



Universidad Nacional Autónoma de México /
Universidad Autónoma de Madrid

Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas /
Doctorado en Biociencias Moleculares

La respuesta al estrés de retículo endoplásmico en *Dictyostelium discoideum*

Eunice Alejandra Domínguez Martín

Ciudad de México, México

Madrid, España

2018



**La respuesta al estrés de retículo endoplásmico en
*Dictyostelium discoideum***

TESIS

Que para optar por el grado de
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Eunice Alejandra Domínguez Martín

DIRECTORES DE TESIS

Dr. Roberto Coria Ortega,
IFC, UNAM. CDMX, México

DR. Ricardo Escalante Hernández
IIB, UAM, Madrid, España

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES



DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

**La respuesta al estrés de retículo endoplásmico en
*Dictyostelium discoideum***

EUNICE ALEJANDRA DOMÍNGUEZ MARTÍN

Licenciada en Investigación Biomédica Básica,
Maestra en Ciencias Bioquímicas
por la Universidad Nacional Autónoma de México

DIRECTORES DE TESIS
DR. ROBERTO CORIA ORTEGA,
IFC, UNAM. CDMX, MÉXICO

DR. RICARDO ESCALANTE HERNÁNDEZ
IIB, UAM, MADRID, ESPAÑA.

Instituto de Fisiología Celular
Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols"
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España



GOBIERNO
DE ESPAÑA

MINISTERIO
DE CIENCIA, INNOVACIÓN
Y UNIVERSIDADES



Dr. Ricardo Escalante Hernández

Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols" de Madrid (CSIC/UAM)

CERTIFICA:

que **Eunice Alejandra Domínguez Martín**, Licenciada en Investigación Biomédica Básica por la Universidad Nacional Autónoma de México ha realizado bajo su dirección el trabajo de investigación titulado: "**La respuesta al estrés de retículo endoplásmico en *Dictyostelium discoideum***".

Dicho trabajo reúne las condiciones requeridas por la legislación vigente, así como la originalidad y calidad científica necesarias para poder ser presentado y defendido con el fin de optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste donde proceda, firmo el presente documento en Madrid a 4 de septiembre de 2018

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Ricardo Escalante Hernández del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, UAM, en Madrid, España; y del Dr. Roberto Coria Ortega en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en la CDMX, México.

La realización de este trabajo recibió la supervisión del comité tutorial, constituido, para el programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas (UNAM), por la Dra. Lourdes Massieu Trigo y por el Dr. Ricardo Escalante; y para el programa del Doctorado en Biociencias Moleculares (UAM) por el Dr. Olivier Vincent.

Eunice Alejandra Domínguez Martín recibió durante el desarrollo de este trabajo el apoyo de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (380127) y contó con el apoyo de Catedra Isaac Costero (Banco Santander), coordinada por la Dra. Carmela Calés.

Se reconoce el apoyo técnico de la Dra. Laura Kawasaki Watanabe y se agradece el apoyo y participación de la Unidad de Biología Molecular y de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en la CDMX, México; así como de los miembros de la Unidad de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, UAM, en Madrid, España. En particular a la Dra. Laura Ongay Larios, la Lic. María Guadalupe Códiz, la Lic. Minerva Mora Cabrera, el M. en C. Gerardo Coello Coutiño, la M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, al Dr. Diego Navarro Vera y al Dr. Luis Carlos Tábara Rodríguez.

Este proyecto se realizó gracias a los apoyos CONACyT: CB-254078; PAPIIT, DAGAPA, UNAM: IN210616. BFU2012-32536 and BFU2015-64440-P Ministerio de Economía, Industria y Competitividad y por FEDER.

El jurado que evaluó esta tesis para el examen de obtención de grado fue el siguiente:

Dra. Rosa Estela Navarro González, IFC, UNAM.

Dra. Susana Castro Obregón, IFC, UNAM.

Dra. Lourdes Massieu Trigo, IFC, UNAM.

Dr. Leandro Sastre Garzón, IIB, UAM.

Dr. Francisco Portillo Pérez, IIB, UAM.

RESUMEN

El retículo endoplásmico (RE) es el compartimento celular en el cual se pliegan y modifican la mayor parte de las proteínas transmembranales y de secreción. Existe un programa adaptativo que permite mantener la homeostasis de este organelo, principalmente mediante la activación de la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), la cual en animales, se constituye por tres rutas de señalización reguladas respectivamente por las proteínas ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), PERK (*Protein Kinase RNA-like ER Kinase*) e IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*). Estas, comunican al núcleo la presencia de alteraciones en el RE y permiten así, que se incremente la capacidad de plegamiento de proteínas en el RE y activan los mecanismos celulares de degradación. Uno de estos es la autofagia, la cual es mediada por la formación de vesículas de doble membrana que entregan material celular al lisosoma.

En este trabajo se definen por primera vez las rutas involucradas en mantener la homeostasis celular en respuesta al estrés de RE en *Dictyostelium discoideum*, una ameba social que se ha utilizado ampliamente para el estudio de la autofagia y de otras rutas de señalización, ya que ha evolucionado un ciclo de vida complejo, durante el cual amebas aisladas se agregan para desarrollar un organismo multicelular capaz de sobrevivir al ayuno.

En este trabajo se encontró que la tunicamicina (TN) genera estrés de RE en *D. discoideum* y desencadena una reprogramación de la expresión génica, la cual permite aumentar la capacidad de plegamiento del RE y aliviar su carga de proteínas. Aproximadamente el 40% de esta respuesta transcripcional depende de IreA, el único ortólogo de IRE1 en *D. discoideum*. Además de esta ruta, se encontró que, para sobrevivir al estrés de RE, las amebas requieren de BzpD, un factor de transcripción transmembranal similar a ATF6.

Los resultados aquí reportados, muestran que en *D. discoideum*, el estrés de RE induce una respuesta autofágica activada por una ruta independiente a la UPR, la cual resulta esencial para que las células puedan contender con este tipo de estrés. Sin embargo, durante el estrés de RE, se requiere de IreA para que exista un correcto ensamblaje de los autofagosomas en el RE. Proponemos que la incapacidad de las células que carecen de IreA para restaurar la homeostasis en el RE causa alteraciones estructurales severas en el RE, que generan un bloqueo en la formación de los autofagosomas.

ABSTRACT

The Unfolded Protein Response (UPR) is an adaptive pathway that restores homeostasis upon endoplasmic reticulum (ER) stress. ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), PERK (*Protein Kinase RNA-like ER Kinase*) and IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*) are three transmembrane ER-resident proteins that in animals, can sense the folding environment at the ER and communicate the presence of ER-stress to the nucleus. This communication path modulates the protein folding capacity of the cell and activates degradative mechanisms, such as autophagy, a process that sequesters cytoplasmic material in double-membrane vesicles that will fuse and deliver its cargo to the lysosome.

In this work, we present the first study on the pathways involved in maintaining cellular homeostasis upon ER-stress in *Dictyostelium discoideum*, a social amoeba which has evolved a complex life cycle that alternates between unicellular and multicellular phases to survive starvation. *D. discoideum* is recognized as a valuable biomedical model organism alternative to yeast, since it conserves traits that are present in animal cells but that were lost in fungi.

Our data suggests that ER-stress response in *D. discoideum* relies in the combined activation of an UPR-dependent gene expression program and in autophagy. We found that tunicamycin (TN) induces effectively ER-stress in *D. discoideum* and that it elicits a transcriptional reprogramming to increase cellular protein folding capacity and to decrease the ER-protein load. IreA is the only *D. discoideum* IRE1 orthologue, it is essential for cell survival upon ER-stress and to attain about 40% of the TN-induced transcriptional changes. Moreover, we found that *D. discoideum* contains an ATF6-like transcription factor, BzpD, which is also required to cope with ER stress.

The response of *D. discoideum* cells to ER stress relies in the combined activation of an UPR-dependent gene expression program and the autophagy pathway. Both processes are independently activated by ER-stress; however, autophagy requires IreA at a later stage for proper autophagosome formation. We propose that unresolved ER stress in cells lacking IreA causes severe structural alterations of the ER, which lead to a late-stage blockade of autophagosome assembly.

ÍNDICE

INDICE DE ABREVIATURAS	19
1.-INTRODUCCIÓN	23
1.1-El retículo endoplásmico (RE) es una red compleja altamente estructurada.....	23
1.2-El RE es un sitio ideal para el plegamiento de proteínas.....	24
1.3-La vía de respuesta al estrés de RE	25
1.3.1-IRE1 es una cinasa y ribonucleasa conservada evolutivamente	27
1.3.2- PERK regula la traducción de proteínas	31
1.3.3-ATF6 es un factor de transcripción que se transporta del RE al Golgi	32
1.4-La autofagia es un proceso complejo de degradación celular	33
1.4.1-El complejo ATG1/ULK1 regula la inducción y nucleación del fagóforo	34
1.4.2-La producción de PI3P se requiere para la nucleación del autofagosoma	36
1.4.3-La elongación del autofagosoma requiere de ATG9 y de dos sistemas de conjugación	36
1.4.4-El material secuestrado por los autofagosomas se degrada en los lisosomas	37
1.4.5-La autofagia y el estrés de RE.....	37
1.5- <i>Dictyostelium discoideum</i> como organismo modelo.....	38
1.5.1- <i>D. discoideum</i> presenta un ciclo de vida complejo	39
1.5.2-La autofagia es esencial para el proceso de desarrollo de <i>D. discoideum</i>	39
1.5.3-El RE de una ameba social	41
2. OBJETIVOS	43
3.-MATERIALES Y MÉTODOS	45
3.1- Cepas	45
3.2- Construcciones y vectores	45
3.3-Anticuerpos utilizados	47
3.4-Metodologías de DNA recombinante	47
3.5-Metodologías para el manejo de <i>D. discoideum</i>	48
3.6- Ensayos de viabilidad mediante goteo de diluciones seriales	50
3.7- Extracción de RNA y secuenciación masiva profunda de RNA	50
3.8- Preparación de células para inmunofluorescencia.....	50
3.9-Microscopía.....	51
3.10- Western blot	51
3.11- Ensayos para evaluar la autofagia.....	52
3.12-Análisis bioinformáticos	52
3.13- Análisis estadísticos	52

4.- RESULTADOS	55
4.1- Inducción de estrés de RE en <i>D. discoideum</i>	55
4.2- Identificación de las proteínas ortólogas de la UPR en <i>D. discoideum</i>	59
4.3- Caracterización de la ruta de IreA	60
4.3.1- IreA es una cinasa/ribonucleasa transmembranal residente del RE	60
4.3.2- IreA es necesaria para contender con el estrés de RE inducido con TN	62
4.3.3- Los dominios de cinasa y de ribonucleasa de IreA	66
4.3.4- La respuesta transcripcional al estrés de RE depende parcialmente de IreA	68
4.4- La autofagia en la respuesta a estrés de RE en <i>Dictyostelium</i>	73
4.4.1- El estrés de RE induce autofagia	73
4.4.2- La autofagia contribuye a la supervivencia ante un tratamiento con TN	75
4.4.3- IreA es dispensable para inducir la autofagia en respuesta al estrés de RE	76
4.5- BzpD en la respuesta al estrés de RE	82
4.5.1- Análisis informático de las secuencias proteicas de BzpC, BzpD y BzpJ	82
4.5.2- BzpD y BzpJ se localizan en el RE	84
4.5.3- BzpD se requiere para contender con el estrés de RE	84
4.5.4- BzpD se procesa en Golgi y se transporta al núcleo ante un tratamiento con TN	88
5.- DISCUSIÓN	93
5.1- La TN induce estrés de RE en <i>D. discoideum</i>	93
5.2- <i>D. discoideum</i> requiere de la ruta de IreA para contender con el estrés de RE	93
5.3- La TN induce cambios transcripcionales que son parcialmente dependientes de IreA	94
5.4- La autofagia en la respuesta a estrés de RE en <i>Dictyostelium</i>	95
5.5- Participación de BzpD en la respuesta a estrés de RE	96
6.- CONCLUSIONES	99
7. REFERENCIAS	101
APÉNDICE I	115
Grupos de términos de ontología génica (GO) enriquecidos en el conjunto de genes cuya expresión cambió ante un tratamiento con tunicamicina en la cepa silvestre (WT)	115
Transcritos cuya expresión aumentó	116
Transcritos cuya expresión disminuyó	119
APÉNDICE II	129
Publicaciones generadas	129

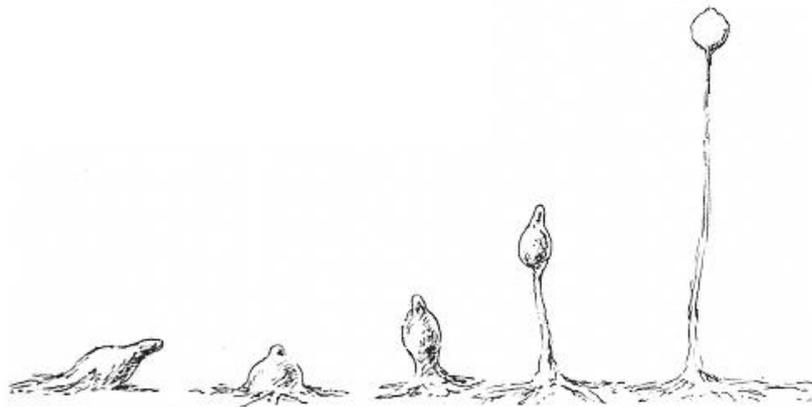
INDICE DE ABREVIATURAS

2-DOG	2-deoxi-D-glucosa
AcbA	Proteína de unión a la acil coenzima A (<i>Acyl-CoA Binding A</i>)
ADP	Adenosina difosfato
AMP	Adenosina monofosfato
AMPK	Cinasa activada por AMP (<i>AMP- activated Protein Kinase</i>)
ATF4	Factor activador de la transcripción 4 (<i>Activating Transcription Factor 4</i>)
ATF6	Factor activador de la transcripción 6 (<i>Activating Transcription Factor 6</i>)
ATG	Proteína relacionada con la autofagia (<i>Autophagy-related protein</i>)
ATP	Adenosina trifosfato
BECN-1	Beclin-1
BLAST	Herramienta básica de búsqueda por alineamientos locales (<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>)
BST	Blassticidina
bZIP	Proteínas tipo zipper básico de leucina
CdcD	<i>similar to Cell Division Cycle mutant</i>
CREB	Factor de transcripción de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (<i>cAMP response element-binding</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTT	Ditiotreitol
eIF2α	Subunidad α del factor de inicio de la traducción 2 (<i>eukaryotic Initiation Factor 2α</i>)
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico (<i>Endoplasmic Reticulum Associated Degradation</i>)
ERGIC	Compartimiento intermedio entre el RE y el Golgi (<i>Endoplasmic Reticulum-Golgi Intermediate Compartment</i>)
FIP200	<i>Focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa</i>
GABARAPs	<i>γ-Aminobutyric acid receptor-associated proteins</i>
GDP	Guanosina difosfato
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GO	Ontología génica
GRP78/BiP	Proteína regulada por glucosa de 78kDa (<i>Glucose regulated protein 78/Binding Protein</i>)
GTP	Guanosina trifosfato
HOPS	<i>Homotypic Fusion and Protein Sorting-tethering</i>
HSP70s	Proteínas de choque térmico (<i>Heat Shock Proteins</i>)
IRE1	<i>Inositol-Requiring Enzyme 1</i>
JNK	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KEN	Dominio nucleasa de extensión a una cinasa (<i>Kinase Extension Nuclease</i>)
LC3	<i>microtubule- associated protein Light Chain 3</i>
LNP	Proteínas Lunapark
MBTPS1	<i>Membrane-Bound Transcription factor Peptidase Site</i>
MCCC1	Subunidad alfa de la 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxilasa
MHC	Complejo Mayor de Histocompatibilidad
MidA	<i>Mitochondrial Dysfunction A</i>
MW	Peso molecular
Ndufaf5	<i>NADH Dehydrogenase [Ubiquinone] 1 alpha subcomplex Assembly Factor 5</i>
OASIS	<i>Old Astrocyte Specifically Induced Substance</i>

ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
OST	Oligosacaril transferasa
PAS	Sitio de ensamblaje del fagóforo (<i>phagophore-assembly site</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDIs	Proteínas Disulfuro Isomerasas
PE	Fosfatidiletanolamina
PERK1	<i>Protein-kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase</i>
PgkA	Fosfoglicerato cinasa
PI3P	Fosfatidil inositol 3-fosfato
PtdIns3K	Fosfatidil inositol 3 cinasa
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RE	Retículo endoplasmático
REDOX	Óxido-reducción
RIDD	Proceso de degradación regulado dependiente de IRE1 (<i>Regulated IRE1-Dependent Decay</i>)
RNAseq	Secuenciación masiva profunda de RNA
RTNs	Reticulones
SDF-2	<i>Spore Differentiation Factor</i>
Sec62	<i>Secretory protein 62</i>
SNARE	'SNAP (Soluble NSF Attachment Protein) Receptor'
T/A	Temperatura ambiente
TN	Tunicamicina
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
Ubq	Ubiquitina
UDP	Uridina difosfato
ULK1	<i>Unc-51-like kinase 1</i>
uORF	Marco abierto de lectura río arriba (<i>upstream Open Reading Frame</i>)
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
Vmp1	<i>Vacuole membrane protein 1</i>
WIPIs	WD-repeat proteins interacting with phosphoinositides protein
WT	Silvestre (<i>Wild Type</i>)
XBP1	X-box Binding Protein

“It isn't the Universe that's following our logic, it's we that are constructed in accordance with the logic of the Universe. And that gives what I might call a definition of intelligent life: something that reflects the basic structure of the Universe.”

— Fred Hoyle, *The Black Cloud*



1.-INTRODUCCIÓN

1.1-El retículo endoplásmico (RE) es una red compleja altamente estructurada

El retículo endoplasmático (RE) es un sistema membranoso continuo, aislado del citoplasma, que ocupa una gran proporción del volumen celular, (**Figura 1**) en el que se llevan a cabo una amplia gama de procesos; dentro de ellos, la síntesis de lípidos y el plegamiento de cerca de un tercio de las proteínas celulares, la mayoría de ellas transmembranales o de secreción [1]. El RE se encuentra estructurado en diferentes dominios, los cuales permiten aislar y llevar a cabo de forma eficiente diferentes funciones. En esta estructura membranosa se pueden distinguir dos zonas principales: la envoltura nuclear, formada por una doble membrana laminar, y una zona periférica (**Figura 1A y 1B**) [2]. Dentro de esta última, existen diferentes dominios, uno de estos, presenta una morfología a la que se conoce como de *lámina* o *cisterna*; sin embargo, este dominio se encuentra formado por matrices de túbulos muy empaçados que presentan muchas uniones [3]. También, existen láminas verdaderas de baja curvatura, las cuales suelen localizarse en zonas cercanas a la membrana plasmática [4]–[6]. La función de los dominios de cisternas está asociada a la síntesis y plegamiento de proteínas y en esta zona suele observarse una alta densidad de ribosomas asociados [7].

Por otra parte, existe otro dominio periférico al cual se le ha asociado con la síntesis de lípidos, en el cual se observa una densidad baja de ribosomas [7]. Esta región está constituida principalmente por túbulos que se interconectan tanto entre ellos, como con las zonas de cisternas (**Figura 1C y 1D**) [2]. Esta red poligonal está sostenida por las proteínas Lunapark (LNP), una familia de proteínas que se encuentra altamente conservada entre organismos, la cual mantiene las interconexiones de la red tubular del RE [8].

En células de mamífero el RE requiere estar asociado al citoesqueleto para mantener su distribución y para que exista una proporción correcta entre túbulos y láminas, [9], [10]. El RE presenta dos tipos de movimiento que dependen de su asociación con los microtúbulos. Uno de ellos se observa como deslizamientos sobre la red estable de microtúbulos y requiere de los motores moleculares dineína y kinesina; mientras que el otro es mediado por el complejo de unión a la punta (TAC, *Tip Attachment Complex*) y se observa como un movimiento en el cual el RE crece y se constriñe de acuerdo al crecimiento del microtúbulo [10], [11]

Existen también diversas proteínas que participan en mantener la estructura de los diferentes dominios del RE. Una familia de proteínas transmembranales conocidas como reticulones (RTNs) participa en mantener específicamente la alta curvatura presente en los túbulos y en los extremos sobre los que se pliegan las láminas. Los RTNs presentan un dominio conservado y característico en su extremo carboxilo, el cual está formado por dos pases transmembranales separados por una región hidrofílica, cuyo plegamiento es capaz de introducir curvatura en las membranas [12], [13]. Junto con los RTNs, existe otro grupo de proteínas que interviene en mantener la estructura del RE, las Atlastinas. Estas proteínas son un grupo de GTPasas que actúan en los eventos de fusión que suceden entre membranas homotípicas del RE [14]–[16].

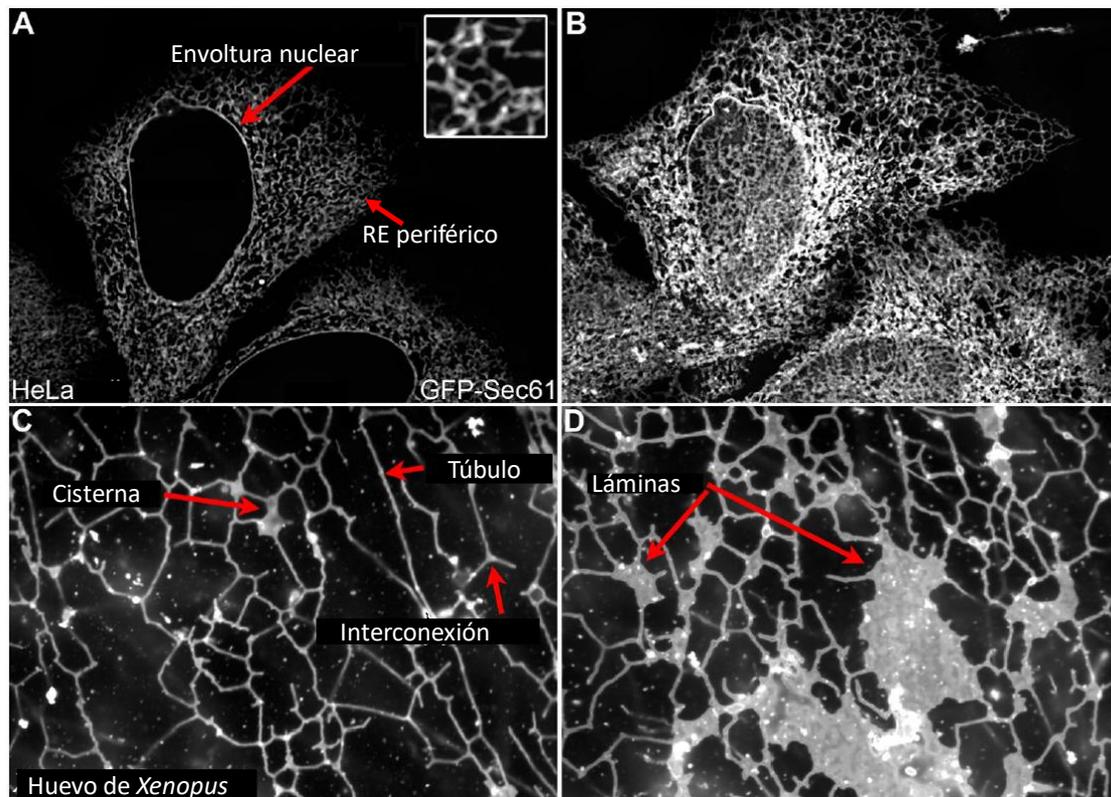


Figura 1. (A) El retículo endoplásmico (RE) se puede dividir en dos regiones principales: la membrana nuclear y el RE periférico. Vista medial del RE de una célula HeLa teñido mediante la expresión de Sec61B (proteína residente del RE que participa en la traslocación de proteínas) fusionada a la GFP. El recuadro muestra un acercamiento de la red poligonal del RE en esta célula. (B) Vista cortical de las mismas células en A. (C y D) Estructura de la red que conforma el RE periférico. Se puede apreciar que esta región está formada por túbulos y zonas en forma de cisternas o de láminas. Todas las zonas están interconectadas. Red de RE formada a partir de extractos de huevos de *Xenopus*. Modificado de Schwarz, D. S.; 2016 [17].

1.2-El RE es un sitio ideal para el plegamiento de proteínas

El ambiente al interior del RE es altamente oxidante y contiene una alta concentración de calcio (Ca^{2+}) con respecto al medio citosólico. Es también muy viscoso, ya que contiene una alta densidad molecular. Además, en este organelo se encuentran concentradas una gran cantidad de chaperonas y de proteínas involucradas en la glicosilación y el plegamiento de proteínas, lo cual en suma, permite que el plegamiento de las proteínas sea altamente eficiente.

La mayoría de las proteínas transmembranales y solubles que siguen la ruta de secreción sufren diversas modificaciones en el RE. Una de ellas es la unión covalente de carbohidratos en los grupos amida de algunos residuos de asparagina (*N*-glicosilación). Este proceso es mediado por la oligosacaril transferasa (OST) y consiste en la transferencia cotraduccional de un oligosacárido, el cual es ensamblado previamente sobre un acarreador lipídico que se encuentra insertado en la membrana del RE, el dolicol fosfato. LA *N*-glicosilación incrementa la estabilidad y solubilidad de las proteínas, además de que permite que estas sean reconocidas por algunas chaperonas y evita que sean retrotranslocadas [18].

En el RE existen dos sistemas de chaperonas. Uno de ellos contiene a GRP78/BiP (*Glucose Regulated Protein 78/Binding Protein*), una chaperona residente del RE que pertenece a la familia de las chaperonas de choque térmico de 70kDa, HSP70s (*Heat Shock Proteins*)[19]. Este grupo de chaperonas reconoce y se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas, de esta forma evita que estas regiones queden expuestas y que puedan interferir así, con el proceso de plegamiento. La actividad de esta chaperona depende de su estado de unión con ATP o ADP [20]. El otro sistema de chaperonas en el RE está formado por las proteínas tipo lectinas, calnexina y calreticulina. Estas chaperonas reconocen la presencia tanto de regiones no plegadas, como de sitios *N*-glicosilados [21].

Al interior del RE se encuentran también otros grupos de proteínas que no pertenecen a la familia de las chaperonas, pero cuya participación resulta esencial durante el proceso de plegamiento de las proteínas. Dentro de estas se encuentran las peptidil-prolil cis/trans-isomerasas que catalizan la isomerización cis/trans de los enlaces peptídicos. Además, existe una familia de enzimas que participan en la formación y remodelado de los puentes disulfuro, formada por las proteínas disulfuro isomerasas (PDIs) [22], [23].

1.3-La vía de respuesta al estrés de RE

Se puede definir como estrés celular a cualquier condición en la cual se ve alterada la homeostasis de una célula y ante la cual se genera una respuesta de supervivencia para reparar y sobrevivir al

daño. Existen diferentes condiciones fisiológicas celulares que alteran las funciones del RE y que causan que se incremente la proporción de proteínas mal plegadas en su interior; entre ellas, se encuentran los cambios en la concentración de calcio intracelular, un aumento en la demanda de proteínas de secreción, así como las deficiencias en el transporte de proteínas.

Experimentalmente, se utilizan diversos agentes capaces de interferir con los procesos que se requieren para el correcto plegamiento de proteínas en el RE y que como consecuencia generan un estrés (**Figura 2**) [24]. Para afectar el plegamiento es común el uso de agentes reductores, tales como el ditioneitol (DTT) y el β -mercaptoetanol, los cuales interfieren con la formación de puentes disulfuro intra e intermoleculares. También se utilizan agentes que interfieren con la *N*-glicosilación de las proteínas, tales como la 2-deoxi-D-glucosa (2-DOG) y la tunicamicina (TN). La 2-DOG es un análogo de la glucosa que al ser incorporado en el oligosacárido evita que continúe la adición de más carbohidratos en la cadena. La TN es un antibiótico nucleotídico que inhibe a la UDP- *N*-acetil glucosamina-1-P-transferasa, la cual cataliza la transferencia de la *N*-acetil glucosamina fosfato desde el UDP (uridina difosfato) hacia el dolicol difosfato, el cual es el primer paso en la formación del oligosacárido.

Las condiciones que ocasionan un aumento en la concentración de proteínas mal plegadas en el RE causan una pérdida de la homeostasis y, por lo tanto, generan estrés de RE. Para poder contender con esto, las células han evolucionado un sistema de señalización, al cual se conoce como la respuesta a proteínas mal plegadas (UPR, *Unfolded Protein Response*), la cual permite por un lado aumentar la capacidad de plegamiento del RE, y por el otro disminuir la carga de proteínas en este compartimiento. Esta respuesta se genera mediante una reprogramación transcripcional, aunada a una disminución en la traducción de proteínas y a un aumento en la capacidad degradativa celular (**Figura 3**) [25]–[28]. En células de mamífero se ha descrito que existen al menos tres rutas de señalización que pueden sentir el ambiente de plegamiento en el lumen del RE. Estas rutas están constituidas por las proteínas transmembranales IRE1, ATF6 y PERK1 (respectivamente *Inositol-Requiring Enzyme 1*, *Activating Transcription Factor 6* y *Protein-kinase R-like Endoplasmic Reticulum Kinase*). Estas proteínas residentes del RE detectan alteraciones en el ambiente del RE y son capaces de generar las respuestas adaptativas requeridas para mantener la homeostasis. En las secciones que se encuentran a continuación, se describe el mecanismo de activación y la actividad de cada una de las rutas reguladas por estas proteínas ante un estrés de RE.

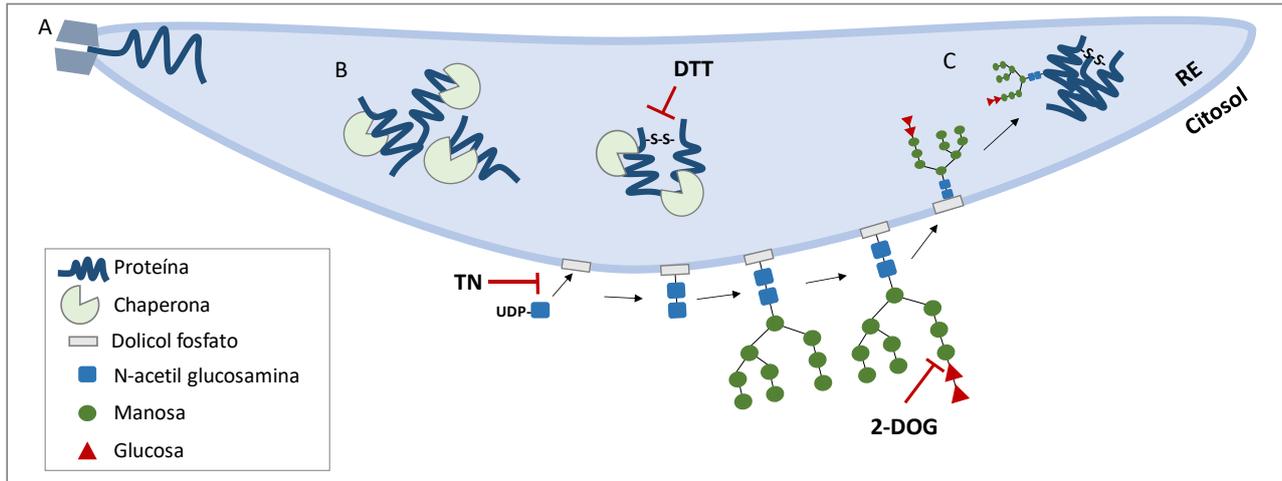


Figura 2. Efecto del ditioneitol (DTT), la tunicamicina (TN) y la 2-deoxy-D-glucose (2-DOG) sobre el plegamiento de proteínas en el RE. **(A)** Las proteínas son translocadas al RE, en donde serán plegadas y sufrirán diversas modificaciones, tales como la adición de oligosacáridos y la formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares. **(B)** Conforme las proteínas son transportadas al interior del RE, se unen a ellas las chaperonas y otras proteínas que las modificarán. Dentro de estas últimas, se encuentra la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la cual participa en la formación de puentes disulfuro inter e intramoleculares. El DTT actúa como un agente reductor de los puentes disulfuro, por lo que evita que las proteínas adquieran un plegamiento correcto. **(C)** Otra modificación postraduccional que sufren las proteínas en el RE para poder ser plegadas es la *N*-glicosilación. Tanto la TN como la 2-DOG interfieren con este proceso. La TN, evita el primer paso de formación del oligosacárido ya que inhibe a la enzima que cataliza la transferencia de la *N*-acetil glucosamina fosfato desde el UDP (uridina difosfato) hacia el dolicol difosfato. La 2-DOG, es incorporada en la cadena de oligosacáridos, pero evita que puedan adicionarse más carbohidratos a la cadena.

1.3.1-IRE1 es una cinasa y ribonucleasa conservada evolutivamente

Dentro de los sensores de estrés de RE, IRE1 es el único que está conservado en todos los organismos eucariontes que se han estudiado. En *Saccharomyces cerevisiae* existe un solo ortólogo de IRE1 y la UPR depende únicamente de esta ruta de señalización; mientras que en animales y en plantas, aunque resulta esencial, esta ruta participa en conjunto con otras para generar una respuesta [29], [30]. En humanos y en *A. thaliana* se expresan dos isoformas de IRE1 que presentan una alta similitud en su secuencia proteica, pero tienen un patrón de expresión diferencial dependiendo del tipo de tejido [31]–[34].

IRE1 es una proteína transmembranal tipo I cuya porción amino terminal (N-terminal) funciona como un sensor de proteínas mal plegadas al interior del RE. Por otra parte, su región citoplasmática contiene dos dominios con función enzimática, uno de estos dominios actúa como una cinasa de serinas y treoninas y el otro, como una ribonucleasa tipo KEN (*Kinase Extension Nuclease*) (**Figura 4A**) [35], [36].

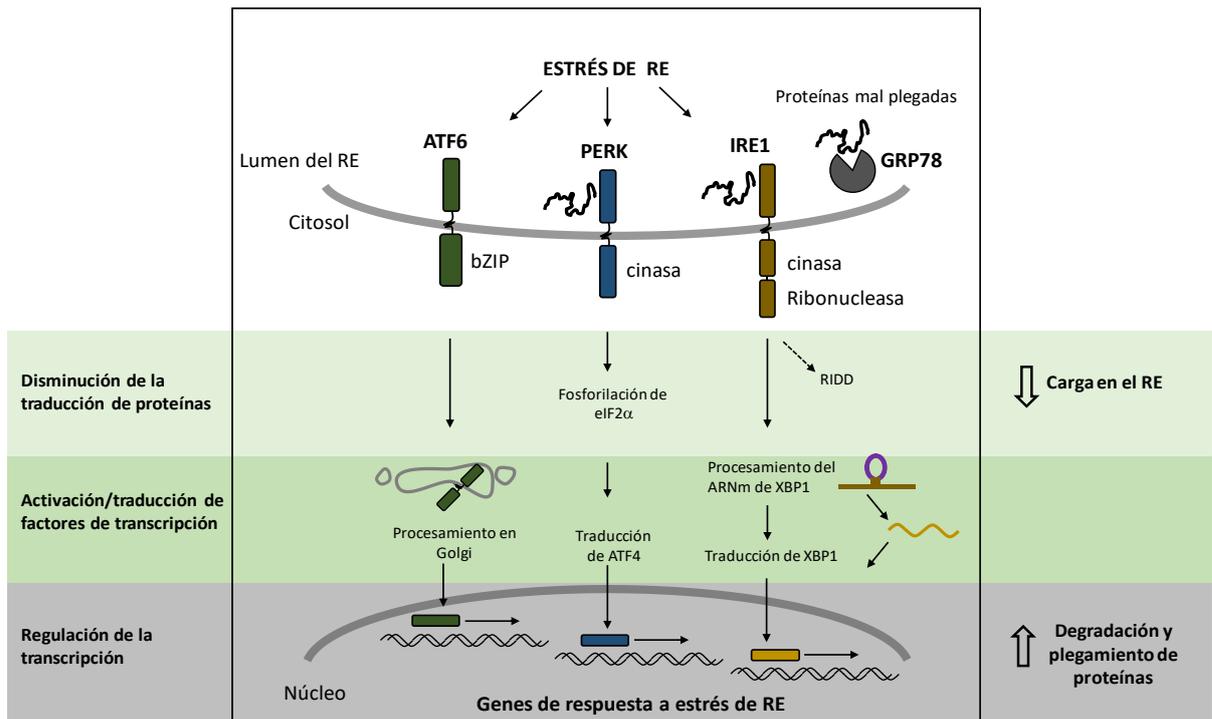


Figura 3. La vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR) es la encargada de activar la respuesta adaptativa que recuperará la homeostasis celular mediante una reducción de la carga de proteínas en el RE, y al incrementar la capacidad de degradación y de plegamiento de proteínas. En mamíferos existen tres proteínas transmembranales de RE que pueden sentir el ambiente de plegamiento: ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*), PERK (*Protein Kinase RNA-Like ER Kinase*) e IRE1 (*Inositol-Requiring Enzyme 1*). Ante un incremento en la carga de proteínas mal plegadas en el RE, los tres sensores pierden su interacción con la chaperona GRP78, lo cual permite su activación. Además, PERK e IRE1 pueden interactuar directamente con péptidos mal plegados mediante su dominio luminal. Las tres rutas de la UPR participan en generar una reprogramación transcripcional, la cual se logra mediante la activación o la traducción de factores de transcripción que participan en incrementar la expresión de genes involucrados con la recuperación de la homeostasis del RE. Tanto PERK como IRE1 participan en atenuar la traducción de proteínas, respectivamente mediante la fosforilación de la subunidad α del factor de inicio de la traducción 2 (eIF2 α) y mediante la degradación de mensajeros regulada dependiente de IRE1 (RIDD). Figura modificada de Domínguez-Martín, E., *et al.*, 2018 [37].

En condiciones de homeostasis, la fracción N-terminal de IRE1 se mantiene asociada con la chaperona GRP78. Esta asociación se pierde al aumentar la concentración de proteínas mal plegadas en el RE ya que esta condición incrementa la ocupación de la chaperona con proteínas sin plegar; esto permite que IRE1 pase a un estado competente para la activación, en la cual es capaz de formar dímeros y posteriormente oligómeros [38], [39] (**Figura 4B**). Durante su activación, IRE1 interacciona también con fragmentos de proteínas mal plegadas mediante un surco que se forma en su extremo N-terminal por efecto de la dimerización. Este surco tiene cierta similitud estructural con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) y presenta una gran afinidad por péptidos compuestos por aminoácidos básicos o hidrofóbicos [40], [41]. La interacción con péptidos no estructurados fortalece la formación de oligómeros de IRE1, lo cual permite que pase a un estado completamente activo que consiste en una alta capacidad de autotransfosforilación y consecuentemente un aumento en su actividad de ribonucleasa.

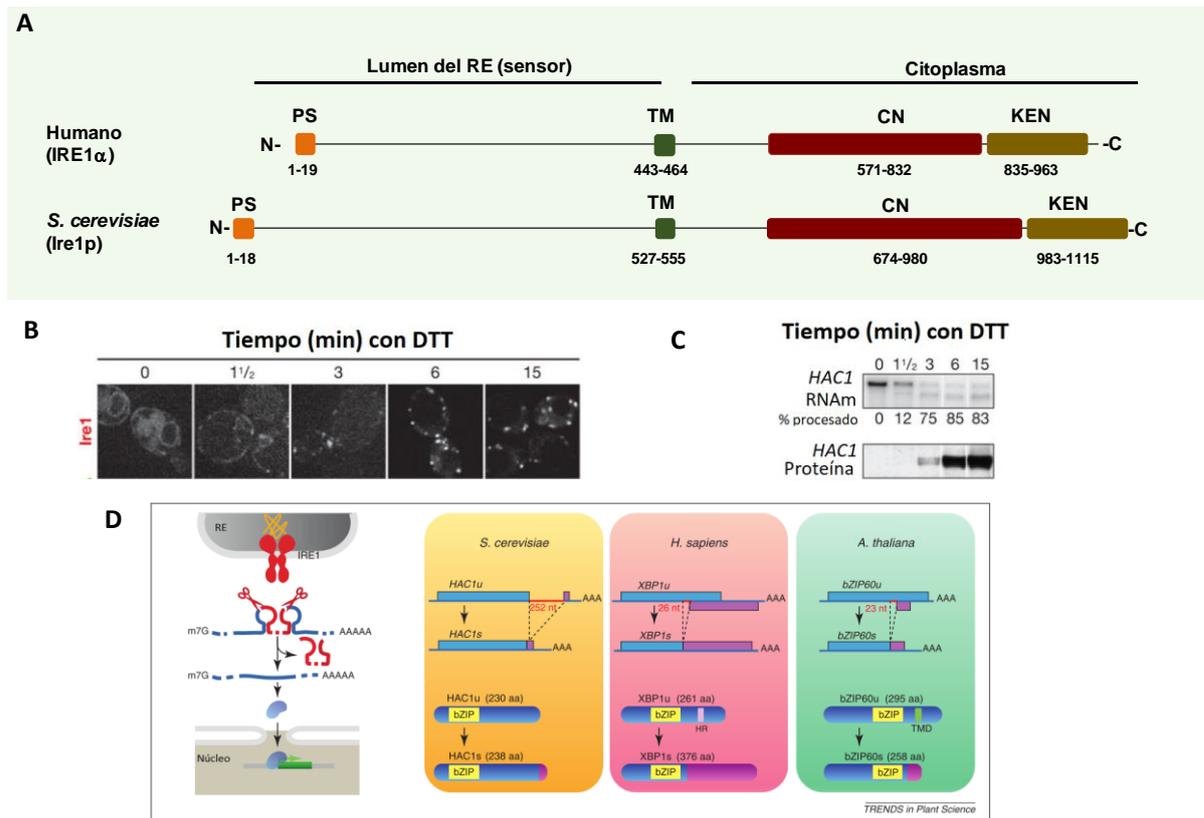


Figura 4. (A) Diagrama comparativo de los dominios de IRE1 de Humano (IRE1 α) y de *S. cerevisiae*. PS (péptido señal), TM (transmembranal), CN (cinasa) y KEN (dominio kinase extension nucleasa). (B) Ante un estrés de RE Ire1 forma oligómeros. Células de *S. cerevisiae* expresando a Ire1 fusionado a la proteína mCherry fueron tratadas durante los tiempos indicados con ditioneitol (DTT) y visualizadas mediante microscopía confocal. Figura modificada de Aragón, T.; *et al*, 2009 [42]. (C) El procesamiento del RNAm de *Hac1* tiene lugar cuando Ire1 se encuentra formando oligómeros. Northern blot contra el mensajero (RNAm) de *Hac1* y un Western blot para detectar los niveles de proteína de Hac1. Muestras tomadas a los tiempos indicados tras el tratamiento con DTT como en B. Figura modificada de Aragón, T.; *et al*, 2009 [42]. (D) IRE1 procesa un intrón no canónico contenido en el mRNA de una proteína tipo bZIP, lo cual permite la traducción de un factor de transcripción activo. El procesamiento varía dependiendo del organismo. Respectivamente IRE1 procesa a XBP1 en humanos, a Hac1 en levaduras y a bZIP60 en plantas. Figura modificada de Iwata, Y. y Koizumi, N., 2012 [43].

Cuando el dominio KEN de IRE1 se encuentra activo, cataliza la escisión de un intrón no canónico contenido en el RNA mensajero de un factor de transcripción de la familia los *zipper*s básicos de leucina (b-ZIP). En humanos y otros metazoarios, este factor se conoce como XBP1 (*X-box Binding Protein*), mientras que en *A. thaliana* se conoce como bZIP60 y en *S. cerevisiae* como Hac1p (Figuras 4D y E). Para producir un mensajero maduro, adicionalmente se requiere de la participación de la ligasa de tRNAs Rlg1/RtcB [44]. La escisión del intrón permite la traducción del mensajero maduro y la síntesis de la forma activa del factor de transcripción (XBP1/bZIP60/Hac1p), el cual se internaliza en el núcleo y para permitir una reprogramación de la transcripción celular (Figura 4E).

La familia de los bZIPs se encuentra representada en todos los organismos eucariontes y se caracteriza por la presencia de una región rica en aminoácidos básicos capaz de interactuar con el

DNA seguida de una región de *zipper* de leucinas, la cual permite la formación de dímeros entre proteínas que contienen este dominio [45]. XBP1, Hac1p y bZIP60 presentan muy poca homología a nivel de secuencia proteica. Como puede observarse en la **Figura 5**, la homología entre la secuencia proteica de la forma no activa de estos factores de transcripción se restringe casi exclusivamente a la zona que contiene el dominio bZIP. Tanto XBP1 como bZIP60 en su forma inactiva se expresan constitutivamente y codifican una proteína transmembranal tipo II que se mantiene anclada al RE [46], [47]. Por otra parte, Hac1p no se expresa en su forma inactiva, ya que el mensajero inmaduro presenta una estructura terciaria en la que el intrón evita que pueda traducirse [48], [49]. A pesar de estas diferencias, los intrones contenidos en los mensajeros de los factores de transcripción que son procesados por IRE1 presentan una estructura similar entre especies, así como algunos motivos conservados en la región del sitio que es reconocido y procesado por IRE1 [50].

En plantas, animales y en algunas levaduras, se ha observado que IRE1 es capaz de degradar algunos mensajeros que codifican para proteínas que serán translocadas al RE mediante su actividad de endorribonucleasa, por un proceso al cual se le conoce como degradación regulada dependiente de IRE1 (RIDD, *Regulated IRE1-Dependent Decay*)[51]–[54]. En plantas el proceso de RIDD permite disminuir la carga de proteínas de secreción que serán translocadas al RE [55], mientras que en células de mamífero este proceso media la degradación selectiva de algunos mensajeros y participa en la ejecución de un programa de muerte por apoptosis cuando el estrés es sostenido, [28], [56]. Por otra parte, el proceso de RIDD es la única respuesta al estrés de RE dependiente de Ire1 en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* [53].

Los RNAs mensajeros que son degradados mediante RIDD y el RNA mensajero de XBP1 contienen una secuencia consenso la cual define el sitio reconocido y procesado por IRE1. Esta suele estar contenida en una región del mensajero que presenta una estructura secundaria conservada de tallo-asa[28], [56]. Sin embargo, aunque el sitio reconocido por IRE1 está conservado en ambos casos y la misma actividad catalítica de IRE1 es la misma, la degradación mediante RIDD y el procesamiento del mensajero de XBP1 presentan ciertas diferencias significativas [57]. Por ejemplo, se ha observado en células de mamífero que la degradación del mensajero BLOC1S1 ocurre a una velocidad menor que el procesamiento de XBP1 y que este mensajero se degrada sólo ante la presencia de un estrés prolongado [58]. Además, se ha sugerido que en estas células se requiere de la actividad de PERK para que algunos de los mensajeros puedan ser degradados [56].

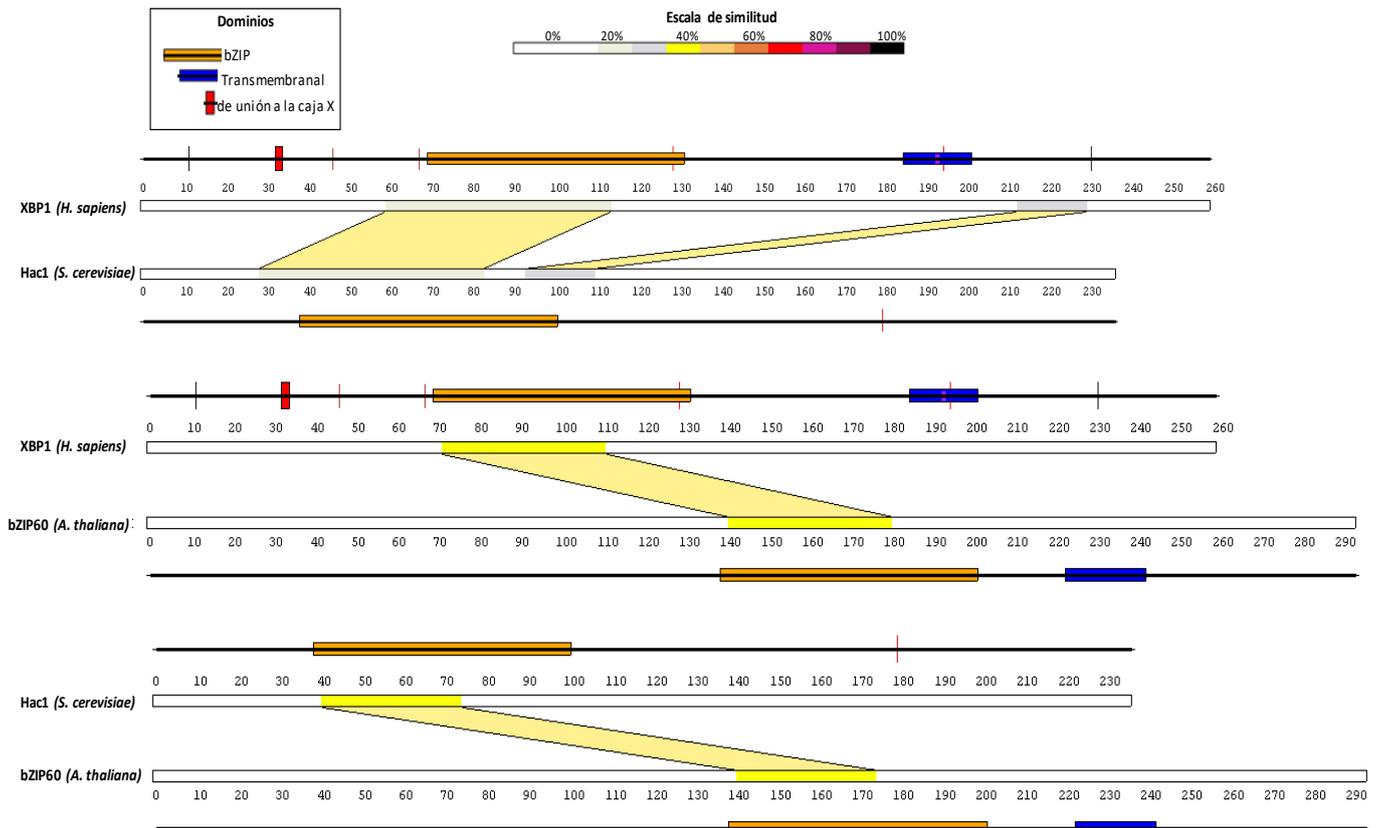


Figura 5. Diagramas de los alineamientos locales entre las secuencias proteicas, respectivamente de XBP1, Hac1 y bZIP60. El código de color representa la similitud que existe entre ambas secuencias. Los alineamientos fueron generados con el programa *SIM alignment* y fueron visualizados con LALNVIEW.

1.3.2- PERK regula la traducción de proteínas

PERK es una proteína transmembranal de RE que presenta ciertos rasgos estructurales similares a IRE1. Esta cinasa presenta un dominio N-terminal alojado en el lumen del RE capaz de sentir el ambiente de plegamiento, el cual forma al dimerizarse una estructura similar al MHC. También, en esta porción tiene una región mediante la cual interacciona con la chaperona GRP78 en ausencia de estrés, y en su porción citoplasmática contiene un dominio de cinasa [59], [60].

Ante un aumento en la concentración de proteínas mal plegadas en el RE, PERK y GRP78 pierden su asociación, lo cual permite que PERK forme dímeros. Con esto se activa como cinasa y se autofosforila, esto aumenta su actividad catalítica y le permite fosforilar a la subunidad α del factor 2 de inicio de la traducción (eIF2 α) (**Figura 3**) [61], [62].

El eIF2 es un complejo multimérico formado por tres subunidades (α , β , γ) el cual, para su activación, se asocia al GTP y lo hidroliza. De esta manera puede unirse al RNA de transferencia de la metionina y así, permite la formación del complejo de pre-inicio de la traducción 43s. Este complejo incluye

también a otros factores de iniciación y a la subunidad pequeña del ribosoma. El reciclaje del factor eIF2 requiere del intercambio de GDP por GTP el cual es catalizado por el intercambiador de nucleótidos eIF2B [63]. Cuando la subunidad α de eIF2 se encuentra fosforilada, puede unirse a un sitio regulatorio de eIF2B e inhibir su actividad, esto produce una disminución en el reciclaje del eIF2, lo cual disminuye la tasa global de traducción de proteínas y por lo tanto, permite disminuir la carga de proteínas en el RE [64].

Por otra parte, la fosforilación de eIF2 α permite la traducción selectiva de algunas proteínas. Los mensajeros de estas proteínas presentan marcos abiertos de lectura pequeños en su extremo no traducido 5' (uORFs). En condiciones normales los uORFs titulan a los ribosomas y bajan la tasa de traducción del ORF codificante. En cambio, en condiciones de estrés, la concentración de eIF2-GTP es baja, debido a la disminución en la tasa de reciclaje. Esto permite que los complejos de inicio tengan una vida media mayor y, por lo tanto, que aumente la frecuencia de traducción del ORF codificante. Una de las proteínas que se regulan de esta manera es el factor de transcripción tipo bZIP, ATF4 (*Activating Transcription Factor 4*), cuyo mensajero contiene dos uORFs regulatorios [65]. ATF4 pertenece a la familia de factores de transcripción de unión a elementos de respuesta a AMP cíclico (CREBs) y al traducirse en condiciones de estrés permite que se generen cambios transcripcionales que participarán en la recuperación de la homeostasis celular [66], [67].

1.3.3-ATF6 es un factor de transcripción que se transporta del RE al Golgi

El factor de transcripción ATF6 se expresa como un precursor que se encuentra anclado a la membrana del RE mediante un dominio transmembranal. En su extremo N-terminal, ubicado en el citoplasma, contiene un dominio de unión a DNA tipo bZIP; contiene también dominios de activación transcripcional y secuencias de localización nuclear [68]. En su extremo C-terminal, el cual se encuentra en el lumen del RE, contiene dos cisteínas con las cuales puede formar dímeros u oligómeros [69]. Además, en esta región contiene dos secuencias de reconocimiento de transporte a Golgi. En condiciones de homeostasis, estas secuencias se encuentran enmascaradas por su interacción con la chaperona GRP78 [70]. Cuando se induce estrés de RE, las proteínas mal plegadas titulan a GRP78, ATF6 se libera y quedan así expuestas sus secuencias de transporte. Al mismo tiempo, las cisteínas se reducen y ATF6 se transporta al Golgi en forma monomérica (**Figura 3**). En el Golgi, ATF6 sufre un procesamiento que es catalizado por las proteasas transmembranales MBTPS1 y MBTPS2 (*Membrane-Bound Transcription factor Peptidase Site 1 y 2*) [71]. De esta forma, el dominio citosólico de ATF6 se libera y se transporta al núcleo, en donde participa en la reprogramación transcripcional que permite a las células adaptarse al estrés de RE. Parte de esta respuesta se debe a que ATF6 retroalimenta la vía de IRE1 aumentando la expresión de GRP78 y de XBP1 [72].

Recientemente se han identificado otros factores de transcripción que se localizan en la membrana del RE, los cuales contienen un dominio bZIP y un dominio de activación transcripcional. Estos factores, al igual que ATF6, son procesados por las proteasas MBTPS1 y MBTPS2. Estos factores constituyen una familia conocida como OASIS (*Old Astrocyte Specifically Induced Substance*), la cual incluye a los factores de transcripción OASIS, BBF2H7, CREBH, CREB4 y LUMAN/CREB3 [73]–[75]. Los factores OASIS presentan características similares a ATF6 y también se procesan en respuesta a la inducción de estrés de RE; sin embargo, en humanos se expresan diferencialmente dependiendo del tipo de tejido, en contraste con ATF6 cuya expresión es ubicua. [74], [75]. Los mecanismos de regulación de estas proteínas, así como su papel fisiológico aún no ha sido esclarecidos del todo.

1.4-La autofagia es un proceso complejo de degradación celular

Uno de los procesos que resulta esencial para que las células puedan recuperar la homeostasis tras diversas situaciones de estrés celular es la autofagia. Esta ruta catabólica permite acarrear componentes celulares (*cargos*) al interior de los organelos ácidos (lisosomas en mamíferos, la vacuola en plantas y levaduras) para que sean degradados por la acción de las hidrolasas. Los diferentes procesos autofágicos que se llevan a cabo en una célula se pueden clasificar dependiendo de si los cargos se reclutan de forma selectiva o no, y dependiendo de cómo sucede la entrega de dicho material al lisosoma o la vacuola.

La macroautofagia (a la cual nos referiremos a lo largo de este texto como autofagia) consiste en la formación de vesículas de doble membrana, a las que se conoce como autofagosomas, que secuestrarán de forma no selectiva material citoplasmático. Posteriormente, los autofagosomas entregaran su cargo al fusionarse con los lisosomas o con la vacuola [76]. También, existe un proceso de autofagia mediante el cual los autofagosomas reconocen y secuestran selectivamente, de forma específica, sólo ciertos componentes celulares. Generalmente los cargos que serán degradados se marcan mediante la adición de ciertos ligandos, como la ubiquitina, que permiten la interacción con un receptor, el cual a su vez pueden unirse a la membrana del autofagosoma cuando este se está formando. Mediante la autofagia selectiva, pueden degradarse organelos dañados, agregados proteicos o incluso bacterias intracelulares [77], [78].

Existe también un proceso mediante el cual se internaliza material celular de forma directa al lisosoma sin requerir la formación de autofagosomas. Este proceso de internalización y degradación de cargos por la invaginación de la membrana lisosomal se conoce como microautofagia [79].

Finalmente, existe un mecanismo mediante el cual se translocan directamente al lisosoma algunas proteínas solubles. Este proceso se conoce como autofagia mediada por chaperonas [80][81].

La autofagia es inducida por diversos estímulos que generan estrés celular, tales como el ayuno, la hipoxia, cambios en la homeostasis de óxido-reducción, perturbaciones de la proteostasis, entre otros [82]–[86]. Tanto las rutas implicadas, como las proteínas que participan en el proceso de formación de los autofagosomas han sido estudiadas principalmente durante el ayuno, ya que la autofagia resulta vital para que las células reciclen nutrientes y puedan así, sobrevivir a este estrés. La inducción de la autofagia durante una privación de nutrientes depende de la actividad de cinasas de serinas y treoninas que están implicadas en la regulación de la homeostasis celular; siendo las más conocidas TOR (*Target of Rapamycin*) y AMPK (*5' AMP- activated protein kinase*) [87].

La formación de los autofagosomas es un proceso complejo que sucede en varias etapas. Inicia con el proceso de inducción, durante el cual sucede la nucleación del fagóforo, y le sigue una fase durante la cual el fagóforo se expande y se cierra para formar una vesícula. En la última fase, el autofagosoma ensamblado se fusiona con el lisosoma. En mamíferos, este proceso sucede primordialmente en varios puntos del RE, en dominios específicos que funcionan como plataforma para el ensamblaje de estas vesículas a la que se conoce como membrana de aislamiento. Estas zonas de RE se caracterizan por estar enriquecidas en sitios de contacto con otros organelos o membranas [88], [89]. Existen también reportes en los que se ha observado que la formación de los autofagosomas puede suceder. En levaduras, este proceso sucede en proximidad con el RE y con la vacuola, en un solo sitio al que se conoce como PAS (phagophore-assembly site) [90], [91]. Para que puedan llevarse a cabo los diferentes procesos durante la formación del autofagosoma, se requiere de la participación de diferentes complejos proteicos, cuyo reclutamiento y actividad se regulan temporalmente (**Figura 6**). En las siguientes secciones se discutirán con detalle los complejos que forman el autofagosoma.

1.4.1-El complejo ATG1/ULK1 regula la inducción y nucleación del fagóforo

Para facilitar su nomenclatura, en levaduras y otros organismos, se han utilizado las siglas ATG (*AuTophagy-related protein*) para nombrar a la mayoría de las proteínas que son esenciales para la formación de los autofagosomas. La proteína ATG1, también conocida como ULK1 (*Unc-51 Like Kinase 1*) en mamíferos, fue la primera que se identificó como indispensable para la autofagia[92]. Sin embargo, esta cinasa de serinas y treoninas se asocia con otras proteínas en un complejo cuyos componentes no están conservados entre organismos, y existen variaciones significativas entre levaduras y mamíferos. En levaduras este complejo está constituido además de ATG1 por Atg17, Atg13 y Atg29, mientras que en mamíferos está formado por ATG101 y FIP200 (*Focal Adhesion Kinase*

Family Interacting Protein of 200kDa). El único elemento común en ambos grupos de organismos es ATG13 [93].

En condiciones normales de crecimiento, tanto en levaduras como en mamíferos, TOR interacciona y al tiempo fosforila a ATG1 y a ATG13, lo cual las mantiene inactivo al complejo ATG1. En condiciones de ayuno, TOR se inactiva, lo que induce la liberación de las formas no fosforiladas de ATG1 y ATG13. La forma libre de ATG1 entonces, puede autofosforilarse y a su vez fosforilar a otros miembros del complejo incluyendo a ATG13 lo cual promueve la formación del complejo activo [94]–[97] [98]. ATG1 fosforila también a otras proteínas autofágicas, como a ATG9, una proteína transmembranal que participa en la elongación del autofagosoma, así como en el reclutamiento de complejo de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PtdIns3K) en el RE [99], y en activar mediante fosforilación a ATG6/Beclin-1(BECN-1)[100].

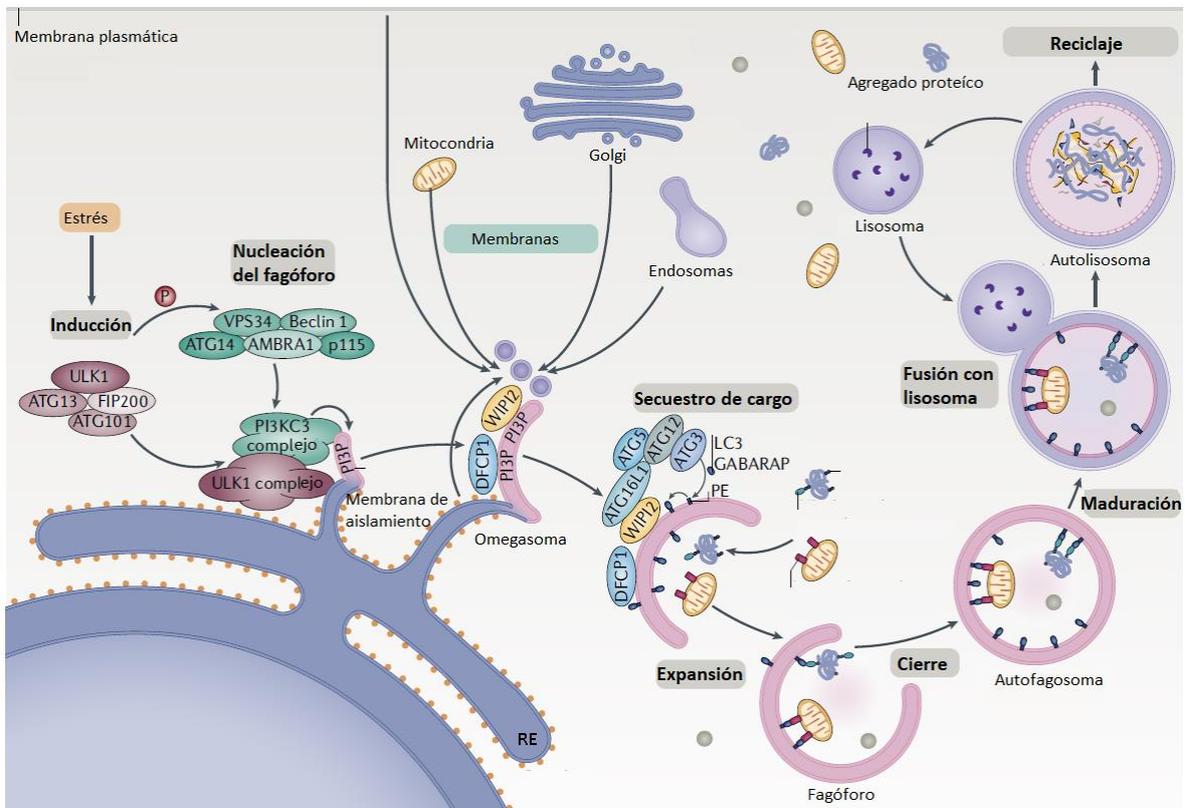


Figura 6. Diagrama de las diferentes etapas durante la formación de un autofagosoma en una célula de mamífero. El complejo ULK1 (*Unc-51-Like Kinase 1*) se activa para permitir la inducción de la autofagia. En ayuno, TOR (*Target of Rapamycin*) deja de fosforilar a ULK1, lo cual permite que esta cinasa se active, se autofosforile, y pueda fosforilar a

los otros miembros del complejo, ATG13 y FIP200 (*Focal Adhesion Kinase Family Interacting Protein of 200 kDa*), con los cuales se ensamblará. El complejo ULK1 activo permite a su vez, que se reclute al complejo de la fosfatidil inositol 3 cinasa (PtdIns3K), el cual catalizará la formación de fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P) en regiones específicas del RE. Estas membranas enriquecidas en PI3P forman una membrana de aislamiento. Además, este lípido sirve como plataforma para reclutar a otros efectores. Para que la membrana del fagóforo se elongue se requiere del reclutamiento de los sistemas de conjugación, compuestos por ATG4, el complejo de ATG12-ATG5/ATG16L1 y las proteínas de la familia ATG8, LC3 (*Microtubule-Associated Protein Light Chain 3*) y GABARAPs (γ -Aminobutyric Acid Receptor-Associated Proteins). Las proteínas de la familia ATG8 (LC3 y GABARAPs) sufrirán un procesamiento mediado por ATG3, que permitirá que se conjuguen con la fosfatidiletanolamina (PE). La doble membrana de los autofagosomas se constituye de material membranal que es entregado por vesículas, algunas de ellas ricas en ATG9, las cuales provienen de diversas fuentes. Finalmente, tras una fase de maduración durante la cual se desasociarán la mayoría de las proteínas ATG, el autofagosoma se fusiona con el lisosoma para que se degrade el cargo y el material pueda ser reutilizado (Modificada de Dikic, I.; Elazar, Z. 2018).

1.4.2-La producción de PI3P se requiere para la nucleación del autofagosoma

La nucleación y elongación del fagóforo se lleva a cabo en dominios específicos del RE que suelen estar enriquecidos en contactos con la mitocondria y con la membrana plasmática [88], [89], [101]. La fosforilación del fosfatidil inositol (PI), catalizada por el complejo de la PtdIns3K genera un enriquecimiento de fosfatidil inositol 3-fosfato (PI3P) en los dominios de la membrana del RE en los cuales se ha inducido la formación del fagóforo [88]. El complejo de la PtdIns3K está formado por la enzima Vps34/PIK3C3, ATG6/BECN-1 y la cinasa de serinas y treoninas Vps15/PIK3R4 y [102]. El PI3P permite reclutar al sitio de nucleación a proteínas que participaran como efectoras en la formación del autofagosoma, tales como ATG18/WIPs (*WD-repeat proteins interacting with phosphoinositides*). Todo esto, promueve la formación del omegasoma, estructura característica en el RE que acuna la formación del autofagosoma [103].

1.4.3-La elongación del autofagosoma requiere de ATG9 y de dos sistemas de conjugación

Tras la formación del omegasoma, la membrana del fagóforo se elongará a partir de varias fuentes de membrana; dentro de ellas, el compartimento intermedio entre el RE y el Golgi (ERGIC) [104]. Durante la elongación del autofagosoma, se requiere la participación de la proteína autofágica ATG9, la cual está involucrada en proveer al fagóforo de membranas. Estas pueden provenir del Golgi y de endosomas de reciclaje [105], [106]. En levaduras, se ha observado que existe un complejo que permite el contacto entre el RE y el autofagosoma en formación, este está constituido por ATG18 y ATG2, los cuales se encuentran asociados constitutivamente, y por Atg9 el cual interacciona a su vez con Atg2 [107].

Durante el proceso de formación del fagóforo se requiere también de dos sistemas de conjugación cuyo mecanismo resulta similar al sistema de ubiquitinación de proteínas. Los componentes de estos sistemas de conjugación se encuentran altamente conservados entre organismos. En levadura dos

proteínas que presentan homología estructural con la ubiquitina, ATG8 y ATG12[108], [109], se modifican para formar, por una parte, un producto de ATG8 unido covalentemente con la fosfatidiletanolamina (PE); y por la otra, un conjugado en el cual se encuentra unidos ATG12 con ATG5 [110].

La formación del conjugado ATG12-ATG5 requiere por un lado de la actividad de ATG7, una enzima tipo E1 que activa a ATG12; y por el otro de ATG10, una enzima tipo E2 que promueve la conjugación de ATG12 con ATG5 [111]. El conjugado ATG12-ATG5 forma un complejo con ATG16, que en mamíferos a su vez interacciona con WIPI2. Esta interacción permite que el complejo ATG12-ATG5-ATG16 sea reclutado al fagóforo, en donde se requiere para facilitar la lipidación de ATG8[112].

Atg8 se sintetiza como una proteína precursora, la cual sufre constitutivamente un procesamiento catalizado por la proteasa de cisteínas Atg4. El procesamiento de Atg8 permite la exposición de un residuo de glicina, el cual permite su conjugación con la PE. El proceso de lipidación de Atg8 es mediado por Atg7 y por la enzima tipo E2, Atg3 [113]. Así, Atg8-PE puede formar parte de la membrana del autofagosoma que se encuentra formándose, principalmente en la cara interna de la vesícula, lo cual permite darle forma a la membrana, así como regular su tamaño y reclutar selectivamente ciertos cargos [114], [115]. Se ha sugerido también, que Atg8 participa durante el proceso de sellado de la membrana del autofagosoma y en el reclutamiento de proteínas que se requieren para la maduración de la vesícula [116]. Durante la última fase, durante la cual madura el autofagosoma, se disocian los complejos proteicos que participaron en el proceso de nucleación del fagóforo.

1.4.4-El material secuestrado por los autofagosomas se degrada en los lisosomas

La etapa final de la autofagia involucra la fusión del autofagosoma con el lisosoma, lo cual permite que el material secuestrado se libere, se degrade y se reutilice en la construcción de nuevos componentes celulares o en otros casos, se secrete. Para que se fusione el autofagosoma con el lisosoma se requiere del reclutamiento de la GTPasa Ypt7/RAB7 [117]. Esta proteína interacciona con el complejo HOPS (*Homotypic Fusion and Protein Sorting-tethering*). Este complejo induce cambios en la curvatura de la membrana[118], y junto con ciertos miembros de familia SNARE participa en la fusión de las dos membranas [119].

1.4.5-La autofagia y el estrés de RE

Se ha reportado ampliamente que la autofagia se induce en respuesta a un estrés de RE. Las primeras observaciones sobre este efecto provienen de estudios realizados en levaduras [86], [120].

Posteriormente, se ha comprobado que esta respuesta se encuentra ampliamente conservada entre organismos y se ha sugerido que la autofagia inducida por el estrés funciona como una estrategia para controlar la expansión del RE e incrementar la capacidad de degradación de agregados proteicos [120]–[123].

En plantas y en mamíferos se ha observado que la inducción de la autofagia ante un estrés de RE requiere de la actividad de IRE1 [124], [125]. En mamíferos, se ha planteado que esta cinasa media la activación de la ruta de JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) y de esta forma se dispara la respuesta autofágica [124]. Sin embargo, la ruta de señalización de JNK se encuentra solamente en animales y no está conservada en otros organismos; por lo que no se ha esclarecido si IRE1 participa en la inducción de la autofagia en organismos carentes de la vía JNK. Por otra parte, se ha planteado que, tras un estrés de RE, Sec62 funciona como un receptor que permite degradar selectivamente ciertas porciones del RE, esto de forma independiente de la ruta de la UPR [126]. Esto sugiere que existen condiciones en las que la autofagia puede inducirse y regularse de forma independiente a la UPR.

1.5-*Dictyostelium discoideum* como organismo modelo

La mayor parte de los descubrimientos en el área de la biología celular se han logrado gracias a los estudios realizados en organismos modelo; principalmente con microorganismos, debido a que presentan tiempos cortos de duplicación y resultan de fácil manipulación. Dentro de ellos, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* es uno de los organismos más estudiados y que más ha aportado al campo. Sin embargo, durante la evolución de este organismo, han aparecido características únicas que se encuentran poco conservadas o ausentes en otros organismos, lo cual impide que algunos de los mecanismos moleculares descubiertos en la levadura puedan ser extrapolados. El estudio de otros organismos ha permitido entonces, complementar el conocimiento que se tiene de ciertos procesos celulares complejos.

Dictyostelium discoideum es una ameba social que se encuentra clasificada en el filo Amebozoa, un grupo que divergió antes de la separación de los hongos y los animales [127]. Este organismo fue descrito por primera vez por Kenneth Raper en 1935, y desde ese momento ha sido ampliamente estudiado, ya que presenta algunos mecanismos moleculares implicados en procesos celulares que se encuentran conservados con animales, pero que se han perdido o han divergido significativamente en las levaduras. En *Dictyostelium* se han estudiado ampliamente la quimiotaxis, la fagocitosis y ciertas rutas de señalización y de comunicación intercelular [128], [129]. Por este motivo, *D. discoideum* se ha utilizado para estudiar la etiología de algunas enfermedades humanas, como la lipofuscinosis ceroides neuronal, la corea-acanthocytosis, y el Alzheimer, entre otros [130].

Además, se ha utilizado para identificar y probar nuevas drogas[131]–[133], así como para estudios relacionados con los mecanismos de infección, ya que presenta ciertas similitudes con las células fagocíticas animales involucradas en la respuesta inmune innata [134], [135].

Además de esto, *D. discoideum* presenta un ciclo de vida particular que alterna entre una fase unicelular y una multicelular que culmina en la formación de un cuerpo fructífero constituido por diferentes tipos celulares. La alternancia entre la fase unicelular y multicelular le permite adaptarse y sobrevivir a condiciones de ayuno; así como colonizar nuevos nichos. Este proceso se describe con mayor detalle en la sección siguiente.

1.5.1-*D. discoideum* presenta un ciclo de vida complejo

D. discoideum suele habitar el suelo de bosques templados en donde se alimenta por fagocitosis de bacterias y levaduras. Estas amebas se mantienen en su forma vegetativa, dividiéndose mediante fisión, mientras existan fuentes de alimento. Sin embargo, cuando los nutrientes escasean las células detienen su crecimiento vegetativo y comienzan un proceso de desarrollo y diferenciación que les permitirá sobrevivir la ausencia de nutrientes. Este proceso es regulado por la secreción de diferentes moléculas. Una de ellas es el cAMP (Adenosin monofosfato cíclico) el cual funciona como un mensajero de señalización extracelular. El cAMP actúa como un quimio-atrayente que induce la agregación de alrededor de 10^5 amebas. Este agregado pasará por varias fases de diferenciación, una de ellas es un gusano móvil microscópico (*slug*) capaz de detectar fuentes lumínicas y diferencias en la concentración de amonio. El proceso de diferenciación culmina en la formación de un cuerpo fructífero construido por diferentes tipos celulares que forman un tallo de células muertas sobre el cual se sostiene un soro lleno de esporas. Bajo condiciones ambientales y nutricionales adecuadas, las esporas se liberan y germinan como amebas (**Figura 7**). En condiciones controladas, el ciclo completo se lleva a cabo durante un tiempo aproximado de entre 24 y 28hrs [136]–[139].

1.5.2-La autofagia es esencial para el proceso de desarrollo de *D. discoideum*

El desarrollo de *D. discoideum* sucede como una respuesta de supervivencia al ayuno, por lo que la autofagia resulta esencial, pues representa la única fuente de nutrientes. Por este motivo, cualquier deficiencia autofágica causa defectos en el proceso de desarrollo [140]–[142]. Se han aislado una serie de mutantes que tienen un bloqueo en diferentes etapas de la autofagia. Estas mutantes presentan fenotipos de desarrollo que varían desde una falta completa de agregación, hasta la

formación de estructuras con múltiples tallos y pocas esporas viables (fenotipo conocido como *multitip*) (Figura 8).

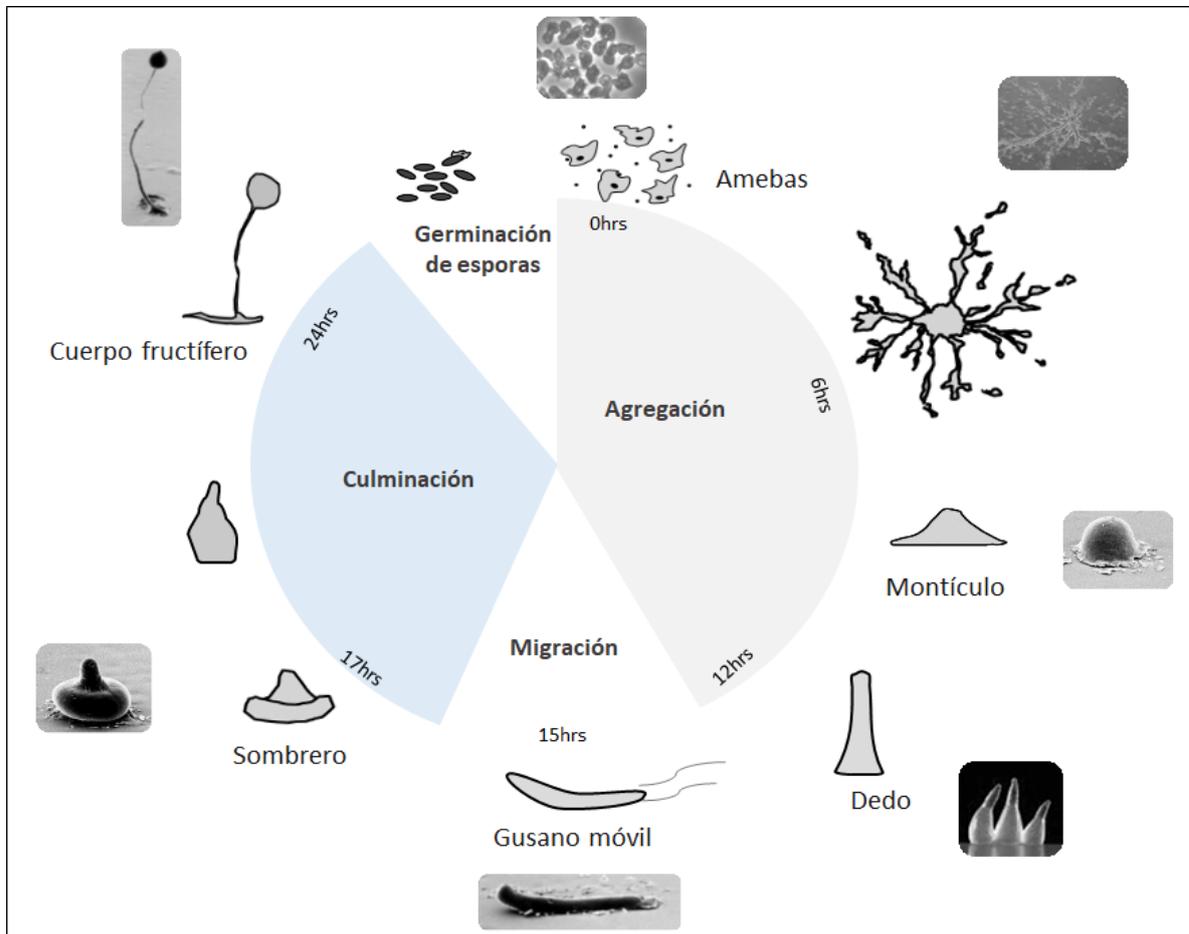


Figura 7. Diagrama del ciclo de vida de *Dictyostelium discoideum*. Las amebas unicelulares se alimentan fagocitando levaduras y bacterias; cuando el alimento escasea, las células de *D. discoideum* secretan señales extracelulares que les permiten agregarse mediante movimientos quimiotáxicos. Estos agregados celulares sufren un proceso de desarrollo y diferenciación comprendido por varias fases, el cual culmina en la formación de un cuerpo fructífero, compuesto por un tallo de células muertas que sostiene un soro lleno de esporas. Cuando las condiciones ambientales son apropiadas, estas esporas germinarán nuevamente como amebas.

De esta forma, se han identificado a los ortólogos de los genes que codifican para el complejo ATG1 [143], los que codifican para el complejo de la PtdIns3K [144] y los que codifican para los sistemas tipo ubiquitina [145]–[147]. Además, en *D. discoideum* se ha identificado que ciertas proteínas cuya función era desconocida, participan durante la autofagia. Entre estas proteínas se encuentran TipC [148], Vmp1 [149], [150], Ndufa5 y MidA [151]. Todos estos trabajos han demostrado que *D. discoideum* representa un buen organismo modelo para el estudio de la autofagia.

Aún no se ha esclarecido si durante el desarrollo de *D. discoideum* se requiere de la autofagia solamente para proveer de nutrientes a las células y mantener así la homeostasis celular, o si también

participa durante los procesos de señalización, ya que se ha observado, por ejemplo, que AcbA, una proteína precursora de uno de los factores de diferenciación de las esporas (SDF-2), es secretada por un proceso no convencional que requiere de la autofagia [152]. Además, el desarrollo del tallo del cuerpo fructífero requiere que las células que lo forman mueran de forma específica por muerte autofágica [153], [154].

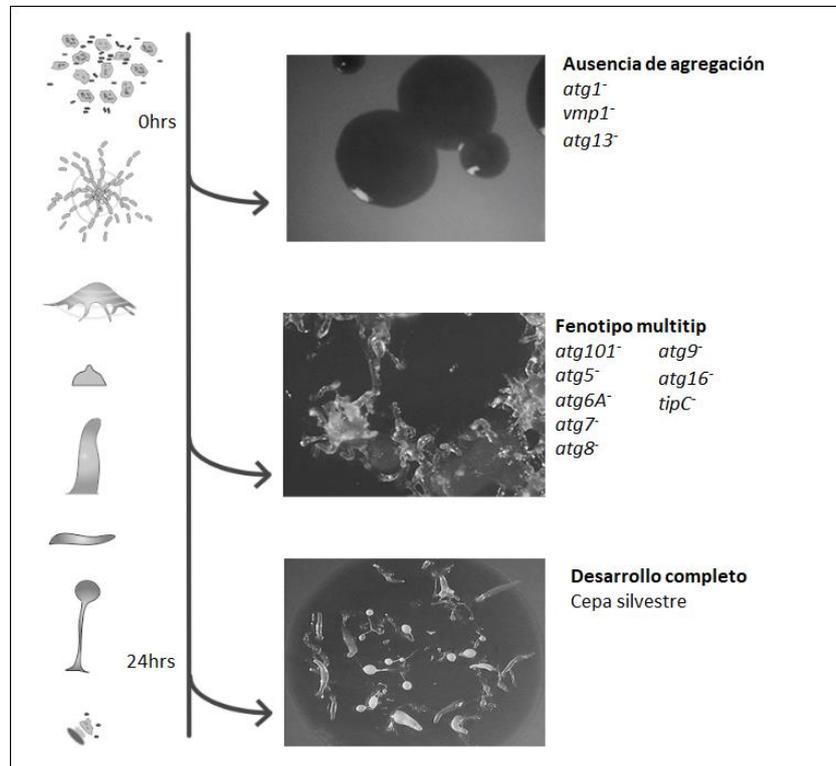


Figura 8. Imágenes representativas de los fenotipos que presentan algunas mutantes de *D. discoideum* con defectos en la autofagia durante el desarrollo. Se muestra un diagrama con las fases de desarrollo y fotografías representativas que corresponden respectivamente a la cepa *atg13*⁻, *tipC*⁻ y AX4 silvestre (comenzando por el panel superior). Figura modificada de Mesquita, A. et al. 2017 [141].

1.5.3-El RE de una ameba social

La estructura del RE de *Dictyostelium* puede visualizarse fácilmente mediante microscopía confocal o mediante microscopía electrónica. Como puede observarse en la **Figura 9**, en el RE de *D. discoideum* pueden distinguirse tanto la membrana perinuclear, como una zona periférica. Esta última está formada por una red de túbulos esparcidos por toda la célula, y por cisternas situadas en la zona más cercana a la membrana plasmática. A la fecha, son escasos los estudios sobre los procesos que mantienen la estructura del RE de *D. discoideum*; sin embargo, en su genoma se encuentra al menos un miembro de la familia RTN (*rtnlc/DDB_G0293088*), un ortólogo de la proteína de las uniones LUNAPARK (*DDB_G0289961*), y uno de la familia Sey1 (*DDB_G0279823*), que es una GTPasa la cual participa en la fusión homotípica de membranas del RE. En *Dictyostelium* se ha

descrito que Sey1 se requiere para que la bacteria *Legionella pneumophila* pueda replicarse intracelularmente [155].

El proceso de plegamiento de proteínas en el RE, así como las rutas que participan en mantener la homeostasis de este organelo aún no se han estudiado en *Dictyostelium*. Sin embargo, se ha visto que la calreticulina y la calnexina, dos chaperonas de RE, tienen un papel importante durante la [21]. También, se han identificado en este organismo los ortólogos de algunas otras chaperonas de RE, tales como Dd-GRP94 de la familia HSP90 [156] y dos miembros de la familia de las proteínas disulfuro isomerasa (PDI) [157], [158].

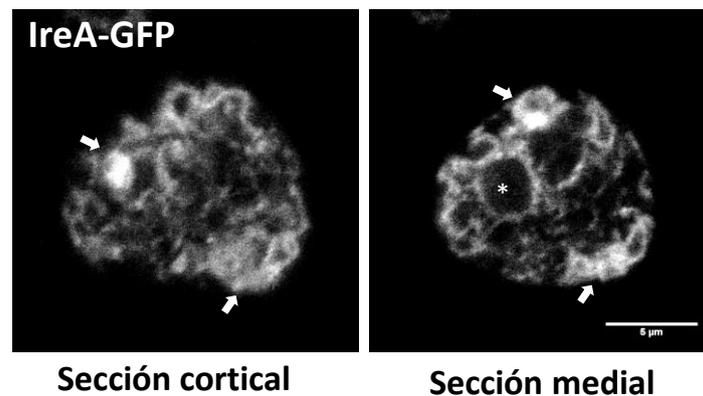


Figura 9. El retículo endoplásmico (RE) de *D. discoideum*. Imágenes obtenidas por microscopía confocal de células silvestres AX4 (WT) vivas expresando una proteína de RE, fusionada a la GFP. Se muestra una sección cortical y una medial. Las flechas señalan zonas con morfología de cisterna y el asterisco marca el núcleo. Se pueden apreciar una red de túbulos esparcida por toda la célula. (Escala 5µM) (Figura modificada de Domínguez-Martín, E.; et al. 2018 [37]).

2. OBJETIVOS

- Establecer las condiciones para inducir estrés de retículo endoplásmico en *D. discoideum*.
- Determinar los elementos de la UPR (IRE1, ATF6, PERK) que están presentes en *D. discoideum* y definir el papel que juegan durante el estrés de RE.
- Caracterizar la respuesta transcripcional que genera el estrés de RE en *D. discoideum*.
- Analizar si en *D. discoideum* la autofagia está involucrada en la respuesta al estrés de RE.
- Definir si en *D. discoideum* el ortólogo de IRE1 está involucrado en regular la autofagia durante el estrés de RE y durante el ayuno.

3.-MATERIALES Y MÉTODOS

3.1- Cepas

La cepa AX4 de *D. discoideum* se utilizó para todos los experimentos y para generar todas las mutantes que se estudiaron en este trabajo. Las mutantes *ireA*⁻, *bzpD*⁻, *bzpJ*⁻ y *mbtpts2*⁻ se obtuvieron mediante la inserción por recombinación homóloga del gen de resistencia a la Blastidina (BST) [159]. Para esto, se generaron construcciones en las que el gen BST se flanqueó por dos regiones homólogas al gen que se deseaba interrumpir. Un listado con todas las cepas que se utilizaron se encuentra en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Cepas utilizadas durante la realización de este trabajo. En el caso de las mutantes generadas durante el desarrollo de este trabajo, se especifica si la inserción del casete de resistencia a blastidina (BST) generó alguna deleción. Se incluye la referencia al trabajo en el cual se reportaron las cepas mutantes que no fueron obtenidas para este trabajo.

Cepa	Descripción
AX4	Tiene el genotipo <i>axeA1</i> , <i>axeB1</i> , <i>axeC1</i> que le permiten el crecimiento axénico. Proviene de la cepa AX3 [160]
<i>ireA</i> ⁻	Presenta una deleción de 998 bases generada al transformar células con el amplificado obtenido de amplificar la construcción pGEM- <i>ireA</i> ::BST con los oligonucleótidos <i>IreA1</i> e <i>IreA2</i> . El gen de resistencia a Blastidina (BST) se insertó entre los sitios EcoRV del ORF de <i>IreA</i> .
<i>atg1</i> ⁻	Mutantes generadas reportadas en [143]. Los genes <i>atg1</i> , <i>atg13</i> y <i>atg101</i> se interrumpieron respectivamente mediante la inserción del gen BST.
<i>atg13</i> ⁻	
<i>atg101</i> ⁻	
<i>bzpD</i> ⁻	Cepa en la que se generó una deleción de 400 bases y la inserción del gen BST, al transformar células con el amplificado resultado de la amplificación con los oligonucleótidos <i>bzpD3</i> y <i>bzpD6</i> la construcción pRS313- <i>bzpD</i> ::BST.
<i>bzpJ</i> ⁻	Cepa en las que el gen <i>bzpJ</i> sufrió una deleción de 717 bases al insertarse el gen BST. Las células se transformaron con el amplificado obtenido de amplificar la construcción pRS313- <i>bzpJ</i> ::BST con los oligonucleótidos <i>bzpJ</i> (KO)-3 y <i>bzpJ</i> (KO)-6.

3.2- Construcciones y vectores

Todos los oligonucleótidos que se utilizaron para generar, mediante PCR, los diferentes amplificados que se utilizaron durante este trabajo están enlistados en la **Tabla 2** y tanto las construcciones, como los vectores utilizados para los experimentos reportados en este trabajo se encuentran descritos en la **Tabla 3**.

Tabla 2. Lista de los oligonucleótidos que se utilizaron durante la realización de este trabajo. Se muestra la coordenada en la que el cada oligonucleótido se une en el gen respectivo. Se refiere también, el número de acceso de la base de datos del genoma de *D. discoideum* con el cual se encuentra identificado el gen que en cada caso fue amplificado.

Nombre	Secuencia	Unión	Gen
ddlreA-107 (FWD)	ATGTAGGGATCCAAAACTACAGAATTTTCG	-107	DDB_G0267650
IreA1 (FWD)	ATATTATCCCGCGCCGCATTAATGTT	758	DDB_G0267650
IreA2 (RV)	CAGGTAATAATGCGGCCGCAAGTTTGTCT	3092	DDB_G0267650
IreA3 (FWD)	GATAGTCATGGTTGGCAACCAGCAG	2525	DDB_G0267650
IreA4 (FWD)	GTAAGATCTATGACTTTTTCAAAA	-9	DDB_G0267650
IreA5 (RV)	ATTACTAGTATAATATTGAACAAAATATTGATC	3209	DDB_G0267650
K603N-IreA (FWD)	GGTAGAAAAGTTGCAGTTAATAGAATGTTATCACAATTTG	2040	DDB_G0267650
K603N-IreA (RV)	CAAATTGTGATAACATTCTATTAAGTCAACTTTTCTACC	2078	DDB_G0267650
N927A-IreA (FWD)	GACCTTTTACGTGTCATTAGAGCTAAATCAACCATTATAG	3008	DDB_G0267650
N927A-IreA (RV)	CTATAATGGTTGAATTTAGCTCTAATGACACGTAAAAGGTC	3050	DDB_G0267650
bzpd-1 (FWD)	AAAGGATCCGACAAAATGGATATTGATTACGAAAATG	-14	DDB_G0278379
bzpd-2 (RV)	TCTACTAGTATGATTTGTAATATTGAAGAAGCTGAAG	2759	DDB_G0278379
bzpd-3 (FWD)	GGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCTAGAAGCTAACACAATCAGCATC	35	DDB_G0278379
bzpd-4 (RV)	CCCGGAAGCTTATCGATACCGTGCACCTCACAGAAGAATCAGAAGAAGATGAAG	1044	DDB_G0278379
bzpd-5 (FWD)	CATATGCCGATGGTTAATTCCTGCAGCCAGAAATCGTAAAAGTGCACAACCTC	1441	DDB_G0278379
bzpd-6 (RV)	AATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCGCTACTAGTATGATTTGTAATATTGAAGAAGCTGAAG	2740	DDB_G0278379
bzpj-1 (FWD)	AAAGGATCCATGGTTGAATTAGAATCAATG	-9	DDB_G0274993
bzpj-2 (RV)	CCCACTAGTTTAATTTAAAGGTGAAAGTGGGG	2540	DDB_G0274993
bzpj(KO)-3 (FWD)	GGGAACAAAAGCTGGGTACCGGGCCCCCGCCATAGTGCAAATAGTAGTGAC	130	DDB_G0274993
bzpj(KO)-4 (RV)	CCCGGAAGCTTATCGATACCGTGCACCTCGAATGGGGTGATGATGATGGTG	753	DDB_G0274993
bzpj(KO)-5 (FWD)	CATATGCCGATGGTTAATTCCTGCAGCCGCACTCAATGAACGTAATAGTGGTG	1465	DDB_G0274993
bzpj(KO)-6 (RV)	AATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGCCGCTTTATTTAAAGGTGAAAGTGGGGGAGAATC	2543	DDB_G0274993

Tabla 3. Lista de todos los vectores que se utilizaron para la realización de este trabajo.

Vector	Descripción
pGEM-IreA	El amplificado del gen <i>IreA</i> obtenido con los oligonucleótidos ddlreA-107 y IreA5 se clonó en el vector comercial pGEM-t easy (PROMEGA).
pGEM-ireA::BST	Construcción en la que se introdujo el fragmento <i>SmaI/KpnI</i> del vector pBluescriptII- <i>BlasticidinR</i> entre los sitios <i>EcoRV</i> del pGEM-IreA.
pDM323	Vector extracromosomal de expresión que permite fusionar la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo C- terminal del producto que se inserte en su sitio de multiclonaje. Contiene el gen de <i>Neo</i> que confiere resistencia al G418 cuando se expresa en <i>D. discoideum</i> [161].
pDM317	Vector extracromosomal de expresión que permite fusionar la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo N- terminal del producto que se inserte en su sitio de multiclonaje. Contiene el gen de <i>Neo</i> que confiere resistencia al G418 cuando se expresa en <i>D. discoideum</i> [161].
pDM324	Vector extracromosomal de expresión que permite fusionar la proteína roja fluorescente (mRFPmars) al extremo C- terminal del producto que se inserte en su sitio de multiclonaje. Contiene el gen de <i>Neo</i> que confiere resistencia al G418 cuando se expresa en <i>D. discoideum</i> [161].
pDM358	Vector extracromosomal de expresión que contiene el gen de <i>Hyg</i> el cual confiere resistencia a la higromicina al transformarse en <i>D. discoideum</i> [161].
pDM323-IreA	El amplificado del gen <i>IreA</i> obtenido con los oligonucleótidos ddlreA-107-IreA5 fue clonado entre los sitios <i>BglII/SpeI</i> del pDM323.
pDM323-IreA ^{K603N}	Versión del pDM323-IreA en la que se generó mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos K603N-IreA, una mutación puntual para cambiar la lisina 603 por una asparagina.
pDM323-IreA ^{N927A}	Versión del pDM323-IreA en la que se generó mediante mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos N927A-IreA, una mutación puntual para cambiar la asparagina 927 por una alanina.
pDM317-Bzpd	

	El amplificado del gen <i>bzpD</i> obtenido con los oligonucleótidos EDbzpd-1 y EDbzpd-2 clonado en el plásmido pDM317.
pDM317-Bzpj	El amplificado del gen <i>bzpj</i> obtenido con los oligonucleótidos EDbzpj-1 y EDbzpj-2 clonado en el plásmido pDM317.
pDM358-GFP-PgkA	La construcción GFP-PgkA descrita previamente en [143], [162] clonada en el plásmido pDM358.
pJSK489	La construcción GFP-Atg18 clonada en el vector pDM448. Vector donado por J. King y descrita en [85].
pRS313-bzpD::BST	Construcción generada mediante la técnica de gap-repair. Contiene clonados los dos fragmentos del gen <i>BzpD</i> obtenido por PCR con los oligonucleótidos bzpD-3 y bzpD-4, y con bzpD-5 y bzpD-6. Estos fragmentos flanquean el fragmento entre ClaI y PstI del plásmido pLPBLP, el cual contiene al gen BST.
pRS313-bzpj::BST	Construcción generada mediante la técnica de gap-repair. Los fragmentos del gen <i>Bzpj</i> obtenidos por PCR con los oligonucleótidos bzpj(KO)-3 y bzpj(KO)-4, y con bzpj(KO)-5 y bzpj(KO)-6, flanquean el fragmento entre ClaI y PstI del plásmido pLPBLP, que contiene el gen BST.
pDM325-Gol	Se clonó el gen <i>gol</i> (golvesin) en el vector pDM324 y posteriormente se cambió el gen <i>Neo</i> contenido entre los sitios BamHI/XhoI por el gen <i>Hyg</i> proveniente del pDM358.
pGEX-4T-DdGrp78	El marco de lectura del gen <i>DDB_G0276445 (GRP78)</i> clonado en el vector para expresión inducible en <i>E.coli</i> pGEX-4T1.

3.3-Anticuerpos utilizados

Para los ensayos de Western blot y de inmunofluorescencia se utilizaron los anticuerpos enlistados en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Anticuerpos utilizados para los experimentos de inmunodetección reportados en este trabajo. Se especifica si el anticuerpo se utilizó para Western Blot (WB) o para inmunofluorescencia (IF).

Blanco	Anticuerpo	Dilución usada
Grp78	Anti-Grp78 (Santa Cruz Biotechnology, sc-1050: goat anti-human GRP78 (N-20), discontinuado)	1:2000 (WB)
GFP	Anti-GFP (<i>Sigma-Aldrich</i> , G1544)	1:10000 (WB)
CdcD	Anti-cdcD (Vcp /P97) (rabbit anti-Dictyostelium CdcD. Provisto por el Dr. Ludwig Eichinger [165]).	1:10000 (WB)
MCCC1	Estreptavidina conjugada a la peroxidasa de rábano.	1:100 000 (WB)
PDI	Anti-PDI (mouse anti-Dictyostelium PDI. Provisto por el Dr. Pierre Cosson)	1:1000 (IF)
Ubiquitina	Anti-Ubiquitina (Cell Signaling ((P4D1) #3936: mouse/rabbit anti-human ubiquitin)	1:500 (IF)
Isótopos de IgG	Anticuerpo secundario conjugado al fluorocromo Alexa fluor 546 (rojo) (Invitrogen, A-11003, goat anti-mouse)	1:1000 (WB)
Isótopos de IgG	Anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Sc2020 Donkey anti goat).	1:10 000 (WB)
Isótopos de IgG	Anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano (Santa Cruz Biotechnology, Sc2004, Goat anti rabbit).	1:10 000 (WB)

3.4-Metodologías de DNA recombinante

Estrategias de clonación

Las construcciones mencionadas en la **Tabla 3**, se generaron mediante la técnica clásica de clonación que depende del uso de enzimas de restricción y de la ligasa de DNA del bacteriófago T4 [163]. Se

utilizó también la técnica de Gap-repair, la cual permite el ensamblaje, mediante recombinación homóloga, de varios fragmentos de DNA en un plásmido. Esta técnica consiste en cotransformar levaduras con fragmentos de DNA que contienen en sus extremos 3' y 5' regiones que son homólogas a los fragmentos contiguos o al vector, con los cuales se desea realizar la fusión. Además, se incluye el plásmido en el cual se desea hacer la clonación. En este caso se utilizó el pRS313. Los detalles de esta técnica se encuentran publicados en [164].

Mutagénesis dirigida

Para generar las construcciones pDM323-IreA^{K603N} y pDM323-IreA^{N927A}, se diseñaron respectivamente dos juegos de oligonucleótidos complementarios (K603N-IreA (FWD) y K603N-IreA (RV), N927A-IreA (FWD) y N927A-IreA (RV)) que se utilizaron para realizar una reacción de PCR con el kit de amplificación de la enzima KAPA HiFi (*KAPA BIOSYSTEMS*), en la cual se utilizó como templado el vector pGEM-IreA. En cada reacción se utilizó cada uno de los oligonucleótidos a una concentración final de 5µM, dNTPs a 300µM (mezcla 10mM contenida en el kit) y de 3-5ng de plásmido, en un volumen final de 25µl. El programa de amplificación utilizado fue el siguiente: desnaturalización inicial de 5min a 95°C; 15 ciclos de amplificación en los que se usó una desnaturalización de 20s a 98°C, 30s de alineamiento a 60°C y 270s de amplificación a 65°C, y finalmente se realizó un ciclo de amplificación por 5min a 65°C. Posteriormente, esta reacción se digirió durante 2hrs con 10unidades de la enzima DpnI (Invitrogen) y se purificó todo el producto por columna (*QIAquick Extraction kit, Qiagen*) y se transformaron células de *E. coli* DH5a con 25µl del producto. Se seleccionaron varias transformantes, de las cuales se obtuvo el plásmido por miniprep y se evaluó la presencia de la mutación puntual por secuenciación. Posteriormente se subclonó el producto del plásmido pGEM-t al pDM323 como se especifica en la **Tabla 3** para la construcción pDM323-IreA.

3.5-Metodologías para el manejo de *D. discoideum*

Todos los protocolos para la preparación de los medios aquí descritos y para el manejo de *D. discoideum* se encuentran detallados en la página <http://dictybase.org>

Condiciones de cultivo y desarrollo

Las células de *D. discoideum* se crecieron siempre a 22°C en incubadores estándar para microbiología. Para los cultivos líquidos (crecimiento axénico) se utilizó el medio HL5 (FORMEDIUM HLB0102), el cual se suplementó con glucosa al 1% y con un cóctel de penicilina y estreptomina (10 000 U /ml penicilina and 10 000 mg/ml estreptomina; Gibco). Para crecer las amebas en asociación con bacterias se utilizaron placas de medio sólido SM (1% glucosa (Sigma), 1% peptona (Difco), 0.1%

extracto de levadura, 4mM $MgSO_4$, 13mM KH_2PO_4 , 3mM K_2HPO_4 y 2%agar), en las que se esparcía *Klebsiella aerogenes* (cepa Ka) antes de depositar las células. Para inducir ayuno, se utilizó el buffer PDF (20mM KCl, 9mM K_2HPO_4 , 13mM KH_2PO_4 , 1mM $CaCl_2$, 1mM $MgSO_4$, pH 6.4).

Para los experimentos de desarrollo se colectaron por centrifugación (1000 rpm por 5 min) 5×10^7 células que estaban creciendo de forma axénica en HL5. Posteriormente se suspendieron en buffer PDF y se depositaron en filtros de nitrocelulosa (Millipore, HABP04700) que se mantuvo humedecido con PDF sobre papel filtro.

Se utilizó Blastidina (10 μ g/ml), G418 (10 μ g/ml) e higromicina (25 μ g/ml) respectivamente como antibióticos para la selección de células transformantes.

Tratamientos

Las drogas utilizadas se prepararon en soluciones concentradas que se mantuvieron congeladas (-20°C). La tunicamicina (TN) se diluyó en DMSO (stock a 1 μ g/ml); y se prepararon en agua tanto el ditiotreitol (DTT) (stock a 1M), como la 2-deoxi-D-glucosa (2-DOG) (stock a 2M). Para los tratamientos, las drogas se diluyeron a la concentración deseada en medio HL5 al momento del experimento. Las células fueron tratadas siempre mientras se encontraban creciendo de forma axénica durante la fase exponencial.

Transformación

Para transformar amebas de *D. discoideum*, se lavaron y se electroporaron 5×10^6 células por celda, con 2-10 μ g de DNA lineal. Estas células fueron lavadas previamente con buffer H50. Este protocolo de transformación ha sido descrito previamente en [165]. El proceso de selección se llevó a cabo en placas para cultivo celular estándar de 60 o de 100mm. Las células se mantuvieron en medio HL5 suplementado con el antibiótico de selección necesario por aproximadamente 4-8 días. Tras este tiempo, las células transformadas con plásmidos fueron mantenidas en placas de cultivo líquido con medio fresco HL5 suplementado con el antibiótico necesario (G418 o higromicina). Mientras que las células en las que se deseaba generar la inserción de fragmentos de DNA se esparcieron en placas de agar SM en presencia de *K. aerogenes* para aislar clonas. Se evaluó mediante PCR de colonia si los eventos de recombinación fueron exitosos. Para esto, se extrajo el DNA a partir de amebas que se tomaron de la zona de crecimiento de las clonas que se encontraban creciendo en placas de SM. Para esto se utilizó la solución de extracción *Master amp DNA* (Epicentre) siguiendo las instrucciones del proveedor. Se utilizó 1 μ l del extracto de DNA para 50 μ l de solución de PCR.

Para comprobar la interrupción del locus se siguió la estrategia mostrada respectivamente en cada caso.

3.6- Ensayos de viabilidad mediante goteo de diluciones seriales

Antes de comenzar con los tratamientos se ajustaron a 1×10^6 células/ml los cultivos, los cuales se encontraban creciendo en líquido durante la fase exponencial ($2-3 \times 10^6$ células/ml). Posteriormente, los cultivos ajustados fueron tratados con la droga señalada (DTT, 2-DOG o TN) a las concentraciones especificadas y durante los tiempos referidos. Posteriormente, se prepararon diluciones seriales 1:10 de estas células en medio HL5 fresco y se depositaron gotas ($4 \mu\text{l}$) de estas diluciones sobre placas de agar SM en las que se había esparcido previamente *K. aerogenes*. Se tomaron fotos de las placas después de incubarlas a 22°C durante 5-7 días dependiendo del experimento.

3.7- Extracción de RNA y secuenciación masiva profunda de RNA

Se ajustaron las células a una densidad de 1×10^6 células/ml y se trataron durante 16hrs con $2 \mu\text{g/ml}$ de TN o con el vehículo (DMSO), los cuales se disolvieron en HL5. Posteriormente las células se centrifugaron y se lavaron con PDF. El RNA se extrajo con un protocolo estándar con Trizol (Sigma). Los ensayos de secuenciación masiva profunda de RNA (RNAseq) se realizaron en la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, CDMX, México. El ensamblaje y análisis de los datos obtenidos se realizó en la Unidad de Cómputo de este mismo instituto. Para esto se utilizó el software TopHat y Cufflinks [166]. Las listas de genes que presentaron diferencias significativas en la abundancia de sus transcritos entre las diferentes condiciones se obtuvieron con el mismo software mediante el análisis de dos réplicas. Los datos crudos pueden obtenerse de la base de datos GEO del NCBI usando el número de acceso GSE104409.

Las listas de genes que presentaron cambios significativos se filtraron para obtener solamente los transcritos que se encontraban representados por al menos 1 mensajero por célula. De acuerdo con Parikh, A., *et al.* [167], bajo nuestras condiciones, 15 cuentas normalizadas representarían un mensajero. Los genes que cuya expresión mostró una tasa de cambio mayor o igual a 2.5 veces (Log_2 de la tasa de cambio ≥ 1.3 ó ≤ -1.3) entre las condiciones analizadas, se evaluaron y clasificaron con la herramienta DAVID [168], la cual permite generar grupos de términos de ontología (gene ontology, GO) que se encuentren enriquecidos en una lista de genes. Se generaron los grupos de enriquecimiento de GO para las categorías de proceso biológico, componente celular y dominios proteicos.

3.8- Preparación de células para inmunofluorescencia

Se ajustaron cultivos de células creciendo de forma axénica, durante la fase exponencial, a una densidad de 1×10^6 células/ml y se aplicó el tratamiento deseado. Posteriormente se depositaron

300µl de células por pozo, en una placa de 8 pozos Ibidi m-Slide la cual había sido tratada previamente con una solución de polilisina aproximadamente por 12hrs y que fue lavada con buffer PDF justo antes de su uso. Estas células se incubaron a 22°C, y transcurrido el tiempo deseado de tratamiento, se retiró el medio y se fijaron por 15min con 2% de paraformaldehído en PDF (preparado a partir de un stock de PFA al 10% en agua y una solución de PDF 10x). Se lavó el exceso de PFA en la preparación y se incubó por 30min en buffer de bloqueo (0.5% de NP-40 y Albúmina sérica bovina al 2% en buffer PDF) a temperatura ambiente (T/A). Posteriormente se incubó toda la noche a 4°C con una dilución del anticuerpo primario deseado (**Tabla 4**) preparada en buffer de bloqueo. Se lavó el exceso de anticuerpo primario y se incubó con anticuerpo secundario (**Tabla 4**) diluido en buffer de bloqueo por 30min a T/A. Se lavó el exceso de anticuerpo y se aplicó PDF con azida de sodio hasta el momento de visualización o se cubrió cada pozo con un cubreobjetos fijado con ProLong Gold Antifade Mountant (*Thermo Fisher*).

En todos los casos los lavados se efectuaron con PDF y la tinción con 4',6-diamino-2-fenilindol (DAPI) se realizó de forma estándar, incubando las preparaciones durante 2min a T/A con una solución 1:2000 preparada en PDF.

3.9-Microscopía

Se utilizó un microscopio confocal invertido espectral Zeiss LSM710. Para todos los casos, las células fueron ajustadas a la densidad deseada, se trataron dependiendo del experimento y se transfirieron a placas de 8 pozos Ibidi m-Slide. Para los experimentos con células vivas, las placas se mantuvieron a 22°C hasta el momento de su visualización. La preparación para inmunofluorescencia se detalla en la sección previa.

3.10- Western blot

Para obtener extractos totales de proteína, las células por analizar se centrifugaron, se lavaron con PDF y se suspendieron en buffer de lisis (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5 mM EDTA, 0.5% NP-40, 0.05% SDS) suplementado con inhibidores de proteasas (*Sigma-Aldrich*, P8340). Posteriormente, la suspensión se incubó durante 30 min en hielo y se centrifugó (15 min., 4°C). Se cuantificó la concentración de proteína de los sobrenadantes obtenidos utilizando el kit comercial BCA (*Thermo Fisher Scientific*). Los extractos totales celulares se separaron mediante electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de PVDF (*Millipore*) que fueron bloqueadas por 1hr en Buffer TBS (Tris Buffered Saline) adicionado con tween al 0.05% (TBSt) adicionado con leche al 5%. Según el experimento, se utilizaron los anticuerpos contenidos en la **Tabla 4** diluidos en TBSt con leche al 5% o al 9%. Los lavados se realizaron con TBSt. Los análisis de densitometría se realizaron con el programa Image-J. Estas medidas se utilizaron para determinar los niveles arbitrarios de proteína. Para esto, dependiendo del ensayo, se utilizó la señal de MCCC1 o de la GFP-PgkA como control de carga para normalizar.

3.11- Ensayos para evaluar la autofagia

Para evaluar la inducción de la autofagia se transformaron las células con el plásmido pJSK489 y se visualizaron mediante microscopía confocal *in-vivo* tras haber sido tratadas como se indica en cada experimento. El número de células que presentaba acumulaciones de GFP-Atg18 se cuantificó manualmente con la ayuda del programa Image-J. Para esto, se analizaron las proyecciones máximas y las fotos individuales.

La capacidad de degradación autofágica se evaluó utilizando un protocolo modificado del ensayo de proteólisis descrito previamente para *D. discoideum* [142], [162]. Para esto, se utilizaron células transformadas con el vector pDM358-GFP-PgkA. En todos los experimentos se utilizaron células creciendo en fase exponencial. Los cultivos se ajustaron a una densidad de 1×10^6 células/ml y se trataron con TN 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o su vehículo (DMSO) por 8hrs. Durante las últimas 2 horas de tratamiento con TN, se añadieron dos pulsos de 150mM NH_4Cl a partir de un stock preparado en agua a 2M. Tras este tratamiento, las células se colectaron y se lisaron para poder realizar el análisis mediante western blot, como se encuentra descrito en la sección previa.

3.12-Análisis bioinformáticos

Todas las secuencias de *D. discoideum* se obtuvieron de la base de datos de su genoma Dictybase [169]. Los análisis de BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) se realizaron también en la herramienta provista por esta misma página. Las secuencias proteicas se obtuvieron de la base de datos UNIPROT. Para los alineamientos locales de dos proteínas se utilizó la herramienta SIM [170] y los resultados se visualizaron con LALNVIEW [171]. Los alineamientos múltiples se realizaron con CLUSTAL OMEGA [172].

3.13- Análisis estadísticos

Se graficaron utilizando el software GraphPad Prism 5 los promedios, desviación estándar y significancia de al menos tres ensayos independientes de cada experimento. Dependiendo de las variables del experimento, la significancia estadística se analizó con este mismo programa mediante la prueba de t de Student, ANOVA de una vía con la prueba de Dunnet o de dos vías con la prueba de Bonferroni.

4.- RESULTADOS

4.1- Inducción de estrés de RE en *D. discoideum*

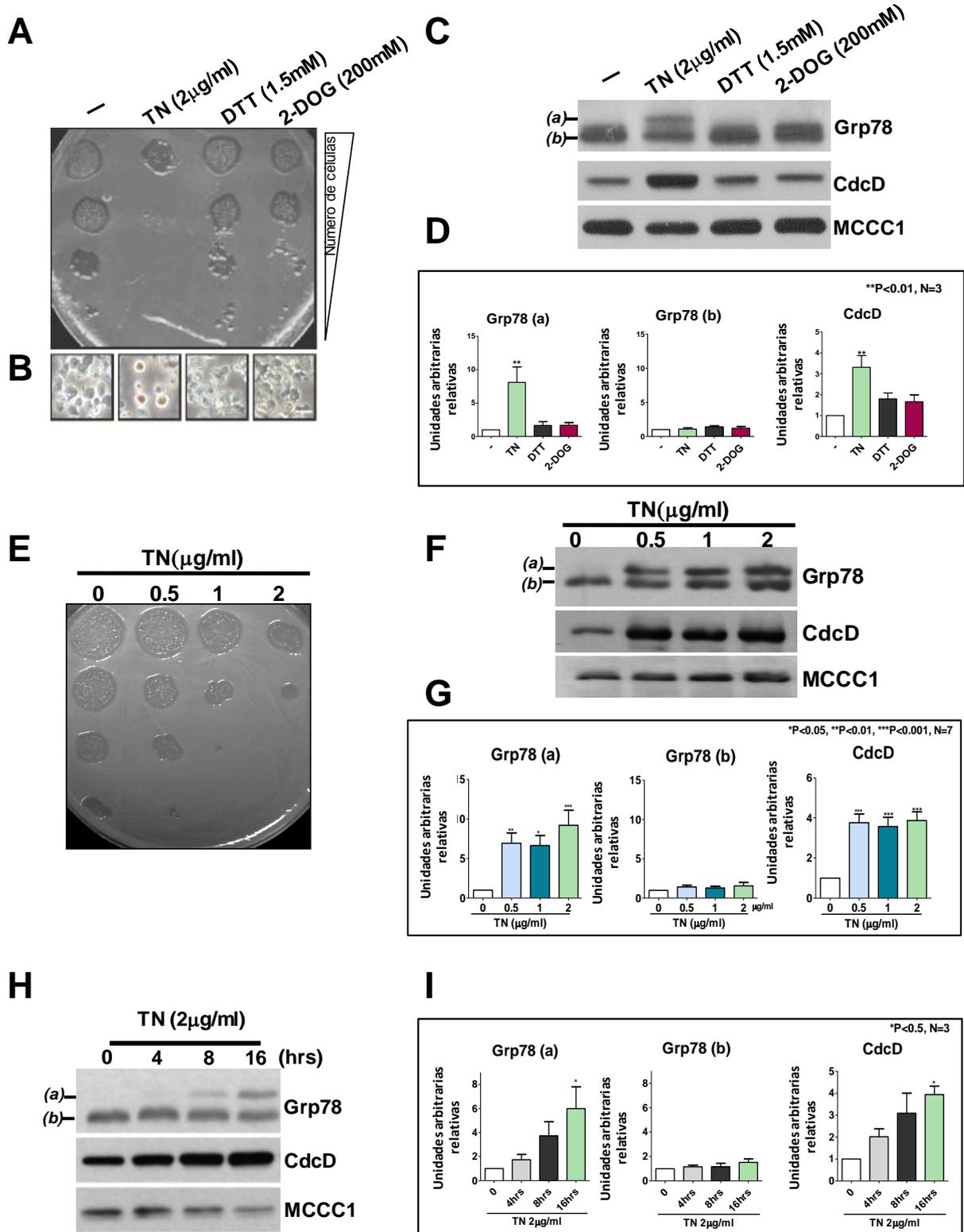
Dado que no existían reportes previos en los que se hubiese caracterizado la respuesta al estrés de RE en *D. discoideum*, se analizó el efecto de la TN, la 2-DOG y el DTT. Estas tres drogas se han utilizado ampliamente como inductores de ERE en levaduras y en mamíferos [173], [174]. Se crecieron células de *D. discoideum* de forma axénica hasta que alcanzaron la fase media exponencial (a una densidad aproximada de 2×10^6 células/ml) y posteriormente se trataron durante 16h con TN (2 μ g/ml), con 2-DOG (200mM) o con DTT (1.5mM). Estas concentraciones se eligieron con base en las concentraciones comúnmente utilizadas para inducir estrés de RE en mamíferos [173]. El efecto de estos tratamientos sobre la viabilidad celular en *D. discoideum* se evaluó mediante un ensayo adaptado a partir de los experimentos de goteo que se utilizan comúnmente en levaduras [175], [176]. Para esto, se depositaron sobre un césped de bacterias, alícuotas de las diluciones seriales (por un factor de 10) de células de *D. discoideum* que fueron preparadas a partir de los cultivos de amebas tratadas con las drogas. De esta forma se caracterizó la capacidad de las amebas para recuperar el crecimiento en asociación con bacterias después de un tratamiento. Además, se evaluaron también los efectos de las drogas en la morfología celular mediante microscopía óptica. De las tres drogas que se emplearon, sólo el tratamiento con TN tuvo un efecto en la viabilidad y en la morfología de las células (**Figura 10A**). En el ensayo de goteo, solo las diluciones con la mayor densidad celular produjeron un halo de crecimiento y las células adquirieron una forma redondeada y refringente; además de que perdieron adherencia y cesaron de dividirse.

En otros organismos se ha descrito ampliamente que el estrés de RE incrementa la expresión de las chaperonas residentes del RE y de componentes del proceso de degradación de proteínas asociada al RE (ERAD, *Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) [177], [178], por lo que evaluamos si en *D. discoideum* un tratamiento con TN, 2-DOG o DTT causaba cambios en la expresión de la chaperona Grp78 (identificada en este estudio, ver **Tabla 4**) y de CdcD, ortólogo de la AAA ATPasa Cdc48 que en levaduras participa en la ERAD asistiendo la retrotranslocación de proteínas para permitir que sean degradadas por el proteasoma [179]. Para esto, se analizaron mediante western blot, los extractos totales de las células que fueron tratadas con las drogas (**Figura 10C**). Para esto se utilizaron respectivamente, un anticuerpo anti-Grp78 de humano y un anticuerpo anti-CdcD de *D. discoideum*.

La inmunodetección de Grp78 en los extractos celulares tratados con TN reveló la presencia de tres bandas (**Figuras 10C, F y H, señaladas como α y β**). Una de ellas, la que migró en la posición de mayor peso molecular, corresponde con el tamaño estimado a partir de la secuencia primaria del ortólogo

en *D. discoideum* de Grp78 (72kDa). Al analizar mediante densitometría varios ensayos de inmunodetección, se observó que la proteína que migró en esta posición fue la única que presentó un incremento en su expresión tras un tratamiento con TN. Las otras dos proteínas detectadas por el anticuerpo contra Grp78, presentaron un peso molecular cercano al estimado para las chaperonas citosólicas de la familia de las Hsc70, HspB (70kDa) y HspE (69kDa), y no presentaron cambios significativos en su expresión ante ninguno de los tratamientos (**Figuras 10D, G, I**). Con estos datos se puede concluir que solamente la TN es capaz de generar un estrés y afectar la viabilidad celular, en cambio la 2-DOG y el DTT parecen que no generar ningún efecto en estas células, al menos en las concentraciones empleadas.

Figura 10. (Página siguiente). Inducción de estrés de RE en células de *D. discoideum*. **(A)** Ensayo para analizar el efecto sobre la viabilidad celular de un tratamiento con DTT, 2-DOG, TN o vehículo (DMSO). Se trataron amebas en crecimiento axénico con las drogas indicadas durante 16hrs y se depositaron gotas de las diluciones seriales preparadas con estas células sobre una placa de SM en la que se había esparcido previamente *K. aerogenes*. La placa se incubó a 22°C y se fotografió 7 días después. **(B)** Imágenes adquiridas mediante microscopía de luz de las células en A, antes de realizar el ensayo de goteo (escala 10µM) **(C)** Western blot que muestra la expresión de Grp78 y CdcD en células tratadas como en A. **(D)** Cuantificación por densitometría de las bandas observadas en el panel C. El gráfico muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos relativo al nivel observado en la condición control (vehículo). El nivel de Grp78 y CdcD se ajustó usando el control de carga (MCCC1). **(E)** Ensayo en el que se analizó la viabilidad de células tratadas con diferentes concentraciones de TN durante 16hrs. **(F)** Western blot en el que se observa la expresión de Grp78 y CdcD ante un tratamiento con diferentes concentraciones de TN y **(G)** gráfico que muestra el promedio y la desviación estándar de la cuantificación de 7 experimentos realizada como en D. **(H)** Western blot en el que se muestra la expresión de Grp78 y CdcD tras diferentes tiempos de tratamiento con 2mg/ml de TN y **(I)** gráfico que muestra el promedio y la desviación estándar de la cuantificación de 3 experimentos, realizada como en D. En todos los casos se muestran fotografías representativas de un experimento y los asteriscos en los gráficos denotan las diferencias estadísticamente significativas.



Además, se confirmó que este anticuerpo fuese capaz de detectar al ortólogo de Grp78 mediante un ensayo en el cual se sobreexpresó en bacterias esta proteína. Al analizar mediante western blot los extractos totales de bacterias en las que se indujo la expresión de Dd-Grp78, se observó que el anticuerpo fue capaz de detectar una proteína cuya migración está en el rango de los 72kDa (**Figura 11**).

Todo esto llevó a concluir que en efecto, esta proteína corresponde al ortólogo de Grp78 de *D. discoideum*.

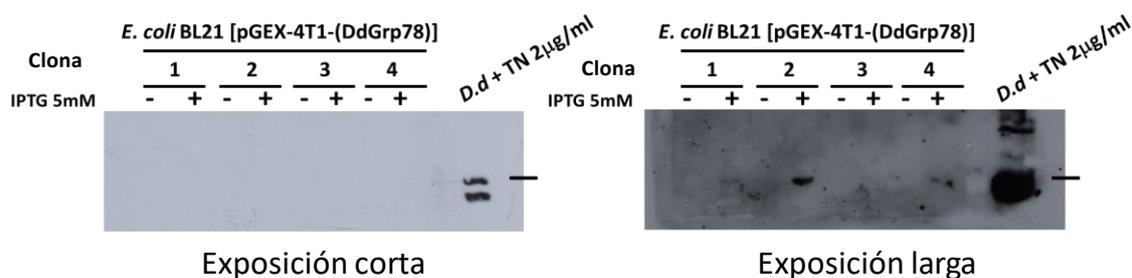


Figura 11. El anticuerpo contra Grp78 de humano reconoce al ortólogo de *D. discoideum*. Se transformaron células de *Escherichia coli* BL21 con el vector pGEX-4T1-DdGrp78, se indujo con IPTG la expresión de la proteína en cultivos de cuatro colonias diferentes y posteriormente se analizaron mediante western blot los extractos totales de proteína de estas células. Se incluyó como control un extracto total de amebas de *D. discoideum* tratadas con TN.

En el caso de CdcD, se observó que la TN indujo significativamente su expresión, al igual que la de Grp78 (**Figuras 10C y D**). La expresión tanto de Grp78 como de CdcD se incrementó de forma proporcional al tiempo de tratamiento con TN (**Figuras 10H e I**). Además, se encontró que el incremento en la expresión de ambas proteínas se da desde concentraciones tan bajas como 0.5 µg/ml de TN, aunque para afectar la viabilidad celular se requieren concentraciones mayores, como puede observarse en las **Figuras 10E y F**.

Los datos obtenidos a partir de todas las pruebas mostradas anteriormente, en las que se utilizaron diferentes inductores de estrés de RE, nos mostraron que es posible utilizar un tratamiento con TN para generar de forma experimental este tipo de estrés en *D. discoideum*. En cambio, la 2-DOG y el DTT a las concentraciones probadas, no causaron efectos significativos en la viabilidad celular, ni en la expresión de Grp78 y CcdD. Se ha reportado que la 2-DOG se internaliza muy pobremente en las células de *D. discoideum* [180], motivo por el cual posiblemente no cause ningún efecto en estas células. Por su parte, cuando el DTT se administra a concentraciones mayores a la que se muestran, altera fuertemente el equilibrio de óxido-reducción (REDOX) celular y causa efectos pleiotrópicos más allá del estrés de RE, por lo que no se realizaron más ensayos con concentraciones mayores de esta droga.

4.2-Identificación de las proteínas ortólogas de la UPR en *D. discoideum*

El hecho de que en *D. discoideum* el estrés de RE generara cambios morfológicos celulares, así como una inducción de la expresión de Grp78 y de CdcD, sugiere que debe existir una ruta de señalización capaz de generar una respuesta a este estímulo. Por lo tanto, se procedió a identificar si en *D. discoideum* existían proteínas ortólogas de los diferentes componentes de la vía de la UPR. Para esto, se realizó una búsqueda mediante BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) empleando la herramienta albergada en la página web de la base de datos del genoma de *D. discoideum* (www.dictybase.org) [169]. Para esto, se utilizaron las secuencias de aminoácidos de las proteínas IRE1, GRP78, XBP1/Hac1p/bZIP60, ATF6/bZIP28 y PERK, de humano, de *S. cerevisiae* y de *A. thaliana*. Con este análisis se identificó que en esta ameba existe un solo ortólogo de IRE1 codificado por el gen *DDB_G0267650/ireA*. Sin embargo, este análisis no nos permitió identificar ortólogos de los factores de transcripción XBP1 y ATF6 (**Tabla 5**).

Tabla 5. Resultados del análisis que se realizó para identificar los posibles homólogos de las vías de respuesta a estrés de retículo endoplásmico utilizando la herramienta BLAST de la base de datos de *D. discoideum*.

Proteína	Localizador	Tamaño *	Resultado	Tamaño *	E-value
Xbp1/Hac1p	<i>P17861 (XBP1_HUMAN)</i>	261/376	ND		
	<i>P41546 (HAC1_YEAST)</i>	230/238			
	<i>Q9C750 (BZP60_ARATH)</i>	258/295			
Ire1p/Ern1	<i>O75460 (ERN1_HUMAN)</i>	977	IreA	984	4e-69
	<i>P32361 (IRE1_YEAST)</i>	1 115			1e-75
	<i>Q93VJ2 (IRE1B_ARATH)</i>	881			2e-78
BiP/Grp78/Kar2p	<i>P11021 (GRP78_HUMAN)</i>	654	DDB_G0276445	658	0
	<i>P16474 (GRP78_YEAST)</i>	682			0
	<i>F4K007 (F4K007_ARATH)</i>	613			0
ATF6	<i>P18850 (ATF6A_HUMAN)</i>	670	ND		
	<i>Q9SG86 (BZP28_ARATH)</i>	675			
PERK	<i>Q9NZJ5 (E2AK3_HUMAN)</i>	1,116	IfkA	2 258	4e-30
			IfkB	1 358	2e-30

Esta búsqueda nos arrojó, con un muy buen valor de *E-value*, a IfkA y a IfkB como ortólogos de PERK en *D. discoideum*; sin embargo, estas proteínas carecen del dominio transmembranal típico que caracteriza a PERK, y además ya se ha descrito que representan ortólogos de Gcn2p, otra cinasa que como PERK también fosforila a la subunidad alfa del eIF2 [181], [182].

Por otra parte, esta búsqueda no arrojó ningún posible ortólogo de XBP1, ni de ATF6. Sin embargo, en el genoma de *D. discoideum* se encuentran anotados 19 factores de transcripción que contienen

un dominio bZIP (**Tabla 6**), por lo que, para se realizó un análisis de la secuencia proteica de cada uno de los posibles bZIPs para determinar si alguno de ellos presenta un dominio transmembranal o una región altamente hidrofóbica en la región carboxilo, característica estructural importante que define a este tipo de factores de transcripción. Se encontró que tres de estas proteínas, bzpC, bzpD y bzpJ, contienen un cruce transmembranal, mientras que seis de ellas, bzpH, bzpM, bzpO, bzpQ, bzpR y bzpS, contienen una zona hidrofóbica en su extremo carboxilo.

Para los estudios posteriores realizados para este trabajo, se eligió solamente a BzpD y a BzpJ, dado que son los únicos que presentan un probable cruce transmembranal, y porque ya han sido anotados como posibles factores de la familia bZIP. BzpD parece ser ortólogo de la isoforma C de Atf6 de *Drosophila* y BzpJ parece ser ortólogo de CREB3, un factor de transcripción de la familia de ATF6 que en mamíferos se ha observado que responde al estrés de RE (**Tabla 6**).

Tabla 6. Análisis de los factores de transcripción codificados en el genoma de *D. discoideum* que presentan un dominio básico de zipper de leucinas (bZIP). Se muestra la información sobre la presencia de regiones transmembranales (TM) o zonas hidrofóbicas (ZH), la función que ha sido anotada para estas proteínas en la base de datos del genoma de *D. discoideum*, así como si existen posibles ortólogos de esa proteína en otros organismos.

bZIP	TM	ZH	Función reportada/ortólogos
dimA	No	No	Regulador transcripcional implicado en la respuesta a la señalización por DIF-1 durante el desarrollo [183], [184].
dimB	No	No	Participa en la expresión de los genes pretallo en respuesta a DIF-1 durante el desarrollo [185].
bzpC	Si	Si	-
bzpD	Si	Si	Ortólogo del gen Atf6-C de <i>Drosophila</i> .
bzpE	No	No	-
bzpF	No	No	Factor de transcripción tipo CREB que participa en la señalización de la vía de PKA [186]. Ortólogo de YAP6 de levadura.
bzpG	No	No	Ortólogo de los factores de transcripción HYS-like y AtbZip64 de <i>A. thaliana</i> .
bzpH	No	Si	-
bzpI	No	No	-
bzpJ	Si	Si	Ortólogo de los factores de transcripción de humano Luman/CREB3 y de ABSCISIC ACID-INSENSITIVE 5-like protein 7 de <i>A. thaliana</i> .
bzpK	No	No	-
bzpL	No	No	Ortólogo de BZIP18 de <i>A. thaliana</i>
bzpM	No	Si	-
bzpN	No	No	Factor de transcripción homólogo a GCN4 de levadura [186].
bzpO	No	Si	-
bzpP	No	No	-
bzpQ	No	Si	-
bzpR	No	Si	Factor de transcripción que se expresa cuando la subunidad alfa del eIF2 se encuentra fosforilado. La mutante nula de este gen presenta un fenotipo similar a la mutante de eIF2alfa que no puede fosforilarse[182].
bzpS	No	Si	-

4.3- Caracterización de la ruta de IreA

4.3.1- IreA es una cinasa/ribonucleasa transmembranal residente del RE

IreA de *D. discoideum* es una proteína transmembranal tipo II de 984 aminoácidos la cual contiene en su extremo amino (N), una secuencia de 26 aminoácidos que presenta las características de una señal de direccionamiento al RE (**Figura 12A**). Esta proteína presenta un peso molecular (MW) de aproximadamente 112 kDa y contiene en su región carboxilo (C) terminal citoplasmática los dos dominios característicos de los ortólogos de IRE1: uno de cinasa de serinas y treoninas (residuos del 575 al 851), seguido de uno de ribonucleasa KEN (residuos del 854 al 984).

La similitud entre la secuencia proteica de los ortólogos de diferentes especies es aproximadamente de un 30%. La mayor identidad se encuentra restringida en la porción citoplasmática de las proteínas, específicamente en la región que contiene los dominios de cinasa y de ribonucleasa (**Figura 12A**). Al considerar la secuencia primaria completa, las proteínas que mostraron mayor identidad fueron las de *D. discoideum* y de *A. thaliana* (32.27%). En cambio, mediante un análisis de alineamiento local, se observó que las porciones citoplasmáticas de IreA de *D. discoideum* y de IRE1 α de humano son las que muestran mayor similitud.

Para determinar si IreA se localiza en la membrana del RE se generó una construcción que permitió etiquetarla con GFP y posteriormente, esta proteína de fusión se expresó en células silvestres. En las imágenes de microscopía confocal de la **Figura 12C** se puede observar que la GFP se distribuyó en un patrón reticular, que coincide con la distribución de la proteína disulfuro isomerasa (PDI), la cual se detectó mediante inmunofluorescencia. La PDI se utiliza comúnmente en *D. discoideum* como un marcador de RE, pues se ha reportado que es una chaperona que se localiza en el lumen de este organelo [157], [158]. También se puede observar que IreA se localiza rodeando a la señal de DAPI lo que indica que tiene también una distribución perinuclear.. Todo esto confirma que IreA es una proteína residente del RE.

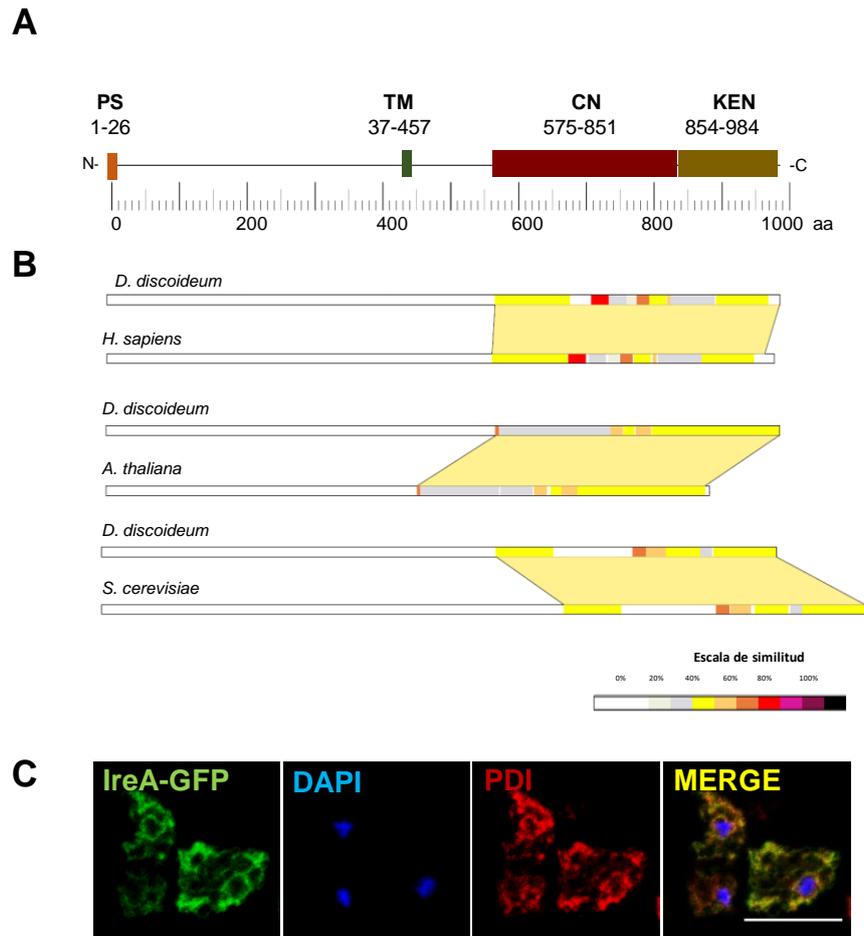


Figura 12. (A) Esquema de los dominios de IreA. PS (péptido señal), TM (transmembranal), CN (cinasa) y KEN (dominio *Kinase Extension Nuclease*). (B) Diagramas de los alineamientos locales entre las secuencias proteicas de los ortólogos de IRE1, respectivamente de *D. discoideum*, *H. sapiens* y *A. thaliana*. El código de color representa la similitud que existe entre ambas secuencias. Los alineamientos fueron generados con el programa SIM alignment y analizados con LALNVIEW. (C) Fotos obtenidas por microscopía confocal de amebas de *D. discoideum* WT expresando la construcción de IreA fusionada a la GFP (IreA-GFP). Las células se fijaron y se prepararon para detectar por inmunofluorescencia a la proteína disulfuro isomerasa (PDI) (en rojo), residente del RE. Los núcleos se tiñeron con DAPI.

4.3.2-IreA es necesaria para contender con el estrés de RE inducido con TN

Para evaluar el papel de IreA en la respuesta a estrés de RE y su posible participación en el proceso de desarrollo de *D. discoideum*, se generó una cepa mutante de esta proteína. Para esto, se interrumpió el locus de *ireA* mediante la inserción de un gen de resistencia a Blastidicina (BST) [159]; de esta forma, se generó una delección de 998 pares de bases. La inserción del casete BST y la ausencia de expresión del mensajero se corroboró mediante PCR y RT-PCR respectivamente (**Figura 13**).

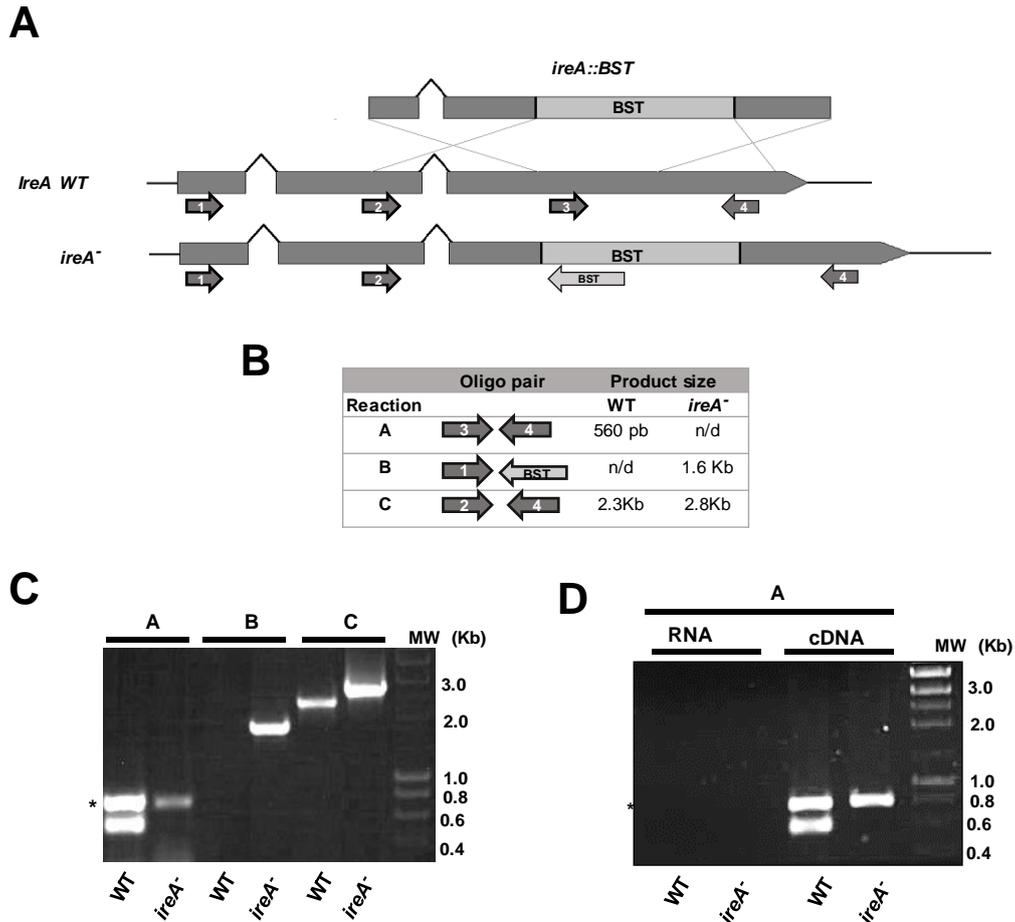


Figura 13. Interrupción del locus de *ireA*. **(A)** Diagrama de la metodología usada para generar la mutante *ireA*⁻. Se muestra el sitio en el que se insertó mediante recombinación homóloga la construcción generada para interrumpir el locus con un casete que contiene el gen de resistencia a la blasticidina (*ireA::BST*) y se muestran los sitios en los que se unen los diferentes oligonucleótidos que se utilizaron para verificar mediante PCR la interrupción y la inserción de BST en *ireA*. **(B)** Tabla que muestra el tamaño de los productos que se obtienen al usar las parejas de oligonucleótidos señaladas en A. **(C y D)** Productos que se obtuvieron al amplificar mediante PCR el **(C)** DNA o **(D)** el cDNA de las cepas especificadas. *Amplificado de un gen no relacionado que se incluyó como control de la reacción de PCR.

La cepa *ireA*⁻ no presentó defectos significativos durante el crecimiento axénico, ni en asociación con bacterias. Únicamente, se detectó en los ensayos de desarrollo en filtro, que se llevan a cabo en ausencia completa de nutrientes, que la cepa *ireA*⁻ se mantuvo más tiempo en la fase migratoria de gusano. Sin embargo, las células de la mutante *ireA*⁻ lograron completar el ciclo de desarrollo y formaron cuerpos fructíferos normales y con esporas viables (**Figura 14A**). Esto indica que la ausencia de IreA no genera efectos drásticos ni en la diferenciación y ni durante el desarrollo.

Se evaluó el efecto de la TN sobre la cepa *ireA*⁻ mediante observaciones de microscopía óptica y se analizó su viabilidad mediante un ensayo de goteo de diluciones seriadas de células. Un tratamiento de 16hrs con TN produjo que las células se redondearan y se observaran refringentes, así como una gran proporción de lisis celular (**Figura 14B**). De la misma manera, los tratamientos con TN por 4, 8 y 16hrs evitaron por completo que el crecimiento de las células mutantes en placas que contenían un

césped bacteriano (**Figura 14C**). Finalmente, en las células *ireA*⁻ tratadas por 16hrs con TN la expresión de Grp78 y de CdcD fue menor que en la cepa WT, tratada bajo las mismas condiciones (**Figuras 14D y E**).

Todas estas observaciones indican que en *D. discoideum*, IreA es indispensable para que las células puedan contender con un tratamiento que genera estrés de RE, lo cual sugiere que esta proteína participa en una ruta de señalización involucrada en mantener la homeostasis del RE.

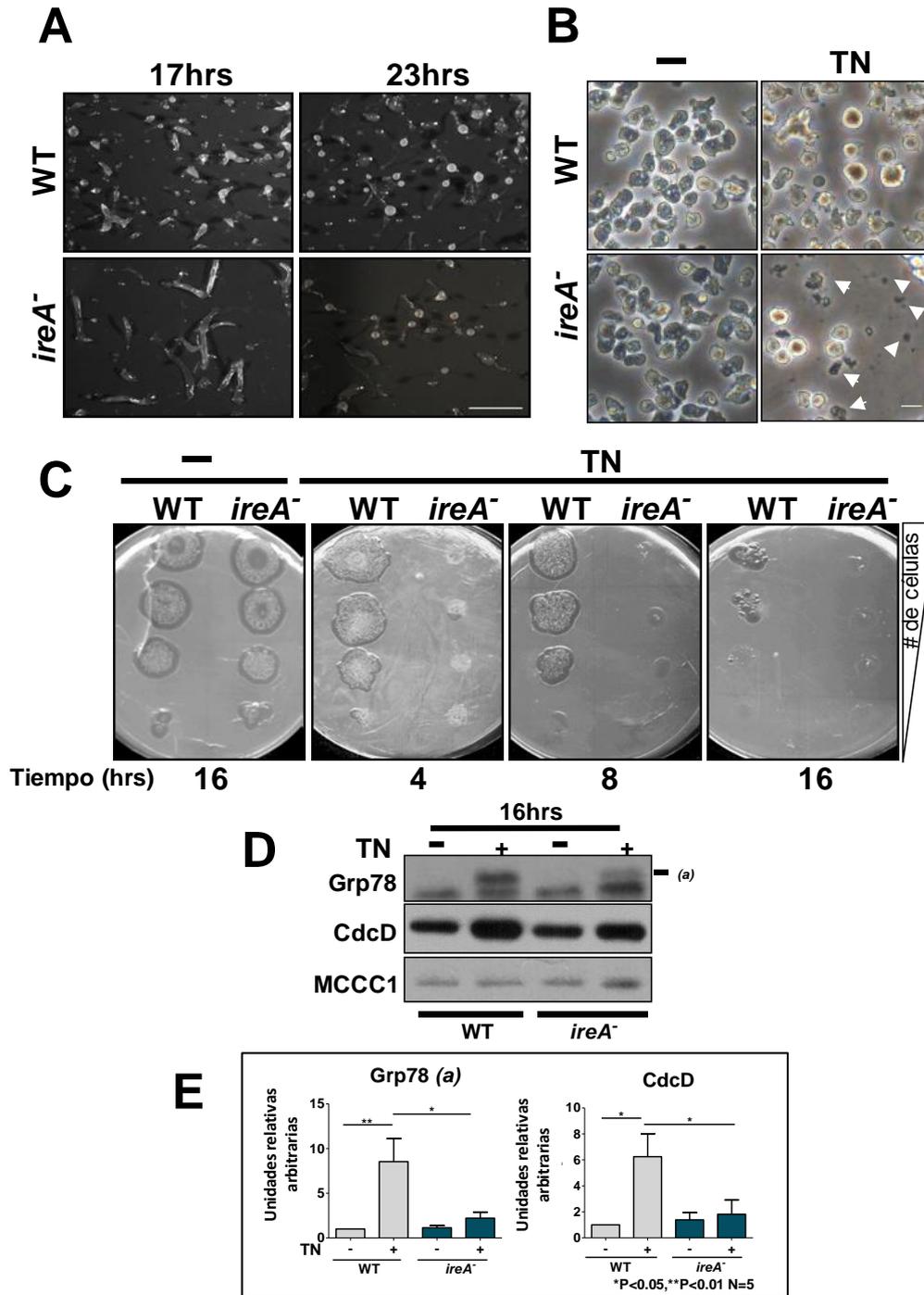


Figura 14. Fenotipo de la mutante *ireA*: **(A)** Efectos de la ausencia de IreA sobre el desarrollo. Se muestran fotografías representativas de células tras 17 y 23hrs de haber sido depositadas en un filtro para que se desarrollaran (escala 1mm). **(B)** Fotografías obtenidas mediante microscopía óptica de amebas de *D. discoideum* WT o *ireA*⁻ tras haber sido tratadas por 16hrs con TN (2µg/ml) o su vehículo (DMSO). Las flechas indican restos celulares (escala 10µM). **(C)** Ensayo de goteo de diluciones seriales de células para evaluar la viabilidad de la cepa WT e *ireA*⁻ tras un tratamiento con TN (2µg/ml) durante los tiempos indicados. **(D)** Imagen representativa de un ensayo de western blot para evaluar la expresión de Grp78 y CdcD en las cepas WT e *ireA*⁻ tras un tratamiento con TN (2µg/ml). **(E)** Gráfico del promedio y la desviación estándar del análisis densimétrico de 5 experimentos, relativo al nivel observado en la condición control (vehículo) de la cepa WT. Todas las muestras se ajustaron con respecto a su control de carga (MCCC1). Los asteriscos denotan las diferencias significativas.

4.3.3-Los dominios de cinasa y de ribonucleasa de IreA

Para examinar la participación de los dominios de cinasa y de ribonucleasa de IreA durante la respuesta al estrés de RE, se generaron de forma independiente una mutante puntual sin actividad de cinasa, y una mutante puntual sin actividad de ribonucleasa. La inactivación del dominio de cinasa se consiguió al remplazar un residuo conservado de lisina localizado en el sitio de unión a ATP por un residuo de asparagina (*ireA*^{K603N}). Para generar una mutante sin actividad de ribonucleasa, se sustituyó una asparagina conservada en el sitio activo del dominio KEN por una alanina (*ireA*^{N927A}) (Figura 15A). En otros organismos, se ha comprobado que las mutaciones correspondientes inactivan eficientemente tanto la actividad de cinasa como de ribonucleasa [187], [188].

Se generaron construcciones para expresar ambas mutantes puntuales fusionadas a la GFP y se transformaron células *ireA*⁻ respectivamente con la construcción que contenía la forma WT (IreA-GFP), o con una de las mutantes puntuales (*ireA*^{K603N}-GFP o *ireA*^{N927A}-GFP). Se examinó mediante microscopía confocal la expresión y la localización de estas versiones de IreA en células que fueron preparadas para inmunofluorescencia, en las que se detectó la PDI. Observamos que, al igual que la forma WT de IreA, ambas mutantes puntuales se expresaron correctamente y se localizaron en el RE (Figura 15B).

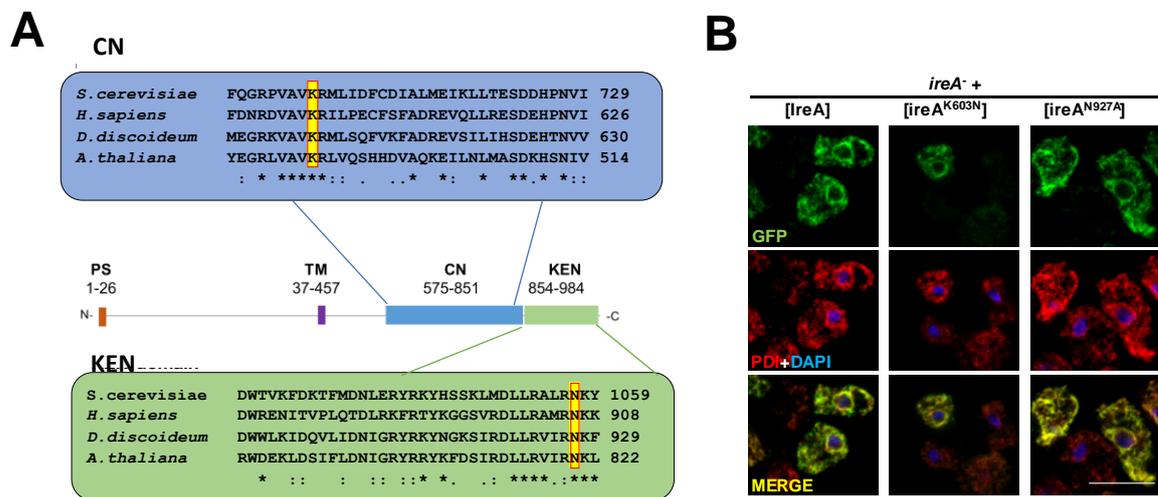


Figura 15. (A) Diagrama en el que se muestran los aminoácidos conservados de IreA que se mutaron para inactivar respectivamente su dominio de cinasa (CN) (sustitución de la K603 por N) o el dominio de ribonucleasa (KEN) (cambio de la N927 por A). Se muestra un alineamiento de los ortólogos de IreA de *S. cerevisiae*, *H. sapiens*, *D. discoideum* y *A. thaliana* de estas zonas conservadas. (B) Imágenes obtenidas mediante microscopía confocal de células expresando respectivamente la forma silvestre de IreA fusionada a la GFP, o las formas mutadas de esta proteína con los cambios K603N o N927A. Las células se prepararon para la detección mediante inmunofluorescencia de la PDI (rojo), y para los núcleos mediante la tinción de DAPI.

Posteriormente, se siguió mediante microscopía confocal *in-vivo* la expresión y localización de las tres formas de IreA durante diferentes tiempos de tratamiento con TN, ya que se ha descrito que la actividad de IreA en mamíferos y en levaduras se regula de manera dependiente a su estado de oligomerización. Ire1 transita de una forma monomérica a una forma oligomérica durante un estímulo de estrés, y cuando la célula comienza el proceso de adaptación a este, IRE1 retoma su forma monomérica [189], [190]. Como puede observarse en la **Figura 16A**, en *D. discoideum* las tres formas de IreA que se probaron formaron oligómeros al ser tratadas con TN (que se observan como puntos en la **Figura 16A**). Aproximadamente el 40% de las células que expresaban la forma WT de IreA presentaron puntos sobre el RE entre las 2 y las 4hrs de tratamiento con TN. Como se observa en la **Figura 16B**, el porcentaje de células en las que se pudo observar la formación de oligómeros de IreA difirió dependiendo de si expresaban la forma WT o alguna de las mutantes puntuales. En comparación con la cepa que expresaba la forma WT de IreA, un porcentaje significativamente menor de células presentó oligómeros en la cepa que expresaba la forma sin actividad de cinasa (*ireA^{K603N}*), mientras que casi el total de las células que expresaban la forma con la ribonucleasa inactiva (*ireA^{N927A}*) presentaron oligómeros en todos los tiempos de tratamiento que fueron analizados.

Las observaciones anteriores indican que las formas mutantes de IreA probablemente mantienen su estructura, ya que son capaces de oligomerizarse ante el estrés de RE, por lo que su efecto en la viabilidad celular ante un tratamiento con TN. Para esto, se realizó un ensayo de goteo de diluciones seriadas como el que se describió anteriormente. Se observó que, sólo las células que expresan la forma silvestre de IreA fueron capaces de crecer en placas después de un tratamiento con TN, mientras que las mutantes carentes de las actividades de cinasa y de ribonucleasa se comportaron como la cepa *IreA⁻*, es decir son altamente sensibles al antibiótico (**Figura 16C**). De la misma manera, la expresión de Grp78 y de CdcD solo aumentó ante un tratamiento con TN en las células que expresaban la forma silvestre y no en las que expresaban las formas mutantes (**Figuras 16D y E**).

Las células *ireA⁻* que expresaban las formas mutantes de IreA (*K603N* o *N297A*) no sólo no fueron capaces de reestablecer el crecimiento tras un estrés de RE sino que además, fueron incapaces de mantener la estructura del RE. Como se observa en las **Figuras 16A y 16F**, el RE de las células que expresaban la forma WT conservaron la estructura del RE durante el tratamiento con TN; sin embargo, se observó que en un porcentaje significativo de las células que expresaban las formas mutantes de IreA, el RE tenía una estructura anormal en la que eran visibles regiones colapsadas.

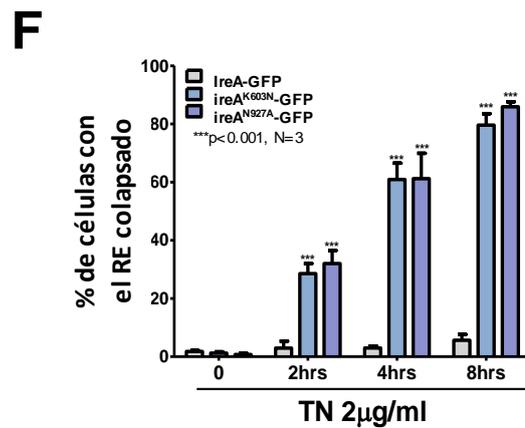
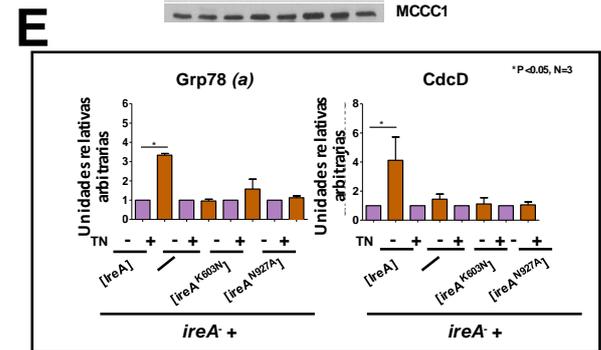
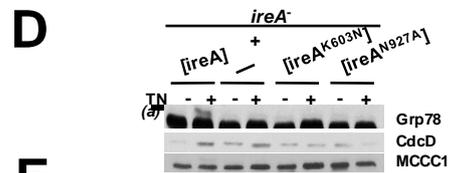
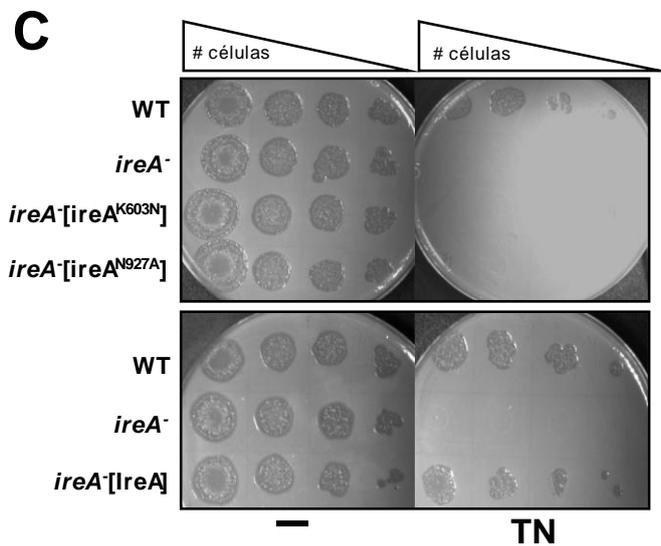
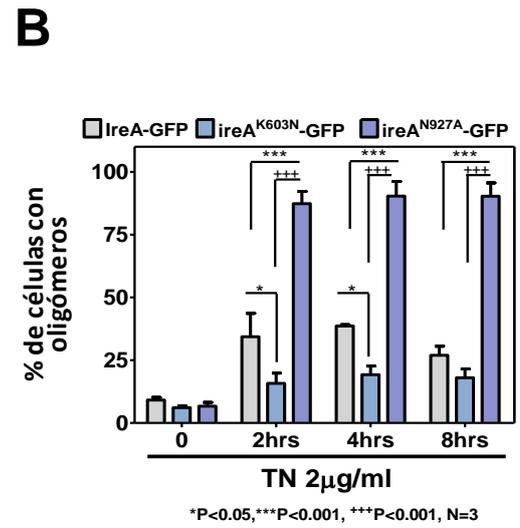
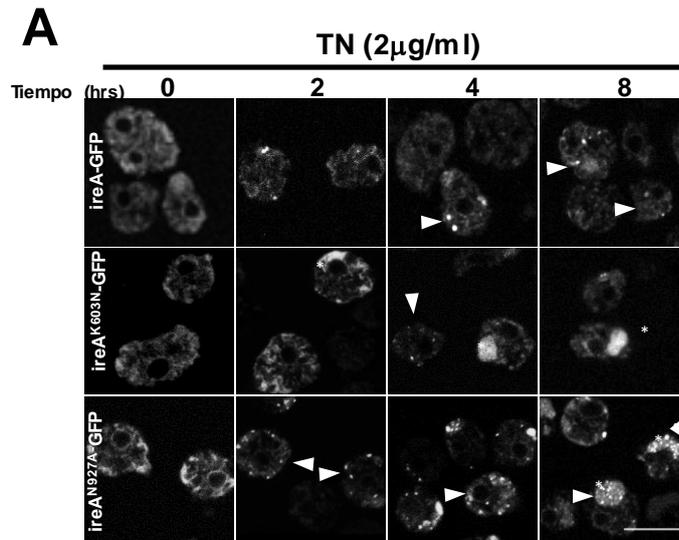
Todos estos datos en conjunto muestran que las formas mutantes de IreA son capaces de sentir condiciones de estrés, ya que pueden formar oligómeros. Sin embargo, cuando IreA no presenta actividad de cinasa o de ribonucleasa, no puede dispararse la respuesta al estrés, y por consiguiente la estructura del RE y su homeostasis se ven comprometidas.. Además, se observó que el proceso de

formación y disociación de los oligómeros resultó defectuoso en las mutantes inactivas de IreA. Esto sugiere que se requiere que IreA se encuentre completamente activa para regular su propia dinámica de oligomerización, y posiblemente su señalización.

4.3.4-La respuesta transcripcional al estrés de RE depende parcialmente de IreA

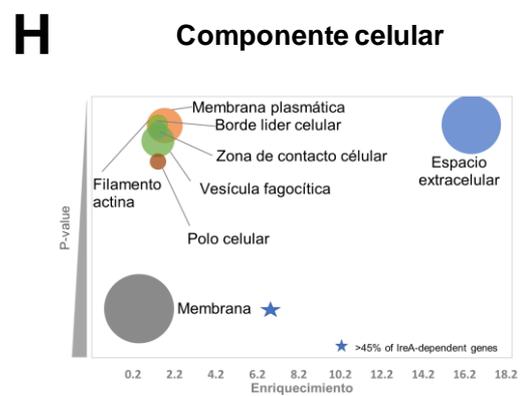
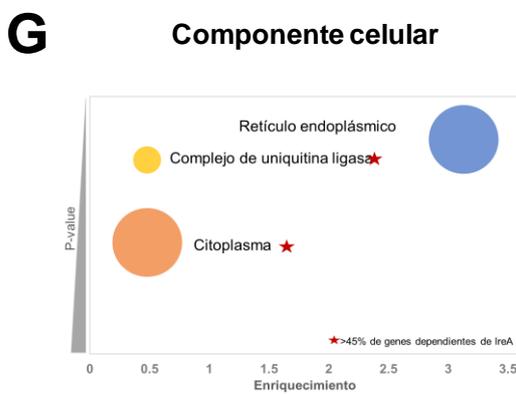
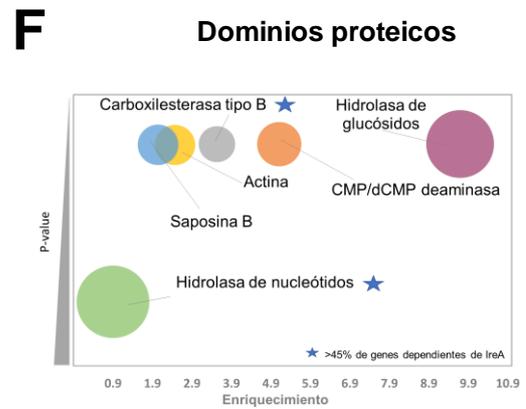
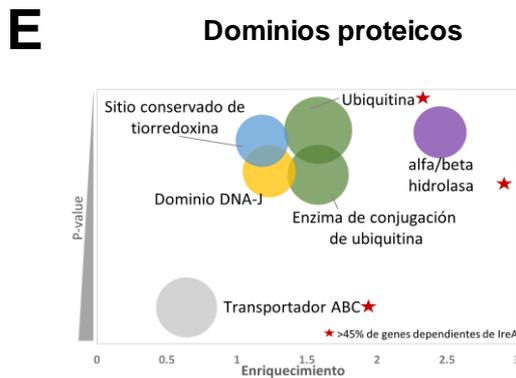
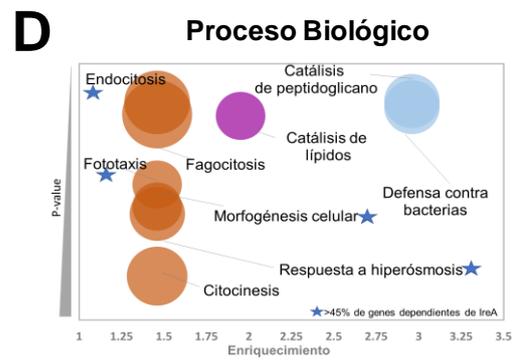
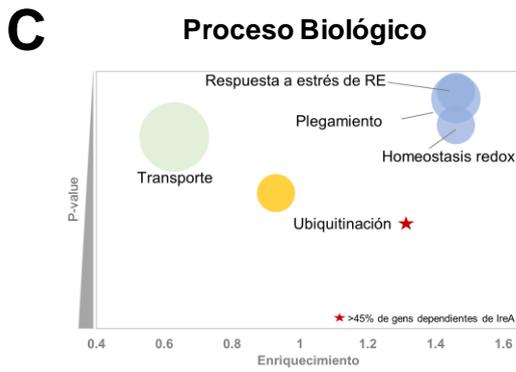
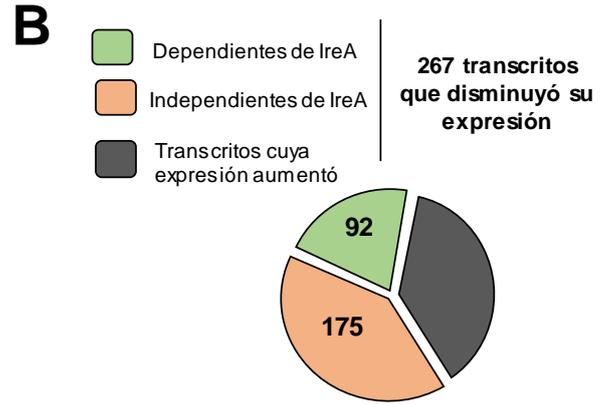
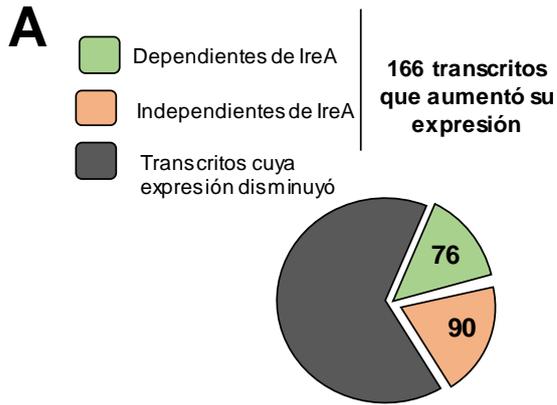
En otros organismos, una parte significativa de la respuesta al estrés de RE consiste en una reprogramación transcripcional que le permite a la célula readaptar su capacidad de plegamiento en el RE y aumentar la degradación de proteínas. Para evaluar si en *D. discoideum* un tratamiento con TN causa cambios transcripcionales, realizamos un ensayo de secuenciación profunda de RNA poliadenilado (RNAseq). Para esto, se utilizó RNA de células WT o *ireA*⁻, tratadas previamente con 2µg/ml de TN o con su vehículo (DMSO) durante 16hrs. En los resultados obtenidos con este ensayo, se observó que en una cepa WT, la TN ocasionó cambios en la abundancia de 433 transcritos, lo cual equivale a aproximadamente 3.5% de los genes en *D. discoideum*. Dentro de estos, se observó que aumentó la expresión de 166, mientras que hubo una disminución en 267 (**Figuras 17A y B**).

Figura 16. (Página siguiente) Participación de los dominios de cinasa y de ribonucleasa de IreA en la respuesta al estrés de RE. **(A)** Imágenes de microscopía confocal que muestran la localización de IreA y su conformación en oligómeros. Se trataron con TN células *ireA*⁻ que expresaban respectivamente las construcciones IreA-GFP, IreA^{K603N}-GFP o IreA^{N927A}-GFP, y se adquirieron imágenes *in-vivo* cada dos horas. **(B)** Cuantificación del porcentaje de células en las que se detectaron oligómeros de IreA. Se muestra el promedio y la desviación estándar de 3 experimentos. **(C)** Ensayo de goteo para probar la viabilidad de las células *ireA*⁻ que expresaban respectivamente las construcciones IreA-GFP, IreA^{K603N}-GFP o IreA^{N927A}-GFP, tras haber sido tratadas con TN durante 16h. **(D)** Western blot de células *ireA*⁻ que expresaban respectivamente las construcciones IreA-GFP, IreA^{K603N}-GFP o IreA^{N927A}-GFP, que muestra la expresión de Grp78 y CdcD tras un tratamiento con TN. **(E)** Gráfico de la cuantificación por densitometría de tres experimentos. Se muestra el promedio y la desviación estándar. **(F)** Se cuantificó el porcentaje de células que mostraban zonas de RE colapsado de tres experimentos como el representado en (A) y se graficó el promedio y la desviación estándar. Para todos los gráficos los asteriscos denotan diferencias estadísticas significativas.



Con el objetivo de definir los procesos celulares en los que se generaron cambios transcripcionales, se analizó el grupo de genes cuya expresión cambió con el tratamiento con TN. El análisis se generó con la herramienta *DAVID gene ontology enrichment clustering tool*. Este programa arroja términos de ontología génica (GO) que se encuentran enriquecidos en una lista de genes dada y genera grupos de términos que se encuentren asociados. Se analizaron los términos GO contenidos únicamente en las siguientes categorías: *proceso biológico*, *dominio proteico* y *componente celular*. En la **Figura 17** se muestra un resumen de los resultados obtenidos a partir de este análisis y los datos completos de cada grupo se encuentran en el Apéndice I. Como puede observarse en la **Figura 17**, el conjunto de transcritos cuya abundancia aumentó ante un tratamiento con TN está principalmente enriquecido en genes asociados a procesos biológicos involucrados en la respuesta a estrés de RE, al plegamiento de proteínas y a la homeostasis REDOX. Además, se observó que este conjunto está enriquecido significativamente en genes asociados a procesos de degradación dependiente de ubiquitinación.

Figura 17. (Página siguiente). Análisis de los transcritos cuya abundancia cambió ante un tratamiento con tunicamicina, de forma dependiente e independiente de IreA. **(A y B)** La TN indujo **(A)** un incremento en la abundancia de 166 transcritos y **(B)** la disminución de 267. Cada uno de estos conjuntos de genes se analizó mediante la herramienta informática DAVID para obtener las categorías de términos ontológicos (GO) que se encontraron enriquecidas. Los grupos de categorías GO obtenidas tanto para el conjunto de los transcritos cuya expresión incrementó, como para el que disminuyó, se graficaron dependiendo de su nivel de enriquecimiento y de su probabilidad ($P\text{-value} \geq 0.05$). Se muestran las categorías GO obtenidas para “Proceso Biológico” **(C y D)**, “Dominios Proteicos” **(E y F)** y para “Componente celular” **(G y H)**. Las estrellas marcan las categorías GO en las que >45% de los genes contenidos dependen de IreA para cambiar su expresión. El tamaño de la burbuja es proporcional al número de genes que contiene. Se utilizó el mismo color para las categorías que pertenecen a un mismo grupo de enriquecimiento.



Por otra parte, se encontró que el conjunto de transcritos cuya abundancia disminuyó en respuesta a la TN está enriquecido en genes asociados a procesos relacionados con el metabolismo de carbohidratos, con la defensa contra infecciones bacterianas y con el catabolismo de lípidos. Otros genes cuya transcripción disminuye y que no pertenecen a estos grupos son aquellos que codifican para proteínas secretadas o que residen en membranas.

Con el transcriptoma de la mutante pudimos determinar que IreA se requiere para que se generen cerca del 40% de los cambios transcripcionales que se observan en respuesta a un tratamiento con TN. Para definir en qué procesos celulares se encuentran involucrados los genes cuyo cambio en la expresión fue dependiente de IreA, se analizaron los términos GO enriquecidos en este grupo. Las categorías más importantes estuvieron relacionadas con procesos degradativos dependientes de ubiquitinación y con procesos que participan en disminuir la carga proteica en el RE. En este último caso, los genes más representativos son aquellos que codifican para proteínas que transitan por el RE, ya sea porque son proteínas de membrana o porque son proteínas de secreción .

En condiciones de crecimiento en ausencia de estrés de RE, la contribución de IreA para regular cambios transcripcionales no es significativa ya que en su ausencia sólo se afectó la expresión de 25 genes.

En conjunto, los datos obtenidos a partir del ensayo de RNAseq sugieren que en *D. discoideum* el estrés de RE causa una reprogramación transcripcional, la cual permite a la célula aumentar su capacidad de plegamiento de proteínas e incrementar los procesos degradativos. Además, este cambio transcripcional sirve para disminuir la carga de proteínas en el RE. A partir de estos datos, se puede inferir que de forma homóloga a lo que sucede en otros organismos, la ruta mediada por IreA es necesaria para que puedan generarse una porción significativa de los cambios transcripcionales inducidos por el estrés de RE. Nuestras observaciones sugieren que IreA se requiere para que se incremente la abundancia de transcritos involucrados principalmente en procesos de degradación de proteínas, y para disminuir la de transcritos que codifican proteínas que transitan por el RE.

4.4- La autofagia en la respuesta a estrés de RE en *Dictyostelium*

4.4.1- El estrés de RE induce autofagia

Se ha descrito ampliamente, en varios organismos, que el estrés de RE induce autofagia; por lo que se evaluó si esta respuesta se encuentra conservada en *D. discoideum*. Para esto, se trataron con TN (2µg/ml) células WT que expresaban la proteína de fusión GFP-Atg18, durante 4, 8 y 16hrs. Las células tratadas se analizaron mediante microscopia confocal *in-vivo*. En estas condiciones los autofagosomas se pueden ver como puntos discretos fluorescentes que se pueden seguir en el tiempo, debido a la acumulación transitoria de Atg18-GFP (**Figuras 18A y B**). Esta metodología ya se ha utilizado previamente en *D. discoideum* para analizar la inducción de autofagia [142], [191]. Se observó que la TN generó un incremento significativo en el porcentaje de células que presentaron puntos de GFP-Atg18 y que la proporción de células con puntos fue aumentando proporcionalmente con el tiempo de tratamiento.

Para realizar una evaluación más completa de la autofagia, es necesario determinar si un aumento en la población de células con estructuras que contienen a Atg18 está asociado a un incremento en la capacidad de degradación celular mediada por la autofagia, o si es consecuencia de un bloqueo en la tasa de degradación de autofagosomas. Por este motivo se analizó en *D. discoideum* el flujo autofágico en presencia y ausencia de TN. Para esto se utilizó un ensayo que se desarrolló gracias a la resistencia relativa que presenta la GFP a la degradación lisosomal. Esto permite que pueda determinarse la capacidad autofágica de las células mediante la cuantificación de GFP libre que se acumula a partir de la proteólisis de una proteína citoplasmática fusionada a la GFP. En *S. cerevisiae* se ha caracterizado que cuando células que sobreexpresan una fusión de la Pgk1 (Fosfoglicerato cinasa) con la GFP son sometidas a un estímulo que induce la autofagia, se observa una acumulación de GFP libre que es proporcional al nivel de degradación mediado por autofagia que estas células presentan [192]. En el caso de *D. discoideum* se ha desarrollado un protocolo similar en el cual se evalúa la degradación de la proteína citoplasmática de fusión PgkA-GFP. Sin embargo, dado que los lisosomas de *D. discoideum* son extremadamente ácidos (con un pH menor a 3.5[193]), se requiere de la adición de NH₄Cl para poder incrementar el pH lisosomal lo suficiente para generar condiciones en las cuales es posible detectar GFP libre [142], [162].

Como puede observarse en la **Figura 18C y 18D**, se acumuló una mayor proporción de GFP libre en las células que fueron tratadas con TN. Lo cual indica que se generó un incremento en la capacidad de degradación mediada por autofagia.. La degradación que se observó de la PgkA-GFP ante un tratamiento con TN se debió a un proceso autofágico, ya que en una mutante *atg1⁻* no hay acumulación de GFP libre (**Figura 18C**).

En conjunto, los datos de flujo autofágico, junto con la observación de que la TN incrementa la proporción de autofagosomas indican que en *D. discoideum* hay una inducción de la autofagia que permite a las células degradar cargos citoplásmicos en respuesta a un estrés de RE.

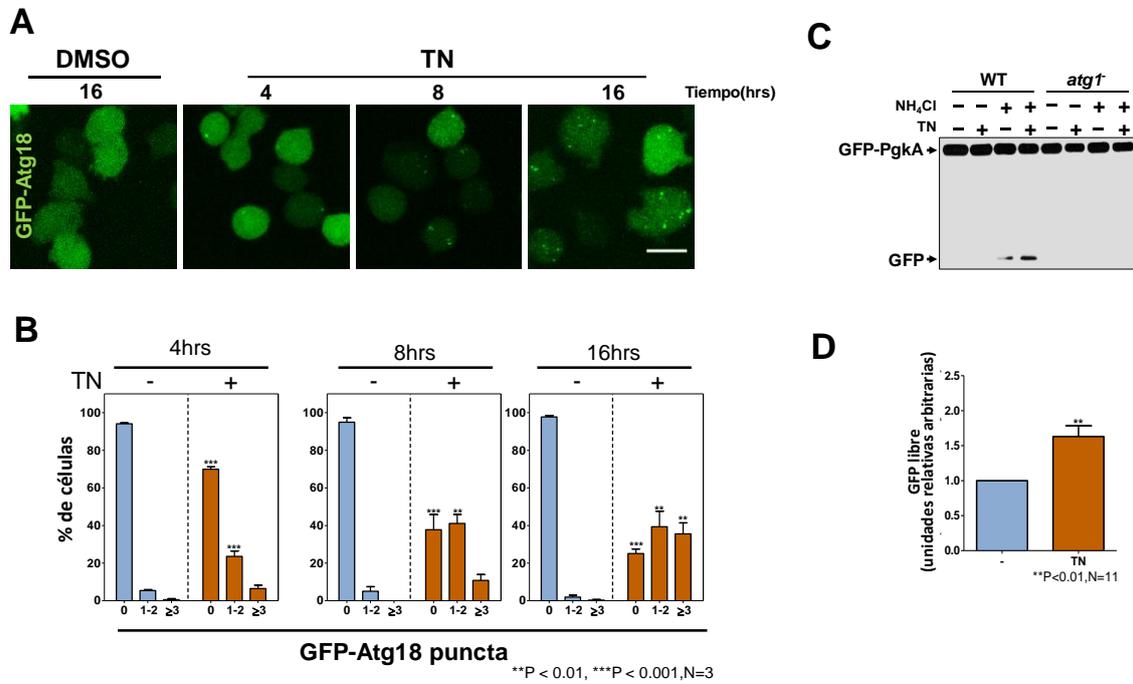


Figura 18. La TN induce una respuesta autofágica en *D. discoideum*. **(A)** La inducción de la autofagia se determinó evaluando la formación de puntos en células que expresaban la construcción GFP-Atg18. Las células se trataron con TN y se adquirieron imágenes a los tiempos indicados, mediante microscopía confocal *in-vivo*. Se muestra la proyección máxima de algunas imágenes representativas. **(B)** Se cuantificó el porcentaje de células que contenían 0, 1 ó 2, y más de 3 puntos de GFP-Atg18. Se muestra el gráfico del promedio y la desviación estándar, obtenidos a partir de tres experimentos. **(C)** Se analizó mediante un ensayo de proteólisis la capacidad de degradación autofágica de células WT y *atg1*⁻ que fueron tratadas con TN por 8hrs. Se evaluó mediante Western blot la acumulación de GFP libre en extractos de células que expresaban la construcción GFP-PgkA y que se trataron con TN y con NH₄Cl. **(D)** Cuantificación de la banda de la GFP libre de 11 ensayos de proteólisis como en C. Se muestra el promedio y la desviación estándar. Se utilizó como control de carga la banda de la GFP-PgkA. El nivel de expresión se muestra de forma relativa a la condición con vehículo.

4.4.2-La autofagia contribuye a la supervivencia ante un tratamiento con TN

Dado que encontramos que el estrés de RE induce una respuesta autofágica en *D. discoideum*, procedimos a determinar si este proceso degradativo es necesario también para que las células puedan contender con este estrés. Para esto, se trataron células de las cepas *atg1⁻*, *atg13⁻*, *atg101⁻* y *atg7⁻* con TN durante 16hrs, y posteriormente se evaluó mediante un ensayo de goteo su capacidad para recuperar el crecimiento en asociación con bacterias. Las mutantes que se probaron carecen de la actividad de proteínas que pertenecen a dos de los complejos que participan en diferentes procesos durante la formación de los autofagosomas. Estos son el complejo ATG1 y el sistema de conjugación. Estas mutantes se han estudiado previamente y se ha descrito que presentan diferentes defectos en la autofagia [143], [145], [147]. Las cepas *atg1⁻* y *atg13⁻* son incapaces de inducir la autofagia, y por lo tanto presentan un bloqueo total en la formación de autofagosomas, mientras que las cepas *atg101⁻* y *atg7⁻* presentan sólo un bloqueo parcial, por lo que pueden inducir autofagia a bajos niveles.

Como puede observarse en la **Figura 19**, las cepas *atg1⁻*, *atg13⁻* y *atg101⁻*, presentaron una deficiencia en el crecimiento en asociación con bacterias después de haber sido tratadas con TN. La sensibilidad de estas cepas al antibiótico resultó ser proporcional al grado de bloqueo autofágico que presentan, es decir, las cepas *atg1⁻* y *atg13⁻* son más sensibles que la cepa *atg101⁻*. En cambio, la ausencia de *Atg7*, proteína que participa en el sistema de conjugación, no generó sensibilidad a TN.

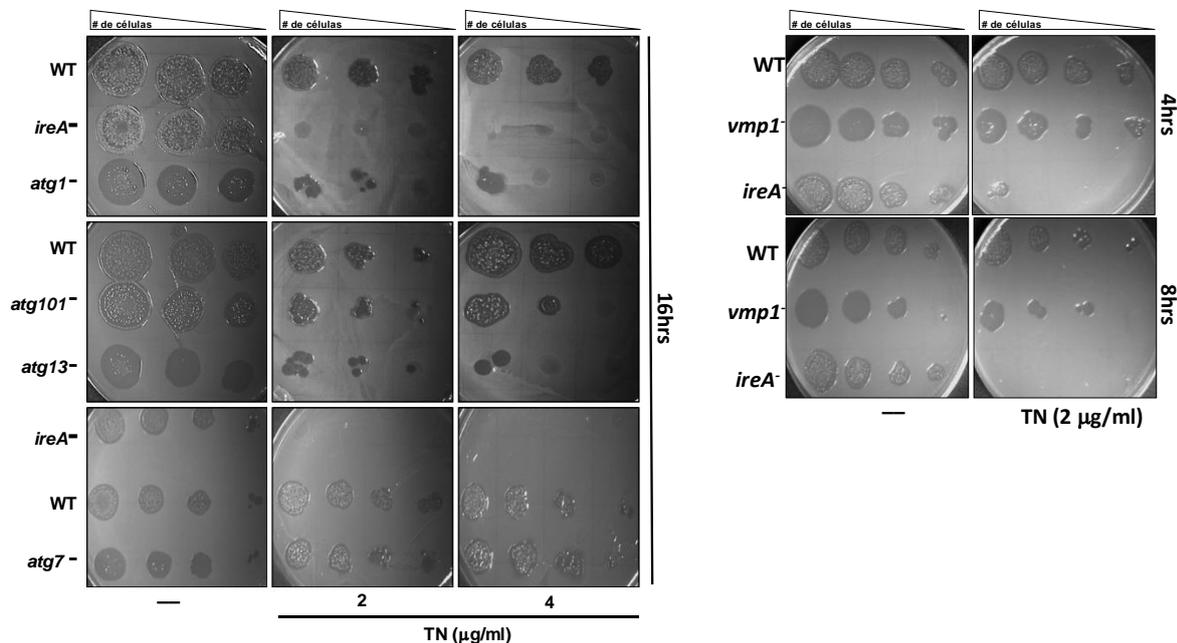


Figura 19. Ensayos de goteo para evaluar la viabilidad de células que presentan deficiencias en la autofagia. Las cepas indicadas fueron tratadas durante el tiempo y la concentración especificada de TN, o con su vehículo (DMSO). Se realizaron diluciones seriales de los cultivos tratados y se depositaron gotas de estos sobre placas de agar en las cuales se había esparcido previamente *K. aerogenes*. Se muestran fotografías se tomaron tras incubar las placas a 22°C por 5-7 días. Se muestran imágenes representativas de tres experimentos independiente.

De forma paralela, se evaluó el efecto que tiene la inactivación de Vmp1 en el crecimiento durante un tratamiento con TN. Vmp1 es una proteína transmembranal de RE cuya ausencia en *D. discoideum* produce efectos pleiotrópicos. Uno de ellos es un defecto severo de la autofagia [150], [194]. La función de esta proteína se ha asociado con la regulación de los sitios de contacto entre el RE y otros organelos [195] y con la distribución de algunos fosfolípidos [196]. A las células de la mutante *vmp1⁻*, no se les puede mantener por tiempos prolongados en cultivo líquido, por lo que las pruebas con esta cepa se realizaron solamente por un tiempo máximo de 8hrs. En presencia de 2µg/ml de TN las células *vmp1⁻* no presentaron un defecto visible en su capacidad de crecimiento en asociación con bacterias (**Figura 19**). Todos estos datos sugieren que, para sobrevivir a un tratamiento con TN, en *D. discoideum* se requiere de procesos autofágicos asociados principalmente a la función del complejo ATG1, y que posiblemente estos son independientes del sistema de conjugación y de la función de Vmp1.

4.4.3- IreA es dispensable para inducir la autofagia en respuesta al estrés de RE

Se ha reportado que tanto en plantas como en mamíferos se requiere de IRE1 para la inducción de la autofagia en respuesta al estrés de RE [124], [125], por lo que en este trabajo evaluamos si esto mismo ocurre en *D. discoideum*. Para esto, evaluamos mediante microscopía confocal los efectos de un tratamiento con TN sobre el proceso de formación de autofagosomas en células de la mutante *ireA⁻*, las cuales expresaban al gen híbrido GFP-Atg18 (**Figura 20A**). Se observó que, en respuesta al tratamiento con TN, la mutante *ireA* no sólo fue capaz de generar autofagosomas (**Figura 20A**), sino que la proporción de células mutantes que presentaron autofagosomas fue significativamente mayor al de las células silvestres (**Figura 20B**). Este aumento resultó ser directamente proporcional al tiempo de tratamiento. Una observación importante que resultó de estos ensayos fue que los autofagosomas de la mutante *ireA⁻* son más conspicuos y alargados, en comparación con los que se observan en la cepa silvestre (**Figura 20A**).

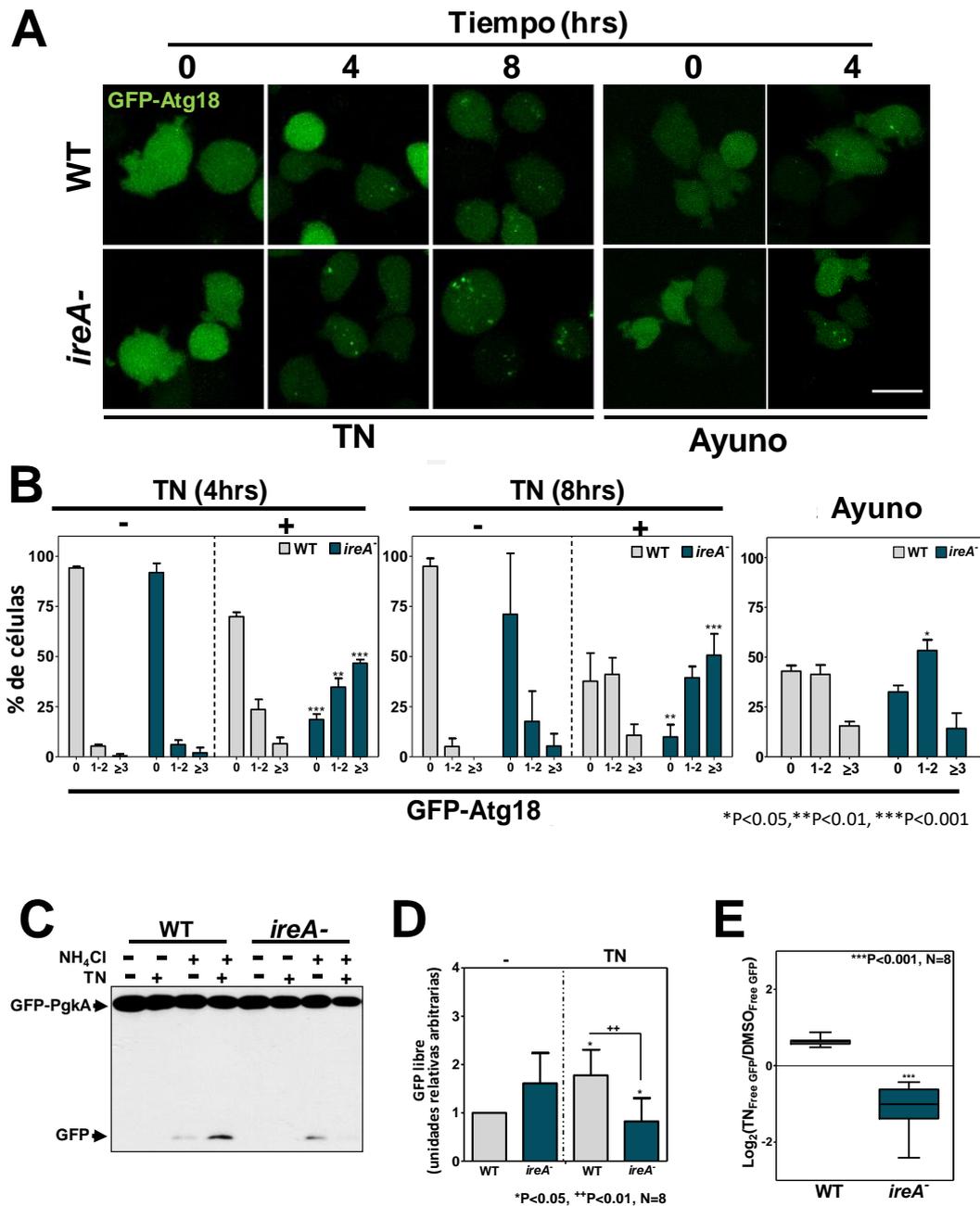


Figura 20. (A) Efectos de la ausencia de IreA sobre la inducción de la autofagia por estrés de RE. Fotografías de microscopía confocal de células WT e *ireA*⁻ expresando la construcción GFP-Atg18, tras un tratamiento con TN por el tiempo especificado (escala 10µM). (B) Se cuantificó el porcentaje de células en las que GFP-Atg18 se acumuló y se clasificaron en categorías dependiendo de si presentaban 0, 1 ó 2, y ≥3 puntos por célula. Se graficaron el promedio y la desviación estándar. (C) Análisis mediante Western blot de la acumulación de GFP libre proveniente de la proteólisis de la GFP-PgkA en células WT e *ireA*⁻ que fueron tratadas por 8hrs con TN en presencia y ausencia de NH₄Cl. (D) Se cuantificó el nivel de GFP libre acumulada mediante densitometría y se graficó el promedio y la desviación estándar de 8 experimentos. Se normalizó contra el nivel de GFP-PgkA y todos los datos se refirieron al nivel de expresión en la cepa WT sin tratamiento. (E) Media y desviación estándar del Log₂ de los datos en D. En todos los gráficos, los asteriscos denotan diferencias estadísticamente significativas.

Con el objetivo de determinar si los autofagosomas que se forman en la mutante *ireA*⁻ en respuesta al tratamiento con TN son completamente activos, se evaluó la capacidad de esta cepa para degradar a la PgkA-GFP. Mediante este ensayo, encontramos que la cepa *ireA*⁻ tiene una menor capacidad de

degradación autofágica ante un tratamiento con TN, ya que presenta una menor acumulación de GFP libre que la cepa WT en estas condiciones (**Figuras 20 C, D y E**); esto a pesar de que presentó una mayor proporción de células con autofagosomas. Estos datos indican que las células de la mutante *ireA* son capaces de inducir la formación de autofagosomas en respuesta a la TN pero, a diferencia de las células silvestres, presentan un bloqueo que evita que se puedan degradar cargos citoplasmáticos.

Para profundizar en éste fenómeno, evaluamos el flujo autofágico en una cepa mutante *ireA* que expresa las formas de IreA que no tienen ni actividad de cinasa (IreA^{K603N}), ni actividad de ribonucleasa (*ireA*^{N927A}). Mientras que la TN indujo una acumulación de GFP libre en la cepa que expresa la forma silvestre de IreA, esto no ocurrió en la cepa que expresa las formas mutantes (**Figuras 21A y B**). Estos datos sugieren que las células requieren de ambas funciones de IreA para incrementar su capacidad de degradación autofágica ante un tratamiento con TN.

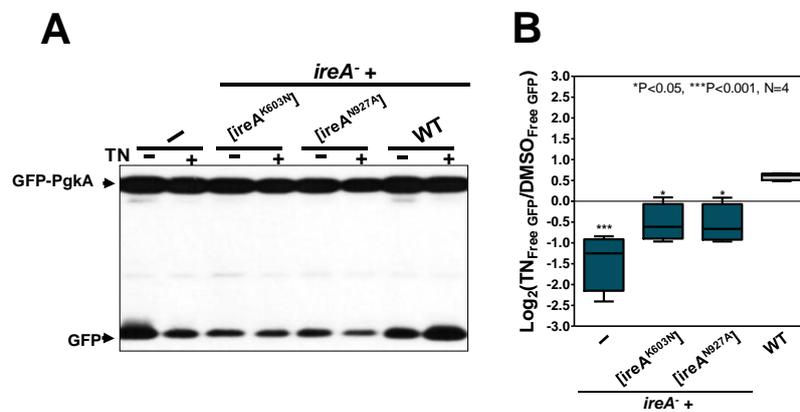


Figura 21. El defecto autofágico de la cepa *ireA*⁻ no se recupera al expresar las formas inactivas de IreA. **(A)** Western blot en el que se aprecia la acumulación de GFP libre en células *ireA*⁻ que expresaban la forma sin actividad de cinasa (*ireA*^{K603N}), la forma de ribonucleasa inactiva (*ireA*^{N927A}) o la forma silvestre (WT) de IreA. Las células se trataron con TN durante 8hrs y se agregó NH₄Cl durante las últimas dos horas de tratamiento. **(B)** Gráfico que muestra el incremento en la acumulación de GFP libre que se genera tras un tratamiento con TN. Se analizó mediante densitometría el nivel de GFP libre y se graficó el promedio y la desviación estándar del Log₂ de la tasa entre el nivel con TN y el nivel en el control (DMSO). Los asteriscos marcan las diferencias estadísticamente significativas.

Se ha descrito previamente que deficiencias en la degradación autofágica generan la acumulación de agregados proteicos citoplasmáticos poliubiquitinados [142], [149]. Por lo que para corroborar los efectos en la capacidad de degradación causados por un tratamiento con TN en las células de *D. discoideum* analizamos la presencia de agregados proteicos ubiquitinados tanto en la cepa WT y como en la *ireA*⁻. En ambos casos se utilizaron células que expresaban la construcción GFP-Atg18. Para esto, se trataron las células durante 8hrs con TN (2µg/ml), se prepararon para inmunofluorescencia y se visualizaron mediante microscopía confocal. Como puede observarse en las fotografías de la **Figura 22**, sólo las células *ireA*⁻ presentaron agregados visibles de proteínas ubiquitinadas en respuesta un tratamiento con TN. Esto sugiere que la mutante *ireA*⁻ presenta una fuerte deficiencia en los procesos de degradación de proteínas con esta marca. También se puede

observar en esta preparación, que algunos agregados ubiquitinados colocalizaron con estructuras elongadas marcadas con GFP-Atg18 (**Figura 22**). Esto sugiere que en la mutante *ireA⁻* se forman autofagosomas cuya biogénesis es defectuosa y que son incapaces de completar los procesos de degradación característicos de la autofagia.

La proteína Atg18 (WIPI-1) se recluta de modo transitorio a los sitios de nucleación durante la etapa de formación de los autofagosomas [85], [197]. Sin embargo, se ha observado que en mutantes autofágicos que presentan un bloqueo posterior a esta fase, Atg18 se acumula en estructuras alargadas que persisten en el tiempo, por lo tanto, el estudio de la dinámica que presenta este marcador permite detectar un posible bloqueo en fases tardías de la formación de los autofagosomas [150], [198]. Con el objetivo de determinar si en la mutante *ireA⁻* existe un bloqueo en fases tardías de la autofagia, se decidió analizar la dinámica que presenta GFP-Atg18 tras un tratamiento con TN. Para esto se siguió durante 900s, por microscopía confocal *in-vivo*, la señal de GFP-Atg18 en células WT e *ireA⁻* que fueron tratadas previamente con TN durante 7hrs. En las células WT la señal de GFP-Atg18 estuvo presente sólo durante algunos segundos (30-80s), mientras que en las células *ireA⁻*, GFP-Atg18 se acumuló en estructuras elongadas que fueron visibles incluso hasta los 900s (**Figura 23A**). Estas observaciones sugieren que, durante un estrés de RE, las células *ireA⁻* presentan defectos en etapas tardías en la formación de los autofagosomas. Lo cual, coincide con la capacidad degradativa deficiente que presenta la cepa *ireA⁻* durante un tratamiento que genera estrés de RE.

En los datos del transcriptoma de *D. discoideum*, encontramos que la TN causó un cambio importante en la expresión de genes involucrados con el metabolismo de lípidos, lo cual sugiere que parte de la respuesta al estrés de RE en este organismo consiste en remodelar la membrana del RE. Este fenómeno también se ha descrito en levaduras [120], [199]. Además, es importante mencionar que en *D. discoideum* y en mamíferos se ha descrito que el RE funciona como una plataforma para el ensamblaje de los autofagosomas [85], [89], [200]. Estas observaciones nos llevaron a plantear que las perturbaciones que presenta la mutante de *ireA⁻* en la estructura del RE podrían interferir con el proceso de formación de autofagosomas. Para probar esta hipótesis, se evaluó de forma simultánea la localización de GFP-Atg18 y la morfología del RE, en células que fueron tratadas con TN. La morfología del RE se analizó mediante la inmunodetección de la PDI. Como puede observarse en la **Figuras 23B y C**, el RE de las células *ireA⁻* tratadas con TN presentó alteraciones severas; la presencia de túbulos es escasa y las cisternas se aprecian colapsadas en una sola estructura, la cual se acumula principalmente en la zona perinuclear. Se observó también que la mayoría de las estructuras aberrantes de GFP-Atg18 (puntos conspicuos en la imagen) que se acumulan en las células *ireA⁻*, se localizan en zonas de RE que se encuentra colapsado. Estas observaciones sugieren que la mutante *ireA⁻* presenta una incapacidad para reestructurar el RE, lo cual ocasiona un defecto severo en el ensamblaje de los autofagosomas (**Figuras 23B y C**). Esto a su vez, explicaría la deficiencia que presenta esta cepa para degradar cargos autofágicos durante el estrés de RE.

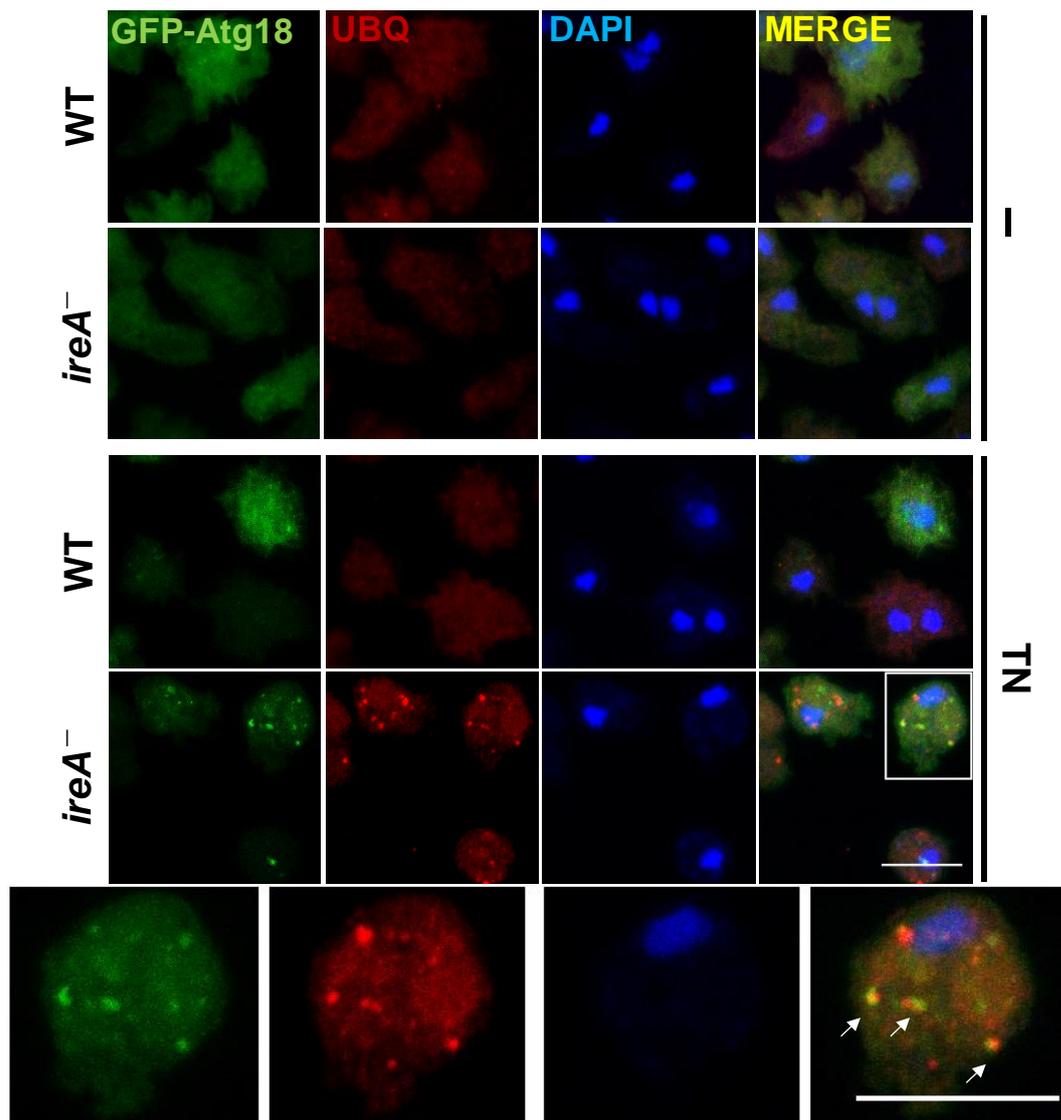


Figura 22. Las células *ireA*⁻ acumulan agregados proteicos ubiquitinados al ser tratadas con TN. Fotografías de células WT o *ireA*⁻ que expresaban a la GFP-Atg18 y que fueron tratadas con TN por 8hrs o con su vehículo. Posteriormente se prepararon para detectar mediante inmunofluorescencia a la ubiquitina (rojo). Las imágenes se adquirieron por microscopía confocal. Los núcleos se tiñeron con DAPI. Se muestra un acercamiento de la célula en el recuadro. Las flechas indican puntos en los que colocaliza la señal de la ubiquitina y la de GFP-Atg18 (Escala 10 μ M).

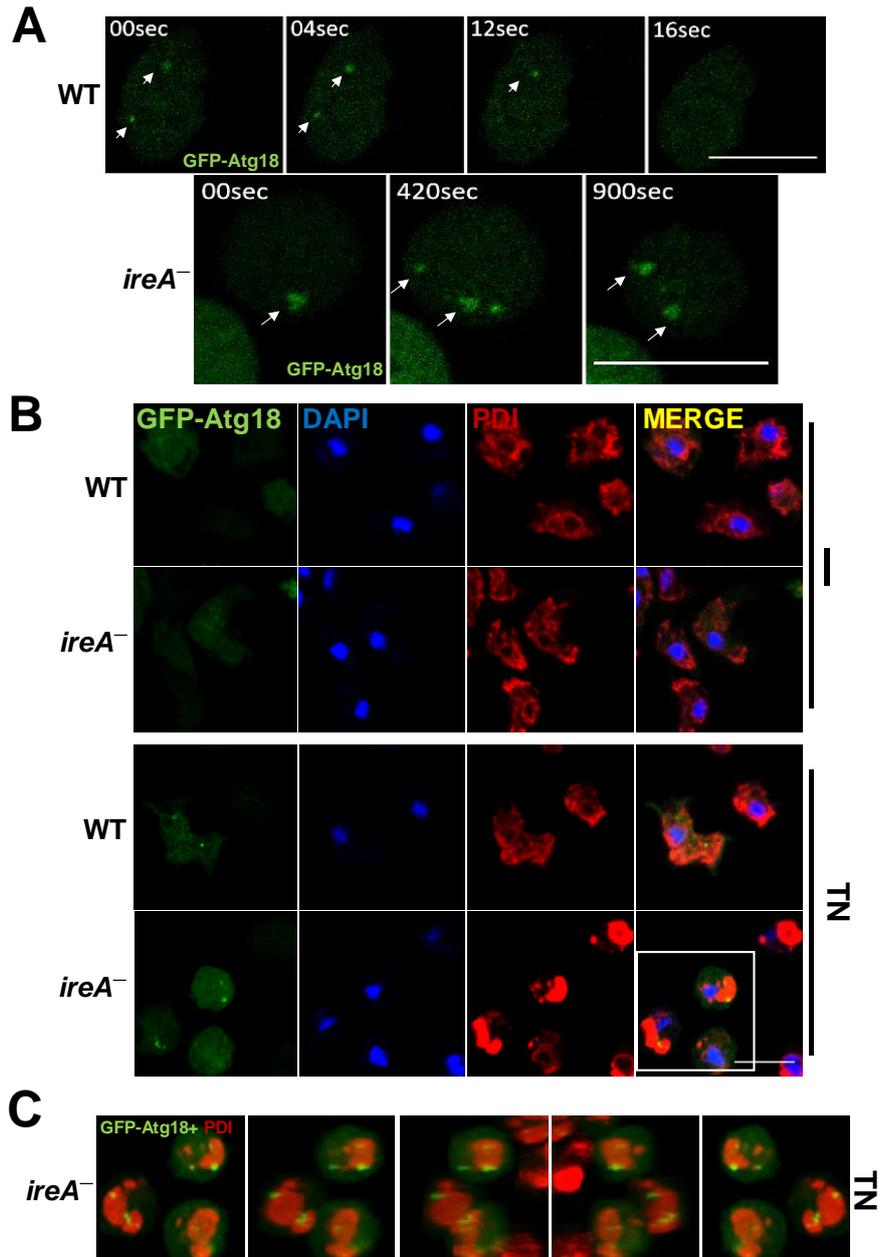


Figura 23. Las estructuras de GFP-Atg18 observadas en las células *ireA*⁻ tras un tratamiento con TN resultan aberrantes y persistentes. **(A)** Fotografías obtenidas de células de las cepas WT o *ireA*⁻, que expresaban la construcción GFP-Atg18, tras haber sido tratadas con TN durante 7hrs. La señal de este marcador se siguió *in-vivo* y se videograbó durante 900s. **(B)** Fotografías de células WT e *ireA*⁻, que fueron tratadas con TN o DMSO durante 8hrs y posteriormente se prepararon para detectar mediante inmunofluorescencia a la PDI (rojo). Se muestran fotografías representativas obtenidas por microscopía confocal. **(C)** Se generó una proyección en 3D de las fotografías en B y se muestran algunas vistas que se obtuvieron al girar esta proyección.

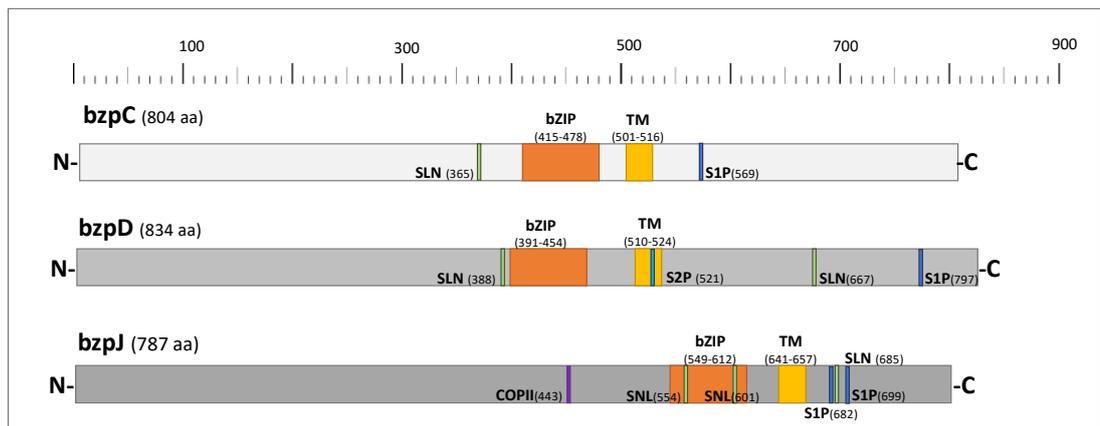
4.5- BzpD en la respuesta al estrés de RE

4.5.1- Análisis informático de las secuencias proteicas de BzpC, BzpD y BzpJ

En mamíferos y en plantas existen componentes adicionales a la ruta de IRE1, que se requieren para generar la respuesta transcripcional inducida por el estrés de RE. En *D. discoideum*, los resultados obtenidos del análisis de expresión génica sugieren que existen vías alternas a la de IreA participan durante la reprogramación de la expresión génica que se genera en respuesta a un tratamiento con TN; por lo que se evaluó mediante BLAST si en el genoma de esta ameba se encontraban codificados posibles ortólogos de ATF6. Como se describió en la sección 3.2 y en la **Tabla 5**, se encontró que BzpC, BzpD y BzpJ contienen un dominio transmembranal que es característico de los activadores tipo ATF6. También se encontró que en el genoma de *D. discoideum* se encuentran codificados ortólogos de MBPTS1 (*mbpts1/DDB_G0282397*) y de MBPTS2 (*mbpts2/DDB_G0275939*), las dos proteasas de Golgi que en otros organismos participan en el procesamiento de ATF6.

Al analizar la secuencia de aminoácidos de estas tres proteínas transmembranales, buscando motivos conservados en los homólogos de ATF6, tales como los sitios de reconocimiento de las proteasas MBPTS1 y MBPTS2, y las secuencias de localización nuclear (NLS) (**Figura 24A**), encontramos que las tres proteínas (BzpC, BzpD y BzpJ) contienen secuencias de localización nuclear y también las tres presentan posibles sitios de reconocimiento de MBPTS1 (S1P); sin embargo, sólo BzpD contiene el motivo de reconocimiento de MBPTS2 (S2P). Esta última, es la proteasa que cataliza el corte del segmento transmembranal de ATF6, lo cual permite su liberación. Se encontró también que BzpJ contiene una posible secuencia de exportación dependiente de COP-II en su región citoplasmática.

Mediante un alineamiento global utilizando la herramienta informática CLUSTAL omega se encontró que la proteína que presenta mayor homología con ATF6 de humanos es BzpD. Por su parte, BzpJ es que resultó presentar un mayor porcentaje de identidad con ATF6 de *Drosophila* y con bZIP28 de *A. thaliana*.

A**B**

	Hs_ATF6α	Dm_ATF6c	bZIP28	BzpC	BzpD	BzpJ
Hs_ATF6α	100%	26.53%	16.63%	14.57%	19.05%	15.90%
Dm_ATF6c	26.53%	100%	17.66%	20.24%	17.29%	20.53%
bZIP28	16.63%	17.66%	100%	18.99%	18.22%	22.76%
BzpC	14.57%	20.24%	18.99%	100%	26.70%	29.01%
BzpD	19.05%	17.29%	18.22%	26.70%	100%	24.95%
BzpJ	15.90%	20.53%	22.76%	29.01%	24.95%	100%

Figura 24. (A) Diagrama que muestra los dominios identificados en las secuencias de BzpC, BzpD y BzpJ. Las proteínas se dibujaron a escala. Se indican los residuos en los cuales se encuentran los dominios especificados. SLN (secuencia de localización nuclear), bZIP (zipper básico de leucinas), TM (transmembranal), S1P (sitio reconocido por MBPTS1), S2P (sitio reconocido por MBPTS2), COPII (secuencia de exportación COP-II). **(B)** Tabla que muestra el porcentaje de identidad entre las proteínas señaladas. Resultados obtenidos a partir de un alineamiento global realizado con el programa CLUSTAL omega.

4.5.2- BzpD y BzpJ se localizan en el RE

Para definir la localización subcelular de BzpC, BzpD y BzpJ se generaron construcciones en las que se fusionó la GFP al extremo N-terminal de cada una de estas proteínas. Al analizar su localización mediante microscopía confocal, se encontró que tanto GFP-BzpD como GFP-BzpJ se encuentran en el RE, el cual en esta preparación se detectó mediante inmunofluorescencia contra la PDI (**Figura 25**). Aunque las dos proteínas están en el RE su distribución resultó ser diferente. BzpD se localizó por toda la red del RE y colocalizó casi totalmente con la PDI, mientras que BzpJ se distribuyó en un patrón punteado y sólo sobre ciertas zonas del RE (**Figura 25**). En cambio, no fue posible detectar a la GFP-BzpC, posiblemente estos resultados se deban ya sea a que la expresión de esta proteína se regula a nivel postraduccional, debido a que la etiqueta utilizada interfiere con su expresión, o a causa de que la proteína no se sintetiza en las condiciones de crecimiento que se utilizaron. Por este motivo, y también debido a la baja identidad que presenta con los homólogos de ATF6 no se continuó con el análisis de BzpC.

Estos datos en conjunto nos sugieren que, aunque la secuencia de las tres proteínas comparte algunas características, podrían participar en diferentes funciones celulares, ya que presentan diferencias claras en su patrón de localización.

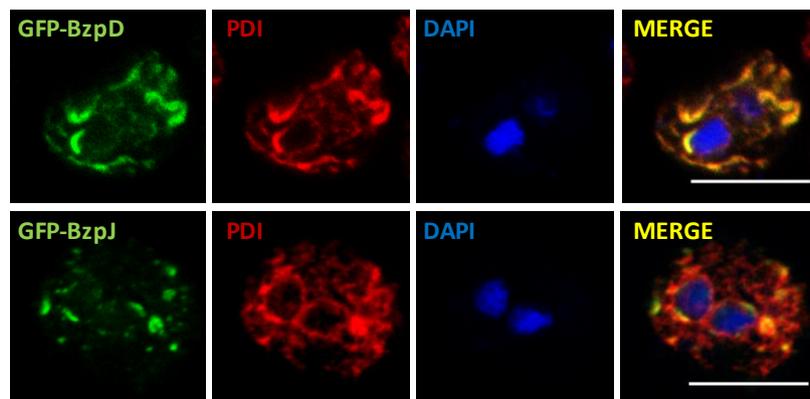


Figura 25. Localización subcelular de BzpD y BzpJ. Fotografías de células WT expresando respectivamente las construcciones GFP-BzpD o GFP-BzpJ que fueron preparadas para detectar a la PDI (rojo) mediante inmunofluorescencia. Para la detección de núcleos, las células se tiñeron con DAPI y se visualizaron mediante microscopía confocal (escala 10mM).

4.5.3- BzpD se requiere para contender con el estrés de RE

Para evaluar si BzpD y BzpJ se requieren durante la respuesta al estrés de RE, se construyeron cepas mutantes de estas proteínas (**Figura 26**). Para esto se integró mediante recombinación homóloga el casete de resistencia a la BST en los locus respectivos (**Figura 26**). En el caso de *bzpD*, esto generó una deleción de 400 pares de bases (**Figura 26A**), y en el locus *bzpJ* una de 717 pares de bases (**Figura 26B**). La integración de BST en ambos casos se comprobó mediante PCR (**Figuras 26C y D**).

Como puede observarse en la **Figura 27A y B**, un tratamiento con TN por 16hrs afectó visiblemente la morfología de ambas mutantes. El tratamiento produjo que las células se tornaran redondeadas y refringentes, y se observó la aparición de detritus, indicativo de lisis celular. Sin embargo, el efecto de la TN sobre la morfología celular en estas mutantes no resultó ser tan severo como el que presentó la cepa *ireA*⁻.

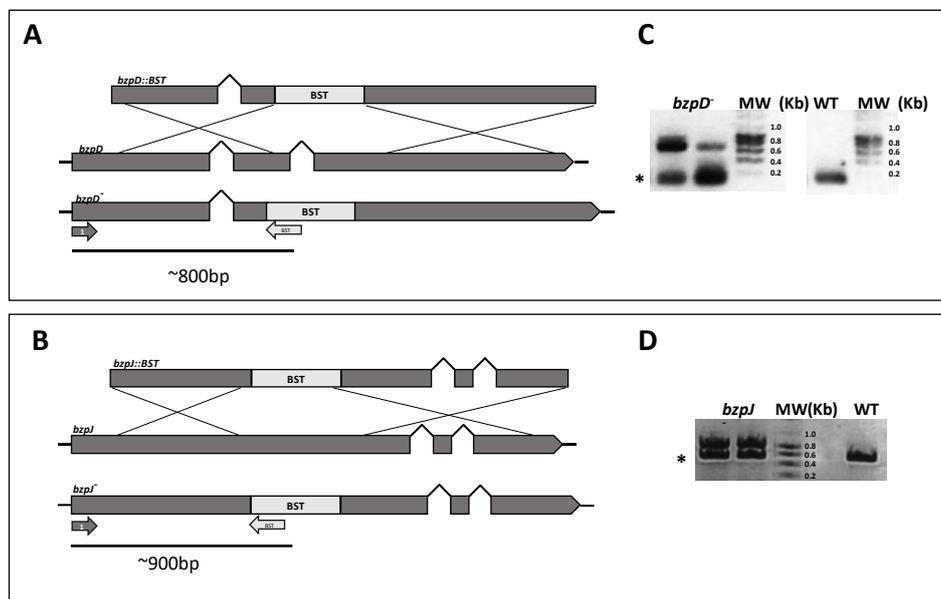


Figura 26. Metodología para interrumpir el locus de *bzpD* y el de *bzpJ*. Los diagramas en **(A)** y en **(B)** muestran las construcciones utilizadas para generar las interrupciones. Estas se generaron mediante la inserción por recombinación homóloga del gen de resistencia a la blasticidina (BST) en el locus indicado. En **(A)** se muestra la construcción para *bzpD*⁻ y **(B)** para *bzpJ*⁻. Se ilustran los oligonucleótidos que se utilizaron para comprobar mediante PCR la integración de BST en el locus, y el tamaño esperado del amplificado que se obtendría con ellos. En **(C)** y **(D)** se muestra el producto obtenido de amplificar con los oligonucleótidos indicados en A y B, mediante PCR, el DNA genómico de dos clones mutantes respectivamente de **(C)** *bzpD*⁻ y **(D)** *bzpJ*⁻ y de células WT. *Amplificado de un gen no relacionado que se incluyó como control.

Por otra parte, un tratamiento de 16hrs con TN afectó la capacidad de retomar el crecimiento en asociación con bacterias de la mutante *bzpD*⁻, pero no de la mutante *bzpJ*⁻ (**Figura 27C**). Aunque las células de la mutante *bzpD*⁻ resultaron ser sensibles al estrés de RE, su sensibilidad a la droga no resultó ser tan severa como la que presentó la mutante *ireA*⁻.

Cuando *D. discoideum* se desarrolla en presencia de bacterias, se pueden observar al mismo tiempo las diferentes fases de desarrollo. En la parte central de la colonia, en la cual las amebas han consumido las bacterias por completo, se encuentran los cuerpos fructíferos; mientras que, en la zona periférica de la colonia, se encuentran las amebas que están consumiendo bacterias; las fases intermedias de desarrollo pueden observarse entre estas dos zonas. Una de estas fases es la de gusano, que en la cepa silvestre tiene una movilidad reducida y no abandona la zona de crecimiento colonial (**Figura 27E**), en cambio en la mutante *bzpD*, el gusano presentó una migración anómala, ya que tendió a recorrer mayores distancias y frecuentemente abandonó la zona de crecimiento.

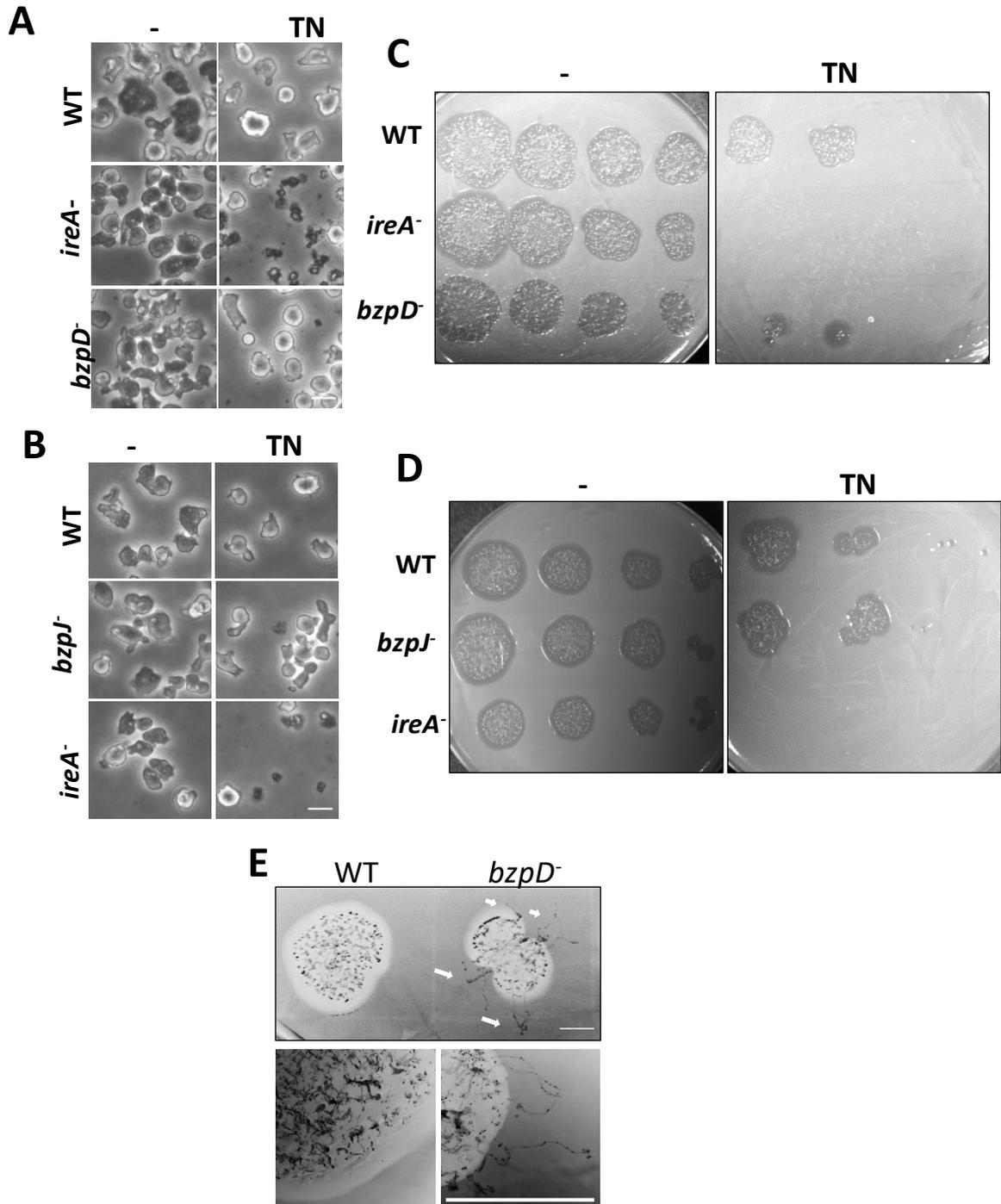


Figura 27. Análisis para determinar la sensibilidad a la TN de las cepas *bpzD*⁻ y *bpzJ*⁻. Se muestran en **(A)** y en **(B)** fotografías (microscopía óptica) de células de las cepas indicadas, que fueron tratadas con TN o con su vehículo (DMSO) durante 16hrs. **(C y D)** Se analizó si estas células eran capaces de restablecer el crecimiento en asociación con bacterias después de ser tratadas con TN y se muestran los resultados obtenidos de este ensayo de viabilidad **(C)** para *bpzD*⁻ y **(D)** para *bpzJ*⁻. **(E)** Fotografías de las colonias formadas por células de las cepas WT y *bpzD*⁻ creciendo sobre una placa de medio sólido en la que se esparció previamente *K. aerogenes*. Las flechas señalan los rastros de migración de los gusanos. Se muestra en la parte inferior un acercamiento de la zona de crecimiento de amebas de las cepas WT y *bpzD*⁻. (Escala 1cm). En todos los casos, se muestran fotografías representativas de tres experimentos independientes.

La expresión del gen silvestre BzpD en la mutante *bzpD*⁻ logró revertir tanto la sensibilidad a la TN como la migración anómala (**Figura 28**), lo cual indica que este factor transcripcional se requiere para generar una respuesta adecuada al estrés de RE y para regular la fase de gusano durante el desarrollo.

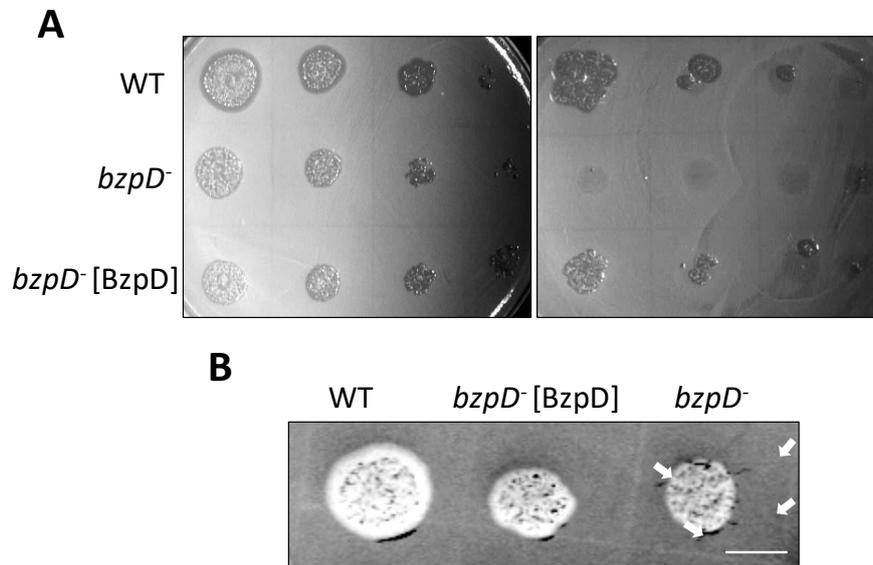


Figura 28. Efectos fenotípicos de la sobreexpresión de GFP-BzpD en la mutante *bzpD*⁻. (A) Ensayo de goteo para analizar el efecto sobre la viabilidad de células de las cepas indicadas tras un tratamiento con TN durante 16hrs. (B) Fotografías de las colonias formadas por células de las cepas señaladas creciendo sobre una placa de medio sólido en presencia de *K. aerogenes*. Las flechas señalan los rastros de migración. En todos los casos, se muestran fotografías representativas de tres experimentos independientes.

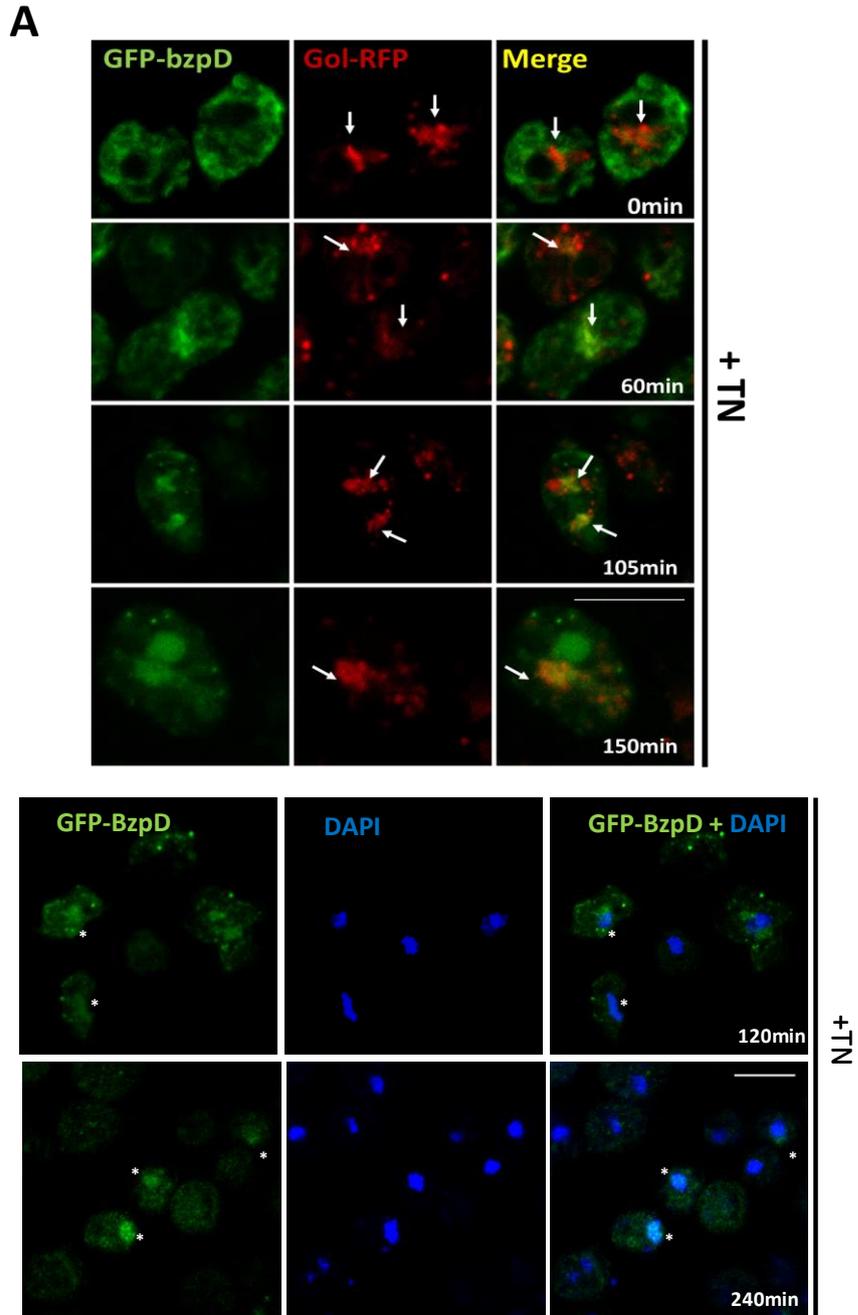
4.5.4- BzpD se procesa en Golgi y se transporta al núcleo ante un tratamiento con TN

Cuando se somete a células de mamífero a un estrés de RE, ATF6 se transporta al Golgi en donde es procesada secuencialmente por las proteasas MBTSP1 y MBTSP2. De esta forma se libera su segmento N-terminal, el cual contiene el dominio bZIP y la secuencia de localización nuclear [68]. Por este motivo, analizamos si BzpD transita por el Golgi ante un estrés de RE. Para esto, se siguió su localización tras un tratamiento con TN en células en las que se marcó el Golgi mediante la expresión de la proteína Golvesina fusionada a la proteína roja fluorescente (Gol-RFP) [201]. Se trataron con TN células que expresaban tanto a Gol-RFP, como a GFP-BzpD, y se observaron mediante microscopía confocal *in-vivo* durante 150 minutos (**Figura 29A**). Inicialmente (entre los 60 y 150 min) se observó que BzpD colocaliza con Gol-RFP, lo cual indica que se encuentra en el Golgi (**Figura 29A**). Posteriormente, a tiempos mayores de tratamiento con TN, se BzpD colocalizó con DAPI, observación que indica que fue transportada al núcleo (**Figura 29B**).

Una vez que detectamos que BzpD transita por el Golgi y se acumula en el núcleo ante un tratamiento con TN, examinamos si esta proteína sufría un procesamiento para generar una forma soluble, de

forma análoga a como sucede con ATF6. Para esto, se analizaron por Western blot extractos totales de células de las cepas WT e *ireA*⁻ tratadas con TN durante 2, 4 y 6hrs. En todas las condiciones, se detectó una proteína de aproximadamente 80kDa (**Figura 30A**) que coincide con el peso molecular esperado de un el fragmento citoplasmático de BzpD fusionado a la GFP (84kDa, del residuo del 1 al 501). La proteína completa que tiene un peso molecular aproximado de 118kDa (incluyendo a la GFP) se expresa pobremente y es difícil detectarla mediante esta técnica con las condiciones utilizadas. Como puede observarse el procesamiento de BzpD fue independiente de IreA, ya que ocurre aún en la mutante que carece de esta cinasa; sin embargo, es dependiente de TN, lo cual indica que sólo ocurre en condiciones de estrés de RE.

Todos estos datos, muestran que BzpD es una proteína tipo bZIP que se requiere para que las células puedan responder a condiciones de estrés de RE y que se procesa en respuesta a un tratamiento con TN. El procesamiento incluye su relocalización en el núcleo, tras haber transitado por el Golgi. Todo esto en conjunto sugiere que BzpD cumple en *D. discoideum* las funciones que ATF6 realiza en otras especies.



. **Figura 29.** BzpD transita por el Golgi y se acumula en el núcleo ante un tratamiento con TN. **(A)** Imágenes adquiridas mediante microscopía confocal *in-vivo* que muestran la localización de GFP-BzpD y Gol-RFP en células WT que fueron tratadas con TN durante los tiempos señalados. Las flechas blancas señalan las zonas en las que se observa colocalización entre GFP-BzpD y Gol-RFP. **(B)** Células que expresaban la GFP-BzpD fueron tratadas con TN por los tiempos señalados y posteriormente se fijaron y se tiñeron con DAPI para detectar núcleos. Los asteriscos marcan las células en las que se detecta colocalización entre GFP-BzpD y el núcleo (escala 10 μ M).

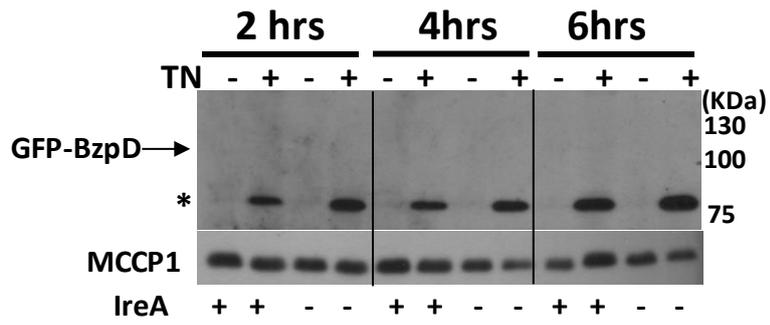


Figura 30. BzpD se procesa ante un tratamiento con TN. Se muestra un ensayo representativo de un Western blot en donde se analizaron extractos de células que expresaban a GFP-BzpD, respectivamente de la cepa WT (IreA +) o *ireA*⁻, y que fueron tratadas con TN o su vehículo durante los tiempos indicados. La detección de MCCCP1 se utilizó como control de carga.

5.-DISCUSIÓN

5.1- La TN induce estrés de RE en *D. discoideum*

En este trabajo se presenta la primera descripción que se ha hecho de la respuesta al estrés de RE en *D. discoideum*. Para esto, desarrollamos una metodología tanto para inducir estrés de RE, como para poder detectar su inducción. También, mostramos las rutas que participan en esta respuesta. Encontramos que la TN es el mejor inductor de estrés de RE en *D. discoideum*, pues además de afectar la viabilidad de estas células, genera un incremento en la expresión de Grp78 y CdcD, dos proteínas que participan en la respuesta a este estrés. Este antibiótico bloquea la glicosilación de proteínas en el RE, ya que inhibe a la enzima que transfiere la *N*-acetilglucosamina fosfato al dolicol fosfato[202]. En contraste, otro agente que interfiere con la glicosilación de proteínas, la 2-DOG, no causó efectos significativos en *D. discoideum*. Existen observaciones previas que sugieren que la 2-DOG es internalizada pobremente en estas células y por esto, posiblemente no fue capaz de inducir estrés de RE [180]. El DTT, a la concentración probada, tampoco generó efectos significativos. Sin embargo, no se probaron concentraciones mayores de este agente reductor debido a que suele tener efectos deletéreos en las células.

5.2- *D. discoideum* requiere de la ruta de IreA para contender con el estrés de RE

Para identificar a los posibles ortólogos de la ruta de respuesta a estrés de RE, se realizó un análisis bioinformático con el cual se encontró que en el genoma de *D. discoideum* existe un sólo ortólogo respectivamente de la chaperona residente de RE, *grp78* y de *IRE1*, *ireA*. Es interesante que *IreA* de *D. discoideum* tiene una mayor similitud con el ortólogo de humano que con el de *S. cerevisiae*, lo cual podría sugerir que la ruta de *IRE1* es evolutivamente más cercana entre *D. discoideum* y humano, que entre la de humano y levadura, y que en esta última pudo haber divergido significativamente. Esto hace a la *D. discoideum* un organismo útil para estudios comparativos de la respuesta a estrés de RE en humano. Nuestras observaciones sugieren que *D. discoideum* carece de un ortólogo del factor *Xbp1/Hac1*; sin embargo, se ha reportado que los factores de transcripción de la familia de los bZIP han divergido ampliamente durante la evolución [45], [203], por lo que no se puede aún descartar que *IreA* procese a un mensajero de algún factor bZIP, cuya secuencia primaria presente poca similitud con los factores tipo XBP1.

Como en otros organismos, *IreA* se localiza en el RE, y resulta esencial para que las células de *D. discoideum* puedan contender con el estrés de RE; para esto, requiere tanto de su actividad de cinasa,

como del de ribonucleasa. Además, IreA es capaz de formar oligómeros, aun cuando presenta mutaciones en su dominio de cinasa, o en el de ribonucleasa. La formación de oligómeros de IRE1 se encuentra conservada en todos los organismos que se han estudiado, por lo que es posible que este mecanismo de señalización haya surgido tempranamente durante la evolución y se haya mantenido durante la especialización de la ruta en las diferentes especies.

En levaduras y en mamíferos el tiempo durante el cual IRE1 se mantiene ensamblada en su forma oligomérica se correlaciona con el periodo durante el cual esta proteína se encuentra activa [42], [190]. Se ha demostrado que en levaduras mutantes de IRE1 que carecen de las actividades de cinasa y de ribonucleasa, presentan oligómeros que persisten en el tiempo, aun cuando las mutaciones no afectan la región de oligomerización [201, 202]. En *D. discoideum*, IreA podría activada aproximadamente a las 2hrs después de un tratamiento con TN, y la adaptación al estrés parece tener lugar aproximadamente a las 8hrs. Tras este tiempo, puede detectarse un incremento en la expresión de proteínas de respuesta a estrés y comienza a disminuir el número de células que presentan oligómeros de IreA. Sin embargo, en la mutantes de IreA que tiene un defecto en su actividad de ribonucleasa, el estado oligomérico se mantiene persistentemente después de haber concluido el estímulo de estrés. Estos datos indican que la actividad de IreA juega un papel importante en la regulación de su propia actividad, posiblemente regulando la dinámica de ensamblaje de oligómeros.

5.3-La TN induce cambios transcripcionales que son parcialmente dependientes de IreA

Los datos obtenidos a partir del análisis masivo de expresión por RNAseq, sugieren que en *D. discoideum*, ante un estrés de RE, se dispara una reprogramación de la expresión génica similar a lo que sucede en otros organismos [25][204]. Un tratamiento con TN genera en esta ameba, un incremento en la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con en el plegamiento, tales como las chaperonas DnaJ, la Calreticulina (CrtA) y las PDIs. También hay un aumento en la abundancia de transcritos relacionados con procesos degradativos, principalmente relacionados con la ubiquitinación de proteínas. También se incrementó la expresión de p62, una proteína que participa en la autofagia. Todo esto sugiere que, para contender con un estrés de RE, las células de *D. discoideum* requieren incrementar su capacidad de plegamiento y activar procesos degradativos, principalmente asociados a la ubiquitinación. Por otra parte, las células disminuyen su carga en el RE disminuyendo la abundancia de un número significativo de transcritos que codifican para proteínas de secreción o que requieren de procesos de plegamiento en la membrana del RE. En estos grupos se encuentran proteínas asociadas a la fagocitosis y a la endocitosis. Esto, sugiere que ante

un estrés de RE las células de *D. discoideum* disminuyen la internalización de alimento, lo cual podría estar ocasionando una interrupción del crecimiento mientras la célula restablece su homeostasis.

En *Schizosaccharomyces pombe* y en *Candida glabrata* no existen homólogos de Hac1/XBP1, y se ha observado que la respuesta al estrés de RE está mediada únicamente por el proceso de degradación de mensajeros dependiente de IRE1 (RIDD)[53], [205]. Los datos aquí presentados indican que en *D. discoideum*, la respuesta al estrés de RE que depende de IreA genera tanto una disminución en la abundancia de ciertos transcritos, como un incremento en la expresión de otros. Esto sugiere que en esta ameba podrían actuar en paralelo, la regulación de la transcripción a través de un factor (aún desconocido), y un proceso de RIDD que se activa en respuesta al estrés de RE. Si esto es así, la vía de respuesta a estrés de RE de *D. discoideum*, tendría más similitudes funcionales con mamíferos que con *S. cerevisiae*.

5.4- La autofagia en la respuesta a estrés de RE en *Dictyostelium*

Se ha reportado ampliamente y en diferentes especies, que el estrés de RE induce autofagia [206], y en este trabajo encontramos que en *D. discoideum* esta respuesta también está presente. Además, en este organismo la autofagia es esencial para que las células puedan sobrevivir a este tipo de estrés. Sin embargo, el proceso autofágico requerido para la adaptación al estrés de RE requiere solamente del complejo de la cinasa ATG1, mientras que el sistema el sistema de conjugación y la proteína de RE Vmp1, resultan dispensables. Previamente se ha observado que se pueden formar autofagosomas en células de mamífero que carecen de ATG5 o de ATG7, ambas, proteínas que participan en el proceso de conjugación [121], [207]. Además, se ha reportado que en *S. cerevisiae*, en respuesta al estrés de RE, se degradan porciones del este organelo sin que se requiera la participación de ATG1 o de componentes del sistema de conjugación [208] Esto, junto con nuestros datos, abre la posibilidad de que la autofagia que se requiere durante la respuesta al estrés de RE dependa únicamente del complejo ATG1, y que la formación de autofagosomas durante esta respuesta suceda mediante rutas alternativas al sistema de conjugación.

A diferencia de lo que ocurre en plantas y mamíferos, en *D. discoideum* existe un sólo ortólogo de IRE1. Esta característica facilita diseccionar el papel de esta cinasa en varios procesos celulares, dentro de ellos la inducción de la autofagia. En este trabajo se describe por primera vez que la inactivación de IreA en *D. discoideum*, no impide que se inicie una respuesta autofágica durante el estrés de RE [124], [125], en contraste con lo que se ha reportado en plantas y mamíferos, en donde IRE1 resulta ser esencial para que pueda llevarse a cabo dicha inducción. Sin embargo, las células de *D. discoideum* si requieren de IreA para que la autofagia sea eficiente. En particular, la mutante *ireA*⁻ presenta una disminución en su capacidad para degradar cargos citoplasmáticos durante el estrés

de RE. Además, en estas células, Atg18 se acumula anómalamente en agregados prematuros, elongados, que permanecen asociados al RE y que resultan ser persistentes en el tiempo. Posiblemente, estas estructuras representan autofagosomas que no logran ensamblarse correctamente, por lo que se mantienen asociados al RE y son incapaces de degradar cargos.

Dado que el RE funciona como la plataforma sobre la cual se ensamblan las vesículas autofágicas [88]–[90], [101], cualquier alteración en el RE, puede causar defectos en el proceso de formación de autofagosomas. Por ejemplo, en levaduras, se ha observado que la biogénesis de los autofagosomas se ve afectada cuando existe un desbalance en la homeostasis del RE a causa de alteraciones en su composición lipídica [209]. También, este efecto se observa tanto en células de mamífero, como de *D. discoideum* que carecen de Vmp1. La ausencia de esta proteína causa deficiencias en el RE, y esto a su vez genera defectos severos en pasos tempranos en la formación de los autofagosomas [150]. Nuestros datos muestran que existe un efecto similar en *D. discoideum* durante el estrés de RE cuando IreA está ausente o inactiva. En este caso, las células pierden la capacidad para recuperar la homeostasis del RE y esto causa alteraciones severas en el proceso de formación de los autofagosomas. Todo esto sugiere que durante el estrés de RE, IreA se requiere para mantener una estructura adecuada del RE, lo cual resulta esencial para que puedan ensamblarse autofagosomas funcionales.

5.5-Participación de BzpD en la respuesta a estrés de RE

Los datos de expresión masiva del ensayo de RNAseq mostraron que en *D. discoideum* solo el 45% de los cambios transcripcionales generados por un tratamiento con TN dependen de la actividad de IreA. Esto quiere decir que más de un 50 % de la reprogramación transcripcional que genera el estrés de RE en este organismo dependen de una o varias vías alternativas. En mamíferos existe una vía complementaria a la de IRE1, la cual depende de ATF6, un factor de transcripción tipo bZIP que se libera de la membrana del RE cuando incrementa la carga de proteínas mal plegadas al interior de este organelo [30], [210]. Sin embargo, al analizar por BLAST el genoma de *D. discoideum*, no logramos identificar ortólogos de este factor de transcripción. Posiblemente este resultado se deba a que los factores de transcripción tipo bZIP han divergido ampliamente durante la evolución, de forma que mediante análisis filogenéticos no ha sido posible establecer que existan ortólogos de la familia ATF6/HAC1 fuera del dominio opisthokonta [45], [211]. Sin embargo, en *A. thaliana* se ha identificado que existen homólogos funcionales tanto de XBP1, como de ATF6 [47], [212], [213]. Por este motivo analizamos si dentro de las 19 proteínas en las que se ha identificado un dominio bZIP en *D. discoideum* podía identificarse alguna que presentase características estructurales similares a ATF6. De esta forma, deducimos que BzpC, BzpD y BzpJ podrían ser buenos candidatos ya que

presentan un cruce transmembranal y al menos una secuencia de localización nuclear, características típicas de factores tipo ATF6.

Aunque la identidad las secuencias proteicas de BzpD y ATF6 es muy baja, nuestros resultados indican que son factores de transcripción análogos. En *D. discoideum*, BzpD responde ante el estrés de RE de forma muy similar a ATF6 y de la misma manera, se transporta al Golgi, se procesa proteolíticamente y se acumula en el núcleo. Además, su ausencia genera sensibilidad a un tratamiento con TN. Finalmente, el hecho de que en *D. discoideum* existan ortólogos de las dos proteasas de Golgi que participan en el procesamiento de ATF6 en otras especies (MBPTS1 y MBPTS2) sugiere que el mecanismo de activación de este factor de transcripción podría estar conservado en *D. discoideum*.

La traslocación de BzpD al Golgi sucede aproximadamente después de 60min de tratamiento con TN. En cambio, la activación de IreA (estimada por la formación de oligómeros) comienza a partir de las 2hrs de tratamiento. Esta diferencia temporal, sugiere que la respuesta mediada por BzpD es más rápida que la de IreA. Por lo que, es posible que este factor participe más tempranamente en el proceso de adaptación al estrés de RE. Estas diferencias en la temporalidad pueden deberse al mecanismo mediante el cual se regulan respectivamente estas dos rutas. Mientras que BzpD se produce constitutivamente y se puede activar rápidamente al ser procesada, la señalización mediada por la ruta de IreA posiblemente dependa de una paulatina acumulación de péptidos mal plegados y de cambios en la membrana del RE que permitan su oligomerización y su activación.

Aunque se ha planteado que la respuesta al estrés de RE mediada por los factores de transcripción tipo bZIP que son liberados de la membrana del RE apareció sólo en ciertas líneas evolutivas superiores, como la de los animales [45], [75], [203], [211], en este trabajo se muestra que en *D. discoideum*, un organismo que apareció antes de la divergencia de los opistocontos, existe una ruta homóloga constituida por la proteína BzpD. Esto sugiere que este sistema de señalización surgió de forma temprana durante la evolución, pero divergió y se especializó ampliamente. La divergencia en la secuencia de estos factores de transcripción puede deberse, entre otras cosas, a que la composición del genoma de los diferentes organismos causó que la secuencia de aminoácidos de los factores de transcripción tipo bZIP se ajustara para permitir la interacción entre los dominios de unión al DNA y las secuencias promotoras de cada organismo. Por ejemplo, el genoma de *D. discoideum* está compuesto en un 70% por adeninas (A) y timinas (T) [214], lo que podría relacionarse al hecho de que los factores de transcripción de éste organismos presenten secuencias muy particulares de aminoácidos.

En el caso de *D. discoideum*, además de las rutas que responden a un incremento en la concentración de proteínas mal plegadas en el RE, es posible que existan factores de transcripción de la familia de los bZIP capaces de regular otros aspectos que se requieren para mantener la homeostasis del RE. Es muy probable que algunos de estos factores residan en el RE y que puedan ser activados por

diferentes estímulos y generar diferentes respuestas transcripcionales, como es el caso del factor de transcripción de humanos SREBP (Sterol regulatory element-binding proteins), el cual detecta cambios en la composición lipídica del RE, y regula específicamente la síntesis de esteroides [215], [216], o el de bZIP17 de *A. thaliana*, que participa en la respuesta al estrés salino [217]. La caracterización de esos factores podría ampliar el panorama de la regulación de la homeostasis del RE.

6.-CONCLUSIONES

La TN es capaz de inducir la expresión de marcadores de estrés de RE, así como de generar cambios morfológicos y de afectar la viabilidad de las células de *D. discoideum*. Los efectos de la TN, tanto sobre la expresión de marcadores, como sobre la viabilidad celular, dependen del tiempo y la concentración de tratamiento con este antibiótico.

IreA es el único ortólogo de IRE1 en *D. discoideum* y su actividad resulta indispensable para contender con el estrés de RE.

Para señalizar, IreA se asocia transitoriamente en oligómeros. La regulación de la dinámica de formación y disociación de estos oligómeros requiere de que IreA se encuentre activa como cinasa y como ribonucleasa.

En *D. discoideum*, un tratamiento con TN genera una reprogramación de la expresión génica que permite, por un lado, incrementar la capacidad degradativa de las células y la de plegamiento de proteínas; y por otro disminuye la carga de proteínas en el RE. Esta respuesta depende parcialmente de IreA; la cual se requiere principalmente para incrementar la degradación de proteínas, mediante procesos relacionados a la ubiquitinación y para aligerar la carga del RE.

Ante un tratamiento con TN, las células de *D. discoideum* inducen la autofagia, y el complejo ATG1 resulta indispensable para lograr una respuesta completa de supervivencia ante este estrés.

IreA es dispensable para la inducción de la autofagia durante la respuesta al estrés de RE. Sin embargo, este proceso degradativo no es funcional cuando IreA está ausente o inactiva, debido a que las células no pueden recuperar la homeostasis de su RE.

BzpD participa en la respuesta a estrés de RE, y se regula mediante un mecanismo análogo al de ATF6 de mamíferos. Ante un tratamiento con TN, BzpD se transporta al Golgi, se procesa y se transporta al núcleo.

Los datos obtenidos en este trabajo permiten plantear el modelo de la **Figura 31**, la cual muestra que en *D. discoideum* la respuesta al estrés de RE está regulada por las proteínas transmembranales de RE, IreA y BzpD. Estas están involucradas en generar una reprogramación en la expresión génica que permitirá aumentar la capacidad de degradación celular y la de plegamiento de proteínas. Además, esta respuesta permite disminuir la carga de proteínas en el RE. Por otra parte, la respuesta a estrés de RE requiere de la inducción de la autofagia. Esta inducción resulta ser independiente de IreA. Sin embargo, se requiere la presencia de esta proteína para que se recupere la homeostasis del RE y por lo tanto para que los autofagosomas puedan formarse adecuadamente.

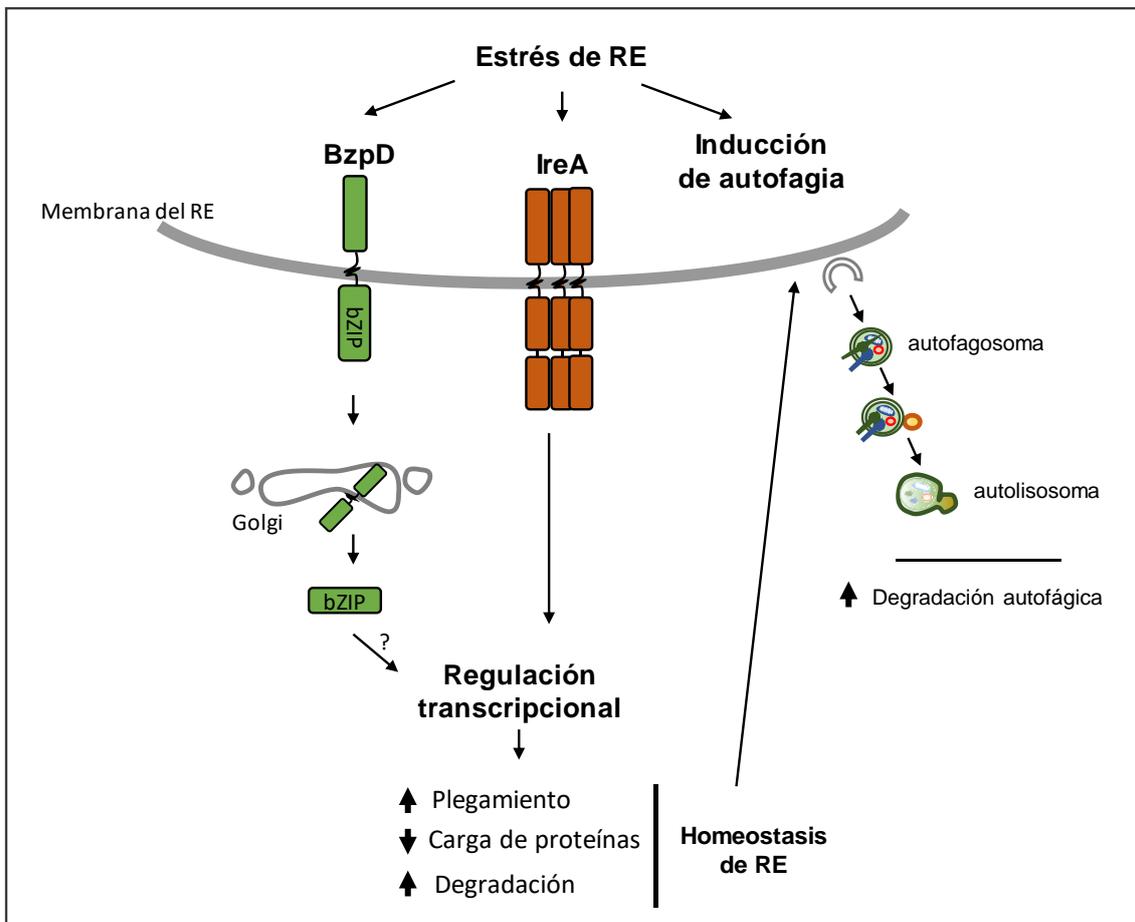


Figura 31. Modelo de la ruta de respuesta a estrés de RE en *D. discoideum*.

7. REFERENCIAS

- [1] E. Snapp, "Endoplasmic Reticulum Biogenesis: Proliferation and Differentiation," in *The Biogenesis of Cellular Organelles*, C. Mullins, Ed. Landes Bioscience, Kluwer Academic / Plenum Publishers, 2005, pp. 63–95.
- [2] L. M. Westrate, J. E. Lee, W. A. Prinz, and G. K. Voeltz, "Form Follows Function: The Importance of Endoplasmic Reticulum Shape," *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 84, no. 1, pp. 791–811, 2015.
- [3] J. Nixon-Abell *et al.*, "Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER," *Science*, vol. 354, no. 6311, pp. aaf3928–aaf3928, Oct. 2016.
- [4] R. Fernández-Busnadiego, Y. Saheki, and P. De Camilli, "Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum–plasma membrane contact sites," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 16, pp. E2004–E2013, 2015.
- [5] M. W. Hetzer, "The Nuclear Envelope," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 2, no. 3, pp. a000539–a000539, 2010.
- [6] M. Terasaki *et al.*, "Stacked endoplasmic reticulum sheets are connected by helicoidal membrane motifs," *Cell*, vol. 154, no. 2, pp. 285–96, 2013.
- [7] Y. Shibata, G. K. Voeltz, and T. A. Rapoport, "Rough Sheets and Smooth Tubules," *Cell*, vol. 126, no. 3, pp. 435–439, 2006.
- [8] S. Chen, T. Desai, J. A. McNew, P. Gerard, P. J. Novick, and S. Ferro-Novick, "Lunapark stabilizes nascent three-way junctions in the endoplasmic reticulum," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 112, no. 2, pp. 418–423, 2015.
- [9] C. M. Waterman-Storer and E. D. Salmon, "Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms," *Curr. Biol.*, vol. 8, no. 14, pp. 798–807, 1998.
- [10] P. S. Gurel, A. L. Hatch, and H. N. Higgs, "Connecting the cytoskeleton to the endoplasmic reticulum and Golgi," *Curr. Biol.*, vol. 24, no. 14, pp. 660–672, 2014.
- [11] B. Bola and V. Allan, "How and why does the endoplasmic reticulum move?," *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 37, no. Pt 5, pp. 961–5, 2009.
- [12] T. Oertle, M. Klinger, C. A. O. Stuermer, and M. E. Schwab, "A reticular rhapsody: phylogenic evolution and nomenclature of the RTN/Nogo gene family," *FASEB J.*, vol. 17, no. 10, pp. 1238–47, Jul. 2003.
- [13] N. Zurek, L. Sparks, and G. Voeltz, "Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules," *Traffic*, vol. 12, no. 1, pp. 28–41, 2011.
- [14] T. Y. Liu *et al.*, "Lipid interaction of the C terminus and association of the transmembrane segments facilitate atlastin-mediated homotypic endoplasmic reticulum fusion," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 109, no. 32, pp. E2146–E2154, 2012.
- [15] J. A. McNew, H. Sondermann, T. Lee, M. Stern, and F. Brandizzi, "GTP-Dependent Membrane Fusion," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 29, no. 1, pp. 529–550, 2013.
- [16] X. Bian *et al.*, "Structures of the atlastin GTPase provide insight into homotypic fusion of endoplasmic reticulum membranes," *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 108, no. 10, pp. 3976–3981, 2011.
- [17] D. S. Schwarz and M. D. Blower, "The endoplasmic reticulum: Structure, function and response to cellular signaling," *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 73, no. 1, pp. 79–94, 2016.

- [18] C. Xu and D. T. W. Ng, "Glycosylation-directed quality control of protein folding," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 16, no. 12, pp. 742–752, 2015.
- [19] L. Halperin, J. Jung, and M. Michalak, "The many functions of the endoplasmic reticulum chaperones and folding enzymes," *IUBMB Life*, vol. 66, no. 5, pp. 318–326, 2014.
- [20] A. Korennykh and P. Walter, "Structural Basis of the Unfolded Protein Response," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 28, no. 1, pp. 251–277, 2012.
- [21] A. Müller-Taubenberger, a N. Lupas, H. Li, M. Ecke, E. Simmeth, and G. Gerisch, "Calreticulin and calnexin in the endoplasmic reticulum are important for phagocytosis.," *EMBO J.*, vol. 20, no. 23, pp. 6772–82, Dec. 2001.
- [22] T. Gidalevitz, F. Stevens, and Y. Argon, "Orchestration of secretory protein folding by ER chaperones," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1833, no. 11, pp. 2410–2424, 2013.
- [23] I. Braakman and D. N. Hebert, "Protein folding in the endoplasmic reticulum," *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, no. 5, p. a013201, 2013.
- [24] C. M. Osowski and F. Urano, *Measuring ER stress and the unfolded protein response using mammalian tissue culture system*, 1st ed., vol. 490, no. C. Elsevier Inc., 2011.
- [25] K. J. Travers, C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman, and P. Walter, "Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation," *Cell*, vol. 101, no. 3, pp. 249–58, Apr. 2000.
- [26] D. Ron and P. Walter, "Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response," *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 8, no. 7. pp. 519–529, 2007.
- [27] D. Scheuner *et al.*, "Translational control is required for the unfolded protein response and in vivo glucose homeostasis.," *Mol. Cell*, vol. 7, no. 6, pp. 1165–76, 2001.
- [28] M. Maurel, E. Chevet, J. Tavernier, and S. Gerlo, "Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation," *Trends Biochem. Sci.*, vol. 39, no. 5, pp. 245–254, 2014.
- [29] H. Wu, B. S. H. Ng, and G. Thibault, "Endoplasmic reticulum stress response in yeast and humans," *Biosci. Rep.*, vol. 34, no. 4, pp. 321–330, 2014.
- [30] R. Chakraborty, J. H. Baek, E. Y. Bae, W. Y. Kim, S. Y. Lee, and M. G. Kim, "Comparison and contrast of plant, yeast, and mammalian ER stress and UPR," *Appl. Biol. Chem.*, vol. 59, no. 3, pp. 337–347, 2016.
- [31] A. Bertolotti *et al.*, "Increased sensitivity to dextran sodium sulfate colitis in IRE1 β -deficient mice," *J. Clin. Invest.*, vol. 107, no. 5, pp. 585–593, 2001.
- [32] M. B. Martino *et al.*, "The ER stress transducer IRE1 β is required for airway epithelial mucin production," *Mucosal Immunol.*, vol. 6, no. 3, pp. 639–654, May 2013.
- [33] N. Koizumi, I. M. Martinez, Y. Kimata, K. Kohno, H. Sano, and M. J. Chrispeels, "Molecular characterization of two Arabidopsis Ire1 homologs, endoplasmic reticulum-located transmembrane protein kinases.," *Plant Physiol.*, vol. 127, no. 3, pp. 949–62, 2001.
- [34] S. J. Noh, C. S. Kwon, and W. I. Chung, "Characterization of two homologs of Ire1p, a kinase/endoribonuclease in yeast, in Arabidopsis thaliana," *Biochim. Biophys. Acta - Gene Struct. Expr.*, vol. 1575, no. 1–3, pp. 130–134, 2002.
- [35] K. P. K. Lee, M. Dey, D. Neculai, C. Cao, T. E. Dever, and F. Sicheri, "Structure of the Dual Enzyme Ire1 Reveals the Basis for Catalysis and Regulation in Nonconventional RNA Splicing," *Cell*, vol. 132, no. 1, pp. 89–100, Jan. 2008.
- [36] D. Ron and S. R. Hubbard, "How IRE1 reacts to ER stress.," *Cell*, vol. 132, no. 1, pp. 24–6, Jan. 2008.

- [37] E. Domínguez-Martín, M. Hernández-Elvira, O. Vincent, R. Coria, and R. Escalante, "Unfolding the Endoplasmic Reticulum of a Social Amoeba: Dictyostelium discoideum as a New Model for the Study of Endoplasmic Reticulum Stress," *Cells*, vol. 7, no. 6, p. 56, Jun. 2018.
- [38] Y. Kimata *et al.*, "Two regulatory steps of ER-stress sensor Ire1 involving its cluster formation and interaction with unfolded proteins," *J. Cell Biol.*, vol. 179, no. 1, pp. 75–86, 2007.
- [39] D. Oikawa, Y. Kimata, and K. Kohno, "Self-association and BiP dissociation are not sufficient for activation of the ER stress sensor Ire1.," *J. Cell Sci.*, vol. 120, no. Pt 9, pp. 1681–8, May 2007.
- [40] B. M. Gardner and P. Walter, "Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response.," *Science (80-.)*, vol. 333, no. 6051, pp. 1891–4, Sep. 2011.
- [41] G. E. Karagöz, D. Acosta-Alvear, H. T. Nguyen, C. P. Lee, F. Chu, and P. Walter, "An unfolded protein-induced conformational switch activates mammalian IRE1," *Elife*, vol. 6, pp. 1–29, 2017.
- [42] T. Aragón *et al.*, "Messenger RNA targeting to endoplasmic reticulum stress signalling sites," *Nature*, vol. 457, no. 7230, pp. 736–740, Feb. 2009.
- [43] Y. Iwata and N. Koizumi, "Plant transducers of the endoplasmic reticulum unfolded protein response," *Trends Plant Sci.*, vol. 17, no. 12, pp. 720–727, 2012.
- [44] T. N. Gonzalez, C. Sidrauski, S. Dörfler, and P. Walter, "Mechanism of non-spliceosomal mRNA splicing in the unfolded protein response pathway.," *EMBO J.*, vol. 18, no. 11, pp. 3119–32, Jun. 1999.
- [45] K. Jindrich and B. M. Degnan, "The diversification of the basic leucine zipper family in eukaryotes correlates with the evolution of multicellularity Genome evolution and evolutionary systems biology," *BMC Evol. Biol.*, vol. 16, no. 1, pp. 1–12, 2016.
- [46] K. Yanagitani *et al.*, "Cotranslational Targeting of XBP1 Protein to the Membrane Promotes Cytoplasmic Splicing of Its Own mRNA," *Mol. Cell*, vol. 34, no. 2, pp. 191–200, 2009.
- [47] Y. Nagashima, K. Mishiba, E. Suzuki, Y. Shimada, Y. Iwata, and N. Koizumi, "Arabidopsis IRE1 catalyses unconventional splicing of bZIP60 mRNA to produce the active transcription factor.," *Sci. Rep.*, vol. 1, no. 1, p. 29, Dec. 2011.
- [48] L. Sathe, C. Bolinger, M. Amin-UI Mannan, T. E. Dever, and M. Dey, "Evidence that base-pairing interaction between intron and mRNA leader sequences inhibits initiation of HAC1 mRNA translation in yeast," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 36, pp. 21821–21832, 2015.
- [49] U. Rügsegger, J. H. Leber, and P. Walter, "Block of HAC1 mRNA translation by long-range base pairing is released by cytoplasmic splicing upon induction of the unfolded protein response," *Cell*, vol. 107, no. 1, pp. 103–114, 2001.
- [50] K. B. Hooks and S. Griffiths-Jones, "Conserved RNA structures in the non-canonical Hac1/Xbp1 intron.," *RNA Biol.*, vol. 8, no. 4, pp. 552–6, 2011.
- [51] J. Hollien and J. S. Weissman, "Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response," *Science (80-.)*, vol. 313, no. 5783, 2006.
- [52] J. Hollien, J. H. Lin, H. Li, N. Stevens, P. Walter, and J. S. Weissman, "Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells," *J. Cell Biol.*, vol. 186, no. 3, pp. 323–331, 2009.
- [53] P. Kimmig *et al.*, "The unfolded protein response in fission yeast modulates stability of select mRNAs to maintain protein homeostasis.," *Elife*, vol. 1, p. e00048, Jan. 2012.
- [54] S. Hayashi, Y. Wakasa, K. Ozawa, and F. Takaiwa, "Characterization of IRE1 ribonuclease-mediated mRNA decay in plants using transient expression analyses in rice protoplasts," *New Phytol.*, vol. 210, no. 4, pp. 1259–1268, 2016.
- [55] K. -i. Mishiba *et al.*, "Defects in IRE1 enhance cell death and fail to degrade mRNAs encoding secretory pathway proteins in the Arabidopsis unfolded protein response," *Proc. Natl. Acad. Sci.*,

vol. 110, no. 14, pp. 5713–5718, 2013.

- [56] K. Moore and J. Hollien, “Ire1-mediated decay in mammalian cells relies on mRNA sequence, structure, and translational status,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 26, no. 16, pp. 2873–2884, 2015.
- [57] A. B. Tam, A. C. Koong, and M. Niwa, “Ire1 Has Distinct Catalytic Mechanisms for XBP1/HAC1 Splicing and RIDD,” *Cell Rep.*, vol. 9, no. 3, pp. 850–858, 2014.
- [58] M. D. Bright, D. N. Itzhak, C. P. Wardell, G. J. Morgan, and F. E. Davies, “Cleavage of *BLOC1S1* mRNA by IRE1 Is Sequence Specific, Temporally Separate from *XBP1* Splicing, and Dispensable for Cell Viability under Acute Endoplasmic Reticulum Stress,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 35, no. 12, pp. 2186–2202, 2015.
- [59] W. Cui, J. Li, D. Ron, and B. Sha, “The structure of the PERK kinase domain suggests the mechanism for its activation,” *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, vol. 67, no. 5, pp. 423–428, 2011.
- [60] J. Zhou *et al.*, “The crystal structure of human IRE1 luminal domain reveals a conserved dimerization interface required for activation of the unfolded protein response,” *{PROCEEDINGS Natl. Acad. Sci. UNITED STATES Am.}*, vol. {103}, no. {39}.
- [61] H. P. Harding *et al.*, “Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells,” *Mol. Cell*, vol. 6, no. 5, pp. 1099–1108, 2000.
- [62] J. B. DuRose, D. Scheuner, R. J. Kaufman, L. I. Rothblum, and M. Niwa, “Phosphorylation of Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Coordinates rRNA Transcription and Translation Inhibition during Endoplasmic Reticulum Stress,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 29, no. 15, pp. 4295–4307, 2009.
- [63] R. C. Wek, “Role of eIF2 α Kinases in Translational Control and Adaptation to Cellular Stress,” *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, p. a032870, 2018.
- [64] D. Scheuner *et al.*, “Control of mRNA translation preserves endoplasmic reticulum function in beta cells and maintains glucose homeostasis,” *Nat. Med.*, vol. 11, no. 7, pp. 757–764, 2005.
- [65] K. M. Vattem and R. C. Wek, “Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 31, pp. 11269–11274, 2004.
- [66] K. Ameri and A. L. Harris, “Activating transcription factor 4,” *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, vol. 40, no. 1, pp. 14–21, 2008.
- [67] D. T. Rutkowski and R. J. Kaufman, “All roads lead to ATF4,” *Dev. Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 442–444, 2003.
- [68] M. Li *et al.*, “ATF6 as a transcription activator of the endoplasmic reticulum stress element: thapsigargin stress-induced changes and synergistic interactions with NF- κ B and YY1,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 20, no. 14, pp. 5096–106, Jul. 2000.
- [69] S. Nadanaka, T. Okada, H. Yoshida, and K. Mori, “Role of Disulfide Bridges Formed in the Luminal Domain of ATF6 in Sensing Endoplasmic Reticulum Stress,” *Mol. Cell. Biol.*, vol. 27, no. 3, pp. 1027–1043, 2007.
- [70] J. Shen, X. Chen, L. Hendershot, and R. Prywes, “ER stress regulation of ATF6 localization by dissociation of BiP/GRP78 binding and unmasking of golgi localization signals,” *Dev. Cell*, vol. 3, no. 1.
- [71] J. Ye *et al.*, “ER Stress Induces Cleavage of Membrane-Bound ATF6 by the Same Proteases that Process SREBPs,” *Mol. Cell*, vol. 6, pp. 1355–1364, 2000.
- [72] R. F. Hillary and U. Fitzgerald, “A lifetime of stress : ATF6 in development and homeostasis,” pp. 1–10, 2018.
- [73] S. Kondo, A. Saito, R. Asada, S. Kanemoto, and K. Imaizumi, “Physiological unfolded protein

- response regulated by OASIS family members, transmembrane bZIP transcription factors,” *IUBMB Life*, vol. 63, no. 4, pp. 233–239, 2011.
- [74] R. Asada, S. Kanemoto, S. Kondo, A. Saito, and K. Imaizumi, “The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology,” *J. Biochem.*, vol. 149, no. 5, pp. 507–518, 2011.
- [75] A. Saito, “Physiological functions of endoplasmic reticulum stress transducer OASIS in central nervous system,” *Anat. Sci. Int.*, vol. 89, no. 1, pp. 11–20, 2014.
- [76] I. Tanida, “Autophagy basics,” *Microbiol. Immunol.*, vol. 55, no. 1, pp. 1–11, 2011.
- [77] A. L. Anding and E. H. Baehrecke, “Cleaning House: Selective Autophagy of Organelles,” *Dev. Cell*, vol. 41, no. 1, pp. 10–22, 2017.
- [78] D. Gatica, V. Lahiri, and D. J. Klionsky, “Cargo recognition and degradation by selective autophagy,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 20, no. 3, pp. 233–242, 2018.
- [79] W. W. Li, J. Li, and J. K. Bao, “Microautophagy: Lesser-known self-eating,” *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 69, no. 7, pp. 1125–1136, 2012.
- [80] S. Kaushik and A. M. Cuervo, “Chaperone-mediated autophagy: A unique way to enter the lysosome world,” *Trends Cell Biol.*, vol. 22, no. 8, pp. 407–417, 2012.
- [81] F. Li and R. D. Vierstra, “Autophagy: A multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling,” *Trends Plant Sci.*, vol. 17, no. 9, pp. 526–537, 2012.
- [82] G. Kroemer, G. Mariño, and B. Levine, “Autophagy and the Integrated Stress Response,” *Mol. Cell*, vol. 40, no. 2, pp. 280–293, 2010.
- [83] R. C. Russell, H.-X. Yuan, and K.-L. Guan, “Autophagy regulation by nutrient signaling,” *Cell Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 42–57, 2014.
- [84] G. Filomeni, D. De Zio, F. Cecconi, D. De Zio, and F. Cecconi, “Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs,” *Cell Death Differ.*, vol. 22, no. 3, pp. 377–388, 2015.
- [85] J. S. King, D. M. Veltman, and R. H. Insall, “The induction of autophagy by mechanical stress,” *Autophagy*, vol. 7, no. 12, pp. 1490–1499, 2011.
- [86] T. Yorimitsu, U. Nair, Z. Yang, and D. J. Klionsky, “Endoplasmic Reticulum Stress Triggers Autophagy,” *J. Biol. Chem.*, vol. 281, no. 40, pp. 30299–30304, 2006.
- [87] E. a. Dunlop and a. R. Tee, “mTOR and autophagy: A dynamic relationship governed by nutrients and energy,” *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 36, pp. 121–129, 2014.
- [88] E. L. Axe *et al.*, “Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum,” *J. Cell Biol.*, vol. 182, no. 4, pp. 685–701, 2008.
- [89] M. Hamasaki *et al.*, “Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites,” *Nature*, vol. 495, no. 7441, pp. 389–393, 2013.
- [90] M. Graef, J. R. Friedman, C. Graham, M. Babu, and J. Nunnari, “ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, no. 18, pp. 2918–31, 2013.
- [91] K. Suzuki, M. Akioka, C. Kondo-Kakuta, H. Yamamoto, and Y. Ohsumi, “Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*,” *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. Pt 11, pp. 2534–44, Jun. 2013.
- [92] Y. Ohsumi, “Historical landmarks of autophagy research,” *Cell Res.*, vol. 24, no. 1, pp. 9–23, 2014.
- [93] D. Papinski and C. Kraft, “Regulation of Autophagy By Signaling Through the Atg1 / ULK1

- Complex," *J. Mol. Biol.*, vol. 428, no. 9, pp. 1725–1741, 2016.
- [94] Y. Kamada, T. Funakoshi, T. Shintani, K. Nagano, M. Ohsumi, and Y. Ohsumi, "Tor-mediated induction of autophagy via an Apg1 protein kinase complex," *J. Cell Biol.*, vol. 150, no. 6, pp. 1507–1513, 2000.
- [95] C. H. Jung *et al.*, "ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery," *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, no. 7, pp. 1992–2003, 2009.
- [96] I. G. Ganley, D. H. Lam, J. Wang, X. Ding, S. Chen, and X. Jiang, "ULK1·ATG13·FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy," *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 18, pp. 12297–12305, 2009.
- [97] N. Hosokawa *et al.*, "Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1 – Atg13 – FIP200 Complex Required for Autophagy," *Mol. Biol. Cell*, vol. 20, no. 7, pp. 1981–1991, 2009.
- [98] D. Papinski *et al.*, "Early Steps in Autophagy Depend on Direct Phosphorylation of Atg9 by the Atg1 Kinase," *Mol. Cell*, vol. 53, no. 3, pp. 471–483, 2014.
- [99] R. C. Russell *et al.*, "ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 741–750, 2013.
- [100] V. Y. Nazarko and Q. Zhong, "ULK1 targets Beclin-1 in autophagy," *Nat. Cell Biol.*, vol. 15, no. 7, pp. 727–728, 2013.
- [101] A. C. Nascimbeni *et al.*, "ER–plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis," *EMBO J.*, vol. 36, no. 14, pp. 2018–2033, 2017.
- [102] C. Burman and N. T. Ktistakis, "Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate," *FEBS Lett.*, vol. 584, no. 7, pp. 1302–1312, 2010.
- [103] K. Obara, T. Sekito, K. Niimi, and Y. Ohsumi, "The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function," *J. Biol. Chem.*, vol. 283, no. 35, pp. 23972–23980, 2008.
- [104] L. Ge and R. Schekman, "The ER-Golgi intermediate compartment feeds the phagophore membrane," *Autophagy*, vol. 10, no. 1, pp. 170–172, 2014.
- [105] H. Yamamoto *et al.*, "Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation," *J. Cell Biol.*, vol. 198, no. 2, pp. 219–33, Jul. 2012.
- [106] K. Shirahama-Noda, S. Kira, T. Yoshimori, and T. Noda, "TRAPP3 is responsible for vesicular transport from early endosomes to Golgi, facilitating Atg9 cycling in autophagy," *J. Cell Sci.*, vol. 126, no. 21, pp. 4963–4973, 2013.
- [107] R. Gómez-Sánchez *et al.*, "Atg9 establishes Atg2-dependent contact sites between the endoplasmic reticulum and phagophores," *J. Cell Biol.*, p. jcb.201710116, 2018.
- [108] T. Shpilka, H. Weidberg, S. Pietrokovski, and Z. Elazar, "Atg8: An autophagy-related ubiquitin-like protein family," *Genome Biol.*, 2011.
- [109] T. Hanada and Y. Ohsumi, "Structure-function relationship of Atg12, a ubiquitin-like modifier essential for autophagy," *Autophagy*, 2005.
- [110] H. Nakatogawa, "Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy," *Essays Biochem.*, vol. 55, pp. 39–50, 2013.
- [111] N. Mizushima *et al.*, "A protein conjugation system essential for autophagy," *Nature*, vol. 395, no. 6700, pp. 395–398, 1998.
- [112] H. C. Dooley, M. Razi, H. E. J. Polson, S. E. Girardin, M. I. Wilson, and S. A. Tooze, "WIPI2 Links LC3 Conjugation with PI3P, Autophagosome Formation, and Pathogen Clearance by Recruiting Atg12-5-16L1," *Mol. Cell*, vol. 55, no. 2, pp. 238–252, 2014.

- [113] Y. Ichimura *et al.*, "A ubiquitin-like system mediates protein lipidation," *Nature*, vol. 408, no. 6811, pp. 488–492, 2000.
- [114] I. Abdollahzadeh, M. Schwarten, T. Gensch, D. Willbold, and O. H. Weiergräber, "The Atg8 family of proteins—modulating shape and functionality of autophagic membranes," *Front. Genet.*, vol. 8, no. AUG, pp. 1–7, 2017.
- [115] Y. K. Lee and J. A. Lee, "Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: Differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy," *BMB Rep.*, vol. 49, no. 8, pp. 424–430, 2016.
- [116] T. Yoshimori, "An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure," *Seikagaku*, vol. 82, no. 4, pp. 327–331, 2010.
- [117] K. Tabata, K. Matsunaga, A. Sakane, T. Sasaki, T. Noda, and T. Yoshimori, "Rubicon and PLEKHM1 Negatively Regulate the Endocytic/Autophagic Pathway via a Novel Rab7-binding Domain," *Mol. Biol. Cell*, vol. 21, no. 23, pp. 4162–4172, 2010.
- [118] D. G. McEwan *et al.*, "PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins," *Mol. Cell*, vol. 57, no. 1, pp. 39–54, 2015.
- [119] P. Jiang *et al.*, "The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17," *Mol. Biol. Cell*, vol. 25, no. 8, pp. 1327–1337, 2014.
- [120] S. Bernales, K. L. McDonald, and P. Walter, "Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response.," *PLoS Biol.*, vol. 4, no. 12, pp. 2311–2324, Nov. 2006.
- [121] S. Schuck, C. M. Gallagher, and P. Walter, "ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery.," *J. Cell Sci.*, no. July 2014, 2014.
- [122] S. Matus, F. Lisbona, M. Torres, C. Leon, P. Thielen, and C. Hetz, "The Stress Rheostat: An Interplay Between the Unfolded Protein Response (UPR) and Autophagy in Neurodegeneration," *Curr. Mol. Med.*, vol. 8, no. 3, pp. 157–172, 2008.
- [123] S. A. Houck *et al.*, "Quality Control Autophagy Degrades Soluble ERAD-Resistant Conformers of the Misfolded Membrane Protein GnRHR," *Mol. Cell*, vol. 54, no. 1, pp. 166–179, 2014.
- [124] M. Ogata *et al.*, "Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 26, no. 24, pp. 9220–31, Dec. 2006.
- [125] Y. Liu, J. S. Burgos, Y. Deng, R. Srivastava, S. H. Howell, and D. C. Bassham, "Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis.," *Plant Cell*, vol. 24, no. 11, pp. 4635–51, Nov. 2012.
- [126] F. Fumagalli *et al.*, "Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery," *Nat. Cell Biol.*, vol. 18, no. 11, pp. 1173–1184, 2016.
- [127] H. Wu, H. Wei, S. Arslan, L. Liu, and Q. Chen, "Free Radical Biology and Medicine Mitophagy receptors sense stress signals and couple mitochondrial dynamic machinery for mitochondrial quality control," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 100, pp. 199–209, 2016.
- [128] S. Muñoz-Braceras, A. Mesquita, and R. Escalante, *Dictyostelium discoideum as a Model in Biomedical Research*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013.
- [129] S. Annesley and P. Fisher, "Dictyostelium discoideum—a model for many reasons," *Mol. Cell. Biochem.*, vol. 329, no. 1, pp. 73–91, Sep. 2009.
- [130] S. J. Annesley *et al.*, "Dictyostelium, a microbial model for brain disease," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1840, no. 4, pp. 1413–1432, 2014.
- [131] K. Dannat, J. Tillner, T. Winckler, M. Weiss, K. Eger, and T. Dingermann, "Effects of medicinal

compounds on the differentiation of the eukaryotic microorganism *Dictyostelium discoideum*: Can this model be used as a screening test for reproductive toxicity in humans?," *Pharmazie*, vol. 58, no. 3, pp. 204–210, 2003.

- [132] X. H. Liao *et al.*, "A High-Throughput, Multi-Cell Phenotype Assay for the Identification of Novel Inhibitors of Chemotaxis/Migration," *Sci. Rep.*, vol. 6, 2016.
- [133] S. Alexander and H. Alexander, "Lead genetic studies in *Dictyostelium discoideum* and translational studies in human cells demonstrate that sphingolipids are key regulators of sensitivity to cisplatin and other anticancer drugs," *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 22, no. 1. pp. 97–104, 2011.
- [134] M. Steinert, "Pathogen?host interactions in *Dictyostelium*, *Legionella*, *Mycobacterium* and other pathogens," *Semin. Cell Dev. Biol.*, vol. 22, no. 1, pp. 70–76, Feb. 2011.
- [135] J. D. Dunn *et al.*, "Eat prey, live: *Dictyostelium discoideum* as a model for cell-autonomous defenses," *Frontiers in Immunology*, vol. 8, no. JAN. 2018.
- [136] W. F. Loomis, "Cell signaling during development of *Dictyostelium*," *Dev. Biol.*, vol. 391, no. 1, pp. 1–16, Jul. 2014.
- [137] L. Strmecki, D. M. Greene, and C. J. Pears, "Developmental decisions in *Dictyostelium discoideum*," *Dev. Biol.*, vol. 284, no. 1, pp. 25–36, Aug. 2005.
- [138] P. Schaap, "Evolutionary crossroads in developmental biology: *Dictyostelium discoideum*," *Development*, vol. 138, no. 3, pp. 387–96, Mar. 2011.
- [139] R. L. Chisholm and R. A. Firtel, "Insights into morphogenesis from a simple developmental system," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 7, pp. 531–541, 2004.
- [140] J. Calvo-garrido *et al.*, "Autophagy in *Dictyostelium* : Genes and pathways , cell death and infection," *Autophagy*, vol. 66, no. August, pp. 686–701, 2010.
- [141] A. Mesquita *et al.*, "Autophagy in *Dictyostelium*: Mechanisms, regulation and disease in a simple biomedical model," *Autophagy*, vol. 13, no. 1, pp. 1–17, 2017.
- [142] E. Domínguez-Martín, E. Cardenal-Muñoz, J. King, T. Soldati, R. Coria, and R. Escalante, "Methods to Monitor and Quantify Autophagy in the Social Amoeba *Dictyostelium discoideum*," *Cells*, vol. 6, no. 3, p. 18, 2017.
- [143] A. Mesquita, L. C. Tábara, O. Martinez-Costa, N. Santos-Rodrigo, O. Vincent, and R. Escalante, "Dissecting the function of Atg1 complex in *Dictyostelium* autophagy reveals a connection with the pentose phosphate pathway enzyme transketolase," *Open Biol.*, vol. 5, no. 8, p. 150088, Aug. 2015.
- [144] J. Calvo-garrido *et al.*, "Genes and pathways , cell death and infection Autophagy in *Dictyostelium*," *Autophagy*, vol. 6, no. 6, pp. 686–701, 2010.
- [145] G. P. Otto, M. Y. Wu, N. Kazgan, O. R. Anderson, and R. H. Kessin, "Dictyostelium macroautophagy mutants vary in the severity of their developmental defects.," *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 15, pp. 15621–9, May 2004.
- [146] J. Matthias, S. Meßling, and L. Eichinger, "The two *Dictyostelium* autophagy eight proteins , ATG8a and ATG8b , associate with the autophagosome in succession," *Eur. J. Cell Biol.*, vol. 95, no. 1, pp. 15–25, 2016.
- [147] G. P. Otto, M. Y. Wu, N. Kazgan, O. R. Anderson, and R. H. Kessin, "Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*," *J. Biol. Chem.*, vol. 278, no. 20, pp. 17636–45, May 2003.
- [148] S. Muñoz-Bracerás, R. Calvo, and R. Escalante, "TipC and the chorea-acanthocytosis protein VPS13A regulate autophagy in *Dictyostelium* and human HeLa cells.," *Autophagy*, vol. 11, no. 6, pp. 918–927, May 2015.

- [149] J. Calvo-Garrido and R. Escalante, "Autophagy dysfunction and ubiquitin-positive protein aggregates in Dictyostelium cells lacking Vmp1," *Autophagy*, vol. 6, no. 1, pp. 100–109, 2010.
- [150] J. Calvo-Garrido, J. S. King, S. Muñoz-Braceras, and R. Escalante, "Vmp1 regulates PtdIns3P signaling during autophagosome formation in Dictyostelium discoideum," *Traffic*, vol. 11, pp. 1235–1246, Aug. 2014.
- [151] S. Carilla-Latorre, S. J. Annesley, S. Muñoz-Braceras, P. R. Fisher, and R. Escalante, "Ndufa5 deficiency in the Dictyostelium model: new roles in autophagy and development.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 24, no. 10, pp. 1519–28, 2013.
- [152] M. Cabral, C. Anjard, V. Malhotra, W. F. Loomis, and A. Kuspa, "Unconventional secretion of AcbA in Dictyostelium discoideum through a vesicular intermediate.," *Eukaryot. Cell*, vol. 9, no. 7, pp. 1009–17, 2010.
- [153] W. F. Whittingham and K. B. Raper, "Non-Viability of Stalk Cells in Dictyostelium.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 46, no. 5, pp. 642–9, 1960.
- [154] J.-P. Levraud, M. Adam, M.-F. Luciani, C. de Chastellier, R. L. Blanton, and P. Golstein, "Dictyostelium cell death: early emergence and demise of highly polarized paddle cells.," *J. Cell Biol.*, vol. 160, no. 7, pp. 1105–14, Mar. 2003.
- [155] B. Steiner *et al.*, "ER remodeling by the large GTPase atlastin promotes vacuolar growth of Legionella pneumophila," *EMBO Rep.*, vol. 18, no. 10, pp. 1–20, 2017.
- [156] T. Morita, K. Saitoh, T. Takagi, and Y. Maeda, "Involvement of the glucose-regulated protein 94 (Dd-GRP94) in starvation response of Dictyostelium discoideum cells.," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 274, no. 2, pp. 323–31, Aug. 2000.
- [157] J. Monnat *et al.*, "Dictyostelium discoideum protein disulfide isomerase, an endoplasmic reticulum resident enzyme lacking a KDEL-type retrieval signal.," *FEBS Lett.*, vol. 418, no. 3, pp. 357–62, Dec. 1997.
- [158] J. Monnat, E. M. Neuhaus, M. S. Pop, D. M. Ferrari, B. Kramer, and T. Soldati, "Identification of a novel saturable endoplasmic reticulum localization mechanism mediated by the C-terminus of a Dictyostelium protein disulfide isomerase.," *Mol. Biol. Cell*, vol. 11, no. 10, pp. 3469–84, Oct. 2000.
- [159] H. Adachi, T. Hasebe, K. Yoshinaga, T. Ohta, and K. Sutoh, "Isolation of Dictyostelium discoideum Cytokinesis Mutants by Restriction Enzyme-Mediated Integration of the Blasticidin S Resistance Marker," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 205, no. 3, pp. 1808–1814, 1994.
- [160] D. A. Knecht, S. M. Cohen, W. F. Loomis, and H. F. Lodish, "Developmental regulation of Dictyostelium discoideum actin gene fusions carried on low-copy and high-copy transformation vectors.," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 6, no. 11, pp. 3973–83, 1986.
- [161] D. M. Veltman, G. Akar, L. Bosgraaf, and P. J. M. Van Haastert, "A new set of small, extrachromosomal expression vectors for Dictyostelium discoideum.," *Plasmid*, vol. 61, no. 2, pp. 110–8, Mar. 2009.
- [162] J. Calvo-Garrido, S. Carilla-Latorre, A. Mesquita, and R. Escalante, "A proteolytic cleavage assay to monitor autophagy in dictyostelium discoideum," *Autophagy*, vol. 7, no. 9, pp. 1063–1068, 2011.
- [163] J. Sambrook and D. W. Russell, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual," *Cold Spring Harb. Lab. Press. Cold Spring Harb. NY*, 2001.
- [164] D. B. Flagfeldt, V. Siewers, L. Huang, and J. Nielsen, "Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in Saccharomyces cerevisiae.," *Yeast*, vol. 26, no. 10, pp. 545–551, 2009.
- [165] P. Gaudet, K. E. Pilcher, P. Fey, and R. L. Chisholm, "Transformation of Dictyostelium discoideum

- with plasmid DNA.," *Nat. Protoc.*, vol. 2, no. 6, pp. 1317–24, Jan. 2007.
- [166] D. R. Cole Trapnell, Adam Roberts, Loyal Goff, Geo Pertea, Daehwan Kim and L. P. Kelley, Harold Pimentel, Steven L Salzberg, John L Rinn, "Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks," *Nat Protoc.* ; 7(3) 562–578., vol. 7, no. 3, pp. 562–578, 2012.
- [167] A. Parikh *et al.*, "Conserved developmental transcriptomes in evolutionarily divergent species.," *Genome Biol.*, vol. 11, no. 3, p. R35, 2010.
- [168] D. W. Huang, B. T. Sherman, and R. A. Lempicki, "Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources," *Nat. Protoc.*, vol. 4, no. 1, pp. 44–57, 2009.
- [169] P. Fey, R. J. Dodson, S. Basu, and R. L. Chisholm, "One stop shop for everything Dictyostelium: DictyBase and the Dicty Stock Center in 2012," *Methods Mol. Biol.*, vol. 983, pp. 59–92, 2013.
- [170] X. Huang and W. Miller, "A Time-Efficient, Linear-Space Local Similarity Algorithm," *Adv. Appl. Math.*, vol. 12, pp. 337–357, 1991.
- [171] L. Duret, E. Gasteiger, and G. Perrière, "LalnView: a graphical viewer for pairwise sequence alignments," *Comput. Applic. Biosci.*, vol. 12, no. 507–510, 1996.
- [172] F. Sievers *et al.*, "Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega," *Mol. Syst. Biol.*, vol. 7, no. 1, pp. 539–539, 2014.
- [173] D. J. Cox, N. Strudwick, A. A. Ali, A. W. Paton, J. C. Paton, and M. Schröder, *Measuring signaling by the unfolded protein response*, vol. 491. 2011.
- [174] N. Hiramatsu, V. T. Joseph, and J. H. Lin, *Monitoring and Manipulating Mammalian Unfolded Protein Response*, 1st ed., vol. 491. Elsevier Inc., 2011.
- [175] S. Back, M. Schröder, K. Lee, K. Zhang, and R. J. Kaufman, "ER stress signaling by regulated splicing: IRE1/HAC1/XBP1," *Methods*, vol. 35, no. 4, pp. 395–416, 2005.
- [176] M. Kwolek-Mirek and R. Zdrag-Tecza, "Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells," *FEMS Yeast Res.*, vol. 14, no. 7, pp. 1068–1079, 2014.
- [177] J. Nikawa, M. Akiyoshi, S. Hirata, and T. Fukuda, "Saccharomyces cerevisiae IRE2/HAC1 is involved in IRE1-mediated KAR2 expression," *Nucleic Acids Res.*, vol. 24, no. 21, 1996.
- [178] D. H. Wolf and A. Stolz, "The Cdc48 machine in endoplasmic reticulum associated protein degradation," *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1823, no. 1, pp. 117–124, 2012.
- [179] K. Arhzaouy *et al.*, "Heteromeric p97 / p97 R155C Complexes Induce Dominant Negative Changes in Wild-Type and Autophagy 9- Deficient Dictyostelium strains," *PLoS One*, vol. 7, no. 10, p. e46879, 2012.
- [180] N. R. Cohen, D. a Knecht, and H. F. Lodish, "Functional expression of rat GLUT 1 glucose transporter in Dictyostelium discoideum.," *Biochem. J.*, vol. 315, pp. 971–5, 1996.
- [181] M. Rai, Y. Xiong, and C. K. Singleton, "Disruption of the ifkA and ifkB genes results in altered cell adhesion, morphological defects and a propensity to form pre-stalk O cells during development of Dictyostelium," *Differentiation*, vol. 74, no. 9–10, pp. 583–595, 2006.
- [182] C. K. Singleton, Y. Xiong, J. H. Kirsten, and K. P. Pendleton, "eIF2 α kinases regulate development through the BzpR transcription factor in Dictyostelium discoideum.," *PLoS One*, vol. 7, no. 3, p. e32500, Jan. 2012.
- [183] C. R. L. Thompson, Q. Fu, C. Buhay, R. R. Kay, and G. Shaulsky, "A bZIP/bRLZ transcription factor required for DIF signaling in Dictyostelium.," *Development*, 2004.
- [184] E. Huang, S. L. Blagg, T. Keller, M. Katoh, G. Shaulsky, and C. R. L. Thompson, "bZIP transcription factor interactions regulate DIF responses in Dictyostelium.," *Development*, vol. 133, no. 3, pp.

449–58, Feb. 2006.

- [185] Y. Yamada *et al.*, “The Dictyostelium prestalk inducer DIF-1 directs phosphorylation of a bZIP transcription factor,” *Int. J. Dev. Biol.*, 2013.
- [186] E. Huang *et al.*, “Bzpf is a CREB-like transcription factor that regulates spore maturation and stability in Dictyostelium,” *Dev. Biol.*, vol. 358, no. 1, pp. 137–146, 2011.
- [187] W. Tirasophon, A. A. Welihinda, and R. J. Kaufman, “A stress response pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus requires a novel bifunctional protein kinase/endoribonuclease (Ire1p) in mammalian cells,” *Genes Dev.*, vol. 12, no. 12, pp. 1812–1824, 1998.
- [188] W. Tirasophon, K. Lee, B. Callaghan, A. Welihinda, and R. J. Kaufman, “The endoribonuclease activity of mammalian IRE1 autoregulates its mRNA and is required for the unfolded protein response,” *Genes Dev.*, vol. 14, no. 21, pp. 2725–2736, 2000.
- [189] A. V. Korennykh *et al.*, “The unfolded protein response signals through high-order assembly of Ire1,” *Nature*, vol. 457, no. 7230, pp. 687–693, 2008.
- [190] H. Li, A. V. Korennykh, S. L. Behrman, and P. Walter, “Mammalian endoplasmic reticulum stress sensor IRE1 signals by dynamic clustering,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 107, no. 37, pp. 16113–16118, 2010.
- [191] A. Mesquita, J. Calvo-garrido, S. Carilla-latorre, and R. Escalante, “Monitoring Autophagy in Dictyostelium,” *Dictyostelium discoideum Protoc. Methods Mol. Biol.*, vol. 983, pp. 461–470, 2013.
- [192] E. Welter, M. Thumm, and R. Krick, “Quantification of nonselective bulk autophagy in *S. cerevisiae* using Pgk1-GFP,” *Autophagy*, vol. 6, no. 6, pp. 794–797, 2010.
- [193] A. Marchetti, E. Lelong, and P. Cosson, “A measure of endosomal pH by flow cytometry in Dictyostelium,” *BMC Res. Notes*, 2009.
- [194] J. Calvo-garrido, S. Carilla-latorre, F. La, G. Egea, and R. Escalante, “Vacuole Membrane Protein 1 Is an Endoplasmic Reticulum Protein Required for Organelle Biogenesis, Protein Secretion, and Development,” *Mol. Biol. Cell.*, vol. 19, no. August 2008, pp. 3442–3453, 2008.
- [195] L. C. Tabara and R. Escalante, “VMP1 establishes ER-microdomains that regulate membrane contact sites and autophagy,” *PLoS One*, vol. 11, no. 11, pp. 1–20, 2016.
- [196] L.-C. Tábara, J.-J. Vicente, J. Biazik, E.-L. Eskelinen, O. Vincent, and R. Escalante, “Vacuole membrane protein 1 marks endoplasmic reticulum subdomains enriched in phospholipid synthesizing enzymes and is required for phosphoinositide distribution,” *Traffic*, vol. 19, no. 8, pp. 624–638, Aug. 2018.
- [197] I. Koyama-Honda, E. Itakura, T. K. Fujiwara, and N. Mizushima, “Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site,” *Autophagy*, vol. 9, no. 10, pp. 1491–1499, 2013.
- [198] C. Kishi-Itakura, I. Koyama-Honda, E. Itakura, and N. Mizushima, “Ultrastructural analysis of autophagosome organization using mammalian autophagy-deficient cells,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. 22, pp. 4984–4984, 2014.
- [199] H. Bommasamy *et al.*, “ATF6 induces XBP1-independent expansion of the endoplasmic reticulum,” *J. Cell Sci.*, vol. 122, no. 10, pp. 1626–1636, 2009.
- [200] T. Garofalo *et al.*, “Evidence for the involvement of lipid rafts localized at the ER-mitochondria associated membranes in autophagosome formation,” *Autophagy*, vol. 12, no. 6, pp. 917–935, 2016.
- [201] N. Schneider, J. M. Schwartz, J. Köhler, M. Becker, H. Schwarz, and G. Gerisch, “Golgesin-GFP fusions as distinct markers for Golgi and post-Golgi vesicles in Dictyostelium cells,” *Biol. Cell*, vol.

92, no. 7, pp. 495–511, 2000.

- [202] M. a Kukuruzinska and P. W. Robbins, “Protein glycosylation in yeast: transcript heterogeneity of the ALG7 gene.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 84, no. 8, pp. 2145–9, Apr. 1987.
- [203] L. Zhang, C. Zhang, and A. Wang, “Divergence and Conservation of the Major UPR Branch IRE1-bZIP Signaling Pathway across Eukaryotes,” *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 27362, 2016.
- [204] C. Y. Chow, X. Wang, D. Riccardi, M. F. Wolfner, and A. G. Clark, “The genetic architecture of the genome-wide transcriptional response to ER stress in the mouse,” *PLoS Genet.*, vol. 11, no. 2, p. e1004924, 2015.
- [205] T. Miyazaki, H. Nakayama, Y. Nagayoshi, H. Takeya, and S. Kohno, “Dissection of Ire1 functions reveals stress response mechanisms uniquely evolved in *Candida glabrata*.,” *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 1, p. e1003160, Jan. 2013.
- [206] M. Smith and S. Wilkinson, “ER homeostasis and autophagy.,” *Essays Biochem.*, vol. 61, no. 6, pp. 625–635, 2017.
- [207] Y. Nishida *et al.*, “Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy,” *Nature*, vol. 461, no. 7264, pp. 654–658, 2009.
- [208] S. Schuck, C. M. Gallagher, and P. Walter, “ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery.,” *J. Cell Sci.*, vol. 127, no. Pt 18, pp. 4078–88, 2014.
- [209] A. P. Velázquez and M. Graef, “Autophagy regulation depends on ER homeostasis controlled by lipid droplets.,” *Autophagy*, p. 0, May 2016.
- [210] D. Bailey and P. O’Hare, “Transmembrane bZIP transcription factors in ER stress signaling and the unfolded protein response.,” *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 9, no. 12, pp. 2305–21, 2007.
- [211] G. D. Amoutzias *et al.*, “One billion years of bZIP transcription factor evolution: Conservation and change in dimerization and DNA-binding site specificity,” *Mol. Biol. Evol.*, vol. 24, no. 3, pp. 827–835, 2007.
- [212] J.-X. Liu, R. Srivastava, P. Che, and S. H. Howell, “An endoplasmic reticulum stress response in *Arabidopsis* is mediated by proteolytic processing and nuclear relocation of a membrane-associated transcription factor, bZIP28.,” *Plant Cell*, vol. 19, no. 12, pp. 4111–9, Dec. 2007.
- [213] P. J. Seo, S. G. Kim, and C. M. Park, “Membrane-bound transcription factors in plants,” *Trends Plant Sci.*, vol. 13, no. 10, pp. 550–556, 2008.
- [214] L. Eichinger *et al.*, “The genome of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*,” *Nature*, vol. 435, no. 7038, pp. 43–57, May 2005.
- [215] A. Radhakrishnan, L. P. Sun, P. J. Espenshade, J. L. Goldstein, and M. S. Brown, *The SREBP pathway. gene regulation through sterol sensing and gated protein trafficking*, Second Edi., vol. 3. Elsevier Inc., 2010.
- [216] A. L. Hughes, B. L. Todd, and P. J. Espenshade, “SREBP pathway responds to sterols and functions as an oxygen sensor in fission yeast,” *Cell*, vol. 120, no. 6, pp. 831–842, 2005.
- [217] J.-X. Liu, R. Srivastava, P. Che, and S. H. Howell, “Salt stress responses in *Arabidopsis* utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling.,” *Plant J.*, vol. 51, no. 5, pp. 897–909, 2007.

APÉNDICE I

Grupos de términos de ontología génica (GO) enriquecidos en el conjunto de genes cuya expresión cambió ante un tratamiento con tunicamicina en la cepa silvestre (WT)

Se muestran a continuación las tablas que se obtuvieron mediante un análisis con la herramienta informática DAVID (<https://david.ncifcrf.gov>). A partir de estos resultados se generó la **Figura 17**. Estas tablas contienen los términos GO enriquecidos en cada grupo, respectivamente para las categorías GO de Proceso Biológico, Dominio Proteico y Componente Celular. Se muestra el nivel de enriquecimiento (score) de cada grupo, así como los estadísticos (P-value, Benjamini) arrojados. También se señala el número de genes contenidos en cada grupo, su identificador, una descripción breve de cada uno, el cambio que se presentó en su abundancia, y si este cambio se generó de forma dependiente de IreA. El código de color resalta el nivel de cambio en la expresión. Los textos se encuentran en inglés.

Transcritos cuya expresión aumentó

Grupos obtenidos para la categoría Proceso Biológico

Cluster 1		Enrichment score:	1.46		
GO terms:		P value:	Benjamini:	genes/term	
	response to endoplasmic reticulum stress	7.40E-03	2.30E-01		3
	protein folding	3.70E-02	5.80E-01		5
	cell redox homeostasis	1.50E-01	8.70E-01		3
Gene ID	Description	IreA depend	Log2(Fold Change)		
DDB_G0282313	heat shock protein DnaJ family protein	yes	1.3874		
DDB_G0293378	Thioredoxin domain-containing protein 5	no	1.35265		
DDB_G0283539	Calreticulin, calcium binding protein (crtA)	no	1.51079		
DDB_G0276141	protein disulfide isomerase(pdi1)	no	1.6439		
DDB_G0291434	protein disulfide isomerase(pdi2)	no	1.49158		
Cluster 2		Enrichment score:	0.93		
GO terms:		P value:	Benjamini:	genes/term	
	positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process	3.20E-02	5.90E-01		3
Gene ID	Description	IreA depend	Log2(Fold Change)		
DDB_G0292120	RING zinc finger-containing protein(cnrk)	no	1.72858		
DDB_G0270130	ubiquitin-protein ligase	yes	1.6868		
DDB_G0275171	Translation termination inhibitor protein ITT1, ubiquitin-protein ligase	no	1.79961		
Cluster 3		Enrichment score:	0.63		
GO terms:		P value:	Benjamini:	genes/term	
	intracellular protein transport	8.10E-02	7.70E-01		5
	culmination involved in sorocarp development	1.60E-01	8.70E-01		4
	transport	2.00E-01	8.90E-01		10
Gene ID	Description	IreA depend	Log2(Fold Change)		
DDB_G0293416	ABC transporter B family protein(abcB1)	no	1.78039		
DDB_G0286559	ABC transporter C family protein(abcC5)	yes	1.58732		
DDB_G0292986	ABC transporter G family protein(abcG10)	yes	1.30967		
DDB_G0269206	ABC transporter G family protein(abcG21)	no	1.52133		
DDB_G0289675	ADP-ribosylarginine hydrolase(adprh)	no	1.50015		
DDB_G0278477	ARF/SAR superfamily protein(sarB)	no	3.22468		
DDB_G0269942	Vesicle-trafficking protein SEC22b,SNARE protein	no	1.82048		
DDB_G0281985	Protein transport protein SEC23,G-protein modulator	no	1.98019		
DDB_G0277797	Sec24CD ortholog, isoform C (sec24I) ,vesicle coat protein	no	1.4186		
DDB_G0293364	peptidase M8, leishmanolysin family protein(sigB)	no	1.72938		
DDB_G0277377	signal recognition particle receptor alpha subunit(srpR)	no	1.38382		

Grupos obtenidos para la categoría Dominio Proteico

Cluster 1		Enrichment score:	2.45		
GO terms:	Alpha/beta hydrolase fold-3	P value:	3.50E-03	Benjamini:	2.50E-01
genes/term					3
Gene ID	Description	IreA depende	Log2(Fold Change)		
DDB_G0287609	alpha/beta hydrolase fold-3 domain-containing protein, lipase, vegetative-specific protein	no	1.76497		
DDB_G0290975	alpha/beta hydrolase fold-3 domain-containing protein, lipase, vegetative-specific protein	yes	1.69352		
DDB_G0291121	esterase/lipase/thioesterase domain-containing protein(cinB), vegetative-specific protein	yes	1.73016		
Cluster 2		Enrichment score:	1.58		
GO terms:	Ubiquitin-conjugating enzyme/RWD-like	P value:	2.50E-03	Benjamini:	2.70E-01
genes/term					5
Gene ID	Description	IreA depende	Log2(Fold Change)		
DDB_G0270130	ubiquitin-protein ligase	yes	1.6868		
DDB_G0275171	Translation termination inhibitor protein ITT1, ubiquitin-protein ligase	no	1.79961		
DDB_G0281833	ligase	no	2.15756		
DDB_G0288381	unkown function	no	2.68616		
DDB_G0288697	unkown function	no	2.59869		
Cluster 3		Enrichment score:	1.58		
GO terms:	Ubiquitin family	P value:	1.20E-02	Benjamini:	4.60E-01
genes/term					4
Gene ID	Description	IreA depende	Log2(Fold Change)		
DDB_G0289449	Polyubiquitin-F (ubqF)	yes	1.32449		
DDB_G0279721	Polyubiquitin-H (ubqH)	yes	1.80215		
DDB_G0269458	Polyubiquitin-J(ubqJ)	yes	1.92808		
DDB_G0269462	ubiquitin domain-containing protein, ribosomal protein	yes	2.22062		
Cluster 4		Enrichment score:	1.23		
GO terms:	DnaJ domain, conserved site	P value:	2.50E-02	Benjamini:	6.50E-01
genes/term					3
Gene ID	Description	IreA depende	Log2(Fold Change)		
DDB_G0286251	DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein(dnajc3)	no	1.87963		
DDB_G0282313	heat shock protein DnaJ family protein	yes	1.3874		
DDB_G0281775	DnaJ homolog subfamily B member 14	no	1.35966		
Cluster 5		Enrichment score:	1.18		
GO terms:	Thioredoxin, conserved site	P value:	8.20E-03	Benjamini:	4.00E-01
genes/term					3
Gene ID	Description	IreA depende	Log2(Fold Change)		
DDB_G0293378	Protein disulfide-isomerase TMX3	no	1.35265		
DDB_G0276141	protein disulfide isomerase(pdi1)	no	1.6439		
DDB_G0291434	protein disulfide isomerase(pdi2)	no	1.49158		
Cluster 6		Enrichment score:	0.64		
GO terms:	ABC transporter-like	P value:	9.70E-02	Benjamini:	8.60E-01
genes/term					4
Gene ID	Description	IreA depende	Log2(Fold Change)		
DDB_G0293416	ABC transporter B family protein(abcB1)	no	1.78039		
DDB_G0286559	ABC transporter C family protein(abcC5)	yes	1.58732		
DDB_G0292986	ABC transporter G family protein(abcG10)	yes	1.30967		
DDB_G0269206	ABC transporter G family protein(abcG21)	no	1.52133		

Grupos obtenidos para la categoría de Componente Celular

Cluster 1		Enrichment score:	3.13		
GO terms:	endoplasmic reticulum		4.60E-11	2.70E-09	19
Gene ID	Description	IreA depend	Log2(Fold Change)		
DDB_G0278477	ARF/SAR superfamily protein(sarB)	no	3.22468		
DDB_G0270946	C-4 methyl sterol oxidase(DDB_G0270946)	no	1.57809		
DDB_G0286251	DNAI heat shock N-terminal domain-containing protein(dnajc3)	no	1.87963		
DDB_G0284777	DUF1183 family protein(DDB_G0284777)	no	1.8708		
DDB_G0276445	Heat shock protein Hsp70 family protein, highly similar to human HSPA5(78 kDa glucose-regulated protein GRP78)	no	3.23801		
DDB_G0287617	Bax inhibitor 1 homolog	no	1.8821		
DDB_G0291436	Dehydrodolichyl diphosphate synthetase	yes	1.977		
DDB_G0293378	Thioredoxin domain-containing protein 5	no	1.35265		
DDB_G0283539	Calreticulin, calcium binding protein (crtA)	no	1.51079		
DDB_G0288833	Probable derlin-1 homolog (der1)	no	1.59401		
DDB_G0285131	Probable derlin-2 homolog (der2)	yes	1.36		
DDB_G0281985	Protein transport protein SEC23,G-protein modulator	no	1.98019		
DDB_G0282197	membrane bound O-acyl transferase family protein	no	1.47533		
DDB_G0278371	microsomal signal peptidase subunit(spc1)	no	2.15796		
DDB_G0290227	nuclear protein localization 4(npl4)	no	2.12259		
DDB_G0276141	protein disulfide isomerase(pdi1)	no	2.82128		
DDB_G0291434	protein disulfide isomerase(pdi2)	no	2.72951		
DDB_G0277377	signal recognition particle receptor alpha subunit(srpR)	no	2.24317		
DDB_G0278543	signal recognition particle receptor beta subunit(srpRB)	no	1.40401		

Cluster 2		Enrichment score:	0.48		
GO terms:	ubiquitin ligase complex		P value: 9.60E-02	Benjamini: 6.20E-01	genes/term 3
DDB_G0292120	RING zinc finger-containing protein(cnrK)	yes	1.80E-01	5.60E-01	19
DDB_G0292120	cytoplasm				
DDB_G0292120	ubiquitin-protein ligase	yes	1.6868		

Cluster 3		Enrichment score:	0.48		
GO terms:	ubiquitin-protein ligase		P value: 4.80E-01	Benjamini: 5.60E-01	genes/term 19
Gene ID	Description	IreA depend	Log2(Fold Change)		
DDB_G0278079	3'-5' exonuclease domain-containing protein(exl2A)	yes	1.64246		
DDB_G0267468	BRCT domain-containing protein(adprt4)	no	1.64246		
DDB_G0292120	RING zinc finger-containing protein(cnrK)	no	1.72858		
DDB_G0285725	deoxyhypusine synthase(dhps)	yes	1.69581		
DDB_G0270130	ubiquitin-protein ligase	yes	1.6868		
DDB_G0275171	Translation termination inhibitor protein ITT1, ubiquitin-protein ligase	no	1.79961		
DDB_G0278757	DIS3-like exonuclease 2	yes	1.62565		
DDB_G0282033	ribonucleoprotein	yes	1.38233		
DDB_G0282867	lyase	yes	1.76746		
DDB_G0286271	unknown function	yes	1.30219		
DDB_G0288381	unknown function	no	2.68616		
DDB_G0288697	unknown function	no	2.59869		
DDB_G0287977	Formimidoyltransferase-cyclodeaminase (ftcd), deaminase transferase	no	2.15983		
DDB_G0279289	Phosphomannomutase 1 (pmmA)	no	1.81886		
DDB_G0289449	Polyubiquitin-F(ubqF)	no	1.32449		
DDB_G0279721	Polyubiquitin-H (ubqH)	no	1.80215		
DDB_G0269458	Polyubiquitin-J (ubqJ)	no	1.92808		
DDB_G0288011	methyltransferase type 11 domain-containing protein	yes	1.28824		
DDB_G0282007	peptidase C12 family protein(uch1)	no	3.092		
DDB_G0269454	tryptophan-tRNA ligase(trpS)	no	1.91549		

Transcritos cuya expresión disminuyó

Grupos obtenidos para la categoría Proceso Biológico

Cluster 1		Enrichment score:	3.18		
GO terms:		P value:	Benjamini:	genes/term	
	peptidoglycan catabolic process	2.40E-04	1.00E-02		5
	cytolysis	3.30E-04	1.10E-02		5
	cell wall macromolecule catabolic process	3.80E-03	7.80E-02		4
	defense response to bacterium	5.10E-03	9.20E-02		5
Gene ID	Description	IreA dependent	Log2(Fold Change)		
DDB_G0274181	glycoside hydrolase family 25 protein	no	-3.13683		
DDB_G0293492	glycoside hydrolase family 25 protein	no	-3.02809		
DDB_G0293566	glycoside hydrolase family 25 protein	no	-2.29178		
DDB_G0275123	lysozyme A (alyA) ²²	no	-3.28988		
DDB_G0275121	lysozymeC (alyC) ²²	no	-2.88526		
DDB_G0288143	LysozymeC protein	no	-2.78539		
Cluster 2		Enrichment score:	1.95		
GO terms:		P value:	Benjamini:	genes/term	
	lipid catabolic process	8.40E-03	1.20E-01		4
Gene ID	Description	IreA dependent	Log2(Fold Change)		
DDB_G0276767	phospholipase B(plbA) ²²	no	-2.04E+00		
DDB_G0277455	phospholipase B-like protein(plbE) ²²	no	-1.6606		
DDB_G0275125	phospholipase B-like protein(plbF) ²²	no	-2.59093		
DDB_G0287649	phospholipase D3(pldY) ²²	no	-3.52942		
Cluster 3		Enrichment score:	1.46		
GO terms:		P value:	Benjamini:	genes/term	
	endocytosis	1.10E-03	2.70E-02		7
	phagocytosis	7.60E-03	1.20E-01		8
	phototaxis	4.60E-02	4.00E-01		4
	cell morphogenesis	5.80E-02	4.50E-01		4
	hyperosmotic response	6.20E-02	4.60E-01		5
	mitotic cytokinesis	9.60E-02	5.60E-01		6
Gene ID	Description	IreA dependent	Log2(Fold Change)		
DDB_G0280621	ADP-ribosylation factor-related(arrJ)	yes	-1.9442		
DDB_G0280633	ADP-ribosylation factor-related(arrK)	yes	-2.07811		
DDB_G0291356	G-protein-coupled receptor family 3 protein 5(grlE)	yes	-1.5342		
DDB_G0268622	Rho GTPase(rac1B)	yes	-2.77696		
DDB_G0270430	WH2 domain-containing protein(wipA)	no	-1.74977		
DDB_G0287297	endosomal membrane protein(p80)	yes	-2.75389		
DDB_G0288879	Actin(act11)	no	-1.3302		
DDB_G0274727	Actin(act19)	no	-1.6916		
DDB_G0289507	Actin (act25)	no	-1.51364		
DDB_G0289005	Actin (act4)	no	-1.45781		
DDB_G0269234	Actin (act8)	no	-1.46722		
DDB_G0275123	lysozyme A (alyA) ²²	no	-3.28988		
DDB_G0271916	null mutant has aberrant RaTiO of prespore to prestalk	yes	-3.61119		
DDB_G0287363	integrin beta A-like protein(sibA)	yes	-1.61654		
DDB_G0282993	superoxide dismutase(sodC)	no	-2.01024		

Grupos obtenidos para la categoría Dominio Proteico

Cluster 1		Enrichment score:	9.69		
		P value:	8.80E-12	Benjamini:	2.10E-09
GO terms:	Glycoside hydrolase, superfamily				Genes 14
Gene ID	Description	IreA dependen	Log2(Fold Change)		
cf45-1	component of the counting factor complex(cf45-1)	no	-2.97832		
DDB_G0270074	unknown function	no	-2.75457		
DDB_G0274181	glycoside hydrolase family 25 protein	no	-3.13683		
DDB_G0281609	unknown function	no	-3.37302		
DDB_G0288289	beta-xylosidase-like protein	yes	-1.42778		
DDB_G0293428	unknown function	yes	-1.51422		
DDB_G0293492	glycoside hydrolase family 25 protein	no	-3.02809		
DDB_G0293566	glycoside hydrolase family 25 protein	no	-2.29178		
gaa	alpha-glucoside hydrolase(gaa)	no	-2.19737		
glb1	glycoside hydrolase family 35 protein(glb1)	yes	-1.55762		
gluA	beta glucosidase(gluA)	yes	-2.22741		
melA	alpha-galactosidase (melibiase)	yes	-3.04273		
nagA	glycoside hydrolase family 20 protein(nagA)	no	-2.78143		
veg111	hyaluronidase(veg111)	no	-3.4379		
Cluster 2		Enrichment score:	5.11		
		P value:	2.10E-06	Benjamini:	1.60E-04
GO terms:	CMP/dCMP deaminase, zinc-binding				Genes 6
Gene ID	Description	IreA dependen	Log2(Fold Change)		
DDB_G0272030	unknown function	no	-2.58995		
DDB_G0272442	unknown function	yes	-5.52682		
DDB_G0282171	unknown function	no	-3.08296		
DDB_G0288019	CMP/dCMP deaminase, zinc-binding domain-containing protein	yes	-2.61533		
DDB_G0292080	unknown function	no	-4.87501		
DDB_G0292096	unknown function	no	-1.44521		
Cluster 3		Enrichment score:	3.53		
		P value:	2.50E-04	Benjamini:	1.00E-02
GO terms:	Carboxylesterase type B, active site				Genes 4
Gene ID	Description	IreA dependen	Log2(Fold Change)		
DDB_G0283087	carboxylesterase, type B family protein	no	-1.33763		
DDB_G0285419	crystal protein(cryS)	yes	-2.61413		
DDB_G0283085	type-B carboxylesterase/lipase family protein D2	yes	-1.73		
DDB_G0276969	unknown function	yes	-3.68922		

Cluster 4		Enrichment score:	2.47		
GO terms:	Actin/actin-like conserved site	P value:	1.80E-03	Benjamini:	4.30E-02
		Genes			5
Gene ID	Description	IreA dependen	Log2(Fold Change)		
DDB_G0288879	Actin(act11)	no	-1.3302		
DDB_G0274727	Actin(act19)	no	-1.6916		
DDB_G0289507	Actin (act25)	no	-1.51364		
DDB_G0289005	Actin (act4)	no	-1.45781		
DDB_G0269234	Actin (act8)	no	-1.46722		
Cluster 5		Enrichment score:	2.04		
GO terms:	Saposin B	P value:	1.60E-03	Benjamini:	4.20E-02
		Genes			5
Gene ID	Description	IreA dependen	Log2(Fold Change)		
DDB_G0286653	saposin-like protein O (apIO)	no	-1.76455		
DDB_G0276479	countin3 (ctnC)	no	-5.22584		
DDB_G0284339	saposin B domain-containing protein	no	-1.65269		
DDB_G0292508	saposin B domain-containing protein	no	-3.33222		
Cluster 6		Enrichment score:	0.9		
GO terms:	P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases	P value:	2.50E-02	Benjamini:	3.20E-01
		Genes			8
Gene ID	Description	IreA dependen	Log2(Fold Change)		
DDB_G0274115	ABC transporter G family protein(abcG12)	no	-1.38208		
DDB_G0267432	ABC transporter G family protein(abcG15)	no	-1.43758		
DDB_G0280621	ADP-ribosylation factor-related(arrJ)	yes	-1.9442		
DDB_G0280633	ADP-ribosylation factor-related(arrK)	yes	-2.07811		
DDB_G0281559	CHR group protein(DG1080)	no	-1.77017		
DDB_G0283911	HSP20-like chaperone domain-containing protein(DDB_G0283911)	yes	-1.66108		
DDB_G0270126	Ras GTPase(rasY)	yes	-2.16568		
DDB_G0270140	Ras GTPase(rasZ)	yes	-3.38974		
DDB_G0268622	Rho GTPase(rac1B)	yes	-2.77696		
DDB_G0282365	Rho GTPase(rac1C)	no	-2.18324		
DDB_G0269176	Rho GTPase(racF1)	yes	-3.41783		
DDB_G0276967	Rho GTPase(racF2)	yes	-4.41285		
DDB_G0268504	hypothetical protein(DDB_G0268504)	yes	-2.32121		
DDB_G0275033	hypothetical protein(DDB_G0275033)	yes	-2.21441		
DDB_G0276097	hypothetical protein(DDB_G0276097)	no	-3.287		
DDB_G0292188	hypothetical protein(DDB_G0292188)	yes	-1.55995		

Grupos obtenidos para la categoría de Componente Celular

Cluster 1		Enrichment score: 16.52		Genes	
GO terms:	extracellular space/extracellular region	P value:	4.60E-25	Benjamini:	3.20E-23
Gene ID	Description	IreA dependent	Log2(Fold Change)		
DDB_G0291255	Sct family protein B (29C)	no	-2.24492		
DDB_G0281663	PhoPQ-activated pathogenicity-related protein(aprA)	no	-2.23199		
DDB_G0285793	calcium-dependent cell adhesion molecule-1(cadA)	no	-1.71061		
DDB_G0269248	component of the counting factor complex(cf45-1)	no	-2.97832		
DDB_G0284363	component of the counting factor complex(cf60)	no	-1.65896		
DDB_G0276479	countin3 (ctnC)	no	-5.22584		
DDB_G0279411	cathepsin D(ctsD)	no	-1.84844		
DDB_G0293538	acid ceramidase(dcd2A)	yes	-1.61977		
DDB_G0270214	galactose-binding domain-containing protein(DD7-1)	no	-2.91803		
DDB_G0267570	unknown function	no	-4.03097		
DDB_G0268828	unknown function	yes	-1.51389		
DDB_G0268870	unknown function	yes	-2.18222		
DDB_G0269040	C-type lectin domain-containing protein(DDB_G0269040)	yes	-2.32201		
DDB_G0270074	unknown function	no	-2.75457		
DDB_G0272238	unknown function	no	-1.98769		
DDB_G0272504	unknown function	yes	-2.5456		
DDB_G0272767	unknown function	no	-1.33441		
DDB_G0274181	glycoside hydrolase family 25 protein(DDB_G0274181)	no	-3.13683		
DDB_G0278243	unknown function	no	-1.318		
DDB_G0279985	unknown function	no	-1.41385		
DDB_G0280159	unknown function	yes	-2.3614		
DDB_G0281067	unknown function	yes	-1.61058		
DDB_G0281609	unknown function	no	-3.37302		
DDB_G0281843	unknown function	no	-2.61997		
DDB_G0281861	unknown function	yes	-3.20691		
DDB_G0281967	unknown function	no	-1.93049		
DDB_G0283087	carboxylesterase, type B family protein(DDB_G0283087)	no	-1.33763		
DDB_G0283127	unknown function	no	-1.58321		
DDB_G0284671	unknown function	no	-3.80238		
DDB_G0284691	unknown function	yes	-2.32789		
DDB_G0284805	unknown function	no	-1.59825		
DDB_G0286021	unknown function	no	-1.76986		
DDB_G0287399	unknown function	no	-2.93815		
DDB_G0288143	lysozyme C family protein(DDB_G0288143)	no	-2.78539		
DDB_G0288563	unknown function	yes	-1.45953		
DDB_G0289015	unknown function	no	-3.14567		
DDB_G0289171	unknown function	no	-2.42769		
DDB_G0290387	unknown function	yes	-2.59397		
DDB_G0290409	unknown function	no	-1.79504		
DDB_G0291394	unknown function	no	-1.84534		
DDB_G0292096	unknown function	yes	-2.79784		
DDB_G0292630	unknown function	yes	-2.04381		
DDB_G0293066	unknown function	no	-5.53097		
DDB_G0293204	unknown function	yes	-1.96126		
DDB_G0293428	unknown function	yes	-1.51422		
DDB_G0293460	unknown function	no	-1.48208		
DDB_G0293492	glycoside hydrolase family 25 protein(DDB_G0293492)	no	-3.02809		
DDB_G0293566	glycoside hydrolase family 25 protein(DDB_G0293566)	no	-2.29178		
DDB_G0269790	alpha-glucohydrolase(gaa)	no	-2.19737		
DDB_G0290217	glycoside hydrolase family 35 protein(glb1)	yes	-1.55762		

DDB_G0292810	beta glucosidase(gluA)	yes	-2.22741
DDB_G0286015	homologous to the Chlamydomonas reinhardtii a2gene (gmsA)	yes	-4.58878
DDB_G0279921	glycoprotein 130(gp130)	no	-2.52731
DDB_G0276767	phospholipase B(plbA)	no	-1.6606
DDB_G0277455	phospholipase B-like protein(plbE)	no	-2.04289
DDB_G0275125	phospholipase B-like protein(plbF)	no	-2.59093
DDB_G0287649	phospholipase D3(pldY)	no	-3.52942
DDB_G0278581	PA14 domain-containing protein(psiF)	no	-2.0081
DDB_G0287363	integrin beta A-like protein(sibA)	yes	-1.61654
DDB_G0287587	small aggregate formation protein(smlA)	no	-1.36256
DDB_G0283021	superoxide dismutase(sodB)	no	-2.38531
DDB_G0282371	hyaluronidase(veg111)	no	-3.4379
Cluster 2		Enrichment score:	1.73
GO terms:	plasma membrane	P value:	6.90E-04
		Benjamini:	9.50E-03
		Genes	21
Gene ID	Description	IreA dependent	Log2(Fold Change)
abcG12	ABC transporter G family protein(abcG12)	yes	-1.38208
abcG15	ABC transporter G family protein(abcG15)	no	-1.43758
amtA	ammonium transporter(amtA)	no	-1.35858
cadA	calcium-dependent cell adhesion molecule-1(cadA)	no	-1.71061
DDB_G0281967	unknown function	no	-1.93049
DDB_G0292424	unknown function	no	-3.33222
DDB_G0281967	unknown function	no	-1.93049
DDB_G0292424	unknown function	no	-3.33222
erg2	C-8 sterol isomerase(erg2)	yes	-1.97652
gp130	glycoprotein 130(gp130)	no	-2.52731
ponA	actin binding protein(ponA)	no	-3.12854
ponL	ponticulín-related protein(ponL)	no	-1.37502
rac1B	Rho GTPase(rac1B)	yes	-2.77696
rac1C	Rho GTPase(rac1C)	no	-2.18324
racF2	Rho GTPase(racF2)	yes	-4.41285
rasY	Ras GTPase(rasY)	yes	-2.16568
rasZ	Ras GTPase(rasZ)	yes	-3.38974
rhgA	Rh-like protein/ammonium transporter(rhgA)	no	-1.32908
sibA	integrin beta A-like protein(sibA)	yes	-1.61654
sodB	superoxide dismutase(sodB)	no	-2.38531
sodC	superoxide dismutase(sodC)	no	-2.01024

Cluster 3		Enrichment score:	1.4	
GO terms:		P value:	Benjamini:	Genes
	actin filament	6.20E-04	1.10E-02	6
	cell-cell contact zone	4.50E-03	5.10E-02	5
	phagocytic vesicle	1.30E-02	1.20E-01	16
	cell pole	3.00E-02	2.10E-01	4
	cell leading edge	3.30E-02	2.00E-01	6
Gene ID	Description	IreA dependent	Log2(Fold Change)	
abpB	34 kDa actin-binding protein(abpB)	yes	-3.30548	
act11	Actin(act11)	no	-1.8574	
act19	Actin(act19)	no	-1.3302	
act25	Actin (act25)	no	-1.6916	
act4	Actin (act4)	no	-1.51364	
act8	Actin (act8)	no	-1.45781	
cadA	calcium-dependent cell adhesion molecule-1(cadA)	no	-2.07811	
DDB_G0267992	unknown function	yes	-4.03097	
DDB_G0268064	esterase/lipase/thioesterase domain-containing protein	no	-2.19302	
DDB_G0274705	unknown function	yes	-1.73455	
DDB_G0281067	unknown function	yes	-3.77692	
DDB_G0281659	unknown function	no	-2.90256	
DDB_G0283911	HSP20-like chaperone domain-containing protein	yes	-1.89906	
DDB_G0284339	saposin B domain-containing protein	no	-1.65269	
DDB_G0286653	unknown function	no	-1.49562	
DDB_G0292508	saposin B domain-containing protein	no	-3.33222	
DDB_G0293202	TRAF-type zinc finger-containing protein	yes	-5.53097	
eif5a	eukaryotic translation initiation factor 5A(eif5a)	yes	-1.73893	
fimA	actin binding protein(fimA)	no	-1.38849	
gp130	glycoprotein 130(gp130)	no	-4.58878	
guaA	GMP synthetase(guaA)	no	-1.5342	
ImpB	lysosomal integral membrane glycoprotein(ImpB)	yes	-1.66478	
maspS	aspartate-tRNA ligase(maspS)	no	-3.80754	
meIA	alpha-galactosidase (melibiase)	yes	-1.70416	
mkcD	MKC subfamily protein kinase(mkcD)	yes	-3.04273	
panC	pantoate-beta-alanine ligase(panC)	no	-2.75389	
pefA	penta EF hand calcium binding protein(pefA)	no	-4.80573	
ponA	actin binding protein(ponA)	no	-3.52942	
rtoA	contains several repeats of a serine-rich motif, catalyzes the fusion of	yes	-3.91052	
smlA	small aggregate formation protein(smlA)	no	-1.63354	
sodB	superoxide dismutase(sodB)	no	-1.36256	
sodC	superoxide dismutase(sodC)	no	-2.38531	
wipA	WH2 domain-containing protein(wipA)	no	-3.4379	

Cluster 4	Enrichment score:	1.4		
GO terms:		P value:	Benjamini:	Genes
	membrane	1.50E-01	5.00E-01	71
abcG12	ABC transporter G family protein(abcG12)	no	-1.38208	
abcG15	ABC transporter G family protein(abcG15)	no	-1.43758	
abkD	ABC1 family protein kinase(abkD)	no	-1.57887	
amtA	ammonium transporter(amtA)	no	-1.35858	
cadA	calcium-dependent cell adhesion molecule-1(cadA)	no	-1.71061	
cryS	crystal protein(cryS)	yes	-2.61413	
D2	type-B carboxylesterase/lipase family protein D2 (D2)	yes	-1.73	
DD3-3	similar to tunicate proteins(DD3-3)	yes	-1.74962	
DDB_G0268026	unknown function	yes	-2.19302	
DDB_G0268862	unknown function	no	-2.71018	
DDB_G0268892	unknown function	no	-2.0129	
DDB_G0268970	unknown function	no	-1.95206	
DDB_G0269488	unknown function	no	-1.33191	
DDB_G0269850	DG1041 family protein	no	-1.68994	
DDB_G0272012	GNS1/SUR4 family protein	no	-2.17183	
DDB_G0270192	unknown function	no	-1.46599	
DDB_G0272342	unknown function	yes	-1.43968	
DDB_G0272380	unknown function	yes	-2.16328	
DDB_G0272492	unknown function	yes	-2.89264	
DDB_G0274479	unknown function	yes	-2.42444	
DDB_G0275049	short-chain dehydrogenase/reductase family protein	no	-1.69684	
DDB_G0276097	unknown function	no	-3.287	
DDB_G0276781	unknown function	yes	-1.40141	
DDB_G0276931	unknown function	yes	-1.77722	
DDB_G0277895	TM2 domain containing protein	yes	-2.19484	
DDB_G0278577	unknown function	no	-3.02385	
DDB_G0278699	unknown function	no	-1.5451	
DDB_G0278835	unknown function	no	-1.98572	
DDB_G0279985	unknown function	no	-1.41385	
DDB_G0281067	unknown function	yes	-1.61058	
DDB_G0283271	DOMON related domain-containing protein	no	-3.45257	
DDB_G0283913	heat shock protein Hsp20 domain-containing protein	yes	-1.63801	
DDB_G0284169	unknown function	yes	-1.65269	

DDB_G0284367	phosphoesterase, PA-phosphatase related-family protein	yes	-1.64383
DDB_G0284691	unknown function	yes	-2.32789
DDB_G0286021	unknown function	no	-1.76986
DDB_G0286897	unknown function	yes	-2.111
ddb_G0287003	DUF914 family protein	no	-1.72543
DDB_G0287933	unknown function	no	-2.59146
DDB_G0288435	unknown function	yes	-1.42778
DDB_G0288635	transmembrane protein	no	-1.59524
DDB_G0290177	unknown function	yes	-3.02142
DDB_G0290379	unknown function	no	-2.84026
DDB_G029040	C-type lectin domain-containing protein	no	-1.79504
DDB_G0291574	unknown function	no	-2.4019
DDB_G0292424	unknown function	no	-3.33222
DDB_G0292764	unknown function	no	-1.32283
DDB_G0293034	unknown function	no	-2.27977
DDB_G0293066	unknown function	no	-5.53097
ddb_g0295829	EGF-like domain-containing protein	yes	-2.32358
ebp	putative 3-beta-hydroxysteroid-Delta(8),Delta(7)-isomerase(ebp)	yes	-1.73893
erg2	C-8 sterol isomerase(erg2)	yes	-1.97652
gp130	glycoprotein 130(gp130)	no	-2.52731
grlE	G-protein-coupled receptor family 3 protein 5(grlE)	yes	-1.5342
ImpB	lysosomal integral membrane glycoprotein(ImpB)	yes	-1.5789
p80	endosomal membrane protein(p80)	yes	-2.75389
pefA	penta EF hand calcium binding protein(pefA)	no	-1.57102
pigX	phosphatidylinositol glycan, class X(pigX)	yes	-1.58991
ponA	actin binding protein(ponA)	no	-3.12854
ponL	ponticuliln-related protein(ponL)	no	-1.37502
psiF	PA14 domain-containing protein(psiF)	no	-2.0081
rac1B	Rho GTPase(rac1B)	yes	-2.77696
rac1C	Rho GTPase(rac1C)	no	-2.18324
racF1	Rho GTPase(racF1)	yes	-3.41783
racF2	Rho GTPase(racF2)	yes	-4.41285
rasY	Ras GTPase(rasY)	yes	-2.16568
rasZ	Ras GTPase(rasZ)	yes	-3.38974
rhgA	Rh-like protein/ammonium transporter(rhgA)	no	-1.32908
sibA	integrin beta A-like protein(sibA)	yes	-1.61654
sodB	superoxide dismutase(sodB)	no	-2.38531
sodC	superoxide dismutase(sodC)	no	-2.01024

APÉNDICE II

Publicaciones generadas

