



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA  
LICENCIATURA EN INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
BÁSICA

PARTICIPACIÓN DE LA PROTEÍNA DE  
ANDAMIAJE PBS2 (MAPKK) EN EL ESTRÉS DE  
RETÍCULO ENDOPLÁSMICO INDUCIDO POR  
TUNICAMICINA EN *Saccharomyces cerevisiae*

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
**LICENCIADO EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA BÁSICA**

**P R E S E N T A:**  
**URIEL CRUZ MARTÍNEZ**

**Facultad de Medicina**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA**



MÉXICO, D. F.

MAYO/2012



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.

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega en el laboratorio 302-oriente, del Departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la asesoría técnica de la Dra. Laura Kawasaki Watanabe.

Así como la asesoría técnica de del personal de la Unidad de Biología Molecular y de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

El proyecto fue apoyado parcialmente por DGAPA-PAPIIT No. IN210110 y CONACYT No: 80343.

# AGRADECIMIENTOS

A mis Padres, sin su apoyo desde el inicio nada de esto sería posible. Por guiarme por caminos difíciles y no dejarme de lado jamás.

A mi familia, Gisela, Omar, mis abuelita Manuela y mis tíos Benjamín y Luisa.

A Lorena, por tu amor, tu compañía, por acompañarme todo este tiempo (Todo), con sus altibajos. De ti aprendí a complementar mi vida académica y muchas cosas más. Sin tu apoyo probablemente habría fracasado.

A la UNAM, mi casa, mi identidad, por las oportunidades que me ha dado, por hacerme un sujeto completo y útil a la sociedad. Y por si fuera poco por permitirme encontrar grandes mentores y amigos.

Al Dr. Roberto Coria, por abrirme las puertas del gran laboratorio 302-Oriente.

A los investigadores que me dieron su tiempo para la revisión de este trabajo: Dr. Roberto Coria Ortega, Dra. María Eugenia Torres Márquez, Dra. Xochitl Pérez Martínez, Dra. Leticia Rocha Zavaleta y la Dra. Laura Camarena Mejía.

A la Dra. Laura Kawasaki (Laurita), por mantener en orden el laboratorio, por tu gran ayuda y consejos técnicos, los grandes y divertidos momentos y las risas de la comida.

A mis compañeros, colegas y grandes amigos que encontré gracias a la LIBB, en especial a Diego, Paco, Eunice, Meztlli, Gordo, Carla, Carlos, Harry, Reempe, Fátima, Liz, Freyermuth, Fernanda y Truby. El orden no es jerárquico.

A mis grandes amigos, Giovanni, Roussel, Sofía e Iván. Desde la prepa han estado conmigo. ¡Gracias!

A Paco por sus críticas duras y ácidas, por ser mi papá académico. Tus consejos para el lab, la vida y la academia me han ayudado mucho. Lo que hiciste aquí y en tierras lejanas siempre te lo agradeceré.

A todos en el 302-Oriente, ha sido la mejor temporada de la licenciatura y de mi vida.

# Índice

<b>1. Resumen.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Introducción.....</b>	<b>4</b>
2.1.    MAP cinasas.....	4
2.2.    Respuesta a estrés osmótico.....	5
2.3.    Pbs2.....	10
2.4.    Respuesta a proteínas mal plegadas.....	12
<b>3. Antecedentes.....</b>	<b>15</b>
<b>4. Objetivos.....</b>	<b>16</b>
<b>5. Hipótesis.....</b>	<b>17</b>
<b>6. Materiales y métodos.....</b>	<b>18</b>
6.1.    Cepas.....	18
6.2.    Plásmidos y construcciones.....	18
6.3.    Condiciones y medios de cultivo.....	19
6.4.    Ensayos de diluciones seriadas.....	20
6.5.    Ensayos de actividad de $\beta$ -galactosidasa.....	20
<b>7. Resultados.....</b>	<b>21</b>
7.1.    Las cepas $\Delta hog1$ y $\Delta pbs2$ son sensibles a tunicamicina.....	21

7.2.	La respuesta a tunicamicina mediada por Pbs2 no activa la UPR.....	22
7.3.	La actividad de cinasa de Pbs2 es parcialmente necesaria para responder a tunicamicina.....	24
7.4.	Las MAPKKK's de la vía de respuesta a estrés osmótico están involucradas en la respuesta a tunicamicina.....	29
7.5.	El fenotipo de sensibilidad sólo es observado en presencia de tunicamicina.....	31
<b>8.</b>	<b>Discusión.....</b>	<b>34</b>
8.1.	Pbs2 está involucrada en la respuesta a estrés por acumulación de proteínas desplegadas.....	34
8.2.	Activación del reportero de UPR.....	34
8.3.	Efecto de Pbs2 K389M.....	35
8.4.	Las MAPKKK's de la vía HOG están involucradas en la respuesta a tunicamicina.....	37
8.5.	Los fenotipos observados en las mutantes de la vía de respuesta a estrés osmótico sólo se inducen en presencia de tunicamicina.....	40
<b>9.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>42</b>
<b>10.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>43</b>
<b>11.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>44</b>

## 1. RESUMEN

El Estrés de Retículo Endoplásmico (ERE) es una condición en la que existe una acumulación anormal de proteínas mal plegadas que induce la transcripción de diversas chaperonas. En *S. cerevisiae* los sensores de ERE son Kar1p e Ire1p, que procesan a *HAC1* (activador transcripcional) el cual actúa positivamente sobre los genes que participan en la respuesta a proteínas mal plegadas.

Por otro lado, Pbs2p es una proteína de andamiaje y MAP cinasa cinasa (MAPKK) que participa en la vía HOG de respuesta a estrés osmótico. Activa a la MAPK Hog1p al ser activada por Ssk2/22p o Ste11p, que a su vez transmiten la señal de Sln1p o Sho1p (sensores), respectivamente. Además se ha observado que Pbs2p se requiere en la célula para sobrevivir al ERE, ya que una mutante  $\Delta pbs2$  es sensible a tunicamicina (agente inhibidor de la N-glicosilación)

El objetivo de este trabajo fue definir si se requiere la actividad de MAPK cinasa de Pbs2p para responder a estrés por acumulación de proteínas mal plegadas inducido por tunicamicina en *S. cerevisiae*.

Expresamos Pbs2p silvestre y una forma de Pbs2p sin actividad de cinasa ( $pbs2p^{K}$ ) para determinar mediante ensayos de complementación si se revierte la sensibilidad a tunicamicina mostrada por una cepa  $\Delta pbs2$ . Observamos que la actividad de cinasa de Pbs2p es parcialmente necesaria para responder a tunicamicina.

Posteriormente estudiamos si existe algún cambio en la expresión de un gen reportero que contiene al elemento de respuesta a proteínas desplegadas (UPRE) en las cepas silvestre,  $\Delta hog1$ ,  $\Delta pbs2$  y  $\Delta hac1 \Delta ire1$ , en el fondo genético BY, mediante ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Los ensayos demostraron que ni Pbs2p ni Hog1 están involucradas en la activación clásica de UPR, lo que sugiere que la respuesta a tunicamicina es mediada por un mecanismo distinto.

Analizamos si existía algún fenotipo en presencia de tunicamicina de las mutantes nulas de los componentes de ambas ramas de la vía HOG río arriba de Pbs2p. Los datos que obtuvimos sugieren que el complejo formado para responder a tunicamicina es distinto al requerido para responder a estrés osmótico, a pesar de que requiere componentes de las ramas de SHO1 y SLN1.

Finalmente observamos que el efecto de la tunicamicina es distinto al de otros agentes inductores de ERE como DTT, ya que en presencia de DTT las cepas no mostraron fenotipo de sensibilidad.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 MAP cinasas

Para responder a los distintos estímulos que pueden presentarse en el ambiente, la célula ha desarrollado diversos sistemas y vías de señalización mediante los cuales es capaz de adaptar su fisiología para tener una mayor oportunidad de supervivencia. Uno de estos sistemas son las vías de las MAP cinasas (MAPKs). Diversos componentes de estas vías fueron descritos por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* aunque se ha descubierto que es un sistema conservado a lo largo de la evolución en el reino eucarionte.

Las vías de MAP cinasas pueden ser activadas por diversas clases de estrés y señales moleculares, pero a pesar de la alta diversidad de estímulos que promueven la activación de estas proteínas, solo se produce la respuesta necesaria evitando el *cross-talk* entre ellas mediante regulación interna de la vía (Nikolaou et al., 2009). En *S. cerevisiae* existen al menos 5 vías de MAP cinasas que han sido ampliamente descritas, modulan la respuesta celular a feromonas, condiciones de privación de nutrientes, estrés hiperosmótico, daño a la pared celular, ensamblaje de la espora, estrés hipoosmótico, estrés de los filamentos de actina, y estrés por calor, entre otros (Gustin et al., 1998).

Una vía típica de MAP cinasas consta de 3 componentes principales. Una MAP cinasa cinasa (MAPKKK o MEKK) que al ser activada fosforila dos residuos de serina o treonina de una MAP cinasa cinasa (MAPKK o MEK) para activarla, para que a su vez active una MAP cinasa (MAPK o ERK) fosforilando dos residuos de treonina y tirosina en un motivo T-X-Y. Esta interacción no es la que da la especificidad de estas vías ya que existen múltiples MAP cinasas con motivos de activación similares y están en constante actividad, por lo que la célula ha desarrollado estrategias diversas de regulación (Chen and Thorner, 2007).

Después de ser activadas, las MAP cinasas activan diversas proteínas blanco mediante la fosforilación de un residuo de serina o treonina en un motivo S/T-P. Este evento por si solo no

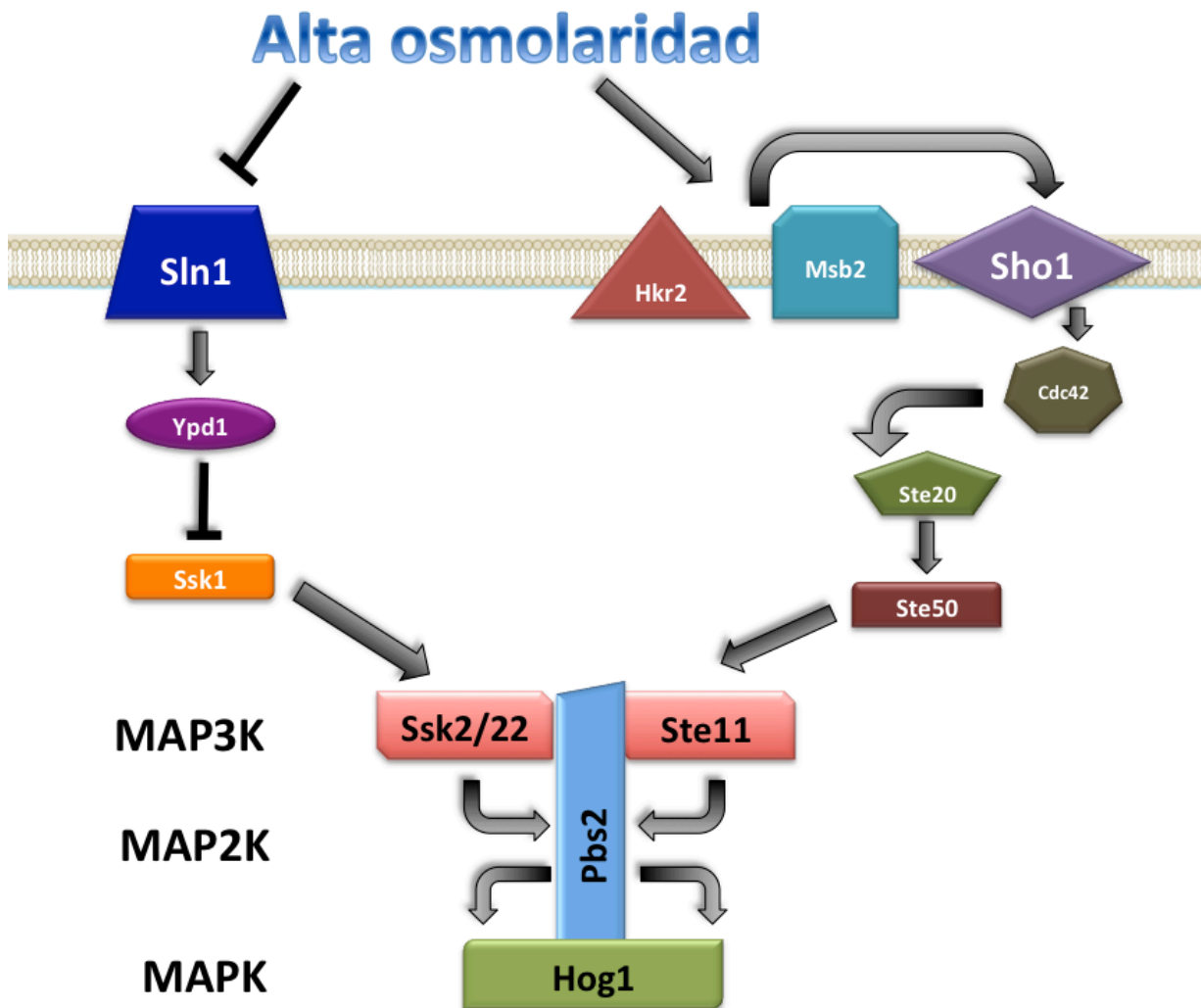


confiere una selectividad fina, por lo que las MAP cinasas además requieren del andamiaje y la compartimentalización que permite que exista selectividad solo por sus sustratos (Mori et al., 1996).

Entre los blancos de las MAP cinasas están algunos factores de transcripción, reguladores traduccionales y otras proteínas que les permiten poner en marcha programas de expresión génica o cambios en la fisiología de la célula en respuesta a diversos estímulos. Además las MAP cinasas también activan fosfatasas que permiten regular la activación de la cascada de señalización mediante asas de retroalimentación negativa (Posas and Saito, 1997; Posas et al., 1996).

## **2.2 Respuesta a estrés osmótico**

El estrés osmótico es una de las diversas condiciones ambientales a las que se enfrenta la levadura *S. cerevisiae*. En esta situación, el medio extracelular tiene una concentración de soluto lo suficientemente alta para alterar la presión de turgencia de la célula, que puede desencadenar alteraciones de la pared celular e incluso la muerte de la célula. Para adaptarse a dichas condiciones hiperosmóticas del medio la célula posee una vía de MAP cinasas llamada HOG (High Osmolarity Glycerol). Su nombre se debe a que para contrarrestar las condiciones hiperosmóticas produce el osmolito glicerol que incrementa la concentración intracelular de soluto y le permite estabilizarse osmóticamente.



**Figura 1.** Esquema de la vía HOG de respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae*. En la rama de SLN1 la alta osmolaridad en el medio provoca la inhibición del sistema de fosforrelevo de Sln1p-Ypd1p-Ssk1p, cuando Ssk1p no está fosforilado se asocia al dominio autoinhibitorio de la MAP3K Ssk2/22p, permitiéndole fosforilar a la MAP2K Pbs2p y finalmente a la MAPK Hog1p. En la rama de SHO1 la alta osmolaridad es detectada por Hkr2p y Msb2p, que activan a Sho1p, lo que le permite reclutar a las proteínas del complejo formado por Cdc42p-Ste20p-Ste50p-Ste11p-Pbs2p-Hog1p, posteriormente activan a la MAP3K Ste11p, que fosforila a la MAP2K Pbs2p la cual a su vez fosforila a la MAPK Hog1p.

La vía HOG está particularmente bien descrita en la levadura y consiste de dos ramas (*Figura 1*). La rama de SHO1 y la de SLN1. Una esta compuesta por un sistema de fosforrelevo similar a los presentes en procariontes que incluye a Sln1p, Ypd1p y Ssk1p. Sln1p es una histidin cinasa transmembranal, sensible a cambios en la presión de turgencia (estrés osmótico), se ha

sugerido que dichos cambios son sensados mediante el cambio en la orientación de sus dominios transmembranales, que finalmente se traducen en cambio en la conformación de su región citoplásmica que pueden activar o inactivar su histidin cinasa (Mori et al., 1996). En condiciones osmóticamente normales transfiere un grupo fosfato a Ypd1p, la proteína de fosfotransferencia que contiene histidina (HPT) y finalmente se transfiere al regulador de respuesta Ssk1p. Cuando existe una condición hiperosmótica en el medio la actividad de cinasa de Sln1p es suprimida e induce la acumulación de Ssk1p no fosforilado que se une mediante su extremo carboxilo (el extremo aceptor del fosfato) al extremo amino de alguna de las MAP cinasas redundantes Ssk2p o Ssk22p, en su dominio autoinhibitorio. Esta interacción promueve la autofosforilación que activa a Ssk2p/Ssk22p y cualquiera de estas proteínas, al liberarse de su dominio autoinhibitorio es capaz de unirse y fosforilar la MAPKK Pbs2. En un fondo genético  $\Delta sln1 \Delta ssk2/22$ , la expresión de Ssk2p es capaz de activar a Hog1p de forma constitutiva, resultando en un fenotipo letal. Sin embargo, en el mismo fondo genético la actividad de Ssk22p por si sola es incapaz de transducir la señal a niveles letales para la célula. Este comportamiento probablemente se debe a diferencias en su expresión o actividad (Bicknell et al., 2010).

La otra vía de respuesta a estrés osmótico es la vía de la proteína transmembranal Sho1p que además interviene en la respuesta a estrés por calor y cambios en la glicosilación de proteínas (*Figura 1*) (Cullen et al., 2000). Sho1p, tiene 4 dominios transmembranales y un dominio SH3 en su extremo amino mediante el cual recluta a la MAP cinasa Pbs2 (en el dominio RSD-II), pero no la activa directamente, para esto requiere a la MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK) Ste11, a la cinasa de la familia PAK Ste20p, la GTPasa Cdc42p y Ste50p. Aunque Sho1p no es propiamente el sensor de estrés osmótico, este no se ha definido aún con claridad, pero se han propuesto candidatos como son Hkr1p, Msb2p y Opy2p. Opy2p actúa junto con Sho1p como proteínas de andamiaje para dar la respuesta a estrés osmótico aunque al parecer no participa directamente en sentir condiciones hiperosmóticas. Hkr1p y Msb2p por otro lado, parecen ser sensores redundantes de estrés osmótico, aunque se ha propuesto que podrían existir otras proteínas que, junto con estas, formen un gran complejo sensor. Ambas proteínas (Hkr1p y Msb2p) parecen percibir el estrés osmótico mediante un mecanismo

distinto a la presión de turgencia que detecta Sln1p, y mas bien, parecen detectar cambios de volumen mediante sus regiones ricas en serina y treonina (STR, Serine Threonine Rich), que están altamente glicosiladas. Al percibir los cambios de volumen, Hkr1p y Msb2p, parecerían provocar un cambio conformacional en Sho1p que la activa en respuesta al estrés hiperosmótico (Bicknell et al., 2010; Takatsuki et al., 1972; Shang et al., 2002)

Cuando Sho1p se activa por Msb2p o Hkr1p, recluta al módulo Ste11p/Ste20p/Ste50p/Pbs2p/Hog1p a la membrana (interactuando únicamente con un motivo rico en prolinas en el extremo amino de Pbs2p). El complejo es reclutado por Ste20 que es conectado a la membrana por Cdc42p, en su forma activa (unida a GTP). Ste20p puede ser sustituido por Cla4p, ya que se ha observado que su sobreexpresión es capaz de revertir el fenotipo de osmosensibilidad en una mutante  $\Delta ste20$ . Esto probablemente se debe a que Cla4p también es una cinasa homóloga a PAK. Esto es apoyado por otro lado debido a que la sobreexpresión de Cdc42p en un fondo genético  $\Delta ssk2 \Delta ssk22 \Delta ste20$  (con las vías de SHO1 y SLN1 inactivas) recupera la resistencia a estrés osmótico. Cuando Ste20p es activada, fosforila a Ste11p, que en presencia de Ste50p. Ste11p y Ste50p además participan en la vías de respuesta a feromonas y de crecimiento invasivo (Tatebayashi et al., 2007; Raitt et al., 2000) .

Las MAP cinasas Ste11p y Ssk1p, de la rama SHO1 y SLN1 respectivamente, convergen en la fosforilación de la MAP cinasa cinasa Pbs2p. Pbs2p es fosforilada por cualquiera de las MAP3K's en los residuos Ser<sup>514</sup> y Thr<sup>518</sup>, esta fosforilación activa el dominio de cinasa de Pbs2p, lo que le permite fosforilar a la MAPK Hog1p, el homólogo de p38 en mamíferos.

La fosforilación de Hog1p en sus residuos Thr<sup>174</sup> y Tyr<sup>176</sup> promueve su translocación del citoplasma al núcleo mediada por la proteína G monomérica Ran-GSP1 y por el factor de importación nuclear Nmd5p. La forma fosforilada de Hog1p promueve la interrupción del ciclo celular, la inducción y/o represión de diversos genes, una disminución en la síntesis de proteínas, y la retención y síntesis de glicerol, entre otras actividades . Aunque se ha reportado que el transporte de Hog1 del citoplasma al núcleo es independiente tanto de su actividad de cinasa como de su estado de fosforilación, se ha demostrado que su fosforilación

cambia el equilibrio de este transporte acelerando su paso hacia el núcleo, lo que finalmente le permite provocar la respuesta adecuada para contender con el estrés osmótico mediante la regulación de diversos genes (Patil and Walter, 2001).

Entre los genes que activa Hog1p se encuentran: Msn1p, Msn2p y Msn4p, factores de transcripción de respuesta general a estrés, que se unen a elementos de respuesta a estrés (STRE), los genes más importantes que regula mediante estos factores son, *GPD1* y *GPD2*, genes fundamentales de la vía de síntesis de glicerol (Rep, 2000; Rep et al., 1999). Hog1p también se asocia a Sko1p, que al ser fosforilado por Hog1p pasa de ser un represor a ser un activador transcripcional mediante el reclutamiento de los complejos SAGA y SWI/SNF y modificadores de la cromatina (Posas and Saito, 1997; Tatebayashi et al., 2003). Otro importante factor con el que interactúa Hog1p es Hot1p, que además de regular diversos genes se requiere para que Hog1p se asocie a la RNA polimerasa y promueva la transcripción. Aunque para activar a Hot1p no se requiere que sea fosforilado por Hog1p, se requiere de la presencia de un Hog1p catalíticamente activo para encender la transcripción de sus genes blanco. Mecanismo probablemente mediado por otros factores como Msn1p (Yamamoto et al., 2010; Murakami et al., 2008; Alepuz et al., 2003).

Después de activar sus genes blanco y factores de transcripción, Hog1p activa (mediante fosforilación) su propia represión. Esto a través de la inducción de fosfatasa de serina/treonina y tirosina entre las cuales destacan Ptc1p, Ptp2p y Ptp3p. Ptc1p es una fosfatasa de treoninas mientras que Ptp2p y Ptp3p son fosfatasas de tirosinas. Ptc1p actúa sobre el complejo Pbs2p-Hog1p en el citoplasma, después de ser reclutada por Nbp2p. Ptp2p es el regulador negativo más importante, retiene e inactiva a Hog1p en el núcleo, por otro lado Ptp3p se asocia a Hog1p en el citoplasma, impidiendo su paso al núcleo. La inactivación de Hog1p además es asegurada mediante su exportación del núcleo hacia el citoplasma que es mediada por Xpo1p, un receptor de señal de exportación nuclear. Esta retroalimentación negativa asegura que la vía HOG solo permanezca activa en tanto persista el estrés osmótico y no sea alterado el funcionamiento normal de la célula cuando las condiciones del medio vuelven a la normalidad (Mattison and Ota, 2000; Mapes and Ota, 2004).

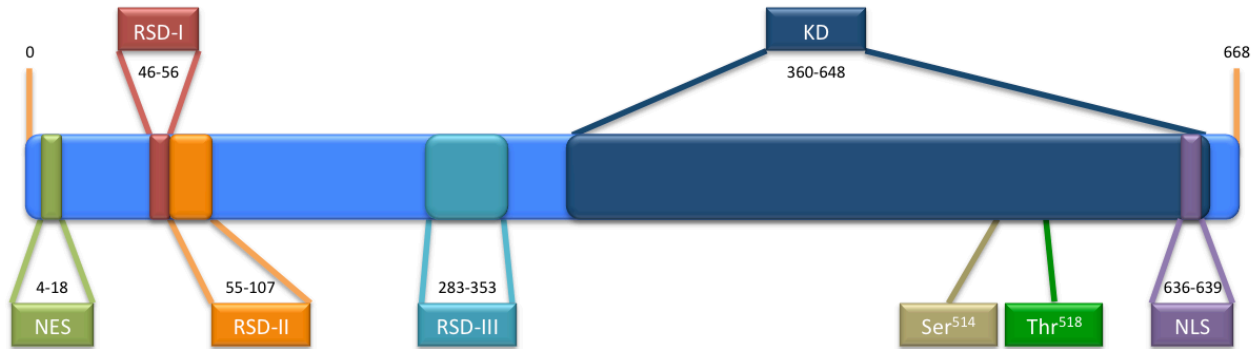
## 2.3 Pbs2

Pbs2 es una proteína cinasa y de andamiaje de 668 aminoácidos cuya actividad es fundamental en la respuesta a estrés osmótico. Se alimenta de las dos ramas (la de SHO1 y la de SLN1), agrupando a los componentes de la vía, dirigiendo el flujo de la señal y evitando el entrecruzamiento de otras señales (*Figuras 1 y 2*).

Pbs2p contiene una secuencia señal de exportación nuclear (NES) (Residuos 4-18) y una secuencia de localización nuclear (NLS) (Residuos 636-639). A pesar de contar con ambas señales su localización es citoplásmica, aunque se ha observado que si se elimina su NES, Pbs2p se localiza dentro del núcleo, dirigida por la NLS, aunque aún no se conocen las implicaciones que puede tener esta localización (Tatebayashi et al., 2003). Pbs2p se activa mediante fosforilación en dos sitios, Ser<sup>514</sup> y Thr<sup>518</sup> (*Figura 2*). Tiene además los siguientes dominios: RSD-I en la región de aminoácidos 46-56 el cual media la activación transmitida por la rama de Sln1 ya que es la región con la que interactúan Ssk2p y Ssk22p (Tatebayashi et al., 2003). Para esto se requiere el residuo Val<sup>54</sup>, el cual interviene también en la fosforilación de Hog1p. El dominio RSD-II (en la región 55-107) transmite la señal de la rama de SHO1. Los residuos Lys<sup>95</sup> y Pro<sup>96</sup> de esta región se requieren para la interacción con Sho1p (Zarrinpar et al., 2004). Esta interacción es la que media principalmente la localización polar del complejo de señalización conformado por Sho1, Cdc42, Ste20, Ste50, Ste11, Pbs2 y Hog1 (Reiser et al., 2000). En la región 283-353 se encuentra el RSD-III que contiene el dominio HBD (Hog binding domain) donde se asocia Hog1 para ser activado. El dominio HBD interactúa con los dominios CD (Common Docking) y PBD (Pbs2 Binding Domain) de Hog1p (Cullen et al., 2000).

Para la regulación negativa de la vía, Pbs2p interactúa con la proteína de andamiaje Nbp2p mediante una región SH3, que se asocia a un lugar distinto al de Sho1p. Nbp2p se une a la fosfatasa Ptc1p, y se asume que esta asociación pone en cercanía a la fosfatasa con Hog1p para desfosforilarla y así apagar la vía. También se ha observado que, posterior a la activación de Hog1p se recluta a la fosfatasa Ptc2p aunque aún no es muy claro si su principal actividad la realiza sobre Pbs2 o Hog1p (Young et al., 2002; Mapes and Ota, 2004). Sin embargo, la

suma de las actividades de Ptc1p y Ptc2p provocaría la disociación del complejo de señalización descrito previamente por Reiser et al., 2000.



**Figura 2.** Representación lineal de la estructura de Pbs2p. Se muestran los dominios que componen a Pbs2p y se indica su extensión (En número de aminoácidos). Abreviaturas: KD, (Dominio de cinasa, Kinase Domain), NES (Señal de exportación nuclear, Nuclear Export Signal), NLS (Señal de Localización Nuclear), RSD-I (Dominio Sub-Regulatorio I), RSD-II (Dominio Sub-Regulatorio II), RSD-III (Dominio Sub-Regulatorio III). Ser<sup>514</sup> y Thr<sup>518</sup> son los residuos que deben ser fosforilados en Pbs2p para habilitar su actividad de cinasa.

Aunque se ha observado que Sho1p actúa como andamio simultáneamente en la vía de Ste11p esto no interfiere con la actividad de Pbs2p, incluso ayuda a ejercer una regulación más fina al tener a Ste11p asociada a Ste20p. Así, cuando Pbs2p se asocia a Ste11p y Sho1p la transmisión de la señal es más efectiva. De hecho si se evita la asociación de Sho1p con Pbs2p (por ejemplo, alterando el dominio SH3 en Sho1p) se produce el entrecruzamiento de señales y Ste11p activado por estrés osmótico enciende la vía de respuesta a feromonas, lo que resalta la actividad regulatoria de Pbs2p (Bicknell et al., 2010; Takatsuki et al., 1972; Shang et al., 2002). Por tener una función dual en la vía de MAP cinasas, Pbs2p puede limitar la señal, pero en cambio aumenta la especificidad y la fidelidad de la señal y evita el entrecruzamiento. Lo anterior no indica que la interacción MAP3K-MAP2K en cada vía sea la única posible. Como demuestran los diversos ejemplos en los que alguna MAP3K modificada genéticamente, principalmente en sus dominios de andamiaje, es capaz de activar distintas MAP2K's. De aquí la importancia de las proteínas de andamiaje para evitar el *cross-talk* en las vías de MAP cinasas (Tatebayashi et al., 2003).

## 2.4 Respuesta a proteínas mal plegadas

Las proteínas transmembranales y las que se secretan deben atravesar el retículo endoplásmico para que se plieguen correctamente. Solo cuando una proteína finaliza su proceso de plegamiento adecuadamente puede salir del retículo y dirigirse a su destino final. En la levadura, ambos procesos, de plegamiento y salida del retículo, son monitoreados por distintas proteínas. Entre estas están las chaperonas Kar2p y Scj1p, las disulfuro isomerasas Pdi1p y Eug1p, Fkb2p (Peptidil-prolil cis-trans isomerasa), etc. El conjunto de estas proteínas están conservadas en los eucariontes y se localizan en el lumen del retículo y responden a otros tipos de estrés como por ejemplo, la privación de glucosa (Mori et al., 1996).

Cuando se compromete la capacidad de plegamiento de proteínas del retículo endoplásmico inicia la acumulación de proteínas que no están correctamente estructuradas. Eventualmente la acumulación de estas proteínas puede resultar tóxica para la célula por lo que se activa la respuesta a proteínas desdobladas (Denominada UPR), cuyos efectores fueron descritos por primera vez en *S. cerevisiae*. Esta vía percibe la concentración de proteínas desdobladas en el retículo y lo señala hacia el núcleo para generar una respuesta. La respuesta consiste esencialmente de tres fases. La primera es un cambio en la cantidad de proteínas que entran al retículo, disminuyendo la síntesis de proteínas y la translocación al mismo. La segunda fase es de adaptación a largo plazo y consiste en un incremento de la capacidad del retículo para contener con las proteínas desdobladas, implica la activación transcripcional de ciertos genes, entre los que están aquellos que codifican para la maquinaria de plegamiento. Si después de estas dos fases la capacidad del retículo sigue comprometida se inicia una tercera fase, la muerte celular (Shamu et al., 1994).

La acumulación de proteínas mal plegadas se da cuando las levaduras se tratan con: agentes reductores como el DTT o el 2-mercaptoetanol, que previenen la formación de enlaces disulfuro; inhibidores de la glicosilación de proteínas como tunicamicina, 2-desoxi-D-glucosa o privación de glucosa; métodos fisiológicos como la sobreexpresión de proteínas mutantes que requieran la vía secretoria y por lo tanto se acumulan en el retículo. Además en células de



mamífero pueden utilizarse agentes que alteren la concentración de calcio en el retículo como el A23187 o la taspigargina (Patil and Walter, 2001).

En *S. cerevisiae* Ire1p y Kar2p monitorean la presencia de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico, reconociendo ciertos oligopéptidos que solo son expuestos por proteínas incorrectamente plegadas. Este reconocimiento se da en dominios similares al surco encontrado en las proteínas del MHC de mamíferos (Gardner and Walter, 2011).

Ire1p es una proteína del retículo endoplásmico con un cruce transmembranal. Contiene una señal de localización para el retículo en su extremo amino-terminal, y dos dominios en su extremo carboxilo terminal, uno de actividad de cinasa de serina/treonina y otro de endorribonucleasa. Entre estas dos regiones se encuentra una señal de localización nuclear que es reconocida por importinas. Ire1p solo es necesaria en condiciones que promueven estrés de retículo endoplásmico y su ausencia no interfiere con la viabilidad celular. Ire1p es capaz de percibir la presencia de proteínas desdobladas indirectamente por medio del monitoreo de la concentración de Kar2p, aunque también se ha propuesto que se puede unir directamente a proteínas desdobladas, ya que según su estructura cristalográfica, al dimerizarse se forma un surco similar al del complejo principal de histocompatibilidad, en el que puede caber un péptido desdoblado, se ha propuesto que estos mecanismos suceden simultáneamente (Ron and Walter, 2007; Okamura et al., 2000).

En condiciones normales, Kar2p (una proteína de la familia de chaperonas HSP70, Heat Shock Proteins) se encuentra asociada al dominio del lumen de Ire1p. Cuando la concentración de proteínas mal plegadas en el retículo aumenta, Kar2p se separa de Ire1p y se asocia a las proteínas mal plegadas para evitar su plegamiento anómalo. Cuando Ire1p está libre pasa a su estado activo, se oligomeriza y transfosforila, mediante su dominio de cinasa, esta fosforilación estimula su actividad de endorribonucleasa sitio específica que procesa a *HAC1*, su único sustrato conocido. En su estado basal *HAC1* contiene un intrón que impide su traducción eficiente, cuando se activa la UPR es procesado, se elimina su intrón y los exones son unidos por la ligasa de RNA Trl1p. Este procesamiento es independiente de la actividad

del complejo de empalme y corte (“spliceosome”), donde Ire1p reconoce una estructura talloasa en *HAC1* que indica el sitio de corte. La versión procesada del mRNA de *HAC1* es traducido con una mayor eficiencia y su producto, Hac1p, un factor de transcripción con un zipper básico de leucina, puede translocarse al núcleo. Allí se une en dímeros a secuencias de DNA de 22 pares de bases llamadas elementos de respuesta a proteínas desdobladas (UPRE), lo que permite regular distintos genes involucrados en restablecer la capacidad del retículo para plegar proteínas adecuadamente. Esta regulación además activa la transcripción del propio *HAC1* lo que lleva a la activación de una respuesta denominada “Super-UPR” que es cualitativamente distinta. La asociación de Hac1p a los elementos UPRE requiere además del complejo SAGA, involucrado en acetilación de histonas. Este complejo también interactúa con Ire1p probablemente porque su componente Ada5p es requerido para el splicing de *HAC1* (Ron and Walter, 2007; Mori et al., 1996; Okamura et al., 2000). *HAC1* activa los genes blanco de respuesta a estrés de retículo endoplásmico, como los son chaperonas, transportadores y genes involucrados en síntesis de lípidos de membrana, que permiten la expansión del retículo, y con ello, el aumento en su capacidad para plegar proteínas.

La UPR también ayuda a la degradación de proteínas desdobladas. Esto es mediante su retrotranslocación hacia el citosol donde posteriormente, son degradadas por el proteasoma. No obstante, cuando la agregación de proteínas desdobladas es severa la célula inicia el proceso de autofagia como último recurso. La autofagia es el proceso mediador de la degradación de organelos. No obstante, cuando es inducida por la UPR se produce inicialmente una degradación selectiva del retículo (Ron and Walter, 2007).

### 3. ANTECEDENTES

En un trabajo previo realizado en el laboratorio se describió el fenotipo de sensibilidad de las cepas  $\Delta hog1$  y  $\Delta pbs2$  en el fondo genético BY en presencia de tunicamicina. Esto sugiere que la vía HOG de respuesta a estrés osmótico, o al menos las MAP cinasas de esta vía, están involucradas en la respuesta a tunicamicina.

Se demostró que es necesaria la presencia de Hog1p para responder a tunicamicina, aunque no se requiere que ésta se encuentre fosforilada (Torres-Quiroz et al., 2010). Esto sugiere que la actividad de cinasa de Pbs2p, no se requiere para que la célula sea capaz de responder al estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina. Debido a esto decidimos determinar, mediante la generación de una mutante de Pbs2p carente de actividad de cinasa ( $pbs2p^{-k}$ ), si la actividad de andamiaje de Pbs2p por si misma, es capaz de restablecer el crecimiento de una cepa  $\Delta pbs2$  en presencia de tunicamicina.

Anteriormente se reportó que una cepa  $\Delta hog1$  presenta ligeros cambios en el splicing de *HAC1* (Torres-Quiroz et al., 2010), respecto a una cepa silvestre, por lo que se decidió analizar si las proteínas Hog1p y Pbs2p están involucradas en la activación del procesamiento de *HAC1*, mediante el análisis de la expresión de un gen reportero que se encuentra bajo el control del elemento de respuesta a proteínas desplegadas, el cual es inducido por Hac1p. Sin embargo, no se han reportado los fenotipos de las mutantes nulas de las proteínas río arriba de las MAP cinasas de la vía de respuesta a estrés osmótico en respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina. Al hacer esto, es posible determinar que componentes de ambas ramas de la vía HOG están involucrados en dicha respuesta, ya que los datos que indican la participación de Hog1p sugieren que los complejos necesarios para responder a estrés osmótico pueden además funcionar para responder a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.

## 4. OBJETIVOS

- Comprobar que mutantes de la vía de SHO1 y SLN1 están involucradas en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico.
- Determinar, mediante ensayos de complementación si es requerida la actividad de cinasa de Pbs2 para responder a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.
- Determinar si Pbs2p está involucrada en la inducción de UPR inducida por tunicamicina.

## 5. HIPÓTESIS

Debido a que se han descrito previamente sistemas donde sólo alguno o algunos dominios de las proteínas efectoras son activados diferencialmente en respuesta a estímulos específicos, y que la respuesta de Hog1p independiente de su fosforilación, proponemos que la respuesta a tunicamicina mediada por Pbs2p puede depender solo del dominio de andamiaje.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Cepas

Se utilizaron las cepas DH5 $\alpha$  de *E. coli* y BY 4741 de *S. cerevisiae* y mutantes nulas derivadas de las mismas, cuyos genotipos se muestran en la *tabla 1*.

**TABLA 1.** Genotipos de las cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
DH5 $\alpha$	<i>supE44 <math>\Delta</math>lacU169(<math>\Phi</math>80 lacZ<math>\Delta</math>M15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 GM33. LAM-IN(rrnD-rrnE)1 dam-3 sup-85</i>
BY 4741	<i>MATa his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 met15<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>
BY 4742	<i>MAT<math>\alpha</math> his3<math>\Delta</math>1 leu2<math>\Delta</math>0 lys2<math>\Delta</math>0 ura3<math>\Delta</math>0</i>
BY 4741 <i>hog1<math>\Delta</math></i>	<i>MATa hog1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>pbs2<math>\Delta</math></i>	<i>MATa pbs2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>sho1<math>\Delta</math></i>	<i>MATa sho1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>hac1<math>\Delta</math> ire1<math>\Delta</math></i>	<i>MATa hac1<math>\Delta</math>::kanMX4 ire1<math>\Delta</math>clonNat</i>
BY 4741 <i>ssk1<math>\Delta</math></i>	<i>MATa ssk1<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ssk2<math>\Delta</math></i>	<i>MATa ssk2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ssk22<math>\Delta</math></i>	<i>MATa ssk22<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ssk2<math>\Delta</math> ssk22<math>\Delta</math></i>	<i>MATa ssk22<math>\Delta</math>::kanMX4 ssk2<math>\Delta</math>::kanMX4</i>
BY 4741 <i>ssk1<math>\Delta</math> ssk2<math>\Delta</math> ssk22<math>\Delta</math></i>	<i>MATa ssk1<math>\Delta</math>::kanMX4 ssk2<math>\Delta</math>::kanMX4 ssk22<math>\Delta</math>::kanMX4</i>

La cepa BY 4741 *pbs2 $\Delta$*  se transformó con la construcción pYES+Pbs2 o pYES+K389M mediante el método de LiOAc/PEG/DMSO (Amberg et al., 2005) y posteriormente las células transformadas fueron seleccionadas en medio de selección SD adicionado con los aminoácidos requeridos.

Las células competentes DH5 $\alpha$  fueron transformadas mediante choque térmico y las transformantes fueron seleccionadas en medio LB adicionado con 0.1 mg/mL de ampicilina.

### 6.2 Plásmidos y construcciones

Para monitorear la activación de la UPR se utilizó el plásmido multicopia pMCZ-Y (2 $\mu$  URA3 amp<sup>R</sup>), que contiene el elemento UPRE dentro del promotor CYC1 fusionado al gen lacZ de *E.*

*coli* (Mori et al., 1996). Para clonar los productos de PCR se utilizó el plásmido pGEM-T Easy (Promega). Las construcciones de *PBS2* y su mutante puntual se hicieron en el plásmido pYES2 (Invitrogen) entre los sitios *Bam*HI y *Xba*I. El plásmido pYES2 contiene el promotor *GAL1*, inducible con galactosa. El gen *PBS2* se clonó mediante PCR con los oligonucleótidos Pbs2XbaRev (5'-TGCCTGTTTGCTTCTAGATGGATATTAA-3') y PbsBamFwrd (5'-ATTATATTAAGCGGATCCAGACGTTAATTT-3') utilizando DNA genómico de la cepa BY 4741 como templado y una temperatura de alineamiento de 55°C. El tiempo de elongación fue de 2 minutos y medio, se realizaron 30 ciclos. Se utilizó la DNA polimerasa Platinum®Pfx (Invitrogen) (0.75 unidades por reacción) con una concentración final en la mezcla de reacción de 0.5 mM de Mg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Para realizar la construcción de la mutante puntual de Pbs2p sin actividad de cinasa (K389M) se realizó un PCR anidado utilizando los oligonucleótidos FwrdIntPBS2 (5'-CGAGCAAACAGGCTCAGATAATGG-3') MutK389MPBS2 (5'-ATTATGGCGACGATGGAAGTCCGTTTG-3') IntRevNarIPBS2 (5'-CATGTAGACGGCGCCCTCAA-3'). La primera reacción de PCR se realizó con la DNA polimerasa del kit "Expand High Fidelity PCR System" (Roche), con los oligonucleótidos MutK389MPBS2 e IntRevNarIPBS2, con DNA genómico de BY 4741 como templado, utilizando una temperatura de alineamiento de 50°C y un minuto de tiempo de elongación en 30 ciclos. El producto de la reacción realizada con 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, denominado "PCR Mut" se corrió en un gel de agarosa de bajo punto de fusión Seaplaque® (Cambrex) al 1% y posteriormente fue purificado con el kit "GeneClean® II Kit" (Q-Biogene) para ser utilizado en una segunda reacción con el oligonucleótido FwrdIntPBS2, con DNA genómico de BY 4741 como templado. La temperatura de alineamiento fue de 55°C y se dio un tiempo de elongación de un minuto y medio, realizándose 30 ciclos. El producto fue clonado entre los sitios *Aat*II y *Nar*I de una construcción de Pbs2 silvestre.

### **6.3 Condiciones y medios de cultivo**

Las células de levaduras se cultivaron a 30°C en medio YPD (1% de extracto de levadura, 2% de peptona y 2% de glucosa o galactosa, según se indica). Los ensayos de diluciones seriadas se realizaron en medio agar YPD/YPGAL adicionado con la cantidad indicada de KCl,

tunicamicina (Tm), 2-mercaptoetanol, ditioneitol (DTT), rojo congo, blanco de calcoflúor o 2-desoxi-*d*-glucosa. La solución stock utilizada de tunicamicina fue de 20 mg/mL diluida en DMSO. Las células de *E. Coli* se cultivaron a 37°C en medio LB suplementado con ampicilina (0.1 mg/mL).

#### 6.4 Ensayos de diluciones seriadas

Un cultivo líquido de levaduras crecido durante toda la noche a 30°C se diluyó a una densidad óptica  $DO_{600}=1$  y se realizaron diluciones seriadas 1:10. A partir de cada dilución se inocularon gotas de 5  $\mu$ l cada una y se crecieron durante ~36 horas a 30°C.

#### 6.5 Ensayos de actividad de $\beta$ -galactosidasa

Las cepas BY 4741, BY 4741 *hog1* $\Delta$ , BY 4741 *pbs2* $\Delta$  y BY 4741 *hac1* $\Delta$  *ire1* $\Delta$ , se transformaron con el plásmido pMCZ-Y. Posteriormente se crecieron durante toda la noche a 30°C en medio YPD, hasta alcanzar una densidad óptica (D.O.<sub>600</sub>) de 0.6, posteriormente las células se indujeron por 90 o 240 minutos en presencia de 0.5  $\mu$ g/ml de tunicamicina. Las células fueron lavadas con agua y amortiguador Z (60mM  $Na_2HPO_4$ , 40mM  $NaH_2PO_4$ , 10mM KCl y 1mM  $MgSO_4$ ). Se extrajo proteína total y se indujo la actividad en una solución con amortiguador Z,  $\beta$ -mercaptoetanol y *o*-NPG por 20 minutos a 30°C, posteriormente se detuvo la reacción con  $Na_2CO_3$  y se cuantificó la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa midiendo la absorbancia a 420 nm (Miller, 1972). El cálculo de actividad se realizó con la siguiente fórmula: Actividad (Expresada en unidades Miller) =  $1000 \text{ (Volumen total de reacción)} / (\epsilon\text{-NPG} * \text{Vol (valorado)} * \text{tiempo de reacción} * \text{mg/ml Proteína})$ . Una unidad Miller se define como la cantidad de enzima capaz de convertir 1 nmol de *o*-NPG por minuto en las condiciones del ensayo.

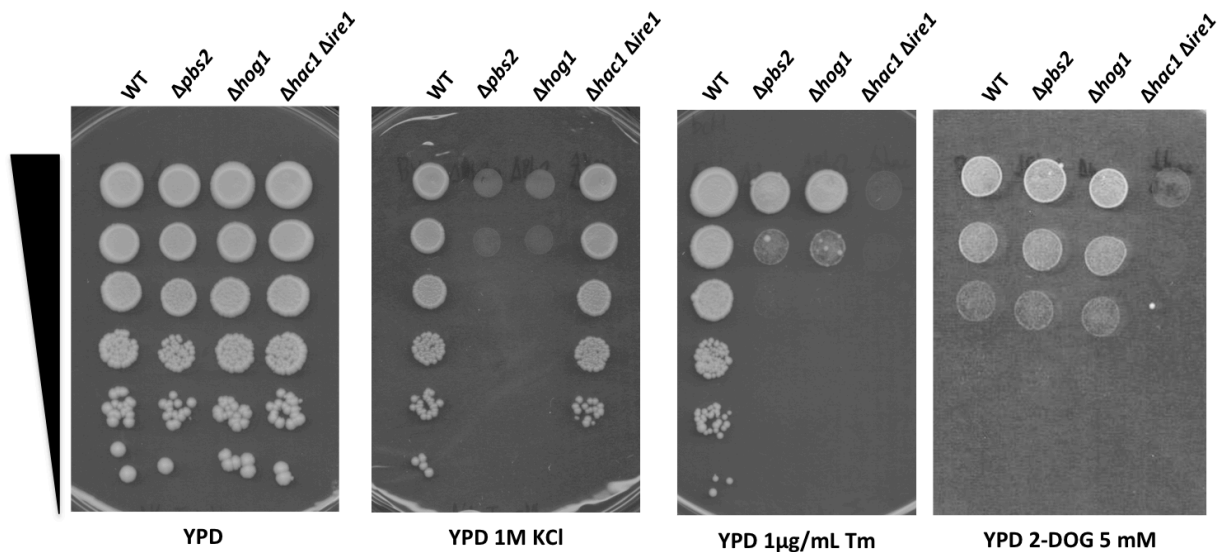
La cantidad de proteína en las muestras se cuantificó mediante el método de Bradford.



## 7. RESULTADOS

### 7.1 Las cepas $\Delta hog1$ y $\Delta pbs2$ son sensibles a tunicamicina.

Para comprobar los fenotipos de sensibilidad de algunas cepas del fondo genético BY en condiciones de estrés osmótico o estrés de retículo endoplásmico, se realizaron ensayos de diluciones seriadas 1:10 (*Materiales y métodos 5.4*) de mutantes nulas en medio YPD, con 1M KCl y agentes inductores de estrés de retículo endoplásmico, 2-desoxi-d-glucosa 5mM o 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina.



**Figura 3.** Diluciones seriadas 1:10 de distintas cepas del fondo genético BY en medio YPD con cloruro de potasio 1M (KCl), 2-desoxi-d-glucosa 5 mM (2-DOG) o tunicamicina 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Tm). Cultivos de cada cepa se crecieron durante una noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 1.0, posteriormente fueron diluidos 1:10 cinco veces y se sembraron gotas de 5  $\mu\text{L}$  en los distintos medios. Las cajas con los distintos medios se incubaron a 30°C durante ~36 horas y entonces se fotografiaron.

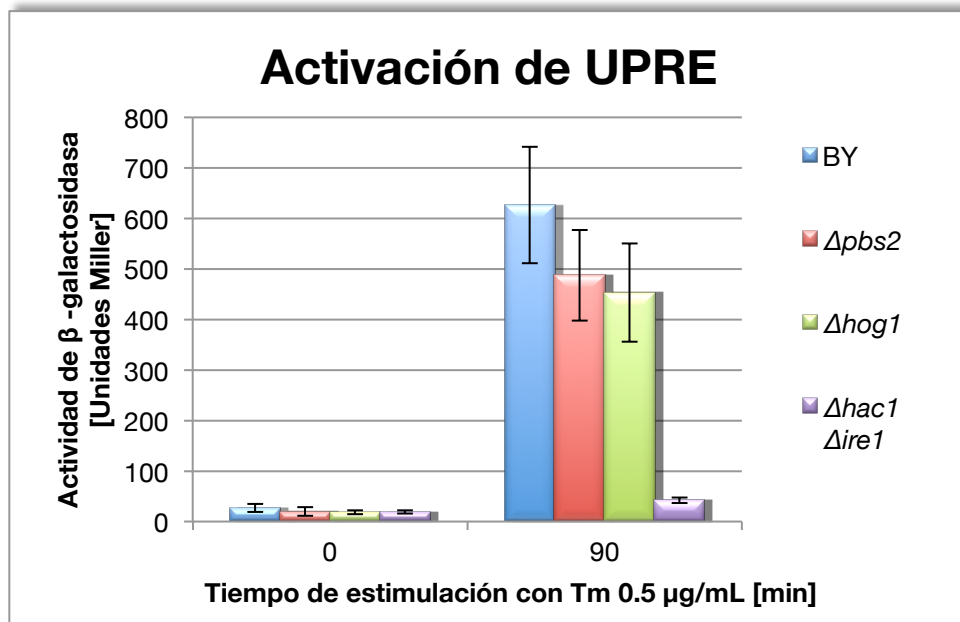
El ensayo de goteos (*Figura 3*) mostró que las cepas  $\Delta pbs2$  y  $\Delta hog1$  además de presentar sensibilidad en cloruro de potasio, como ya ha sido ampliamente reportado (Posas and Saito, 1997; Posas et al., 1996), fueron sensibles a la presencia de tunicamicina en el medio. No se observó ningún efecto de la 2-desoxi-d-glucosa sobre estas cepas, a pesar de que la 2-desoxi-d-glucosa, al igual que la tunicamicina, es un agente inductor de estrés por acumulación de

proteínas desplegadas, lo cual será discutido posteriormente. La cepa  $\Delta hac1 \Delta ire1$  es sensible en presencia de tunicamicina y 2-desoxi-*d*-glucosa (inductores de UPR), ya que esta cepa es incapaz de montar una respuesta al estrés por la acumulación de proteínas mal plegadas.

## **7.2 La respuesta a tunicamicina mediada por Pbs2p no activa la UPR**

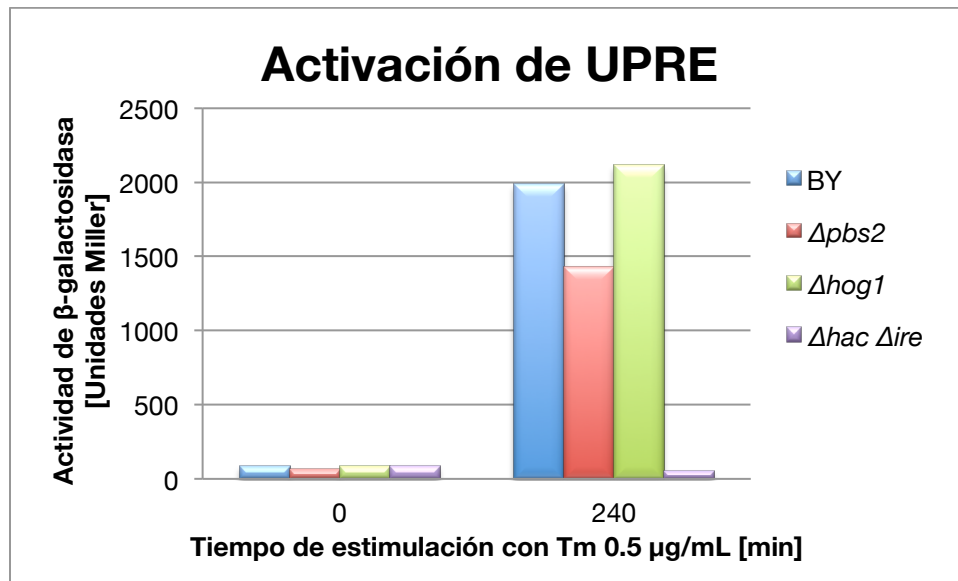
El fenotipo de sensibilidad de las cepas  $\Delta hog1$  y  $\Delta pbs2$  a la tunicamicina sugiere que estas proteínas son necesarias para que la célula pueda contender con el estrés provocado por acumulación de proteínas desplegadas.

En un acercamiento para comprobar si están involucrados en la inducción de la respuesta canónica a la acumulación de proteínas desplegadas inducida por tunicamicina, es decir, la inducción de la UPR, utilizamos un plásmido con un gen reportero de UPR (pMCZ-Y) (Mori et al., 1996), que consiste en el gen *lacZ* de *E. coli* bajo el control del elemento de respuesta a proteínas desdobladas (UPRE). Las cepas  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta hog1$ ,  $\Delta hac1 \Delta ire1$  y la silvestre del fondo genético BY se transformaron con el plásmido pMCZ-y y a partir de cultivos saturados en medio YPD se tomó un volumen adecuado para incubarse toda la noche hasta tener una densidad óptica  $D.O_{600} \approx 0.5$  y se incubaron durante 90 o 240 minutos en presencia de 0.5  $\mu\text{g/mL}$  de tunicamicina. Posteriormente a la inducción se midió la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa como se describe en “*Materiales y métodos*”.



**Figura 4.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa (expresada en unidades Miller) en las cepas BY (Silvestre),  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta hog1$  y  $\Delta hac1 \Delta ire1$  en el fondo genético BY, en el tiempo 0 y después de 90 minutos de estimulación con 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina. Los datos presentados en la gráfica corresponden al promedio  $\pm$  la desviación estándar de 3 experimentos independientes.

Los ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa mostraron que la actividad del UPRE no disminuye en ausencia de Pbs2p o Hog1p en presencia de tunicamicina en el medio (Figura 4). Como control del experimento se utilizó la cepa  $\Delta hac1 \Delta ire1$  que es incapaz de activar la UPR y como se puede observar no tiene actividad de  $\beta$ -galactosidasa. Por otro lado, la cepa silvestre tuvo un aumento importante, muy similar al que tuvieron las cepas  $\Delta pbs2$  y  $\Delta hog1$ . Aunque después de estimular a las células durante 90 minutos se observó una buena respuesta del reportero, se tomó en cuenta un reporte que sugiere que Hog1p está involucrado en la regulación de la fase tardía de la respuesta a proteínas desplegadas, la cual sucede entre 3 y 6 horas después del estímulo (Bicknell et al., 2010), lo que llevó a decidir realizar este ensayo estimulando las células con tunicamicina por un periodo más largo de tiempo (240 minutos).



**Figura 5.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa (expresada en unidades Miller) en las cepas BY (Silvestre),  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta hog1$  y  $\Delta hac1 \Delta ire1$  en el fondo genético BY, en el tiempo 0 y después de 240 minutos de estimulación con 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina.

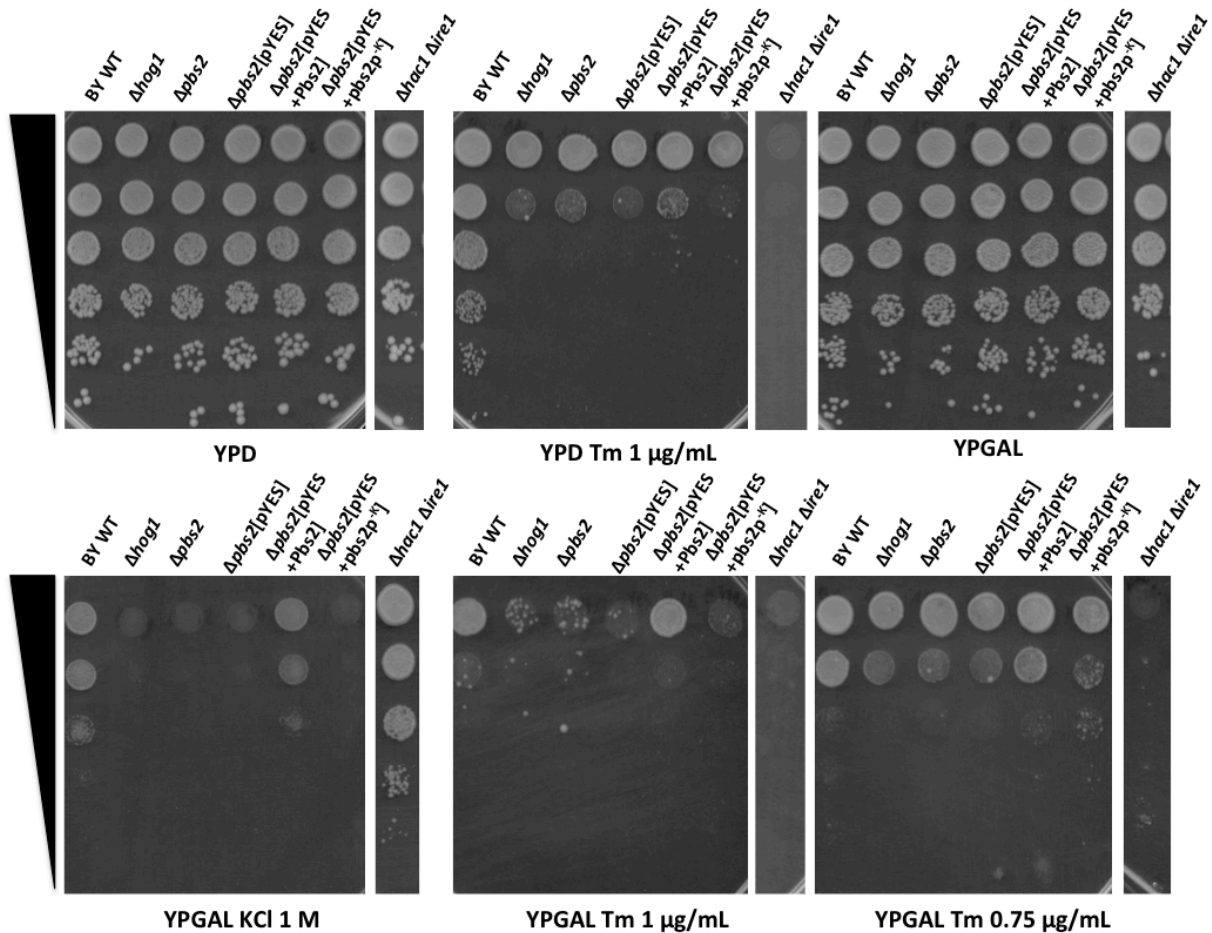
El ensayo de actividad del reportero de UPR estimulando con tunicamicina durante 240 minutos mostró un resultado similar al ensayo anterior hecho con 90 minutos de estimulación (Figura 5). Ni la mutante  $\Delta hog1$  ni la  $\Delta pbs2$  mostraron defectos en la capacidad para activar el reportero de UPR, en comparación con las cepas silvestres y  $\Delta hac1 \Delta ire1$ , que tuvieron una activación importante y casi nula, respectivamente. Esto sugiere que incluso en la respuesta tardía de la UPR es dispensable la intervención de Pbs2p y Hog1p.

### 7.3 La actividad de cinasa de Pbs2 es parcialmente necesaria para responder a tunicamicina

Existen proteínas que se valen solamente de algunos de sus dominios para responder a diversos estímulos, lo que da plasticidad y especificidad a las vías de señalización en que están involucradas. Con este mecanismo, un estímulo particular generará la interacción de solo ciertos dominios en una o varias proteínas y, en consecuencia, se evitará el *cross-talk* y sólo se generará la respuesta necesaria a ese estímulo particular. Esta regulación fina permite a la célula tener una mayor eficiencia y adecuación al medio.

Para comprobar si en la respuesta a tunicamicina, en la que sabemos está involucrada Pbs2p, se requiere sólo el dominio de andamiaje, el dominio de cinasa, o ambos, como sucede en el caso de la respuesta a estrés osmótico, se clonó el gen que codifica para Pbs2p en el plásmido pYES2, que contiene un promotor inducible por galactosa. Células BY  $\Delta pbs2$  fueron transformadas con dicha construcción. También se generó en Pbs2p una mutación puntual que tiene como consecuencia la substitución de la lisina 389 por una metionina ( $pbs2p^{K}$ ). Esta substitución elimina la actividad de cinasa de Pbs2p y no altera la función de ninguno de sus dominios de andamiaje. Adicionalmente células  $\Delta pbs2$  fueron transformadas con el plásmido pYES2 sin ninguna construcción para descartar algún efecto que este pudiera tener sobre las células.

Se realizaron ensayos de diluciones seriadas en medio YPD y YPGAL adicionado con 1M de KCl, 0.75  $\mu\text{g/ml}$  o 1  $\mu\text{g/mL}$  de tunicamicina.

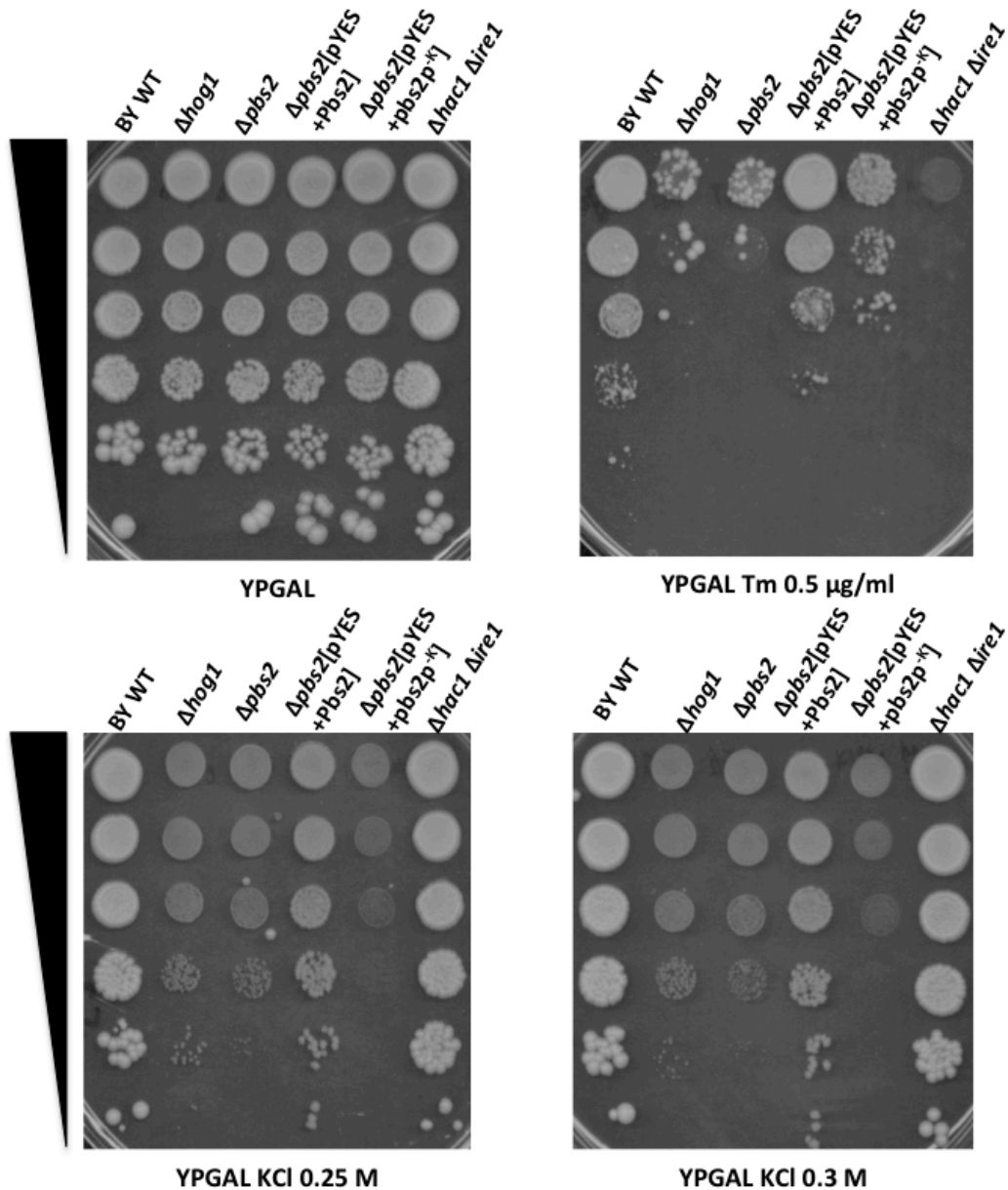


**Figura 6.** Diluciones seriadas 1:10 de distintas cepas del fondo genético BY en medio YPD o YPGAL con, Cloruro de potasio 1M (KCl), o tunicamicina 1 µg/mL, o 0.75 µg/mL (Tm). Cultivos de cada cepa se crecieron durante una noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 1.0, posteriormente fueron diluidos 1:10 cinco veces y se sembraron gotas de 5 µL en los distintos medios. Posteriormente las cajas con los distintos medios se sembraron a 30°C durante ~36 horas y entonces se fotografiaron. El plásmido pYES contiene el promotor inducible por galactosa *GAL1*, por lo que las cepas que lo contienen se crecieron en medio YPGAL.

El plásmido pYES2 vacío no tuvo efecto alguno en el crecimiento de las células en ningún medio. Por otro lado, la construcción de Pbs2p silvestre revirtió el fenotipo de sensibilidad de la cepa *Δpbs2* (Figura 6) en presencia de cloruro de potasio y tunicamicina en medio YPGAL, mientras que en YPD esto no fue observado. La construcción *pbs2p<sup>K</sup>* (Mutante de Pbs2p carente de actividad de cinasa) no complementó el defecto en el crecimiento de esta cepa en cloruro de potasio, y en tunicamicina se observó una complementación parcial en 1 µg/mL, este fenotipo fue más evidente al disminuir la concentración de esta droga a 0.75 µg/mL. Aunque en esta última condición también se observa crecimiento de la cepa *Δpbs2*, no es tan

marcado como el de la cepa con la construcción  $pbs2p^{-K}$ . Aunque el crecimiento de la cepa  $pbs2p^{-K}$  fue notable en presencia de tunicamicina, no igualó al crecimiento de las células silvestres o las de la cepa  $\Delta pbs2::pYES+Pbs2$ , ya que en el caso de éstas últimas las colonias individuales fueron más grandes y se observó saturación de las primeras gotas (*Figura 6*). Este resultado sugiere que la actividad de cinasa de Pbs2p es parcialmente necesaria para responder a tunicamicina, y la respuesta depende principalmente del dominio de andamiaje de Pbs2p.

Posteriormente buscamos si existía algún efecto de la mutante puntual  $pbs2p^{-K}$  en la respuesta a estrés osmótico en concentraciones bajas de sal. Este experimento nos puede sugerir, indirectamente, que Pbs2p aún sin su dominio de cinasa tiene actividad como proteína de andamiaje, ya que en esta concentración de sal el fenotipo observado de la cepa  $\Delta pbs2$  es más sutil y puede observarse si Pbs2p secuestra a Hog1p y, por lo tanto, induce un fenotipo de sensibilidad.



**Figura 7.** Diluciones seriadas 1:10 de distintas cepas del fondo genético BY en medio YPGAL con, Cloruro de potasio (KCl) 0.25 M y 0.3 M, o tunicamicina (Tm) 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Cultivos de cada cepa se crecieron durante una noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 1.0, posteriormente fueron diluidos 1:10 cinco veces y se sembraron gotas de 5  $\mu\text{L}$  en los distintos medios. Posteriormente las cajas con los distintos medios se sembraron a 30°C durante ~36 horas y entonces se fotografiaron. El plásmido pYES contiene el promotor inducible por galactosa *GAL1*, por lo que las cepas que lo contienen se crecieron en medio YPGAL.

Al crecer las células en 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de tunicamicina de nuevo se observó que la construcción *pbs2p<sup>-k</sup>* revirtió el fenotipo de la mutante  $\Delta\text{pbs2}$  respecto a la mutante nula, aunque su fenotipo no fue idéntico a la cepa silvestre (*Figura 7*).

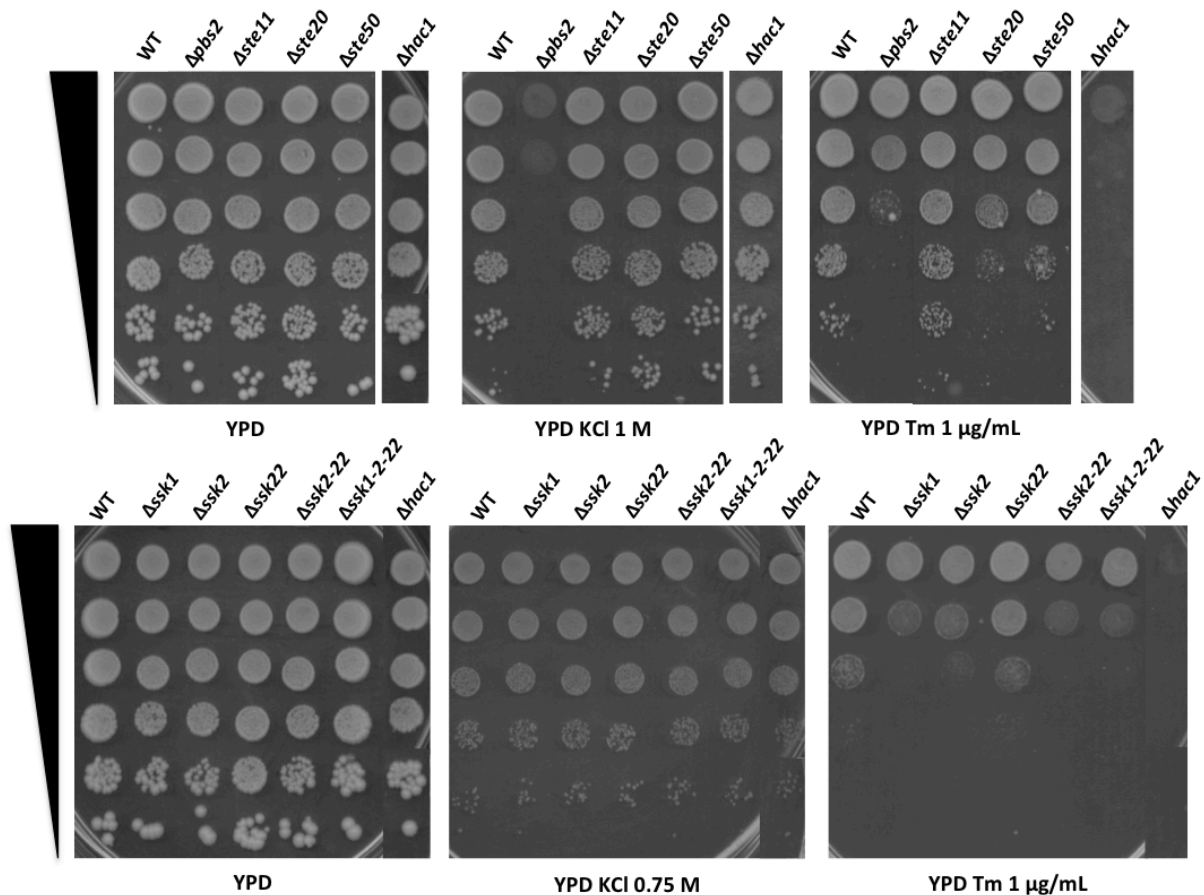


Por otro lado, como se esperaba, al crecer las células en bajas concentraciones de sal (0.25 y 0.3 M de KCl), donde el fenotipo de la mutante  $\Delta pbs2$  es más sutil, la construcción  $pbs2p^{-k}$  tuvo un ligero efecto sobre la cepa  $\Delta pbs2$  que hizo que su crecimiento fuera menor en comparación con una mutante  $\Delta pbs2$  sin transformar (*Figura 6*). Esto sugiere que la construcción  $pbs2p^{-k}$  podría estar secuestrando a Hog1p, lo que impide que se transloque al núcleo y, por lo tanto, no se evoque una respuesta al estrés osmótico. El anterior resultado sugiere que a pesar de no tener actividad de cinasa, la construcción  $pbs2p^{-k}$  sigue actuando como proteína de andamiaje.

#### **7.4 Las MAPKKK's de la vía de respuesta a estrés osmótico están involucradas en la respuesta a tunicamicina**

Después de observar que la actividad de cinasa de Pbs2p solo se requiere parcialmente para responder a tunicamicina en el medio, y dado que no se requiere el estado fosforilado de Hog1p para responder a dicha condición, decidimos analizar si mutantes nulas de las MAPKKK's río arriba de Pbs2p tienen alguna implicación en su crecimiento en presencia de tunicamicina.

Crecimos a las mutantes sencillas en los componentes de cada rama de respuesta a estrés osmótico (SLN1 y SHO1) en diluciones seriadas en medio YPD adicionado con cloruro de potasio o tunicamicina, según se indica en la *Figura 8*.



**Figura 8.** Diluciones seriadas 1:10 de distintas cepas del fondo genético BY en medio YPD con Cloruro de potasio (KCl) 1 M o 0.75 M o 1  $\mu$ g/mL de tunicamicina (Tm). Cultivos de cada cepa se crecieron durante una noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 1.0, posteriormente fueron diluidos 1:10 cinco veces y se sembraron gotas de 5  $\mu$ L en los distintos medios. Posteriormente las cajas con los distintos medios se sembraron a 30°C durante ~36 horas y entonces se fotografiaron. Las mutantes de la parte superior de la figura corresponden a genes de la rama de Sho1, mientras que las del renglón inferior corresponden a la rama de Sln1.

Observamos el crecimiento de diversas mutantes nulas de las MAP3K's río arriba de Pbs2p en el fondo genético BY en medio YPD en presencia de tunicamicina para comprobar si alguna de estas proteínas está involucrada en el mecanismo de respuesta a esta droga.

En primer lugar, las cepas  $\Delta$ ste20 y  $\Delta$ ste50 (Parte de la rama de Sho1 de respuesta a estrés osmótico) tuvieron un fenotipo de sensibilidad en presencia de tunicamicina respecto a la cepa silvestre (Figura 8). Aunque previamente ha sido descrito que Ste20p, Ste50p y Ste11p

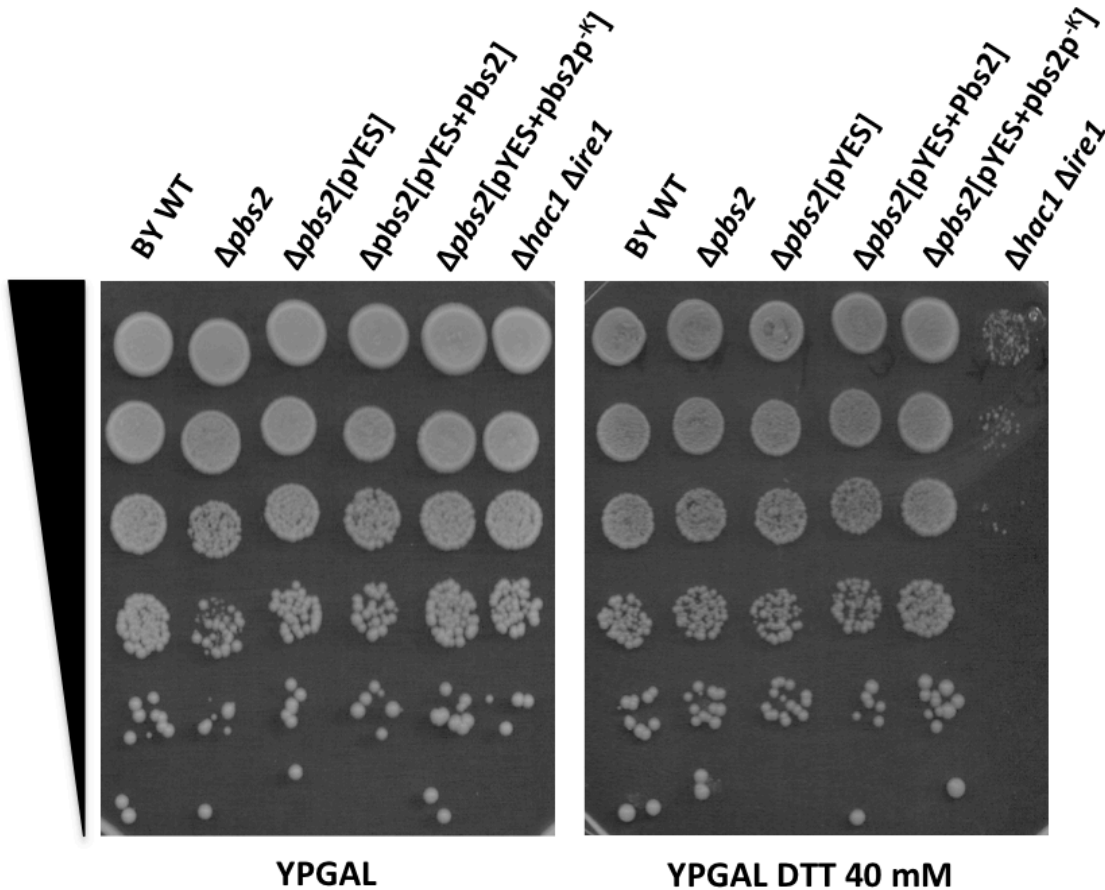
forman parte de la misma vía y mutantes nulas de cualquiera de estas proteínas (en un fondo genético donde la rama de SLN1 esté abatida) muestran el mismo fenotipo de sensibilidad al enfrentarse a estrés osmótico (Posas and Saito, 1997; Raitt et al., 2000), en el caso de la respuesta a tunicamicina se muestra claramente una diferencia en su fenotipo, aún sin haber abatido la actividad de la rama de SLN1. En esta parte del ensayo no utilizamos la cepa  $\Delta sho1$ , proteína membranal de la rama del mismo nombre, ya que trabajo previo realizado en el laboratorio demostró que no es requerida en la respuesta a tunicamicina (Torres-Quiroz et al., 2010).

En el caso de las mutantes de la rama de SLN1, las cepas  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2$  tuvieron un fenotipo de sensibilidad en presencia de tunicamicina respecto a la cepa silvestre (*Figura 8*). El fenotipo que presentaron estas cepas no fue aditivo al realizar este mismo ensayo con mutantes triples  $\Delta ssk1-ssk2-ssk22$  o la mutante doble  $\Delta ssk2-ssk22$ , lo cual sugiere que en este caso al menos Ssk1p y Ssk2p participan de forma lineal en la misma vía. Es importante notar que aunque *SSK2* y *SSK22* siempre han sido considerados genes parálogos con actividad redundante, las mutantes nulas sencillas de cada gen tienen un comportamiento distinto en presencia de tunicamicina. Este fenotipo diferencial no es observado en KCl debido a que, al menos en esa condición, parecen actuar de forma redundante.

### **7.5 El fenotipo de sensibilidad sólo es observado en presencia de tunicamicina**

Previamente han sido reportados estudios en los que se utiliza a la tunicamicina como agente inductor de estrés de retículo endoplásmico, aunque frecuentemente se menciona que puede tener otros efectos debido, entre otras cosas, a su estructura y a que consiste de una mezcla de distintos compuestos (Ito et al., 1980; Kuo and Lampen, 1974; Brandish et al., 1996; Yang et al., 2009). Después de considerar la posibilidad de que el efecto observado sobre las cepas  $\Delta pbs2$  y  $\Delta hog1$  sólo se de en presencia de tunicamicina, lo cual fue sugerido por un ensayo en el que se utilizó, además de la tunicamicina, a la 2-desoxi-*d*-glucosa para inducir UPR (*Figura 3*), en donde esta última droga no tuvo efecto alguno sobre el crecimiento de las cepas  $\Delta hog1$  o  $\Delta pbs2$  respecto a la cepa silvestre, decidimos realizar ensayos de diluciones seriadas en

presencia de otro agente que induce estrés por acumulación de proteínas desplegadas, como lo es el DTT.



**Figura 9.** Diluciones seriadas 1:10 de distintas cepas del fondo genético BY en medio YPGAL con, Cloruro de potasio (KCl) 1 M, ditionitrotol (DTT) 40 mM. Cultivos de cada cepa se crecieron durante una noche a 30°C y se ajustaron a una densidad óptica a 600 nm de 1.0, posteriormente fueron diluidos 1:10 cinco veces y se sembraron gotas de 5  $\mu$ L en los distintos medios. Posteriormente las cajas con los distintos medios se sembraron a 30°C durante ~36 horas y entonces se fotografiaron. El plásmido pYES contiene el promotor inducible por galactosa *GAL1*, por lo que las cepas que lo contienen se crecieron en medio YPGAL.

La presencia de 40 mM de DTT no tuvo ningún efecto sobre el crecimiento de las cepas  $\Delta pbs2$  o las complementadas con Pbs2p o la mutante  $pbs2p^{-k}$  (Figura 9). Este comportamiento sugiere que el fenotipo observado en los ensayos con tunicamicina es un efecto exclusivo de esta droga, aunque esto no significa que la respuesta montada por la célula no sea para enfrentar al estrés por acumulación de proteínas desdobladas, ya que al agregar tunicamicina

al medio la cepa  $\Delta hac1 \Delta ire1$ , incapaz de montar UPR, tiene un fuerte fenotipo de sensibilidad. Este efecto indica que la tunicamicina efectivamente está induciendo estrés de retículo endoplásmico aunque la forma en que lo hace y por lo tanto los mecanismos mediante los cuales responde la célula son distintos, al menos respecto de el DTT. Además la sensibilidad de la cepa  $\Delta hac1 \Delta ire1$  a DTT indica que este agente es activo y está provocando estrés de retículo endoplásmico.

## 8. Discusión

### 8.1 Pbs2p está involucrada en la respuesta a estrés por acumulación de proteínas desplegadas

Después de observar que la MAP cinasa de la vía HOG de respuesta a estrés osmótico Hog1p está involucrada en la respuesta a estrés por acumulación de proteínas desdobladas inducido por tunicamicina (Torres-Quiroz et al., 2010), se decidió investigar si las MAP cinasas río arriba estaban igualmente involucradas en esta respuesta de la misma forma en la que responden al estrés osmótico, es decir mediante las vías de SHO1 y SLN1, convergiendo en el nodo Pbs2p (MAP2K).

El observar que la mutante  $\Delta pbs2$  tuvo un fenotipo similar a la cepa  $\Delta hog1$  indicó que al menos al nivel de la MAP2K el funcionamiento de la respuesta a acumulación de proteínas desplegadas podía ser similar al de la respuesta a estrés osmótico, lo que nos llevó a varios cuestionamientos: En primer lugar, determinar si esta vía está involucrada en la activación del mecanismo canónico de UPR, la vía de Hac1p e Ire1p (Shamu et al., 1994). Determinar si otras MAP cinasas o componentes de la vía HOG están involucrados en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico. Comprobar si la actividad de cinasa de Pbs2 se requiere para responder a la presencia de tunicamicina en el medio, ya que una cepa con un Hog1p no fosforilable es viable en presencia de tunicamicina (Torres-Quiroz et al., 2010). Finalmente se determinó si los fenotipos observados se repetían en presencia de otros agentes que inducen UPR en levaduras.

### 8.2 La inactivación de la vía de HOG no afecta la respuesta a proteínas desdobladas

No se observó cambio alguno en la activación del reportero de UPR en presencia de tunicamicina de las cepas  $\Delta pbs2$  y  $\Delta hog1$ , lo cual puede indicar dos situaciones. Primero, que estas proteínas no están involucradas en la inducción canónica de UPR y, por consiguiente, no tienen relación alguna con Hac1p e Ire1p para inducir la respuesta a proteínas desplegadas.

Segundo, que la tunicamicina provoca otro tipo de estrés, además del estrés de retículo endoplásmico, en el que la célula requiere a Pbs2p y Hog1p para sobrevivir. Sin embargo, las mutantes son sensibles, lo que sugiere que participan en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.

Previamente se había demostrado una relación epistática entre Hog1p e Ire1p en respuesta a tunicamicina, el cambio en la fosforilación y localización de Hog1p en esta condición y el requerimiento de la vía HOG para responder adecuadamente al estrés inducido por esta droga (Torres-Quiroz et al., 2010; Bicknell et al., 2010). Cabe la posibilidad de que la tunicamicina esté provocando otro tipo de efecto sobre la célula, además de estrés por acumulación por proteínas desdobladas, ya que la tunicamicina no afecta directamente al retículo endoplásmico, si no a la GlcNAc-1-P transferasa, inhibiendo la N-glicosilación. Dicha ausencia de N-glicosilación puede afectar la vía secretora o interferir en la composición y morfología de la pared celular y, por lo tanto, en su sensibilidad a estímulos externos. Esto es congruente con el hecho de que la 2-desoxi-*d*-glucosa no afecta el crecimiento de mutantes de la vía de HOG, lo que indica que los agentes inductores de estrés de retículo endoplásmico se interpretan de manera diferente en las mutantes (Bicknell et al., 2010; Takatsuki et al., 1972; Shang et al., 2002). Además se ha observado que la rama de Sho1 puede ser activada como consecuencia de defectos en glicosilación proteica, dicho efecto puede ser provocado por la tunicamicina (Cullen et al., 2000).

### **8.3 La actividad de cinasa de Pbs2p es dispensable para responder a tunicamicina**

La actividad de Pbs2 es fundamental para responder a estrés osmótico (Maeda et al., 1995), por lo que la construcción  $pbs2p^{-K}$ , en la cepa  $\Delta pbs2$ , no fue capaz de restablecer el fenotipo de crecimiento en sal (*Figura 6*). En presencia de tunicamicina, la construcción  $pbs2p^{-K}$  reestableció parcialmente el crecimiento de la mutante  $\Delta pbs2$  aunque esta no presentó un crecimiento equiparable al de la cepa silvestre o de la mutante complementada con Pbs2p silvestre, lo cual sugiere que la actividad de cinasa de Pbs2p es dispensable parcialmente para responder a tunicamicina.

Previamente observamos que una cepa  $\Delta hog1$  transformada con un alelo no fosforilable de *HOG1* produce un ligero restablecimiento del crecimiento en presencia de tunicamicina, mientras que un alelo sin actividad de cinasa no tiene efecto alguno en la misma cepa (Torres-Quiroz et al., 2010), además en una cepa donde Hog1p es mantenido en el citoplasma hay una mayor resistencia a tunicamicina (datos no publicados del laboratorio), esto junto con nuestro resultado anterior indica que la actividad de cinasa de Pbs2p, a pesar de estar involucrada en la respuesta a tunicamicina, no es indispensable para la supervivencia de la célula. Lo anterior indicaría que la actividad necesaria en Pbs2p para responder a tunicamicina es la de andamiaje, como lo hace en el caso de la respuesta a estrés osmótico (Posas and Saito, 1997; Tatebayashi et al., 2003). Probablemente en esta respuesta no se siga la misma dinámica de activación.

La(s) interacción(es) que pueda tener Pbs2p para inducir la respuesta a tunicamicina puede ser a diversos niveles. Previamente se han descrito niveles de regulación y discriminación de estímulos en diversas partes de la vía de respuesta a estrés osmótico, como en el reclutamiento a la membrana mediado por Sho1p y Opy2p, o las interacciones con transportadores nucleares que regulan la localización de Pbs2p, o la interacción directa con Hog1p para mantenerlo en el citoplasma. También se ha reportado que aún si es mantenido en el citoplasma impidiendo su transporte al núcleo, la célula es capaz de responder a estrés osmótico (Westfall et al., 2008; Yamamoto et al., 2010; Murakami et al., 2008).

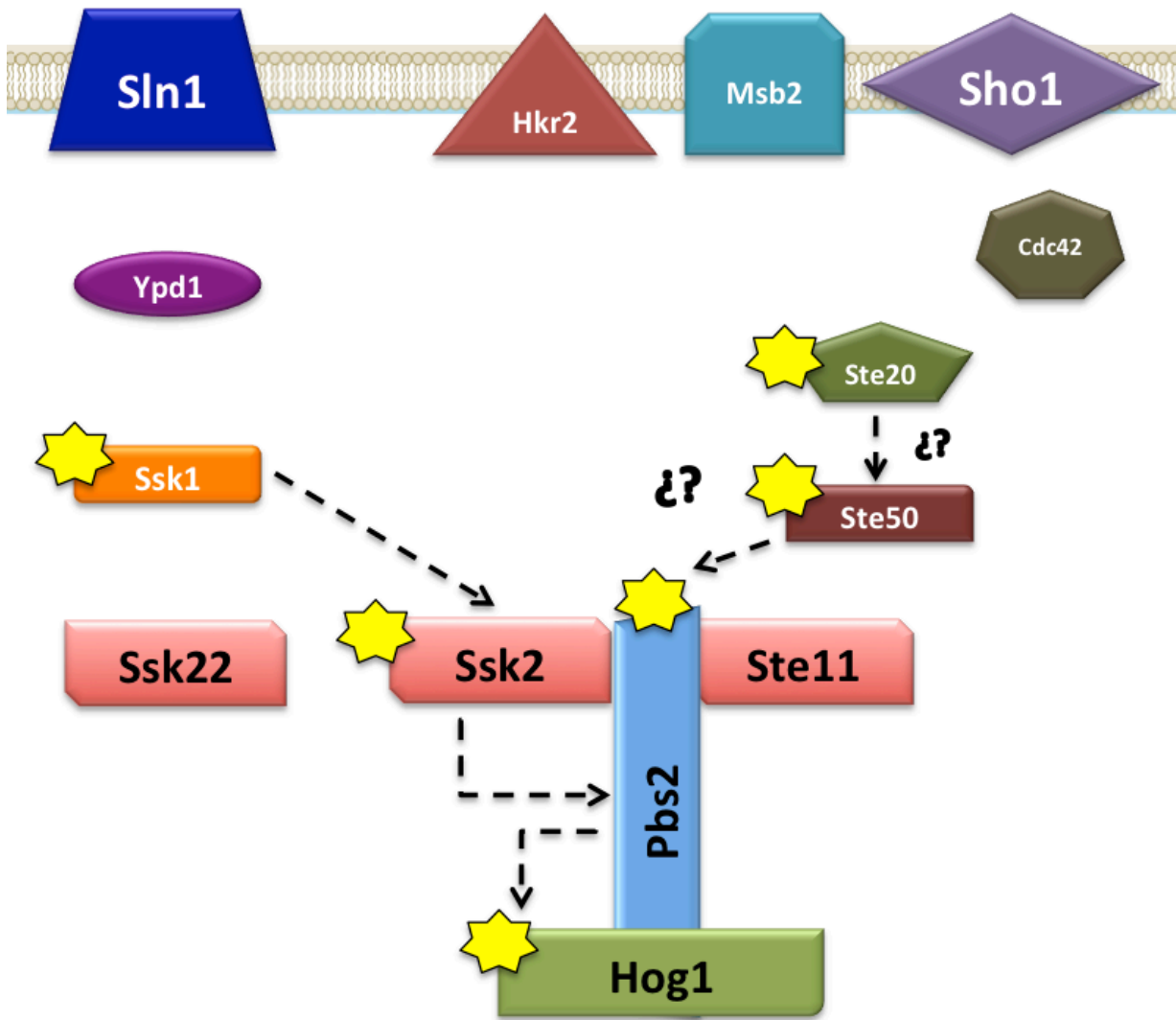
Los fenotipos de sensibilidad de las cepas  $\Delta hog1$  y  $\Delta pbs2$  son idénticos en tunicamicina y concentraciones altas de sal (1 M de KCl) pero después de observar el fenotipo distinto de la cepa  $\Delta pbs2[pYES+pbs2p^{-K}]$  en tunicamicina, decidimos realizar ensayos de diluciones seriadas en bajas concentraciones de sal (0.25 y 0.3 M de KCl). En este tipo de ensayos las cepas  $\Delta hog1$  y  $\Delta pbs2$  tienen un fenotipo más sutil. Si el comportamiento de la cepa  $\Delta pbs2[pYES+pbs2p^{-K}]$  nuevamente fuera distinto esto sugeriría la funcionalidad como proteína de andamiaje de  $pbs2p^{-K}$ .



La diferencia observada en el ensayo de diluciones seriadas en bajas concentraciones de sal (*Figura 7*) entre el crecimiento de la cepa  $\Delta pbs2[pYES+pbs2p^{-K}]$  y las mutantes  $\Delta hog1$  y  $\Delta pbs2$ , sugiere que la construcción  $pbs2p^{-K}$  conserva su función como proteína de andamiaje, lo que le permitiría secuestrar a Hog1p y debido a que es incapaz de activarlo, no se monta una respuesta para contender con el estrés osmótico y el crecimiento es menor. Además este comportamiento de  $pbs2p^{-K}$  sugiere la importancia de su actividad de cinasa.

#### **8.4 Las MAPKKK's de la vía HOG están involucradas en la respuesta a tunicamicina**

Después de analizar, mediante ensayos de diluciones seriadas, que proteínas de las ramas de SHO1 y SLN1 se requieren para responder al estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina, descubrimos que su comportamiento no es lineal para cada rama, como lo es en el caso de la respuesta a estrés osmótico (Brewster et al., 1993; Posas et al., 1996; Maeda et al., 1995), lo cual sugiere que el funcionamiento de estos componentes es distinto a cuando son requeridos para responder a estrés osmótico.



**Figura 10.** Esquema de los componentes de la vía HOG. Se encuentran marcados con una estrella amarilla los componentes que están implicados en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina. Además se indican con flechas punteadas las probables conexiones entre las proteínas implicadas en dicha respuesta.

Por el lado de la rama de SHO1, una mutante  $\Delta sho1$  es resistente a tunicamicina lo que indica que no es necesaria la rama completa para responder a esta droga, y probablemente el estímulo no sucede a nivel de la membrana plasmática. Aunque Sho1p no es propiamente el sensor de estrés osmótico, es la única proteína descrita capaz de transmitir el estímulo sentido por Hkr2p y Msb2p. Las mutantes  $\Delta ste20$  y  $\Delta ste50$  mostraron un fenotipo de sensibilidad (Figura 10). A pesar de que se ha descrito previamente que ambas proteínas funcionan en conjunto con Ste11 para montar la respuesta a estrés osmótico de la rama de

Sho1 (Raitt et al., 2000; Posas and Saito, 1997), en el caso de la respuesta a estrés de retículo endoplásmico parecen actuar de forma independiente, al menos de Ste11p. Puede observarse que existe una ligera diferencia entre el fenotipo de las cepas  $\Delta ste20$  y  $\Delta ste50$  (Figura 9) lo que podría indicar que la relación entre estas proteínas podría no ser necesariamente directa, o que funcionan de forma distinta a como lo hacen en la rama de SHO1. Finalmente, cabe destacar que hay una diferencia con el fenotipo mostrado por la mutante  $\Delta pbs2$ , siendo esta ligeramente más sensible que las cepas  $\Delta ste20 \Delta ste50$ . Lo cual indica que su relación podría no ser la única que es requerida para responder a la presencia de tunicamicina en el medio, como sucede en la respuesta a estrés osmótico, o incluso que en el caso de la respuesta a estrés por acumulación de proteínas desplegadas funcionan de forma independiente. Esto último podría comprobarse mediante ensayos de diluciones seriadas realizados en mutantes dobles donde podría observarse si su fenotipo es aditivo o si sucede el mismo fenómeno observado en las mutantes sencillas.

En el caso de la rama de SLN1, en presencia de tunicamicina, las mutantes  $\Delta ssk1$  y  $\Delta ssk2/22$  mostraron un fenotipo similar al que tienen en estrés osmótico (Tatebayashi et al., 2003). Es decir, fueron sensibles respecto a una cepa silvestre y su sensibilidad tuvo una intensidad similar, sugiriendo que funcionan de forma lineal. Además, datos obtenidos en el laboratorio indican que Sln1p si es requerida para responder a tunicamicina, aunque Sho1p no es necesaria. Esto sugiere que el fosforrelevo es necesario para responder a la tunicamicina aunque no se requiera la vía canónica de respuesta a sal.

Las mutantes sencillas  $\Delta ssk2$  y  $\Delta ssk22$ , que se han descrito en la literatura como redundantes (Posas and Saito, 1998; Posas et al., 1996) tuvieron un comportamiento diferencial. La mutante  $\Delta ssk2$  mostró un fenotipo de sensibilidad mientras que la cepa  $\Delta ssk22$  es resistente. Este comportamiento implica que Ssk2p y Ssk22p no son redundantes para la respuesta a tunicamicina. No es el primer caso en el que se observa que dos proteínas consideradas funcionalmente redundantes para cierta función no los son en alguna otra. Tal es el ejemplo de Fus3p y Kss1p, inicialmente consideradas redundantes, aunque posteriormente se

describieron sus funciones distintas en la respuesta a feromonas (Yang et al., 2009; Cullen et al., 2000).

El que Ste20p, Ste50p, Ssk2p y los componentes del fosforrelevo sean necesarios para responder a tunicamicina sugiere que la actividad de estas proteínas se requiere para responder de forma distinta a como actúan en la respuesta a estrés osmótico. Probablemente mediante la formación de un complejo de respuesta específico para tunicamicina, distinto a los que se forman en ambas ramas de la vía HOG.

### **8.5 La vía clásica de MAP cinasas de la vía HOG no es requerida para responder a tunicamicina**

Después de observar que al inducir estrés de retículo endoplásmico mediante 2-desoxi-*d*-glucosa las cepas  $\Delta pbs2$  y  $\Delta hog1$  no exhibieron fenotipo alguno (*Figura 3*), y sabiendo que la tunicamicina tiene otros efectos sobre la célula (Brandish et al., 1996; Takatsuki et al., 1972), decidimos realizar ensayos con otros agentes. Además incluimos la cepa  $\Delta pbs2$  complementada con la construcción  $pbs2p^K$ , por lo que los ensayos fueron llevados a cabo en presencia de galactosa.

Al repetir el experimento en medio YPGAL adicionado con diversas concentraciones de 2-desoxi-*d*-glucosa, no fue posible observar crecimiento incluso en la cepa silvestre, posiblemente debido al cambio metabólico que induce la galactosa. Después de realizar diversas pruebas se decidió utilizar otro agente inductor de UPR, el ditioneitol (DTT), un poderoso agente reductor.

El DTT solo fue capaz de inhibir el crecimiento de la cepa  $\Delta hac1 \Delta ire1$  (*Figura 9*), esto indica que probablemente los efectos ejercidos por la tunicamicina sobre nuestras cepas son exclusivos de esta droga. A pesar de esta particularidad no es posible descartar que la respuesta iniciada por la célula, y por lo tanto el fenómeno observado, se deba a que la célula responde al estrés por acumulación de proteínas desplegadas.

El principal efecto de la tunicamicina es la inhibición de la N-glicosilación de proteínas, que produce el estrés de retículo endoplásmico, a diferencia de otros agentes, los efectos de la tunicamicina pueden verse reflejados en cambios en el metabolismo de la célula para contender con el estrés producido por la droga, o la alteración en la glicosilación puede requerir la regulación de las proteínas involucradas en este proceso. Ambos casos podrían relacionarse al requerimiento de la actividad de cinasa de Hog1p, ya que se sabe que las MAP cinasas regulan la actividad de diversas proteínas mediante fosforilación, además de promover la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo celular o la glicosilación de proteínas (Escoté et al., 2004; Teige et al., 2001).

Es probable que otros agentes inductores de estrés de retículo endoplásmico solo sean capaces de inducir una respuesta clásica de UPR y su efecto no requiera de la respuesta de la vía de Hog1p o el fosforrelevo, debido a esto las cepas  $\Delta hog1$  y  $\Delta pbs2$  no presentan ningún fenotipo. Esto es apoyado por resultados obtenidos en el laboratorio que sugieren que en respuesta a tunicamicina Hog1p y Pbs2p actúan de forma aislada respecto a Ssk1p, Sln1p, Ssk2p, Ste20p y Ste50p, lo que implica que no se forman los mismos complejos que responden a estrés osmótico, además de que la UPR clásica no es suficiente para responder al estrés de retículo inducido por tunicamicina.

## 9. Conclusiones

- La actividad de cinasa de Pbs2p es dispensable para responder a tunicamicina, sin embargo una mutante carente de Pbs2p es sensible. Esto sugiere que la actividad de andamiaje de Pbs2p es importante para generar resistencia a tunicamicina.
- La inducción de UPR en respuesta a tunicamicina es independiente de las MAP cinasas de la vía de respuesta a estrés osmótico.
- A pesar de que las mutantes  $\Delta hog1$  y  $\Delta pbs2$  cuentan con una UPR normal, esto no es suficiente para responder al estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.
- La participación de Ste20p, Ste50p, Ssk2 y Ssk1 en la respuesta al estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina es distinta a como sucede en la respuesta a estrés osmótico.
- Las cepas  $\Delta hog1$ ,  $\Delta pbs2$ ,  $\Delta ssk2$ ,  $\Delta ssk1$ ,  $\Delta ste50$  y  $\Delta ste20$  son sensibles a tunicamicina pero no a otros agentes que inducen estrés de retículo endoplásmico.

## 10. Perspectivas

- Se debe analizar que regiones del dominio de andamiaje de Pbs2p están involucradas en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina.
- Determinar que proteínas interactúan con el dominio de Pbs2p que se requiere para responder a tunicamicina.
- Realizar en sayos de crecimiento de cepas mutantes nulas de los componentes de la vía de la integridad de la pared celular en presencia de tunicamicina.

## 11. Bibliografía

1. Alepuz, P. M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G. and Posas, F. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *The EMBO Journal* 22, 2433–2442. Available at: <http://dx.doi.org/10.1093/emboj/cdg243>.
2. Amberg, D. C., Burke, D. and Strathern, J. N. (2005). *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual* Available at: <http://books.google.com/books?hl=es&lr=&id=47zspjkKkCwC&pgis=1>.
3. Bicknell, A. a, Tourtellotte, J. and Niwa, M. (2010). Late phase of endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 17545–17555. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382742>.
4. Brandish, P. E., Kimura, K. I., Inukai, M., Southgate, R., Lonsdale, J. T. and Bugg, T. D. (1996). Modes of action of tunicamycin, liposidomycin B, and mureidomycin A: inhibition of phospho-N-acetylmuramyl-pentapeptide translocase from *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 40, 1640–1644. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=163387&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
5. Brewster, J. L., de Valoir, T., Dwyer, N. D., Winter, E. and Gustin, M. C. (1993). An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science (New York, N.Y.)* 259, 1760–1763. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8500168>.
6. Chen, R. E. and Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1773, 1311–1340. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2031910&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
7. Cullen, P. J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B. J., Jigami, Y. and Sprague, G. F. (2000). Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* 155, 1005–1018. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1461155&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
8. Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J. and Posas, F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature Cell Biology* 6, 997–1002. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15448699>.
9. Gardner, B. M. and Walter, P. (2011). Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. *Science (New York, N.Y.)* 333, 1891–1894. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3202989&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
10. Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M. and Davenport, K. (1998). MAP Kinase Pathways in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62, 1264–1300.



11. Ito, T., Takatsuki, A., Kawamura, K., Sato, K. and Tamura, G. (1980). Isolation and Structures of Components of Tunicamycin. *Agricultural and Biological Chemistry* *44*, 695–698.
12. Kuo, S.-C. and Lampen, J. O. (1974). Tunicamycin — An inhibitor of yeast glycoprotein synthesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *58*, 287–295. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0006291X74909255>.
13. Maeda, T., Takekawa, M. and Saito, H. (1995). Activation of yeast Pbs2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science (New York, N.Y.)* *269*, 554–558.
14. Mapes, J. and Ota, I. M. (2004). Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *The EMBO Journal* *23*, 302–311. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/sj.emboj.7600036>.
15. Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics (Cold Spring Harbor Laboratory)* Available at: <http://books.google.com/books?id=PtVpAAAAMAAJ&pgis=1>.
16. Mori, K., Kawahara, T., Yoshida, H., Yanagi, H. and Yura, T. (1996). Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells : Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms* *1*, 803–817. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9077435>.
17. Murakami, Y., Tatebayashi, K. and Saito, H. (2008). Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Molecular and Cellular Biology* *28*, 2481–2494. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2268422&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
18. Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M., Quinn, J., Stansfield, I. and Brown, A. J. P. (2009). Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology* *9*, 44. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2666651&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
19. Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A. and Kohno, K. (2000). Dissociation of Kar2p/BiP from an ER sensory molecule, Ire1p, triggers the unfolded protein response in yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* *279*, 445–450. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11118306>.
20. Patil, C. and Walter, P. (2001). Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus: the unfolded protein response in yeast and mammals. *Current Opinion in Cell Biology* *13*, 349–355. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11343907>.
21. Posas, F. and Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *The EMBO Journal* *17*, 1385–1394. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9482735>.
22. Posas, F. and Saito, H. (1997). Osmotic Activation of the HOG MAPK Pathway via Ste11p MAPKKK: Scaffold Role of Pbs2p MAPKK. *Science* *276*, 1702–1705. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.276.5319.1702>.

23. Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. A., Thai, T. C. and Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* 86, 865–875.
24. Raitt, D. C., Posas, F. and Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *The EMBO Journal* 19, 4623–4631. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=302074&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
25. Reiser, V., Salah, S. M. and Ammerer, G. (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nature Cell Biology* 2, 620–627. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10980703>.
26. Rep, M. (2000). The Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Osmotic Shock. Hot1p AND Msn2p/Msn4p ARE REQUIRED FOR THE INDUCTION OF SUBSETS OF HIGH OSMOLARITY GLYCEROL PATHWAY-DEPENDENT GENES. *Journal of Biological Chemistry* 275, 8290–8300. Available at: <http://www.jbc.org/cgi/content/abstract/275/12/8290>.
27. Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J. M., Hohmann, S., Ammerer, G. and Ruis, H. (1999). Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Mol. Cell. Biol.* 19, 5474–5485. Available at: <http://mcb.asm.org/cgi/content/abstract/19/8/5474>.
28. Ron, D. and Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular Cell Biology* 8, 519–529. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17565364>.
29. Shamu, C. E., Cox, J. S. and Walter, P. (1994). The unfolded-protein-response pathway in yeast. *Trends in Cell Biology* 4, 56–60. Available at: [http://www.sciencedirect.com/science?\\_ob=ArticleURL&\\_udi=B6TCX-47G9PKV-1T&\\_user=945819&\\_coverDate=02/28/1994&\\_rdoc=1&\\_fmt=high&\\_orig=gateway&\\_origin=gateway&\\_sort=d&\\_docanchor=&view=c&\\_rerunOrigin=scholar.google&\\_acct=C000048981&\\_version=1&\\_urlVersion=0&\\_userid=945819&md5=b7426b49f317a526c975f142b5644bca&searchtype=a](http://www.sciencedirect.com/science?_ob=ArticleURL&_udi=B6TCX-47G9PKV-1T&_user=945819&_coverDate=02/28/1994&_rdoc=1&_fmt=high&_orig=gateway&_origin=gateway&_sort=d&_docanchor=&view=c&_rerunOrigin=scholar.google&_acct=C000048981&_version=1&_urlVersion=0&_userid=945819&md5=b7426b49f317a526c975f142b5644bca&searchtype=a).
30. Shang, J., Körner, C., Freeze, H. and Lehrman, M. a (2002). Extension of lipid-linked oligosaccharides is a high-priority aspect of the unfolded protein response: endoplasmic reticulum stress in Type I congenital disorder of glycosylation fibroblasts. *Glycobiology* 12, 307–317. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12070073>.
31. Takatsuki, A., Shimizu, K. I. and Tamura, G. (1972). Effect of tunicamycin on microorganisms: morphological changes and degradation of RNA and DNA induced by tunicamycin. *The Journal of Antibiotics* 25, 75–85. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4624615>.
32. Tatebayashi, K., Takekawa, M. and Saito, H. (2003). A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *The EMBO Journal* 22, 3624–3634.
33. Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.-Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M. and Saito, H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative

- osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO Journal* 26, 3521–3533. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17627274>.
34. Teige, M., Scheikl, E., Reiser, V., Ruis, H. and Ammerer, G. (2001). Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98, 5625–5630. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=33263&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
35. Torres-Quiroz, F., García-Marqués, S., Coria, R., Randez-Gil, F. and Prieto, J. A. (2010). The activity of the yeast HOG1 MAP kinase is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 20088–20096. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2888421&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
36. Westfall, P. J., Patterson, J. C., Chen, R. E. and Thorner, J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 12212–12217. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2518827&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
37. Yamamoto, K., Tatebayashi, K., Tanaka, K. and Saito, H. (2010). Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Molecular Cell* 40, 87–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20932477>.
38. Yang, H.-Y., Tatebayashi, K., Yamamoto, K. and Saito, H. (2009). Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *The EMBO Journal* 28, 1380–1391. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2688530&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
39. Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S. and Ota, I. (2002). Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryotic Cell* 1, 1032–1040. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=138758&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.