



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

**EFFECTO DE LA INDUCCIÓN DE ESTRÉS DE RETÍCULO ENDOPLÁSMICO DURANTE EL
PROCESO DE APAREAMIENTO DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

JULIANA BERENICE ROJO RODRÍGUEZ

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. ROBERTO CORIA ORTEGA

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DRA. ROSA ESTELA NAVARRO GONZÁLEZ

Istituto de Fisiología Celular, UNAM

DRA. MARÍA ELENA CHÁNEZ CÁRDENAS

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Ciudad de México. Agosto, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

“Una vez descartado lo imposible, lo que queda, por improbable que parezca, debe ser la verdad”

Sir Arthur Conan Doyle

Agradecimiento

Agradezco especialmente al Dr. Roberto Coria, por dirigir y asesorar este proyecto junto al comité tutorial constituido por la Dra. Rosa Navarro González y la Dra. María Elena Chánez.

A la Dra. Laura Kawasaki Watanabe por su apoyo técnico y académico durante este proyecto.

A la Dra. Laura Ongay Larios, la M. en C. Minerva Mora Cabreray la Lic. Guadalupe Codiz Huerta, miembros de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular por asesoría técnica y excelente servicios.

Al Lic. Gerardo Coello, la M. en C. María Escalante y a Juan Manuel Barbosa Castillo miembros de la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular por atender solicitudes de servicio por parte del laboratorio 124 nte, manteniendo nuestros equipos operando de forma satisfactoria.

Ing. Manuel Ortíz Benavides Ing. Aurey Galván Lobato, por el excelente servicio que siempre nos brindaron

A la Dra. María Teresa Lara Ortiz por su gran disposición y apoyo en proporcionarnos cepas que se utilizaron en este ensayo.

A la Dra. Ruth Rincón Heredia y al Dr. Abraham Rosas Arellano, miembros de La Unidad de Imagenología del Instituto de Fisiología Celular por su gran apoyo técnico, capacitación y el excelente servicio que siempre nos brindaron.

Al Posgrado de Ciencias Bioquímicas de la UNAM y a los organismos que financiaron este proyecto: CONACyT (Proyecto No. CB-254078), PAPIIT, DGAPA, UNAM (Proyecto No. IN210616), a la UNAM y al posgrado de Ciencias Bioquímicas por haberme brindado un lugar para consolidar mi formación académica y al CONACyT por la beca otorgada (No. Becario: 517025987).

Agradecimiento personal.

Dr. Roberto Coria, mi gratitud y cariño por su infinita paciencia y profesionalidad, por el tiempo que dedica a esta hermosa profesión y a nosotros sus aprendices. Le agradezco todo el apoyo brindado, incluso desde antes de llegar a este laboratorio.

Dra. Laura Kawasaki, muchas gracias por el apoyo que nos brindas en lo profesional y personal.

Iris, Abiram, Gris, Diana, Mariana, Eunice, Andrés y Kevin, en mi corazón solo puede haber agradecimiento hacia vosotros porque sois como una familia para mí. Por las risas, por los consejos académicos como personales, por hacer del laboratorio 124nte un segundo hogar para mí.

Dra. Laura Ongay Larios, Lic. Lupita Codiz Huerta y Gerardo Coello quiero expresarles mi más sincero agradecimiento por hacerme sentir en confianza y por su apoyo brindado durante este tiempo

“La mayoría de la gente dice que es el intelecto lo que hace a un gran científico. Están equivocados: es el carácter.” Einstein

A mi familia:

Gracias mamá por tu gran amor y apoyo incondicional, a pesar de la distancia nunca te sentí lejos. Gracias papá por ser mi superhéroe y mi mejor ejemplo a seguir. Por enseñarme el camino recto que los hombres buenos siguen y por dar todo por mí. Los amo. Jazmín Rojo, Vania Rojo aunque sean diferente a mí, lejos de hacerme un mal, su existencia enriquece y le da sentido a mi vida. Gracias

Un especial agradecimiento a mi mejor amigo; la persona que le ha tocado lidiar con mi estrés, ansiedad y mal humor. A pesar de ello sigues aquí, siempre aconsejándome y mostrándome el mejor camino a seguir. Gracias por ser mi guía, por detenerme cuando debías y empujarme cuando tenía miedo de seguir mis sueños, mil gracias Alonso!

Índice de abreviaturas

IPTG Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

LB Luria Bertani

YPD *Yeast extract Peptone Dextrose*

MAPK *Mitogen-Activated Protein Kinases*

Tris Tris (hidroximetil) aminometano

DMSO Dimetilsulfóxido

EDTA *Ethylenediaminetetraacetic acid*

Tn Tunicamicina

2-DOG 2-desoxi-D-glucosa

CFP Cyan Fluorescent Protein

GFP *Green Fluorescent Protein*

WT Wild Type

ROS *Reactive Species of Oxygen*

RE Retículo Endoplasmático

ERE Estrés de Retículo Endoplasmático

RF Respuesta a Feromona

Índice

I RESUMEN	1
II ABSTRACT	3
III INTRODUCCIÓN	4
3.1 Ciclo celular.....	4
3.1.1. Reproducción sexual.....	5
3.1.2. Vía de respuesta a feromona.....	5
3.1.3. Módulo MAPK en el apareamiento.....	6
3.1.4. Participación de la proteína G en la vía de apareamiento.....	7
3.1.5. Variabilidad funcional del Módulo de las MAPKS.....	8
3.2 Retículo endoplasmático	9
3.2.1. Respuesta a proteínas mal plegadas.....	10
3.2.2. N-glicosilación.....	12
3.2.3. Inductores de estrés de RE.....	13
3.2.4. Modificaciones lipídicas post-traduccionales.....	13
IV ANTECEDENTES	15
V. OBJETIVOS	17
VI.HIPOTESIS	18
VII. MATERIAL Y MÉTODOS	19
Medios de cultivos.....	19
Construcción de la mutante del gen <i>GPA1</i>	20
Construcción del reportero para la vía de respuesta a feromona: Fus1-mRuby.....	21
Construcción del reportero para la vía UPR.....	23
Mutante condicional $G\alpha\Delta$ [$G\alpha$].....	25
Construcción de GFP-Ste18p y su localización.....	25
Ensayo de sensibilidad a inductores de estrés.....	28
Ensayo de competencia entre inductores de estrés y feromona α	28
Extracción de ADN cromosómico.....	28
Ensayos de apareamiento.....	29
Transformación de <i>E. coli</i>	29
Purificación de plásmido.....	29
PCR.....	30
Purificación de DNA a partir de gel de agarosa.....	30
Transformación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
Ensayo de viabilidad	31
Citometría de flujo.....	32
VIII. RESULTADOS	33
Formación del <i>shmoo</i> en respuesta a feromona.....	33
Fus1p se expresa y se localiza en el <i>tip</i> del <i>shmoo</i> en respuesta a la feromona α	34

Efecto de la Tn y 2-DOG en la morfología y viabilidad de las células.....	34
<i>KAR2</i> se expresa en respuesta a inductores de estrés.....	36
La Tn y 2-DOG inhiben la formación del <i>shmoo</i> en respuesta a la feromona α	38
Efecto de los inductores de estrés de RE en la expresión de Fus1p.....	39
La expresión de FUS1 se inhibe cuando se induce estrés de RE previamente al estímulo de la feromona.....	41
La subunidad $G\alpha$ no participa en la respuesta a inductores de estrés de RE.....	42
Los inductores de estrés de RE revierten la letalidad de una mutante $\Delta G\alpha$	43
La localización mebranal de Ste18p se bloquea en condiciones de estrés de RE.....	45
IX DISCUSIÓN.....	47
XI CONCLUSIONES	52
X. PERSPECTIVAS.	53
XII ANEXOS.....	54
XIII REFERENCIA.....	56

I RESUMEN

En la levadura la vía de apareamiento entre células haploides de sexos opuestos se activa ante la presencia de feromona. Esta respuesta es mediada por la proteína G, que se compone de tres subunidades diferentes; $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, cada una de las cuales son indispensables para activar la vía que culmina en la formación de una célula diploide. En la levadura el proceso de apareamiento cumple con dos aspectos distintos. Por un lado la inducción de la transcripción de genes necesarios para la fusión de las células, por otro lado, el quimiotropismo de la célula que conduce a la polarización para dar lugar a una forma celular la cual se le conoce como *shmoo*.

En este trabajo se encontró que una cepa silvestre de *S. cerevisiae* no es capaz de responder al apareamiento cuando se le induce estrés de retículo endoplasmático (ERE). Se observó por microscopia de fluorescencia la capacidad de la célula para activar la vía de apareamiento, mediante la transcripción de la proteína reportera Fus1p etiquetada con mRuby2, además también se observó la respuesta quimiotrófica que conduce a la formación del *shmoo* (morfología). Los resultados indican que cuando el estímulo de feromona y tunicamicina es simultaneo, se inhibe únicamente la formación eficiente del *shmoo*. Sin embargo, cuando existe un ERE previo al tratamiento con feromona, tanto la transcripción de Fus1p como la formación del *shmoo* se interrumpen. Estos resultados indican que la tunicamicina por un lado inhibe de manera casi inmediata, procesos que están implicados con la morfología de la pared celular durante el apareamiento, por otro lado, su efecto prolongado afecta la transcripción de genes como Fus1p. Encontramos que la subunidad $G\gamma$ (la cual participa en traducir la señal inicial de la cascada de apareamiento), se disocia de la membrana celular en condiciones de ERE

Los resultados indican que cuando el ERE se vuelve prolongado y se activa la vía de apareamiento con feromona, esta proteína se disocia de la membrana y se va al citoplasma formando pequeños agregados. Esto puede explicar el por qué la célula ya no es capaz de

responder a la activación de genes que son requeridos para el apareamiento, como la proteína reportera Fus1p.

Sugerimos que la tunicamicina además de inhibir la N-glicosilación también afecta la farnesilación de la subunidad Gy, la cual es una modificación lipídica estrictamente necesaria para la formación del dímero Gβγ (efectores de la vía de apareamiento).

II ABSTRACT

In yeast the mating response pathway between opposite sex haploid cells is activated by the presence of pheromone, this response is in turn triggered by a G protein, which is composed of three different subunits: $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$, each one of them is essential to activate the pathway that culminates in the formation of a diploid cell. The same mating process fulfills two different aspects; on one hand, the gene transcription of elements necessary for cell fusion, and on the other hand, the cell's chemotropism which leads to polarization and formation of a cellular shape known as *shmoo*. In this work we have found that a wild type strain of *Saccharomyces cerevisiae* is incapable of activate its mating response pathway when it is subjected to endoplasmic reticulum stress (ER stress). We observed both the cell's ability to activate the mating response pathway through the transcription of the reporter protein Fus1p tagged with mRuby2, as well as its chemotropic response leading to the formation of *shmoo* (morphology) cells. The results indicate that when the pheromone and tunicamycin stimuli are simultaneous, efficient *shmoo* formation is inhibited. However, when cells are subjected to ER stress before to pheromone treatment, both the transcription of Fus1p and the formation of the *shmoo* are interrupted. Another aspect of these results is that tunicamycin inhibits almost immediately the processes of cell wall biogenesis during mating, while its long term effect is on the gene transcription such as Fus1p. We have also observed that the $G\gamma$ subunit (which is involved in transducing the mating signal) is delocalized from the cell membrane during ER stress conditions.

These results indicate that when reticule stress is prolonged for too long and the pheromone mating response pathway is activated, it is disassociated from the membrane and reaches the cytoplasm forming small aggregates. This may explain why the cell is no longer able to respond to the activation of genes that are required for mating, such as the Fus1p reporter protein.

These results indicate that when the pheromone response pathway is activated during ER stress the $G\gamma$ subunit dissociates from the membrane and reaches the cytoplasm forming small aggregates. This may explain why the cell is no longer able to respond to the pheromone stimulus and fails to activate transcription of genes required for mating.

The results suggest that in addition to inhibit N-glycosylation, tunicamicyn also affects the farnesylation of the $G\gamma$ subunit, which is a lipid modification strictly necessary for the formation of functional $G\beta\gamma$ dimer required to activate the mating pathway.

III INTRODUCCIÓN

3.1 Ciclo celular

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un ascomiceto que tiene un metabolismo facultativo, es decir, puede crecer tanto en condiciones respiratorias como en condiciones fermentativas.

S. cerevisiae puede existir en forma haploide o diploide. Las células haploides son de dos tipos sexuales: MAT α y MAT a las cuales tienen la capacidad de aparearse para producir un tercer tipo celular, diploide, denominado a/ α . Tanto las células haploides como las diploides pueden reproducirse de manera asexual por gemación (Herskowitz, 1988) (**Figura1**).

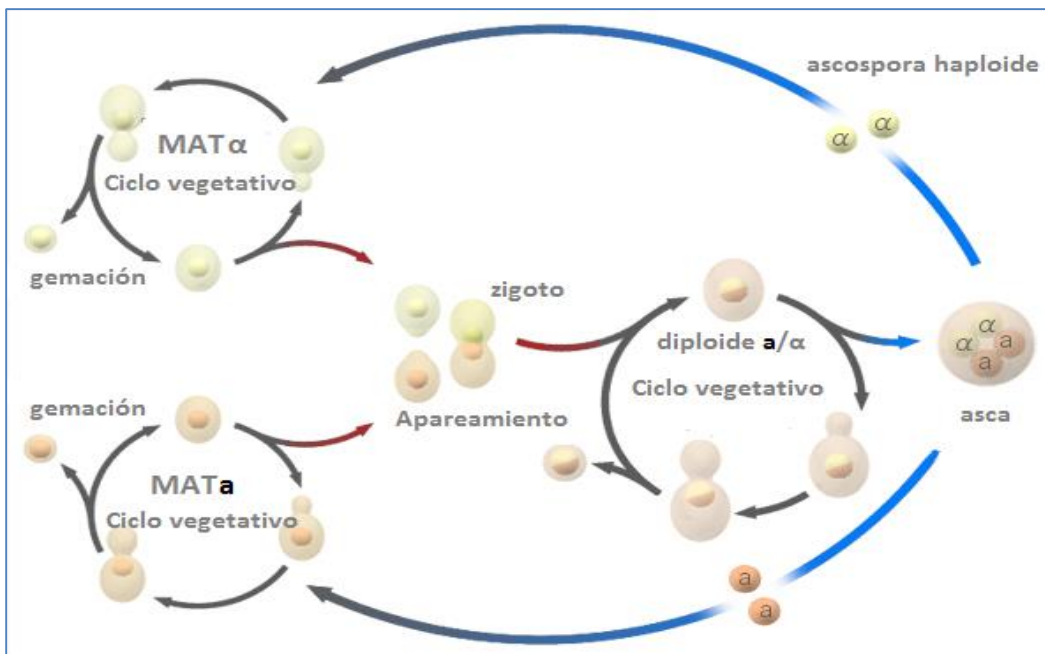


Figura 1. Ciclo de vida de *S. cerevisiae*. Durante el ciclo vegetativo los individuos haploides (MAT a y MAT α) y diploides se reproducen por gemación. En la reproducción sexual, las células MAT a y las células MAT α se aparean para formar una célula diploide, el cual puede continuar con su ciclo vegetativo y en condiciones desfavorables también puede entrar en meiosis (esporular) y producir nuevos individuos haploides a y α .

3.1.1. Reproducción sexual

Para llevar a cabo su reproducción sexual las células haploides de tipo sexual α producen una feromona denominada factor α , mientras que las de tipo sexual **a** producen el factor **a** (Singht *et al.*, 1983; Michaelis y Herskowitz, 1988; Sindrauski, 1997). Cada célula expresa en su membrana plasmática un receptor de siete dominios transmembranales específico para la feromona del sexo opuesto. Al receptor para la feromona α se le conoce como Ste2 y al receptor de la feromona **a** como Ste3p. Estos receptores están acoplados a una proteína G heterotrimérica. Ambas células secretan su respectiva feromona la cual se une al receptor de la célula de sexo opuesto. Esto activa una cascada de fosforilaciones cuyo efecto es el arresto celular en la fase G1, la inducción transcripcional de los genes implicados en el apareamiento y cambios morfológicos en la célula (Dietzel y Kurjan, 1987).

3.1.2. Vía de respuesta a feromonas

La proteína G está encargada de modular la respuesta de apareamiento y estructuralmente consta de tres subunidades: $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ las cuales son codificadas por los genes *GPA1*, *STE4* y *STE18* respectivamente. Durante el apareamiento la unión de la feromona al receptor estimula a $G\alpha$, la cual intercambia GDP por GTP, y esto a su vez conduce a su disociación del dímero $G\beta\gamma$ el cual transmite la señal al módulo de proteínas cinasas (MAPKs). Estas finalmente modulan la expresión de genes específicos para el apareamiento (Figura 2) (Dietzel y Kurjan, 1987; Merlini *et al.*, 2013). La subunidad $G\gamma$ ancla al dímero $G\beta\gamma$ a la membrana plasmática a través de grupos lipídicos (farnesilo y palmitoilo) (Manahan *et al.*, 2000). $G\beta$ transmite la señal a los efectores de la vía lo cual incluye la autofosforilación de Ste20p mediante la exposición de un dominio cinasa localizado en su extremo C-terminal.

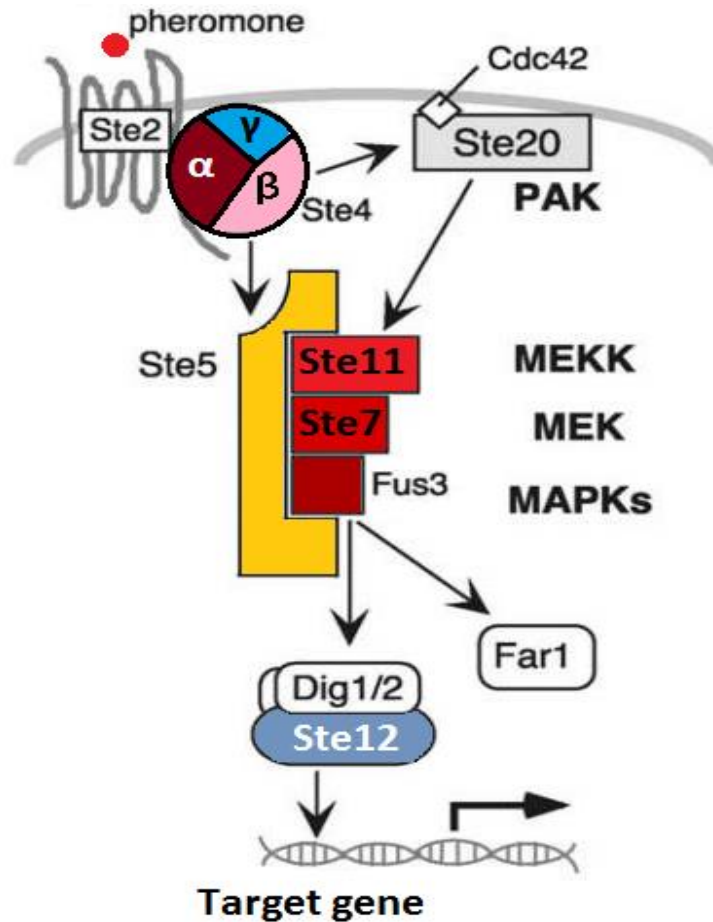


Figura 2. Componentes de la vía de respuesta a feromona. La feromona es capturada por el receptor (Ste2p o Ste3p), que estimula un cambio de GDP por GTP en la subunidad G α . Cuando el GTP está unido a G α el dímero G $\beta\gamma$ se separa y activan proteínas efectoras que transmiten una señal para detener el ciclo celular en la fase G1 y para activar los genes diana que son requeridos para el apareamiento (Bardwell, 2005). El módulo MAPK es activado por Ste20p de manera descendiente hasta activar Fus3p que se separa del complejo para activar al factor de transcripción Ste12p, que activa genes necesarios para el apareamiento.

3.1.3. Módulo MAPK en el apareamiento

El módulo MAPK es un conjunto de tres proteínas cinasas, que actúan en secuencia. En la vía de apareamiento de levadura, estas cinasas están codificadas por los genes *STE11* (MAPKKK), *STE7* (MAPKK) y *FUS3/KSS1* (MAPK) y están asociadas a la vía de respuesta a feromona a través de Ste5p que es una proteína de andamiaje. Ste5p une al dímero G $\beta\gamma$ y

a Ste20p al módulo de las MAPKs. De esta manera Ste20p fosforila a Ste11p, la cual activa a Ste7p por la fosforilación de dos residuos de serina. Ste7p entonces activa a la MAPK Fus3p por medio de la fosforilación de un residuo de treonina y una de tirosina (Bardwell, 2005). Fus3p se disocia del complejo de MAPK cinasas y entonces activa por fosforilación a Ste12p, el cual es un factor de transcripción cuyo dominio de unión a DNA reconoce a elementos PRE (*pheromone response element* por sus siglas en inglés), los cuales se localizan en la región promotora de los genes requeridos para el apareamiento (McCaffrey *et al.*, 1987; Kirkman *et al.*, 1993; Chou *et al.*, 2006). Ste12p es un factor de transcripción que responde a dos estímulos diferentes; por un lado, responde a las feromonas de apareamiento, y por otro participa en el crecimiento invasivo que se da en condiciones de estrés nutricional. La actividad de Ste12p está regulada por las proteínas Dig1p y Dig2p.

Además de activar a Ste12p, Fus3p también fosforila a Far1p. Esta proteína es inhibidora de cinasas dependientes de ciclina. Far1p inactiva los complejos Cdc28/Cln2, causando arresto celular en la fase G1. Por su parte, en respuesta a feromona Far1p también forma un complejo con Cdc42 el cual se mueve desde el núcleo al citoplasma e interactúa con Cdc24 y el dímero G $\beta\gamma$. Esto promueve el crecimiento de la célula en la dirección de la feromona para promover el apareamiento (Chang y Herskowitz, 1990; Peter *et al.*, 1993; Valtz *et al.*, 1995; Merlini *et al.*, 2013). Este crecimiento polarizado conduce finalmente a la formación del gameto o *shmoo* (Elion, 2000). Las células del sexo opuesto que han adquirido esta morfología entran en contacto y se fusionan para generar una célula diploide. Durante este proceso uno de los genes que se transcriben más abundantemente es *FUS1* el cual codifica para una proteína requerida para la fusión membranal. Fus1p se acumula en el *tip* del *shmoo* (McCaffrey *et al.*, 1987; Chou *et al.*, 2006).

3.1.4 Participación de la proteína G en la vía de apareamiento

La inactivación de las subunidades de la proteína G tiene efectos importantes en el proceso de apareamiento de las células (Nakayama *et al.*, 1985; Schrick *et al.*, 1997). Por un lado la delección en el gen *GPA1* que codifica para la subunidad G α produce letalidad debido a que se disocia del dímero G $\beta\gamma$, el cual se activa constitutivamente. Esto conduce a la activación

permanente de la vía de señalización y por consiguiente a la interrupción del ciclo celular en la fase G1. Esto implica que la subunidad G α es esencial en el crecimiento vegetativo de las células haploides y que funciona como un elemento regulador negativo de la vía de apareamiento (Dietzel y Kurjan, 1987; Miyajima *et al.*, 1987). Las subunidades G β y G γ por su parte, se requieren para activar la cascada, y esto lo hacen como un dímero indisociable (Leberer *et al.*, 1992). La actividad de este dímero se puede inhibir con la delección de solo uno de los genes que codifican para estas proteínas, *STE4* (G β) o *STE18* (G γ). Una mutante de G β es estéril, ya que esta proteína se encarga de interactuar con los efectores de la vía. El mismo efecto se obtiene en una mutante carente de la subunidad G γ . Esta tiene la función de anclar a la subunidad G β a la membrana plasmática mediante sus grupos lipídicos (farnesilo y palmitoilo), por lo que su ausencia o la pérdida de sus grupos lipídicos, impide que el dímero se ancle a la membrana. El dímero soluble es incapaz de transducir la señal por su deficiente interacción con los efectores. Por consiguiente, mutantes de G β y de G γ son viables ya que pueden dividirse vegetativamente pero no pueden reproducirse sexualmente.

Las proteínas de la cascada MAPK que participan en la vía de respuesta a feromona, Ste5, Ste11, Ste7, Ste20 y Fus3, también son necesarias para el apareamiento en *S. cerevisiae* y su inactivación produce esterilidad en mayor o menor grado (Fields y Herskowitz, 1985; Nakayama *et al.*, 1985; McCaffrey *et al.*, 1987; Ramer y Davis, 1993; Schrick *et al.*, 1997).

3.1.5 Variabilidad funcional del Módulo de MAPKs

Los módulos MAPKs se encuentran conservados en todos los organismos eucariontes y participan en la respuesta celular a varias condiciones intra y extracelulares. Funcionan como amplificadores emulando a un interruptor para producir una respuesta celular (Ferrell, 1996).

En *S. cerevisiae*, algunos de los componentes de la cascada de MAPKs de la respuesta a las feromonas de apareamiento se emplean en otras vías compuestas también por este tipo de módulos (**Figura 3**) (Herskowitz, 1995; Nagiec y Dohlman, 2012; Baltanas *et al.*, 2013). Ste20p y Ste11p por ejemplo participan también en la vía de respuesta a estrés

hiperosmótico (HOG) (Posas y Saito, 1997). Estas mismas proteínas participan en la vía de crecimiento invasivo y en el desarrollo de pseudohifas, que son un patrón de crecimiento exhibido por células haploides y diploides respectivamente que se genera en respuesta a la privación de nutrientes (Elion, 2001). La MAPKK Ste7p participa también en la vía de crecimiento invasivo. Esta cinasa activa a Fus3p en la respuesta a feromonas y a Kss1p durante la depleción de nutrientes (Saito, 2010).

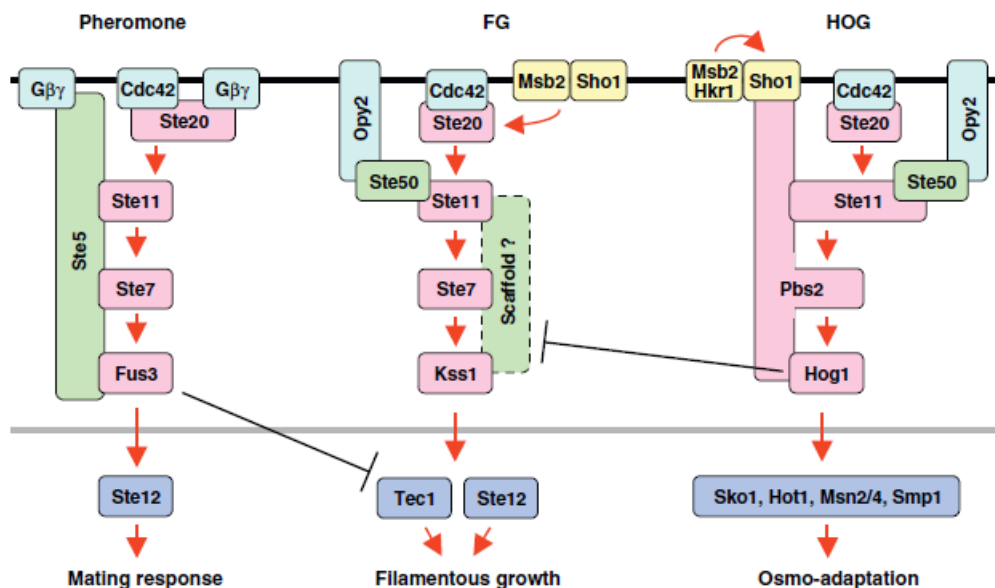


Figura 3. Cascada MAPK. Tres vías en *S. cerevisiae* utilizan una MAPKKK común denominado Ste11p. El módulo de MAPK de la feromona, la vía de crecimiento invasivo y la vía HOG. Las flechas rojas indican el flujo de la señal, mientras que las barras negras en forma de T indican la inhibición. Línea horizontal negra: membrana plasmática; Línea horizontal gris: membrana nuclear (Saito, 2010).

3.2 Retículo endoplasmático

El retículo endoplasmático (RE) es el organelo donde se lleva a cabo la síntesis de proteínas, su plegamiento y su glicosilación, así como la síntesis de lípidos y de esteroides. La correcta homeostasis del RE resulta esencial para la célula. En el RE se localizan chaperonas encargadas de catalizar reacciones de plegamiento de las proteínas destinadas a ingresar al tráfico vesicular para secretarse o formar parte de organelos (Kaufman, 1999).

Cuando se altera la homeostasis del RE por diversos factores se produce una acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del retículo. Esto activa una respuesta celular denominada *Unfolded Protein Response* (UPR, por sus siglas en inglés), que tiene como objetivo recuperar el funcionamiento normal del RE. Durante la UPR se activan genes que codifican para chaperonas, para catalizadores de plegamiento, para proteínas encargadas de mediar el transporte a través de membranas y para proteasas que participan en la vía de ERAD (por sus siglas en inglés *Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*) (Kaufman, 1999).

3.2.1. Respuesta a proteínas mal plegadas

La UPR es una respuesta a estrés de retículo endoplásmico (ERE) que está conservada en todos los organismos eucariontes. En mamíferos la UPR consiste en la activación de tres vías que inician con tres sensores localizados en la membrana de RE. Estos sensores son Ire1p, PERK y ATF6. En *S. cerevisiae*, la UPR solo consiste de la rama de Ire1p. Ire1p es una proteína residente del RE que transmite la señal desde el lumen hasta el núcleo. Está compuesta de un dominio luminal, un segmento transmembranal y un dominio citosólico que tiene dos actividades enzimáticas distintas; una actividad cinasa y una de endoribonucleasa (Nikawa y Yamashita, 1992; Fagbenro y Jauncey, 1993; Rupak Chakraborty *et al.*, 2016). El dominio luminal de Ire1p está unido a la chaperona Kar2p, la cual mantiene a Ire1p en un estado inactivo. Kar2p se une a proteínas mal plegadas y de esta manera se disocia de Ire1p. El mismo dominio luminal de Ire1p actúa como un sensor ya que es capaz de unirse con alta afinidad a los aminoácidos hidrofóbicos expuestos de las proteínas mal plegadas (Kimata *et al.*, 2003). La unión de Kar2p a Ire1p, mantiene a ésta última inactiva y en forma monomérica. En presencia de proteínas mal plegadas Kar2p se disocia de Ire1p, y ésta se oligomeriza, se trans-autofosforila y se activa su dominio de endoribonucleasa (Okamura *et al.*, 2000; Pincus *et al.*, 2010). Con su actividad de RNasa, Ire1p procesa al RNA mensajero de HAC1 (HAC1^u). Este procesamiento consiste en la remoción de un intrón no convencional presente en HAC1^u. La formación del RNA mensajero maduro permite su traducción y la síntesis de un factor de transcripción (Hac1p) que activa la expresión de genes de respuesta UPR, entre ellos el mismo *KAR2* (Figura 4) (Sidrauski y Walter, 1997).

Cuando el estrés no se resuelve con la activación de la UPR, se activan alguno de los mecanismos principales de degradación subcelular como el sistema de proteosoma de ubiquitina (UPS por sus siglas en inglés *ubiquitin proteasome system*) y la autofagia. Y cuando se vuelve prolongado eventualmente puede producir un aumento en ROS (por sus siglas en inglés *Reactive oxygen species*) y conducir a la muerte celular.

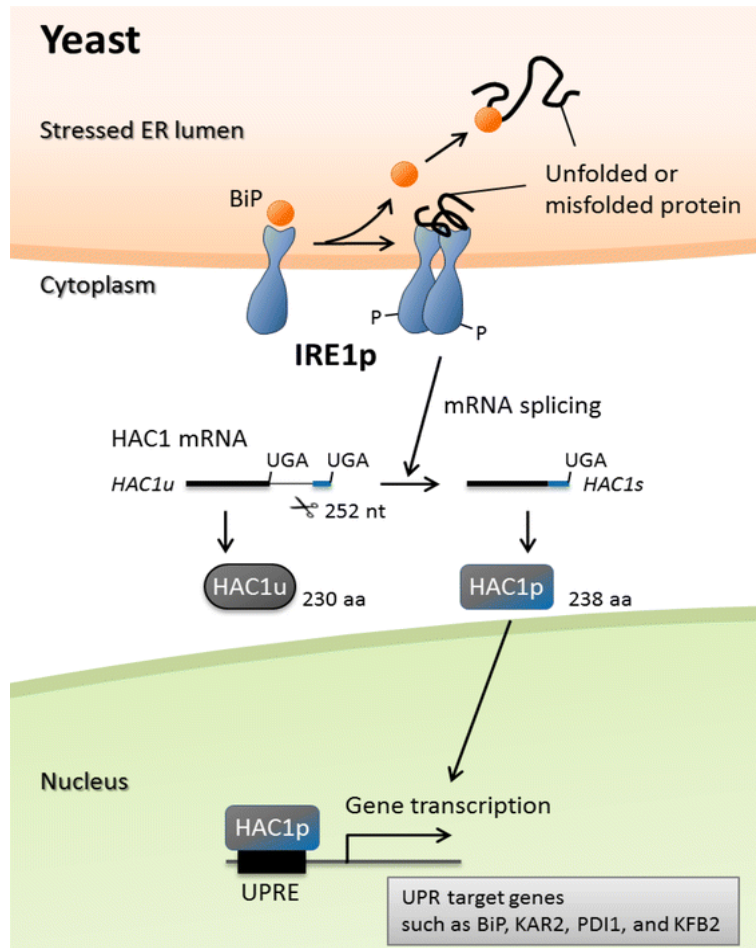


Figura 4. Componentes de la vía UPR. La vía UPR es activada por la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen de RE. Ire1p es activado por la separación de Kar2p, que se une a las proteínas mal plegadas. Esto le permite a Ire1p trans-autofosforilarse y activar el resto de sus dominios (Chakraborty et al., 2016).

3.2.2. N-glicosilación

¿En el RE se lleva a cabo la N-glicosilación de proteínas. En este proceso se adiciona un oligosacárido compuesto de 2 N-acetilglucosaminas, 9 manosas y 3 glucosas (*core*) a un residuo de asparagina de la cadena polipeptídica naciente. Este proceso ocurre consertadamente con el plegamiento de la proteína (Sharma *et al.*, 1981). La síntesis del oligosacárido comienza en la membrana del RE, donde es añadido un residuo de N-acetilglucosamina fosfato, al dolicol fosfato, después se agregan secuencialmente 5 manosas. El oligosacárido unido al dolicol se transloca al lumen del retículo por la acción de la enzima RFT1. La síntesis del core termina en el lumen del RE, donde se agregan otros siete residuos de hexosas (4 manosas y 3 glucosas). Una vez sintetizada esta cadena de oligosacáridos se transfiere a la proteína naciente. Esta modificación permite el adecuado plegamiento de la proteína y su transporte a través del sistema vesicular (**Figura 5**) (Tanner y Lehle, 1987).

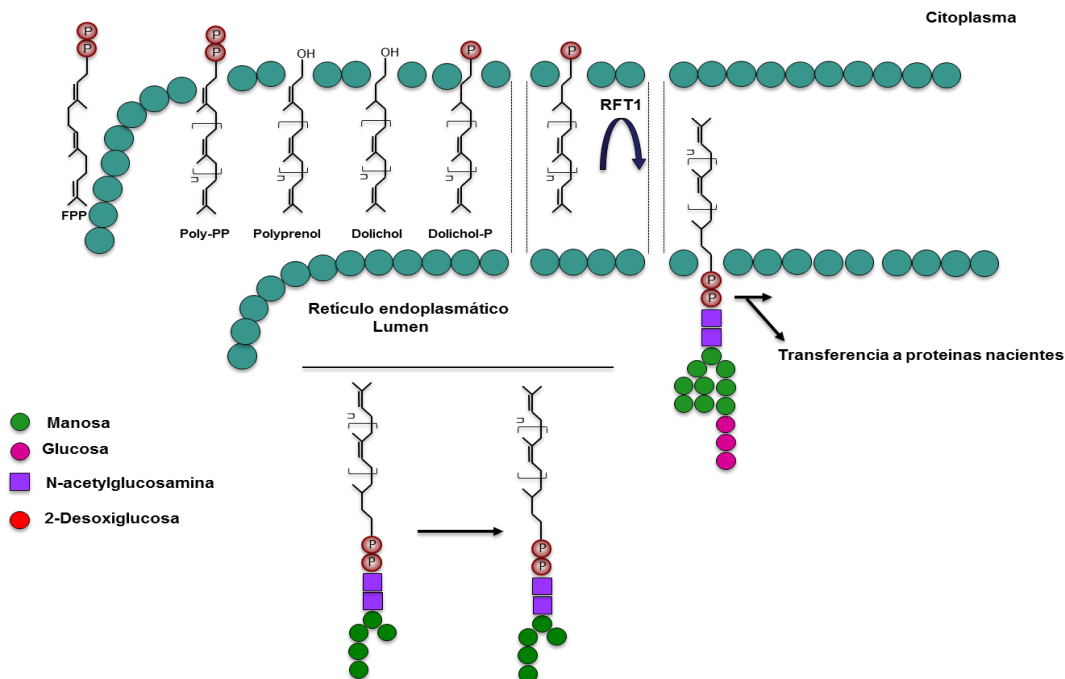


Figura 5. Plegamiento de proteínas y N-glicosilación en el RE. Se muestran los pasos para la formación del árbol de glicosilación en el RE. El árbol de glicosilación comienza con la fosforilación del dolicol, seguido por la adición de una N-acetilglucosamina-fosfato y la adición secuencial de una N-acetilglucosamina y cinco manosas. Este pre-árbol es

translocado de la cara citoplasmática del RE y al lumen, donde finaliza su construcción con la adición secuencial de cuatro manosas y tres glucosas. El árbol de glicosilación es incorporado de manera cotraduccional a los polipéptidos dentro del RE (modificado de Cantagrel, *et al.*, 2010).

3.2.3. Inductores de estrés de RE

Cuando se altera la homeostasis del RE por diversos factores, como pueden ser la depleción de calcio, los defectos en la vía de degradación asociada al RE (ERAD), los defectos en el plegamiento de proteínas por la inhibición de la N-glicosilación, etc., se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del RE activando la UPR.

En el laboratorio se utilizan diferentes drogas para inducir el estrés de retículo; dos de las más usadas son la tunicamicina (Tn) y la 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG). Ambas son inhibidores de la N-glicosilación, ya que bloquean la formación del polisacárido que se transfiere a las proteínas en el RE. La Tn inhibe a la enzima Alg7, la cual cataliza la transferencia de la UDP-N-acetilglucosamina al dolicol fosfato. Este es el primer paso en la formación del polisacárido (Lehle y Tanner, 1976). La 2-DOG es capaz de incorporarse al polisacárido naciente ya que es un análogo estructural de la glucosa. La ausencia del grupo OH en posición 2' impide la posterior incorporación del resto de los monosacáridos por lo que el polisacárido queda trunco y no puede ser transferido a las proteínas nacientes. En ambos casos, los defectos en la glicosilación de las proteínas provocan defectos en su plegamiento y su acumulación en el RE generando estrés.

3.2.4. Modificaciones lipídicas post-traduccionales

En el RE también se llevan a cabo modificaciones postraduccionales como la farnesilación y palmitoilación de proteínas que les ayudan a anclarse a diferentes membranas. La subunidad G γ de la proteína G es inusual entre las subunidades G γ porque está se farnesila en la cisteína 107 y es tioacilada en la cisteína 106, lo que le permite anclarse a la membrana plásmatica (en forma de heterodímero con G β) en la vecindad del receptor de la feromona.

Las proteínas que son farnesiladas presentan en su extremo carboxilo una secuencia consenso denominada CAAX la cual consiste en una cisteína, dos aminoácidos alifáticos y un aminoácido cualquiera. En el residuo de cisteína ocurre la adición del grupo farnesilo a través de una serie de pasos. El primero es el reconocimiento del CAAX y la adición del farnesil-pirofosfato en la cisteína por la actividad de la Ftasa (farnesil transferasa). El segundo es la proteólisis de la secuencia AAX que cataliza la proteasa RCE1; y el tercero es la metilación del grupo farnesilo, lo que aumenta su hidrofobicidad y que realiza por una isoprenil cisteína metiltransferasa (IcmT) (**Figura 6**). La delección de uno de los residuos del motivo CAAX, o el cambio de la cisteína, genera una deficiencia en la farnesilación y la inactivación de la subunidad de Gy con el efecto de generar esterilidad en *S. cerevisiae* (Lu *et al.*, 2014; Manahan *et al.*, 2000).

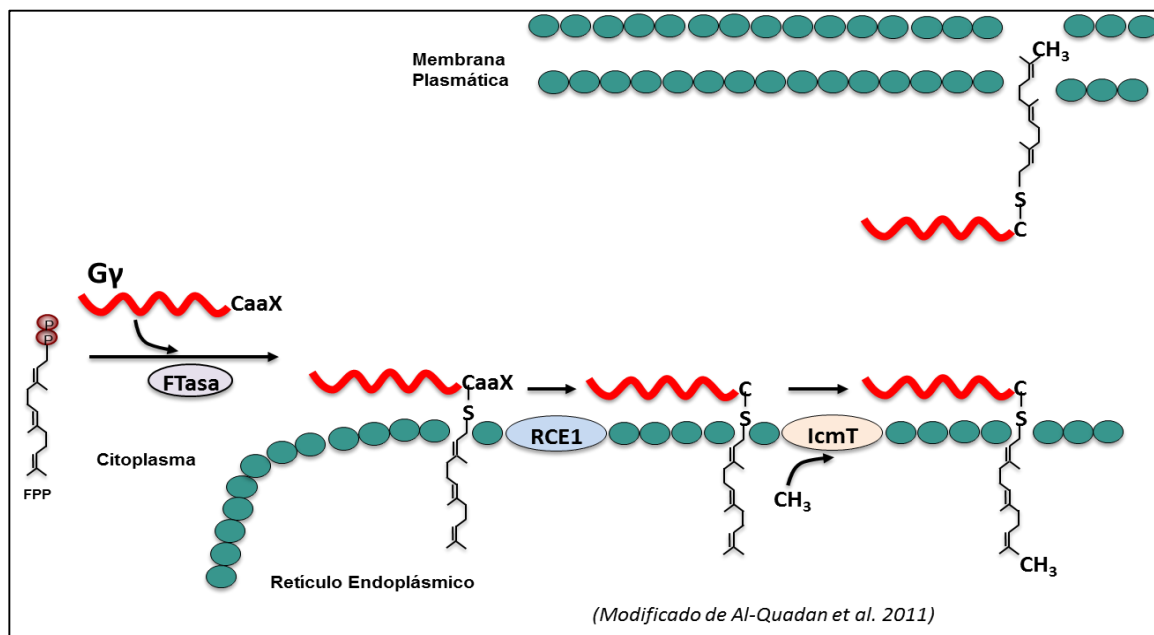


Figura 6. Mecanismo postraduccional (farnesilación) de la subunidad Gy, en RE. Reconocimiento y adición del farnesil pirofosfato por una Ftasa en cisteína 107 de la secuencia CAAX (una secuencia de aminoácidos específica en el C-terminal que consta de una cisteína, dos residuos alifáticos y una aminoácido cualquiera), una prenilpeptidasa proteoliza la secuencia CAAX, liberando AAX. Por último una isoprenil cisteína metiltransferasa metila el extremo C-terminal para aumenta la hidrofobicidad de dicho extremo.

IV. ANTECEDENTES

Se ha observado que la proteína G heterotrimérica está implicada en la muerte celular asociada a la respuesta a proteínas mal plegadas en *Arabidopsis* (Wang *et al.*, 2007). En este trabajo se demostró que la ausencia de la subunidad G β genera resistencia a agentes inductores de ERE como la tunicamicina.

En nuestro laboratorio hemos visto que mutantes de las subunidades G β y G γ de la proteína G heterotrimérica de la levadura *S. cerevisiae* no muestran efectos en el crecimiento en medios con 2DOG, lo que sugiere que aparentemente no tienen una participación directa en la respuesta al ERE.

En el laboratorio también observamos que una cepa silvestre expuesta simultáneamente a feromona de apareamiento y a 2DOG muestra una inhibición en la respuesta a feromonas conforme se incrementa la concentración del inductor de estrés. Esto medido a través de la detección de la proteína híbrida *Fus1*-GFP y de la formación del *shmoo* (**Figura 7**). La inhibición de la respuesta a feromonas de apareamiento conforme aumenta el estrés de RE sugiere que la proteína G o algún componente de la vía de respuesta a feromonas pierden actividad hasta generar esterilidad.

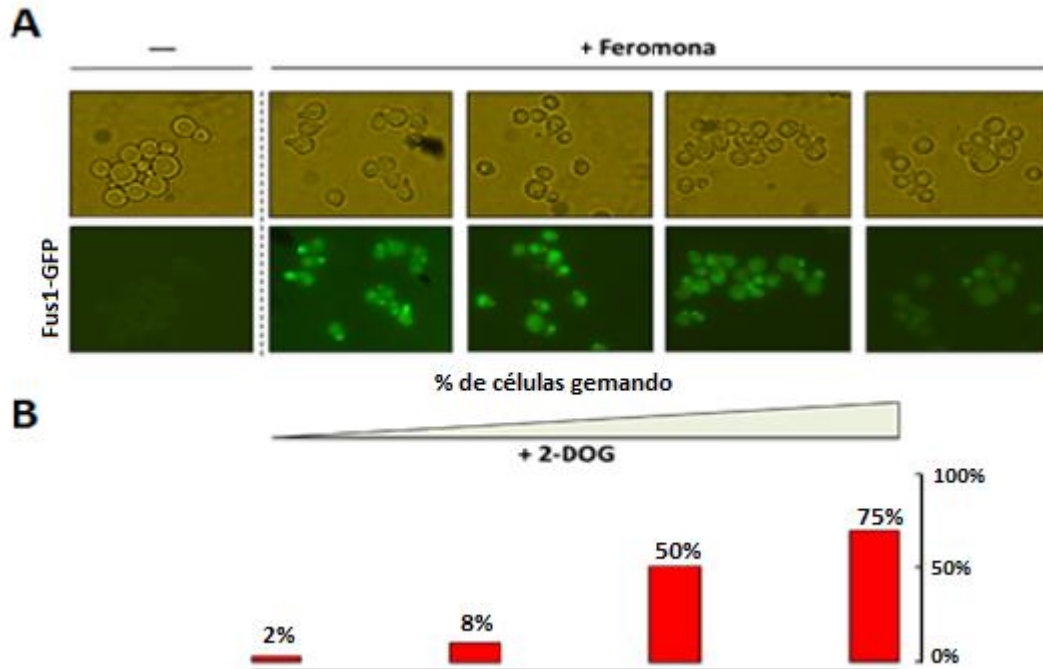


Figura 7. Respuesta de *S. cerevisiae* al estímulo simultáneo de feromona y 2-DOG. **(A)** Imágenes por microscopía de epifluorescencia de células que expresan Fus1p etiquetado con GFP. **(B)** Gráfica que muestra el incremento en el porcentaje de células gemenates a una mayor concentración de 2-DOG.

En este trabajo nos interesa determinar cuál es la respuesta fisiológica a tratamientos simultáneos con inductores de estrés de RE y con la feromona de apareamiento y si en esta respuesta está implicada la proteína G heterotrimérica. Particularmente nos preguntamos si la subunidad $G\alpha$ participa en este proceso y qué efectos puede tener la inducción de estrés en la actividad y localización de la subunidad $G\gamma$.

V. OBJETIVOS

General:

Determinar la respuesta celular de la levadura a la inducción simultánea del apareamiento y de estrés de retículo endoplásmico y definir el papel de la proteína G heterotrimérica en esta respuesta.

Específicos:

- Determinar si la subunidad $G\alpha$ participa en la respuesta a inductores de estrés de RE.
- Determinar la respuesta fisiológica a tratamientos simultáneos con feromona e inductores de ERE, mediante reporteros de la UPR y de la vía de respuesta a feromonas de apareamiento.
- Determinar la localización de la subunidad $G\gamma$ en respuesta a inductores de ERE.

VI.HIPÓTESIS

Las funciones de RE están interconectadas, defectos en cualquiera de estas funciones induce la pérdida de la homeostasis de este organelo. El estrés de retículo endoplasmático inducido por tunicamicina o 2-DOG induce la pérdida de la homeostasis, incluyendo la inhibición de otros procesos postraduccionales que también ocurren en el RE, como es el caso de la prenilación. Esta es una modificación lipídica postraducciona que facilita la unión de proteínas a las membranas celulares como es el caso de la subunidad Gy necesaria para activar la cascada de respuesta a feromona, y de Cdc42 una GTPasa esencial para el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS

Medios de cultivos

Las células de levadura se crecieron a 30°C en medio YPD líquido (extracto de levadura 1% peptona 2% y glucosa 2%), en medios sintéticos (base nitrogenada sin aminoácidos 0.69% y 2% glucosa), suplementados con una mezcla de aminoácidos (adenina, triptófano, histidina, arginina, metionina, isoleucina lisina y uracilo), para hacer posible el crecimiento de las células y mantener la selección del plásmido. Las células de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio LB con ampicilina (0.1mg/ml). Las cepas de levaduras y de bacterias empleadas en este trabajo se enlistan en la tabla I.

Tabla I. Cepas utilizadas durante la realización de este trabajo.

Cepa	Genotipo
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 (Φ80 lacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 GM33. LAM-IN (rrnD-rrnE)1 dam-3 sup-85</i>
70	<i>MATα; thr3</i>
W303-1A	<i>MATα ade2 his3 trp1 ura3 can1-100</i>
W303-1A ΔGβ	<i>MATα; ade2 his3 leu2 trp1 can1-100, ste4::URA3</i>
W303-1A ΔGαΔGγ	<i>MATα; ade2 his2 leu2 trp1 can1-100 ste4::URA3 gpa1::clonNAT</i>
By4741	<i>MATα; his3Δ leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>
By4742	<i>MATα; his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
By4741 Ste18-GFP	<i>MATα; his3Δ leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 STE18-GFP clonNAT</i>
By4741 Fus1-mRuby	<i>MATα; his3Δ leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 FUS1-mRuby2 his3</i>

Construcción de la mutante del gen *GPA1*

Elaboración de Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se sintetizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular.

Para crear la delección en el gen *GPA1* ($G\alpha$) en el cromosoma de *S. cerevisiae*, se amplificó el gen *NAT1* utilizando oligonucleótidos híbridos que contienen 45 nt homólogos a regiones que flanquean el gen *GPA1* (Tabla II, **Figura 8**). *NAT1* se amplificó a partir del plásmido pAG25 y fue integrado al genoma por recombinación homóloga (Figura 10). Con esto se sustituye, el gen *GPA1* con el casete de *NAT1*.

Para confirmar la inserción de *NAT1* en el locus *GPA1* del genoma de *S. cerevisiae*, se amplificó esta región usando oligonucleótidos (Fwd: GPA1PRO Rev: GPA1int) que se anclan en una región que antecede al codón de inicio de *GPA1* y en una secuencia interna del ORF de *NAT1*, respectivamente (**Figura 9**).

Tabla II. Secuencia de oligonucleótidos; forward y reverse para la amplificación de *NAT1*, y forward y reverse para confirmar la inserción de mRuby +his en el C-terminal de *FUS1*.

Fwd: NAT1	5' CAATAATCCAGAGGTGTATAAATTGATATATTAAGGTAGGAAATAAGA TCTGTTTAGCTTGCCTT 3'
Rev: NAT1	Fwd:5' AACAGAATTTACGTATCTAAACACTACTTTAATTATACAGTTCCTG AGCTCGTTTTTC GACTCTGG 3'
Fwd:GPA1PRO	5' AGACCAAAGTACTGAGTAGAAGCTA 3'
Rev:GPA1int	5' GAGTACGAGACGACCACGAAGC 3'

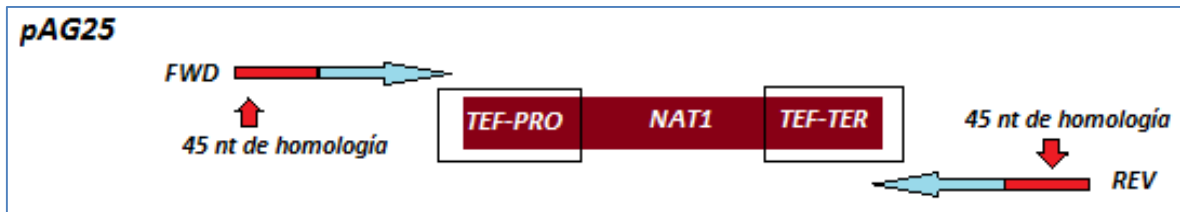


Figura 8. Diagrama del diseño de oligonucleótidos para la amplificación de *NAT1*

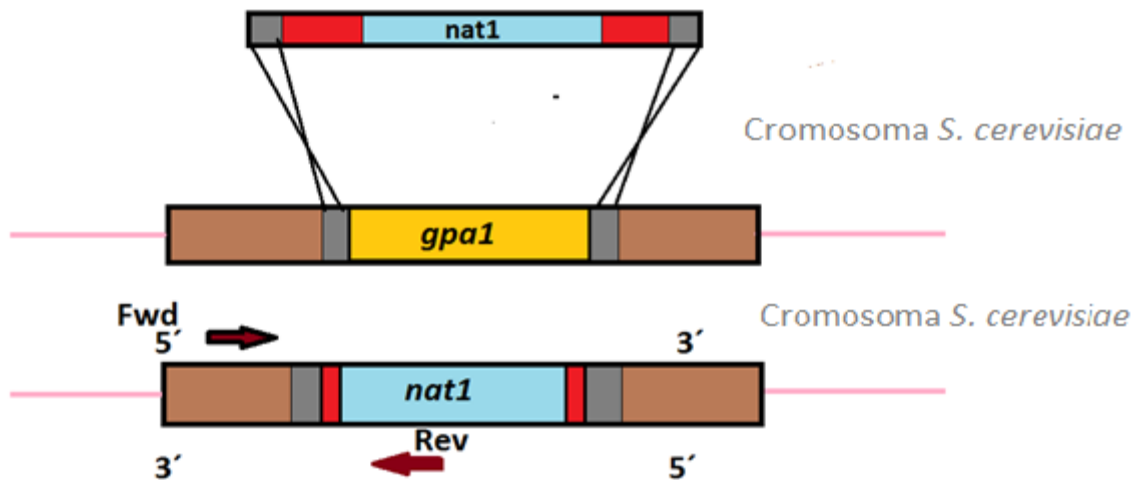


Figura 9. Diagrama del diseño de oligonucleótidos para comprobar la inserción del gen *NAT1* al genoma de *S. cerevisiae*. El oligonucleótido forward se diseñó para amplificar a partir de la región 5' UTR de *GPA1* mientras que el reverse se une al ORF del *NAT1*.

Construcción del reportero para la vía de respuesta a feromona: *Fus1*-mRuby

El gen *FUS1* se etiquetó en el extremo C-terminal con la proteína fluorescente mRuby. Para esto se amplificó el gen de mRuby utilizando oligonucleótidos híbridos que contienen 45nt homólogos antes del codón de parada de *FUS1* y 45nt después (Fwd:mRuby/*FUS1* y Rev:his/*FUS1* 3'utr). A esta construcción además se le agregó el marcador de auxotrofia de histidina como se observa en la **figura 10** y se integró al genoma por recombinación homóloga.

Para confirmar la etiqueta de *FUS1* con la proteína fluorescente, se diseñaron los oligonucleótidos que se muestran en la Tabla III (Fwd: FUS1int y Rev: FUS1 3'utr), los cuales se utilizaron para amplificar un fragmento forward y reverse que va desde una región interna del ORF de *FUS1* (Fwd) hasta su 3'UTR (Rev).

Tabla III. Oligonucleótidos para la confirmación de inserción de mRuby +his en el C-terminal de Fus1p. El oligonucleótido forward se diseñó para amplificar a partir ORF interno de *FUS1*, mientras que el reverse se une a la región 3'UTR del mismo gen.

Fwd:mRuby/FUS1	5'GAAGATAGAGGCATTGTGCCTGGTGACTGTCTCCAAGAATACGAC TGAATCGGTGACGGTGCTGGTTA
Rev:his/FUS1 3'utr	5'ATATAAGTACAGAATTATAGGTATAGATTAATGCGAACGTCAATT GGATGGCGGCGTTAGTATCG 3'
Fwd: FUS1int	5' ACGAATCTCCACTATCTCGATGG 3'
Rev: FUS1 3'utr	5'CCTCCAGGTGAAA AGACCTACA3'

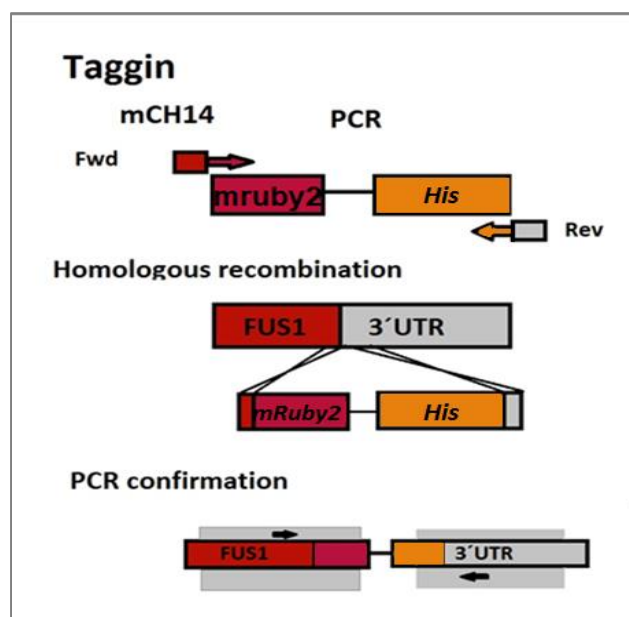


Figura 10. Diagrama del diseño de oligonucleótidos para confirmar que *FUS1* ha sido etiquetado con la proteína fluorescente mRuby2 en el C-terminal.

Construcción del reportero para la vía UPR

El reportero para la vía UPR es *KAR2* del cual se realizó un análisis de la actividad transcripcional de su región promotora. Se diseñaron oligonucleótidos para amplificar 210 nt (-160 al 50) de su promotor. Los primers forward y reverse contienen sitios de restricción *SacI* y *XmaI* respectivamente (**Figura 11**), los cuales se utilizaron para amplificar y clonar el promotor de *KAR2* en el vector monocopia PRS415 de expresión en levadura (**Figura 12**). La región promotora de *KAR2* se insertó río arriba de una secuencia de CFP (Proteína Fluorescente Cian). La actividad transcripcional de la región promotora se determinó mediante la intensidad de fluorescencia de CFP por citometría de flujo.

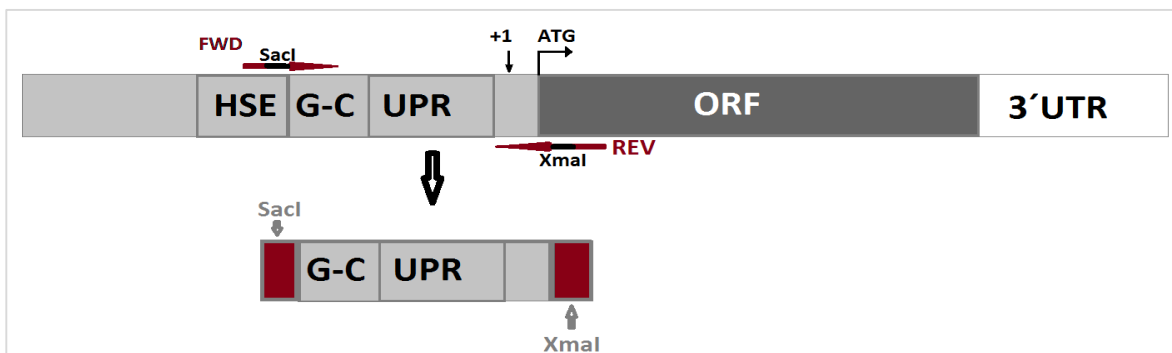


Figura 11. Diagrama del diseño de oligonucleótidos para una parte del promotor de *KAR2* (210 nt). Los oligonucleotidos forward y reverse se diseñaron para contener sitios de restricción para *SacI* en la región 5' y *XmaI* en el 3'. El producto obtenido fue digerido e introducido a un vector de expresión en *S. cerevisiae*.

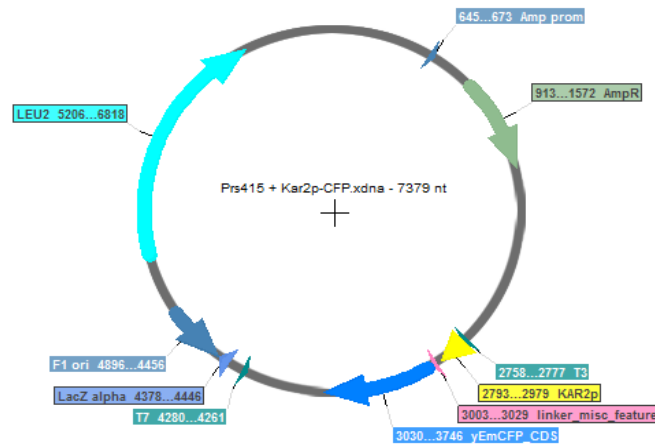


Figura 12. Vector monocópico de expresión en levadura: PRS415, para clonación del promotor *kAR2* (amarillo) ligado a la proteína fluorescente CFP como reportera.

Mutante condicional $\Delta G\alpha$ [$G\alpha$]

La cepa $\Delta G\alpha$ (K258-14D [$G\alpha$]) fue adquirida de construcciones pasadas. Esta no presenta en su genoma la secuencia del gen *GPA1* que codifica para la subunidad $G\alpha$, la expresión de $G\alpha$ está dada por la introducción de un plásmido centromérico que contiene el gen *GPA1* bajo el control del promotor de galactosa, por lo cual únicamente en presencia de esta fuente de carbono se activar la transcripción de $G\alpha$, mientras que en otras fuentes de carbono se deja de transcribir y la vía de respuesta a feromona se mantiene constitutivamente activa, por lo que eventualmente la célula entra en arresto celular y muere.

Construcción de GFP-Ste18p y su localización

Para observar la sub localización de Ste18p se construyó una fusión completa GFP-STE18-NAT1, para esto se amplificaron por PCR las secuencias de codificación de los genes GFP (Fwd: GFP-ste18 5'utr y Rev:GFP-ste18), *STE18* (Fwd: STE18-gfp y Rev:STE18-nat1) y *NAT1* (Fwd:NAT1-ste18 y Rev:NAT1- ste18 3'utr). En una segunda PCR se utilizaron como

templado los productos purificados de GFP (715pb) y *STE18* (564). Los primeros 10 ciclos de la reacción se realizaron en ausencia de oligonucleótidos usando una temperatura de fusión (t_m) de 55°C (para que ambos fragmentos linearizaran), después se añadieron los oligonucleótidos: Fwd: GFP-ste18 5'utr y Rev: STE18-nat1 que se muestran en la tabla VIII, y la reacción continuo 25 ciclos más. Al finalizar la reacción se procedió a purificar el producto final de 1279pb (GFP-STE18). En la tercera PCR se usaron como templados los productos purificados de *GFP-STE18* (1279 pb) y de *NAT1* (1200pb). Se realizaron 10 ciclos sin oligonucleótidos (para que ambos fragmentos linearizaran) usando una t_m de 55°C, después de finalizar los 10 ciclos se añadieron los oligonucleótidos: Fwd: GFP-ste18 5'utr y Rev: NAT1-ste18 3'utr y la reacción continuo por 25 ciclos más. Al final se obtuvo la fusión de *STE18* etiquetado en el N-terminal con GFP unidos al casete de resistencia *NAT1* (GFP-STE18-NAT1), que fue integrado al genoma de *S. cerevisiae* por recombinación homóloga (**Figura 13**).

De la misma manera se construyó la fusión de GFP-STE18^{SS}-NAT1, en la cual STE18^{SS} tiene sustituida la cisteína 106 y 107 por dos residuos de serina. A partir del plásmido que contenía el gen STE18^{SS} proporcionado por la Dra. Laura Ongay, se procedió a amplificar por PCR a STE18^{SS} (Fwd: STE18-gfp y Rev STE18^{SS} 3'utr). También se amplificaron las secuencias de codificación de los genes GFP (Fwd:GFP-ste18 5'utr y Rev:GFP-ste18) y NAT1 (Fwd:NAT1 3'utr ste18^{SS}) y se continuo con el mismo procedimiento que el de la construcción GFP-STE18-NAT1.

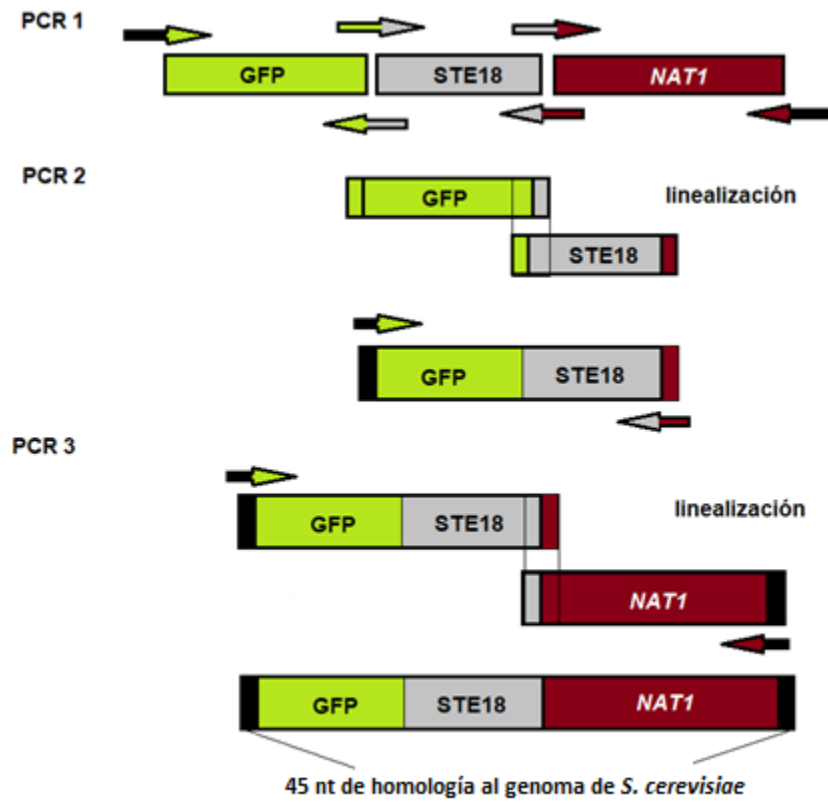


Figura 13. Representación gráfica de la fusión de GFP-STE18-NAT1 por PCR

Tabla IV. Oligonucleótidos utilizados para la construcción GFP-STE18-NAT1 y GPF-STE18^{SS}-NAT1: Nucleótidos sombreados corresponden al linker (IGDGAGLIN) entre GFP y STE18. Los oligonucleótidos marcados con * fueron empleados en la construcción de GFP-STE18^{SS}-NAT1 en lugar de Fwd: NAT1-ste18 y Rev: STE18-nat1

Oligonucleótido	Secuencia 5' -- 3'
Fwd:GFP-ste18 5'utr	5'AGGATAGTAGCAATCGCAAACGTTCTCAATAATTCTAAGAATGAGCAAGGGGGAAGAGTTG 3'
Rev:GFP-ste18	5'TTGTAAGCGTGGAGAGTTTTGAACTGATGT <u>aggacgaccgtgaccgat</u> TTTGTAAGTTCATCCATGCCATG3'
Fwd: STE18-gfp	5'ATAACACATGGCATGGATGAACTTTACAAA <u>atcggtgacggtgctggt</u> ACATCAGTTCAAAACCTCTCCACGC 3'
Rev:STE18-nat1	5'GTGACCCGGCGGGGACAAGGCAAGCTAAACATTTTGAATAAGATATGAACGGAGCCAAAAT 3'
Fwd:NAT1-ste18	5'ATTTTGGCTCCGTTTCATATCTTATTCAAATGTTTAGCTTGCCTTGTCCCCG3'
Rev:NAT1-ste18 3'utr	5'GCTGAATTAATTTTGAATAAGATATGAACGGAGCCAAAATT CGTTTTCGACTTGGATGGCG 3'
Fwd:NAT1 3'utr ste18^{SS}*	5'TGATAGTAATAGAATCCAAAAAAAAAAAAAAAAATACATGCGTTTAGCTTGCCTTGTCCCCG 3'
Rev STE18^{SS} 3'utr*	5'GCATGTATATTTTTTTTTTTTTTGGATTCTATTACTATCA TTACATAAGCGTAGAAGAAAC 3'

Ensayo de sensibilidad a inductores de estrés

Para inducir estrés de RE se usó 2-DOG y tunicamicina a las concentraciones indicadas en las figuras. A partir de un cultivo en fase exponencial ($DO_{600} \sim 0.5$) se hicieron diluciones en serie (1:10). Una alícuota de cada dilución se depositó en cajas petri con medio solido que contenía las drogas. Las cajas se incubaron a 30°C durante 48 hrs.

Ensayo de competencia entre inductores de estrés y feromona α

Para los ensayos de competencia se crecieron células hasta la fase exponencial. Una alícuota con 1.5×10^6 cels/ml se sometió a tratamientos con inductores de ERE y con feromona a las concentraciones y por los tiempos que se indican en las figuras. Las células se fijaron con formaldehído al 4% durante 15 min. Posteriormente se colectaron por centrifugación y se lavaron con buffer de fosfatos 0.1 M. Las muestras fueron montadas en el cubreobjetos con el medio de montaje antidecoloración *ProLong Diamond* de *thermo Fisher* que se aplicó directamente en el pellet de las células en portaobjetos de microscopio. Se determinó la morfología de las células (formación de *shmoo*) y la inducción de genes reporteros por microscopía de luz y microscopía confocal respectivamente.

Extracción de ADN cromosómico

La extracción de ADN se llevó a cabo usando la metodología descrita por (Hoffman y Winston, 1987) con modificaciones. A partir de un cultivo en fase exponencial las células se recuperaron por centrifugación y se re suspendieron en un poco de líquido remanente. La lisis se llevó acabo de la siguiente manera; a las células recuperadas se les agrego QTP (0.2% TritonX-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris-Cl pH 8 y 1mM NaEDTA), perlas estériles y fenol:cloroformo 1:1, se agitaron en vortex durante 2-4 min y se añadieron 200 μ l de agua. La muestra se centrifugó durante 5 min a 12 000 rpm. El sobrenadante se recuperó y se le agregó 1 ml de etanol al 100% y se centrifugó nuevamente. El pellet se resuspendió en 500 μ l de agua y 3 μ l de RNasa (10 mg/ml), la muestra se incubó a 37°C durante 5 min. Se

agregaron 10 μ l de acetato de amonio 4 M y 1 ml de etanol al 70%, se mezcló por inversión y se centrifugó. El pellet se secó y se re suspendió en 50 μ l agua estéril.

Ensayos de apareamiento

Las cepas que se aparearon son: WT y $\Delta G\beta\Delta Gy$ de la w303-1A, y Ste18^{SS} (cepas con mutaciones puntuales en el sitio de farnesilación de la proteína Ste18p) y GFP-Ste18p (cepa que tiene Ste18p etiquetada con GFP en su N-terminal) de la cepa BY4741. Se tomaron colonias individuales de cada cepa MAT α y se crecieron como pequeños parches en cajas petri con YPD solido por 48 horas a 30°C.

A partir de un cultivo en medio líquido de toda la noche se tomaron 150 μ l de células MAT α (cepas 70 y BY4742), y se hizo un césped en una caja petri de YPD sólido y se dejó crecer a 30°C durante 24 horas. Una vez que el césped y los parches crecieron se combinaron por replicación en terciopelos y se transfirieron a una caja con YPD. Se incubaron a 30° C durante 6 horas y se replicaron también mediante terciopelo a medio mínimo selectivo de diploides. Las cajas se incubaron por 48 horas a 30°C. Las imágenes de estos apareamientos se encuentran en anexos.

Transformación de *E. coli*

Las células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* se utilizaron para la amplificación de plásmidos. 100 μ l de estas células y 20 ng/ μ l de DNA fueron colocados en un tubo eppendorf y se mezclaron a continuación se incubaron en hielo durante 30 min, pasado el tiempo se procedió a darles un choque de calor a 42°C durante 1 min. Se agregó un 1 ml de LB sin antibiótico y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación. Se centrifugó la suspensión celular y el pellet se re suspendió en el líquido remanente (del mismo medio de cultivo). Las células se sembraron en cajas petri de LB con ampicilina.

Purificación de plásmido

Para la purificación de plásmidos se empleó la metodología descrita en el manual QIAprep Miniprep Hanbook de QIAGEN

PCR

Las reacciones de amplificación se hicieron en un termociclador Bio Rad PTC-100 *peltier thermal cycler* y las condiciones de amplificación fueron determinadas para cada uno de los ensayos.

Tabla V. Condiciones estándares de PCR

Condiciones estándar para un PCR	μ l
✓ Agua estéril	39
✓ Buffer 10x pfx	5
✓ MgCl ₂ 50mM	1.5
✓ DNTP'S 10mM	1
✓ Forward oligos 200ng/ μ l	1
✓ Reverse oligos 200ng/ μ l	1
✓ pAG25 10ng/ μ l	1
✓ Taq	<u>0.5</u>
	50

Purificación de DNA a partir de gel de agarosa

Los productos de PCR se analizaron por la técnica de electroforesis usando un gel de agarosa al 0.8%, con amortiguador SB (amortiguador de Borato de Sodio). El 1Kb “plus ladder” de *Thermo Fisher Scientific* se usó como marcador de peso molecular 1Kb. Las muestras se tiñeron con GelRed (biotium) y se visualizaron en un transiluminador Maestro Gen MLB-16.

Cuando se requirió se purificó la banda de interés cortando el gel y extrayendo el DNA siguiendo el protocolo “GeneClean” mediante el “Kit” de Biomedicals.

Transformación de *Saccharomyces cerevisiae*

La transformación de *S. cerevisiae* se llevó a cabo usando la metodología de Ito *et al.*, 1983 con modificaciones. Las células se crecieron hasta la fase exponencial y se ajustaron a una DO₆₀₀ 0.2. Se incubaron a 30°C hasta alcanzar una duplicación en la densidad (3-4hrs). Las células se recuperaron por centrifugación y se lavaron con agua estéril, luego se lavaron con

Acetato de Litio /TE 1X y finalmente se re suspendieron en 250 μ l de Acetato de Litio /TE 1X (células competentes).

Se colocaron 50 μ l de células competentes y el DNA de interés (~1 μ g), 5 μ l de DNA esperma de salmón (1 mg/ml) y 300 μ l de PEG/LiOAc/TE (PEG 40%- Acetato de Litio- Tris- EDTA). La muestra se incubó con agitación (250 rpm) durante 30 min a 30°C. Se añadieron 40 μ l de DMSO y se dio un choque de calor a 42°C durante 15 min. Las células se recuperaron mediante centrifugación y el pellet se re suspendió en 50 μ l de agua estéril y se sembró en cajas con medio selectivo. Las cajas se incubaron 48 hrs a 30 °C.

Ensayo de viabilidad

Se cultivaron las células en 5 ml de YPD durante toda la noche a 30°C. Al día siguiente se inocularon tres tubos y se les ajustó la absorbancia a DO₆₀₀-0.2. Dos de los cultivos se trataron con diferente concentración de tunicamicina (Tn): 1.5 μ g/ml y 2 μ g/ml y un tercer tubo fue control. Se incubaron por 3 y 4 hrs a 30°C. Transcurrido el tiempo se determinó la absorbancia y se cosechó el volumen necesario para tener una DO₆₀₀-0.8 de células resuspendidas en 1 ml. Las células se transfirieron a tubos eppendorf de 1.5 ml. Las células se lavaron con PBS1X y se centrifugaron 5 min a 8000 rpm. La pastilla se resuspendió en 197 μ l de buffer GH (glucosa 2%, HEPES 10 mM, PH 7.2) con 2.5 μ l de FUN1 (400 μ M). FUN1 es indicador fluorescente, cuando las células están vivas este indicador se acumula en la vacuola y produce una emisión naranja (esto por el pH ácido de este organelo) y cuando las células están muerta se acumula en el citoplasma y produce una emisión verde (pH neutro). Las células se incubaron durante 30 min a 30°C con agitación y en oscuridad, transcurrido este tiempo se cosecharon y se lavaron con PBS 1X y se re suspendieron en 100 μ l de PBS 1X. Se aplicó el mismo tratamiento a células que fueron previamente calentadas por 10 min a 92°C con el objetivo de visualizar el colorante FUN1 en células muertas. Las células se visualizaron con un microscopio de fluorescencia OLYMPUS BX51. Se tomaron imágenes de 3 campos y se contó el número de células vivas y de células muertas con el programa ImageJ 1.51J. Finalmente se graficó el promedio del porcentaje de células vivas de cada tratamiento.

Citometría de flujo

La determinación cuantitativa de la fluorescencia se hizo por citometría de flujo. Las células se separaron en un equipo Attune y se detectaron con láser azul/violeta (405/488 nm). En todos los casos se colectaron 50,000 células y los datos se analizaron con el software *attune cytometric software v2.1*

VIII. RESULTADOS

Formación del *shmoo* en respuesta a la feromona

Con el objetivo de estandarizar los tiempo de respuesta al apareamiento en este ensayo expusimos a las células MATa a la feromona α por diferentes tiempos. Se observa que cuando la célula se expone a la feromona se genera una proyección de apareamiento y la morfología cambia de una forma semiesférica a una forma de *shmoo*. La formación del *shmoo* comienza a la hora de exposición a la feromona, se mantiene por las siguientes dos horas y desaparece a las 4 horas (**Figura 14A**). En este tiempo se ha alcanzado un fenómeno de desensibilización (adaptación) a la feromona de apareamiento (Bidlingmaier y Snyder, 2004). El porcentaje de células gemando antes del tratamiento con feromona es de alrededor del 90%, a las 2 hrs de tratamiento disminuye a un 5% y a las 4 hrs regresa a un 82% (**Figura 14B**).

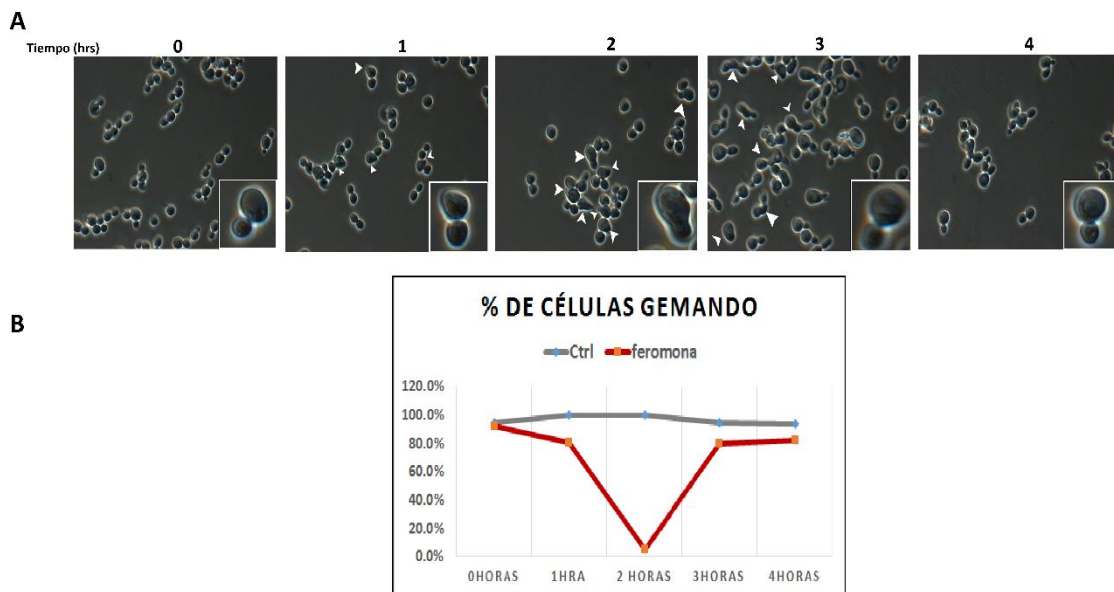


Figura 14. *Saccharomyces cerevisiae* responde a la formación del *shmoo* entre la primera y segunda hora de exposición a la feromona α . (A) Formación del *shmoo* de las células en respuesta a la feromona α . Las células se trataron con feromona α ($1 \mu\text{g} \times 1 \times 10^6$ cels/ml) durante 4 horas y se analizó su morfología a través de imágenes obtenidas por óptica campo claro (Las flechas indican células *shmoo*). (B) Gráfico que muestra el porcentaje de células gemando tras un tratamiento con feromona α . *S. cerevisiae* detiene su división celular a las 2 horas de exposición con feromona α y después de un intervalo de tiempo reanuda la división celular.

Fus1p se expresa y se localiza en el *tip* del *shmoo* en respuesta a la feromona α

Además de la formación del *shmoo*, las células en respuesta a la feromona activan genes necesarios para el apareamiento, entre ellos *FUS1* que codifica para una proteína de fusión membranal. En este ensayo observamos la expresión y localización de la proteína Fus1-mRuby en respuesta a la feromona α . A los 30 min de exposición a la feromona se observa ya una sobre-expresión de Fus1, aun cuando no se ha formado el *shmoo* totalmente. Después de este tiempo y hasta los 120 min Fus1 se enriquece en el *tip* del *shmoo* (Figura 15).

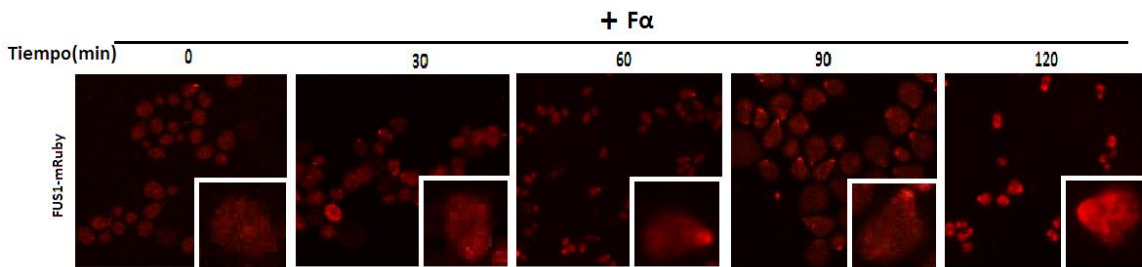


Figura 15. La respuesta de expresión de Fus1p es a tiempo cortos. Imágenes obtenidas por microscopía de epifluorescencia que muestran la expresión de *FUS1*-mRuby por exposición de la feromona α . Las células fueron crecidas en YPD y tratadas con feromona α ($1 \mu\text{g} \times 1 \times 10^6$ cels/ml). Las células fueron monitoreadas cada 30 min durante 120 min como se indica en la figura.

Efecto de la Tn y 2-DOG en la morfología y viabilidad de las células

Se trataron células con las diferentes concentraciones de inductores de estrés de RE y por diferentes tiempos para determinar sus efectos en la morfología y en la viabilidad celular. Esto con el objetivo de encontrar condiciones en las que la morfología y la viabilidad no estuvieran comprometidas. Como puede observarse en la **Figura 16A**, tratamientos con $2 \mu\text{g/ml}$ de Tn y 6 mM de 2-DOG no afectan la morfología celular, incluso hasta las 4 hrs de exposición a las drogas. En estas condiciones se observa que la mayoría de las células

mantienen una forma semiesférica y una gran proporción están en proceso de gemación. Los efectos del tratamiento con estas drogas en la viabilidad se determinaron empleando el indicador fluorescente FUN1. Cuando la célula está viva este indicador se acumula en la vacuola y produce una emisión naranja (esto por el pH ácido de este organelo) y cuando la célula está muerta se acumula en el citoplasma y produce una emisión verde (pH neutro). Se encontró que tratamientos con 1.5 y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tn las células mostraron una reducción máxima de la viabilidad celular de 23.14 % durante 4 hrs y del 13.8% con 2-DOG (**Figura 16 B y C**). Considerando el rango de viabilidad que se presenta en condiciones normales de crecimiento en cultivos celulares que van del 80 al 95%, las concentraciones de Tn y 2-DOG empleadas en este ensayo al tiempo que se indica, pueden considerarse adecuadas para inducir ER.

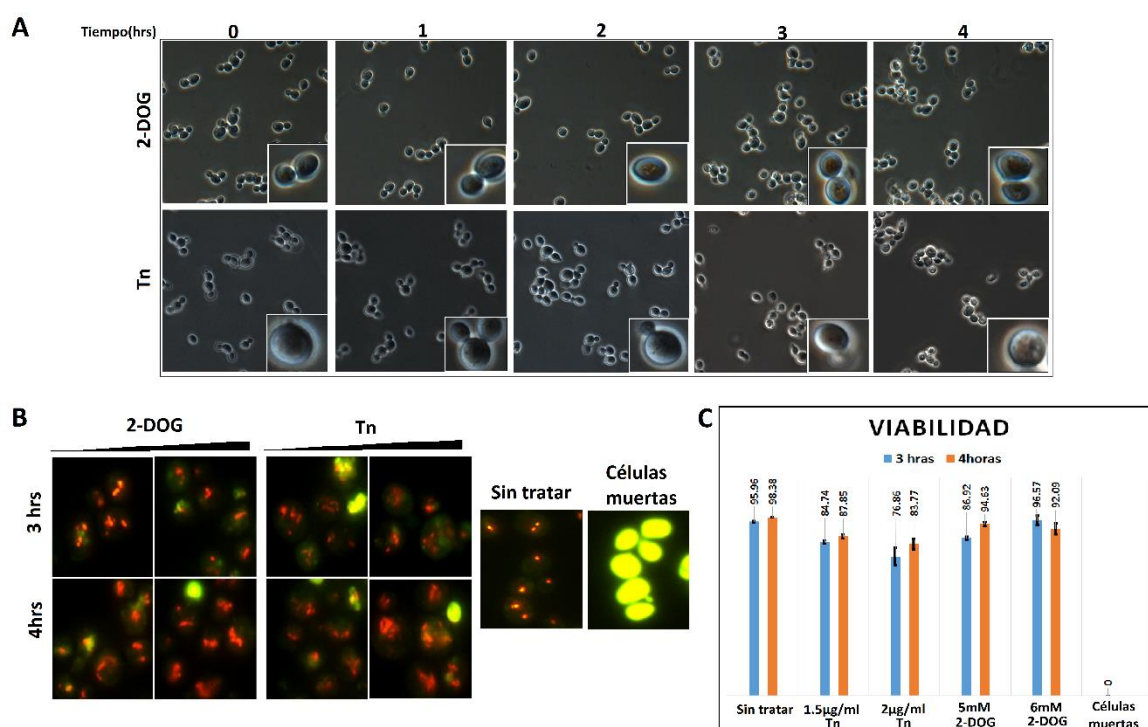


Figura 16. Los inductores de estrés de retículo no alteran la morfología de las células ni la viabilidad celular. (A) Morfología de las células en respuesta a inductores de estrés (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Tn y 6mM 2-DOG) durante 4 hrs de exposición. **(B)** Prueba de viabilidad con el colorante FUN1. Se presentan una serie de campos representativos de lo observado por microscopía de epifluorescencia con la tinción de FUN1 para las diferentes concentraciones de 2-DOG (5 y 6 mM) y Tn (1.5 y 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) después de 3 y 4 horas de crecimiento. También se muestra las

células sin tratar y células muertas que fueron expuestas a 92°C ambas tratadas con FUN1. **(C)** Cuantificación del porcentaje de células viables de 3 campos con 200 - 250 células por campo en una misma muestra.

KAR2 se expresa en respuesta a inductores de estrés

Se midió la expresión de KAR2 como reportero de la vía UPR en células bajo el estímulo de inductores de ER a diferentes concentración y tiempos. Kar2 es una chaperona que regula la activación del sensor del estrés de RE Ire1. Kar2 se expresa basalmente en la célula, pero en respuesta a estrés aumenta significativamente su expresión (Kohno, 1993). Los resultados por microscopía de epifluorescencia muestran que *KAR2* aumenta ligeramente su expresión a las 2 horas de haber expuesto a las células a inductores de estrés, 2 µg/ml de Tn o 5 mM de 2-DOG. A las 3 hrs de tratamiento, la expresión de Kar2 se incrementa significativamente sobre todo con Tn (**Figura 17A**).

Adicionalmente, se midió la expresión de Kar2 determinando la intensidad de fluorescencia por citometría de flujo (**Figura 17B**). Las células tratadas únicamente con Tn (1.5 y 2µg/ml) mostraron un incremento significativo en los niveles de expresión de *KAR2* con respecto a la muestra control (sin tratamiento) desde las 2 horas de tratamiento. Por otro lado, aunque los tratamientos con 5 y 6 mM de 2-DOG producen un aumento en la expresión, ésta no es significativamente mayor que la expresión en las células sin tratamiento (**Figura 17C**). La expresión en una construcción que no tiene el promotor de *KAR2* es de la misma proporción que la expresión en una cepa WT en presencia de los inductores de ERE (datos no mostrados), lo que nos confirma que los niveles de expresión están regulados por el promotor de *KAR2* y que a su vez, la expresión de *KAR2* aumenta con los tratamientos inductores de ERE (Kohno *et al.*, 1993).

El análisis cuantitativo de los resultados de la citometría de flujo y los perfiles representativos para los tiempos de 1, 2 y 3 hrs se muestra en la sección de anexos (**Tabla IX**).

En este ensayo observamos que los niveles de expresión de *KAR2* muestran un aumento significativo hasta las dos horas de tratamiento y, que bajo estas condiciones el tiempo de respuesta al estrés no es simultáneo a la respuesta de la feromona.

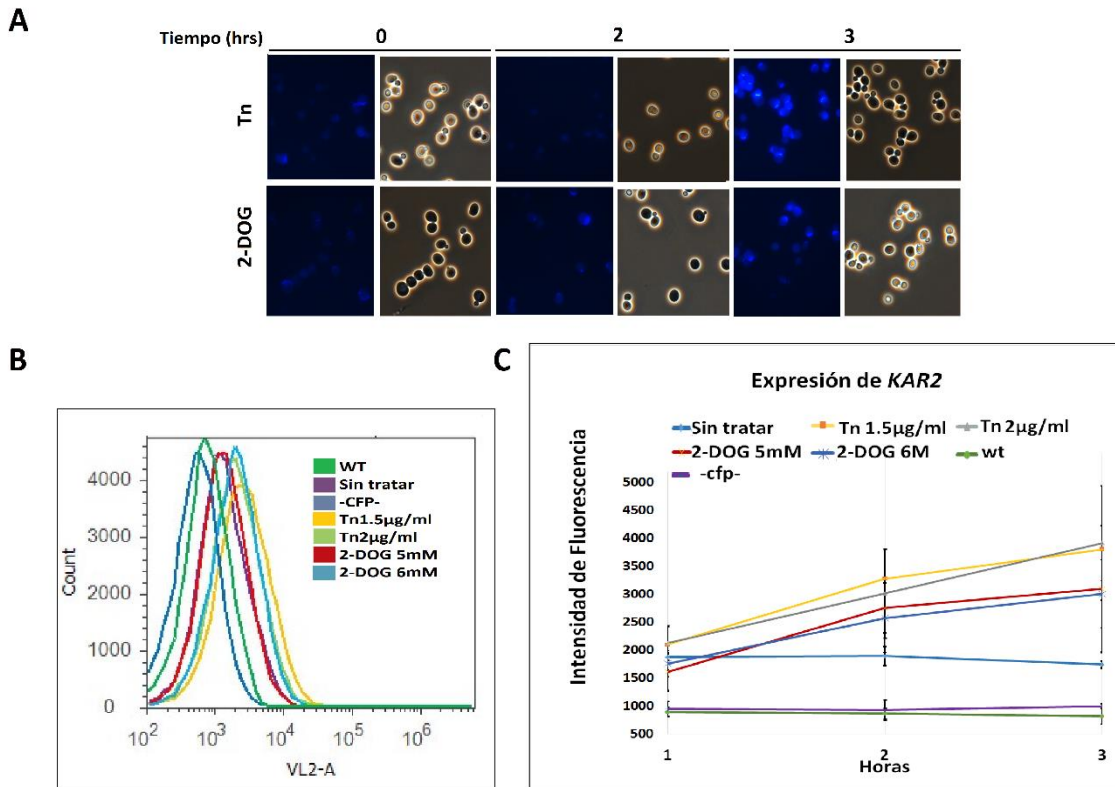


Figura 17. La expresión de *KAR2* se incrementa significativamente sobre todo con Tn a las 2 horas de tratamiento (A) Imágenes por microscopía de epifluorescencia de la actividad transcripcional de *KAR2* en células de levadura expuesta a 5mM de 2-DOG y 2µg/ml de Tn a las 2 y 3 hrs de tratamientos. **(B)** Perfiles representativos de citometría de flujo de la actividad de *KAR2* a las tres horas de tratamiento con inductores de ERE. **(C)** Gráfica de la expresión de *KAR2* durante las 3 horas de tratamiento con Tn (1.5 y 2µg/ml) y 2-DOG (5 y 6 mM). Se muestra promedio y desviación estándar obtenidas a partir de tres experimentos. Anova de dos vías $p < 0.01$.

La Tn y 2-DOG inhiben la formación del *shmoo* en respuesta a la feromona α

Después de determinar la cinética de respuesta a la feromona α y de comprobar que los tratamientos con Tn y 2-DOG inducen la expresión de *KAR2* sin comprometer la viabilidad celular, se exploró el efecto que tiene la inducción de estrés de RE en la vía de respuesta a feromonas. Cuando las células se exponen simultáneamente a la feromona α y a Tn o 2-DOG, no son capaces de formar el *shmoo* aún después de 4 horas de tratamiento (**Figura 18A**). También observamos que el porcentaje de células gemando en presencia de inductores de estrés es significativamente mayor a las 2 hrs de tratamiento comparado con las células que tratadas únicamente con feromona α (**Figura 18B**). Estos resultados sugieren que en presencia de inductores de estrés de retículo las células no son capaces de activar la vía de respuesta a la feromona α .

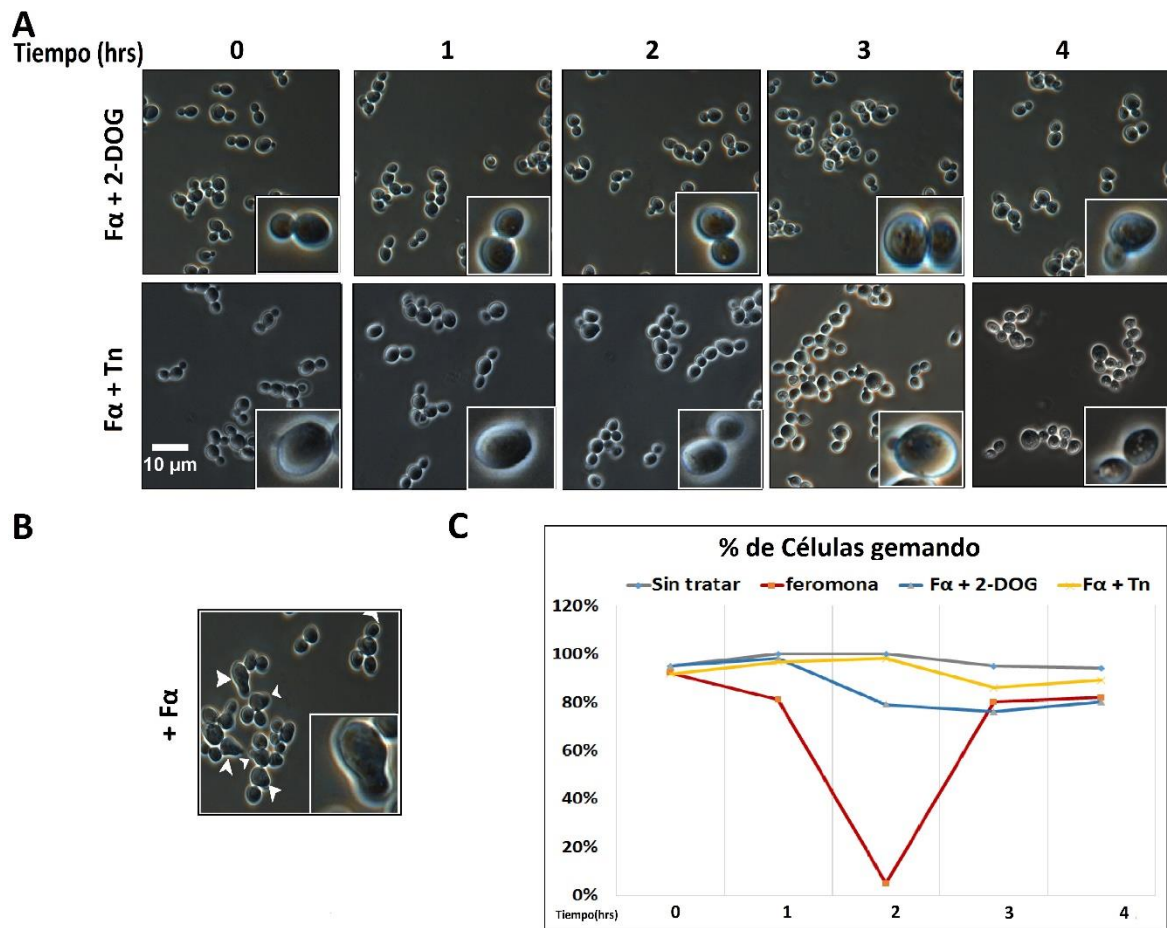


Figura 18. La Tn y 2-DOG inhiben la formación del *shmoo* en respuesta a la feromona α .

(A) Ensayo de competencia entre inductores de estrés y feromona α ($F\alpha$) en una cepa silvestre. Imágenes por microscopio de contraste de fase de células expuestas a la feromona α ($1 \mu\text{g} \times 1 \times 10^6$ cels/ml) +2-DOG 6 mM, y feromona α + 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tn, crecidas en YPD como medio de cultivo y monitoreadas a diferentes tiempos como se muestra en la figura. **(B)** Respues de las células en precencia de de feromona α a las 2 hrs. **(C)** Gráfico que muestra el porcentaje de células gemando tras un tratamiento con feromona α , feromona α más inductores de estrés y celulas sin tratar. Cuantificación del porcentaje de células gemando de 3 campos con 200 - 220 células por campo en una misma muestra.

Efecto de los inductores de estrés de RE en la expresión de Fus1p.

Para comprobar que la inducción de un estrés de RE inhibe la respuesta a feromonas de apareamiento, se determinó la inducción de la expresión de *FUS1* en la presencia simultánea de feromona α y de inductores de estrés. Esto se hizo mediante la detección del reportero Fus1-mRuby por microscopía de fluorescencia (**Figura 19**). Observamos, que Fus1p se expresa cuando las células se estimulan simultáneamente con feromona y un inductor de ERE (Tn o 2-DOG). La expresión de *FUS1* en la mayoría de los casos es uniforme y en todo el citoplasma, pero en algunas células se concentra en puntos que prefiguran un *tip*. Aunque el número no es significativo, la mayor proporción de células que muestran una distribución punteada de Fus1p se observa a los 60 y 90 min, lo cual coincide con la mayor proporción de células con forma de *shmoo* detectada en los tratamientos anteriores. Estos resultados nos indican que la Tn y 2-DOG cuando se administran simultáneamente con la feromona no inhiben la expresión de *FUS1* pero sí inhiben la formación del *shmoo* y por tanto la acumulación de Fus1p en el *tip*.

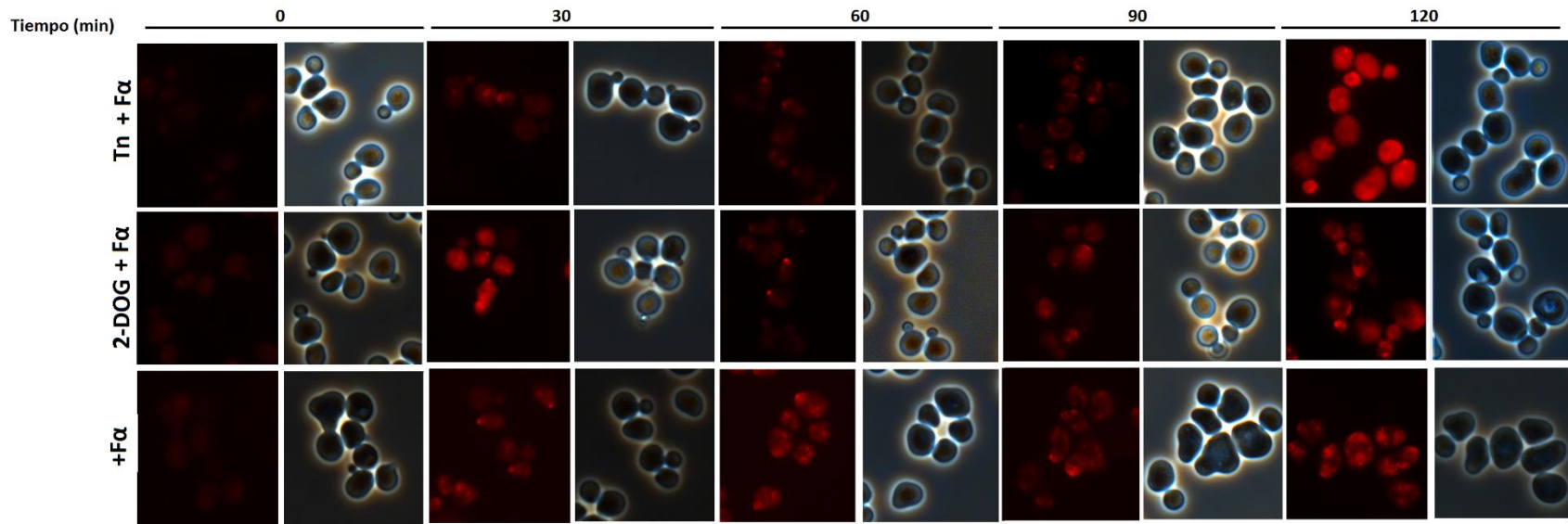


Figura 19. Expresión de FUS1 en células que fueron tratadas simultáneamente con Tn (1.5µg/ml) y feromona α (Fα) (1µg x 1 x 10⁶ cels/ml), así como 2-DOG 5mM y Fα. La expresión del reportero Fus1p-mRuby se analizó a diferentes tiempos (como se indica en la imagen) una vez que fueron añadidos los dos estímulos.

La expresión de FUS1 se inhibe cuando se induce estrés de RE previamente al estímulo de la feromona.

Es posible que el incremento en la expresión de *FUS1* que se observa en el experimento anterior se deba al tiempo que tarda en producirse el efecto de las drogas sobre el RE. Por esto se expusieron células a Tn 3 hrs antes de añadir la feromona α . Una vez que las células fueron expuestas a la feromona, se observó a las 1.5 hrs que la expresión de Fus1p era evidentemente menor comparada con aquellas células que no fueron estresadas. Estas últimas muestran una expresión y localización de Fus1p en el *tip* del *shmoo* a los 30 y 90 min. También observamos la expresión de *KAR2*, pero las diferencias en la intensidad de expresión no son muy evidentes en las células con estrés y sin estrés (**Figura 20**). Sin embargo, la expresión de *KAR2* aumenta significativamente a las 3 horas de tratamiento con Tn como se demostró en el ensayo de citometría de flujo.

En este ensayo demostramos que las células ante un previo estrés de retículo no son capaces de responder a vía de respuesta a feromona.

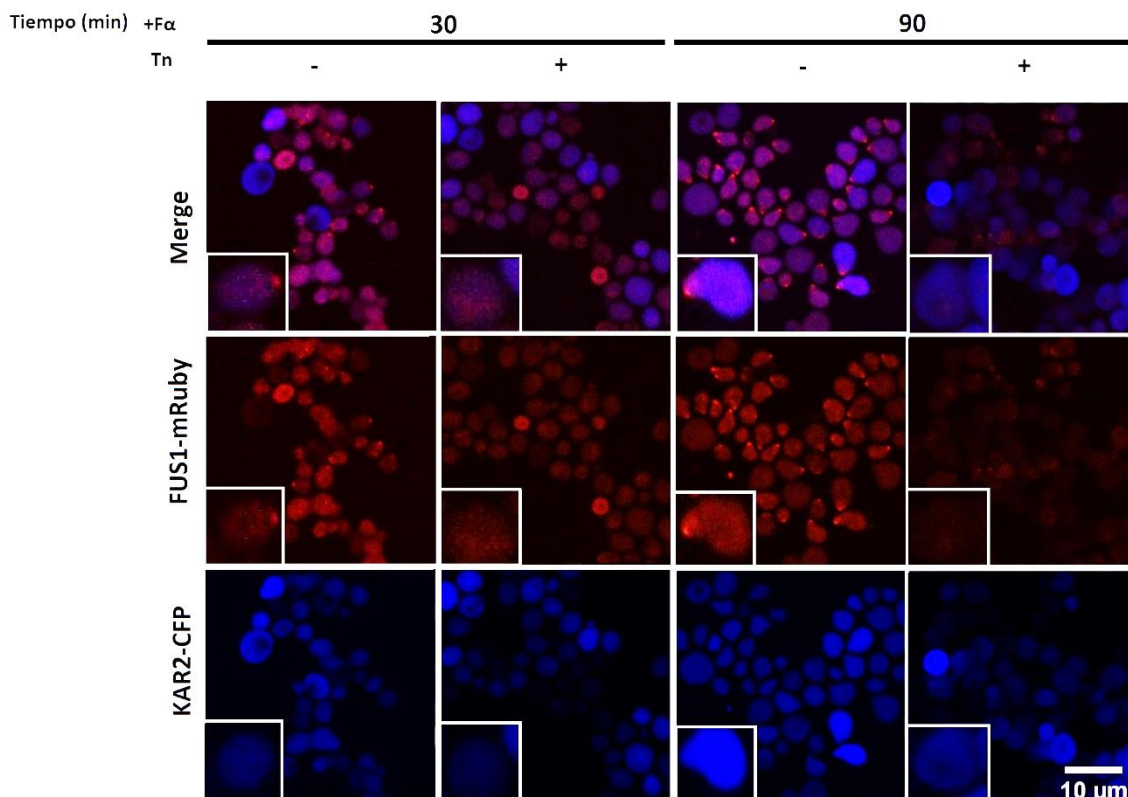


Figura 20. La expresión y localización de Fus1p disminuye ante un pre-tratamiento con Tn. Expresión de *KAR2* y *FUS1*, en células que fueron estresadas previamente con Tn (1.5 μ g/ml) durante 3 horas y se les añadió feromona α (1 μ g x 1 x 10⁶ cels/ml). La expresión de los reporteros se midió a los 30 y 90 min después de haber añadido la feromona.

La subunidad G α no participa en la respuesta a inductores de estrés de RE

La inhibición de la respuesta a feromonas de apareamiento por los inductores de estrés de RE puede deberse entre otros factores a que algún componente de la proteína G se requiere para la respuesta al estrés y en esas condiciones no participa en la respuesta a feromonas. Esto se apoya en la observación de que la subunidad β de la proteína G de *Arabidopsis* se requiere para generar una respuesta a la Tn (Wang *et al.*, 2007). En el laboratorio ya se había definido que mutantes carentes de G β y de G γ no tienen defectos de crecimiento en medios con inductores de estrés. En este trabajo evaluamos el efecto de la inactivación de la subunidad G α . Para esto se hizo un ensayo de crecimiento por diluciones seriadas. En

este ensayo se comparó el crecimiento en TN o 2-DOG de la mutante doble $G\alpha\Delta G\beta\Delta$ con el de la mutante sencilla $G\beta\Delta$. Es importante recordar que una mutante $G\alpha\Delta$ no es viable, ya que la vía de respuesta a feromonas se activa constitutivamente y esto causa la interrupción del ciclo celular en G1.

En estos ensayos se observó que la doble mutante $G\alpha\Delta G\beta\Delta$ crece con la misma eficiencia que la mutante sencilla $G\beta\Delta$ y que la cepa silvestre en medios con 10 mM de 2-DOG y en 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de Tn (**Figura 21A**). Estos resultados sugieren que igual que las proteínas $G\beta$ y $G\gamma$, la subunidad $G\alpha$ no está involucrada en la respuesta a estrés de RE.

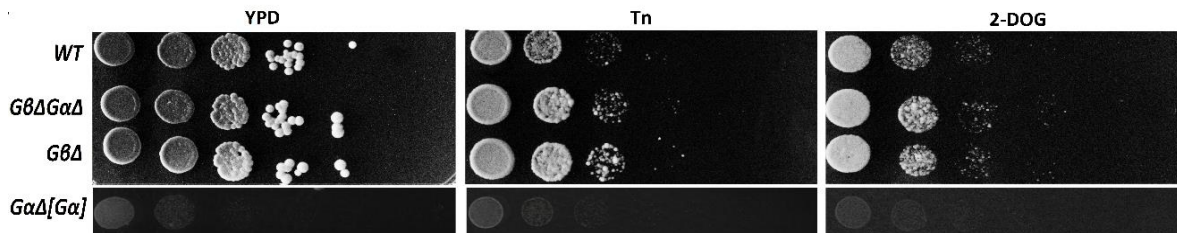


Figura 21. La subunidad $G\alpha$ de la proteína G no participa en la respuesta a inductores de estrés de retículo. Ensayo de sensibilidad por goteo a inductores de estrés de retículo. Se evalúa el fenotipo de mutantes nulas de las subunidades de la proteína G heterotrimera. Se comparan las mutantes para la proteína $G\beta\Delta$ y la doble mutante de $G\alpha\Delta G\beta\Delta$ en presencia de inductores de estrés de RE: 0.3 $\mu\text{g/ml}$ de Tn y 10mM de 2DOG.

Los inductores de estrés de RE revierten la letalidad de una mutante $G\alpha\Delta$

Como se ha mencionado anteriormente, la inactivación de la subunidad $G\alpha$ induce letalidad por la activación constitutiva del dímero $G\beta\gamma$ el cual induce la vía de apareamiento y por consiguiente la interrupción del ciclo celular en G1. En este ensayo evaluamos el efecto de la 2-DOG en el crecimiento de células en las que se inactiva la subunidad $G\alpha$. Para esto, una mutante nula del gen que codifica para $G\alpha$ ($GPA1$) se transformó con un plásmido centromérico que contiene el gen $GPA1$ bajo el control del promotor de galactosa. En medios con galactosa el gen se expresa y mantiene la viabilidad celular la cual se infiere por

la alta proporción de células gemantes (**Figura 22**). En estos cultivos, una proporción baja de células deja de gemar y adquieren la morfología *shmoo* debido a la pérdida espontánea del plásmido. En medios con glucosa en cambio, la expresión de *GPA1* se apaga, se activa la vía de feromona, las células dejan de dividirse y adquieren la morfología *shmoo* (Figura 24). Las células que se transfieren a glucosa y que se tratan simultáneamente con 2-DOG, muestran un retraso significativo en la formación del *shmoo*. En estas condiciones, y a diferencia de las células que sólo tienen glucosa, hay una alta proporción de células gemando aún en tiempos largos de incubación (Figura 24). Estos resultados nos sugieren que existe un mecanismo por el cual la 2-DOG revierte la letalidad que se genera por inactivación de la subunidad $G\alpha$ y la consiguiente activación constitutiva de la vía de respuesta a feromonas.

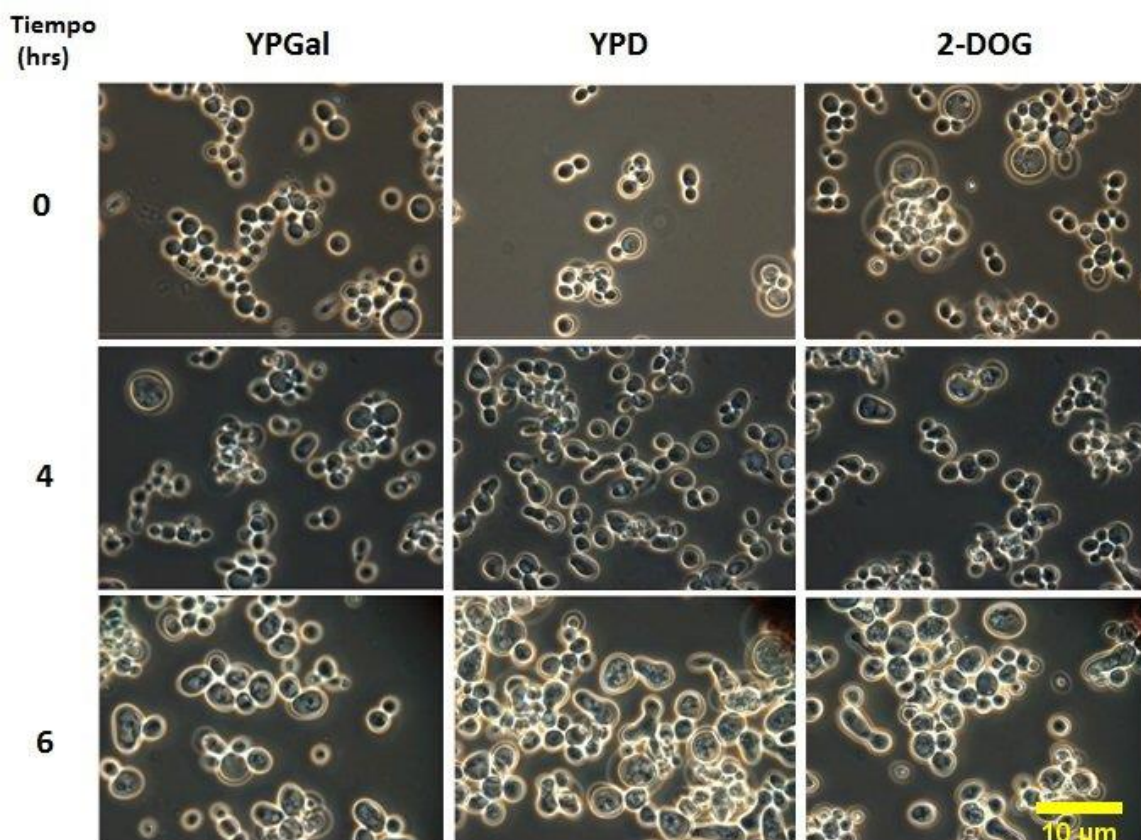


Figura 22. Una mutante de la subunidad $G\alpha$ no es capaz de forma *shmos* y continua gemando en medios con 2-DOG. Las células fueron crecidas durante toda la noche en YPGal. Después se lavaron con PBS 1X y se transfirieron a YPGal, YPD y YPD + 2-DOG (10

mM). Posteriormente se monitoreo la morfología de las células por microscopía de luz a las horas que se indican en la figura. Las flechas indican células *shmoo*.

La localización en la membrana de Ste18p se bloquea en condiciones de estrés de RE.

El hecho de que ninguna de las 3 subunidades de la proteína G participen directamente en la respuesta al estrés de RE, nos llevó a preguntarnos como pueden los inductores de estrés inhibir la vía de apareamiento. Una hipótesis es que de alguna manera la Tn y la 2-DOG, por ser inhibidores de la glicosilación afectan la farnesilación (y la palmitoilación) de la subunidad $G\gamma$ (véase la sección de Introducción). Para probar si éste es el caso, se evaluó la localización de la subunidad $G\gamma$ en células tratadas con Tn por 3 hrs y posteriormente con feromona α . Para este ensayo se generó una cepa que expresa una forma de $G\gamma$ etiquetada en su extremo N-terminal con la proteína verde fluorescente (GFP). Cabe mencionar que esta proteína híbrida es funcional y no afecta la vía de respuesta a feromonas.

Las imágenes de microscopía confocal mostraron que $G\gamma$ se localiza en la membrana plasmática en células que no se han tratado ni con Tn ni con feromona. Cuando las células se trataron con α feromona, $G\gamma$ se acumula en una gran proporción en el *tip* de las células que han adquirido la morfología *shmoo*, pero cuando las células se tratan con Tn y luego con feromona, $G\gamma$ se deslocaliza y se observa en citoplasma y sobre todo forma acúmulos citoplásmicos (**Figura 23**). En estos ensayos se incluyó una versión mutante de $G\gamma$ ($G\gamma^{SS}$), la cual carece de los residuos de cisteína del motivo CAAX y que no pueden modificarse postraduccionalmente. Esta versión de $G\gamma$ que carece de ácido palmítico y de farnesilo se localiza permanentemente en el citoplasma sin importar el tratamiento.

Estos resultados sugieren que la subunidad $G\gamma$ se disocia de la membrana plasmática cuando el estrés de RE es prolongado, lo que puede explicar por qué la señal de la feromona se interrumpe en presencia de inductores de estrés de RE.

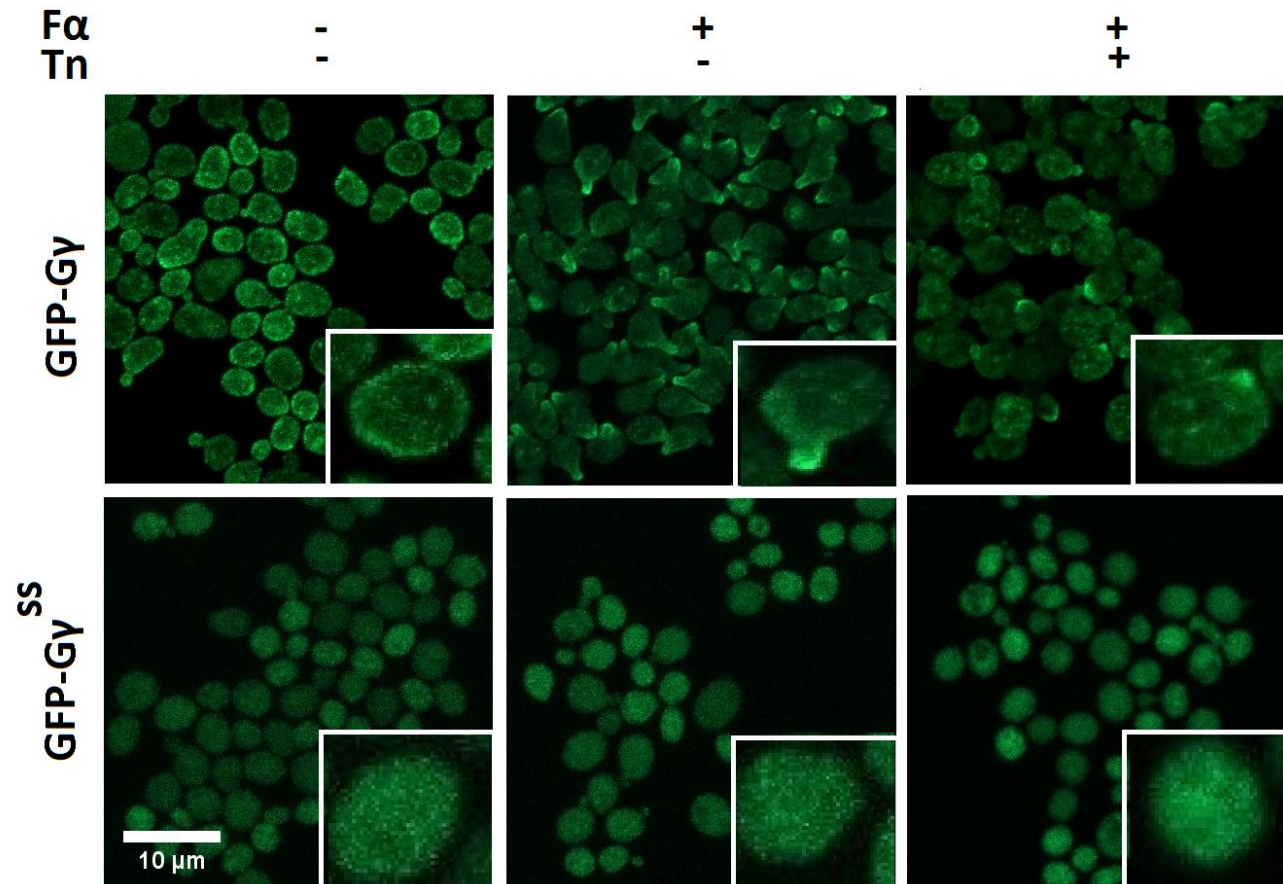


Figura 23. G γ se localiza en membrana y se acumula en citoplasma ante un tratamiento con Tn. (A) Imágenes por microscopía confocal muestran la localización de GFP-G γ en células WT que no fueron tratadas ni con feromona α (F α) ni con Tn (--), células tratadas únicamente con F α (+-) y células tratadas previamente con Tn (2 μ g/ml) durante tres horas y se les añadió F α (++). La localización de G γ se observó a los 120 de exposición a la F α . Lo mismo se hizo para la mutante GFP-G γ^{SS} .

IX. DISCUSIÓN

La levadura *S. cerevisiae* responde a feromonas sexuales por medio de una vía de transducción que promueve cambios en la transcripción génica y promueve cambios en el ciclo celular. En particular se activa la transcripción de genes que participan en la formación de un gameto (*shmoo*) y en la fusión membranal como *FUS1*. Así mismo las feromonas inducen un arresto del ciclo celular en la fase G1 (McCaffrey *et al.*, 1987; Trueheart *et al.*, 1987; Bidlingmaier y Snyder, 2004).

La vía de señalización inicia con un complejo membranal que está compuesto por un receptor, sea este Ste2 o Ste3 en el cual está acoplada una proteína G heterotrimérica. La estimulación con feromonas promueve la inducción transcripcional de genes como BAR1, AKR1 y Sst2 (Stratton, *et al.*, 1996; Feng y Davis, 2000) que codifican para proteínas que funcionan como reguladores negativos de la vía y que promueven un fenómeno de adaptación de las células a la feromona el cual se conoce como desensibilización (Dohlman y Thorner, 2001; Bardwell, 2005). Por un lado, la proteína Bar1p es una proteasa que inactiva (degrada) a la feromona α y por otro lado la fosforilación en el extremo C-terminal del receptor Ste2 promueve la regulación negativa regulando positivamente la ubiquitinación y la internalización del mismo receptor (Chen y Konopka, 1996; Hicke, *et al.*, 1998). En las condiciones usadas en este trabajo, la máxima respuesta a la feromona ocurre de la célula a la feromona α . Este tipo de desensibilización y de adaptación también se observa en las células de mamíferos y en respuesta a las hormonas peptídicas (Jones y Hinkle, 2005; Fu *et al.*, 2014).

El apareamiento en la levadura consta de dos procesos, el primero es la inducción de la expresión de proteínas necesarias para que se lleve a cabo la fusión célula-célula, y el segundo es la respuesta quimiotrópica de la célula hacia la región de mayor concentración de la feromona. Esta última conduce a la polarización celular que da lugar a la formación del *shmoo* (Schrick *et al.*, 1997; Bidlingmaier y Snyder, 2004). Esta proyección que morfológicamente se distingue por la formación de un *tip*, consiste en el ensamblaje de un complejo de proteínas conocido como polarisoma. El polarisoma contiene entre otras

proteínas al complejo receptor-proteína G y a Fus1p (Trueheart *et al.*, 1987; Bar *et al.*, 2003). Nuestros datos muestran que tanto Fus1p como G γ se acumulan en el *tip* en respuesta al estímulo de la feromona y que la inducción simultánea de estrés de retículo endoplasmático (ERE) inhibe la formación de éste *tip* y tanto Fus1p como G γ se redistribuyen en el citoplasma.

Una de varias explicaciones del porqué la célula no se polariza en presencia de inductores de estrés incluye que éstos afectan a elementos que forman parte de la pared celular. Se ha reportado que la tunicamicina conduce a una deslocalización de la quitina, (Vai *et al.*, 1987), y esto genera defectos en el ensamblaje de polímeros de la pared celular afectando la formación del polarisoma (Popolo *et al.*, 1997; Cullen *et al.*, 2000). La Tn y la 2-DOG son inhibidores de la N-glicosilación, y probablemente están afectando a proteínas de la vía secretora o proteínas que se requieren para la síntesis de la pared celular como Gas1p (Chenevert *et al.*, 1994; Mondesert y Reed, 1996; Popolo *et al.*, 1997; Shahinian y Bussey; 2000). De los elementos de la vía de respuesta a feromonas, el único que es N-glicosilado es el receptor Ste2 de la feromona α , sin embargo, se ha comprobado que la eliminación de los dos sitios de glicosilación que tiene la proteína no afecta su adecuada inserción en la membrana ni la unión de la feromona α . Estas mutantes responden adecuadamente al estímulo y se aparean normalmente (Mentesana y Konopka, 2001). Fus1p por su parte también se glicosila pero esta glicosilación es de tipo O, la cual no se ve afectada por la Tn ni la 2-DOG (Trueheart y Fink, 1989).

En este trabajo fusionamos sólo una parte del promotor de *KAR2* (210 nt) a la proteína CFP para usarla como un reportero del estrés de RE. Este fragmento del promotor contiene únicamente los elementos de respuesta a estrés de RE y no contiene elementos de regulación por choque térmico (Hsf), los cuales están presentes en el promotor endógeno (Rose *et al.*, 1989; Kohno *et al.*, 1993). Como se observa en este trabajo, la expresión de *KAR2* en estas condiciones responde muy bien a la estimulación con Tn y 2DOG (Promlek *et al.*, 2011). En otros trabajos se ha reportado el uso de DTT y β -mercaptoetanol para inducir estrés de RE (Pincus *et al.*, 2010). Estos son agentes reductores que inhiben la formación de

enlaces disulfuro e inducen el plegamiento incorrecto de proteínas en el RE, sin embargo, tienen muchos efectos pleiotrópicos que pueden incluir la inhibición de la actividad de varias proteínas de la vía de la feromona.

En este trabajo se encontró que Fus1p puede ser un buen reportero de la temporalidad de los eventos del proceso de apareamiento. Por un lado, se puede medir un evento temprano como es la respuesta transcripcional y por otro un evento tardío como es la formación del *tip* y la morfología *shmoo*. La estimulación con feromona induce significativamente la expresión de *FUS1* como un primer evento y después su acumulación en el *tip* como un segundo evento. Nuestras observaciones indican que cuando la inducción del estrés de RE es simultáneo a la inducción de la vía de apareamiento no se afecta la expresión de *FUS1*, pero sí su acumulación en el *tip* del *shmoo*. Sin embargo, cuando el estrés de RE ocurre antes de la estimulación con feromona no sólo se inhibe la formación del *tip*, sino también la expresión de *FUS1*.

En este trabajo se demostró que mutantes carentes de la subunidad $G\alpha$ no muestran defectos en la respuesta a inductores de estrés de RE, lo que complementa las observaciones anteriores en las cuales se vio que mutantes de $G\beta$ y $G\gamma$ muestran una respuesta normal a Tn y 2-DOG. Consideramos entonces que los efectos inhibitorios de la Tn y la 2-DOG sobre la vía de respuesta a feromonas pueden deberse entre otros fenómenos a defectos en el procesamiento de las proteínas de la vía. Esto se comprobó al determinar la localización de la subunidad $G\gamma$ en condiciones de estrés de RE. $G\gamma$ es palmitoilada y farnesilada en condiciones normales y esto permite que se ancle a la membrana plasmática junto con $G\beta$ con la cual forma un dímero muy estable (Pryciak y Huntress, 1998; Hirschman y Jenness, 1999; Manahan *et al.*, 2000). Cuando el sistema se induce con feromona, $G\gamma$ se acumula en el *tip* del *shmoo* seguramente como parte del complejo del polarisoma. El pre-tratamiento con inductores de estrés evita que esto ocurra y $G\gamma$ se deslocaliza y se distribuye en el citoplasma (en ocasiones en puntos discretos). Esta distribución citoplásmica coincide con la de una mutante de $G\gamma$ que no se modifica postraduccionalmente. Esto sugiere que uno de los efectos del tratamiento con los

inductores de estrés de RE podría ser la inhibición de la farnesilación de G γ lo que genera defectos en el proceso de respuesta a feromona. Sin embargo esto es meramente especulativo y aun faltan algunos trabajos por comprobarlo.

El hecho de que un tratamiento simultáneo de inductores de estrés y feromona α no afecte la transcripción de *FUS1* y sí la formación del *shmoo*, sugiere que esta transcripción se debe a la actividad de una proteína G funcional y pre-existente. Esto se refuerza por el hecho de que un pre-tratamiento con inductores de estrés de RE disminuye significativamente la transcripción de *FUS1*. Estas observaciones entonces sugieren que el efecto de la Tn ocurre en las proteínas que se sintetizan *de novo* y particularmente en la farnesilación de la subunidad G γ .

En condiciones ambientales las células están expuestas a una gran cantidad de estímulos que son difíciles de predecir. En muchos casos estas señales son contradictorias y pueden provocar cambios celulares que son incompatibles y por lo tanto tienen que ser interpretados con cierta jerarquía. Un ejemplo es la preferencia de la célula a resolver un estrés osmótico antes de responder a un estímulo de apareamiento. Esto quiere decir que bajo dos estímulos, los mecanismos de regulación de la célula conducen a la activación de una vía y a la suspensión de la otra, hasta que las células resuelven y se adaptan a la primera (Nagiec y Dohlman, 2012).

Los resultados de este trabajo demuestran que la inhibición de la respuesta a feromonas de apareamiento conforme aumenta el estrés de RE se debe a la deslocalización de la subunidad G γ de la membrana plasmática.

Presentamos un modelo que es plenamente especulativo, sin embargo, puede ser un escenario que explique la deslocalización de G γ ante el estímulo de feromona y estrés de retículo; para probar esto, se requiere de más ensayos que nos permitan responder esta pregunta.

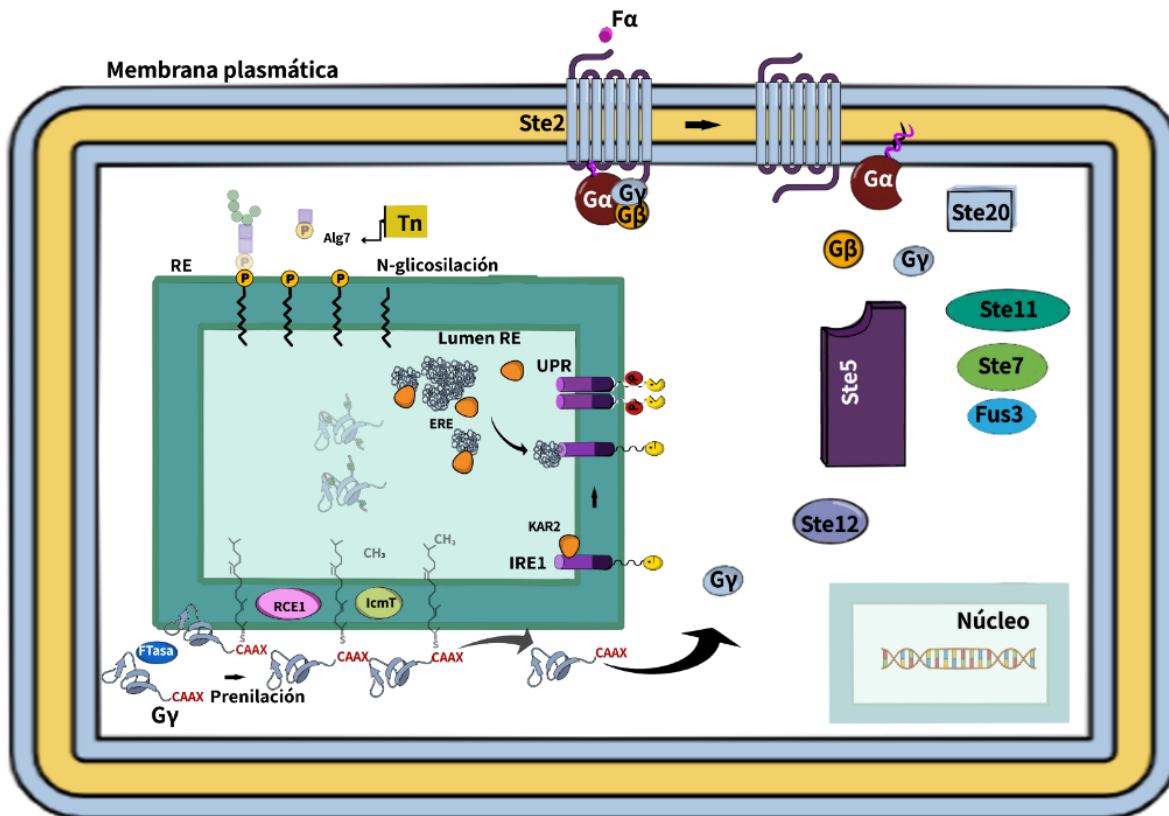


Figura 26. Modelo esquemático de la célula en respuesta al estrés de retículo. El estrés de retículo endoplasmático prolongado inducido por tunicamicina o 2-DOG podría inducir a la inhibición de otros mecanismos postraduccionales que también ocurren en el RE como es el caso de la prenilación; una modificación lipídica postraducciona que facilita la unión de proteínas a las membranas celulares como es el caso de la subunidad Gy y que es necesaria para activar la cascada de respuesta a feromona. Una subunidad Gy que no se farnesilo se dirige a la membrana plasmática a través de su asociación con Gα, que se acila de forma dual. Sin embargo, cuando se añade la feromona, Gα libera el dímero Gβγ. Debido a que Gy no tiene las modificaciones lipídicas, Gβγ se libera en el citosol. Esta separación espacial de Gβγ de sus efectores unidos a la membrana impide la señalización y, por lo tanto, la activación de los genes dianas de vía de respuesta a feromona.

X. CONCLUSIONES

- ✓ La estimulación con la feromona α induce transitoriamente la expresión de *FUS1* y la formación del *shmoo*, después las células se adaptan y se desensibilizan.
- ✓ La inducción de estrés de RE durante un estímulo con feromona inhibe la formación del *shmoo*.
- ✓ La inducción simultánea de estrés de RE y de la vía de feromonas no afecta la expresión de *FUS1* pero si su acumulación en el *tip*.
- ✓ La estimulación con feromona α no induce la expresión de *FUS1* en células pre-tratadas con inductores de estrés de RE.
- ✓ Mutantes carentes de las subunidades de la proteína G (α , β y γ) no presentan defectos de crecimiento en medios con inductores de estrés de RE.
- ✓ Los inductores de estrés de RE provocan la disociación de la subunidad $G\gamma$ de la membrana plasmática en células tratadas con feromona. En estas condiciones $G\gamma$ no se acumula en el *tip*.

XI.PERSPECTIVAS

Resulta interesante estudiar los efectos que ocasiona el estrés de retículo endoplásmico en la respuesta de apareamiento en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Esto nos puede ayudar a entender más acerca de la importancia de los procesos que se llevan a cabo en el RE y que contribuyen a mantener su homeostasis y como la alteración de esta homeostasis puede comprometer otras funciones celulares incluyendo el apareamiento entre células de sexo opuesto.

El estudio aquí reportado nos indicó que el tratamiento con inductores de estrés de retículo afecta la expresión de Fus1p, sin embargo es importante hacer un estudio fino y cuantitativo de estos efectos para determinar con precisión la relación temporal entre la adecuada función del retículo endoplasmático y la respuesta de apareamiento.

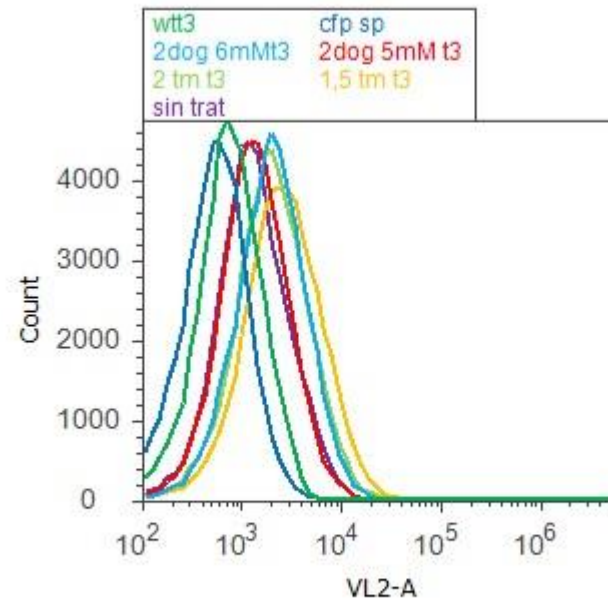
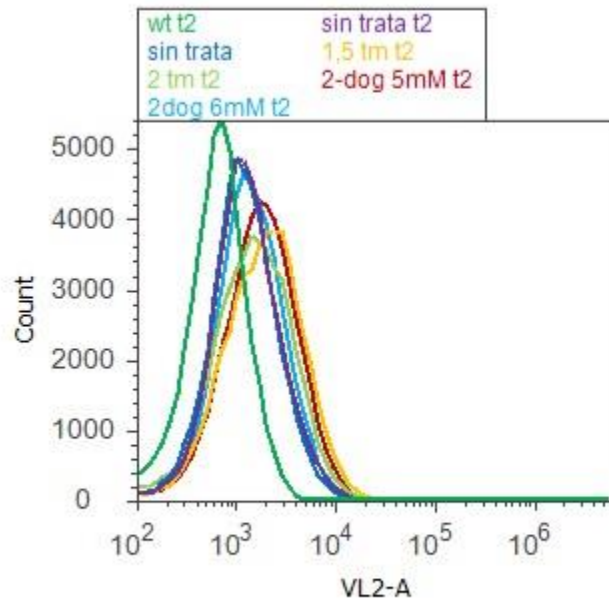
Se encontró que Ste18p se disocia de la membrana plasmática después de un tratamiento con inductores de estrés de RE cuando la proteína G heterotrimérica esta activa. Sin embargo es importante comprobar si la disociación de G γ de la membrana se debe a un efecto de su farnesilación debido a una disfunción del retículo endoplasmático

XII ANEXOS

Tabla VI. Intensidad de fluorescencia en ensayo de actividad promotora. Ensayo de actividad promotora de *KAR2* por expresión del gen reportero CFP, cuantificado por citometría de flujo. Se tabulan los valores de intensidad de fluorescencia mediana con desviación estándar de las células con el plásmido PRS415+*KAR2*-CFP en condiciones de estrés de RE; se utiliza una cepa silvestre WT como control negativo, y las células que no expresan CFP por ausencia del promotor *KAR2*. Tn y 2-DOG a diferentes concentraciones fueron los inductores de estrés de RE (activadores de la vía UPR).

Tratamiento		1hora	2horas	3horas
		Media de intensidad % células	Media de intensidad % células	Media de intensidad % células
Ctrl	KAR2-CFP	1872 ± 239.98	1893.33 ± 167.6	1742.33 ± 57.95
		72.85 ± 3.81%	65.70 ± 9.27	49.18 ± 14.13
1.5µg/ml Tn	KAR2-CFP	2095.66 ± 348.86	3273.66 ± 536.23	3803.66 ± 568.31
		75.76 ± 11.85%	73.72 ± 8.38%	67.67 ± 4.68%
2µg/ml Tn	KAR2-CFP	2123 ± 304.53	3009 ± 793.12	3911 ± 1020.42
		76.43 ± 24.35%	80.06 ± 21.05%	78.69 ± 10.40
2-DOG 5mM	KAR2-CFP	1608.33 ± 332.60	2753 ± 448.26	3094.33 ± 1134
		81.84 ± 10.51	65.82 ± 4.85%	74.96 ± 9.18
2-DOG 6mM	KAR2-CFP	1759.33 ± 234.45	2571 ± 614.02	3002.66 ± 612.34
		74.44 ± 4.87%	75.44 ± 2.61%	77.05 ± 7.72

Sin tratamiento	WT	890.66 ± 78.52	863 ± 93.25	820.33 ± 142.97
		73.36 ± 8.18	62.34 ± 6.01	40.24 ± 9.60
Sin tratamiento	-CFP-	949.33 ± 136.58	929 ± 189.50	994.66 ± 43.89
		78.74 ± 15.97%	64.82 ± 5.33	54.19 ± 14.71 %



XIII. REFERENCIA

- Baltanas, R., Bush, A., Couto, A., Durrieu, L., Hohmann, S., & Colman-Lerner, A. (2013). Pheromone-induced morphogenesis improves osmoadaptation capacity by activating the HOG MAPK pathway. *Sci Signal*, 6(272), ra26. doi:10.1126/scisignal.2003312
- Bar, E. E., Ellicott, A. T., & Stone, D. E. (2003). Gbetagamma recruits Rho1 to the site of polarized growth during mating in budding yeast. *J Biol Chem*, 278(24), 21798-21804. doi:10.1074/jbc.M212636200
- Bardwell, L. (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*, 26(2), 339-350. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2004.10.002>
- Bidlingmaier, S., & Snyder, M. (2004). Regulation of polarized growth initiation and termination cycles by the polarisome and Cdc42 regulators. *J Cell Biol*, 164(2), 207-218. doi:10.1083/jcb.200307065
- Cantagrel, V., Lefeber, D. J., Ng, B. G., Guan, Z., Silhavy, J. L., Bielas, S. L., ... Gleeson, J. G. (2010). SRD5A3 is required for converting polyprenol to dolichol and is mutated in a congenital glycosylation disorder. *Cell*, 142(2), 203-217. doi:10.1016/j.cell.2010.06.001
- Chakraborty, R., Baek, J.H., Bae, E.Y., Kim, W., Lee, S.Y., & Kim, M.G. (2016). Comparison and contrast of plant, yeast, and mammalian ER stress and UPR. *Applied Biological Chemistry*, 59, 337-347.
- Chang, F., & Herskowitz, I. (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell*, 63(5), 999-1011.
- Chen, Q., & Konopka, J. B. (1996). Regulation of the G-protein-coupled alpha-factor pheromone receptor by phosphorylation. *Molecular and cellular biology*, 16(1), 247-257. doi:10.1128/mcb.16.1.247

- Chenevert, J., Valtz, N., & Herskowitz, I. (1994). Identification of genes required for normal pheromone-induced cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, *136*(4), 1287-1296.
- Chou, S., Lane, S., & Liu, H. (2006). Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *26*(13), 4794-4805. doi:10.1128/mcb.02053-05
- Cullen, P. J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B. J., Jigami, Y., & Sprague, G. F., Jr. (2000). Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics*, *155*(3), 1005-1018.
- Dietzel, C., & Kurjan, J. (1987). The yeast SCG1 gene: A G α -like protein implicated in the α - and α -factor response pathway. *Cell*, *50*(7), 1001-1010. doi:[http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90166-8](http://dx.doi.org/10.1016/0092-8674(87)90166-8)
- Dohlman, H. G., & Thorner, J. W. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu Rev Biochem*, *70*, 703-754. doi:10.1146/annurev.biochem.70.1.703
- Elion, E. A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol*, *3*(6), 573-581.
- Elion, E. A. (2001). The Ste5p scaffold. *J Cell Sci*, *114*(Pt 22), 3967-3978.
- Fagbenro, O., & Jauncey, K. (1993). Chemical and nutritional quality of stored fermented fish (tilapia) silage. *Bioresource Technology Bioresource Technology*, *46*(3), 207-211.
- Ferrell, J. E., Jr. (1996). Tripping the switch fantastic: how a protein kinase cascade can convert graded inputs into switch-like outputs. *Trends Biochem Sci*, *21*(12), 460-466.
- Fields, S., & Herskowitz, I. (1985). The yeast STE12 product is required for expression of two sets of cell-type specific genes. *Cell*, *42*(3), 923-930.
- Fu, Q., Kim, S., Soto, D., De Arcangelis, V., DiPilato, L., Liu, S., . . . Xiang, Y. K. (2014). A long lasting beta1 adrenergic receptor stimulation of cAMP/protein kinase A (PKA) signal

- in cardiac myocytes. *J Biol Chem*, 289(21), 14771-14781. doi:10.1074/jbc.M113.542589
- Herskowitz I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev*. 1988 Dec;52(4):536-53.
- Herskowitz, I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell*, 80(2), 187-197.
- Hicke, L., Zanolari, B., & Riezman, H. (1998). Cytoplasmic tail phosphorylation of the alpha-factor receptor is required for its ubiquitination and internalization. *The Journal of cell biology*, 141(2), 349–358. doi:10.1083/jcb.141.2.349
- Hirschman, J. E., & Jenness, D. D. (1999). Dual lipid modification of the yeast ggamma subunit Ste18p determines membrane localization of Gbetagamma. *Mol Cell Biol*, 19(11), 7705-7711. doi:10.1128/mcb.19.11.7705
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, 57(2-3), 267-272.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., & Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol*, 153(1), 163-168.
- Jahng, K. Y., Ferguson, J., & Reed, S. I. (1988). Mutations in a gene encoding the alpha subunit of a *Saccharomyces cerevisiae* G protein indicate a role in mating pheromone signaling. *Mol Cell Biol*, 8(6), 2484-2493.
- Jones, B. W., & Hinkle, P. M. (2005). Beta-arrestin mediates desensitization and internalization but does not affect dephosphorylation of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *J Biol Chem*, 280(46), 38346-38354. doi:10.1074/jbc.M502918200
- Kaufman, R. J. (1999). Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev*, 13(10), 1211-1233.

- Kimata, Y., Kimata, Y. I., Shimizu, Y., Abe, H., Farcasanu, I. C., Takeuchi, M., . . . Kohno, K. (2003). Genetic evidence for a role of BiP/Kar2 that regulates Ire1 in response to accumulation of unfolded proteins. *Mol Biol Cell*, *14*(6), 2559-2569. doi:10.1091/mbc.e02-11-0708
- Kirkman-Correia, C., Stroke, I. L., & Fields, S. (1993). Functional domains of the yeast STE12 protein, a pheromone-responsive transcriptional activator. *Mol Cell Biol*, *13*(6), 3765-3772.
- Kohno, K., Normington, K., Sambrook, J., Gething, M. J., & Mori, K. (1993). The promoter region of the yeast KAR2 (BiP) gene contains a regulatory domain that responds to the presence of unfolded proteins in the endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol*, *13*(2), 877-890.
- Leberer, E., Dignard, D., Hougan, L., Thomas, D. Y., & Whiteway, M. (1992). Dominant-negative mutants of a yeast G-protein beta subunit identify two functional regions involved in pheromone signalling. *Embo j*, *11*(13), 4805-4813.
- Lehle, L., & Tanner, W. (1976). The specific site of tunicamycin inhibition in the formation of dolichol-bound N-acetylglucosamine derivatives. *FEBS Letters*, *71*(1), 167-170. doi:doi:10.1016/0014-5793(76)80922-2
- Lu, H., Sun, Y., Jiang, Y. Y., & Whiteway, M. (2014). Ste18p is a positive control element in the mating process of *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, *13*(4), 461-469. doi:10.1128/ec.00320-13
- Manahan, C. L., Patnana, M., Blumer, K. J., & Linder, M. E. (2000). Dual lipid modification motifs in G(alpha) and G(gamma) subunits are required for full activity of the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, *11*(3), 957-968. doi:10.1091/mbc.11.3.957
- McCaffrey, G., Clay, F. J., Kelsay, K., & Sprague, G. F., Jr. (1987). Identification and regulation of a gene required for cell fusion during mating of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, *7*(8), 2680-2690.

- Mentesana, P. E., & Konopka, J. B. (2001). Mutational Analysis of the Role of N-Glycosylation in α -Factor Receptor Function. *Biochemistry*, 40(32), 9685-9694. doi:10.1021/bi0108507
- Merlini, L., Dudin, O., & Martin, S. G. (2013). Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol*, 3(3), 130008. doi:10.1098/rsob.130008
- Michaelis, S., & Herskowitz, I. (1988). The a-factor pheromone of *Saccharomyces cerevisiae* is essential for mating. *Mol Cell Biol*, 8(3), 1309-1318.
- Miyajima, I., Nakafuku, M., Nakayama, N., Brenner, C., Miyajima, A., Kaibuchi, K., . . . Matsumoto, K. (1987). GPA1, a haploid-specific essential gene, encodes a yeast homolog of mammalian G protein which may be involved in mating factor signal transduction. *Cell*, 50(7), 1011-1019.
- Mondesert, G., & Reed, S. I. (1996). BED1, a gene encoding a galactosyltransferase homologue, is required for polarized growth and efficient bud emergence in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 132(1-2), 137-151.
- Nagiec, M. J., & Dohlman, H. G. (2012). Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS Genet*, 8(1), e1002437. doi:10.1371/journal.pgen.1002437
- Nakayama, N., Miyajima, A., & Arai, K. (1985). Nucleotide sequences of STE2 and STE3, cell type-specific sterile genes from *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo j*, 4(10), 2643-2648.
- Nikawa, J., & Yamashita, S. (1992). IRE1 encodes a putative protein kinase containing a membrane-spanning domain and is required for inositol phototrophy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 6(11), 1441-1446.
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A., & Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, 279(2), 445-450. doi:10.1006/bbrc.2000.3987

- Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., & Herskowitz, I. (1993). FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell*, *73*(4), 747-760.
- Pincus, D., Chevalier, M. W., Aragon, T., van Anken, E., Vidal, S. E., El-Samad, H., & Walter, P. (2010). BiP binding to the ER-stress sensor Ire1 tunes the homeostatic behavior of the unfolded protein response. *PLoS Biol*, *8*(7), e1000415. doi:10.1371/journal.pbio.1000415
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., & Vai, M. (1997). Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, *179*(2), 463-469.
- Posas, F., & Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, *276*(5319), 1702-1705.
- Promlek, T., Ishiwata-Kimata, Y., Shido, M., Sakuramoto, M., Kohno, K., & Kimata, Y. (2011). Membrane aberrancy and unfolded proteins activate the endoplasmic reticulum stress sensor Ire1 in different ways. *Mol Biol Cell*, *22*(18), 3520-3532. doi:10.1091/mbc.E11-04-0295
- Pryciak, P. M., & Huntress, F. A. (1998). Membrane recruitment of the kinase cascade scaffold protein Ste5 by the Gbetagamma complex underlies activation of the yeast pheromone response pathway. *Genes Dev*, *12*(17), 2684-2697. doi:10.1101/gad.12.17.2684
- Ramer, S. W., & Davis, R. W. (1993). A dominant truncation allele identifies a gene, STE20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*(2), 452-456.
- Rose, M. D., Misra, L. M., & Vogel, J. P. (1989). KAR2, a karyogamy gene, is the yeast homolog of the mammalian BiP/GRP78 gene. *Cell*, *57*(7), 1211-1221.
- Rueden, C. T.; Schindelin, J. & Hiner, M. C. *et al.* (2017), "ImageJ2: ImageJ for the next generation of scientific image data", *BMC Bioinformatics* 18:529, PMID 29187165, doi:10.1186/s12859-017-1934-z (on Google Scholar).

- Saito, H. (2010). Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr Opin Microbiol*, 13(6), 677-683. doi:10.1016/j.mib.2010.09.001
- Schindelin, J.; Arganda-Carreras, I. & Frise, E. *et al.* (2012), "Fiji: an open-source platform for biological-image analysis", *Nature methods* 9(7): 676-682, PMID 22743772, doi:10.1038/nmeth.2019
- Schrick, K., Garvik, B., & Hartwell, L. H. (1997). Mating in *Saccharomyces Cerevisiae*: The Role of the Pheromone Signal Transduction Pathway in the Chemotropic Response to Pheromone. In *Genetics* (Vol. 147, pp. 19-32).
- Shahinian, S., & Bussey, H. (2000). beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*, 35(3), 477-489.
- Sharma, C. B., Lehle, L., & Tanner, W. (1981). N-Glycosylation of yeast proteins. Characterization of the solubilized oligosaccharyl transferase. *Eur J Biochem*, 116(1), 101-108.
- Sidrauski, C., Walter, P.,. (1997). The Transmembrane Kinase Ire1p Is a Site-Specific Endonuclease That Initiates mRNA Splicing in the Unfolded Protein Response In (Vol. Cell, Vol. 90, pp. 1031–1039). Department of Biochemistry and Biophysics University of California, School of Medicine. San Francisco, California 94143-0448: Cell.
- Singh, A., Chen, E. Y., Lugovoy, J. M., Chang, C. N., Hitzeman, R. A., & Seeburg, P. H. (1983). *Saccharomyces cerevisiae* contains two discrete genes coding for the alpha-factor pheromone. *Nucleic Acids Res*, 11(12), 4049-4063.
- Stratton HF, Zhou J, Reed SI, Stone DE. (1996). The mating-specific G(alpha) protein of *Saccharomyces cerevisiae* downregulates the mating signal by a mechanism that is dependent on pheromone and independent of G(beta)(gamma) sequestration. *Mol Cell Biol* 1996;16:6325–37.
- Tanner, W., & Lehle, L. (1987). Protein glycosylation in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, 906(1), 81-99. doi:https://doi.org/10.1016/0304-4157(87)90006-2

- Trueheart, J., Boeke, J. D., & Fink, G. R. (1987). Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol Cell Biol*, 7(7), 2316-2328.
- Trueheart, J., & Fink, G. R. (1989). The yeast cell fusion protein FUS1 is O-glycosylated and spans the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86(24), 9916-9920.
- Valtz, N., Peter, M., & Herskowitz, I. (1995). FAR1 is required for oriented polarization of yeast cells in response to mating pheromones. *J Cell Biol*, 131(4), 863-873.
- Wang, S., Narendra, S., & Fedoroff, N. (2007). Heterotrimeric G protein signaling in the Arabidopsis unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(10), 3817-3822. doi:10.1073/pnas.0611735104