



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

Papel de la proteína del fosforrelevo KLYpd1p en la
respuesta a estrés de retículo endoplásmico en la levadura
Kluyveromyces lactis

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A:

MARCELA SOFÍA ARAGÓN GÓMEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. LAURA KAWASAKI WATANABE



MÉXICO, D.F.

2014



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.

1. Datos del alumno

Aragón

Gómez

Marcela Sofía

044 66 81 63 03 16

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

409078415

2. Datos del tutor

Dra.

Laura

Kawasaki

Watanabe

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Claudia

Segal

Kischinevsky

4. Datos del sinodal 2

M. en C.

Alfonso José

Vilchis

Peluyera

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Sigfrido

Sierra

Galván

6. Datos del sinodal 4

Dra.

María Teresa

Lara

Ortiz

7. Datos del trabajo escrito

Papel de la proteína del fosforrelevo KLYpdip en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico en la levadura *Kluyveromyces lactis*

56p

2014

Reconocimientos

Se reconoce especialmente a la Dra. Laura Kawasaki por la tutoría de este trabajo de tesis así como por toda la asesoría técnica dentro del laboratorio.

Se reconoce a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular: Dra. Laura Ongay, Biol. Ma. Guadalupe Códiz y Minerva Mora, por su asistencia en la secuenciación de DNA.

Así como el apoyo técnico de Gerardo Coello y Sergio Rojas de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular.

Se reconoce la asesoría, colaboración y apoyo del Dr. Roberto Coria, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos reportados en esta tesis y fue parte activa de todo el proceso.

A la Sra. Marisela Bolaños Martínez por su gran apoyo en el mantenimiento del laboratorio y proporcionar el material necesario para los experimentos.

Se reconoce a la M. en C. Miriam Rodríguez por facilitar las cepas y oligonucleótidos que se utilizaron en la parte experimental de este trabajo.

A los sinodales: Dra. Claudia Segal, M. en C. Alfonso Vilchis, Dr. Sigfrido Sierra y Dra. Teresa Larios por la asesoría y revisión del trabajo escrito.

Esta tesis de licenciatura se hizo bajo la dirección de la Dra. Laura Kawasaki Watanabe en el laboratorio 302 oriente, del departamento de Genética Molecular en el Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de CONACyT proyecto No. 166734 y DGAPA-PAPIIT No. IN206512/24. Además, conté con una beca del mismo proyecto de DGAPA-PAPIIT durante una parte del desarrollo de la presente tesis.

Agradecimientos

A mi familia, por enseñarme el significado de amor, unidad y confianza y hacer de mí la persona que soy ahora; A mi mamá, por ser una mujer tenaz y única que siempre me motiva y da ánimos, que se ha encargado de demostrarme su cariño incondicionalmente y me ha enseñado que siempre se puede ser una mejor persona; A mi papá, por ser un hombre íntegro que me ha brindado su apoyo ilimitadamente y ha sido mi guía así como un modelo de humildad y perseverancia constante; A mi hermana, mi ejemplo de disciplina, por creer en mí y hacerme siempre su cómplice (Blrd).

A la Dra. Laurita Kawasaki, por tenerme tanta paciencia, orientarme con la mejor disposición, enseñarme sus conocimientos y habilidades, empujarme a seguirlo intentando y guiarme siempre con una sonrisa.

Al Dr. Roberto Coria, por permitirme ser parte de su grupo de investigación, asistirme cada vez que pedía ayuda y liderar invariablemente con calidez al laboratorio.

A mi alma máter, la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por haberme permitido formarme como bióloga y hacerme sentir en todo momento orgullosamente UNAM.

A mis compañeros de laboratorio, por rescatarme siempre en mis dudas, ser condescendientes con mis descuidos (que eran muchos), y hacer del 302-O algo más que un lugar de trabajo, creando un ambiente muy alegre y agradable con personalidad propia; Chío, Citlali, Gris, Eunice, Mariana, Nancy, Bere y Miriam, en especial a Uriel, Diego y Abraham por brindarme, además, su amistad. Así como a la Dra. Laura, Gerardo y Lupita por ser parte activa del laboratorio y acompañarnos en los mejores momentos.

A mis amigos de la Facultad de Ciencias; David T., Nadia, Mauricio, Pacheco, Pamela, David F. y Chu por haber compartido conmigo la complejidad de la biología, hacerme reír y sobre todo hacer de la facultad un lugar extraordinario.

A la comunidad Copilco 300 (y agregados culturales); Alberto, Flor, Juan, Danae, Emma, Tita, Irlanda, Arisaf, Oso y Francés, por darme ánimos, vivir momentos inolvidables y haber sido mi segunda familia, en el mejor lugar durante mi estancia en la universidad.

A Melissa y Perla, por alentarme cuando lo necesitaba y ayudarme a no perder la cordura.

A Gustavo y su familia; Ofelia, Agustín, Rox y tía Chata, por haberme acogido y tratado como un miembro más de su familia.

*A mi papá,
el verdadero horcón del medio.*

Índice

1. Abreviaturas.....	1
2. Resumen.....	2
3. Introducción.....	3
3.1. Transducción de señales.....	3
3.2. Sistemas de fosforrelevo.....	4
3.3. Fosforrelevo de Sln1.....	6
3.4. La vía de HOG en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
3.5. Estrés de retículo endoplásmico.....	10
3.6. <i>Kluyveromyces lactis</i>	13
4. Antecedentes Particulares.....	15
5. Objetivos.....	17
5.1. Objetivo general.....	17
5.2. Objetivo particular.....	17
6. Hipótesis.....	17
7. Materiales y métodos.....	18
7.1. Cepas y plásmidos	18
7.2. Medios de cultivo.....	18
7.2.1. Para <i>E. coli</i>	18
7.2.2. Para <i>K. lactis</i>	19
7.3. Extracción de DNA genómico de levadura.....	20
7.4. Electroforesis.....	21
7.5. Purificación de DNA de geles de agarosa.....	21
7.6. Reacciones de amplificación en cadena	21
7.6.1. Amplificación de <i>KlYPD1</i> silvestre (<i>KlYPD1</i> ^{wt}).....	22
7.6.2. Amplificación de <i>KlYPD1</i> con la mutación puntual de histidina por alanina (<i>KlYPD1</i> ^{H67A}).....	22

7.7. Obtención de construcciones.....	24
7.7.1. Ligación en pGEM-T Easy Vector.....	24
7.7.2. Digestión de Vectores.....	24
7.7.3. Ligación en YEpKDGal.....	25
7.8. Transformación de <i>E. coli</i>	26
7.9. Minipreparación de plásmidos.....	26
7.10. Restricción enzimática.....	27
7.11. Transformación de <i>K. lactis</i>	27
7.11.1. Tratamiento con 5-FOA.....	27
7.11.2. Procedimiento para transformar a <i>K. lactis</i>	28
7.12. Ensayos de goteo por diluciones seriadas	29
8. Resultados	30
8.1. La cepa $\Delta Klypd1$ es sensible a tunicamicina.....	30
8.2. La mutante $\Delta Klypd1+YPD1^{wt}$ recupera parcialmente el fenotipo.....	31
8.2.1. Obtención de la transformante $\Delta Klypd1+KlYPD1^{wt}$	31
8.2.2. Ensayos de goteo por dilución seriada.....	34
8.3. La mutante puntual no fosforilable $\Delta Klypd1+ YPD1^{H67A}$ responde ligeramente mejor a tunicamicina.....	35
8.3.1. Obtención de la transformante $\Delta Klypd1+KlYPD1^{H67A}$	35
8.3.2. Ensayos de dilución seriada.....	38
9. Discusión.....	40
10. Conclusiones.....	47
11. Referencias.....	48
12. Apéndice.....	56

1. Abreviaturas

Δ KLYpd1: Cepa de que *K. lactis* en la cual el gen de *YPD1* se encuentra interrumpido.

2-DOG: 2-desoxi-D-glucosa

β -ME: β -Mercaptoetanol

DTT: Ditioneitol

CA: Dominio catalítico y de unión a ATP

DNA: Deoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico

ERAD: Endoplasmic reticulum associated protein degradation, degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico

HAC1: gen que codifica para el factor de transcripción Hac1p

Hac1p: Factor de transcripción Hac1 (proteína)

HK: Histidín cinasa

HOG: High osmolarity glycerol, alta osmolaridad del glicerol

HPt: Dominio de fosfotransferencia que contiene histidina

HSF: Heat shock factor, factor de transcripción que participa en la respuesta a choque térmico

Kb: Kilobase

KCl: Cloruro de Potasio

KLYpd1p: Proteína Ypd1 de *K. lactis*

MAPK: Mitogen activated protein kinases, proteína cinasa activada por mitógenos

MAPKK: MAP cinasa cinasa

MAPKKK: MAP cinasa cinasa cinasa

mRNA: Messenger ribonucleid acid, ácido ribonucleico mensajero

PCR: Polymerase chain reaction, Reacción en cadena de la polimerasa

pb: Pares de bases

RE: Retículo endoplásmico

REC: Dominio receptor

RR: Dominio regulador de respuesta

Tm: Tunicamicina

UPR: Unfolded protein response, respuesta a proteínas mal plegadas

UPRE: Unfolded protein response element, elemento de respuesta a proteínas mal plegadas

YPD1: Gen de la proteína Ypd1p.

2. Resumen

Para responder a un estímulo, tanto ambiental como dentro de la célula, los procariontes se valen de una vía de señalización celular denominada sistema de dos componentes, que consiste en la fosforilación de una proteína histidín cinasa (HK) y la posterior transferencia del fosfato a una proteína reguladora de respuesta (RR) encargada de ejercer la acción celular. Éste mecanismo ha evolucionado en múltiples transferencias de fosfatos, mediadas, generalmente, por proteínas con un dominio de fosfotransferencia que contiene histidinas (HPt) encargadas de transferir el grupo fosfato desde la proteína HK hasta la proteína RR. La levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuenta con un sistema de fosforrelevo compuesto por una proteína HK Sln1p, una proteína HPt Ypd1p y dos proteínas RR; Ssk1p y Skn7p. El fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1 constituye una rama de la vía de HOG que responde a estrés hiperosmótico, mientras que el fosforrelevo Sln1-Ypd1-Skn7 participa principalmente en estrés de pared celular y estrés oxidativo. Las proteínas de membrana y de secreción se maduran en el retículo endoplásmico (RE); cuando por diversas causas la carga de proteínas que entra al RE excede su capacidad de plegamiento, se acumulan en el lumen proteínas mal plegadas y esto ocasiona estrés de retículo endoplásmico, que puede ser potencialmente letal para la célula si no se efectúa una respuesta eficiente.

Se ha observado en *S. cerevisiae* que componentes de la vía de HOG participan en la respuesta a estrés de RE inducido por tunicamicina, principalmente la rama de Sln1. Ya que la levadura *Kluyveromyces lactis* cuenta con un sistema de fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1 ortólogo al de *S. cerevisiae*, se decidió investigar el papel de estas proteínas durante el estrés de RE. Se hicieron ensayos de goteo por dilución seriada de mutantes nulas de las proteínas de la rama de Sln1 en presencia de distintos inductores de estrés de RE; 2-desoxi-D-glucosa, ditiotreitól, β -mercaptoetanol y tunicamicina. Se obtuvo como resultado que una mutante Δ KLYpd1 es muy sensible a estrés de RE inducido por tunicamicina. Con base en esto, se decidió expresar, en un fondo Δ KLYpd1, a la proteína Ypd1p silvestre, teniendo como resultado un reestablecimiento parcial del fenotipo de sensibilidad. Puesto que desconocíamos si el estado de fosforilación de la proteína HPt Ypd1p jugaba un papel importante en la respuesta, se resolvió hacer una construcción donde la proteína Ypd1p no pudiera fosforilarse. Los resultados obtenidos demostraron que la fosforilación de la proteína es dispensable para la respuesta a estrés de RE y que incluso responde ligeramente mejor que la proteína silvestre.

3. Introducción

3.1. Transducción de señales

Las células individuales así como los organismos pluricelulares, necesitan percibir su entorno constantemente y sobre todo tener la capacidad de reaccionar ante cualquier cambio en él. Para poder responder a los diversos estímulos que se encuentran a su alrededor, las células han desarrollado mecanismos que permiten percibir el estímulo extracelular para convertirlo en una respuesta fisiológica eficiente en el interior de la célula; este proceso de conversión se denomina transducción de señales.

La recepción del estímulo comienza cuando una señal originada en el exterior de la célula es reconocida por una proteína específica en la superficie celular, denominada receptor. La proteína receptora convierte la señal química en una alteración en su conformación, generando como consecuencia una nueva señal intracelular. El mensaje entonces, pasa de una proteína señalizadora intracelular a otra y cada una de ellas activa o genera a la siguiente proteína señalizadora de la cadena hasta llegar a la proteína efectora que, como su nombre lo indica, se encarga de ejecutar la respuesta celular (fig. 1); ésta puede tener lugar en el citoplasma o bien implicar acción en el núcleo, como modificaciones en los patrones de expresión génica (Alberts *et al.*, 2006).

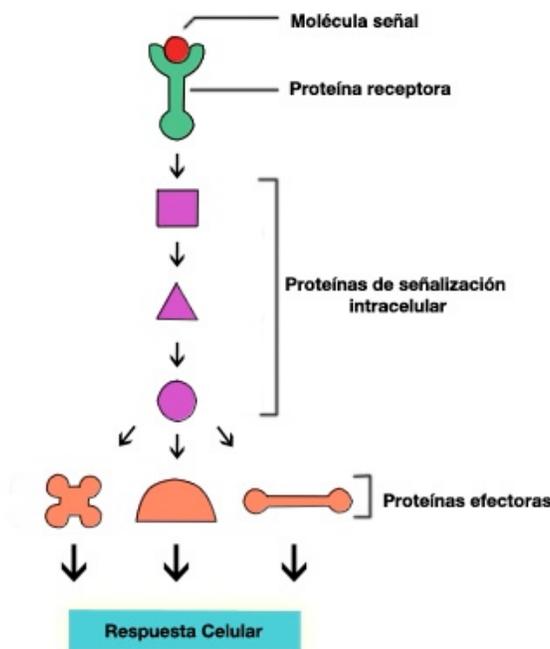


Figura 1. Transducción de la señal. La proteína receptora, usualmente anclada a la membrana, reconoce de manera específica al estímulo extracelular (molécula señal) y al formarse un complejo entre estos dos, se ocasiona un cambio conformacional en el receptor. Este cambio desencadena la cascada de señalización en el interior de la célula, activando en cadena a diferentes proteínas de señalización hasta llegar a la activación de proteínas efectoras, generalmente factores de transcripción o enzimas con actividad metabólica, que finalmente son las encargadas de llevar a cabo la respuesta celular que se requiera en ese momento, desde movimiento celular hasta alteración en los patrones de expresión génica (adaptado de: Alberts, 2002)

3.2. Sistemas de fosforrelevo

En bacterias la señalización celular se lleva a cabo, principalmente, por un sistema denominado de dos componentes. Se le llama así porque está compuesto canónicamente de dos proteínas; una proteína histidín cinasa (HK) como sensor transmembranal y una proteína reguladora de respuesta (RR), frecuentemente un factor de transcripción. La señalización ocurre cuando la proteína HK transfiere un grupo fosfato desde un residuo de histidina a un residuo de ácido aspártico en la proteína RR y ésta efectúa directamente la respuesta, regulando la expresión génica (fig. 2a) (West y Stock, 2001).

Sin embargo existen versiones más complejas del sistema de dos componentes, como el fosforrelevo, en donde existen múltiples fosfotransferencias y se involucran más de dos partes, como proteínas que contienen un dominio de fosfotransferencia que contiene histidina (HPT) que fungen como intermediarias entre las dos proteínas canónicas (fig. 2) (Hoch, 2000; Azuma *et al.*, 2007). El fosforrelevo se encuentra presente en vías complejas de transducción de señales en bacterias para controlar esporulación y ciclo celular, entre otros procesos, y es parte de la señalización eucariota en plantas, amebas, levaduras y hongos superiores. Debido a que no se encuentran proteínas de fosforrelevo en mamíferos, éstas constituyen un blanco de drogas antibióticas muy interesante (Fassler y West, 2013).

En las HK prototípicas, la parte citoplásmica de la cinasa está compuesta de dos dominios; un dominio carboxilo terminal catalítico y de unión a ATP (CA) y un dominio de dimerización y transferencia de histidina (DHp). El dominio DHp contiene el residuo conservado de histidina que se fosforilará y el dominio CA contiene la actividad catalítica para transferir el fosfato del ATP al residuo de histidina. Sin embargo, existen HK que incorporan un dominio receptor (REC), presente en los reguladores de respuesta, para formar cinasas híbridas, éste tipo de cinasas principalmente son las que se encuentran en un sistema de fosforrelevo (Gao y Stock, 2009; Casino *et al.*, 2010).

Las HK cuentan también con un dominio sensor variable en su amino terminal, que les permite percibir una gran cantidad de estímulos; luz, presión de turgencia, estrés de pared, potencial redox, gradientes electroquímicos y pequeñas moléculas. Estos dominios pueden percibir el estímulo directamente o de manera indirecta a través de la interacción con otras proteínas. La característica distintiva de las HK es la formación de fosforamidatos en lugar de la formación de fosfoésteres como los de las proteínas cinasas de serina, treonina y tirosina (Gao y Stock, 2009).

En procariontes, si se presenta, el dominio de fosfotransferencia que contiene histidina (HPT) forma parte de las cinasas híbridas, mientras que en eucariontes se encuentra como parte de una proteína independiente (Stock *et al.*, 2000). Los dominios HPT están conformados estructuralmente por un aglomerado de cuatro hélices similar a la estructura del dominio DHp de las histidín cinasas. No poseen actividad de fosfatasa ni de cinasa dependiente de ATP, por lo que sólo son intermediarios en la transferencia del grupo fosforil de un dominio REC a otro dominio REC dentro de la cascada de señalización (West y Stock, 2001).

Los dominios HPT contienen un motivo consenso corto con un residuo de histidina fosforilable que no varía y se encuentra posicionado a la mitad de la hélice que se encuentra con la cara

expuesta al solvente, aparte de este motivo, la secuencia de los HPT no se encuentra tan conservada como en otros dominios (Perraud *et al.*, 1999; Gao y Stock, 2009).

La mayoría de las proteínas reguladoras de respuesta (RR) se conforman de dos dominios; un dominio receptor (REC) amino terminal conservado y un dominio efector carboxilo terminal variable. El dominio REC tiene actividad enzimática que cataliza la transferencia del grupo fosforil del residuo de histidina de una proteína HPT, o una HK, hacia un residuo de aspartato conservado dentro de sí mismo, así como también posee actividad de fosfatasa para autodefósforilarse (Gao y Stock, 2009; Stock *et al.*, 2000)

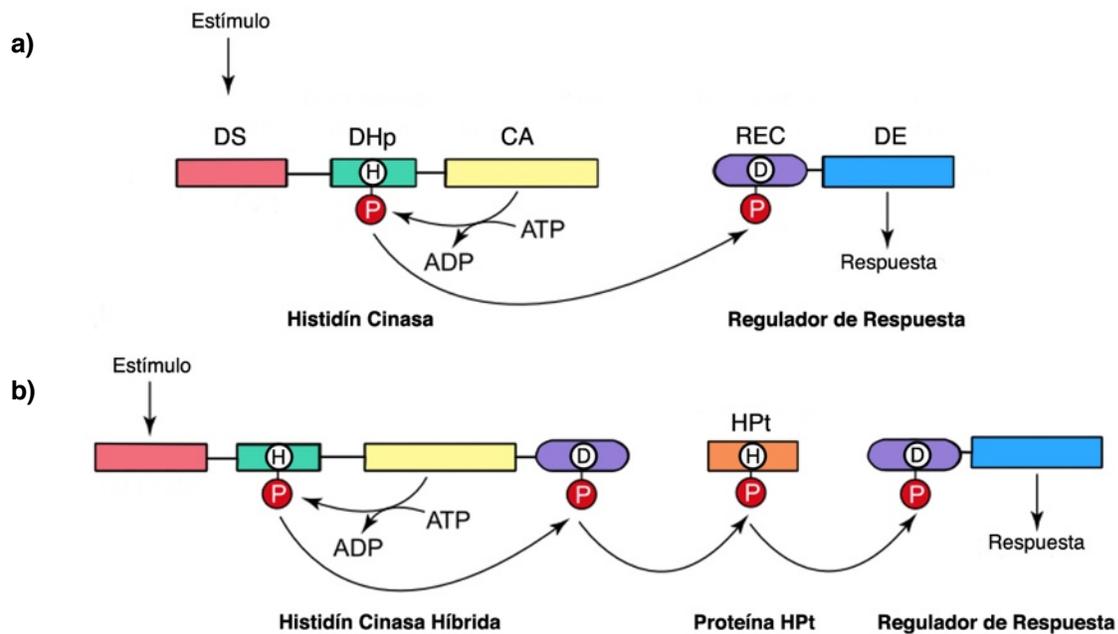


Figura 2. Sistemas de dos componentes. a) Sistema de dos componentes canónico donde la transferencia de fosfatos va de una proteína histidín cinasa a una proteína reguladora de respuesta. b) Sistema de fosforrelevo que presenta una proteína histidín cinasa híbrida y una proteína con dominio HPT independiente, se observan las fosfotransferencias múltiples de fosfatos His->Asp->His->Asp. DS: Dominio sensor, DHp: Dominio de dimerización y transferencia de histidina, CA: Dominio catalítico y de unión a ATP, REC: Dominio regulador de respuesta, DE: Dominio efector, HPT: dominio de fosfotransferencia que contiene histidina (adaptado de: West y Stock, 2001).

La autodefósforilación del dominio REC en las proteínas RR limita la vida media del estado activado y permite regular al dominio efector a manera de encendido/apagado dependiente de fosforilación. Dependiendo del rol del RR en la célula, el estado de activación puede tener una vida media que va desde segundos hasta semanas. En la mayoría de los sistemas de dos componentes las proteínas RR son la parte final de la vía, gracias a que el dominio efector en ese caso tiene sitios de unión a DNA y funciona directamente como factor de transcripción, sin embargo en eucariontes regularmente las proteínas RR son intermediarias, ya que en la parte carboxilo terminal tienen dominios efectores que funcionan como enzimas, permitiendo interactuar con proteínas como las MAPK y segundos mensajeros como las ciclasas (Stock *et al.*, 2000; West y Stock, 2001; Gao y Stock, 2009).

Un sistema de fosforrelevo canónico funciona entonces de la siguiente manera; al detectar un estímulo, la histidín cinasa híbrida tiene un cambio conformacional provocando que catalice su autofosforilación, donde un grupo fosforil pasa del ATP a un residuo conservado de histidina, después el dominio REC presente en la HK cataliza la donación del grupo fosforil hasta un residuo de aspartato dentro del mismo dominio. El grupo fosforil del aspartato se pasa entonces a un residuo de histidina presente en la proteína HPT y ésta acarrea el fosfato hasta la proteína reguladora de respuesta correspondiente, que catalizará la transferencia del grupo fosforil del residuo de histidina hasta su propio residuo de aspartato presente en el dominio REC. Cuando el dominio REC de la proteína RR se fosforila, ocurre un cambio conformacional, se activa el dominio efector y se lleva a cabo la respuesta celular (fig. 2b). Eventualmente la transmisión de la señal se termina por la pérdida del grupo fosforil como fosfato inorgánico, ya sea espontáneamente o con la ayuda de fosfatasas (West y Stock, 2001; Saito, 2001; Gao y Stock, 2009; Schaller *et al.*, 2011).

3.3. Fosforrelevo de Sln1

Saccharomyces cerevisiae Meyen ex E.C. Hansen (1883) presenta solamente un sistema de fosforrelevo, ya que en su genoma únicamente se encuentran codificados los genes para una histidín cinasa (HK) Sln1p, una proteína de fosfotransferencia que contiene histidina (HPT) Ypd1p y dos proteínas reguladoras de respuesta (RR); Ssk1p y Skn7p (Saito, 2001). Skn7p es una proteína nuclear que regula genes de respuesta a estrés oxidativo y de mantenimiento de la pared celular (Saito y Posas, 2012), mientras que Ssk1p es una proteína citoplásmica que participa en la respuesta a estrés osmótico (Maeda *et al.*, 1994).

Sln1p es una proteína osmosensora compuesta por 1220 residuos de aminoácidos, que tiene dos dominios transmembranales unidos por un asa extracelular en su extremo amino terminal, y ya que es una histidín cinasa híbrida, posee un dominio catalítico y un dominio receptor en su extremo carboxilo terminal (Ota y Varshavsky, 1993; Kawasaki *et al.*, 2009). En condiciones iso-osmóticas, Sln1p mantiene activo su dominio catalítico provocando una autofosforilación en el residuo de histidina-576 y transfiere el grupo fosforil al residuo de aspartato-1144 del dominio REC. Esta fosfotransferencia más que intramolecularmente puede ocurrir dentro de un dímero de Sln1p (Posas *et al.*, 1996).

El grupo fosforil del residuo de aspartato-1144 es entonces transferido a la histidina-64 de Ypd1p, una proteína conformada por 167 residuos de aminoácidos con un dominio HPT y una estructura terciaria compuesta por un aglomerado de cuatro hélices, en donde la histidina fosfoaceptora se encuentra en medio de la tercera hélice y totalmente expuesta al solvente (Xu *et al.*, 2003). Finalmente Ypd1p transfiere, de manera irreversible, el grupo fosforil del residuo de histidina-64 al residuo de aspartato-554 de Ssk1p, causando su inactivación (fig. 3). Se forma un complejo muy estable entre Ypd1p y Ssk1p fosforilado que permite que la vida media de éste regulador de respuesta aumente significativamente, de 13 minutos si se encuentra solo, a 40 horas cuando está en complejo. La proteína reguladora de respuesta Ssk1p está formada por 712 residuos de aminoácidos y contiene un dominio REC en el extremo carboxilo terminal. A diferencia de otras proteínas RR, Ssk1 se encuentra activa cuando está defosforilada, por lo que en condiciones

osmóticas normales, se encuentra constitutivamente fosforilada (fig. 3) (Janiak-Spens *et al.*, 1999; Janiak-Spens *et al.*, 2000).

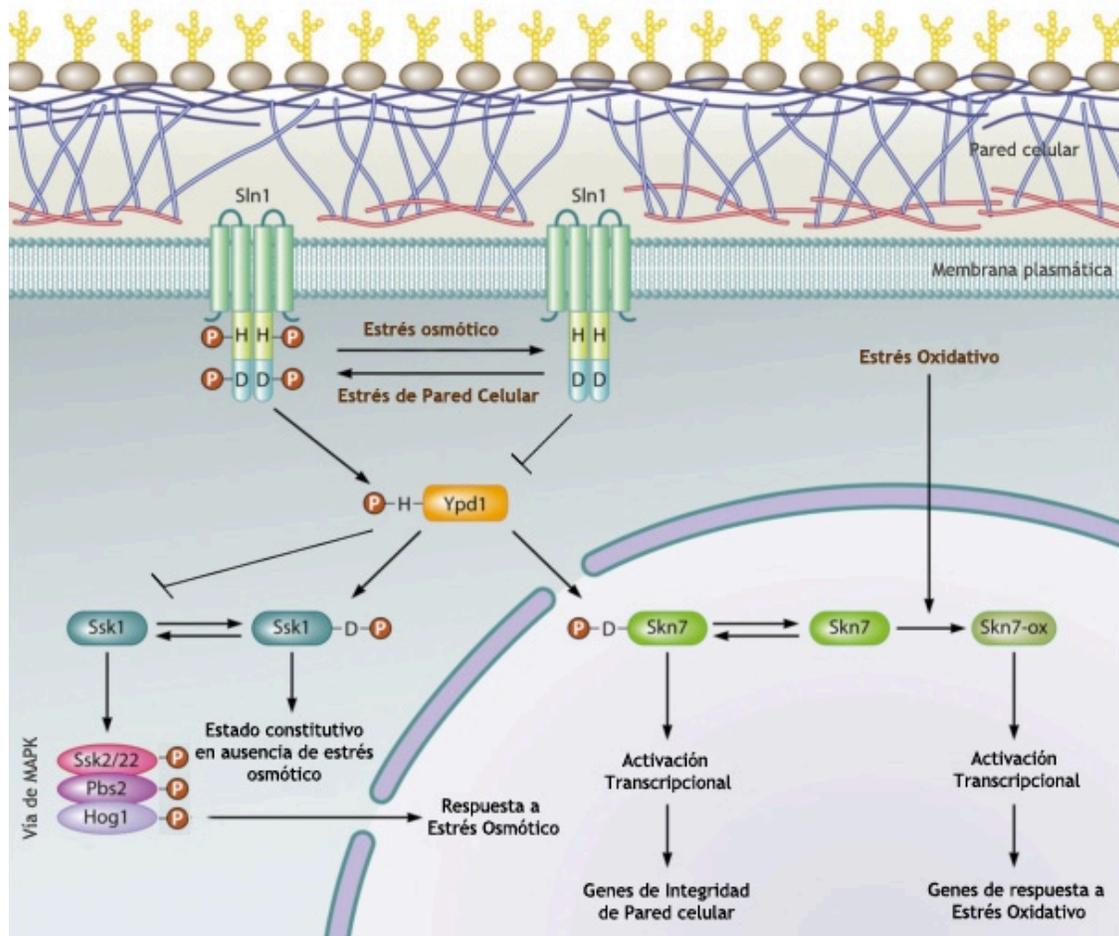


Figura 3. Fosforrelevo de Sln1. En condiciones osmóticas normales, el fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1 se encuentra encendido; la HK Sln1 se autofosforila en la histidina (H) del dominio catalítico y ese fosfato se transfiere al aspartato (D) de su dominio REC, después se transfiere a la histidina de la HPt Ypd1 y finalmente al aspartato del RR Ssk1. En estrés hiperosmótico se interrumpe el fosforrelevo, acumulándose Ssk1 no fosforilado que activa al módulo de MAPK de la vía de HOG y se logra la respuesta a estrés osmótico. Cuando hay estrés de pared celular el fosforrelevo Sln1-Ypd1-Skn7 se enciende, Ypd1~P se trasloca al núcleo y se transfiere el fosfato al RR Skn7, que funciona como factor de transcripción activando genes de integridad de pared celular. Skn7 también se activa de manera independiente del fosforrelevo cuando hay estrés oxidativo (adaptado de: Fassler y West, 2011).

En condiciones de estrés hiperosmótico, las células se encogen y disminuye la presión de turgencia, provocando que la distancia entre la membrana y la pared celular aumente. Este cambio de turgor es sentido por los dominios transmembranales y extracelulares de Sln1p y ocasiona que se inactive su actividad de cinasa (Reiser *et al.*, 2003). Al perder la actividad de cinasa, la transferencia de fosfatos se ve interrumpida y esto provoca la acumulación de Ssk1p no fosforilado. En esta forma, Ssk1p interacciona con las MAPKKK redundantes Ssk2p y Ssk22p ocasionando que se autofosforilen y se active la vía de MAPK río abajo hasta llegar a la fosforilación de Hog1p para poder contender con el estrés osmótico (fig. 3) (Posas y Saito, 1998)

La otra proteína reguladora de respuesta Skn7p tiene 623 residuos de aminoácidos y es un factor transcripcional que se encuentra muy conservado en hongos y que responde a estrés. En el extremo amino terminal cuenta con un dominio de unión a DNA similar al del factor de transcripción de choque térmico (HSF por sus siglas en inglés) y en el extremo carboxilo terminal tiene un dominio REC (Brown *et al.*, 1994; Fassler y West, 2011).

Skn7p se activa de manera dependiente de Sln1p en condiciones hipo-osmóticas y principalmente en estrés de pared celular, mediante la traslocación de Ypd1p al núcleo, en donde fosforila al RR en el residuo de aspartato-427 (fig. 3). La vía Sln1-Skn7 es responsable de la activación de genes involucrados en la integridad de pared celular como *OCH1* que codifica para la α -1,6 manosiltransferasa y *KRE9* que codifica una glicoproteína involucrada en el ensamblaje del β -glucano de la pared celular, entre otros. También se activa en respuesta a estrés oxidativo, sin embargo, en este caso, no se requiere de la fosforilación en el aspartato para que Skn7p se active y por lo tanto esta respuesta es independiente del fosforrelevo. (Li *et al.*, 1998; Fassler y West, 2011)

3.4. La vía de HOG en *Saccharomyces cerevisiae*

Cuando las células se encuentran expuestas a un aumento en los solutos disueltos en el ambiente se produce estrés hiperosmótico, desencadenándose alteraciones en la pared celular, pérdida de turgencia e incluso la muerte. Para lidiar con el aumento externo de osmolaridad, las levaduras inician un programa adaptativo muy complejo que incluye arresto temporal del ciclo celular, disminución en la capacidad de traducción, ajustes en los patrones de transcripción, estimulación de la glicólisis para aumentar la síntesis de glicerol así como su retención en el interior de la célula, con el fin de incrementar la concentración intracelular de solutos y así recuperar el balance osmótico. Estas respuestas adaptativas se encuentran reguladas, en su mayoría, por la vía de HOG (alta osmolaridad de glicerol, por sus siglas en inglés High Osmolarity Glycerol) (Hohmann *et al.*, 2007; Kawasaki *et al.*, 2009; Saito y Posas, 2012).

La vía de HOG está compuesta por dos ramas funcionalmente redundantes pero mecanísticamente distintas. Ambas responden a cambios en la osmolaridad, sin embargo se encuentran activas en diferentes concentraciones osmóticas; la rama de Sln1 se encuentra encendida en condiciones iso-osmóticas y apagada en estrés hiperosmótico mientras que la rama de Sho1, está encendida en condiciones hiperosmóticas y apagada en condiciones iso-osmóticas. La vía de HOG también está compuesta, río abajo de éstas ramas, por un módulo de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que convergen al nivel de la MAPKK en común Pbs2p (fig. 4) (Kawasaki *et al.*, 2009).

La rama de Sln1 consiste en un sistema de fosforrelevo, explicado anteriormente, compuesto por las proteínas Sln1p-Ypd1p-Ssk1p que, en condiciones hiperosmóticas, se interrumpe y de esa manera activa a las MAPKKK redundantes Ssk2p y Ssk22p para que fosforilen a la MAPKK Pbs2p y ésta finalmente active a la MAPK Hog1p (fig. 4), ortóloga a la MAPK P38p de mamíferos que también responde a estrés. (O'Rourke *et al.*, 2002).

Por otro lado, la rama de Sho1 involucra la formación rápida y transitoria de un complejo proteico en la membrana celular con componentes que también se encuentran en las vías de respuesta a feromonas y de crecimiento filamentoso. En condiciones de estrés hiperosmótico, el osmosensor putativo Msb2p y el co-osmosensor Sho1p, ambas proteínas transmembranales, interactúan y llevan a la activación y reclutamiento en la membrana de la cinasa PAK Ste20p a través de la asociación con la proteína G pequeña Cdc42p. Ste20p entonces, fosforila y activa a la MAPKKK Ste11p unida constitutivamente a la proteína adaptadora Ste50p que interactúa con la proteína de anclaje a membrana Opy2p. Una vez activada Ste11p fosforila a la proteína de andamiaje MAPKK Pbs2p que a su vez fosforila y activa a la MAPK Hog1p (fig. 4) (Westfall *et al.*, 2004; Saito y Posas, 2012).

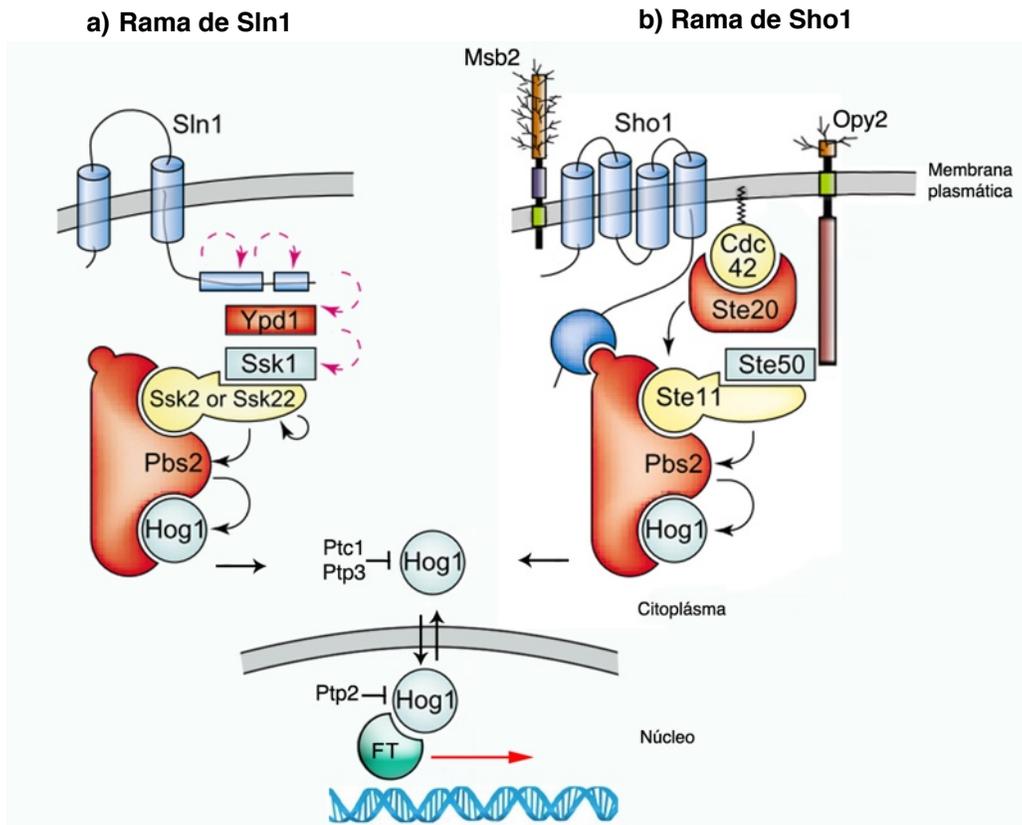


Figura 4. Vía de HOG en estrés hiperosmótico. Las dos ramas de la vía de HOG convergen en la MAPKK Pbs2p y activan a Hog1p. Las flechas negras indican fosforilación mientras que las rosas señalan los eventos de fosfotransferencia constante de las proteínas del fosforrelevo en condiciones iso-osmóticas. La rama de Sln1 (A) apaga su fosforrelevo en condiciones hiperosmóticas, activando a Ssk2 mientras que la rama de Sho1 (B) forma un complejo transitorio en la membrana que lleva a la fosforilación de Hog1p, que una vez activado puede traslocarse al núcleo para unirse a factores de transcripción (FT) y modificar patrones de expresión génica para contender con el estrés (ver más información en el texto) (adaptado de: O'Rourke *et al.*, 2002; Saito y Posas, 2012).

Para que la MAPK Hog1p se active es necesaria su fosforilación por la MAPKK Pbs2p en los residuos de treonina 174 y tirosina 176. Una vez fosforilada, se exporta al núcleo en donde modifica la expresión de aproximadamente 600 genes, de los cuales sólo una parte responde específicamente a estrés osmótico, mientras que el resto son genes de respuesta general a estrés,

sin embargo otra porción de Hog1p permanece en el citoplasma activando a otras proteínas blanco (Hohmann *et al.*, 2007). Ésta respuesta transcripcional es controlada por los factores de transcripción Hot1p, Sko1p, Smp1p, Msn1p, Msn2p y Msn4p. Cuando el balance osmótico se restablece o después de que la célula se adapta a la hiperosmolaridad, Hog1p se defosforila y la actividad disminuye hasta su nivel basal, exportándose de nuevo al citoplasma. Debido a que la activación excesiva de las MAPK puede ser letal para la célula, la defosforilación de Hog1p es regulada por la fosfatasa de serina/treonina Ptc1p y las fosfatasas de tirosina Ptp2p y Ptp3p que actúan en el núcleo y citoplasma respectivamente (fig. 4) (Miermont *et al.*, 2011; Saito y Posas, 2012).

3.5. Estrés de retículo endoplásmico

En las células eucariotas el retículo endoplásmico (RE) es el organelo membranoso más grande, consiste en una red de forma tubular-reticular que se encuentra contigua a la membrana exterior de la envoltura nuclear. En levaduras, el RE está organizado en dos partes; el RE de envoltura perinuclear y el RE cortical, que se encuentra cercano a la membrana plasmática de la célula. Esencialmente el RE sirve como un regulador para los procesos de maduración, control de calidad y tráfico de proteínas, también tiene dentro de sus funciones regular la homeostasis del Ca^{2+} y la biosíntesis de lípidos, por lo que tiene una influencia en la composición y abundancia relativa de los lípidos en toda la célula (Babour *et al.*, 2010).

Al sintetizarse, la mayoría de las proteínas transmembranales y de secreción son marcadas y trasladadas al lumen del RE en donde ocurre el plegamiento y adquieren modificaciones, como formación de puentes disulfuro, glicosilación y ensamblaje de subunidades hasta llegar a una conformación funcional. Solamente las proteínas que se encuentren plegadas correctamente podrán salir del RE hacia sus respectivos sitios blanco (Oikawa *et al.*, 2007; Babour *et al.*, 2010).

Cuando las células se encuentran expuestas a distintos tipos de estrés como; privación de glucosa, toxinas ambientales, condiciones reductoras, perturbación en la concentración de Ca^{2+} , inhibición de la glicosilación de proteínas y agentes infecciosos, se provoca una interferencia en la capacidad de plegamiento del RE (Okamura *et al.*, 2000). Cuando la carga de proteínas que entra al RE excede su capacidad de plegamiento, se acumulan proteínas mal plegadas y se ocasiona estrés de retículo endoplásmico (Patil y Walter, 2001).

Se han descrito dos procesos para contender con este estrés; la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en inglés) y la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés) (Chen *et al.*, 2005). La ERAD es responsable de la retrotranslocación de proteínas mal plegadas desde el RE al citoplasma para una degradación dependiente del proteosoma, mientras que la UPR es una vía de señalización intracelular que mantiene la homeostasis del RE de dos maneras: uno, proporcionando nueva maquinaria para el plegamiento dentro del RE y dos, aumentando el área superficial así como el espacio luminal del RE (fig. 5) (Schuck *et al.*, 2009).

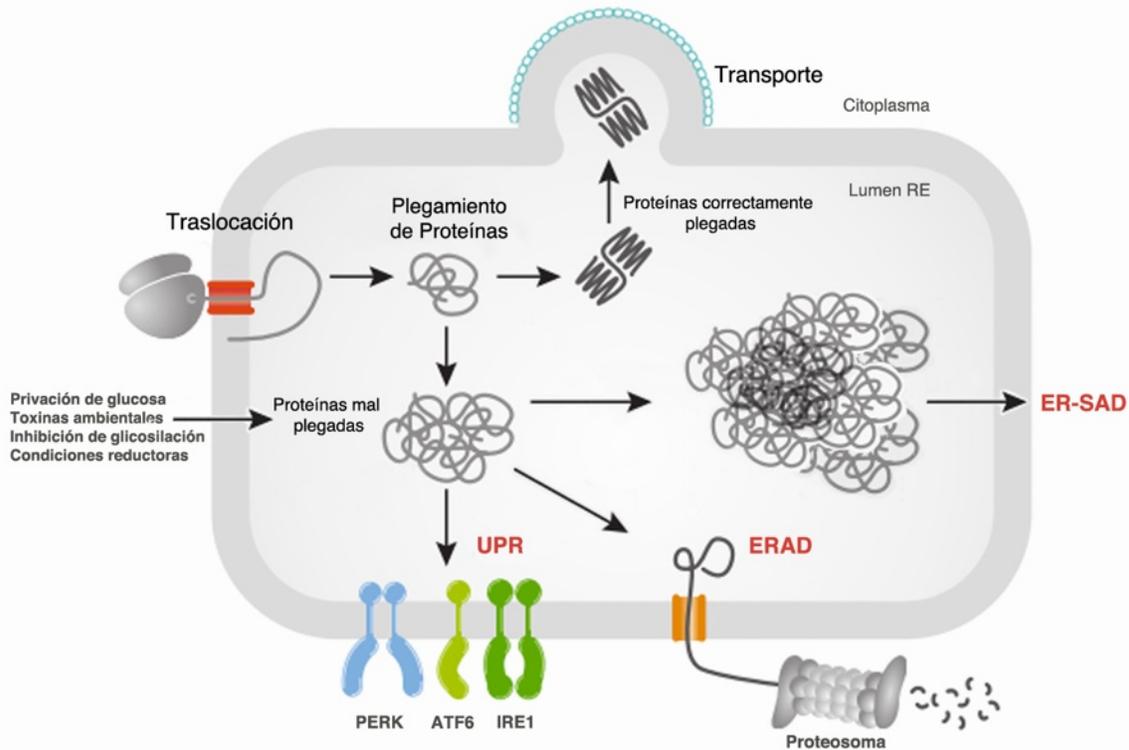


Figura 5. Estrés de Retículo Endoplásmico. En presencia de distintos tipos de estrés, se interfiere el proceso de plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico y se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen lo que provoca estrés de RE. Para contener con este estrés, se inicia la vía de señalización de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) dirigida, en mamíferos, por tres proteínas sensoras; PERK, ATF6 e IRE1. Como mecanismo alternativo, se lleva a cabo la degradación de proteínas asociada al retículo endoplásmico (ERAD) de manera dependiente del proteosoma. En caso de que los dos mecanismos no sean suficientes y se sigan acumulando proteínas mal plegadas, la célula desencadena el proceso de muerte celular asociada a estrés de retículo (ER-SAD) (adaptado de: Cyr y Hebert, 2009).

La UPR funciona en tres etapas; en la primera, que corresponde a una adaptación transitoria, hay una disminución en la síntesis de proteínas y de traslocación al RE, permitiendo una reducción en la carga de proteínas que entra al lumen de dicho organelo. Después, en la segunda etapa y como respuesta a largo plazo, se activa la transcripción de genes blanco de la UPR que codifican en su mayoría para proteínas que son parte de la maquinaria de plegamiento del RE, como chaperonas, provocando que aumente la capacidad de contener con las proteínas mal plegadas. Por último, en la tercera etapa, si la homeostasis no se restablece se desencadena un proceso denominado muerte celular asociada a estrés de retículo endoplásmico (ER-SAD por sus siglas en inglés) (fig. 5 y 6) (Ron y Walter, 2007; Austriaco, 2012).

Todas las células eucariotas contienen con el estrés de RE activando la UPR a través de proteínas sensoras residentes del retículo endoplásmico. En mamíferos existen tres sensores regulados por diferentes mecanismos: IRE1, PERK y ATF6 (fig. 5). La rama de IRE1 es la que se encuentra más conservada y es la única presente en levaduras (Mori, 2009). Ire1p es una proteína transmembranal residente del RE que consiste en un dominio sensor amino terminal que se encuentra en el lumen del RE y un dominio carboxilo terminal citoplasmático que presenta actividad tanto de cinasa como de endorribonucleasa (Walter y Ron, 2011).

Kar2p (BiP en mamíferos) es una proteína que pertenece a la familia de chaperonas HSP70, en condiciones normales se encuentra unida al dominio luminal de Ire1p, que se encuentra inactivo y en forma de monómero. Al presentarse estrés de RE, Kar2p se disocia de Ire1p y se asocia a las proteínas mal plegadas, permitiendo que éstas funcionen como ligandos activos que se unen a Ire1p, ocasionando su oligomerización en la membrana y su activación mediante autofosforilación en *trans* (Gardner y Walter, 2011; Kawaguchi y Ng, 2011). La fosforilación induce un cambio conformacional permitiendo la activación del dominio de ribonucleasa en el citoplasma cuyo único sustrato es el mRNA del factor de transcripción Hac1p (Xbp1p en mamíferos) (Oikawa *et al.*, 2007). En metazoarios se tiene como hipótesis que Ire1p, una vez fosforilado, disminuye directamente la afluencia de proteínas al RE de manera independiente de Xbp1p, escindiendo a mRNAs, que al tener los extremos libres, son sustratos para la degradación por el exosoma en el citoplasma, evitando entonces su traducción y traslocación al RE (fig. 6) (Hollien y Weissman, 2006; Walter y Ron, 2011).

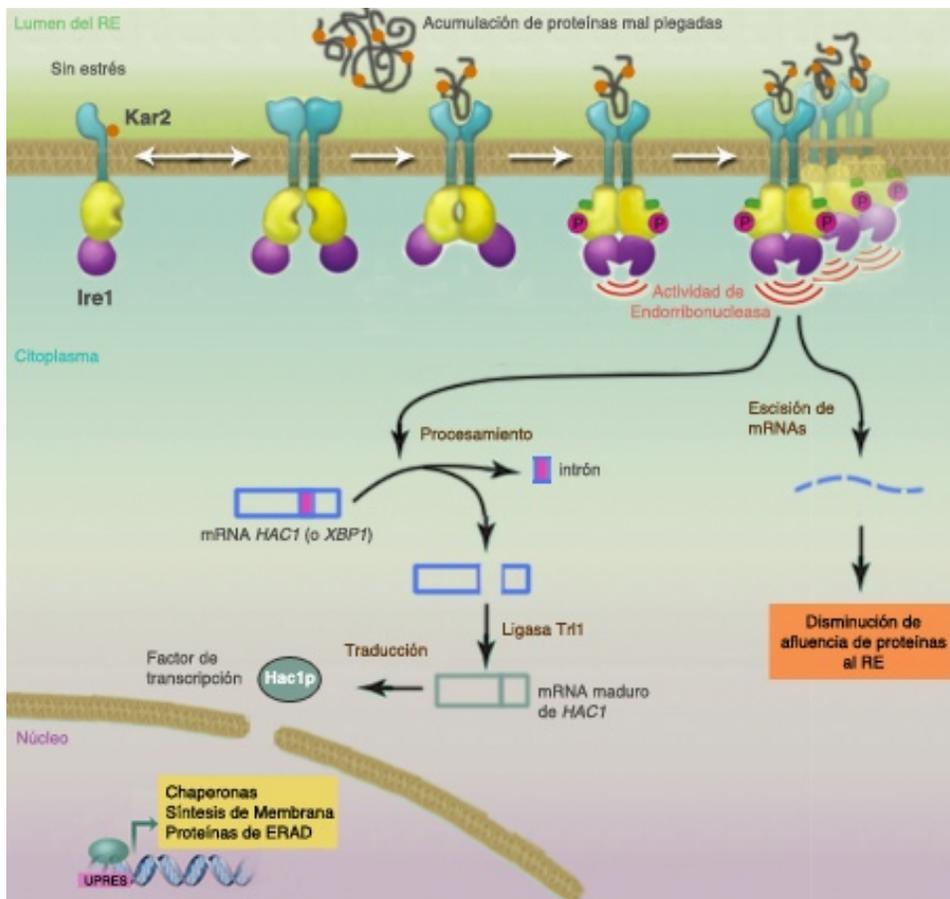


Figura 6. Respuesta a proteínas mal plegadas (UPR). Cuando se acumulan proteínas mal plegadas en el lumen del RE, Kar2p se disocia de Ire1p y se une a las proteínas mal plegadas que sirven como ligando directo a Ire1p, el sensor se autofosforila en *trans*, se enciende su actividad de endorribonucleasa y se oligomeriza. Una vez activado Ire1p, elimina al intrón del mRNA *HAC1* los fragmentos restantes se unen con la ligasa Trf1p para formar al mRNA *HAC1* maduro, capaz de traducirse en el factor de transcripción Hac1p, que se une a secuencias UPRs en el núcleo para iniciar la transcripción de genes de UPR. Ire1p disminuye la afluencia de proteínas que entran al RE escindiendo mRNAs y así evitando su traducción (Adaptado de: Walter y Ron, 2011).

El mRNA *HAC1* contiene un intrón que separa el dominio de unión a DNA y el dominio de activación, en ausencia de estrés el intrón no se procesa y por lo tanto se impide su traducción. Cuando Ire1p se activa como ribonucleasa, corta el intrón de *HAC1* y los dos fragmentos 5' y 3' son unidos por la ligasa de RNA Trl1p, dando como resultado el mRNA maduro de *HAC1* que se traduce en un factor de transcripción con un zíper básico de leucina y se trasloca al núcleo donde se une a secuencias específicas de DNA, llamadas elementos de respuesta a proteínas mal plegadas (UPRE por sus siglas en inglés) activando a los genes blanco de la UPR para contender con el estrés de RE (fig. 6). En levaduras, más del 5% del genoma se encuentra regulado por la UPR, éstos genes no sólo incluyen chaperonas del RE sino también a proteínas que tienen un papel en la vía secretora del RE específicamente proteínas involucradas en la traslocación, plegamiento y degradación de proteínas, glicosilación en el RE, metabolismo de lípidos/inositol, tráfico entre RE y Golgi, glicosilación en el aparato de Golgi, marcaje de proteínas hacia la vacuola y biogénesis de la pared celular (Ron y Walter, 2007; Mori, 2009).

3.6. *Kluyveromyces lactis*

Las levaduras son organismos eucariontes, unicelulares saprófitos pertenecientes a la clase Hemiascomycetes. Se utilizan como modelo de estudio debido a que son fáciles de manipular y cultivar en laboratorio, tienen un crecimiento rápido y un genoma relativamente pequeño, regularmente de entre 12 y 20 Mb (Bolotin-Fukuhara, 2006)

Kluyveromyces lactis (Dombrowski) van der Walt pertenece a la familia Saccharomycetaceae y se han aislado dos variedades; *K. lactis* var. *lactis* y *K. lactis* var. *drosophilarium*, la primera habita principalmente en productos derivados de la leche, es heterotálica y es capaz de asimilar lactosa como fuente de carbono, mientras que la segunda se encuentra presente en plantas e invertebrados, es homotálica y no fermenta o asimila lactosa. Las células de *K. lactis* son elipsoidales, miden de 6 a 8 μm y presentan 4 esporas en una asca evanescente, no son dehiscentes sino que la pared del asca se reabsorbe. Tiene un genoma de aproximadamente 10.6Mb organizado en seis cromosomas que van de 1 a 3Mb. La característica clave del género *Kluyveromyces* es la explosión o delicuescencia de las ascas, no presenta ascocarpos (Nel et al., 2009)

Como *Saccharomyces cerevisiae*, *K. lactis* tiene dos tipos sexuales: *MATa* y *MAT α* sin embargo, al contrario de *S. cerevisiae* que frecuentemente se encuentra como diploide, *K. lactis* es haploide en condiciones naturales. Es una levadura clasificada como “petite-negativa” debido a que no puede sobrevivir sin DNA mitocondrial (Chen, 2003; Zonneveld y Steensma, 2003).

Posee un metabolismo energético de tipo respirofermentativo, es decir, puede convertir el piruvato de manera oxidativa a través de la vía de los ácidos tricarbóxicos (respiración) o puede convertirlo de manera oxidoreductiva reduciéndolo a etanol (fermentación). Tanto *S. cerevisiae* como *K. lactis* son aerobios facultativos por las características antes mencionadas; sin embargo, en condiciones aeróbicas *S. cerevisiae* es una levadura aeróbica fermentativa y *K. lactis* es aeróbica respiratoria, posicionándola como una levadura Crabtree-negativa (González-Siso et al., 2000; Zonneveld y Steensma, 2003).

Kluyveromyces lactis tiene aplicaciones en la industria debido a su capacidad de expresar proteínas recombinantes y secretar proteínas de alto peso molecular. Es conocida por producir industrialmente a las proteínas heterólogas β -galactosidasa y quimosina, enzimas que funcionan para producir leche deslactosada y quesos respectivamente y se utiliza también para producir proteínas humanas recombinantes como la albúmina humana y la interleucina-1 (Bonekamp y Oosterom, 1994). En biología molecular se utiliza como organismo modelo, alternativo a *S. cerevisiae*, ya que su genoma se encuentra totalmente secuenciado y tiene la capacidad de introducir fragmentos de DNA a su genoma o bien expresarlos fuera de él mediante plásmidos estables caracterizados (Mishra y Baranwal, 2009).

4. Antecedentes Particulares

En un trabajo previo del grupo de trabajo del Dr. Coria, se demostró que en *Kluyveromyces lactis* están presentes las proteínas homólogas de Pbs2p y Hog1p de *S. cerevisiae* y que éstas efectivamente participan en la respuesta a estrés osmótico, debido a que las mutantes nulas ($\Delta K1Hog1$ y $\Delta K1Pbs2$) son sensibles a KCl y sorbitol. Al mismo tiempo, se comprobó que en condiciones de hiperosmolaridad no se detecta fosforilación de K1Hog1p en una cepa $\Delta K1Pbs2$ (Kawasaki *et al.*, 2008).

Datos obtenidos también dentro de nuestro grupo, demostraron que la interacción entre Ssk1p y Ssk2p es más fuerte cuando Ssk1p se encuentra defosforilada, probando que ésta es la forma activa de Ssk1p y que esta unión es funcional, es decir se activa la vía de HOG, sólo en condiciones de estrés hiperosmótico. También se confirmó que *K. lactis* es capaz de acumular glicerol en bajas cantidades en respuesta a estrés hiperosmótico (Trejo-Medécigo, 2011).

Mediante ensayos de fosfotransferencia *in vitro* se demostró que la proteína K1Ypd1p tiene la capacidad de recibir en la histidina de su dominio HPT un grupo fosfato proveniente del dominio REC de una histidín cinasa híbrida, así como de transferirlo al aspartato de otro dominio REC en la proteína reguladora de respuesta K1Ssk1p. Asimismo, mediante ensayos de fosforilación *in vivo* se confirmó que la fosforilación de K1Ypd1p es mayor en ausencia de estrés osmótico (Domínguez-Martín, 2012). Estos datos corroboraron que *K. lactis* cuenta con el sistema de fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1, y que la transferencia de fosfatos es igual que en *S. cerevisiae*.

Chen y colaboradores (2005) realizaron una búsqueda de genes en *S. cerevisiae* que conferían resistencia a agentes inductores de estrés de retículo endoplásmico, tales como tunicamicina, β -mercaptoetanol y ditiotreitól. Dentro de sus resultados destaca el hecho de que, además de los genes necesarios para la vía de UPR, también participan genes de la ruta de la integridad de la pared celular y los genes de la vía de HOG; *SSK1*, *SSK2*, *SSK22*, *PBS2* Y *HOG1*. Todos estos genes aumentan su transcripción durante el estrés de RE, pero *HOG1* y *PBS2* son inducidos de manera dependiente de *IRE1/HAC1*, implicándolos como genes blanco de la UPR.

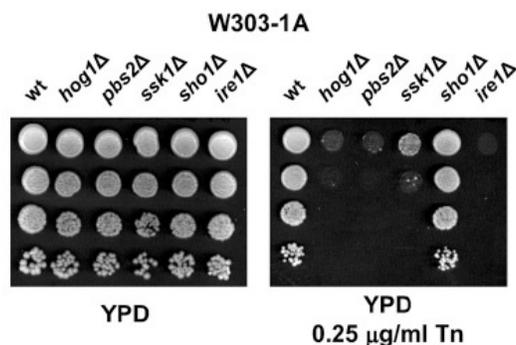


Figura 7. Vía de HOG en tunicamicina. El goteo muestra los fenotipos de mutantes nulas de las proteínas de la vía de HOG en medio YPD con tunicamicina de la cepa W303-1A de *S. cerevisiae*; en ausencia de la MAPKK Pbs2 (*pbs2Δ*) y de la MAPK Hog1p (*hog1Δ*) es muy sensible, se observa también que la rama de Sho1 no es necesaria (*sho1Δ*) mientras que la de Sln1 sí (*ssk1Δ*). La cepa *ire1Δ* se usó como control negativo (Torres-Quiroz *et al.*, 2010).

Considerando estos últimos datos, dentro de nuestro grupo de trabajo se hicieron experimentos que demostraron que las cepas $\Delta ScHog1$ y $\Delta ScPbs2$ son sensibles a estrés de RE inducido por tunicamicina y β -mercaptoetanol. Además se llegó a la conclusión que la rama de HOG que participa en éste estrés es la de Sln1, ya que una cepa $\Delta ScSsk1$ es sensible a tunicamicina mientras que una cepa $\Delta ScSho1$ tiene un crecimiento igual al de la cepa silvestre (fig. 7) (Torres-Quiroz *et al.*, 2010).

Dado que Hog1p se encuentra regulada por la MAPKK Pbs2p, se investigó su papel durante estrés de RE inducido por tunicamicina en *S. cerevisiae*. Se resolvió que para poder contender con el estrés es necesaria la presencia de la proteína, pero su actividad de cinasa es dispensable, de forma que se requiere de Pbs2p pero solamente como proteína de andamiaje cuando se acumulan proteínas mal plegadas (Cruz-Martínez, 2012).

En otra investigación, se utilizaron mutantes nulas de *IRE* y *HAC1* de *K. lactis*, ya que ambas proteínas son componentes principales en la UPR. Las mutantes se probaron en tunicamicina, 2-desoxi-D-glucosa y ditiotretol, y se encontró que ambas cepas son muy sensibles a los tres tipos de agentes inductores de estrés de RE. Además, se comprobó que el mRNA de *HAC1* efectivamente se procesa tras la inducción de estrés de RE con 2-desoxi-D-glucosa (fig. 8). También se identificó en el promotor del gen *KAR2* una secuencia UPRE necesaria para su expresión durante estrés de RE (Escamilla-Ayala, 2010). Estos experimentos demostraron que *K. lactis* puede responder a la acumulación de proteínas mal plegadas por la vía de UPR y utiliza los mismos componentes descritos para levaduras.

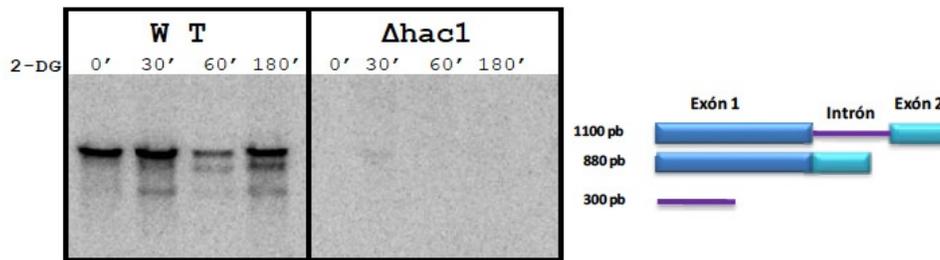


Figura 8. Procesamiento de HAC1 durante estrés de retículo endoplásmico en *K. lactis*. Northern blot del mRNA de HAC1 en donde se evidencia su procesamiento a partir de 30 minutos de incubación con 2-desoxi-D-glucosa (2-DG), se usó la cepa $\Delta hac1$ como control negativo. En el esquema de la derecha se señala a que corresponde cada banda; transcrito completo de HAC1 (1100 pb), HAC1 procesado (880 pb) y el intrón de HAC1 (300 pb) (Escamilla-Ayala, 2010).

Con estos antecedentes y por la evidencia que sugiere que en *S. cerevisiae* la vía de HOG participa en la respuesta a estrés de RE a través de la rama de Sln1, se decidió utilizar a *Kluyveromyces lactis* como modelo alternativo para investigar el papel de las proteínas del fosforrelevo en el estrés de retículo endoplásmico.

5. Objetivos

5.1. Objetivo general

- Determinar si el fosforrelevo de Sln1-Ssk1 de la vía de HOG participa en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico en la levadura *Kluyveromyces lactis*.

5.2. Objetivos particulares

- Conocer si se requiere, para la respuesta celular, que el fosforrelevo se encuentre encendido o apagado.
- Definir si participan todas las proteínas del fosforrelevo, así como aclarar si existen diferencias entre ellas.
- Determinar si la respuesta a estrés de retículo endoplásmico es igual para β -mercaptoetanol, ditiotreitól y tunicamicina.

6. Hipótesis

Con base en los resultados previos de *S. cerevisiae* y estrés de retículo endoplásmico, se propone que en *K. lactis*;

- Mutantes nulas del fosforrelevo de Sln1-Ssk1 serán sensibles a agentes inductores de estrés de retículo endoplásmico.
- Se requerirá que el fosforrelevo se encuentre apagado para efectuar la respuesta a estrés de retículo endoplásmico, al igual que lo hace en estrés osmótico.
- Participarán todas las proteínas del fosforrelevo; Sln1p, Ypd1p y Ssk1p.
- El fenotipo de las mutantes nulas no será igual para los 3 agentes inductores de estrés de retículo endoplásmico.

7. Materiales y métodos

7.1. Cepas y plásmidos

La cepa bacteriana que se utilizó para el mantenimiento y propagación de plásmidos fue *Escherichia coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80 *lacZ* Δ M15) *hsdR17* *recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *relA1*).

La cepa de levadura que se utilizó para todos los ensayos y transformación de plásmidos fue *Kluyveromyces lactis* MD 2/1 (*MAT α* , *argA*, *lysA*, *ura3*).

Los productos de PCR se clonaron en pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) y para la expresión de construcciones se utilizó el plásmido YE ϕ KDGal (Apéndice 1).

7.2. Medios de cultivo

7.2.1. Para *E. coli*

Medio Luria-Bertani (LB): 0.5% de extracto de levadura (Difco), 1% de triptona (Difco) y 1% de NaCl (JT Baker) en agua destilada. Para el medio sólido, se adiciona bacto-agar al 2% (Sigma¹). Esterilizar en una autoclave a 121°C con una presión de 15 libras durante 20 minutos².

+Ampicilina: Cuando así se requiera, se adiciona ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml a partir de un stock de 25 mg/ml, tanto para el medio líquido como para el sólido.

Medio LB-Amp IPTG X-Gal: En cajas de medio LB-ampicilina ya solidificadas, se agregan 10 μ L de isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, al 20%) y 40 μ L de 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal, al 2% disuelto en N,N-dimetilformamida). Se plaquea uniformemente en la superficie del medio y se deja a 30°C hasta que seque.

¹ Todos los reactivos que se utilizaron en la parte experimental fueron de la marca Sigma a menos que se indique lo contrario.

² La esterilización siempre se hizo bajo las mismas condiciones.

7.2.2. Para *K. lactis*

7.2.2.1. Medios de crecimiento

Medio YPD: 1% de extracto de levadura (Difco), 2% de peptona (Difco) y 2% de glucosa en agua destilada. Para el medio sólido, se adiciona bacto-agar al 2%. Esterilizar.

Medio YPGal: 1% de extracto de levadura (Difco), 2% de peptona (Difco) y 2% de galactosa en agua destilada. Para el medio sólido, se adiciona bacto-agar al 2%. Esterilizar.

Medio YPD-FOA: Se prepara YPD sólido como ya se describió, se esteriliza y se deja enfriar hasta que esté tibio, agregar 1g de ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA, Toronto Research Chemicals) por cada litro de medio, para obtener una concentración final de 0.1%. Asegurarse que el 5-FOA esté perfectamente disuelto y repartir el contenido en cajas de Petri estériles, esperar a que solidifique y almacenar las cajas a 4°C.

Mezcla -URA: 0.2% de arginina, adenina, histidina, metionina y triptófano, 0.3% de lisina y leucina en agua destilada, mezclar y esterilizar.

Medio Mínimo (SD): 0.67% de base nitrogenada sin aminoácidos (YNB, Difco) y 2% de glucosa. Para el medio sólido, se adiciona 2% de bacto-agar. Esterilizar.

Medio mínimo SD-URA: Preparar medio SD como ya se describió y agregar 70 µL de mezcla -URA por cada 1 ml de medio en agua destilada. Para el medio sólido, se adiciona 2% de bacto-agar y se ajusta el pH entre 6 y 7. Esterilizar.

Medio mínimo SRaf-URA: 0.67% de base nitrogenada sin aminoácidos (YNB, Difco), 2% de rafinosa y 7 ml de mezcla -URA por cada 100 ml de medio en agua destilada. Esterilizar.

+Ura: Cuando así se requiera, se adiciona al medio mínimo según sea el caso (SD, SD-URA o SRaf-URA) uracilo a una concentración final de 0.2%, a partir de una solución al 20%, tanto para el medio líquido como para el sólido.

7.2.2.2. Medios para inducir estrés

- Estrés osmótico

+Cloruro de Potasio (KCl): Preparar medio YPD sólido como ya se describió y agregar; para 1M, 7.456 g de KCl por cada 100 mL de medio. Mezclar y esterilizar.

- Estrés de retículo endoplásmico

+2-desoxi-D-glucosa (2-DG): del stock de 2-DG que se encuentra a 1M adicionar; para 10mM, 1 mL de 2-DG por cada 100 mL de medio.

+Ditiotreitol (DTT): del stock de DTT que se encuentra a 2M adicionar;
para 10mM, 500 μ L por cada 100 mL de medio

+ β -mercaptoetanol (β -ME): del stock de β -ME que se encuentra a 14.2M adicionar;
para 12.5mM, 88 μ L por cada 100 ml de medio
para 15mM, 105.6 μ L por cada 100 ml de medio

+Tunicamicina (Tn): del stock de Tn (marca Enzo) que se encuentra a 10 μ g/ μ L en DMSO, hacer una dilución 1:100 en el mismo disolvente y adicionar;
para 0.10 μ g/ml, 100 μ L por cada 100 ml de medio
para 0.15 μ g/ml, 150 μ L por cada 100 ml de medio
para 0.20 μ g/ml, 200 μ L por cada 100 ml de medio
para 0.25 μ g/ml, 250 μ L por cada 100 ml de medio
para 0.30 μ g/ml, 300 μ L por cada 100 ml de medio

Todos los agentes inductores de estrés de RE utilizados se encontraban estériles, se adicionaron al medio YPD o YPGal después de esterilizar y se dejaron enfriar hasta que estuvieron tibios. Se mezcla vigorosamente y se reparte el contenido en cajas de Petri hasta que solidifiquen.

7.3. Extracción de DNA genómico de levadura

1. Inocular la levadura en 10 ml de medio YPD líquido e incubar a 30°C y 250 rpm durante toda la noche.
2. Colectar las células centrifugando durante 2 minutos en una centrífuga clínica. Remover el sobrenadante, resuspender en el líquido residual y transferir a un tubo de polipropileno de 1.5 mL.
3. Agregar 200 μ L de buffer de lisis QTP (2% Triton X-100, 1% SDS, 100mM NaCl, 10mM Tris-HCl a pH 8.0 y 1mM Na₂EDTA), 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamil (25:24:1) y añadir perlas de vidrio (0.5 mm, BioSpec) hasta que queden por debajo del menisco.
4. Colocar el tubo de 1.5 mL en el vórtex de disrupción durante 5 minutos y agregar 200 μ L de agua destilada.
5. Microfugar durante 5 minutos, tomar la fase acuosa con una micropipeta y pasarla a un tubo de 1.5 mL limpio, después agregar 1 mL de etanol frío al 100% y mezclar por inversión.
6. Microfugar 2 minutos y desechar sobrenadante. Resuspender el pellet en 500 μ L de agua destilada y agregar 3 μ L de RNAsa (10mg/ml).
7. Incubar durante 5 minutos a 37°C y agregar 10 μ L de acetato de amonio 4M, 1 mL de etanol frío al 100% y mezclar por inversión.
8. Microfugar 2 minutos y desechar sobrenadante. Agregar 1 mL de etanol frío al 70% y repetir la primera parte de este paso. Dejar el tubo con la tapa abierta hasta que se seque.

9. Resuspender el pellet en 50 μ L de agua destilada y almacenar a -20°C . Para confirmar la calidad del DNA extraído, correr un gel de agarosa por electroforesis cargando 5 μ L.

7.4. Electroforesis

Para observar DNA, producto de diferentes procedimientos, se carga la muestra, previamente mezclada con Stop Mix, así como el marcador de peso molecular que se requiera en geles de agarosa al 1%³ teñidos con bromuro de etidio. Estos geles se corrieron a 96 volts durante el tiempo necesario dentro de una cámara de electroforesis. Al finalizar se observaron en un transiluminador, desde donde fueron fotografiados.

• Soluciones/Productos:

Amortiguador Tris/Borato/EDTA (TBE) 5x: 53g de Tris base, 27.5g de ácido bórico y 20 mL de EDTA 0.5M a pH 8 en 1000 mL de agua destilada

Gel de agarosa: 1% (ó 2%, según sea el caso) de agarosa (Bio-Pure) y 5 μ L de bromuro de etidio (10 μ g/ μ L) por cada 100mL de solución, en amortiguador TBE 0.5x. Se calienta la mezcla en un microondas hasta que se disuelva completamente, se deja enfriar y se vacía en un molde hasta que polimerice.

Marcadores de peso molecular: Se utilizó el marcador lambda/*EcoRI-HindIII* para fragmentos de DNA >500 pb, el cual se hace en el laboratorio con la digestión de DNA total del fago lambda con las enzimas indicadas. Para fragmentos <500 pb se utilizó el marcador 100 bp DNA Ladder de New England Biolabs.

7.5. Purificación de DNA de geles de agarosa

Para obtener el DNA, producto de diferentes procedimientos, de un gel de agarosa, se utilizó siempre el paquete comercial GENE CLEAN[®] Kit de la marca Qbiogene siguiendo las instrucciones indicadas por el fabricante. Una vez purificado el producto deseado, se corroboró siempre corriendo otro gel con 2 μ L de la muestra.

7.6. Reacciones de amplificación en cadena

Para las reacciones de amplificación en cadena de DNA (PCR por sus siglas en inglés) se utilizó un termociclador convencional de tapa caliente (BioRad). Los oligonucleótidos que se usaron para amplificar el gen *KLYPD1*, silvestre o mutado, fueron diseñados en nuestro laboratorio por Miriam Rodríguez y se muestran en la Tabla 1.

³ En el caso de fragmentos de DNA menores a 200 pdb, los geles de agarosa fueron al 2%.

7.6.1. Amplificación de *KLYPD1* silvestre (*KLYPD1^{wt}*)

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en este trabajo. El sitio de restricción de la enzima HindIII está subrayado y en negritas se señala el sitio de cambio de aminoácido de histidina (silvestre) por alanina (mutación puntual).

Nombre del oligo	Secuencia	T _m
1. HindII ^{Ypd1} F	5'-ACGAAA <u>AAGCTT</u> AATATA-3'	42°C
2. HindII ^{Ypd1} R	5'-AGAGAAA <u>AAGCTT</u> GCCTG-3'	50°C
3. His-Ala ^{Ypd1}	5'-GACAGCTGGGAG <u>CC</u> TTTTTGAAGG-3'	76°C

Para amplificar el gen silvestre *YPD1* se utilizaron 0.5 µL de Platinum *Pfx* DNA polimerasa (2.5U/µL, Invitrogen), 5 µL de amortiguador de Platinum *Pfx* DNA polimerasa (10x, Invitrogen), 1 µL de dNTPs (10mM, Roche), 200 ng de oligo 1, 200 ng de oligo 2 (Ver Tabla 1), 1 µL de DNA genómico de *K. lactis MD2/1* (10ng/µL) como templado y se hizo una curva de 0.5, 1 y 2mM de MgSO₄ en agua destilada estéril hasta llegar a un volumen final de 50 µL por reacción. El programa de amplificación fue:

1. Desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos
 2. Desnaturalización a 94°C durante 1 minuto
 3. Alineamiento a 42°C durante 30 segundos
 4. Extensión a 68°C durante 1 minuto
 5. Extensión final a 68°C durante 10 minutos
- } x 35 ciclos

Se verificó el producto esperado de PCR de ≈464 pdb por electroforesis en gel de agarosa, se purificó del gel por GENE CLEAN®, se incubó con *Taq* DNA polimerasa y se ligó al vector de clonación pGEM®-T Easy Vector (ver 7.1.). Posteriormente se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del IFC y se corroboró que tuviera la secuencia correcta (fig. 11).

7.6.2 Amplificación de *KLYPD1* con la mutación puntual de histidina por alanina (*KLYPD1^{H67A}*)

Para obtener una construcción en donde *Ypd1p* no pudiera fosforilarse, se indujo un cambio en la secuencia del gen *KLYPD1^{wt}*; se mutó el codón que codifica para la histidina fosforilable por una alanina que no puede fosforilarse, mediante una PCR anidada que consiste en dos pasos (fig. 9):

- **Primera reacción; inducción de la mutación puntual.**

Se utilizaron 0.5 µL de Platinum *Pfx* DNA polimerasa (2.5U/µL, Invitrogen), 5 µL de amortiguador de Platinum *Pfx* DNA polimerasa (10x, Invitrogen), 1 µL de dNTPs (10mM), 200 ng de oligo 3, 200 ng de oligo 2 (ver tabla 1), 1 µL de la construcción pGEM+*KLYPD1^{wt}* (10ng/µL)

como templado y se hizo una curva de 0,5, 1 y 2mM de $MgSO_4$ en agua destilada estéril hasta llegar a un volumen final de 50 μL por reacción. El programa de amplificación fue:

1. Desnaturalización inicial a 94°C durante 10 minutos
 2. Desnaturalización a 94°C durante 1 minuto
 3. Alineamiento a 50°C durante 30 segundos
 4. Extensión a 68°C durante 1 minuto
 5. Extensión final a 68°C durante 10 minutos
- } x 35 ciclos

Se verificó el producto de PCR esperado de ≈ 257 pdb por electroforesis en gel de agarosa y se purificó del gel por GENE CLEAN®.

• **Segunda reacción; amplificación del producto completo**

Se realizó con las mismas condiciones que la primera, con la excepción de que en lugar del oligo 3 se utilizaron 5 μL del producto de ≈ 257 pb purificado de la primera reacción a manera de oligo antisentido.

Se verificó el producto esperado de PCR de ≈ 464 pdb por electroforesis en gel de agarosa, se purificó del gel por GENE CLEAN® y se ligó al vector de clonación pGEM®-T Easy Vector (ver 7.1). Posteriormente se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del IFC y se corroboró que tuviera la mutación puntual de histidina por alanina (fig. 16).

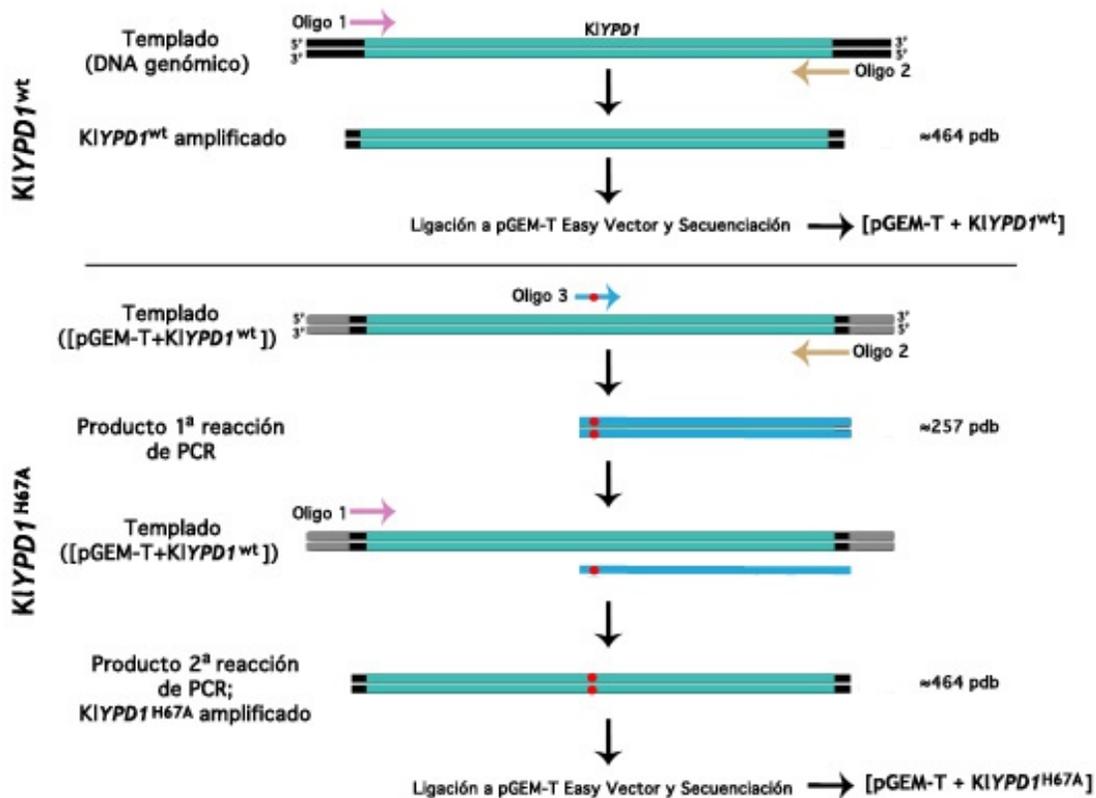


Figura 9. Esquema de las reacciones de PCR para amplificar a KIYPD1 silvestre y mutante puntual. El punto rojo marca el cambio de histidina por alanina y entre corchetes se indican las construcciones con pGEM-T Easy Vector finales.

7.7. Obtención de construcciones

Para poder expresar en *K. lactis* los productos de PCR del paso anterior, se requiere primero ligarlos al vector de clonación pGEM-T® Easy Vector para su propagación en *E. coli*, después digerir estas construcciones para obtener los insertos KLYPD1^{wt} y KLYPD1^{H67A} y por último subclonarlos en el plásmido de expresión para levadura YEpKDGal, para así obtener las construcciones finales [YEpKDGal+KLYPD1^{wt}] y [YEpKDGal+KLYPD1^{H67A}]. Este procedimiento se explica a detalle en los puntos siguientes.

7.7.1. Ligación en pGEM-T® Easy Vector

7.7.1.1. Tratamiento con Taq DNA polimerasa

Debido a que la Platinum Pfx DNA polimerasa es una enzima de alta fidelidad y deja extremos romos cuando amplifica, fue necesario incubar los productos de PCR (KLYPD1^{wt} y KLYPD1^{H67A}) con la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen) mas dATP para que incorpore una adenina en los extremos 3' de los fragmentos y entonces pueda ligarse a los extremos cohesivos del vector pGEM-T Easy Vector. Para ello, se hizo lo siguiente;

1. Correr un gel con la reacción de PCR que se requiera, purificar con GENE CLEAN Kit el producto generado con Platinum Pfx del gel de agarosa y tomar 7 µL.
2. Agregar 1 µL de buffer de Taq DNA polimerasa (10x, Invitrogen), 0.6 µL de MgCl₂ (25mM), 1 µL de dATP (2mM) y 0.5 µL de Taq DNA polimerasa (5U/µL, Invitrogen)
3. Incubar a 70°C durante 30 minutos
4. Utilizar 2µL de esta reacción para la ligación en pGEM-T Easy Vector

7.7.1.2. Procedimiento

El procedimiento para ligar los productos de PCR en el vector de clonación pGEM-T® Easy Vector y obtener las construcciones [pGEM-T+KLYPD1^{wt}] y [pGEM-T+KLYPD1^{H67A}] se hizo con los reactivos del kit y de acuerdo al protocolo sugerido por el proveedor (Promega).

7.7.2. Digestión de Vectores

7.7.2.1 pGEM-T® Easy Vector

Para obtener los insertos de las construcciones [pGEM-T+KLYPD1^{wt}] y [pGEM-T+KLYPD1^{H67A}], se hicieron digestiones con la enzima de restricción HindIII, puesto que los oligonucleótidos utilizados para amplificar a KLYPD1 silvestre y mutante puntual se diseñaron con un sitio HindIII interno (ver Tabla 1). La reacción de digestión se realizó con 2 µl de buffer B (10x, Roche), 0.5 µL de enzima HindIII (10U/µL, Roche), 300 ng de pGEM+KLYPD1^{wt} ó 300 ng de pGEM +KLYPD1^{H67A} purificado (concentración variable) y agua desionizada hasta llegar a un volumen final de 20 µL. Se incubó a 37°C por 1 hora, pasado este tiempo se agregó Stop Mix y se corrió por

electroforésis el producto de la digestión en un gel para verificar que se hubiera digerido correctamente, si así fue el caso se purificó el inserto del gel por GENECLAN®.

7.7.2.2. YEpKDGal

Para hacer linear el vector de expresión YEpKDGal se hicieron digestiones con la enzima de restricción *Hind*III, ya que cuenta con un sitio *Hind*III en el sitio de clonado múltiple (apéndice 1). La reacción de digestión se realizó de la misma manera que en el paso anterior, sólo que en este caso se usaron 300 ng de YEpKDGal purificado (concentración variable).

7.7.3. Ligación en YEpKDGal

7.7.3.1. Tratamiento con Fosfatasa Alcalina

Después de digerir el vector de expresión YEpKDGal es necesario defosforilarlo en los extremos 5' con la enzima fosfatasa alcalina de intestino de borrego (CIAP, Roche) para evitar que se recircularice. Para lograr esto, después de la reacción de digestión, se hizo lo siguiente;

1. Agregar en el mismo tubo de la reacción de digestión 1 µl de CIAP (1U/µl, Roche), 2.5 µl de buffer de CIAP (10x, Roche) y 1.5 µl de agua desionizada
2. Incubar a 37°C durante 45 minutos
3. Agregar 1 µl de CIAP (1U/µl, Roche)
4. Incubar a 37°C otros 45 minutos y agregar Stop Mix
5. Correr un gel con esta reacción y purificar por GENECLAN® el producto (YEpKDGal defosforilado) para la ligación.

7.7.3.2 Procedimiento

El plásmido YEpKDGal purificado del paso anterior se ligó con diferentes proporciones de los insertos digeridos y purificados de pGEM-T® Easy Vector (ver 7.7.2.1) utilizando la enzima T₄ DNA ligasa (1U/µl, Roche) y su respectivo buffer (10x, Roche) en un volumen final de 10 µl. Se hicieron también controles negativos usando sólo el vector o el inserto y se incubaron a 16°C durante toda la noche. Las reacciones de ligación se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Reacciones de ligación de YepKDGal con los insertos KLYPD₁^{wt} o KLYPD₁^{H67A}

	Vector Solo	Inserto solo	1:3 Vector-Inserto	1:2 Vector-Inserto
T₄ DNA ligasa	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Buffer	1 µl	1 µl	1 µl	1 µl
Vector: YEpKDGal	2 µl	----	2 µl	2 µl
Inserto: KLYPD₁^{wt} o KLYPD₁^{H67A}	----	2 µl	6 µl	4 µl
Agua desionizada	6 µl	6 µl	----	2 µl

7.8. Transformación de *E. coli*

1. Descongelar células competentes DH5α en hielo, utilizar 100 µl en un tubo de 1.5 mL por cada transformación.
2. Agregar 10 µL de la ligación correspondiente (ver 7.1. y 7.2.)
3. Incubar 30 minutos en hielo.
4. Dar choque térmico a 42°C durante 1 minuto
5. Agregar 1mL de medio LB líquido e incubar a 37°C durante 1 hora.
6. Microfugar las células durante 30 segundos, desechar el sobrenadante y resuspender el pellet en el medio residual ≈200 µL.
7. Tomar todo el contenido del tubo y plaquear en cajas Petri con medio de selección; medio LB-Amp/IPTG/X-Gal en caso de transformaciones con construcciones en pGEM-T Easy Vector y en medio LB-Amp en caso de transformaciones con construcciones en YEpKDGal
8. Incubar a 37°C durante ≈14 horas y seleccionar las colonias de transformantes positivas; en caso de transformaciones con pGEM-T Easy Vector se seleccionaron las colonias blancas, en el caso de las transformaciones con YEpKDGal que no tiene selección en IPTG-XGal, se seleccionaron colonias al azar.

En ambos casos, se procedió a hacer minipreparaciones de los plásmidos para analizar con enzimas de restricción y así seleccionar las clonas correctas (ver 7.9. y 7.10.).

7.9. Minipreparación de plásmidos

1. Picar colonias de *E. coli* transformantes y dejar por cada colonia un cultivo en 5 mL de medio LB-Amp líquido a 37°C durante toda la noche.
2. Centrifugar 1 minuto a 14000 rpm y retirar sobrenadante.
3. Agregar 250 µL de agua y resuspender homogéneamente agitando en el vórtex.
4. Agregar 250 µL de solución de lisis; 1% de SDS (10%) y 0.2M de NaOH (2M) en agua y mezclar despacio por inversión.

5. Agregar 250 μL de acetato de potasio 3M y mezclar por inversión.
6. Incubar en hielo durante 5 minutos.
7. Microfugar a 14000 rpm a 4°C durante 8 minutos.
8. Pasar 600 μL del sobrenadante a un tubo limpio, agregar 900 μL de etanol al 100% y mezclar por inversión.
9. Microfugar 5 minutos a 14000 rpm.
10. Remover todo el sobrenadante, agregar 500 μL de etanol al 70% y mezclar por inversión.
11. Remover el sobrenadante y dejar secar el tubo.
12. Resuspender en 50 μL de agua
13. Tomar una muestra de 10 μL y digerir con enzimas de restricción
14. Correr un gel con la digestión para verificar si las clonas seleccionadas contienen el vector mas el inserto.

Una vez confirmado que se tienen las clonas correctas, se inoculan nuevos cultivos con las bacterias seleccionadas y se purifican los plásmidos con el estuche QIAprep Spin Miniprep Kit de la marca Qiagen de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Hecho esto, se corre un gel para verificar que el plásmido esté correctamente purificado, si así es el caso se cuantifica en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo-Scientific) y se almacena a -20°C hasta su uso.

7.10. Restricción enzimática

Para hacer lineal a YEpkDGal así como para obtener los insertos de las construcciones tanto de pGEM-T Easy Vector como de YEpkDGal, las digestiones fueron con la enzima de restricción *HindIII* como se indica en el punto 7.7.2.

Al hacer las ligaciones, el inserto tiene la misma probabilidad de ligarse al vector en sentido 5'→3' ó 3'→5' con respecto al promotor. Con el fin de conocer la orientación de los insertos *KLYPD1^{wt}* y *KLYPD1^{H67A}* en YEpkDGal y seleccionar aquellos en sentido 5'→3', se hicieron digestiones con la enzima de restricción *BamHI* debido a que tanto el plásmido como los insertos cuentan con sitios *BamHI* internos (apéndice 1 y fig. 11).

La restricción enzimática se hizo con 0.5 μL de la enzima *BamHI* (10U/ μL , Roche), 1 μL de Buffer B (10x, Roche), 300 ng de YEpkDGal+*KLYPD1^{wt}*/*KylYPD1^{H67A}* (concentración variable) y agua desionizada hasta un volumen final de 10 μL por reacción. La reacción se incubó a 37°C durante 1 hora, pasado este tiempo se agrega Stop Mix y se corre un gel para observar el patrón de digestión.

7.11. Transformación de *K. lactis*

7.11.1. Tratamiento con 5-FOA

La cepa MD2/1 de *K. lactis* es auxótrofa para uracilo (ver 7.1.), para obtener cepas con mutantes nulas de un gen, en este caso de *YPD1*, se interrumpe el gen que desea eliminarse con un

cassette de *URA3*. Este gen codifica para la enzima OMP descarboxilasa que participa en la biosíntesis de uracilo, permitiendo entonces a las mutantes nulas positivas (Δ Klypd1) crecer en medio sin uracilo (-URA).

Para transformar a Δ Klypd1 con las construcciones en YE_pKDGal, fue necesario eliminar el cassette de *URA3* de la cepa, porque el plásmido cuenta también con un cassette de *URA3* para su selección (ver apéndice 1). Esto se logra tratando a Δ Klypd1 con ácido 5-fluoro-orótico (5-FOA), compuesto que se vuelve tóxico para la población *URA3*⁺ dejando entonces a células *ura3*⁻ libres para transformarse (Boeke *et al.*, 1987). El procedimiento para obtener la cepa Δ Klypd1-FOA se hizo de la siguiente manera;

1. Crecer a la cepa Δ Klypd1 en medio sólido SD-URA a 30°C durante el tiempo que sea necesario.
2. Tomar una porción de ese cultivo e inocular en 5 mL de medio YPD líquido. Incubar a 30°C y 250 rpm durante toda la noche.
3. Minifugar el cultivo hasta que quede un pellet con todas las células en un tubo de 1.5 mL.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender en el medio residual \approx 200 μ L
5. Plaquear todo el contenido en una caja de Petri con medio YPD-FOA
6. Incubar a 30°C hasta que aparezcan colonias \approx 7 días.
7. Picar diferentes colonias y con el mismo palillo sembrar un parche en cajas de Petri con medio SD-URA y otro parche en medio SD-URA+Ura en la misma posición.
8. Incubar a 30°C hasta que crezcan.

Seleccionar las colonias Δ Klypd1-FOA positivas: los parches que hayan crecido en medio SD-URA+Ura y no en SD-URA.

7.11.2. Procedimiento para transformar a *K. lactis*

1. Inocular la cepa Δ Klypd1-FOA en 10 ml de medio SD-URA+Ura líquido e incubar a 30°C y 250 rpm durante toda la noche.
2. Diluir las células 1:20 en un cultivo de YPD líquido hasta quedar a una densidad óptica de 0.2 a 600 nanómetros.
3. Incubar a 30°C y 250 rpm hasta que la densidad óptica alcance un valor de 0.6 a 600 nanómetros.
4. Pasar el cultivo a un tubo de polipropileno estéril de 50 ml y centrifugarlo 5 minutos a 3000 rpm y desechar sobrenadante
5. Resuspender las células en el mismo volumen de agua destilada estéril y volver a centrifugar como se indica en el paso 4.
6. Resuspender las células en 1 ml de agua destilada y transferirlas a un tubo de 1.5 ml
7. Minifugar a 14000 rpm durante 15 segundos, remover sobrenadante y agregar 1 ml de solución TE/acetato de litio (Preparado fresco a partir de TE 10x a pH 7.5 y acetato de litio 10x, proporción 1:1), agitar y repetir la primera parte de este paso.
8. Resuspender las células en 1/100 del volumen del cultivo original con solución TE/LiOAc.
9. Mezclar 50 μ l de células con 1 μ g de plásmido ([YE_pKDGal+KLYPD1^{wt}/KLYPD1^{H67A}]) y 50 μ g de DNA de esperma de salmón sonicado y hervido.
10. Agregar 300 μ l de solución PEG/litio/TE (preparado fresco a partir de polietilenglicol (PEG) al 50%, acetato de litio 10x y TE 10x en proporción 8:1:1) y agitar vigorosamente.
11. Incubar a 30°C agitándose por 30 minutos a 250 rpm.
12. Agregar 40 μ l de DMSO y agitar vigorosamente.

13. Incubar a 42°C durante 15 minutos, pasado este tiempo microfugar 15 segundos y eliminar sobrenadante.
14. Resuspender las células en 1 ml de agua destilada estéril.
15. Plaquear 100 µl en cajas de Petri con medio de selección SD-URA, e incubar a 30°C hasta que crezcan colonias.

7.12. Ensayos de goteo por diluciones seriadas

Los fenotipos en estrés osmótico o de retículo endoplásmico de las distintas cepas utilizadas en este trabajo se observaron mediante ensayos de goteo por diluciones seriadas. Éste método consiste en:

1. Inocular las cepas que se desean observar, cada una en un tubo distinto, en 10 ml de medio líquido⁴ e incubar a 30°C y 250 rpm durante toda la noche.
2. Medir la densidad óptica a 600 nm y ajustar con el mismo medio de cultivo a $DO_{600}=0.5$
3. Una vez que todas las cepas estén ajustadas a la misma D.O., hacer cinco diluciones 1:10 a partir de éste cultivo concentrado hasta llegar a 1:100,000.
4. Tomar 3 µl de cada dilución y gotear en cajas de Petri con el medio que se desee probar.
5. Incubar a 30°C durante el tiempo que sea necesario, realizando observaciones del crecimiento diariamente.
6. Transcurrido este tiempo, retirar las cajas de la incubadora y escanearlas.

Cada ensayo de goteo por dilución seriada de este trabajo, tuvo al menos 3 repeticiones.

⁴ Se usaron diferentes medios líquidos dependiendo de la cepa que se estuviera probando;

MD2/1: **YPD**

$\Delta Klhac1$, $\Delta Klsln1$, $\Delta Kllypd1$, $\Delta Klssk1$, $\Delta Klssk2$: **SD-URA**

$\Delta Kllypd1$ -FOA: **SD-URA+Ura**

$\Delta Kllypd1$ + $[YE\text{pKDGal}+KIYPD1^{wt}]$ y $\Delta Kllypd1$ + $[YE\text{pKDGal}+KIYPD1^{H67A}]$: **SRaf-URA**

8. Resultados

8.1. La cepa $\Delta Klypd1$ es sensible a tunicamicina.

Para analizar si la rama de Sln1 de *Kluyveromyces lactis* participa en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico, se hicieron ensayos de goteo por diluciones seriadas con las mutantes nulas de la rama: $\Delta Klsln1$, $\Delta Klypd1$, $\Delta Klssk1$ y $\Delta Klssk2$. Dichas diluciones se sembraron en medio YPD con los agentes inductores de estrés de RE tunicamicina, ditiotreitolo, β -mercaptoetanol y 2-desoxi-D-glucosa y para comparar la respuesta de la rama de Sln1 en estrés osmótico se sembraron en medio con KCl. Se utilizó la mutante nula $\Delta Klhac1$ como control negativo para estrés de retículo endoplásmico, ya que sin Hac1p se bloquea la UPR y la célula no puede contener a nivel transcripcional con las proteínas mal plegadas.

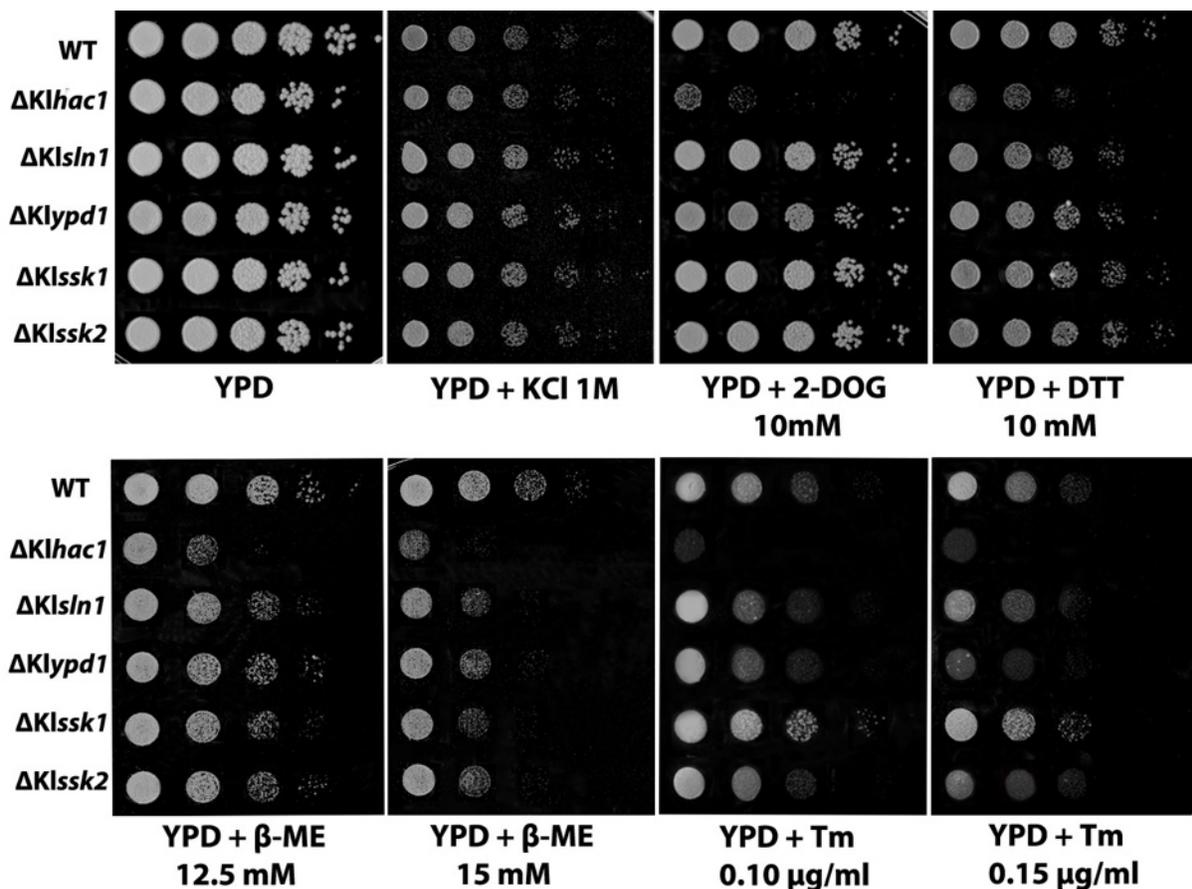


Figura. 10. Fenotipos de las mutantes de la vía de Sln1 en presencia de inductores de estrés de retículo endoplásmico. Diluciones seriadas de las distintas mutantes del fondo genético MD 2/1 y de la cepa silvestre (Wt) en medio YPD con cloruro de potasio 1M (KCl), 2-desoxi-D-glucosa 10 mM (2-DOG), ditiotreitolo 10 mM (DTT), β -mercaptoetanol 12.5 y 15 mM (β -ME) y tunicamicina 0.1 y 0.15 μ g/ml (Tm). Se crecieron cultivos de cada cepa en medio mínimo SD-URA líquido a 30°C y 250 rpm durante una noche, al día siguiente, se ajustó la densidad óptica en 600 nm a 0.5, después se realizaron diluciones seriadas (sin diluir, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) de cada cepa y se sembraron gotas de 3 μ l en una caja de Petri con los distintos medios, se incubaron a 30°C por \approx 48 h y se escanearon.

En la figura 10 se muestra que tanto la WT como las mutantes de la rama de Sln1 tienen un fenotipo de sensibilidad moderado en sal (KCl 1M) con respecto a su crecimiento en YPD (control), así como que las mutantes $\Delta Klsln1$ y $\Delta Klypd1$ no son letales, como en el caso de *S. cerevisiae*. Estas observaciones coinciden con resultados previamente obtenidos dentro de nuestro grupo de trabajo (datos no publicados). Todas tienen un crecimiento uniforme en sal, incluida $\Delta Klhac1$, a diferencia de como se observa en el resto de los inductores de estrés de RE (fig. 10) corroborando que KlHac1p no es requerida en la respuesta a estrés osmótico pero sí en la respuesta a estrés de RE.

Los agentes utilizados inducen estrés de RE, provocando la acumulación de proteínas mal plegadas a través de distintos mecanismos; el β -mercaptoetanol (β -ME) y el ditioneitol (DTT) son agentes reductores que evitan la formación de puentes disulfuro en las proteínas, la 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG) es un análogo de la glucosa que ocasiona un nivel bajo de glicosilación en proteínas y la tunicamicina es un inhibidor de la N-glicosilación de proteínas (Barnes *et al.*, 1984; Singh *et al.*, 1995; Back *et al.*, 2005).

Se observa que a pesar de que en 2-DOG y DTT $\Delta Klhac1$ no crece, todas las mutantes crecen de igual manera que la cepa silvestre. En β -ME se distingue en la concentración más alta (15 mM) que las mutantes son sensibles y crecen menos que la WT, sin embargo no se observan diferencias entre las mutantes (fig. 10). En tunicamicina fue el medio donde se observó más sensibilidad de las mutantes, con excepción de $\Delta Klssk1$ que obtuvo un crecimiento incluso mayor a la silvestre. A pesar de que el resto de las mutantes se mostraron sensibles, se puede distinguir desde la primera gota que $\Delta Klypd1$ es más sensible que el resto en la concentración más alta de tunicamicina (0.15 μ g/ml) (fig. 10).

Debido a que se puede observar mejor el fenotipo sensible de las mutantes, en especial $\Delta Klypd1$, y a que se utiliza ampliamente como inductor estándar de la UPR (Back *et al.*, 2005) se dispuso utilizar solamente tunicamicina en los ensayos posteriores.

8.2 La mutante $\Delta Klypd1+Ypd1^{wt}$ recupera parcialmente el fenotipo.

Debido a que la cepa $\Delta Klypd1$ mostró más sensibilidad que el resto de las mutantes nulas de la vía de Sln1 y a que Ypd1p es una proteína clave dentro del fosforrelievo (ver fig. 3), se decidió investigar si es posible revertir el fenotipo de sensibilidad complementando a esta cepa con el gen silvestre de KLYPD1.

8.2.1. Obtención de la transformante $\Delta Klypd1+KLYPD1^{wt}$.

Se amplificó mediante PCR el gen KLYPD1 utilizando como templado DNA genómico de *K. lactis* MD 2/1. El producto de ≈ 464 pb se ligó al vector pGEM-T Easy y se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, utilizando para ello los oligonucleótidos universales T7 y SP6. Se realizó un alineamiento con la secuencia del producto y la secuencia

pGEM – KIYPD1wt	TTACGAAAGCTTAATATATAATGTC	CCCAAACACCTAGAATTCAGATAA	350
KIYPD1 Génolevures	-----ATGTC	CCCAAACACCTAGAATTCAGATAA	29
pGEM – KIYPD1wt	AGTGATCAATTGGGATATTCTCAATGAAATTGTTTCCATGGATGAAGATG		400
KIYPD1 Génolevures	AGTGATCAATTGGGATATTCTCAATGAAATTGTTTCCATGGATGAAGATG		79
pGEM – KIYPD1wt	ATGCTGGCTTTTCACAATCCTTACTAATAACAATTCTTTGAGCAAGCGACT		450
KIYPD1 Génolevures	ATGCTGGCTTTTCACAATCCTTACTAATAACAATTCTTTGAGCAAGCGACT		129
pGEM – KIYPD1wt	TCTACCTTTAACCAAATCGAACAGCACATCAAAACTGATAAGAAGCTTGGGA		500
KIYPD1 Génolevures	TCTACCTTTAACCAAATCGAACAGCACATCAAAACTGATAAGAAGCTTGGGA		179
pGEM – KIYPD1wt	TCAACTGGGACAGCTGGGACACTTTTTGAAAGGATCTTCGGCATCCCTAG		550
KIYPD1 Génolevures	TCAACTGGGACAGCTGGGACACTTTTTGAAAGGATCTTCGGCATCCCTAG		229
pGEM – KIYPD1wt	GTCTACAGAGGATTGCATGGGTTTGTGAGAGAATTCAAAATTACGGACAG		600
KIYPD1 Génolevures	GTCTACAGAGGATTGCATGGGTTTGTGAGAGAATTCAAAATTACGGACAG		279
pGEM – KIYPD1wt	AAAAGAGAAAGGATCCGGTATTACAGACGATAATTATATACAATTGATTCA		650
KIYPD1 Génolevures	AAAAGAGAAAGGATCCGGTATTACAGACGATAATTATATACAATTGATTCA		329
pGEM – KIYPD1wt	AAATTCTCTGGATCTGGCAAGGAAAGAGTTTGACTCGGCCAAGAGCGAAC		700
KIYPD1 Génolevures	AAATTCTCTGGATCTGGCAAGGAAAGAGTTTGACTCGGCCAAGAGCGAAC		379
pGEM – KIYPD1wt	TAGGGCAGTACTACAAAACCTCAATTTTAAAGTTTACTTCTCTGATTTTTAC		750
KIYPD1 Génolevures	TAGGGCAGTACTACAAAACCTCAATTTTAA-----		408
pGEM – KIYPD1wt	AGGCAAGCTTTTCTCTAATCGAATTCCC	CGCGCCCATGGCGGCCGGGA	800
KIYPD1 Génolevures	-----		408

Figura. 11. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas KIYPD1^{wt} (producto de PCR) y KIYPD1 de la base de datos Génolevures (KLLA0D19338g). Se muestra en azul la comparación de las secuencias indicadas. Se puede observar que el producto de PCR no contiene ningún cambio. En rojo se indican los codones de inicio y de término, en verde se enmarca el codón que codifica para el residuo de histidina fosforilable. En rosa se encuentra la secuencia del oligo1, en amarillo se encuentra la secuencia complementaria del oligo2 y se indican en naranja los sitios de restricción *Hind*III. En morado se enmarca el sitio de restricción interno de *Bam*HI. El alineamiento se realizó en el programa CLC Sequence Viewer 6

del gen *KIYPD1* (KLLA0D19338g) de la base de datos Génolevures (<http://genolevures.org>) y se comprobó que la secuencia del producto era correcta y no contenía mutaciones (fig. 11).

Ya que se comprobó que la secuencia era la correcta, se subclonó el inserto (*KIYPD1^{wt}*) en el vector de expresión de *K. lactis* *YepKDGal* y se transformó una cepa Δ *Klypd1*-FOA de *K. lactis* como se explica en *materiales y métodos*. Los oligonucleótidos que se utilizaron para amplificar a *KIYPD1^{wt}* se diseñaron con sitios *Hind*III (ver tabla 1) ya que el inserto no cuenta con sitios *Hind*III internos y para poder recuperar el inserto digiriendo con esta enzima y subclonar en *YepKDGal* digerido con la misma enzima (ver 7.7.2.2. y apéndice 1). Una vez ligados vector e inserto, se transformó *E. coli* y se hicieron minipreparaciones de plásmidos que se analizaron digiriendo igualmente con *Hind*III. De esta manera, se seleccionaron las clonas con el plásmido *YepKDGal* que contenían el inserto (fig. 12)

Una vez comprobado que todas las clonas seleccionadas contenían la construcción *YepKDGal* +*KIYPD1^{wt}*, se seleccionaron, mediante digestiones con la enzima de restricción *Bam*HI, únicamente aquellas en las que el inserto *KIYPD1^{wt}* se encontró en dirección 5'→3' con respecto al promotor inducible por galactosa (fig. 13a). Es muy importante este paso de selección en la orientación correcta porque como se trata de un vector de expresión, si el inserto entra al revés, no sería posible obtener a la proteína *Ypd1p*. Se empleó la enzima *Bam*HI debido a que tanto el inserto *KIYPD1^{wt}* como el plásmido *YepKDGal* contienen un solo sitio de restricción para esta enzima (fig. 12 y apéndice 1), al digerir con ella se puede obtener información con respecto a la orientación del inserto en el plásmido. Cuando el inserto se encontró en dirección 5'→3' se

observó una banda de ≈ 156 pb (fig. 13b) y cuando se encontró en dirección $3' \rightarrow 5'$ se observó una banda de ≈ 308 pb (fig. 13a).

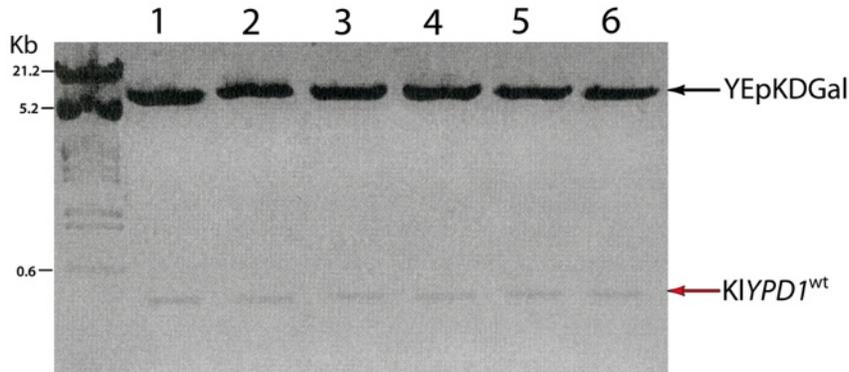


Figura 12. Análisis por digestión con *HindIII* de las posibles construcciones YepKDGal+KLYpd1^{wt}. Electroforésis en gel de agarosa al 1% con los plásmidos purificados por minipreps de 6 clonas distintas (carriles 1-6), digeridos con la enzima de restricción *HindIII*. La flecha negra indica el plásmido YepKDGal de ≈ 7 Kb y la flecha roja el inserto KLYPD1^{wt} de ≈ 464 pb, se observa que en las 6 clonas se encontró exitosamente el plásmido mas el inserto.

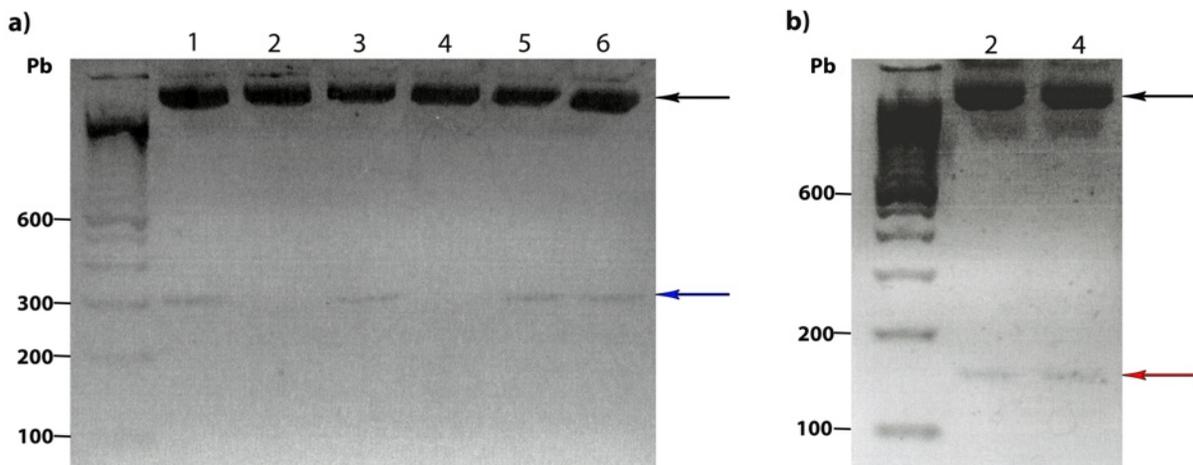


Figura 13. Análisis por digestión con *BamHI* de las construcciones YepKDGal+KLYPD1^{wt}. a) Electroforésis en gel de agarosa al 1% con la digestión de los plásmidos purificados por minipreps de las 6 clonas confirmadas con el inserto KLYPD1^{wt} (carriles 1-6) con la enzima de restricción *BamHI*, la flecha negra indica el plásmido YepKDGal de ≈ 7 Kb, la flecha azul muestra en los carriles 1, 3, 5 y 6 la banda de ≈ 308 pd comprobando que esas clonas contienen al inserto KLYPD1^{wt} en dirección $3' \rightarrow 5'$, la banda esperada de ≈ 156 pbd en los carriles 2 y 4 no se pudo definir. b) Electroforésis en gel de agarosa al 2% con la digestión de los plásmidos purificados por minipreps de las clonas 2 y 4 con la enzima de restricción *BamHI*, la flecha negra indica el plásmido YepKDGal de ≈ 7 Kb, la flecha roja muestra la banda de ≈ 156 pbd, confirmando que esas clonas contienen el inserto en dirección $5' \rightarrow 3'$.

8.2.2. Ensayos de goteo por dilución seriada

Una vez seleccionada una construcción YepKDGal+KLYPD1^{wt} en la orientación correcta, se procedió a transformar la cepa Δ Klypd1-FOA con dicha construcción y con el plásmido YepKDGal sin inserto como control. Se eligieron dos de las transformantes y se realizaron ensayos de dilución seriada en diferentes concentraciones de tunicamicina. Se utilizó medio YPGal para inducir la expresión del gen KLYPD1^{wt}, dado que el plásmido YepKDGal cuenta con un promotor inducible por galactosa (apéndice 1).

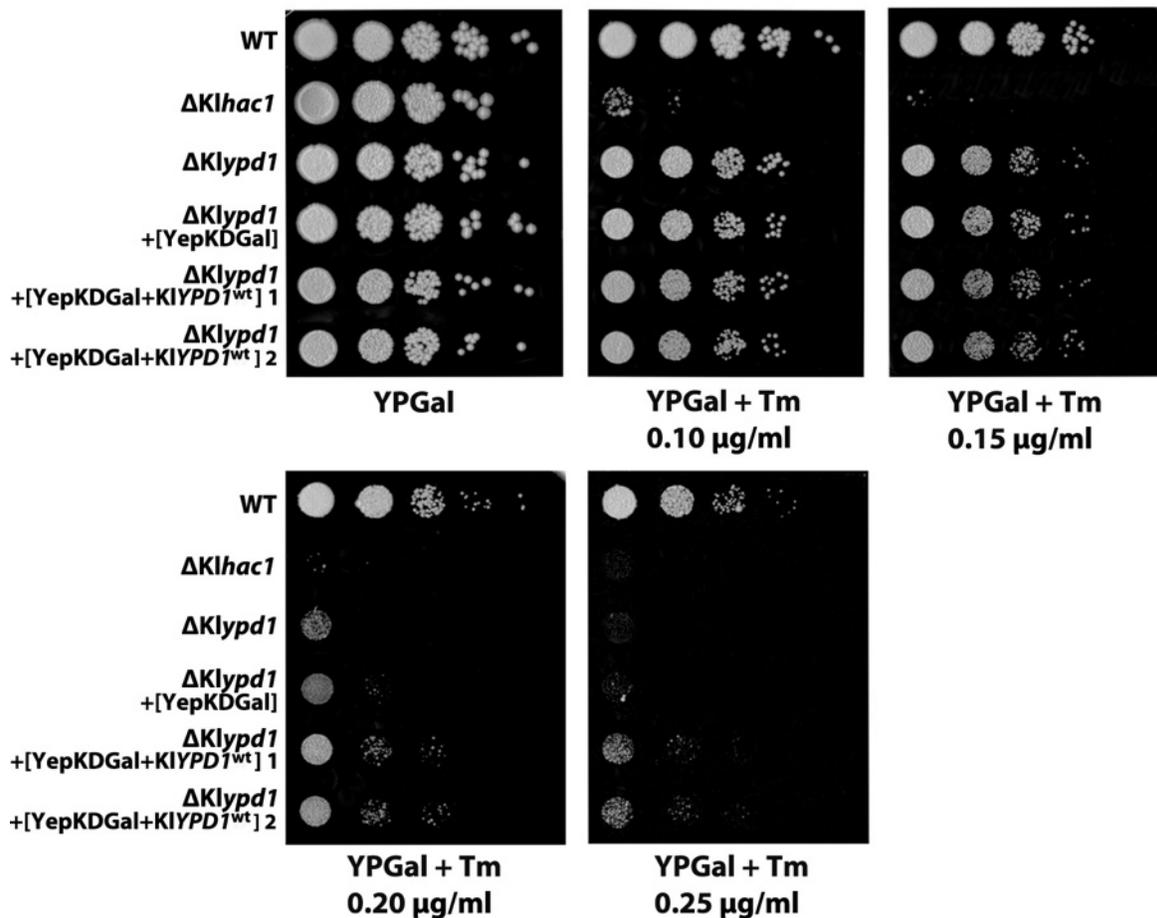


Figura 14. Fenotipo de la cepa Δ Klypd1 con la construcción YepKDGal+KLYPD1^{wt}. Diluciones seriadas de cepas de fondo genético MD 2/1 en medio YPGal con tunicamicina (Tm) 0.10, 0.15, 0.20 y 0.25 µg/ml. Se utilizó la cepa Δ Klypd1-FOA sin transformar (tercera posición) y se probaron dos clones independientes con la construcción YepKDGal+KLYPD1^{wt} (quinta y sexta posición). Se crecieron cultivos de cada cepa en medio mínimo Sraf-URA líquido a 30°C y 250 rpm durante una noche, se ajustó la D.O. en 600 nm a 0.2 y se indujo con galactosa al 2% por \approx 5 horas. Se ajustó la densidad óptica en 600 nm a 0.4, después se hicieron diluciones seriadas (sin diluir, 1:10, 1:100, 1:1000 y 1:10,000) de cada cepa y se sembraron gotas de 3µ en una caja de Petri con los distintos medios, se incubaron a 30°C por \approx 5 días y se escanearon.

Se puede observar desde 0.10 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina que la cepa ΔKlhac1 es muy sensible y que el resto de las cepas crecen ligeramente menos que la silvestre y de manera uniforme, sin embargo a partir de que se aumenta al doble de concentración (0.20 $\mu\text{g/ml}$) se distingue claramente que la cepa ΔKlypd1 es muy sensible al antibiótico (fig. 14), como se observa en la figura 10.

En las concentraciones más altas, también se puede notar que las clonas de la cepa ΔKlypd1 con la construcción $\text{YepKDGal}+\text{KLYPD1}^{\text{wt}}$ crecen hasta la tercera gota, al contrario de ΔKlypd1 y ΔKlypd1 con el plásmido YepKDGal vacío, que crecen ligeramente sólo en la primera gota. En 0.25 $\mu\text{g/ml}$ es la concentración donde se observa de manera más fuerte el fenotipo, siendo las mutantes con la construcción las únicas que crecen. Cabe mencionar que no se observaron diferencias en el crecimiento de las dos clonas que se probaron ($\Delta\text{Klypd1}+[\text{YepKDGal}+\text{KLYPD1}^{\text{wt}}]$ 1 y 2) en ninguna de las concentraciones, lo que corrobora que contienen la misma construcción y que ésta se comporta y expresa de manera equivalente. Por lo tanto el que a la cepa ΔKlypd1 se le complementa con el gen de KLYPD1 faltante ocasiona que se restablezca el fenotipo de no sensibilidad de manera parcial ya que si bien no crece de manera semejante a la silvestre, tiene un crecimiento mayor a la mutante nula ΔKlypd1 en tunicamicina (fig. 14).

8.3 La mutante puntual no fosforilable $\Delta\text{Klypd1}+\text{Ypd1}^{\text{H67A}}$ responde ligeramente mejor a tunicamicina.

Después de observar que cuando se complementa con el gen silvestre de KLYPD1 , la mutante nula ΔKlypd1 restablece parcialmente su fenotipo de no sensibilidad en tunicamicina, nos llevó a cuestionar si este fenotipo era debido a que la proteína de fosfotransferencia Klypd1p se encontraba fosforilada en su dominio HPt o si solamente era producto de la presencia *per se* de la proteína, independientemente de su estado de fosforilación. Por consiguiente, se decidió construir una mutante en donde la proteína Klypd1p no pudiera estar fosforilada para poder esclarecer si existían diferencias entre los fenotipos en presencia de tunicamicina.

8.3.1. Obtención de la transformante $\Delta\text{Klypd1}+\text{KLYPD1}^{\text{H67A}}$

Para obtener a la mutante de Klypd1p no fosforilable, fué necesario realizar una PCR en dos pasos (PCR anidada) de KLYPD1 donde se cambió el residuo de histidina-67, que es el blanco de fosforilación en *K. lactis*, por un residuo de alanina que no se puede fosforilar (fig. 15). Se utilizó como templado a la construcción $\text{YepKDGal}+\text{KLYPD1}^{\text{wt}}$, dado que previamente se había secuenciado y comprobado que la secuencia era correcta y no contenía mutaciones (fig. 11). Se seleccionó el producto de ≈ 464 pb amplificado con 0.5 mM de MgSO_4 ya que la banda, en este caso, fue la mejor definida (fig. 15) y se ligó al vector pGEM-T Easy. Posteriormente se secuenció en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular y se hizo un alineamiento con la secuencia del producto y la secuencia del gen KLYPD1 (KLLA0D19338g) de la base de datos Génolevures (<http://genolevures.org>) y se comprobó que la secuencia del producto de PCR contenía el cambio esperado de histidina (codón CAC) por alanina (codón GCC) y que el resto de la secuencia era correcta (fig. 16).

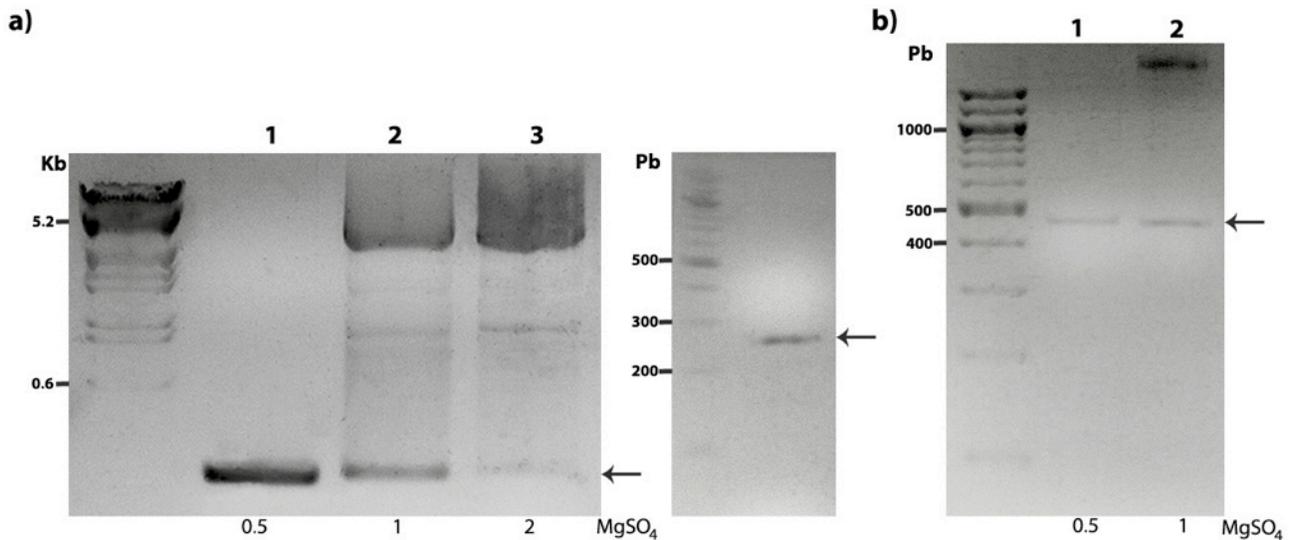


Figura 15. PCR anidada para obtener el gen mutante *KIYPD1*^{H67A}. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos amplificados de la primera reacción de PCR hecha con el oligo1 y el oligo3. Los carriles 1, 2 y 3 indican las tres reacciones independientes que se realizaron con 0.5, 1 y 2 mM de MgSO₄ respectivamente. El gel contiguo muestra el producto purificado del carril 1 del gel anterior, usando como marcador de peso molecular una escalera de 100 pb para identificar la banda esperada de ≈ 257 pb, que se señala en ambos casos con la flecha. b) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los productos amplificados de la segunda reacción de PCR, hecha con el producto purificado de la primera reacción (a manera de oligonucleótido antisentido) y el oligo1. Los carriles 1 y 2 indican las dos reacciones independientes que se realizaron con 0.5 y 1 mM de MgSO₄ respectivamente. La flecha indica el producto esperado de ≈464 pb.

pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	TAGT GATT ACGAAAGCTTAATATATA ATG TCCCAAACACCTAGAATTCC	350
<i>KIYPD1</i> Génolevures	-----ATG TCCCAAACACCTAGAATTCC	23
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	AGATAAAGTGATCAATTGGGATATTCTCAATGAAATTGTTTCCATGGATG	400
<i>KIYPD1</i> Génolevures	AGATAAAGTGATCAATTGGGATATTCTCAATGAAATTGTTTCCATGGATG	73
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	AAGATGATGCTGGCTTTTACAATCCTTACTAATACAATTCTTTGAGCAA	450
<i>KIYPD1</i> Génolevures	AAGATGATGCTGGCTTTTACAATCCTTACTAATACAATTCTTTGAGCAA	123
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	GCGACTTCTACCTTTAACCAAATCGAACAGCACATCAAAACTGATAAGAA	500
<i>KIYPD1</i> Génolevures	GCGACTTCTACCTTTAACCAAATCGAACAGCACATCAAAACTGATAAGAA	173
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	CTTGGATCAACTGGGACAGCTGGGAGCCCTTTTGGAAAGGATCTTCGGCAT	550
<i>KIYPD1</i> Génolevures	CTTGGATCAACTGGGACAGCTGGGACACTTTTGGAAAGGATCTTCGGCAT	223
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	CCCTAGGTCTACAGAGGATTGCATGGGTTTGTGAGAGAATTCAAATTAC	600
<i>KIYPD1</i> Génolevures	CCCTAGGTCTACAGAGGATTGCATGGGTTTGTGAGAGAATTCAAATTAC	273
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	GGACAGAAAAGAGAA GGATCCGGTATTACAGACGATAATTATATACAATT	650
<i>KIYPD1</i> Génolevures	GGACAGAAAAGAGAA GGATCCGGTATTACAGACGATAATTATATACAATT	323
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	GATTCAAATTCTCTGGATCTGGCAAGGAAAGAGTTTGACTCGGCCAAGA	700
<i>KIYPD1</i> Génolevures	GATTCAAATTCTCTGGATCTGGCAAGGAAAGAGTTTGACTCGGCCAAGA	373
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	GCGAACTAGGGCAGTACTACAAACTCAATTT TAA GTTTACTTCTCTGAT	750
<i>KIYPD1</i> Génolevures	GCGAACTAGGGCAGTACTACAAACTCAATTT TAA -----	408
pGEM – <i>KIYPD1</i> ^{H67A}	TTTTA CAGGCAAGCTT TTCTCTAATCGAATTCCC GCGGCCCGCCATGGCGG	800
<i>KIYPD1</i> Génolevures	-----	408

Figura 16. Alineamiento de las secuencias nucleotídicas *KIYPD1*^{H67A} (producto de PCR) y *KIYPD1* de la base de datos Génolevures (KLLA0D19338g). Se muestra en azul la comparación de las secuencias indicadas. Se remarca en el recuadro negro el cambio de histidina (CAC) por alanina (GCC) en el producto mutante. En rojo se indica el codón de inicio y de término. En rosa se encuentra la secuencia del oligo1 y en azul claro se enmarca la secuencia del oligo3, en amarillo se muestra la secuencia complementaria del oligo2 y en naranja se indican los sitios de restricción *Hind*III. En morado se enmarca el sitio de restricción interno de *Bam*HI. El alineamiento se realizó en el programa CLC Sequence Viewer 6.

Se subclonó el gen mutante (*KLYPD1^{H67A}*) en el vector de expresión de *K. lactis* YepKDGal (ver 7.7.3.) y puesto que el inserto con la mutación puntual también contenía sitios *Hind*III en los extremos (fig. 16) se comprobó mediante digestiones con dicha enzima que el plásmido contenía el inserto (fig. 17). Ya que se confirmó que las construcciones contenían el gen mutante, se hicieron digestiones con *Bam*HI para, tal como se hizo con la construcción silvestre, verificar que la orientación fuera la correcta (fig. 18).

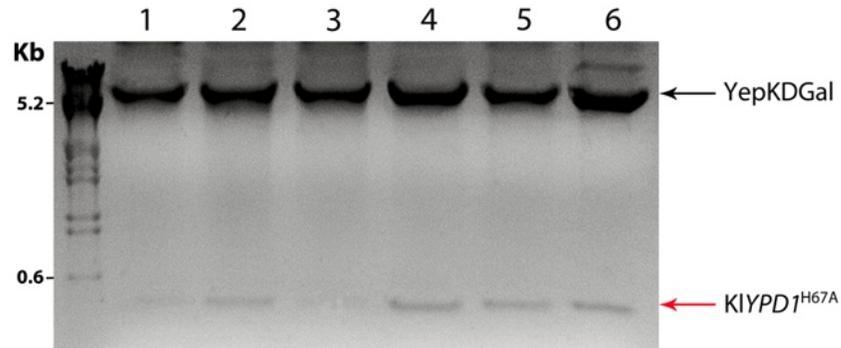


Figura 17. Análisis por digestión con *Hind*III de las posibles construcciones YepKDGal+*KLYPD1^{H67A}*. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con los plásmidos purificados por minipreps de 6 clonas transformantes independientes (carriles 1-6) digeridos con la enzima de restricción *Hind*III. La flecha negra indica el plásmido lineal YepKDGal de ≈ 7 Kb y la flecha roja el inserto *KLYPD1^{H67A}* de ≈ 464 pb. Se observa que las 6 clonas contienen el inserto, pero en los carriles 1 y 3 la digestión no fue muy eficiente, por lo que se ve muy poco inserto.

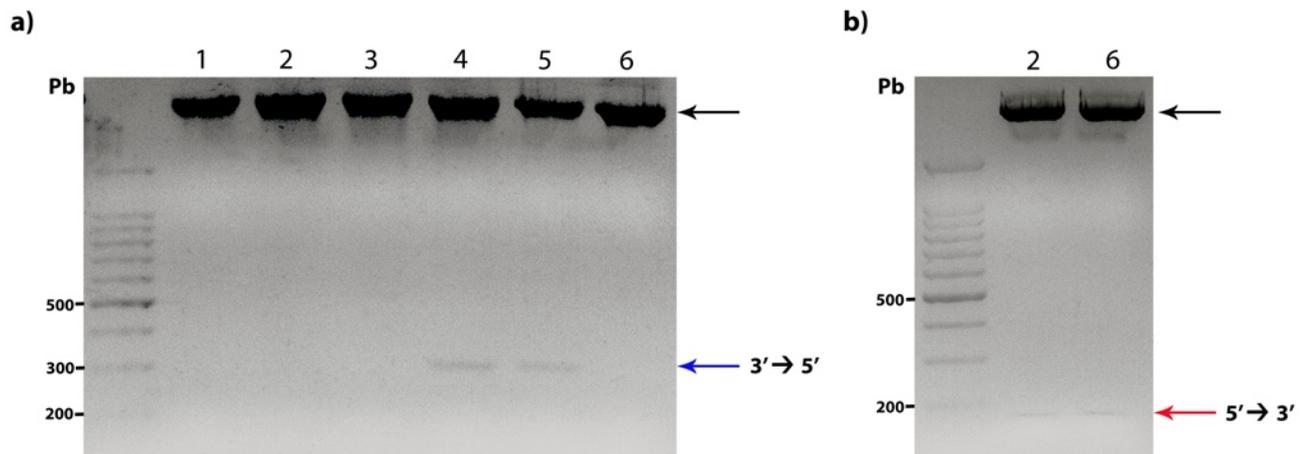


Figura 18. Análisis por digestión con *Bam*HI de la construcción YepKDGal+*KLYPD1^{H67A}*. a) Electroforesis en gel de agarosa al 1% con la digestión de las mismas 6 minipreparaciones de plásmidos de la Figura 17 (carriles 1-6) con la enzima de restricción *Bam*HI. La flecha negra indica el plásmido lineal YepKDGal de ≈ 7 Kb, la flecha azul muestra en los carriles 4 y 5 la banda de ≈ 308 pb comprobando que esas clonas contienen el inserto *KLYPD1^{H67A}* en la dirección opuesta a la esperada. En los carriles 1, 2, 3 y 6 no pudo definirse la banda. b) Electroforesis en gel de agarosa al 2% con la digestión de la construcción mutante purificada por minipreps de las clonas 2 y 6 con la enzima de restricción *Bam*HI. La flecha negra indica el plásmido lineal YepKDGal de ≈ 7 Kb, la flecha roja muestra la banda de ≈ 156 pb, confirmando que esas clonas contienen el inserto mutante en la dirección correcta, 5' \rightarrow 3'.

8.3.2. Ensayos de dilución seriada

Para comparar los fenotipos de la proteína Klypd1p silvestre y mutante no fosforilable, se transformó la cepa Δ Klypd1-FOA con las construcciones YepkDGal+KLYPD1^{wt} y YepkDGal+KLYPD1^{H67A} y se hizo un ensayo de dilución seriada, sembrando en YPGal con diferentes concentraciones de tunicamicina (fig. 19).

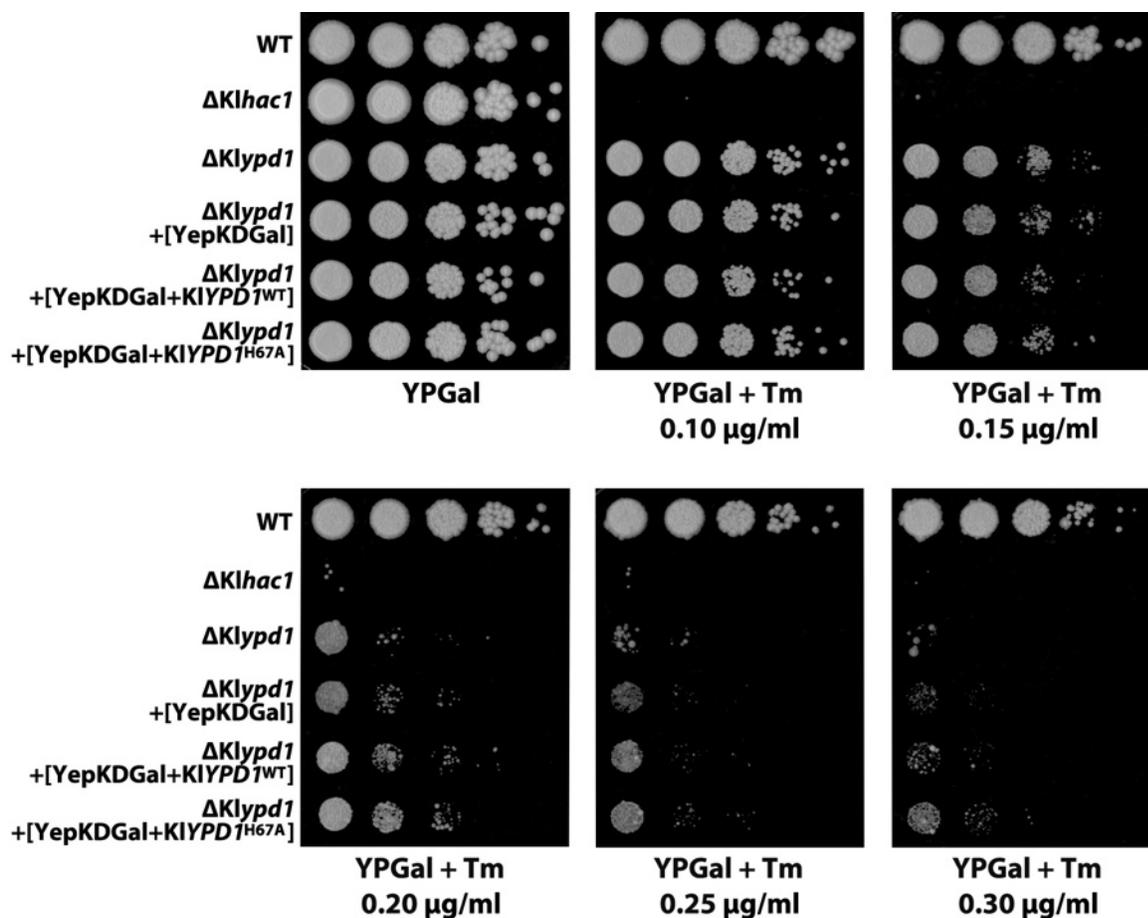


Figura 19. Fenotipos de la cepa Δ Klypd1 con las construcciones YepKDGal+KLYPD1^{wt} y YepKDGal+KLYPD1^{H67A}. Diluciones seriadas de cepas con fondo genético MD 2/1 en medio YPGal con tunicamicina (Tm). Se utilizó la cepa Δ Klypd1-FOA sin transformar (tercera posición) y se probaron las transformantes con la construcción silvestre YepkDGal+KLYPD1^{wt} (quinta posición) y la construcción con la mutante puntual no fosforilable YepkDGal+KLYPD1^{H67A} (sexta posición). Se crecieron cultivos de cada cepa en medio mínimo SRAF-URA líquido a 30°C y 250 rpm durante una noche, se ajustó la D.O. en 600 nm a 0.2 y se indujo con galactosa al 2% por \approx 5 horas, después del tiempo de inducción se ajustó la densidad óptica en 600 nm a 0.4, después se hicieron diluciones seriadas (sin diluir, 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10 000) y se sembraron gotas de 3 μ l en una caja de Petri con los distintos medios, se incubaron a 30°C por \approx 8 días y se fotografiaron.

En este ensayo también se observó que la cepa $\Delta Klhac1$ es muy sensible desde la concentración más baja de tunicamicina (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y que el resto de las cepas crecen ligeramente menos que la silvestre pero de manera similar hasta 15 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tm. A partir de 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tm se pueden distinguir las diferencias en los fenotipos; las transformantes en las que se sobreexpresa Klypd1p en cualquiera de sus formas (silvestre o mutante), crecen más que la cepa $\Delta Klypd1$ y que la transformante con el plásmido vacío.

A partir de 0.20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Tm, se comienza a distinguir que la transformante YepKDGal +KLYPD1^{H67A} crece ligeramente más que la transformante con Klypd1 silvestre, pero la diferencia es más notoria en la concentración más alta (0.30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) donde se observa que la mutante puntual logra crecer en la primera gota mientras que la transformante silvestre no. Ésto sugiere que no es necesaria la fosforilación de Klypd1 para contender con el estrés de RE y que incluso si no se encuentra fosforilada, puede efectuar una mejor respuesta.

9. Discusión

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* cuenta con cinco vías de señalización controladas por MAPK: respuesta a feromonas, crecimiento filamentoso, integridad de la pared celular, esporulación y respuesta a estrés osmótico. Cada vía está determinada por una estructura de proteínas río arriba de la cascada de MAPK (Chen y Thorner, 2007). Además de su función principal, estas vías tienen la capacidad de responder a muchos tipos de señales, por lo que dependiendo del estímulo al que se encuentre sujeta la célula, se forman diferentes complejos proteicos en los cuales algunos componentes de las distintas vías se comparten para formular una respuesta específica.

La vía de respuesta a estrés osmótico controlada por la MAPK Hog1p no es la excepción, ya que tanto en *S. cerevisiae* como en otras especies de hongos, además de su ya conocida función durante el estrés hiperosmótico, se ha descrito que la MAPK o los componentes río arriba participan en estrés por frío (Hayashi y Maeda, 2006), choque térmico (Winkler *et al.*, 2002), tolerancia al arsénico (Thorsen *et al.*, 2006), estrés oxidativo (Dios *et al.*, 2010) hipoxia (Hickman *et al.*, 2011), absorción de hierro (Kaba *et al.*, 2013), resistencia al ácido acético (Mollapour *et al.*, 2009) y al ácido cítrico (Lawrence *et al.*, 2004), privación de glucosa y señalización de lípidos en Golgi (Piao *et al.*, 2012), mitofagia (Mao *et al.*, 2011), estrés de pared celular (Bermejo *et al.*, 2008), pH bajo (Motizuki *et al.*, 2008), fusión de la pared celular (Nelson *et al.*, 2004), inhibición de la síntesis de esfingolípidos (Tanigawa *et al.*, 2012) y en respuesta a proteínas mal plegadas (Bicknell *et al.*, 2010; Torres-Quiroz *et al.*, 2010; Eraso *et al.*, 2011).

Para la mayoría de estos tipos de estrés no osmótico, no se conoce cómo se activa Hog1p y regularmente participa sólo una de las ramas de la vía, ya sea la de Sln1 o la de Sho1, pero no ambas (Saito y Posas, 2012). En el caso de estrés provocado por proteínas mal plegadas, se ha reportado que la rama del fosforrelevo de Sln1 es la que participa en *S. cerevisiae* (Bicknell *et al.*, 2010; Torres-Quiroz *et al.*, 2010; Eraso *et al.*, 2011; Cruz-Martínez, 2012).

En la levadura *Kluyveromyces lactis* están presentes todas las proteínas ortólogas de *S. cerevisiae* que conforman la rama de Sln1; Sln1p, Ypd1p, Ssk1p, Ssk2p, Pbs2p y Hog1p. La única ausente es la MAPKKK Sk22p que es redundante con Ssk2p en *S. cerevisiae*. Además se ha observado que la rama de Sln1 de *K. lactis* también funciona de manera similar, regulando negativamente a la vía de HOG a través del fosforrelevo; en ausencia de estrés la histidín cinasa (HK) Sln1p se autofosforila y se transfiere el grupo fosfato a su propio dominio receptor, después el grupo fosfato se transfiere a la proteína de transferencia que contiene histidina (HPt) Ypd1p y ésta transfiere el grupo fosfato a la proteína reguladora de respuesta (RR) Ssk1p, manteniéndola en un estado inactivo. Cuando se presenta estrés hiperosmótico, Sln1p se defosforila ocasionando la acumulación de Ssk1p defosforilado, que activa al módulo de MAPK hasta llegar a la fosforilación de Hog1p y la subsecuente respuesta celular (Kawasaki *et al.*, 2008; Trejo-Medécigo, 2011; Domínguez-Martín, 2012).

Partiendo de esto, se probaron cepas de *K. lactis* con mutaciones nulas de la rama de Sln1; $\Delta Klsln1$, $\Delta KlYpd1$, $\Delta KlSsk1$ y $\Delta KlSsk2$ en medio con sal (KCl) para inducir estrés osmótico y en medios con 2-desoxi-D-glucosa (2-DOG), β -mercaptoetanol (β -ME), ditiotreitól (DTT) y

tunicamicina (Tm) para inducir estrés de retículo endoplásmico (fig. 10). Los resultados obtenidos demostraron que en KCl 1M todas las cepas, incluida la silvestre, crecen de manera similar y sólo ligeramente menos que en YPD.

A pesar de tener trunca la rama de Sln1, las mutantes no son sensibles en sal. De hecho, a pesar de que las dos ramas alimentan al módulo de MAPK de la vía de HOG, en *S. cerevisiae* se ha demostrado que en concentraciones moderadas de KCl (0.125 ó 0.25 M) no son redundantes; en estas condiciones la rama funcional es la de Sln1-Ssk1 y no la de Sho1-Ste11. Sin embargo en concentraciones altas de KCl (de 0.5 a 1.4 M) tanto la rama de Sln1-Ssk1 como la de Sho1-Ste11 inducen la expresión de genes de respuesta a estrés hiperosmótico y genes de respuesta general a estrés (O'Rourke y Herskowitz, 2004). Esto puede ser una explicación de porqué en *K. lactis* no se observan diferencias en los fenotipos de la cepa silvestre y las cepas mutantes, ya que en ambos casos la rama principal por la cual se está conteniendo con el estrés hiperosmótico es la de Sho1 y es suficiente para lograr una respuesta efectiva (fig. 10).

Cuando se crecieron las mismas mutantes con los diferentes agentes inductores de estrés de retículo endoplásmico se observó que las mutantes nulas de la rama de Sln1 tienen distintos fenotipos. En 2-DOG, DTT y β -ME el crecimiento de las cepas fue muy semejante a la silvestre y no se observaron diferencias entre ellas. Por otro lado, en tunicamicina [0.10 y 0.15 μ g/ml] solamente las cepas Δ KlSln1 y Δ KlSsk2 crecieron igual a la silvestre, no obstante, sí se observan diferencias en el crecimiento de Δ KlYpd1 y Δ KlSsk1. Sin embargo, los fenotipos son opuestos, ya que mientras que la cepa Δ KlYpd1 resultó ser la más sensible al tratamiento, la cepa Δ KlSsk1 resultó ser resistente (fig. 10). Esta última observación contrasta con lo observado en *S. cerevisiae* en donde una mutante Δ sSk1 es sensible a tunicamicina (0.25 μ g/ml, fig. 7) (Torres-Quiroz *et al.*, 2010).

La discrepancia en los fenotipos de las mutantes Δ sSk1, indica que en *K. lactis* la respuesta a estrés de RE inducido por tunicamicina es distinta a como sucede en *S. cerevisiae* y el hecho de que la capacidad de crecimiento es diferente dependiendo del miembro del sistema de fosforrelevo que se elimine (Sln1-Ypd1-Ssk1) sugiere que, al menos en tunicamicina, la transferencia de fosfatos o el mecanismo de función es diferente a lo que sucede en estrés hiperosmótico.

Con todos los agentes inductores de estrés de RE probados, la cepa Δ Klhac1, utilizada como control negativo, tuvo un fenotipo de alta sensibilidad y se corroboró que en sal (KCl) no tuvo fenotipo. A pesar de ser la cepa más sensible a estrés de RE, se puede distinguir que en DTT [10 mM] y β -Me [12.5 mM] el crecimiento fue ligeramente mayor que en 2-DOG y Tm, llegando incluso a la segunda gota. También se observa que en tunicamicina [0.10 y 0.15 μ g/ml] la delección de HAC1 es letal (fig. 10).

Δ Klhac1 resulta un control negativo excelente, ya que si no se encuentra el transcrito de HAC1, no puede ser procesado por Ire1p y por lo tanto no puede madurar y traducirse en el factor de transcripción que se unirá a secuencias UPRE para activar a los genes blanco de la UPR, impidiendo por completo la respuesta a nivel transcripcional que permite contender con las proteínas mal plegadas (Ron y Walter, 2007).

A pesar de que todos los agentes utilizados son inductores de estrés de retículo endoplásmico, su modo de acción es distinto, dando como resultado las diferencias en los fenotipos observadas en $\Delta Klhac1$ y en las cepas mutantes de la vía de Sln1 (fig. 10). El DTT y β -Me evitan que las proteínas adquieran su conformación terciaria y cuaternaria, al reducir los puentes disulfuro entre las cisteínas. Sin embargo, a pHs cercanos a 7, como sucede en el medio YPD (pH 6.5 ± 0.2) (Zimbro *et al.*, 2009), son menos reactivos, reduciendo de manera lenta y no por completo a los puentes disulfuro (Singh *et al.*, 1995). Como consecuencia, podría resultar que hay una cantidad baja de proteínas mal plegadas que tal vez no sea suficiente para generar una respuesta, es decir, que no se alcancen los niveles para el estrés de RE. Esta observación concuerda, además, con el crecimiento de $\Delta Klhac1$ que no se mostró tan sensible como en el resto de los agentes.

La 2-desoxi-D-glucosa es un análogo de la glucosa que inhibe competitivamente la incorporación de D-manosa y D-glucosa al oligosacárido central de la N-glicosilación, lo que resulta en una glicosilación baja de proteínas. Sin embargo esta inhibición puede ser reversible y la 2-DOG tiene como efecto lateral la reducción de los niveles de ATP al inhibir la glucólisis, ocasionando alteraciones generales en el metabolismo de la célula (Back *et al.*, 2005).

En el medio con tunicamicina fue donde se observó mayor sensibilidad de las cepas así como diferencias en crecimiento entre ellas. Esto puede deberse a: 1) la Tm resulta más específica y eficaz para inducir estrés de RE ó 2) la rama de Sln1 está respondiendo a algún efecto colateral de la Tm.

La tunicamicina es una toxina que actúa inhibiendo a la N-acetilglucosamina-1-P-transferasa, enzima que cataliza la adición de la N-acetilglucosamina al dolicol fosfato en el primer paso de la vía del dolicol en la N-glicosilación (Barnes *et al.*, 1984). Es muy eficaz debido a que diferentes porciones de la toxina asemejan tanto la N-acetilglucosamina como al dolicol, impidiendo por completo y de manera irreversible la N-glicosilación de proteínas.

La mayoría de proteínas que se maduran en el RE son transmembranales y de secreción y necesitan estar N-glicosiladas, al no suceder esto no pueden plegarse correctamente ni dirigirse a sus blancos y se acumulan en forma de proteínas mal plegadas en el lumen del RE. Es por este efecto que la tunicamicina se prefiere sobre los otros agentes y se utiliza ampliamente en investigación como agente causante de estrés de RE y UPR (Back *et al.*, 2005).

Sin embargo no puede dejarse de lado que la célula puede tener alteraciones fisiológicas por la falta o el mal funcionamiento de estas proteínas, como cambios en la estructura y funcionamiento de la pared celular así como modificaciones en la vía secretora.

La alta sensibilidad de la mutante $\Delta Klypd1$ y el fenotipo de resistencia de la $\Delta Klssk1$ indican que estas proteínas son necesarias o al menos están involucradas en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina y que por lo tanto, al igual que en *S. cerevisiae*, en *K. lactis* se requiere de componentes de la rama de Sln1.

En *S. cerevisiae* una mutante $\Delta ypd1$, así como una $\Delta sln1$, es letal debido a la sobreactivación de la cascada de MAPK de la vía de HOG, ocasionada por la acumulación permanente de Ssk1 no

fosforilado (Posas *et al.*, 1996). Es por esto que en los reportes que se han hecho de la participación de la rama de Sln1 en estrés de retículo endoplásmico no se hace mención de la participación de Ypd1p.

A pesar de que el fosforrelevo de la rama de Sln1 de *K. lactis* funciona de la misma manera en estrés hiperosmótico que el de *S. cerevisiae*, las mutantes nulas de K Δ SLN1 y K Δ YPD1 no son letales. En experimentos hechos en nuestro grupo de trabajo se ha demostrado que en las mutantes Δ Klypd1 y Δ Klsln1, Hog1p no se encuentra fosforilado en condiciones iso-osmóticas (M. Rodríguez, comunicación personal, 2 de mayo de 2013); esta peculiaridad podría explicar la falta de letalidad.

Considerando todo lo anterior, nos resultó interesante que en *K. lactis* la ausencia de la proteína intermediaria del fosforrelevo KLYpd1p resultara en el fenotipo de más sensibilidad a tunicamicina, por consiguiente se decidió investigar si la complementación con el gen silvestre de YPD1 era capaz de restablecer el fenotipo.

Al transformar a la cepa Δ Klypd1 con la construcción YepKDGal+KLYPD1^{wt} se distingue en concentraciones bajas de tunicamicina [0.10 y 0.15 μ g/ml] que la mutante complementada crece de manera semejante a la cepa Δ Klypd1 (fig. 14), aún así, ambas cepas siguen teniendo un crecimiento menor a la silvestre. Es en concentraciones altas de tunicamicina [0.20 y 0.25 μ g/ml] donde se marca la diferencia en los fenotipos de la cepa complementada con el gen silvestre de YPD1 (Δ Klypd1+[YepKDGal+KLYPD1^{wt}]) y la mutante nula Δ Klypd1. Aquí se puede observar que la cepa que contiene al gen de YPD1 crece más que la que no lo tiene. Cabe destacar que incluso en 0.25 μ g/ml de tunicamicina es la única cepa que crece. Si bien el crecimiento no es igual a la silvestre, la presencia de la proteína Ypd1p hace que la mutante pueda rescatar de manera parcial el fenotipo de sensibilidad (fig. 14).

En este segundo ensayo de dilución seriada por goteo las cepas tienen un crecimiento mayor que en el primero (fig. 10); ésto se debe a que se dejaron incubando por más tiempo [5 días] que en el primero [48 hrs] porque observamos en repetidas ocasiones que las células tardan más tiempo en crecer, ya que adicionalmente al estrés de la tunicamicina, se encuentran en medio YPGal en donde la única fuente de carbono es la galactosa con el fin de inducir la expresión del plásmido YepkDGal y este azúcar es más difícil de metabolizar para *K. lactis* que la glucosa.

Las proteínas con un dominio de fosfotransferencia que contiene histidina (HPt) como Ypd1p, funcionan fosforilando a un aspartato en el dominio receptor (REC) de una proteína reguladora de respuesta (Fassler y West, 2013). En el caso de la cepa Δ Klypd1 complementada con el gen silvestre de YPD1, sabemos que se está traduciendo en la proteína Ypd1p y que ésta ayuda parcialmente a la célula a contender con la tunicamicina, sin embargo desconocemos el estado de fosforilación de la proteína y si esto juega un papel determinante en la respuesta al estrés.

Es por eso que se decidió expresar una proteína Ypd1p que no pudiera fosforilarse mediante una mutación puntual en el gen de YPD1, donde se sustituyen dos bases del codón que codifica para el residuo de histidina fosforilable para que pueda traducirse en un residuo de alanina (fig. 15), un aminoácido poco reactivo que no puede fosforilarse. Si la nueva construcción resultaba en

un fenotipo de sensibilidad igual al de $\Delta Klypd1$, significaría que la proteína defosforilada es incapaz de complementar a la mutante nula. Si en cambio el crecimiento fuese igual al de la construcción con el gen silvestre, nos estaría diciendo que el estado de fosforilación es dispensable y basta con la presencia de la proteína en la célula para aliviar el estrés por tunicamicina.

Al probar en tunicamicina a la cepa $\Delta Klypd1$ con la construcción YepKDGal+YPD1^{H67A}, que contiene la mutación puntual, el resultado fue un tanto distinto a lo esperado; se observó en las concentraciones más altas de tunicamicina [0.20, 0.25 y 0.30 $\mu\text{g/ml}$] que la cepa complementada con el gen mutante crece ligeramente más, la diferencia es más notoria en 0.30 $\mu\text{g/ml}$ de tunicamicina, en donde la mutante no fosforilable alcanza a llenar la primera gota mientras que la mutante con la construcción silvestre no (fig. 19).

Estos resultados nos dicen que para contender contra la tunicamicina, *Kluyveromyces lactis* requiere de la presencia de la proteína Ypd1p y que no necesita estar fosforilada para efectuar la respuesta, incluso es ligeramente mejor cuando se encuentra constitutivamente defosforilada.

Sería lógico pensar que en este caso la acción de Ypd1p es regular directamente a la proteína RR Ssk1p, ya que una cepa $\Delta Klssk1$ crece más que la cepa silvestre en tunicamicina (fig. 10) esto puede deberse a tres escenarios; 1) a la interrupción de la interacción con Ssk2p que tiene como consecuencia la pérdida de la señalización Ssk1-Hog1, 2) a la falta de interacción de Ssk1 con una proteína distinta río arriba o río abajo, o bien 3) que al no estar presente Ssk1p se favorezca la interacción de Ypd1p con otra proteína que ayude a la célula durante el estrés de RE.

Se observó que una mutante $\Delta Klssk2$ tiene un crecimiento igual a la silvestre en tunicamicina (fig. 10) y no crece más, como se esperaría si la vía de HOG estuviera regulando de manera negativa la respuesta a tunicamicina; por consiguiente, esta primera opción se descarta, favoreciendo la alternativa en donde el fenotipo de $\Delta Klssk1$, y por consiguiente de $\Delta Klypd1$, es independiente de la señalización por medio de la vía de HOG.

Una cepa $\Delta ypd1$ es equivalente a tener una acumulación de Ssk1p no fosforilado (Posas *et al.*, 1996) y es en este estado defosforilado cuando la proteína se encuentra activa fisiológicamente tanto en *S. cerevisiae* como en *K. lactis* (Posas y Saito, 1998; Trejo-Medécigo, 2011). En el caso de que Ssk1p estuviera interaccionando con componentes que regulen negativamente la respuesta a tunicamicina, como proteínas involucradas en vías de muerte celular, mecanismo que se sabe que ocurre cuando se induce estrés de RE de manera prolongada (Urra *et al.*, 2013) la cepa $\Delta Klypd1$ no tendría por que ser sensible y no existirían diferencias en los fenotipos de esta mutante con la que no puede fosforilarse ($\Delta Klypd1+$ [YepKDGal+YPD1^{H67A}]), de manera que esta opción también resulta poco probable.

Ypd1p de *S. cerevisiae* interacciona con tres dominios reguladores de respuesta distintos; SLN1-R1, SSK1-R2 y SKN7-R3. Se ha reportado que la afinidad por SLN1-R1 y SKN7-R3 es similar, pero la interacción con SSK1-R2 es tres veces más fuerte (Xu *et al.*, 2003). También se ha detectado un complejo muy estable entre Ypd1p y Ssk1p que es dependiente de su fosforilación, presuntamente para mantener a Ssk1 fosforilado en condiciones iso-osmóticas, cuando el

fosforrelevo se encuentra encendido (Janiak-Spens *et al.*, 2000). Estos hechos concuerdan con la idea de que en ausencia de Ssk1 la interacción de Ypd1 se ve favorecida hacia otro posible regulador de respuesta.

También explicaría el porqué la mutante no fosforilable crece ligeramente más que la complementada con el gen silvestre; si Ypd1p no tiene la capacidad de fosforilarse, Ssk1p no se fosforila y por lo tanto no puede formarse el complejo entre estas proteínas, dejando a la totalidad de Ypd1p libre para unirse a su posible blanco alternativo.

Estas inferencias nos llevan a elegir la opción en donde la acción de Ypd1p es independiente del fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1 y contiene con el estrés de RE inducido por tunicamicina mediante otra proteína reguladora de respuesta, probablemente Skn7p. Además, en el laboratorio se ha observado que una mutante $\Delta skn7$ para *S. cerevisiae* es sensible a tunicamicina (A. Olivares, comunicación personal, 4 de octubre de 2013).

En *S. cerevisiae*, Ypd1p regula río abajo a dos proteínas RR; Ssk1 y Skn7, en el citoplasma y núcleo respectivamente (Li *et al.*, 1998). Otras levaduras como *Candida albicans* (Calera *et al.*, 2000) y *Schizosaccharomyces pombe* (Tan *et al.*, 2007), así como los hongos filamentosos *Cochliobolus heterostrophus* (Izumitsu *et al.*, 2007), *Aspergillus nidulans* (Vargas-Pérez *et al.*, 2007), *Neurospora crassa* (Banno *et al.*, 2007) y *Cryptococcus neoformans* (Lee *et al.*, 2011) tienen genes ortólogos a *YPD1*, *SSK1* y *SKN7*. Cuentan con un sistema de fosforrelevo similar al de *S. cerevisiae*, en donde una proteína homóloga a Ypd1p regula de manera negativa o positiva a estas dos proteínas RR en respuesta a una amplia gama de tipos de estrés.

En *K. lactis* se tiene información de Ssk1p como blanco de Ypd1p, pero no se han realizado estudios con Skn7p. La secuencia de KlSkn7p comparte un 52% de identidad y un 67% de similitud con la secuencia de ScSkn7p y al analizarla con la herramienta para la búsqueda de dominios ScanProsite del sitio PROSITE (<http://prosite.expasy.org>), predice un dominio REC con un posible sitio fosfoceptor en un residuo de aspartato, así como un dominio de unión a DNA (fig. 20), lo que apoya fuertemente que *K. lactis* no es la excepción y también cuenta con Skn7p como proteína reguladora de respuesta.

Con la hipótesis planteada, en donde se propone que Ypd1p está actuando a través de Skn7p en *K. lactis* para contender con estrés de RE inducido por tunicamicina surge la pregunta ¿cómo lo hace si no puede fosforilarla?

Skn7p es una proteína RR residente del núcleo, que funciona como factor transcripcional en respuesta a diversos tipos de estrés, principalmente oxidativo y de pared celular (Fassler y West, 2011). En *S. cerevisiae* se ha reportado que durante el estrés de pared celular es necesaria la fosforilación del aspartato de su dominio REC, pero no es requerida para estrés oxidativo (Morgan *et al.*, 1997); en *S. pombe* también se ha reportado que la forma no fosforilable del ortólogo de Skn7p (Prr1) es activa, promoviendo constitutivamente el desarrollo sexual a través de la expresión de genes esenciales para meiosis (Nakamichi *et al.*, 2003). Por lo tanto, a pesar de ser una proteína con un dominio REC, puede efectuar una respuesta aún sin que el residuo de aspartato se encuentre fosforilado. Esta estrategia también es común en sistemas de dos componentes de bacterias (Latasa *et al.*, 2012).

En *S. cerevisiae* se ha reportado que la traslocación de Ypd1p al núcleo es independiente de su estado de fosforilación y tampoco es dependiente de estrés celular, ya que la localización fue la misma tanto en condiciones normales como en estrés osmótico, choque térmico y estrés oxidativo (Lu *et al.*, 2003).

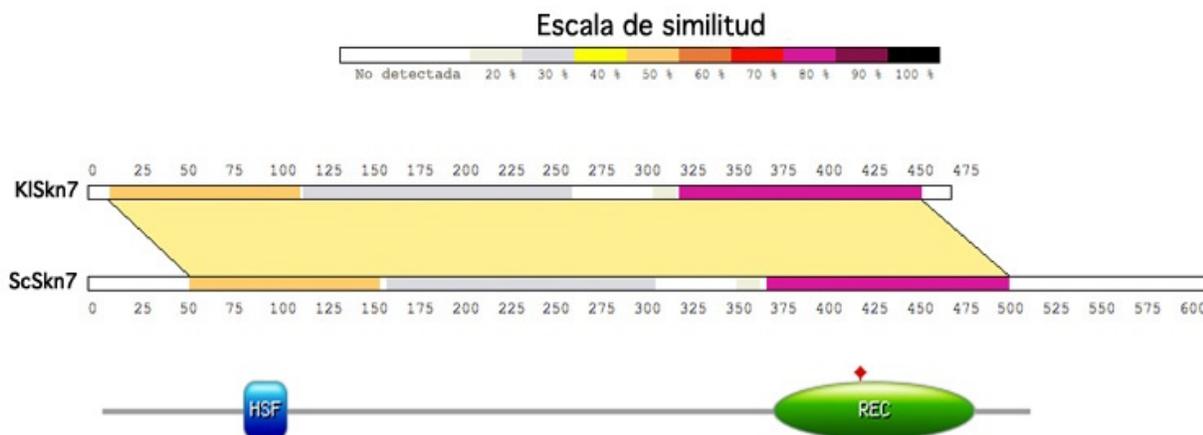


Figura 20. Similitud en las secuencias de aminoácidos de la proteína Skn7p de *K. lactis* y *S. cerevisiae*. Esta representación gráfica se hizo con el programa LaInview utilizando alineamientos de aminoácidos realizados con el programa SIM del servidor ExPASy Proteomic Server (<http://web.expasy.org/sim/>) con la matriz BLOSUM62. En la parte superior se indica la escala de similitud por colores, en la parte inferior se señalan la posición aproximada de los dominios encontrados con ScanProsite del sitio PROSITE (<http://prosite.expasy.org>), HSF: Heat Shock Factor type DNA-binding domain, REC: Response Regulatory Domain, en rojo se muestra el aspartato fosforilable. La secuencia de aminoácidos de Skn7 para *K. lactis* (KLLA0A10219g) y para *S. cerevisiae* (SACE0H06116g) se obtuvo de la base de datos Génolevures (<http://genolevures.org>).

Entonces, en conclusión, una posible explicación a la pregunta planteada anteriormente puede ser que sólo baste con la interacción física entre Ypd1p y Skn7p en el núcleo para que ésta pueda efectuar la respuesta a tunicamicina a nivel transcripcional. Es necesario realizar más experimentos en el futuro para comprobar que efectivamente KlSkn7p está participando en la respuesta a tunicamicina. No podemos dejar de lado que la célula eucarionte es un sistema muy complejo; los resultados obtenidos en esta tesis son sólo una pequeña parte del proceso, deben de existir otros pasos de regulación, así como otras proteínas involucradas cuando la célula se encuentra bajo estrés de retículo endoplásmico.

10. Conclusiones

- La mutante $\Delta Klypd1$ es sensible a estrés de RE inducido por tunicamicina.
- La acción de Ypd1p en estrés de RE es independiente del fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1.
- El fosforrelevo actúa de manera distinta en estrés de RE y en estrés osmótico.
- De los agentes inductores de estrés de RE probados, la tunicamicina fue la que provocó un fenotipo de mayor sensibilidad.
- La sobreexpresión de Ypd1p silvestre permite recuperar parcialmente el fenotipo en tunicamicina.
- Ypd1p no requiere estar fosforilada para contender con el estrés de RE.

11. Referencias

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. Nueva York: Garland Science.
- Alberts, B., Bray, D., Hopkin, K., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Walter, P. (2006). *Introducción a la biología celular*. Buenos Aires: Médica Panamericana.
- Austriaco, N. (2012). Endoplasmic reticulum involvement in yeast cell death. *Frontiers in oncology*, 2(87), 1-6. doi: 10.3389/fonc.2012.00087
- Azuma, N., Kanamaru, K., Matsushika, A., Yamashino, T., Mizuno, T., Kato, M. y Kobayashi, T. (2007). Analysis of His-Asp phosphorelays in *Aspergillus nidulans*: the first direct biochemical evidence for the existence of His-Asp phosphotransfer systems in filamentous fungi. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 71(10), 2493–2502. doi:10.1271/bbb.70292
- Babour, A., Bicknell, A. a, Tourtellotte, J., y Niwa, M. (2010). A Surveillance Pathway Monitors the Fitness of the Endoplasmic Reticulum to Control Its Inheritance. *Cell*, 142(2), 256–269. doi:10.1016/j.cell.2010.06.006
- Back, S. H., Schröder, M., Lee, K., Zhang, K., y Kaufman, R. J. (2005). ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1. *Methods*, 35(4), 395–416. doi:10.1016/j.ymeth.2005.03.001
- Barnes, G., Hansen, Hansen, W.J., Holocomb, C. L. y Rine, J. (1984). Asparagine-linked glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae*: Genetic Analysis of an Early Step. *Molecular and Cellular Biology*, 4(11), 2381-2388.
- Bicknell, A. A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010) Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *J Biol Chem*, 285, 17545–17555.
- Bolotin-Fukuhara, M. (2006). Genomics and Biodiversity in Yeasts. En C. A. Rosa & G. Péter (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 45–66). Springer Berlin Heidelberg.
- Bonekamp, F. J. y Oosterom, J. (1994). On the safety of *Kluyveromyces lactis* a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 41, 1–3.
- Banno, S., Noguchi, R., Yamashita, K., Fukumori, F., Kimura, M., Yamaguchi, I., y Fujimura, M. (2007). Roles of putative His-to-Asp signaling modules HPT-1 and RRG-2, on viability and sensitivity to osmotic and oxidative stresses in *Neurospora crassa*. *Current genetics*, 51(3), 197–208. doi:10.1007/s00294-006-0116-8
- Bernejo, C., Garc1, R., Rodri, J. M., Concepcio, D., Posas, F., y Arroyo, J. (2008). The Sequential Activation of the Yeast HOG and SLT2 Pathways Is Required for Cell Survival to Cell Wall Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 19, 1113–1124. doi:10.1091/mbc.E07

- Brown, J., Bussey, H. y Stewart, R.C. (1994). Yeast Skn7 functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *The EMBO Journal*, 13(21), 5186-5194.
- Calera, Â. A., Herman, D., y Calderone, R. (2000). Identification of YPD1, a gene of *Candida albicans* which encodes a two-component phosphohistidine intermediate protein. *Yeast*, 16, 1053-1059.
- Casino, P., Rubio, V., y Marina, A. (2010). The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Current opinion in structural biology*, 20(6), 763-771. doi:10.1016/j.sbi.2010.09.010
- Chen, X. J. 2003. Isolation of Mitochondrial Mutants from the Petite-Negative yeast *Kluyveromyces lactis*. En Wolf, K., K, Breunig y G. Barth (Eds), *Non-Conventional Yeast in Genetics, Biochemistry and Biotechnology* (494 pp) Springer Lab Manual
- Chen, R. E., y Thorner, J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*, 1773(8), 1311-40. doi:10.1016/j.bbamcr.2007.05.003
- Chen, Y., Feldman, D. E., Deng, C., Brown, J. a, De Giacomo, A. F., Gaw, A. F. y Koong, A. C. (2005). Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cancer research*, 3(12), 669-777. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0181
- Cruz-Martínez, U. 2012. *Participación de la proteína de andamiaje PBS2 (MAPKK) en el estrés de retículo endoplásmico inducido por tunicamicina en Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México
- Cyr, D. y Hebert, D. (2009). Protein quality control-linking the unfolded protein response to disease. *EMBO reports*. 10(11), 1206-1210. doi:10.1038/embor.2009.224
- Dios, C.H., Román, E., Monge, R.A. y Pla, J. (2010). The role of MAPK signal transduction pathways in the response to oxidative stress in the fungal pathogen *Candida albicans*: implications in virulence. *Curr Protein Pept Sci*. 11(8): 693-703
- Domínguez-Martín, E. (2012). *Estudio de la fosfotransferencia en la respuesta a estrés osmótico en la levadura Kluyveromyces lactis*. Tesis de Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México
- Eraso, P., Mazón, M. J., Posas, F., y Portillo, F. (2011). Gene expression profiling of yeasts overexpressing wild type or misfolded Pma1 variants reveals activation of the Hog1 MAPK pathway. *Molecular microbiology*, 79(5), 1339-52. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07528.x
- Escamilla-Ayala, A. (2010). *Respuesta a proteínas mal plegadas en la levadura Kluyveromyces lactis*. Tesis de licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México

- Fassler, J. S., y West, A. H. (2011). Fungal Skn7 stress responses and their relationship to virulence. *Eukaryotic cell*, 10(2), 156–67. doi:10.1128/EC.00245-10
- Fassler, J. S., y West, A. H. (2013). Histidine phosphotransfer proteins in fungal two-component signal transduction pathways. *Eukaryotic cell*, 12(8), 1052–60. doi:10.1128/EC.00083-13
- Gardner, B. M. y Walter, P. (2011). Unfolded Proteins Are Ire1-Activating Ligands That directly induce the Unfolded Protein Response. *Science*, 333, 1891-1894. doi: 10.1126/science.1209126
- Gao, R., y Stock, A. M. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annual review of microbiology*, 63, 133–54. doi:10.1146/annurev.micro.091208.073214
- González-Siso, M., Freire-Picos, M., Ramil, E., González-Domínguez, M., Rodríguez Torres A, y Cerdán, M. (2000). Respirofermentative metabolism in *Kluyveromyces lactis*: Insights and perspectives. *Enzyme and microbial technology*, 26(9-10), 699–705.
- Hayashi, M., y Maeda, T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of biochemistry*, 139(4), 797–803. doi:10.1093/jb/mvj089
- Hickman, M. J., Spatt, D., y Winston, F. (2011). The Hog1 mitogen-activated protein kinase mediates a hypoxic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 188(2), 325–38. doi: 10.1534/genetics.111.128322
- Hoch, J. A. (2000). Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current opinion in microbiology*, 3(2), 165–70.
- Hohmann, S., Krantz, M., y Nordlander, B. (2007). Yeast osmoregulation. *Methods in enzymology*, 428(07), 29–45. doi:10.1016/S0076-6879(07)28002-4
- Hollien, J. y Weissman, J. (2006). Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science*, 313, 104-107
- Izumitsu, K., Yoshimi, A., & Tanaka, C. (2007). Two-component response regulators Ssk1p and Skn7p additively regulate high-osmolarity adaptation and fungicide sensitivity in *Cochliobolus heterostrophus*. *Eukaryotic cell*, 6(2), 171–81. doi:10.1128/EC.00326-06
- Janiak-spens, F., Sparling, J. M., West, A. H., Gurfinkel, M., y West, A. H. (1999). Differential Stabilities of Phosphorylated Response Regulator Domains Reflect Functional Roles of the Yeast Osmoregulatory SLN1 and SSK1 Proteins . *Journal of Bacteriology*, 181(2), 411-417
- Janiak-Spens, F., Sparling, D. P., y West, a H. (2000). Novel role for an HPT domain in stabilizing the phosphorylated state of a response regulator domain. *Journal of bacteriology*, 182(23), 6673–8.
- Kawaguchi, S. y Ng, D.T. (2011). Cell Biology. Sensing ER stress. *Science*, 333, 1830-1. doi: 10.1126/science.1212840
- Kawasaki, L., Castañeda-Bueno, M., Sánchez-Paredes, E., Velázquez-Zavala, N., Torres-Quiroz, F., Ongay-Larios, L. y Coria, R. (2008). Protein kinases involved in mating and osmotic

- stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*, 7(1), 78-85. doi:10.1128/EC.00362-07
- Kawasaki, L., Ongay-Larios, L. y Coria, R. (2009). Cascadas de MAP cinasas en apareamiento y estrés en levaduras. En Bustos Jaimes, I., Castañeda Patlán, C. Rendón Huerta, E., Reyes Vivas, H. y Romero Álvarez, I. (Eds) *Mensaje Bioquímico*, Vol. XXXIII (pp 103-116), UNAM.
- Kaba, H. E. J., Nimtz, M., Müller, P. P., y Bilitewski, U. (2013). Involvement of the mitogen activated protein kinase Hog1p in the response of *Candida albicans* to iron availability. *BMC microbiology*, 13, 16. doi:10.1186/1471-2180-13-16
- Latasa, C., García, B., Echeverz, M., Toledo-Arana, A., Valle, J., Campoy, S., García-del Portillo, F., Solano, C y Lasa, I. (2012). Salmonella biofilm development depends on the phosphorylation status of RcsB. *Journal of bacteriology*, 194(14), 3708-22. doi:10.1128/JB.00361-12
- Lawrence, C. L., Botting, C. H., Antrobus, R., y Coote, P. J. (2004). Evidence of a New Role for the High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Yeast: Regulating Adaptation to Citric Acid Stress Evidence of a New Role for the High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Yeast: Regulating Adaptation to Citric Acid Stress. *Molecular and Cellular Biology*, 24, 3307-3323 doi:10.1128/MCB.24.8.3307
- Lee, J.-W., Ko, Y.-J., Kim, S.-Y., y Bahn, Y.-S. (2011). Multiple roles of Ypd1 phosphotransfer protein in viability, stress response, and virulence factor regulation in *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic cell*, 10(7), 998-1002. doi:10.1128/EC.05124-11
- Li, S., Ault, a, Malone, C. L., Raitt, D., Dean, S., Johnston, L. H., Deschenes, R. J. y Fassler, J. S. (1998). The yeast histidine protein kinase, Sln1p, mediates phosphotransfer to two response regulators, Ssk1p and Skn7p. *The EMBO journal*, 17(23), 6952-62. doi:10.1093/emboj/17.23.6952
- Lu, J. M., Deschenes, R. J., y Fassler, J. S. (2003). *Saccharomyces cerevisiae* Histidine Phosphotransferase Ypd1p Shuttles between the Nucleus and Cytoplasm for SLN1-Dependent Phosphorylation of Ssk1p. *Eukaryotic Cell*, 2, 1304-1314 doi:10.1128/EC.2.6.1304
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S. M., y Saito, H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, 369(6477), 242-5. doi:10.1038/369242a0
- Mao, K., Wang, K., Zhao, M., Xu, T., y Klionsky, D. J. (2011). Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology*, 193(4), 755-67. doi:10.1083/jcb.201102092
- Miermont, A., Uhlenendorf, J., McClean, M., y Hersen, P. (2011). The Dynamical Systems Properties of the HOG Signaling Cascade. *Journal of signal transduction*, 2011, 930940. doi:10.1155/2011/930940

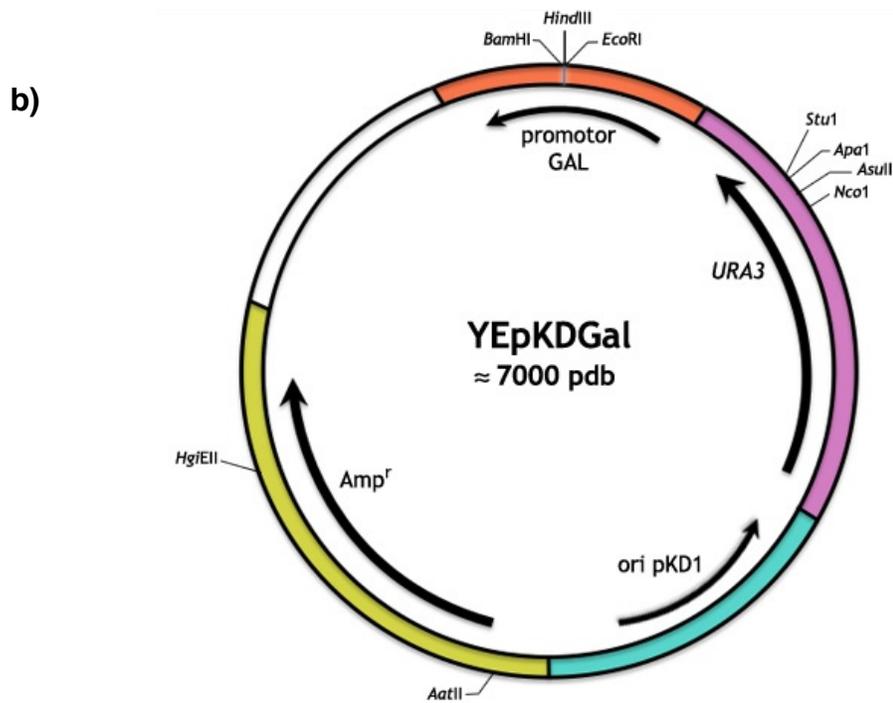
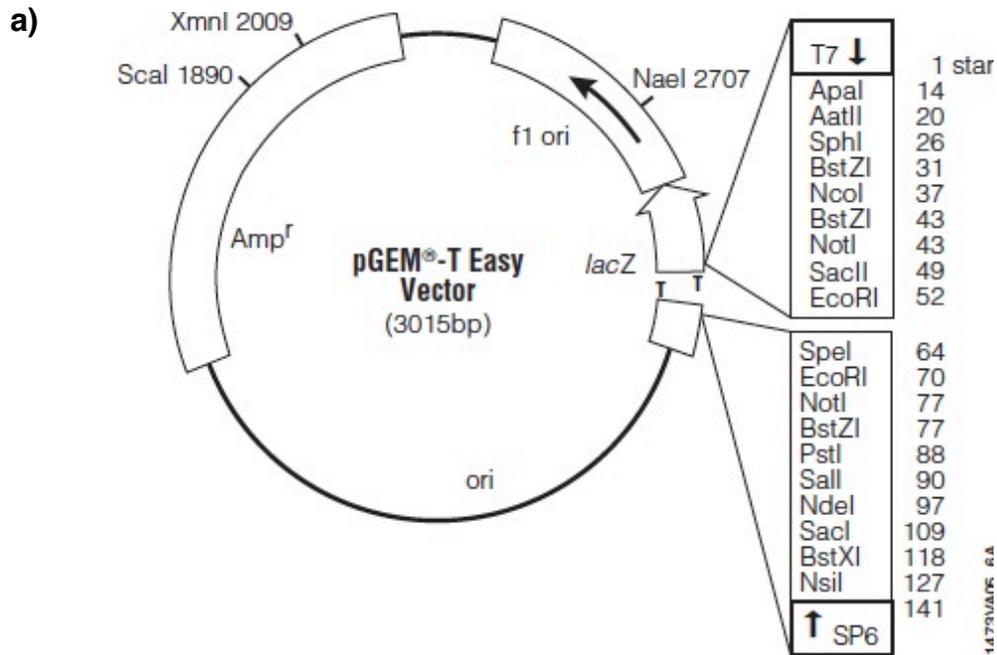
- Mishra, S., y Baranwal, R. (2009). Yeast Genetics and Biotechnological Applications. En T. Satyanarayana y G. Kunze (Eds.), *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* (pp. 323–355). Dordrecht: Springer Netherlands. doi:10.1007/978-1-4020-8292-4
- Mollapour, M., Shepherd, A., y Piper, P. W. (2009). Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slt2(Mpk1)p activation, with acetic acid stress of yeast. *Microbiology*, 155, 3304–11. doi:10.1099/mic.0.030502-0
- Mori, K. (2009). Signalling Pathways in the Unfolded Protein Response: Development from Yeast to Mammals. *J. Biochem.* 146(6); 743–750
- Morgan, B. a, Banks, G. R., Toone, W. M., Raitt, D., Kuge, S., y Johnston, L. H. (1997). The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal*, 16(5), 1035–44. doi:10.1093/emboj/16.5.1035
- Motizuki, M., Yokota, S. y Tsurugi, K. 2008. Effect of low pH on organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1780(2): 179–84.
- Nakamichi, N., Yanada, H., Aiba, H., Aoyama, K., Ohmiya, R., y Mizuno, T. (2003). Characterization of the Prr1 response regulator with special reference to sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 67(3), 547–55.
- Nel, S., Labuschagne, M. y Albertyn, J. (2009). Advances in Gene Expression in Non-Conventional Yeasts. En Satyanarayana, T. y Kunze, G. (Eds.) *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications*. (369–403). Springer Netherlands.
- Nelson, B., Parsons, A. B., Evangelista, M., Schaefer, K., Kennedy, K., Ritchie, S., Petryshen, T. L. y Boone, C. (2004). Fus1p interacts with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis signaling pathways to control cell fusion during yeast mating. *Genetics*, 166(1), 67–77.
- Oikawa, D., Kimata, Y., y Kohno, K. (2007). Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1. *Journal of cell science*, 120(9), 1681–8. doi:10.1242/jcs.002808
- Okamura, K., Kimata, Y., Higashio, H., Tsuru, A, y 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(2), 445–50. doi:10.1006/bbrc.2000.3987
- O'Rourke, S. M., Herskowitz, I. y O'Shea, E. (2002). Yeast fo the whole HOG for the hyperosmotic response. *TRENDS in Genetics*, 18(8), 405–412.

- O'Rourke, S. M., y Herskowitz, I. (2004). Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 15, 532–542. doi:10.1091/mbc.E03
- Ota, I. M., y Varshavsky, A. (1993). A yeast protein similar to bacterial two-component regulator. *Science*, 262, 566–569.
- Patil, C., y 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(3), 349–55.
- Perraud, a L., Weiss, V. y Gross, R. (1999). Signalling pathways in two-component phosphorelay systems. *Trends in microbiology*, 7(3), 115–20.
- pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems Instructions for use of Products. (2010).Promega, Madison, WI.
- Piao, H., MacLean-Freed, J. y Mayinger, P. (2012). Metabolic activation of the HOG MAPK kinase pathway by Snf1/AMPK regulates lipid signaling at the Golgi. *Traffic*, 13(11): 1522-31. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01406.x
- Posas, F., y Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *The EMBO journal*, 17(5), 1385–94. doi:10.1093/emboj/17.5.1385
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S. M., Maeda, T., Witten, E. a, Thai, T. C., y 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(6), 865–75.
- Reiser, V., Raitt, D. C., y Saito, H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of cell biology*, 161(6), 1035–40. doi: 10.1083/jcb.200301099
- Ron, D., y Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(7), 519–29. doi:10.1038/nrm2199
- Saito, H. (2001). Histidine phosphorylation and two-component signaling in eukaryotic cells. *Chemical reviews*, 101(8), 2497–509.
- Saito, H., y Posas, F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), 289–318. doi: 10.1534/genetics.112.140863
- Schaller, G. E., Shiu, S.-H., y Armitage, J. P. (2011). Two-component systems and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Current biology*, 21(9), R320–30. doi:10.1016/j.cub.2011.02.045

- Schuck, S., Prinz, W. a, Thorn, K. S., Voss, C., y Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of cell biology*, 187(4), 525–36. doi:10.1083/jcb.200907074
- Singh, R., Lamoureux, G.V., Lees W.J y Whitesides, G.M. (1995) Reagents for rapid reduction of disulfide bonds. *Methods Enzymol.* 251 (1995) 167–173
- Stock, a M., Robinson, V. L., y Goudreau, P. N. (2000). Two-component signal transduction. *Annual review of biochemistry*, 69, 183–215. doi:10.1146/annurev.biochem.69.1.183
- Tan, H., Janiak-Spens, F., y West, A. H. (2007). Functional characterization of the phosphorelay protein Mpr1p from *Schizosaccharomyces pombe*. *FEMS yeast research*, 7(6), 912–21. doi: 10.1111/j.1567-1364.2007.00260.x
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., y Maeda, T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and cellular biology*, 32(14), 2861–70. doi:10.1128/MCB.06111-11
- Thorsen, M., Di, Y., Ta, C., Ahmadpour, D., Does, C. Van Der, Wagner, A., Johansson, E., Boman, J., Posas, F., Wysocki, R. y Tama, M. J. (2006). The MAPK Hog1p Modulates Fps1p-dependent Arsenite Uptake and Tolerance in Yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 17, 4400–4410. doi:10.1091/mbc.E06
- Torres-Quiroz, F., García-Marqués, S., Coria, R., Randez-Gil, F., y Prieto, J. A. (2010). The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *The Journal of biological chemistry*, 285(26), 20088–96. doi:10.1074/jbc.M109.063578
- Trejo-Medécigo, A. 2011. *Interacción funcional entre las proteínas Ssk1 y Ssk2 del sistema de fosforrelevo de la levadura Kluyveromyces lactis*. Tesis de Maestría, Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F., México
- Urra, H., Dufey, E., Lisbona, F., Rojas-Rivera, D., y Hetz, C. (2013). When ER stress reaches a dead end. *BBA- Molecular Cell Research*. doi:10.1016/j.bbamcr.2013.07.024
- Vargas-Pérez, I., Sánchez, O., Kawasaki, L., Georgellis, D., y Aguirre, J. (2007). Response regulators SrrA and SskA are central components of a phosphorelay system involved in stress signal transduction and asexual sporulation in *Aspergillus nidulans*. *Eukaryotic cell*, 6(9), 1570–83. doi:10.1128/EC.00085-07
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081–6. doi:10.1126/science.1209038
- West, A. H., y Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in biochemical sciences*, 26(6), 369–76.
- Westfall, P. J., Ballon, D. R., y Thorner, J. (2004). When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science*, 306(5701), 1511–2. doi:10.1126/science.1104879

- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C. P., Burkholder, A., Knoche, K., y Ota, I. (2002). Heat Stress Activates the Yeast High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway , and Protein Tyrosine Phosphatases Are Essential under Heat Stress. *Eukaryotic Cell*, 1(2), 163-173. doi:10.1128/EC.1.2.163
- Xu, Q., Porter, S. W., y West, A. H. (2003). The Yeast YPD1/SLN1 Complex: Insights into Molecular Recognition in Two-Component Signaling Systems. *Structure*, 11(12), 1569–1581. doi:10.1016/j.str.2003.10.016
- Zimbardo, M. J., Power, D., Miller, S., Wilson, G. y Johnson, J (Eds). 2009. *Difco & BBL Manual, Manual of Microbiological Culture Media*. 2ª ed. Becton, Dickinson and Company, Estados Unidos de América.
- Zonneveld, B.J. y H. Y. Steensma. 2003. Mating, Sporulation and Tetrad Analysis in *Kluyveromyces lactis*. En Wolf, K., K. Breunig y G. Barth (Eds), *Non-Conventional Yeast in Genetics, Biochemistry and Biotechnology*. 494 pp Springer Lab Manual

12. Apéndice



Apéndice 1. Mapa de los plásmidos usados en este trabajo. a) Mapa del vector de clonación pGEM-T Easy Vector, extraído del manual del fabricante (Promega). b) Esquema del vector de expresión YEpKDGal, se muestra en la región promotora el sitio de clonado múltiple con sitios *EcoRI*, *HindIII* y *BamHI* en dirección 5'-->3'.