



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de los factores de transcripción Skn7 y Crz1 en genes de respuesta a calcio durante estrés de retículo endoplásmico en levadura

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
Maestra en Ciencias

PRESENTA:

Diana Iris Hernández Rojas

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Roberto Coria Ortega
[Instituto de Fisiología Celular](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Francisco Torres Quiroz
[Instituto de Fisiología Celular](#)
Dra. Imelda López Villaseñor
[Instituto de Investigaciones Biomédicas](#)

Ciudad de México, Agosto 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 124N del Instituto de Fisiología Celular (UNAM), bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega.

Agradezco a los miembros del comité tutor por las sugerencias y comentarios.

Dr. Francisco Torres Quiroz Instituto de Fisiología Celular

Dra. Imelda López Villaseñor Instituto de Investigaciones Biomédicas

A la Dra. Laura Kawasaki Watanabe por la asesoría técnica.

A la Dra. Laura Ongay Larios, a la Lic. Guadalupe Códiz Huerta y a la M. en C. Minerva Mora Cabrera de la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM por la síntesis de desoxioligonucleótidos y préstamo de equipos.

Al Dr. Francisco Torres Quiroz, al Dr. Antonio Peña, a la Dra. Martha Calahorra y a la M. en C. Norma Sánchez por la facilitación de reactivos y préstamo de equipo.

Al personal de la Unidad de Computo del Instituto de Fisiología Celular, a Gerardo Coello Coutiño, Ana María Escalante Monsalvo, Juan Manuel Barbosa e Ivette Rosas Arciniega.

Al personal del taller del mantenimiento, al Ing. Manuel Ortíz Benavides e Ing. Audrey Galván Lovato.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada. Becario No. 895398

Al programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas y al Programa de Apoyo a Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) por el apoyo económico para la asistencia al XIII Congreso Nacional de Biología Molecular y Celular de Hongos.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT, DGAPA, UNAM) por el donativo IN210519.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

Al Dr. Roberto Coria por la oportunidad al recibirme en el laboratorio y por toda la ayuda que me brindó durante este tiempo.

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que me brindaron, a mi madre y en especial a mi hermana Rubi. A Aleck y Lia por ser tan comprensivos.

A mis compañeros de laboratorio Juliana, Diana, Kevin del Carpio, Kevin Antonio, Yaisa y Mariana por su ayuda y en especial a Abiram por dedicar parte de su tiempo a enseñarme.

INDICE

ABREVIATURAS.....	1
1. RESUMEN.....	3
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1 Retículo endoplásmico.....	4
2.1.1 N-glicosilación.....	4
2.2 Inductores de estrés de retículo endoplásmico.....	6
2.2.1 Tunicamicina.....	6
2.2.2 2-desoxiglucosa.....	6
2.2.3 Ditiotreitól y β -mercaptoetanol.....	6
2.3 Vía UPR en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
2.4 Vía de señalización dependiente de calcio.....	9
2.4.1 Bombas, canales y transportadores involucrados en la homeostasis de Ca^{2+}	10
2.4.1.1 Vacuola.....	10
2.4.1.2 Retículo endoplásmico y aparato de Golgi.....	11
2.4.2 Vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina.....	12
2.5 Crz1.....	15
2.6 Skn7.....	17
3. ANTECEDENTES.....	20
4. HIPÓTESIS.....	22
5. OBJETIVOS.....	22
5.1 Objetivo General.....	22
5.2 Objetivos particulares.....	22
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
6.1 Cepas.....	23
6.2 Medios.....	23
6.3 Plásmidos.....	24
6.3.1 Clonación de <i>lacZ</i> en el plásmido pGEM-T Easy Vector.....	24
6.3.2 Subclonación de <i>lacZ</i> en el plásmido YEp352.....	24

6.3.3 Subclonación de los promotores de <i>FKS2</i> , <i>PMC1</i> y <i>GDT1</i> en el plásmido YEp352- <i>lacZ</i>	24
6.4 Amplificación de productos por PCR.....	25
6.5 Ensayos de sensibilidad por goteo.....	26
6.6 Curvas de crecimiento.....	26
6.7 Extracción de DNA genómico.....	27
6.8 Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i>	27
6.9 Purificación de DNA en geles de agarosa y DNA en solución.....	27
6.10 Transformación de bacterias.....	27
6.11 Transformación de levaduras.....	28
6.12 Ensayo cualitativo de la actividad de β -galactosidasa.....	28
6.13 Ensayo cuantitativo de la actividad de β -galactosidasa.....	28
6.13.1 Tratamiento de muestras.....	28
6.13.2 Extracción de proteínas.....	28
6.13.3 Ensayo de actividad de β -galactosidasa.....	29
6.14 Análisis de datos.....	29
7. RESULTADOS.....	30
7.1 El factor de transcripción Skn7 participa en una vía paralela a la de Crz1 durante ERE inducido con Tm.....	30
7.2 <i>FKS2</i> y <i>PMC1</i> presentan sitios de unión para el factor de transcripción Crz1, mientras que <i>FKS2</i> y <i>GDT1</i> tienen sitios de unión a Skn7.....	31
7.3 Los genes <i>FKS2</i> y <i>PMC1</i> se sobreexpresan en respuesta a estrés inducido con Tm y Ca^{2+}	32
7.4 La expresión de <i>FKS2</i> es dependiente de Crz1 tanto en condiciones óptimas como de estrés inducido con Tm y Ca^{2+} y Skn7 se comporta como represor.....	34
7.5 La expresión de <i>PMC1</i> es dependiente de Crz1 e independiente de Skn7 en condiciones de estrés por Tm y Ca^{2+}	36
7.6 La expresión de <i>GDT1</i> en condiciones de estrés por Tm y Ca^{2+} no depende de los factores Crz1 y Skn7.....	38
7.7 La inactivación de la subunidad regulatoria de la calcineurina abate la inducción de la transcripción de los genes <i>FKS2</i> y <i>PMC1</i> en condiciones de estrés por Tm y Ca^{2+}	40
7.8 La vía Ca^{2+} /calcineurina es independiente de la vía UPR en condiciones de estrés inducido con Tm.....	42

8. DISCUSIÓN.....	45
9. CONCLUSIONES.....	49
10. PERSPECTIVAS.....	49
11. REFERENCIAS.....	50
12. ANEXO.....	59

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de N-glicosilación.....	5
Figura 2. Vía UPR dependiente de Ire1 en <i>S. cerevisiae</i>	8
Figura 3. Bombas, canales e intercambiadores que participan en la homeostasis del Ca ²⁺ en la levadura.....	10
Figura 4. Vía de señalización Ca ²⁺ /calcineurina.....	14
Figura 5. Dominios estructurales de la subunidad catalítica Cna1 y la subunidad reguladora Cnb1 de calcineurina.....	15
Figura 6. Dominios estructurales de Crz1.....	16
Figura 7. Dominios estructurales del factor de transcripción Skn7 de <i>S. cerevisiae</i>	18
Figura 8. El factor Skn7 participa en la vía de fosforrelievo y en estrés oxidante en <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 9. Sensibilidad a Tm en mutantes del factor de transcripción Skn7 y los componentes de la vía de señalización Ca ²⁺ /calcineurina.....	21
Figura 10. Sensibilidad de la cepa <i>crz1Δskn7Δ</i> al ERE inducido con Tm.....	30
Figura 11. Los genes <i>FKS2</i> y <i>PMC1</i> se sobreexpresan en respuesta a estrés inducido con Tm y Ca ²⁺	33
Figura 12. El gen <i>FKS2</i> es regulado por Crz1 y Skn7 en estrés inducido con Tm y Ca ²⁺ ...33	33
Figura 13. El factor Crz1 regula la actividad promotora del gen <i>PMC1</i> en estrés inducido con Tm y Ca ²⁺	37
Figura 14. Los factores Crz1 y Skn7 no regulan la actividad promotora del gen <i>GDT1</i> en estrés inducido con Tm y Ca ²⁺	39
Figura 15. La subunidad Cnb1 se requiere para la inducción de <i>FKS2</i> y <i>PMC1</i> en estrés inducido con Tm y Ca ²⁺	41
Figura 16. Las mutantes <i>ire1Δ</i> e <i>ire1Δcnb1Δ</i> son muy sensibles al estrés inducido con Tm.....	43

Figura 17. Tasas de crecimiento de la cepa silvestre wt y las mutantes *ire1Δ*, *cnb1Δ* e *ire1Δcnb1Δ* en estrés inducido con Tm a diferentes concentraciones.....43

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* y sus marcadores.....23

Tabla 2. Inductores de estrés utilizados para la evaluación de fenotipos de sensibilidad en distintas mutantes.....26

Tabla 3. Sitios y secuencias de unión de los factores de transcripción Crz1 y Skn7 en los promotores de los genes *FKS2*, *PMC1* y *GDT1*.....32

Tabla 4. Desoxioligonucleótidos utilizados en la amplificación de productos por PCR.....59

Tabla 5. Plásmidos empleados.....59

ABREVIATURAS

AID	Dominio autoinhibitorio (<i>Autoinhibitory Domain</i>)
AIS	Señal de autoinhibición (<i>Autoinhibitory Signal</i>)
NLS	Señal de localización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
ALG7	N-acetil glucosamina fosfotransferasa
ATF6	Factor de transcripción activador 6 (<i>Activating Transcription Factor 6</i>)
BBH	Dominio de unión a calcineurina B (<i>Calcineurin B Binding Helix</i>)
CaM	Calmodulina
CAX	Intercambiador de calcio/protones (<i>Calcium/Proton Exchanger</i>)
CBD	Dominio de unión a calmodulina (<i>Calmodulin Binding Domain</i>)
CC	Estructura supersecundaria de cuerda enrollada (<i>Coiled Coil</i>)
CDRE	Elementos de respuesta dependientes de calcineurina (<i>Calcineurin Dependent Response Elements</i>)
CSSR	Region sensora de estrés (<i>Core Stress-Sensing Región</i>)
DTT	Ditiotreitol
ERAD	Degradación de proteínas asociada a retículo endoplásmico (<i>Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation</i>)
ERE	Estrés de retículo endoplásmico
GlcNAc-1-P	N-acetil glucosamina 1-fosfato
HOG	Vía de alta osmolaridad-glicerol (<i>High Osmolarity Glycerol</i>)
HSE2	Elementos de choque de calor 2 (<i>Heat Shock Elements 2</i>)
HSF	Factor de transcripción de choque de calor (<i>Heat Shock Factor</i>)
IRE 1	Proteína 1 requeridora de inositol (<i>Inositol-requiring protein 1</i>)
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i>)
NES	Secuencia de exportación (<i>Nuclear Export Signal</i>)
NLS	Secuencia de señalización nuclear (<i>Nuclear Localization Signal</i>)
OSRE	Elementos de respuesta a estrés oxidante (<i>Oxidative Stress Response Elements</i>)
OST	Oligosacaryltransferasa (<i>Oligosaccharyltransferase</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PDI	Enzimas disulfuro isomerasa (<i>Protein Disulfide Isomerase</i>)
PEG	Polietilenglicol
PERK	Proteína cinasa de retículo endoplásmico similar a PKR (<i>Protein kinase RNA (PKR)-like ER Kinase</i>)
PMCA	ATPasa de calcio de membrana plasmática (<i>Plasma Membrane Ca²⁺ ATPase</i>)
PP2B	Fosfatasa de proteínas 2B (<i>Protein Phosphatase 2B</i>)
RE	Retículo endoplásmico
SRE	Elementos de respuesta a SLN1 (<i>SLN1 Response Elements</i>)
SRR	Región rica en serina (<i>Serine Rich Region</i>)
t-BOOH	Ter-butyl hidroperóxido
Tm	Tunicamicina
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
UPRE	Elementos de respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response Elements</i>)
UTR	Region no traducida (<i>Untranslated Region</i>)

1. RESUMEN

El estrés de retículo endoplásmico (ERE) es una condición producida por la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen de este organelo, ante este evento, se activa la vía de señalización de respuesta a proteínas mal plegadas o UPR y también algunas vías paralelas. Para estudiar el ERE experimentalmente se utilizan inductores de diversas naturalezas, uno de ellos es la tunicamicina (Tm) que es un antibiótico capaz de inhibir de forma específica la N-glicosilación, un proceso de modificación que sufre gran parte de las proteínas que transitan por la vía secretora. La inhibición de la N-glicosilación produce la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE y por consiguiente ERE. La vía Ca^{2+} /calcineurina es una de las vías de detección de la acumulación de proteínas mal plegadas en el lumen del RE. Para esto, el factor de transcripción Crz1 es el encargado de modular la respuesta transcripcional de la vía y mutantes *crz1Δ* muestran sensibilidad al ERE inducido con Tm. Se ha reportado que la proteína Skn7 estabiliza a Crz1 y se requiere para la expresión de genes de respuesta a estrés por $CaCl_2$. Las mutantes *skn7Δ* también son sensibles al estrés de retículo endoplásmico inducido con Tm. Con el objetivo de esclarecer la participación del factor de transcripción Skn7 en la vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina activada por ERE se construyeron reporteros transcripcionales con promotores de los genes *PMC1* y *GDT1* involucrados en la homeostasis de calcio y del gen *FKS2* un blanco de Crz1 y se realizaron ensayos de sensibilidad a Tm en mutantes carentes de los factores de transcripción Crz1 y Skn7, así como en mutantes de la vía Ca^{2+} /calcineurina y de la vía UPR. Los resultados obtenidos mostraron que: 1) los factores de transcripción Crz1 y Skn7 actúan en vías independientes en condiciones de ERE inducido con Tm, 2) los genes *FKS2* y *PMC1* son regulados positivamente por Crz1, 3) Skn7 actúa negativamente en el promotor de *FKS2*, 4) el gen *GDT1* que codifica para el intercambiador H^+/Ca^{2+} localizado en el aparato de Golgi no es regulado por Crz1 ni por Skn7 en condiciones de ERE y 5) la inactivación de la vía UPR no afecta la activación de la vía Ca^{2+} /Calcineurina por la Tm.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (RE) es un organelo multifuncional compuesto por una membrana continua que se extiende a través de la célula, se encuentra organizado en túbulos y cisternas interconectadas en un solo lumen (West *et al.*, 2011). En el RE ocurren procesos celulares esenciales entre los que se encuentran: síntesis de lípidos y esteroides, metabolismo de carbohidratos, almacenamiento de calcio, así como la modificación y plegamiento de proteínas (Braakman & Hebert, 2013; English & Voeltz, 2013).

En las células eucarióticas, las proteínas secretadas hacia el aparato de Golgi, lisosoma (vacuola en levaduras), membrana plasmática o al exterior, son sintetizadas por ribosomas adheridos a la membrana del RE y dado que tienen requerimientos especiales de plegamiento y modificación, son cotraduccionalmente translocadas al lumen del RE en donde son procesadas por proteínas especializadas en el plegamiento y modificación (Berner *et al.*, 2018). En el lumen del RE, los sistemas de chaperonas, la familia de enzimas disulfuro isomerasas (PDI por sus siglas en inglés *Protein Disulfide Isomerase*), así como enzimas involucradas en procesos de glicosilación, hidroxilación y lipidación actúan sobre las cadenas polipeptídicas para minimizar la agregación, catalizan la formación de puentes disulfuro y facilitan la formación de la estructura nativa y el ensamblaje oligomérico (Aebi, 2010). Una vez que las proteínas se encuentran en un estado funcional, se transportan en vesículas a través de la vía de transporte vesicular hacia su destino final (Viotti, 2016).

2.1.1 N-glicosilación

Las proteínas que forman parte de la vía secretora sufren de un primer proceso de modificación covalente conocido como N-glicosilación, que consiste en la adición de un oligosacárido en el residuo de asparagina que se encuentra en la secuencia Asn-X-Ser/Thr (en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina, ácido aspártico y ácido glutámico) (Aebi *et al.*, 2010). Este proceso ocurre de forma cotraduccional, una vez que los primeros 13 aminoácidos del péptido ingresan al lumen del RE se alinea el residuo Asn con el sitio activo de la subunidad SST3 de la enzima oligosacariltransferasa (OST por sus siglas en inglés *Oligosaccharyltransferase*). La enzima OST forma un complejo transferasa hetero-oligomérico asociado al complejo Sec61 (Shibatani *et al.*, 2005) y transfiere un bloque preensamblado de carbohidratos que consisten de tres glucosas, nueve manosas y

dos N-acetil glucosamina (Glc3 Man9-GlcNAc2) desde el dolicol pirofosfato al residuo de Asn de la proteína a ser modificada (Figura 1). Una segunda isoforma de la subunidad catalítica de OST (STT3B) es capaz de modificar al péptido en secuencias que frecuentemente se encuentran cerca del carboxilo terminal de la proteína (Ruiz-Canada *et al.*, 2009).

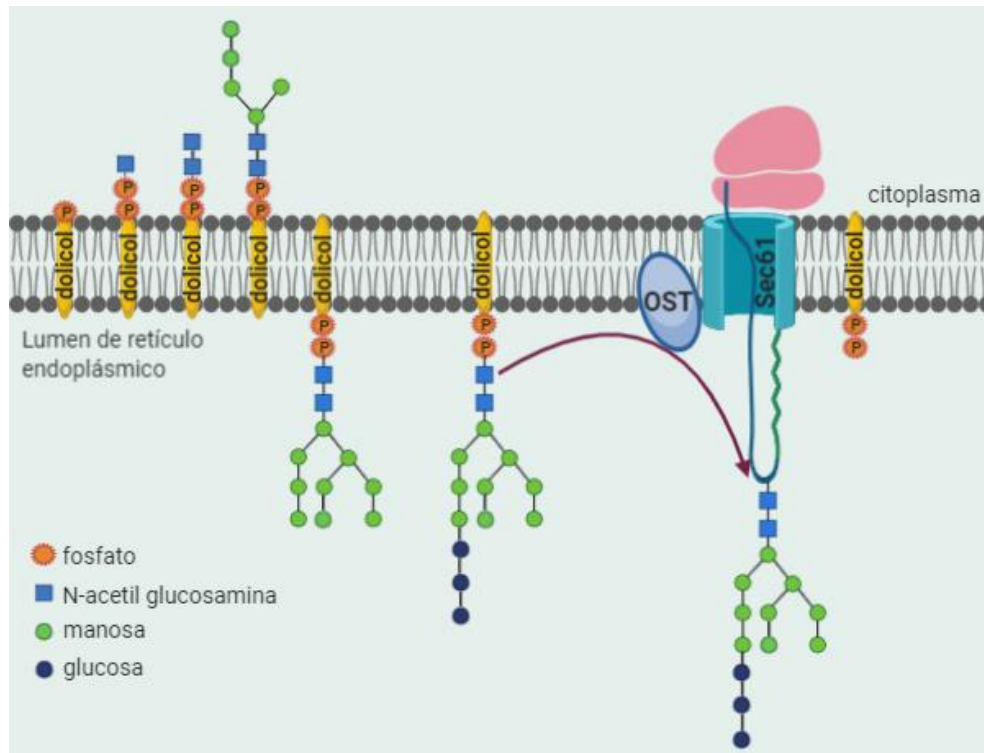


Figura 1: Proceso de N-glicosilación. Un oligosacárido previamente ensamblado es transferido desde el dolicol pirofosfato al residuo de asparagina localizado en la secuencia Asp-X-Ser/Thr, la transferencia es catalizada por la enzima Oligosaciltransferasa (OST) que se encuentra asociada al complejo Sec61 responsable de la translocación cotraduccional de los polipéptidos.

Las proteínas que no completan adecuadamente los procesos de modificación y plegamiento son retrotranslocadas del RE al citosol, ubiquitinadas y posteriormente degradadas por el proteosoma en un proceso conocido como degradación asociada a retículo endoplásmico (ERAD por sus siglas en inglés *Endoplasmic Reticulum Associated Protein Degradation*); sin embargo, cuando la acumulación de proteínas mal plegadas incrementa y sobrepasa la capacidad del RE de removerlas, la célula entra a un estado conocido como estrés de retículo endoplásmico (ERE). La célula responde a este estrés activando la vía de respuesta a proteínas mal plegadas (UPR por sus siglas en inglés

Unfolding Protein Response). Hay muchos factores que alteran el balance entre la síntesis y remoción de proteínas del RE, por ejemplo, errores en el plegamiento por mutaciones, oxidación de residuos, estrés por calor, estrés por metales pesados, perturbaciones en la homeostasis iónica y en la concentración de lípidos y glicolípidos (Ron & Walter, 2007).

2.2 Inductores de estrés de retículo endoplásmico

Experimentalmente el estrés de retículo es inducido por tratamientos con agentes que inhiben la N-glicosilación como la tunicamicina y la 2-desoxiglucosa o agentes que impiden la formación de puentes disulfuro como el ditioneitol y el β -mercaptoetanol.

2.2.1 Tunicamicina

La tunicamicina (Tm) es un antibiótico nucleosídico producido por *Streptomyces lysosuperificus*. En su estructura se encuentra una uridina conjugada a una aminodeoxialdosa y una cadena de ácidos grasos de longitud variable (13-17 carbonos) ramificada e insaturada. La Tm es un inhibidor selectivo de la N-glicosilación, presenta homología estructural con N-acetilglucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1-P) y compite con ésta por el sitio activo de la enzima GlcNAc fosfotransferasa (Alg7), impidiendo la transferencia desde UDP-GlcNAc al dolicol fosfato, de este modo, inhibe la formación de dolicol-PP-GlcNAc (Hemming, 1985).

2.2.2 2-desoxiglucosa

La 2-desoxiglucosa (2-DOG) es un análogo de la glucosa en la que el grupo hidroxilo del segundo átomo de carbono es sustituido por un hidrógeno. Debido a la similitud de la glucosa con la manosa, la 2-DOG compite con la manosa en el proceso de N-glicosilación, ésta es convertida a un derivado nucleosido-difosfato (GDP-2-DG) antes de ser incorporado en el precursor oligosacárido unido al dolicol. Al intermediario GDP-2-DG no se le pueden adicionar residuos de manosa y consecuentemente se interrumpe el proceso de N-glicosilación (Audrey *et al.*, 2018).

2.2.4 Ditioneitol y β -mercaptoetanol

El ditioneitol (DTT) y el β -mercaptoetanol son agentes reductores, rompen los puentes disulfuro entre los residuos Cys necesarios para la conformación estructural de las proteínas y mantienen a las proteínas en un estado reducido (Bub, 2017).

2.3 Vía UPR en *Saccharomyces cerevisiae*

En metazoarios se han identificado tres ramas de la UPR conocidas como: IRE1 (por sus siglas en inglés *Inositol-Requiring Protein 1*), ATF6 (por sus siglas en inglés *Activating Transcription Factor 6*) y PERK (por sus siglas en inglés *Protein Kinase RNA (PKR)-like ER Kinase*). La presencia de cada una de las ramas depende de la especie, sin embargo, la rama de Ire1 se encuentra en todas las células eucariontes incluyendo a las levaduras. Esta vía se ha estudiado ampliamente en *S. cerevisiae* (Figura 2) (Hernández-Elvira *et al.*, 2018).

El gen *IRE1* codifica para la proteína transmembranal de 1115 aminoácidos Ire1, cuyo dominio N-terminal se encuentra en el lumen del RE y el dominio C-terminal se localiza en el citosol; la región citosólica está compuesta por dos dominios funcionales: un dominio cinasa de serina/treonina y un dominio de endorribonucleasa cuya secuencia es homóloga a la de la RNasa L. En el dominio N-terminal se localiza una región central de detección de estrés (CSSR por sus siglas en inglés *Core Stress-Sensing Region*) en donde se unen proteínas mal plegadas. Bajo condiciones normales, el dominio N-terminal de Ire1 se encuentra asociado a la chaperona Kar2, la acumulación de proteínas mal plegadas lleva a la disociación de Ire1 y Kar2 (Credle *et al.*, 2005) lo que permite que la primera se oligomerice y se active por medio de la trans-autofosforilación de sus dominios cinasa yuxtapuestos (Shamu & Walter, 1996). Se han identificado a los residuos Ser 840, Ser 841, Thr 844 y Ser 850 de Ire1 como los blancos de fosforilación; los dos primeros tienen una función reguladora positiva ya que cuando están fosforilados, inducen la activación del dominio de endorribonucleasa. Este dominio cataliza el *splicing* de un pre-RNA mensajero el cual, en su forma madura codifica para el factor de transcripción Hac1.

El factor de transcripción Hac1 consta de 238 aminoácidos y pertenece a la familia *zipper* básico de leucina (bZIP). Contiene una región de unión a DNA seguida de 20 aminoácidos que forman el característico motivo *zipper* de leucina (Cox & Walter, 1996). El mRNA precursor de *HAC1* se expresa constitutivamente, sin embargo, éste no se traduce eficientemente debido a la presencia, cerca de su extremo 3', de un intrón de 252 nucleótidos que forma una estructura de tallo-asa como consecuencia del apareamiento de algunas bases del intrón con una porción de la región no traducida 5' (UTR por sus siglas en inglés *Untranslated Region*). Esto provoca la atenuación de la traducción debido a la incapacidad de los ribosomas de superar esta estructura (Aragón *et al.*, 2009). El dominio de endorribonucleasa de Ire1 cataliza el corte del intrón del RNA precursor de *HAC1*, posteriormente, la enzima Rlg1 une los exones generando al mRNA maduro (Ron & Walter,

2007). Dado que el sitio de *splicing* 5' está localizado dentro de la región codificante de Hac1, el *splicing* reemplaza la región C-terminal de Hac1, con esto, los últimos 10 residuos son substituídos por 18 residuos que forman el dominio de transactivación del factor (Mori *et al.*, 2000). Una vez sintetizado, el factor de transcripción Hac1 se transloca al núcleo en donde se une como homodímero a secuencias conocidas como elementos de respuesta a proteínas mal plegadas (UPRE por sus siglas en inglés *Unfolded Protein Response Elements*) los cuales se encuentran en los promotores de los genes blanco de la UPR. Durante este proceso, los residuos de Asn y Arg de la región de unión a DNA de Hac1 son esenciales para el reconocimiento de la secuencia UPRE, ya que estos aminoácidos interactúan con el surco mayor de la cadena de DNA (Hernández-Elvira *et al.*, 2018). Hac1 promueve la transcripción de genes que codifican para proteínas involucradas en el tráfico de proteínas y en su modificación, para componentes de la maquinaria de ERAD, para proteínas de metabolismo y biosíntesis de la pared celular (Thibault *et al.*, 2011). Así mismo provoca una disminución en la síntesis de RNAs ribosomales y en la expresión de genes involucrados en la respiración aeróbica como *COX20*, *OXA1* y *SOM1* (Van Daltsen *et al.*, 2018).

Un análisis con microarreglos mostró la activación de al menos 381 genes durante ERE (Travers *et al.*, 2000), sin embargo, el grupo de Chen *et al.* (2005) determinó que solo el 11% de estos genes son activados directamente por la vía Ire1/Hac1. Actualmente se sabe que hay vías paralelas a la UPR que se activan por ERE. Se han identificado la vía de la proteína cinasa activadas por mitógenos (MAPK por sus siglas en inglés *Mitogen-Activated Protein Kinases*) de integridad celular dependiente de Slt2 (Chen *et al.*, 2005), la vía MAPK osmosensora dependiente de Hog1 (Torrez-Quiroz, 2010) y la vía de señalización dependiente de calcio/calcineurina (Bonilla, 2002; Olivares, 2017).

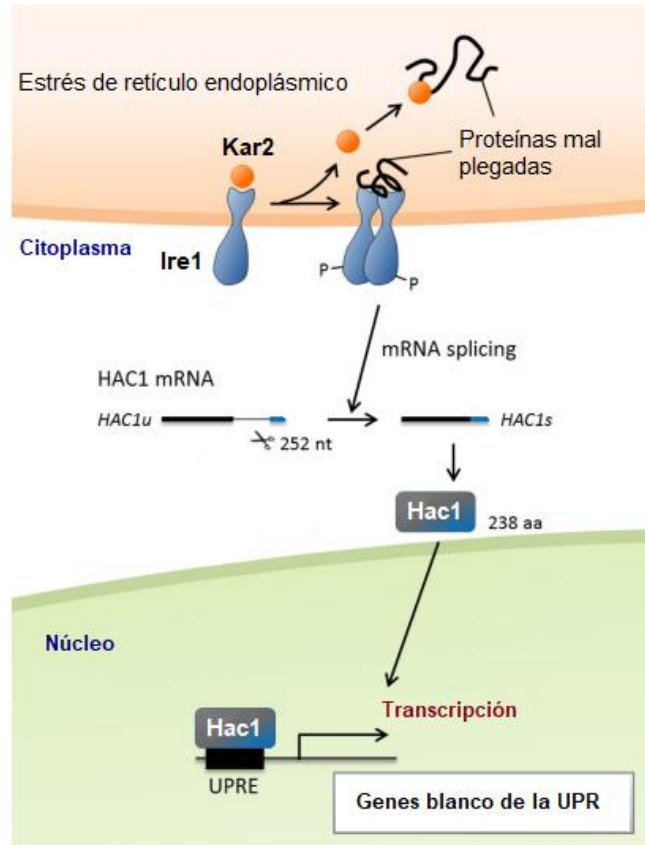


Figura 2. Vía UPR dependiente de Ire1 en *S. cerevisiae*. En condiciones normales, Kar2 se encuentra unida a Ire1 en el lumen del RE. La acumulación de proteínas mal plegadas conduce a la disociación de Ire1 y Kar2 lo que permite que la primera se oligomerice, transautofosforile y active el dominio de endorribonucleasa. El dominio de endorribonucleasa cataliza el corte de un intrón en el RNA precursor de *HAC1*. Una vez sintetizado, Hac1 se transloca al núcleo y se une a los elementos de respuesta a proteínas mal plegadas (UPRE) localizados en los promotores de genes blanco. Modificado de Chakraborty, 2016.

2.4 Vía de señalización dependiente de calcio

El calcio (Ca^{2+}) es un componente esencial en las células eucarióticas y, aunque la concentración citosólica es baja, tiene funciones estructurales, enzimáticas y de señalización importantes. Altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico son dañinas para la célula debido a que este precipita con iones inorgánicos, por esta razón, las células eucarióticas han desarrollado una serie de mecanismos para adquirir, usar, almacenar y mantener concentraciones no citotóxicas (Cyert & Philpott, 2013).

2.4.1 Bombas, canales y transportadores involucradas en la homeostasis de Ca^{2+}

La señalización por calcio depende de un grupo de bombas, intercambiadores y canales que son responsables del control del flujo de Ca^{2+} entre los diferentes compartimentos celulares de las células eucarióticas (Colinet *et al.*, 2016). Estas proteínas, así como la red de señalización dependiente de Ca^{2+} se encuentran conservadas en el reino fungi (Figura 3) (Zelter, 2004).

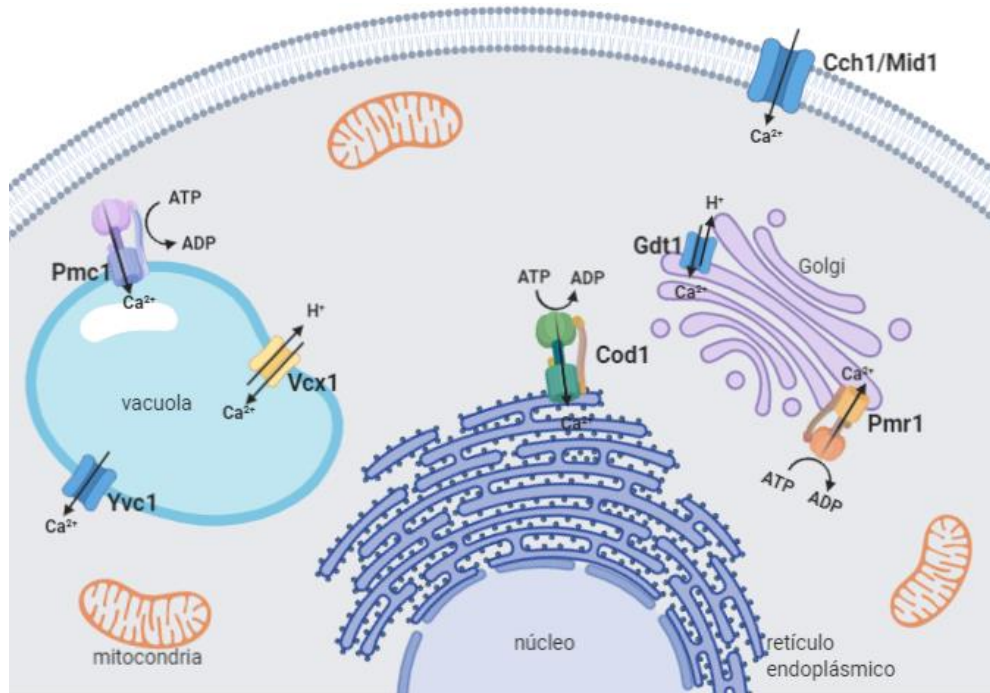


Figura 3. Bombas, canales e intercambiadores que participan en la homeostasis del Ca^{2+} en la levadura. En la imagen se representan las bombas Pmc1, Cod1 y Pmr1, los canales Cch1/Mid1 y Yvc1 y los intercambiadores de calcio Vcx1 y Gdt1, así como su localización subcelular.

2.4.1.1 Vacuola

S. cerevisiae contiene una o varias vacuolas que pueden estar en ciclos de invaginación, fusión y fisión en respuesta al ciclo celular y al ambiente; las vacuolas de los hongos tienen la capacidad de captar grandes cantidades de Ca^{2+} y bajo determinadas condiciones ambientales, lo pueden liberar al citoplasma (Cunningham, 2011). En *S. cerevisiae*, este compartimento capta más del 90% del Ca^{2+} celular. La concentración de Ca^{2+} vacuolar libre se ha estimado en $\sim 30 \mu\text{M}$ mientras que la concentración total se ha estimado en $\sim 3 \text{mM}$

(Shigaki *et al.*, 2006), esto se debe a que el ion forma complejos con polifosfatos inorgánicos (Dunn *et al.*, 1994). La mayor cantidad del Ca^{2+} es tomado directamente del citoplasma mediante la acción de Pmc1 y Vcx1 que se encuentran localizadas específicamente en la membrana de la vacuola (Cunningham, 2011).

Pmc1 es una ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA por su nombre en inglés *Plasma Membrane Ca^{2+} ATPase*). Se encuentra en las células eucariontes incluyendo plantas y animales, participa en la homeostasis del Ca^{2+} transportándolo del citoplasma a la vacuola. Una mutante nula de Pmc1 no muestra fenotipos de crecimiento o morfológicos evidentes en condiciones estándar; sin embargo, en condiciones de alta concentración del ion, acumula menor cantidad de este en la vacuola y presenta menor tolerancia a altas concentraciones de Ca^{2+} (Cunningham & Fink, 1994).

Vcx1 es un miembro de la familia de intercambiadores de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ (CAX por sus siglas en inglés *Calcium/Proton Exchanger*) tipo II, no se encuentra en células animales, pero sí en plantas y hongos (Shigaki *et al.*, 2006). Utiliza el gradiente de protones para acoplar la entrada de Ca^{2+} a la vacuola con la salida de protones al citosol. Una mutante nula de Vcx1 presenta un retardo en la disminución de la concentración citosólica de Ca^{2+} , sin embargo, la captación de éste en la vacuola no se altera, además, exhibe mayor tolerancia que una cepa silvestre a altas concentraciones de Ca^{2+} (Cyert & Philpott, 2013).

Vcx1 y Pmc1 actúan en conjunto para almacenar Ca^{2+} en la vacuola, Vcx1 toma rápidamente una gran cantidad de Ca^{2+} y tiene una función dominante en la dinámica del Ca^{2+} a corto plazo, mientras que Pmc1 establece un marcado gradiente de concentración de Ca^{2+} a través de la membrana vacuolar (Cyert & Philpott, 2013).

Cuando las levaduras son expuestas a un choque osmótico (Denis & Cyert, 2002), de peróxido de hidrogeno o de terbutil-hidroperóxido ocurre la liberación de Ca^{2+} a través del canal mecanosensible Yvc1 (Popa *et al.*, 2010). Éste se localiza exclusivamente en la membrana vacuolar y cuando se sobreexpresa induce hipersensibilidad al Ca^{2+} ambiental por lo que se sugiere que la proteína se requiere para regular la homeostasis del Ca^{2+} (Denis & Cyert, 2002).

2.4.1.2 Retículo endoplásmico y aparato de Golgi

El RE concentra aproximadamente $\sim 10 \mu\text{M}$ de Ca^{2+} por la acción de Pmr1. Esta proteína es una ATPasa tipo P que bombea Ca^{2+} y Mn^{2+} . Se localiza principalmente en el aparato de Golgi y suministra Ca^{2+} y Mn^{2+} durante la biogénesis del RE por medio del tráfico mediado

por vesículas en dirección retrograda. Pmr1 es crucial para las funciones de la vía secretora, para la N- y O-glicosilación, para la clasificación de proteínas y para su degradación asociada a RE (Dürr *et al.*, 1998). Una mutante nula de Pmr1 muestra una disminución significativa en el almacenamiento de Ca^{2+} en el RE (Strayle *et al.*, 1999).

Cod1/Spf1 es una ATPasa tipo P localizada en la membrana plasmática del RE que contribuye a la homeostasis de Ca^{2+} tanto en el RE como en el aparato de Golgi, sin embargo, no se ha caracterizado completamente (Cyert & Philpott, 2013).

Gdt1 es una proteína transmembranal, que se localiza en la zona cis- y media- del aparato de Golgi y en la vacuola. Es un intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$, participa en la regulación de la concentración de Ca^{2+} ante estrés osmótico y su sobreexpresión incrementa el almacenamiento de Ca^{2+} , además, tiene una función indirecta en la glicosilación de proteínas. Pese a su importante función en la homeostasis de Ca^{2+} , aún no se determina la dirección de transporte de Ca^{2+} por esta proteína (Colinet *et al.*, 2016).

2.4.2 Vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina

S. cerevisiae crece en un amplio rango de concentraciones de Ca^{2+} extracelular (1 μ -100 mM), responde y se adapta rápidamente a amplias fluctuaciones de este, gracias a la activación de vías de señalización que permiten modificaciones de los patrones de expresión génica (Espeso, 2016).

En condiciones normales, la concentración citosólica de Ca^{2+} en levadura se encuentra en un rango de 50-200 nM, sin embargo, la exposición a determinados estímulos ambientales y a diversos tipos de estrés provoca el incremento del Ca^{2+} citosólico, ya sea por la entrada a través de canales localizados en la membrana plasmática o la liberación de este de los compartimentos que lo almacenan. Este incremento activa a la vía de señalización dependiente de Ca^{2+} /calcineurina (Cyert, 2003). *S. cerevisiae* emplea esta última vía para regular una amplia variedad de procesos que incluyen la progresión del ciclo celular (Loukin & Kung, 1995; Iida *et al.*, 1990), el apareamiento (Muller *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2003), el procesamiento de proteínas (Hartley *et al.*, 1996), la respuesta a estrés hipotónico (Batiza *et al.*, 1996), la regulación del pH intracelular (Serrano *et al.*, 2002) y la señalización metabólica (Rispaill *et al.*, 2009).

En la vía de señalización dependiente de Ca^{2+} /calcineurina (Figura 4), el incremento en la concentración de Ca^{2+} citosólico activa a la calmodulina (CaM). La CaM es una proteína pequeña que se encuentra conservada en todos los eucariontes; es la principal proteína

receptora de Ca^{2+} intracelular y media muchos de los efectos de este ion (Cyert, 2001). Estructuralmente la CaM posee dos dominios similares, cada dominio tiene dos motivos de unión a Ca^{2+} conocidos como *EF-hand* conectados por un segmento corto y flexible. Los motivos *EF-hand* están formados por un asa de 12 aminoácidos flanqueado por dos hélices- α ; dentro del asa, el Ca^{2+} es coordinado por el oxígeno y seis diferentes aminoácidos. En ausencia de Ca^{2+} los motivos *EF-hand* se encuentran en una conformación cerrada, la unión de un ion Ca^{2+} a cada uno de los sitios causa un cambio de conformación con la consecuente exposición de dos superficies hidrofóbicas que le permiten unirse a las proteínas blanco dependientes de Ca^{2+} (Cyert, 2001).

La CaM tiene múltiples blancos, uno de estos es la fosfatasa calcineurina. La calcineurina o PP2B (por sus siglas en inglés *Protein Phosphatase 2B*), es una fosfatasa de serina/treonina dependiente de Ca^{2+} /CaM. La calcineurina es un heterodímero compuesto por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora (Stie & Fox, 2008). *S. cerevisiae* contiene dos genes parálogos que codifican para las subunidades catalíticas *CMP1/CNA1* y *CMP2/CNA2* y un gen *CNB1* que codifica a la subunidad reguladora. *CNA1* y *CNA2* se transcriben a diferentes proporciones durante las fases exponencial y estacionaria del crecimiento en medios con glucosa, en crecimiento diaúxico su abundancia disminuye considerablemente. El producto de *CNA1* y *CNA2* son proteínas de 63 y 68 kDa respectivamente, se especula que las proteínas son reguladas por mecanismos postraduccionales, tanto Cna1 como Cna2 tienen secuencias PEST putativas, estas son secuencias ricas en Pro, Glu, Ser y Thr que actúan como secuencia señal para la degradación proteolítica (Mere *et al.*, 2003). La subunidad catalítica o calcineurina A tiene al dominio fosfatasa en el dominio N-terminal seguido de una hélice con el dominio de unión de la subunidad reguladora o calcineurina B (BBH por sus siglas en inglés *Calcineurin B Binding Helix*), un dominio de unión a CaM (CBD por sus siglas en inglés *Calmodulin Binding Domain*), una secuencia autoinhibitoria (AIS por sus siglas en inglés *Autoinhibitory Signal*) seguida de un dominio autoinhibitorio (AID por sus siglas en inglés *Autoinhibitory Domain*) cerca del dominio C-terminal (Figura 5. Kissinger *et al.*, 1995; Roy *et al.*, 2007).

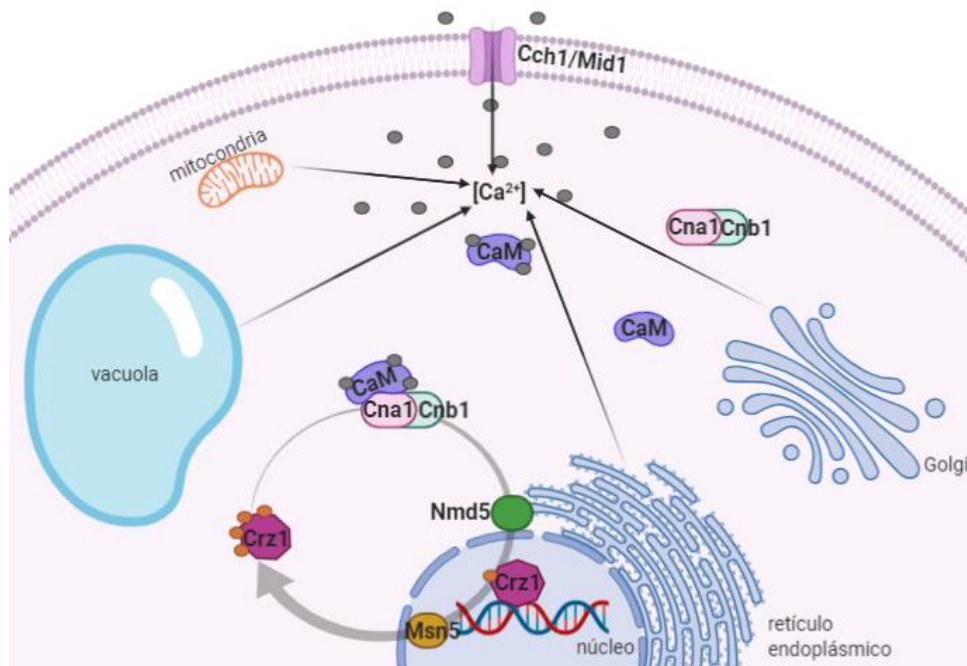


Figura 4. Vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina. En la imagen se muestran a las proteínas que participan en la vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina. El incremento en la concentración citosólica de Ca^{2+} , ya sea por la entrada de este a través de canales en la membrana plasmática como Cch1/Mid1 o por la salida del ion de los reservorios, provoca la unión del ion Ca^{2+} a la calmodulina (CaM). La CaM unida a cuatro iones de Ca^{2+} se une a la calcineurina y la activa, esta desfosforila al factor de transcripción Crz1 hiperfosforilado y permite su entrada al núcleo en donde se une a los elementos de respuesta dependientes de calcineurina (CDRE) en los promotores de los genes blanco.

Cnb1 es una proteína pequeña de 175 aminoácidos que forma el heterodímero con la subunidad catalítica Cna1/Cna2; Cnb1 tiene similitudes estructurales con la CaM, presenta cuatro motivos de unión a Ca^{2+} *EF-hand* (EF1-4) posicionados en extremos opuestos de la estructura terciaria simétrica en forma de pesa (Anglister, 1994). La CaM asociada al Ca^{2+} se une al dominio de unión de la calcineurina A y desplaza al dominio autoinhibitorio del sitio catalítico permitiendo que el sustrato acceda a esta última (Stie & Fox, 2008); trabajos realizados en *S. cerevisiae*, mostraron que el motivo EF4 es dispensable para la actividad de la calcineurina mientras que los motivos EF1-3 contribuyen a su activación independientemente del cambio conformacional ocurrido por la unión de Ca^{2+} /CaM (Ariño *et al.*, 2019).

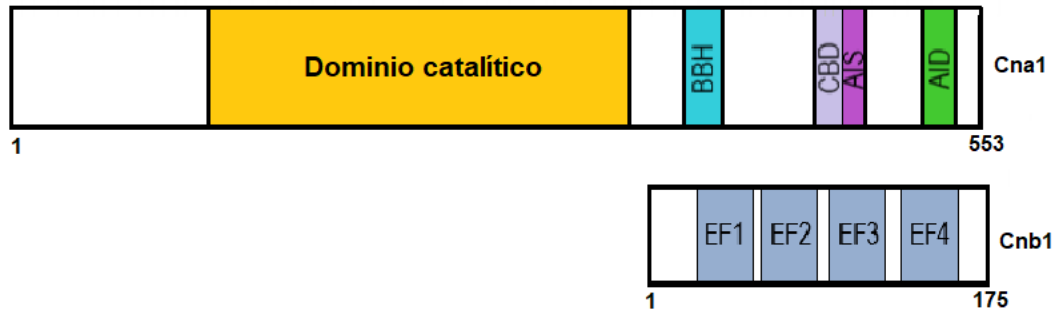


Figura 5. Dominios estructurales de la subunidad catalítica Cna1 y la subunidad reguladora Cnb1 de calcineurina. En la imagen superior se muestran en color amarillo el dominio catalítico, en azul el dominio de unión a la subunidad Cnb1 (BBH), en gris el dominio de unión a la calmodulina (CBD), en morado la señal de autoinhibición (AIS) y en color verde el dominio autoinhibitorio (AID). En la parte inferior se muestran en color azul, los cuatro dominios *EF-hand* (EF1-4) de la subunidad Cnb1 de la calcineurina. Modificada de Ariño *et al.*, 2019.

La calcineurina reconoce a sus sustratos por medio de un motivo corto distinto al sitio de desfosforilación. En varios blancos de la calcineurina como Crz1, Rcn1, Slm1, Slm2 y Hph1 se ha identificado la secuencia PxlIT como un motivo de interacción. La interacción es de baja afinidad y ocurre en un surco de la subunidad catalítica distante del centro catalítico e independiente del estado de activación del dominio de fosfatasa. Un contacto secundario establecido mediante el motivo LxVP, encontrado en algunos sustratos como Rcn1, auxilia en la orientación del sustrato durante la desfosforilación (Roy & Cyert, 2009; Goldman *et al.*, 2014). Aunque se han identificado varios blancos de la calcineurina, el factor de transcripción Crz1 es el mejor caracterizado en la levadura *S. cerevisiae*. Este factor actúa río abajo para regular la respuesta dependiente de calcineurina (Cyert, 2003).

2.5 Crz1

El factor de transcripción Crz1 es una proteína de 678 aminoácidos que se caracteriza por presentar en el extremo C-terminal, dos motivos de unión a DNA conocidos como dedos de zinc C_2H_2 (estos pueden variar de uno a cuatro dependiendo de la especie). También contiene un motivo pequeño con la secuencia PIISIQ en los aminoácidos 332 a 337 involucrado en la interacción directa con la calcineurina, una región rica en residuos de Ser (SRR por sus siglas en inglés *Serine Rich Region*) así como las secuencias de señalización (NLS por sus siglas en inglés *Nuclear Localization Signal*) y de exportación nucleares (NES por sus siglas en inglés *Nuclear Export Signal*) (Figura 6) (Cyert, 2003).

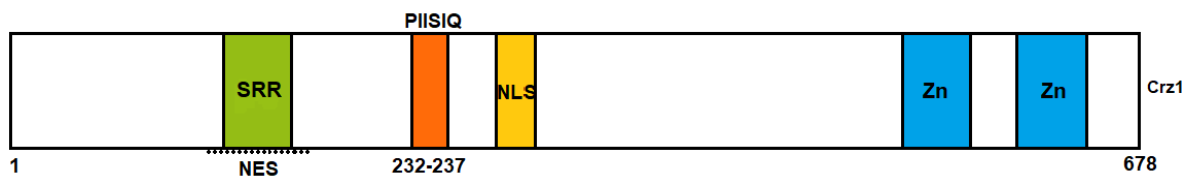


Figura 6. Dominios estructurales de Crz1. SSR representa a la región rica en Ser, la secuencia de señalización nuclear se representa como NES (región de puntos), la región PIISIQ se representa en color naranja, la secuencia de exportación nuclear se representa en color amarillo (NLS), el dominio de unión a DNA se representa en color azul y se indican los átomos de zinc importantes para esta función. Modificada de Cyert, 2003.

La calcineurina controla la actividad de Crz1 mediante la regulación de su localización celular. En condiciones fisiológicas Crz1 se encuentra hiperfosforilado en el citoplasma; después de un incremento en la concentración de Ca^{2+} intracelular, Crz1 se acumula rápidamente en el núcleo. La calcineurina desfosforila a Crz1 provocando un cambio en la conformación tridimensional, dicho cambio expone la NLS permitiendo que ésta sea reconocida por la importina Nmd5 que lo transloca al núcleo. Se han identificado dos secuencias NLS en Crz1, una localizada entre los aminoácidos 394 y 422 y la otra entre los aminoácidos 612 y 615, sin embargo, solo se requiere de la primera para la regulación dependiente de calcineurina. Esta NLS contiene una porción hidrofóbica de Ile y dos porciones básicas de Arg y Lys indispensables para su importación dependiente de Nmd5. Adicionalmente, dos Arg cerca del dominio C-terminal potencian la importación, pero no son imprescindibles. Se ha reportado que Crz1 se une directamente a Nmd5 para ingresar al núcleo (Polizotto & Cyert, 2001).

La acumulación de Crz1 en el núcleo es reversible; la secuencia NES de Crz1 se localiza entre los residuos 186 y 279 y es reconocida por la exportina Msn5 (Cyert, 2003); la secuencia NES contiene una región rica en Leu entre los aminoácidos 257 y 263 que es necesaria para el proceso de exportación. En este dominio se encuentra la región SRR, la cual se ha demostrado por mutagénesis, que la eliminación de las Ser y de dos Thr impide la exportación de Crz1. Esto sugiere que la fosforilación de estos aminoácidos es necesaria para la interacción física entre Crz1 y Msn5. Se ha identificado a la cinasa Hrr25, homóloga a la caseína cinasa I de mamíferos, como una de las responsables de la fosforilación de Crz1. Hrr25 se une a Crz1 independientemente de su actividad catalítica. La interacción es de larga duración y ocurre en ambos compartimentos celulares (Kadafar *et al.*, 2003). El motivo PIISIQ de Crz1 participa en la asociación física con la calcineurina y es requerido para la desfosforilación dependiente de calcineurina de la región SRR. Esta desfosforilación

inhibe la interacción entre la región NES de Crz1 y Msn5, lo que disminuye su exportación y por tanto aumenta su localización en el núcleo (Boustany & Cyert, 2002).

Una vez en el núcleo, Crz1 se une a los promotores de los genes blanco en una secuencia conocida como elementos de respuesta dependientes de calcineurina (CDRE por sus siglas en inglés *Calcineurin-Dependent Response Elements*) (Stathopoulos & Cyert, 1997). Se ha sugerido que la desfosforilación de Crz1 puede incrementar su actividad transcripcional, sin embargo, esto no se ha demostrado (Boustany & Cyert, 2002). En *S. cerevisiae* la activación de calcineurina por un pulso de Ca^{2+} de 200mM, incrementa la expresión de más de 160 genes, muchos de los cuales contienen una secuencia consenso 5'GNGGC(G/T)CA-3' a la que se une Crz1 (Cyert, 2003; Yoshimoto et al., 2002). Entre los genes blanco de Crz1 se incluye al propio *CRZ1* (Matheos et al., 1997), a *RCN1* y *RCN2* que codifican para reguladores positivos y negativos de la calcineurina (Kingsbury & Cunningham, 2000; Mehta et al., 2009), a *CMK2* que codifica para una proteína cinasa dependiente de Ca^{2+} /CaM (Dudgeon et al., 2008), así como a *PMC1*, *PMR1* y *ENA1* que codifican para varias bombas catiónicas responsables de la salida de Ca^{2+} , Mn^{2+} , Na^+ y Li^+ (Matheos, 1997). Además, Crz1 regula a genes involucrados en homeostasis iónica y de integridad de la membrana y pared celulares (Yoshimoto et al., 2002).

En el 2001, se reportó que el factor de transcripción Skn7 actúa como estabilizador de Crz1 (Williams & Cyert, 2001).

2.6 Skn7

El gen *SKN7* codifica para un factor de transcripción de respuesta a estrés que se encuentra conservado en hongos. La proteína está constituida por 622 aminoácidos y se localiza predominantemente en el núcleo; en el extremo N-terminal presenta un dominio de unión a DNA similar al encontrado en el factor de transcripción de choque de calor (HSF por sus siglas en inglés *Heat Shock Factor*) y un dominio con estructura supersecundaria de cuerda enrollada (CC por sus siglas en inglés *Coiled Coil*) involucrado en interacción proteína-proteína. En C-terminal contiene un dominio aceptor de fosfato con aminoácidos altamente conservados encontrados en familias de proteínas reguladoras de respuesta y un dominio rico en Gln que tiene similitud con dominios de activación transcripcional (Figura 7) (Mulford & Fassler, 2011).

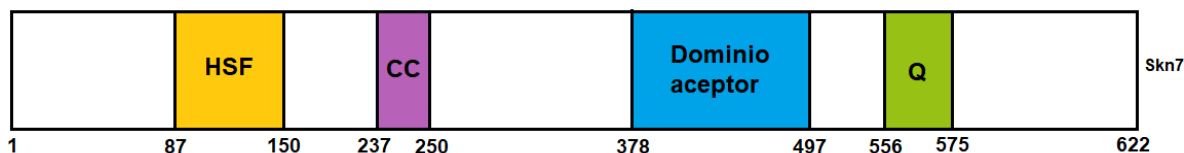


Figura 7. Dominios estructurales del factor de transcripción Skn7 de *S. cerevisiae*. El dominio de unión a DNA se representa en color amarillo (HSF), el dominio de interacción con proteínas se visualiza en color morado (CC), el dominio aceptor se representa en color azul y la región rica en Gln se representa en color verde (Q).

Inicialmente se identificó a Skn7 por su capacidad de suprimir los defectos en el crecimiento de una cepa mutante *kre9Δ* de *S. cerevisiae* (Brown *et al.*, 1993), y por la supresión del fenotipo de lisis en una mutante *pkcΔ* (Brown *et al.*, 1994). Posteriormente, Skn7 se identificó como regulador de respuesta del sistema de fosforrelevo en *S. cerevisiae*. En esta vía, la fosforilación de la proteína sensora histidina cinasa, Sln1, controla la fosforilación de la proteína histidina fosfotransferasa Ypd1 y dos reguladores de respuesta: Ssk1, que controla la actividad de la vía MAPK dependiente de Hog1 en condiciones de estrés osmótico, y Skn7, que controla la actividad de genes dependientes de Sln1-Skn7 como *OCH1*; además se encontró que Skn7 actúa como regulador de la actividad de la vía de señalización de alta osmolaridad-glicerol (HOG por sus siglas en inglés *High Osmolarity Glycerol*) (Ketela *et al.*, 1998). Para estos efectos es imprescindible la fosforilación del Asp 427 de su dominio aceptor (Brown *et al.*, 1994; Ketela *et al.*, 1998).

Skn7 participa en la respuesta a estrés oxidante y su actividad es independiente a la vía Sln1 por lo que no requiere la fosforilación del Asp 427. En condiciones de estrés oxidante, Skn7 interactúa con el factor de transcripción Yap1 y juntos activan la transcripción de genes blanco; durante este evento, los residuos C303, C598 y C629 de Yap1 así como los residuos I428, V429 y T437 del dominio aceptor de Skn7 son necesarios para la interacción física entre Yap1-Skn7 y la T449 es necesaria para la interacción física de Skn7 con el DNA (Figura 8) (He *et al.*, 2009; Mulford & Fassler, 2011).

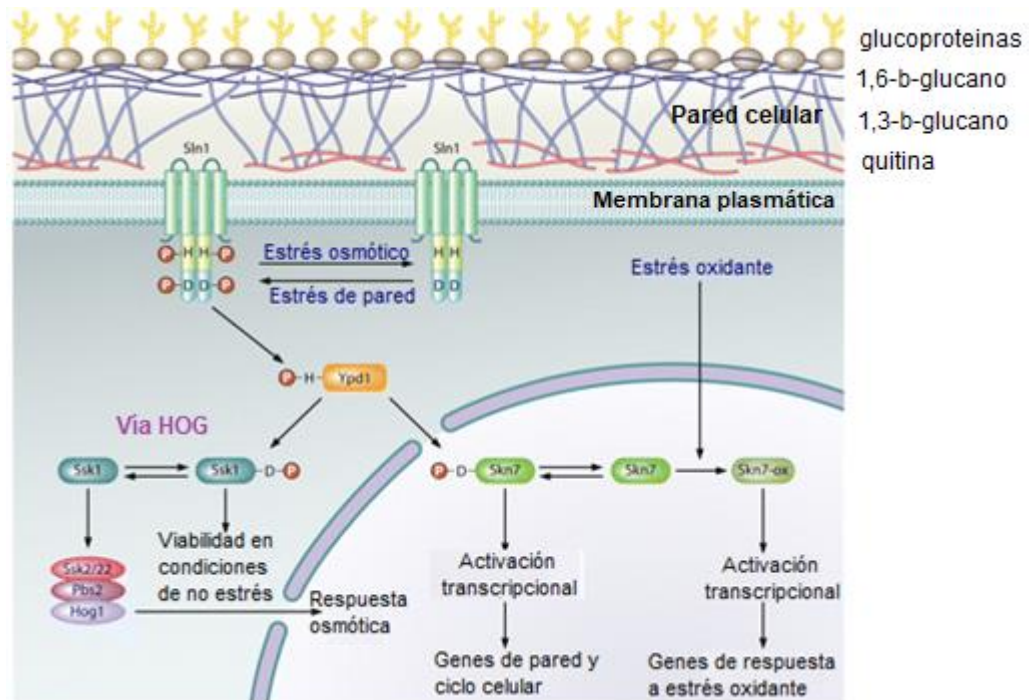


Figura 8. El factor Skn7 participa en la vía de fosforrelevo y estrés oxidante en *S. cerevisiae*. En la vía de fosforrelevo, la proteína sensora Sln1 asociada a la membrana plasmática detecta las propiedades físicas de la pared celular, esta se representa como un entramado de quitina, 1,3-β-glucano, 1,6-β-glucano y glicoproteínas en la superficie. En condiciones normales Sln1 se transautofosforila y posteriormente el grupo fosfato es transferido a la fosfotransferasa Ypd1 la que, a su vez, transfiere el grupo fosfato a los reguladores de respuesta Ssk1 y Skn7. El estrés osmótico provoca la disminución de la actividad cinasa de Sln1, por lo que las formas desfosforiladas de Ssk1 y Skn7 se acumulan; Ssk1 puede asociarse a Ssk2/22 y activar la vía HOG. La hiperactivación de Sln1 ocurre por estrés de pared celular provocando un incremento de Skn7 fosforilado y la activación transcripcional de sus genes blanco. En estrés oxidante Skn7 activa la respuesta transcripcional de los genes blanco independientemente de Sln1. Modificada de Fassler & West, 2011.

Adicionalmente, Skn7 se encuentra involucrada en otros procesos celulares. Por ejemplo, participa en la respuesta a estrés de pared celular y estrés osmótico (Li *et al.*, 2002), en la respuesta a estrés por calor y en el crecimiento filamentoso diploide inducido por privación de fuentes de nitrógeno (Lorentz & Heitman, 1998). Recientemente se demostró que mutantes nulas de *SKN7* son sensibles a ERE inducido con Tm y se determinó que su actividad es independiente de su función como regulador de respuesta en la vía Sln1 y de la fosforilación del residuo D427. En este sistema Skn7 no requiere de la co-actividad de Yap1 (Olivares, 2017).

El factor Skn7 puede autoasociarse e interactuar con otras proteínas que incluyen al factor de transcripción Hsf1 (Raitt *et al.*, 2000), Yap1 (Mulford & Fassler, 2011), Mbp1 (Morgan *et al.*, 1995; Bouquin *et al.*, 1999), Crz1 (Williams & Cyert, 2001), la GTPasa Rho (Alberts *et al.*, 1998) y Mog1 (Lu, *et al.*, 2004).

3. ANTECEDENTES

Desde hace varios años Williams & Cyert (2001) reportaron la interacción física y genética de los factores de transcripción Crz1 y Skn7. De acuerdo con este reporte, la sobreexpresión de Skn7 activa la transcripción dependiente de los CDREs y la expresión de los genes *PMC1* y *FKS2*. En ese mismo trabajo se reporta que Skn7 tiene una función estabilizadora de Crz1 ya que incrementa el tiempo de vida media de la proteína. Ensayos *in vitro* mostraron que Skn7 interactúa físicamente con Crz1 y con calcineurina y además se observó que los dominios CC y de interacción con DNA de Skn7p se requieren para regular la actividad transcripcional dependiente de Crz1. La interacción *in vitro* entre Skn7 y Crz1 no requiere del dominio CC de Skn7 (Williams & Cyert, 2001).

Recientemente se mostró que mutantes *skn7Δ* y *crz1Δ* presentan un fenotipo sensible a estrés de retículo inducido por Tm (Figura 9) (Olivares, 2017), la Tm activa a la vía dependiente de Ca^{2+} /calcineurina (Bonilla *et al.*, 2002; Olivares, 2019) y mutantes de las subunidades catalítica (Cna2) y reguladora (Cnb1) de la calcineurina son sensibles a este antibiótico (Olivares, 2017). La conexión entre Skn7 y la vía Ca^{2+} /Calcineurina se comprobó al observar que la inactivación de Skn7 en la mutante de la calcineurina exacerba su sensibilidad a Tm (Figura 9) (Olivares, 2019).

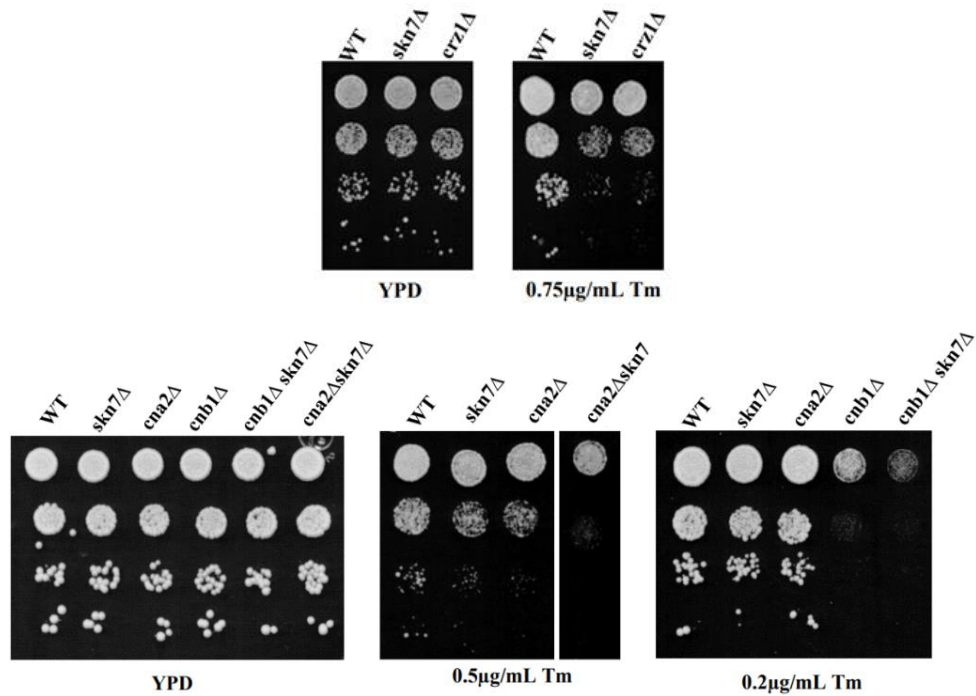


Figura 9. Sensibilidad a Tm de mutantes del factor de transcripción Skn7 y los componentes de la vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina Cna2, Cnb1 y Crz1. Se muestran ensayos de crecimiento de *S. cerevisiae* en diluciones seriadas de una cepa silvestre y mutantes de los componentes de la vía de calcineurina. Todas las mutantes son sensibles a la Tm; en la parte superior se muestra que *skn7Δ* y *crz1Δ* presentan el mismo grado de sensibilidad a 0.75 μg/ml de Tm; en la parte inferior, *skn7Δcna2Δ* presenta mayor sensibilidad en el crecimiento que la observada en cada una de las mutantes sencillas en 0.5 μg/ml de Tm; la mutante *cnb1Δ* presenta sensibilidad a 0.2 μg/ml de Tm y su crecimiento es menor en una doble mutante *cnb1Δskn7Δ*. Tomada de Olivares, 2017; 2019.

4. HIPÓTESIS

Mutantes de los elementos Cna2, Cnb1 y Crz1 de la vía Ca^{2+} /calcineurina así como del factor de transcripción Skn7 presentan sensibilidad a ERE inducido con Tm, ensayos *in vitro* han mostrado que Skn7 interacciona físicamente con Crz1. Entonces se espera que un ERE inducido con Tm active a la vía de Ca^{2+} /Calcineurina y la respuesta transcripcional dependerá sinérgicamente de Crz1 y Skn7. En particular se espera que los promotores de los genes *FKS2*, *PMC1* y *GDT1* se co-regulen por ambos factores de transcripción en respuesta a la Tm.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

- Determinar si los factores de transcripción Crz1 y Skn7 participan en la respuesta a ERE inducido con Tm co-regulando genes de respuesta de la vía Ca^{2+} /calcineurina.

5.2 Objetivos particulares

- Determinar si el factor de transcripción Skn7 es un elemento de la vía de señalización Ca^{2+} /calcineurina.
- Caracterizar la respuesta transcripcional de los genes *FKS2*, *PMC1* y *GDT1* al ERE inducido con Tm.
- Determinar si la transcripción de los genes *FKS2*, *PMC1* y *GDT1* depende de la actividad sinérgica de Skn7 y Crz1 en respuesta a ERE inducido con Tm.
- Determinar si la activación de la vía Ca^{2+} /calcineurina es dependiente de la vía UPR.

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 Cepas utilizadas

Todas las cepas utilizadas en este trabajo son derivadas de la silvestre BY4742 de *S. cerevisiae*. Las cepas mutantes sencillas fueron obtenidas de una colección comercial de mutantes EUROSCARF en posesión del Dr. Gabriel del Rio Guerra, quien las donó al laboratorio del Dr. Roberto Coria; el genotipo de cada una de las cepas se describe en la Tabla 1.

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* y sus marcadores.

Nombre	Genotipo
BY4742	MAT α <i>his3Δ1 leu2Δ0 lys2Δ0 ura3Δ0</i>
<i>crz1Δ</i>	BY4742 <i>crz1::KANMX4</i>
<i>skn7Δ</i>	BY4742 <i>skn7::KANMX4</i>
<i>crz1Δskn7Δ</i>	BY4742 <i>crz1::KANMX skn7::ura3</i>
<i>Ire1Δ</i>	BY4742 <i>ire1::KANMX4</i>
<i>cnb1Δ</i>	BY4742 <i>cnb1::KANMX</i>
<i>ire1Δcnb1Δ</i>	BY4742 <i>ire1::KANMX cnb1::NATMX4</i>

6.2 Medios

Las levaduras se cultivaron a 30°C en medio completo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona, 2% glucosa y 2% agar cuando se requirió medio sólido) o en medio mínimo sintético SD (0.69% base nitrogenada, 2% glucosa, 20 μ g/ml de los aminoácidos adenina, arginina, histidina, metionina, leucina, lisina y triptófano y en caso de medio sólido 2% agar pH 6.5-7). El medio sólido SD-Ura utilizado para los ensayos cualitativos de la actividad de β -galactosidasa se elaboró con amortiguador de fosfatos en lugar de agua.

Las bacterias de *Escherichia coli* (DH5 α) se cultivaron a 37°C en medio LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 0.5% NaCl) suplementado con 100 μ g/ml de ampicilina para la selección de plásmidos.

6.3 Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se muestran en la tabla 5 del ANEXO.

6.3.1 Clonación de *lacZ* en el plásmido pGEM-T Easy Vector

El fragmento correspondiente al gen *lacZ* se amplificó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) y se purificó para luego poliadenilarse en una reacción con los siguientes componentes: DNA de *lacZ* 6 μ l, $MgCl_2$ 2.5 mM (Promega), dATP 0.2mM, amortiguador 1x, Taq polimerasa 0.05 U/ μ l (Invitrogen) en un volumen de 10.1 μ l; la mezcla se incubó a 72°C durante 30 minutos en el termociclador PT100 Peltier Thermal Cycler de MJ Research. Posteriormente se clonó en el vector *pGEM-T Easy Vector System* (Promega) siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.3.2 Subclonación de *lacZ* en el plásmido YEp352

El plásmido pGEM-*lacZ* (este trabajo) se digirió con las enzimas *XbaI*, *Sall* y *Scal* (*Thermo Scientific FastDigest*) y el fragmento correspondiente a *lacZ* fue purificado (ver apartado 6.9). El plásmido YEp352 (600 ng) (Hill *et al.*, 1986) se digirió con las enzimas *XbaI* y *Sall* (*Thermo Scientific Fast Digest*) y posteriormente se desfosforiló con 0.03 U/ μ l de la enzima fosfatasa alcalina (*Roche Diagnostics*) en un volumen final de 30 μ l durante 1 hora a 37°C; el plásmido fue verificado en un gel de agarosa al 0.8% y el fragmento correspondiente a YEp352 fue purificado. Los fragmentos purificados de *lacZ* y YEp352 fueron puestos en una reacción de ligación en las siguientes condiciones: amortiguador T4 DNA ligasa 1x, vector 7 μ l, inserto 5 μ l, T4 DNA ligasa 0.075 U/ μ l (*Roche Diagnostics*) en un volumen final de 20 μ l; la reacción se incubó durante 12 horas a 14 °C.

6.3.3 Subclonación de los promotores de *FKS2*, *PMC1* y *GDT1* en el plásmido YEp352-*lacZ*

Los promotores de los genes *FKS2*, *PMC1* y *GDT1*, correspondientes a 1,000 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción de cada gen, fueron obtenidos de los plásmidos pGEM-P*FKS2*, pGEM-P*PMC1* y pGEM-P*GDT1* (los promotores fueron clonados previamente con el kit *pGEM-T Easy Vector System* por Olivares-Reséndiz en el laboratorio del Dr. Roberto Coria, no publicado). El plásmido pGEM-P*FKS2* fue digerido con las enzimas *XmaI* y *XbaI*

y la banda correspondiente al promotor fue aislada y purificada. Los plásmidos pGEM-PPMC1 y pGEM-PGDT1 fueron digeridos con la enzima *EcoRI* en un volumen de 20 μ l. A la reacción de digestión se adicionó *Klenow dilution buffer* 1x, dNTPs 1 mM, y 0.1 u/ μ l de la enzima *Klenow fragment (Invitrogen)* en un volumen final de 30 μ l, la mezcla se incubó a 37°C durante 30 minutos, posteriormente los fragmentos correspondientes a los promotores fueron purificados. Los productos se cortaron con la enzima *XbaI* y posteriormente se purificaron. El producto purificado se cortó con la enzima *XbaI*. El fragmento correspondiente al promotor de *FKS2* se ligó con YEp352-*lacZ* (este trabajo) previamente cortado con las enzimas *XmaI* y *XbaI* y desfosforilado con la enzima fosfatasa alcalina. Los promotores de *PMC1* y *GDT1* fueron ligados con YEp352-*lacZ* digerido con las enzimas *SmaI* y *XbaI*; la reacción de ligación se realizó con las siguientes condiciones: amortiguador T4 DNA ligasa 1x, vector 2 μ l, inserto 5 μ l, T4 DNA ligasa 0.075 U/ μ l (*Roche Diagnostics*) en un volumen final de 20 μ l; la reacción se incubó durante 12 horas a 14 °C. Las clonas recombinantes se verificaron por electroforesis en un gel al 0.8% con las enzimas *Sall+SmaI+XbaI*. Las enzimas utilizadas en este apartado fueron de *Thermo Scientific FastDigest Restriction Enzymes*.

6.4 Amplificación de productos por PCR

El gen *lacZ* se amplificó a partir del plásmido pSH18-34 (Estojak *et al.*, 1995) con los desoxioligonucleótidos mostrados en la Tabla 4 del ANEXO; las condiciones de la PCR fueron las siguientes: desoxioligonucleótidos sentido (*Forward*) y antisentido (*Reverse*) 4 ng/ μ l, dNTPs 0.2 mM (*Roche Diagnostics*), MgSO₄ 1 mM, *Pfx amplification buffer* 1x, Pfx DNA polimerasa 0.025 U/ μ l (*Invitrogen*), DNA plasmídico 0.5 ng/ μ l en un volumen final de 50 μ l. Se utilizó un termociclador PT100 Peltier Thermal Cycler de MJ Research y las condiciones de amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización inicial de 98°C durante 5 minutos, posteriormente 30 ciclos de una serie de: 98°C durante 30 segundos, 50°C durante 30 segundos, 72°C durante 3 minutos y finalmente 5 minutos a 72°C.

El plásmido pAG25 (Goldstein *et al.*, 1999) se utilizó para amplificar al gen *NAT1* (los desoxioligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 4 del ANEXO). Las condiciones de la reacción de PCR fueron similares a la anterior excepto que la concentración de DNA fue de 0.2 ng/ μ l. Para la amplificación se empleó una temperatura de alineación de 55°C y el tiempo de extensión fue de 30 s.

El gen *NAT1* se amplificó a partir de DNA genómico extraído de cepas recombinantes *ire1Δcnb1Δ* (los desoxioligonucleótidos utilizados se muestran en la Tabla 4 del ANEXO), las condiciones de la reacción de PCR fueron las siguientes: MgSO₄ 2 mM (Promega), dNTPs 0.2 mM (*Roche Diagnostics*), desoxioligonucleótidos sentido (*Forward*) y antisentido (*Reverse*) 4 ng/μl, DNA 1μl, *Colorless Go Taq Flexi Buffer* 1x (Promega), *Go Taq DNA* polimerasa 0.025 U/μl (Promega) en un volumen de 50 μl. Se utilizó un termociclador PT100 Peltier Thermal Cycler de MJ Research. Para la amplificación se empleó una temperatura de desnaturalización inicial de 98°C durante 5 minutos, posteriormente 30 ciclos de una serie de: 98°C durante 30 segundos, 67°C durante 30 segundos, 72°C durante 30 segundos y finalmente 5 minutos a 72°C.

6.5 Ensayos de sensibilidad por goteo

Las cepas se crecieron en medio YPD líquido y los cultivos en fase exponencial se ajustaron a una OD₆₀₀ de 0.5. Posteriormente se realizaron cuatro diluciones seriadas 1:10, para lo cual se colocaron, de mayor a menor concentración, alícuotas de 3.5 μl sobre cajas Petri con medio YPD sólido con y sin distintos inductores de estrés (Tabla 2), según fuera el caso. Después de 48 horas de incubación a 30 °C las placas se escanearon.

Tabla 2. Inductores de estrés utilizados para evaluación de fenotipos de sensibilidad en distintas mutantes.

Cepas evaluadas	Inductores de estrés
BY4742, <i>crz1Δ</i>, <i>skn7Δ</i>, <i>crz1Δskn7Δ</i>	Tm 1 μg/ml, MnCl ₂ 4 mM y t-BOOH 0.75 mM.
BY4742, <i>ire1Δ</i>, <i>cnb1Δ</i>, <i>ire1Δcnb1Δ</i>	Tm 0.05, 0.075, 0.1, 0.12, 0.15 μg/ml y MnCl ₂ 4mM.

6.6 Curvas de crecimiento

Las células se crecieron en YPD toda la noche. Después se ajustaron a DO₆₀₀ de 0.05 y se adicionó Tm a distintas concentraciones, se incubaron a 30°C con agitación en cajas de Elisa de 100 pozos (Bioscreen C). Se registró la DO₆₀₀ cada 60 minutos durante 24 horas en un espectrofotómetro de placas. El promedio de tres ensayos se graficó y la tasa de crecimiento se calculó como el valor de la pendiente de una regresión lineal de la fase exponencial.

6.7 Extracción de DNA genómico

5 ml de un cultivo en fase exponencial de la cepa transformante se centrifugó a 823 x g durante 5 minutos, el botón se resuspendió en 500 μ l de solución A (Tris 50mM, EDTA 10 mM, NaCl 150 mM, triton 1%, SDS 1%) y se agregaron 250 μ l de fenol + 240 μ l de cloroformo + 10 μ l de alcohol isoamílico. La mezcla se agitó vigorosamente durante 4 minutos y se incubó durante 30 minutos a 44°C en un termobloque con agitación. La mezcla se centrifugó a 11,357 x g durante 5 minutos, la fase acuosa fue transferida a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó durante otros 3 minutos a 11,357 x g el sobrenadante se transfirió por decantación a tubos de microcentrífuga de 1.5 ml con 50 μ l de la solución A sin detergente. Se agregaron 30 μ g/ μ l de RNAsa y se incubó a 44 °C durante 30 minutos. Posteriormente se agregaron 7 μ l de NaCl 5 M y la mezcla se centrifugó a 11,357 x g durante 2 minutos. El botón se lavó con etanol al 100% y se centrifugó a 11,357 x g durante 1 minuto. Después se lavó 2 veces con etanol al 70%, se eliminó el exceso de alcohol y se centrifugó a 11,357 x g durante 30 segundos. Se retiró el alcohol restante sin tocar el botón, este se dejó secar a la intemperie y finalmente se resuspendió en 50 μ l de agua.

6.8 Extracción de plásmidos de *E. coli*

La extracción y purificación de plásmidos de bacterias se hizo por medio del *QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)* siguiendo las instrucciones del proveedor.

6.9 Purificación de DNA en geles de agarosa y DNA en solución

Los productos de PCR y el DNA proveniente de plásmidos digeridos fueron verificados por electroforesis en gel de agarosa ultrapura (*Invitrogen*) al 0.8% y posteriormente la banda de interés se purificó por medio del *Gene Clean II Kit (Mp Biomedicals)* siguiendo el instructivo del proveedor. Igualmente se siguió el protocolo marcado en este *kit* para la purificación de DNA en solución.

6.10 Transformación de bacterias

Se utilizaron bacterias competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* para amplificar los plásmidos obtenidos de las reacciones de ligación. Se tomaron 100 μ l de cultivos de bacterias ajustadas a una OD₆₀₀ de 0.5 y se incubaron con las mezclas de ligación. Las

células se incubaron en hielo durante 30 minutos y posteriormente se sometieron a choque térmico de 42°C durante 45 segundos. Se incubaron en hielo durante 2 minutos y se agregó 1 ml de medio LB. Se incubaron a 37°C durante 1 hora, se centrifugaron a 4 300 x g durante 1 minuto en una microcentrifuga y el botón se resuspendió en 100 µl de LB. Finalmente, las células se plaquearon en cajas de LB con 100 µg/ml de ampicilina como agente de selección.

6.11 Transformación de levaduras

Las células de un cultivo en fase exponencial se centrifugaron a 1 075 x g durante 5 minutos, luego se lavaron con un volumen de agua estéril y posteriormente con 1 ml de amortiguador Tris-EDTA (TE)/LiOAc (100 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA pH 7.5, 100 mM LiOAc pH 7.5). El botón de la última centrifugación se resuspendió en 100 µl de amortiguador TE/LiOAc. Se tomaron 50 µl de la suspensión celular y se mezcló con 40 ng de plásmido, 5 µl de DNA de esperma de salmón y 300 µl de polietilenglicol/TE/LiOAc (40% polietilenglicol (PEG), 100 mM TE pH 7.5, 100 mM LiOAc pH 7.5). La mezcla se incubó durante 30 minutos a 30°C en agitación de 250 rpm, posteriormente se agregaron 40 µl de DMSO y se incubó durante 15 minutos a 42 °C. Finalmente, las células se centrifugaron y el botón se resuspendió en 100 µl de medio mínimo para plaquearse en medio mínimo suplementado con el agente de selección.

6.12 Ensayo cualitativo de la actividad de β-galactosidasa

Las levaduras transformantes se estiraron en cajas amortiguadas (pH 7.0) de SD-Ura con y sin Tm (1µg/ml) y 60 µl de Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indol-β-D-galactopiranósido, *EMD Millipore Corp*) y se incubaron a 30 °C. Después de 48 horas las placas se escanearon.

6.13 Ensayo cuantitativo de la actividad de β-galactosidasa

6.13.1 Tratamiento de muestras

Cultivos en fase exponencial se ajustaron a una OD₆₀₀ de 0.3±0.03 en un volumen de 90 ml de YPD y se incubaron a 30°C durante 1 hora. Después cada cultivo se dividió en tres grupos, uno fue el control y los otros dos se trataron con Tm 1 (µg/ml) o CaCl₂ (200 mM). Se incubaron durante 3 horas a 30°C.

6.13.2 Extracción de proteínas

Las células se centrifugaron durante 5 minutos a 2900 x g a 4°C. El botón se lavó con amortiguador Z frío (Na₂HPO₄ 60 mM, NaH₂PO₄ 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄ 1 mM), se centrifugó y posteriormente se resuspendió en 500 µl de amortiguador Z. Se agregaron 500 µl de perlas de vidrio y las muestras se sometieron a 8 pulsos de agitación (en un disruptor) de 30 segundos cada uno alternando con una incubación en hielo por 30 segundos. Por último, las muestras se centrifugaron a 1500 x g durante 2 minutos a 4°C. Se recuperó el sobrenadante y se cuantificó la concentración de proteínas con el reactivo *Pierce 660nm Protein Assay* siguiendo las instrucciones del proveedor (*Thermo Fisher Scientific*).

6.13.3 Ensayo de actividad de β-galactosidasa

Para determinar la actividad de β-galactosidasa se colocaron 100 µl del extracto de proteínas en 400 µl de amortiguador Z con β-mercaptoetanol (27µl de β-mercaptoetanol /10 ml de amortiguador Z) y se agregaron 100 µl de o-NPG (o-Nitrofenil-β-D-galactopiranosido) de una solución madre de 4 mg/ml (*Research Organics Inc*). La muestra se incubó a temperatura ambiente y se leyó a 420 nm de longitud después de que se detectara un cambio en la coloración (se anotó el tiempo en el que ocurrió el cambio).

La actividad β-galactosidasa se calculó con la siguiente fórmula:

$$Actividad = ((1000)(Abs\ 420nm)) \left(\frac{volumen\ total}{(volumen\ valorado)(\epsilon\ oNPG)(min) \left(\frac{mg}{ml} proteina \right)} \right)$$

Los valores obtenidos se normalizaron con respecto a la actividad detectada en la cepa silvestre crecida en YPD sin estrés.

6.14 Análisis de datos

Los datos obtenidos se analizaron utilizando el programa estadístico *GraphPad Prism 5*. Para determinar las diferencias entre grupos se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de comparaciones múltiples de Bonferroni. Se consideró una diferencia significativa a una p<0.01.

7. RESULTADOS

7.1 El factor de transcripción Skn7 participa en una vía paralela a la de Crz1 durante ERE inducido con Tm

Trabajos previos identificaron al factor de transcripción Skn7 como regulador de la actividad transcripcional de Crz1 en condiciones de estrés inducido con CaCl_2 (Williams & Cyert 2001) y posteriormente, se determinó que la vía Ca^{2+} /Calcineurina se encuentra activa en condiciones de ERE inducido con Tm (Bonilla *et al.*, 2002; Olivares, 2019). Con el objetivo de determinar si el factor de transcripción Skn7 participa en la vía calcineurina/Crz1, se realizaron ensayos de sensibilidad a Tm mediante diluciones seriadas en mutantes *crz1Δ*, *skn7Δ* y *crz1Δskn7Δ*. Como control se utilizaron MnCl_2 y ter-butil hidroperóxido (t-BOOH) para inducir estrés iónico y estrés oxidante respectivamente. Se ha reportado que una cepa *crz1Δ* es altamente sensible a MnCl_2 y una cepa *skn7Δ* es muy sensible al estrés oxidante. Por lo tanto, la doble mutante *crz1Δskn7Δ* debe ser sensible a ambos compuestos.

En la **Figura 10** se observa que en condiciones sin estrés el crecimiento de las cepas silvestre, *crz1Δ*, *skn7Δ* y *crz1Δskn7Δ* fue similar, sin embargo, en condiciones de ERE inducido con 1 $\mu\text{g/ml}$ de Tm las cepas *crz1Δ* y *skn7Δ* presentaron defectos en el crecimiento y la mutante *crz1Δskn7Δ* presentó una mayor deficiencia. En el medio con MnCl_2 la cepa *crz1Δ* presentó una fuerte deficiencia en el crecimiento y este efecto fué exacerbado en la doble mutante *crz1Δskn7Δ* mientras que la mutante *skn7Δ* resistió a esta sal. Como se esperaba, la mutante *skn7Δ* y la doble mutante *crz1Δskn7Δ* fueron muy sensibles al t-BOOH; sin embargo, la mutante *crz1Δ* creció de forma similar a la cepa silvestre.

Estos resultados nos sugieren que, en condiciones de ERE inducido con Tm, Skn7 participa en una vía de señalización independiente de Crz1, ya que la sensibilidad a Tm de la doble mutante parece ser la suma de las sensibilidades de las mutantes sencillas.

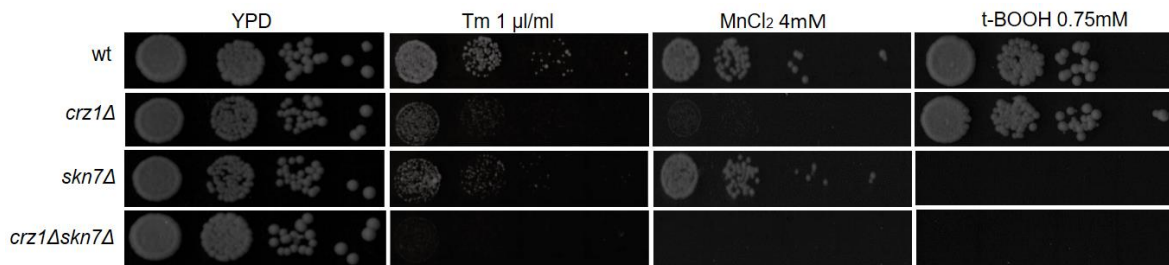


Figura 10. Sensibilidad de la cepa *crz1Δskn7Δ* al ERE inducido con Tm. Se muestra el crecimiento de cepas *crz1Δ*, *skn7Δ* y *crz1Δskn7Δ* en estrés inducido con Tm, MnCl₂ y t-BOOH. Cultivos de *S. cerevisiae* en diluciones seriadas en un factor de 10 fueron goteadas sobre medio YPD con los inductores de estrés indicados. Las cajas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas y posteriormente fueron evaluadas.

7.2 *FKS2* y *PMC1* presentan sitios de unión para el factor de transcripción Crz1, mientras que *FKS2* y *GDT1* tienen sitios de unión a Skn7

La regulación de genes involucrados en la homeostasis de Ca²⁺ por el factor de transcripción Crz1 se encuentra ampliamente documentada. *FKS2* y *PMC1* son los genes que se utilizan con mayor frecuencia en estudios que involucren la activación de la vía Ca²⁺/calcineurina (Stathopoulos & Cyert, 1997; Williams & Cyert, 2001) ya que la respuesta transcripcional de estos genes ante un estrés por Ca²⁺ incrementa significativamente. Además de estos genes, en este trabajo se decidió evaluar la respuesta transcripcional de *GDT1* porque se ha visto que éste tiene un papel importante en la homeostasis de Ca²⁺; sin embargo son pocos los reportes que existen sobre su regulación. Por otro lado, hay pocos reportes de la regulación que podría ejercer el factor de transcripción Skn7 en estrés por Ca²⁺, los genes *FKS2* y *PMC1* se han reportado como blancos de regulación para este factor. Con el objetivo de indentificar sitios de unión para los factores de transcripción Crz1 y Skn7 en genes que responden o se encuentran involucrados en la homeostasis de Ca²⁺ y probablemente en la respuesta a ERE inducido con Tm, se hizo una búsqueda en la base *Yeasttrack* de probables secuencias de unión para estos factores de transcripción en los promotores de tres genes de respuesta a la vía de Ca²⁺ *FKS2*, *PMC1* y *GDT1*. Se ha reportado que el factor de transcripción Crz1 se asocia a la secuencia concenso 5' GNGGC(G/T)CA 3'. Los sitios de union de Skn7 hasta ahora identificados son 5'GGCYGGC 3' (*Oxidative Stress Responsive Skn7 Response Elements*, Tsuzi *et al.*, 2004), 5' AGAACG TTC 3' (HSE2 por sus siglas en inglés *Heat Shock Elements 2*; Raitt *et al.*, 2002), 5'ATTTGGYTGGGCC 3' (SRE, por sus siglas en inglés *SLN1 Response Elements*, Li *et al.*, 2002), 5'GGCGAGATCT 3' (OSRE, por sus siglas en inglés *Oxidative*

Stress Response Elements 1), 5'GGCCAGA 3'(OSRE), 5'GGCCGGC 3' (OSRE3) y 5'GGCTGGC 3' (OSRE; He & Fassler, 2005). Los sitios identificados en los promotores de los genes anteriormente mencionados se describen en la **Tabla 3**.

Puede observarse que *FKS2* tiene sitios probables para ambos factores de transcripción, dos para Crz1, cada uno localizados en diferentes cadenas y uno para Skn7, este promotor, además, contiene un sitio probable de unión del factor de transcripción Hac1 que participa en la vía UPR de respuesta a estrés de RE. El promotor de *PMC1* solo parece tener tres secuencias de unión para Crz1, dos en una cadena y uno en la otra. El promotor de *GDT1* contiene solamente un probable sitio de unión a Skn7 muy cercano al inicio del ORF. Este análisis nos sugiere que de los promotores elegidos uno sería regulado por los dos factores (*FKS2*) y los otros dos solo por uno, *PMC1* por Crz1 y *GDT1* por Skn7.

Tabla 3: Sitios y secuencias de unión de los factores de transcripción Crz1p y Skn7p en los promotes de los genes *FKS2*, *PMC1* y *GDT1*. Obtenido de la base Yeasttrack.

Factor de transcripción	Secuencia consenso	Posición	Cadena
<i>FKS2</i>			
Crz1p	CACCAGTCGGTGGCTGTGCGCTTG	-763	sentido
Crz1p	CAGCCAC	-747	antisentido
Skn7p	GGCCR	-975	antisentido
<i>PMC1</i>			
Crz1p	GNGGCKCA	-540	sentido
Crz1p	GNGGCKCA	-135	antisentido
Crz1p	GGGGCTG	-411	antisentido
<i>GDT1</i>			
Skn7p	GGCCR	-16	sentido

7.3 Los genes *FKS2* y *PMC1* se sobreexpresan en respuesta a estrés inducido con Tm y Ca²⁺

Con el objetivo de determinar si los genes *FKS2*, *PMC1* y *GDT1* se expresan en respuesta a Tm y Ca²⁺, sus promotores se fusionaron al gen reportero *lacZ*. La actividad de β-galactosidasa se cuantificó en células silvestres transformadas con los plásmidos reporteros después de tratamientos con Tm o CaCl₂. Para esto se empleó un ensayo

colorimétrico, como se indica en la sección de Métodos. El efecto del Ca^{2+} en la actividad del promotor de *FKS2* ya se ha reportado (William & Cyert, 2001) por lo que no solo se utilizó como un control positivo de que el estrés se estaba induciendo correctamente, sino también para verificar el efecto de este catión sobre la vía Ca^{2+} /calcineurina y si *Skn7* también forma parte de la vía. Como puede verse en la **Figura 11**, la expresión de *FKS2* aumentó cuatro y cinco veces en respuesta a Tm y Ca^{2+} respectivamente. De la misma manera, la expresión de *PMC1* aumentó casi cuatro veces con Tm y hasta 12 veces con Ca^{2+} . La expresión de *GDT1* en cambio, no se modificó con ningún tratamiento. Esto implica que, en células silvestres, los inductores de estrés inducen la expresión de *FKS2* y *PMC1* pero no la de *GDT1*.

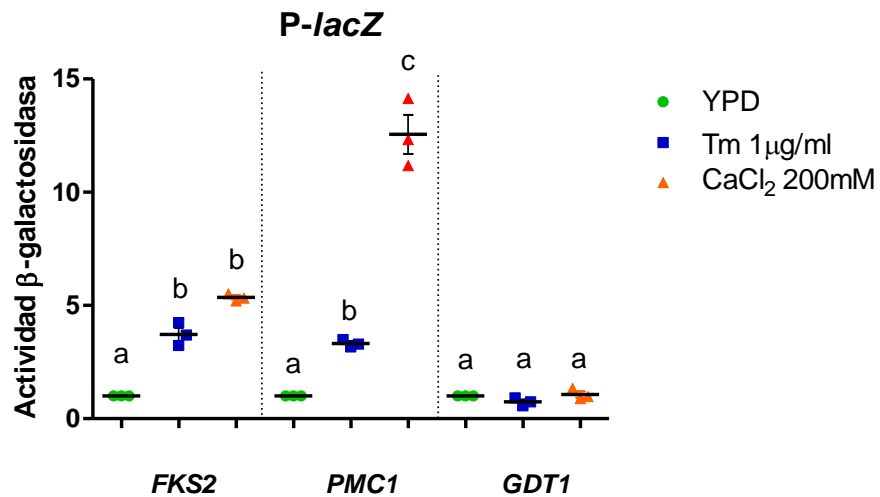


Figura 11. Los genes *FKS2* y *PMC1* se sobreexpresan en respuesta a estrés inducido con Tm y Ca^{2+} . Ensayo cuantitativo de la actividad β -galactosidasa de los genes reporteros *PFKS2-lacZ*, *PPMC1-lacZ* y *PGDT1-lacZ*. Cada uno de los puntos en la gráfica representa el valor obtenido en un ensayo independiente, las barras representan \pm SEM, n=3. $P < 0.01$. Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba Bonferroni.

7.4 La expresión de *FKS2* es dependiente de Crz1 tanto en condiciones óptimas como de estrés inducido con Tm y Ca²⁺ y Skn7 se comporta como represor

Con el objetivo de determinar cualitativa y cuantitativamente la actividad del promotor de *FKS2*, se realizaron ensayos de β -galactosidasa en condiciones de estrés con Tm. En estos ensayos, las diferencias en la actividad promotora del gen se detectan por los cambios en la coloración del parche debido a que la enzima β -galactosidasa, codificada por el gen *lacZ*, hidroliza el X-Gal y produce 5-bromo-4-cloro-3-hidroxiindol, el cual se oxida espontáneamente a 5,5'-dibromo-4,4'-dicloro que tiene un color índigo.

En la **Figura 12a** se muestra un ensayo en caja de la actividad de β -galactosidasa que presenta el gen reportero *PFKS2-lacZ*. Puede observarse que la coloración azul generada por el reportero tanto en la cepa silvestre como en las mutantes *crz1* Δ y *skn7* Δ es similar en condiciones control; sin embargo, en ERE inducido con Tm la coloración disminuyó ligeramente en la mutante *crz1* Δ . Esta disminución es más evidente cuando se determina la actividad de β -galactosidasa en un ensayo colorimétrico (**Figura 12c y d**), es decir, en estrés con Tm la actividad disminuyó aproximadamente 6 veces en la mutante *crz1* Δ comparada con la silvestre. En estrés por Ca²⁺, el comportamiento es similar, la actividad de β -galactosidasa disminuyó alrededor de 10 veces en la mutante *crz1* Δ comparada con la cepa silvestre. Estos datos indican que Crz1 es un modulador positivo de la expresión de *FKS2* en condiciones tanto óptimas como de estrés inducido tanto con Tm como con Ca²⁺. En cambio, el promotor de *FKS2* parece ser reprimido por el factor Skn7 tanto en condiciones óptimas como en presencia de los inductores de estrés (**Figura 12c y d**) ya que la actividad de β -galactosidasa incrementó en la mutante entre 1.7 y 1.8 veces en Tm y Ca²⁺ respectivamente y con respecto a la cepa silvestre. La actividad de β -galactosidasa en la doble mutante *crz1* Δ *skn7* Δ fué muy similar a la de la mutante sencilla *crz1* Δ . Esto quiere decir que el efecto negativo de Skn7 en la expresión de *FKS2* se enmascara por la falta de Crz1.

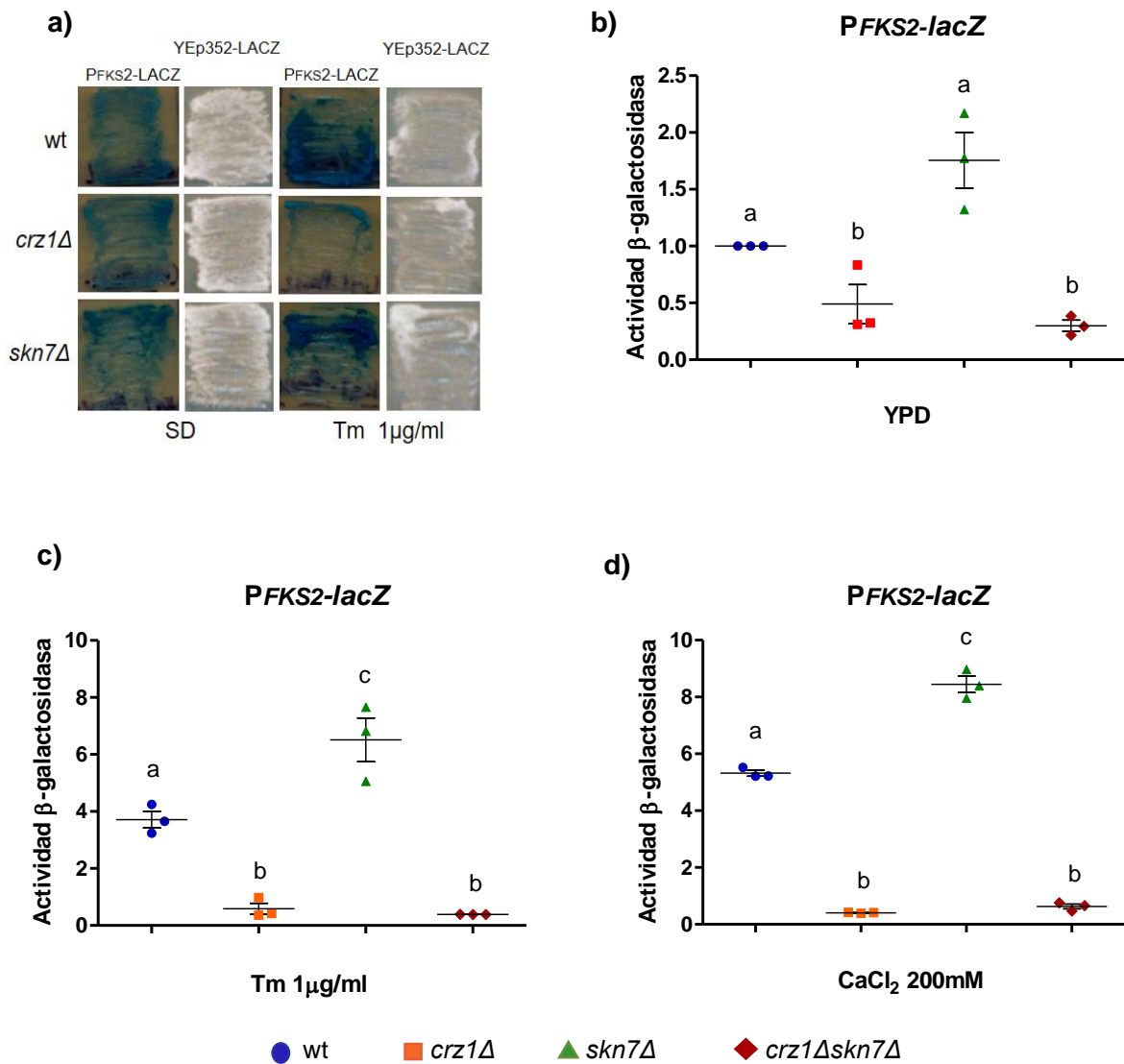


Figura 12. El gen *FKS2* es regulado por *Crz1* y *Skn7* en estrés inducido con Tm y Ca^{2+} .
a) Ensayo cualitativo de la actividad de β-galactosidasa del gen reportero *PFKS2-lacZ*. b) Ensayo cuantitativo de β-galactosidasa del gen reportero *PFKS2-lacZ* en condiciones control. c) Actividad β-galactosidasa del gen reportero *PFKS2-lacZ* durante ERE inducido con Tm. d) Actividad de β-galactosidasa del gen reportero *PFKS2-lacZ* durante estrés inducido con $CaCl_2$. Cada uno de los puntos en la gráfica representa el valor obtenido en un ensayo independiente, las barras representan \pm SEM, n=3. P<0.01. Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba Bonferroni.

7.5 La expresión de *PMC1* es dependiente de *Crz1* e independiente de *Skn7* en condiciones de estrés por Tm y Ca^{2+}

En la **Figura 13a** se muestran se muestran los mismos ensayos descritos en el apartado anterior pero ahora con el reportero del promotor de *PMC1*. Puede observarse tanto en el ensayo en placa como en el ensayo colorimétrico que la expresión de *PMC1* en condiciones de estrés (tanto Tm como Ca^{2+}) solo dependió de *Crz1* y que esta expresión fue independiente de *Skn7*. La mutante *crz1Δ* en general, mostró una actividad de β-galactosidasa alrededor de 10 veces menor a la de la cepa silvestre en presencia de Tm y Ca^{2+} (**Figura 13c y d**). Llama la atención la disminución en actividad (de unas 4 veces) que esta mutante mostró en condiciones normales (**Figura 13b**) y que en este ensayo tiene significancia estadística, pero aun así es mucho menor que la diferencia que existe cuando se compara con la cepa silvestre en presencia de los inductores de estrés. La actividad de la doble mutante *crz1Δ skn7Δ*, en Tm y Ca^{2+} fue muy similar a la de la mutante sencilla *crz1Δ* y el hecho de que en condiciones normales su actividad no haya variado con respecto a la cepa silvestre y a la mutante *skn7Δ*, sugiere que la actividad de la mutante *crz1Δ* en esta condición tendría que ser revisada. En resumen, estos datos indican que *Crz1* regula positivamente al promotor de *PMC1* en condiciones tanto óptimas como de estrés y que, como se esperaba, su transcripción en respuesta a estrés es independiente de *Skn7*.

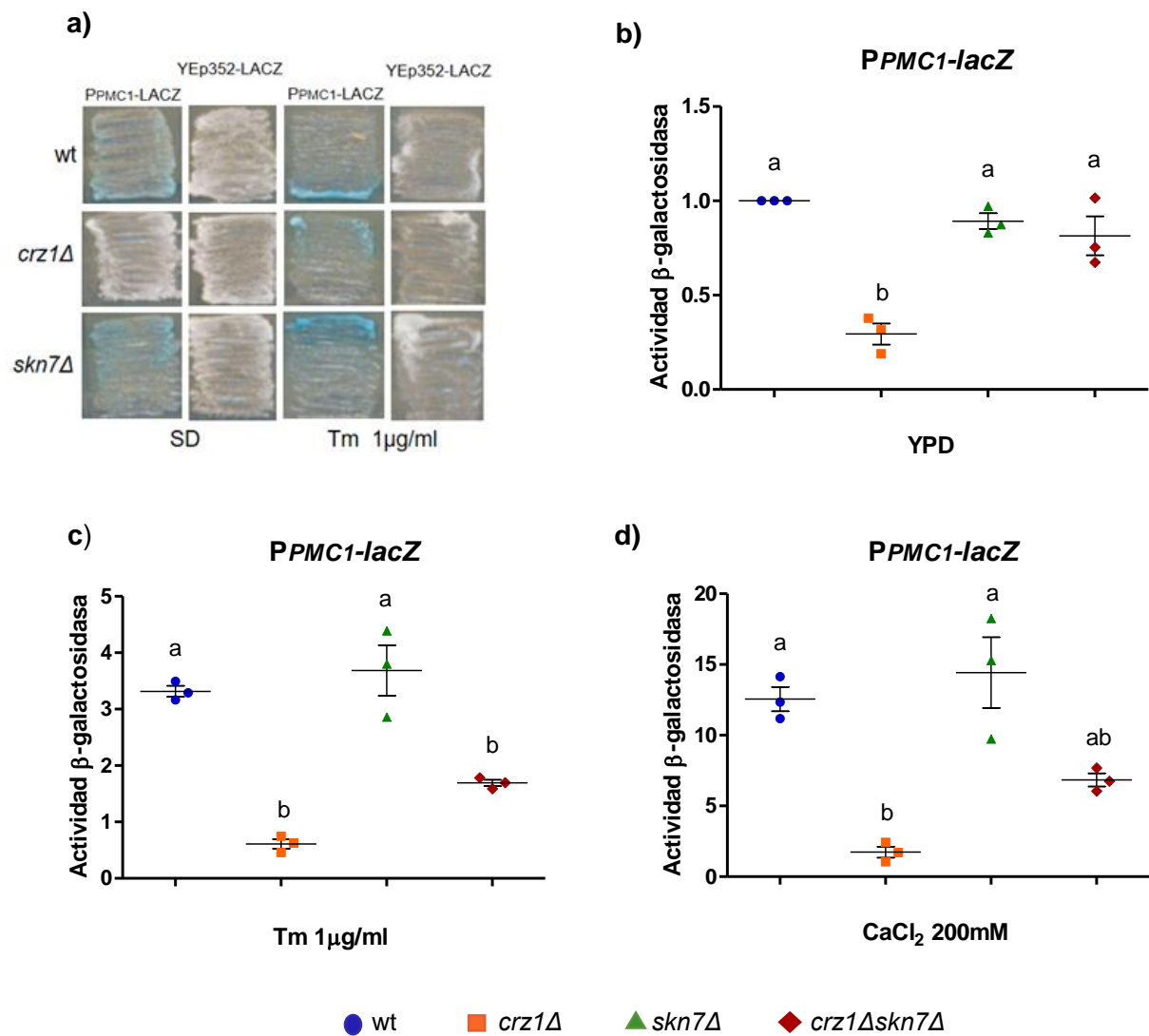


Figura 13. El factor Crz1 regula la actividad promotora del gen *PMC1* en estrés inducido con Tm y Ca²⁺. a) Ensayo cualitativo de la actividad de β-galactosidasa del gen reportero *PPMC1-lacZ*. b) Ensayo cuantitativo de la actividad de β-galactosidasa del gen reportero *PPMC1-lacZ* en condiciones control. c) Ensayo cuantitativo de la actividad β-galactosidasa en condiciones de ERE inducido con tunicamicina. d) Ensayo cuantitativo de la actividad β-galactosidasa durante estrés inducido con CaCl₂. Cada uno de los puntos en la gráfica representa el valor obtenido en un ensayo independiente, n=3. P<0.01. Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba Bonferroni.

7.6 La expresión de *GDT1* en condiciones de estrés por Tm y Ca²⁺ no depende de los factores Crz1 y Skn7

En la **Figura 14** se observa la actividad de β -galactosidasa del reportero *lacZ* fusionado con el promotor de *GDT1*. Como puede observarse tanto en el ensayo en caja (**Figura 14a**) como en el ensayo colorimétrico (**Figura 14b, c y d**), la expresión de *GDT1* no depende ni de Crz1 ni de Skn7 en condiciones de estrés inducido con Tm o con Ca²⁺. El promotor de *GDT1* mostró mayor actividad en la mutante *skn7* Δ cuando se trató con Ca²⁺. Sin embargo, los datos no mostraron significancia estadística respecto a los de la cepa silvestre. El que la expresión de este promotor no dependa de los factores transcripcionales era de esperarse, ya que los inductores de estrés no modifican la expresión del promotor en la cepa silvestre como se vió en la **Figura 11**. Llama la atención que la actividad del promotor en la mutante *crz1* Δ se haya incrementado en condiciones normales y que en este ensayo mostrase significancia estadística. Este dato tiene que ser revisado y en todo caso confirmado, ya que no se ve un incremento similar en ninguna de las condiciones de estrés.

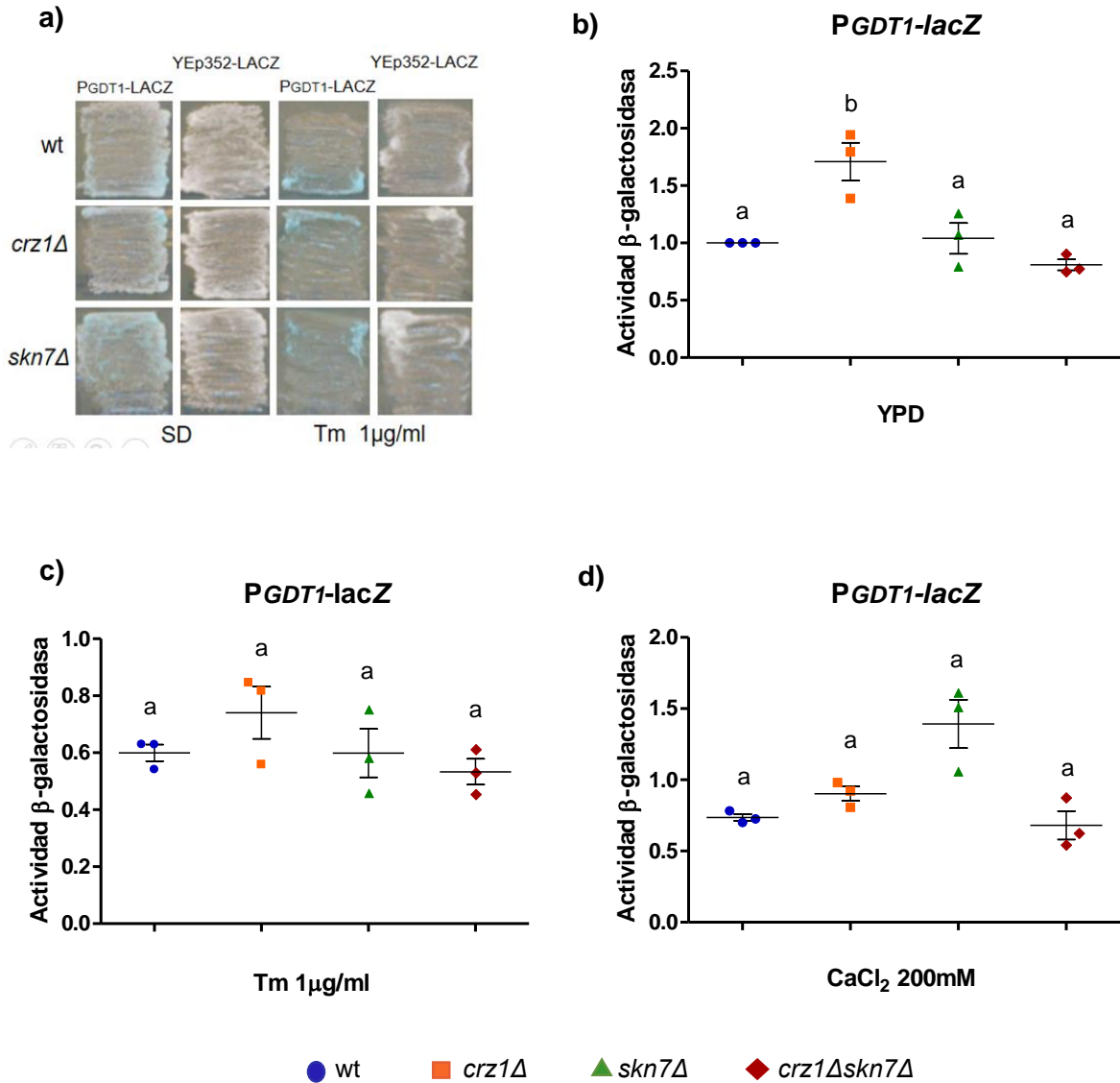


Figura 14. Los factores Crz1 y Skn7 no regulan la actividad promotora del gen GDT1 en estrés inducido con Tm y Ca²⁺. a) Ensayo cualitativo de la actividad β-galactosidasa del gen reportero *PGDT1-lacZ*. b) Ensayo cuantitativo β-galactosidasa del gen reportero *PGDT1-lacZ* en condiciones control. c) Ensayo cuantitativo de la actividad β-galactosidasa en condiciones de ERE inducido con Tm. d) Ensayo cuantitativo de la actividad β-galactosidasa durante estrés inducido con CaCl₂. Cada uno de los puntos en la gráfica representa el valor obtenido en un ensayo independiente, n=3. P<0.01. Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba Bonferroni.

7.7 La inactivación de la subunidad regulatoria de la calcineurina abate la inducción de la transcripción de los genes *FKS2* y *PMC1* en condiciones de estrés por Tm y Ca^{2+}

Con el objetivo de determinar si la expresión de los genes *FKS2* y *PMC1* en condiciones de estrés depende de la vía Ca^{2+} /calcineurina se hicieron ensayos de β -galactosidasa en una mutante de la subunidad regulatoria de la calcineurina (*cnb1* Δ) y una mutante de uno de los genes parálogos de la subunidad catalítica (*cna2* Δ , ver el apartado correspondiente en la Introducción y la **Figura 4**). La actividad transcripcional tanto del promotor de *FKS2* como del promotor de *PMC1* disminuyó significativamente en la mutante *cnb1* Δ , en ambos inductores de estrés, en promedio la actividad de los promotores bajó unas 5 veces en esta mutante (**Figura 15** paneles **b**, **c**, **e** y **f**). Este efecto no se observó en la mutante de la subunidad catalítica (*cna2* Δ). Estos datos indican que se requiere la vía de calcineurina intacta para que los promotores de *FKS2* y *PMC1* respondan al estrés impuesto por Tm y Ca^{2+} y en particular, se requiere de la subunidad regulatoria Cnb1 de la calcineurina. En cambio, la eliminación de la subunidad catalítica Cna2 no tiene ningún efecto significativo en la actividad de los promotores. Esto puede deberse en parte a que en la mutante *cna2* Δ se encuentra presente el gen parólogo *CNA1* y este podría reemplazar funcionalmente a *CNA2*.

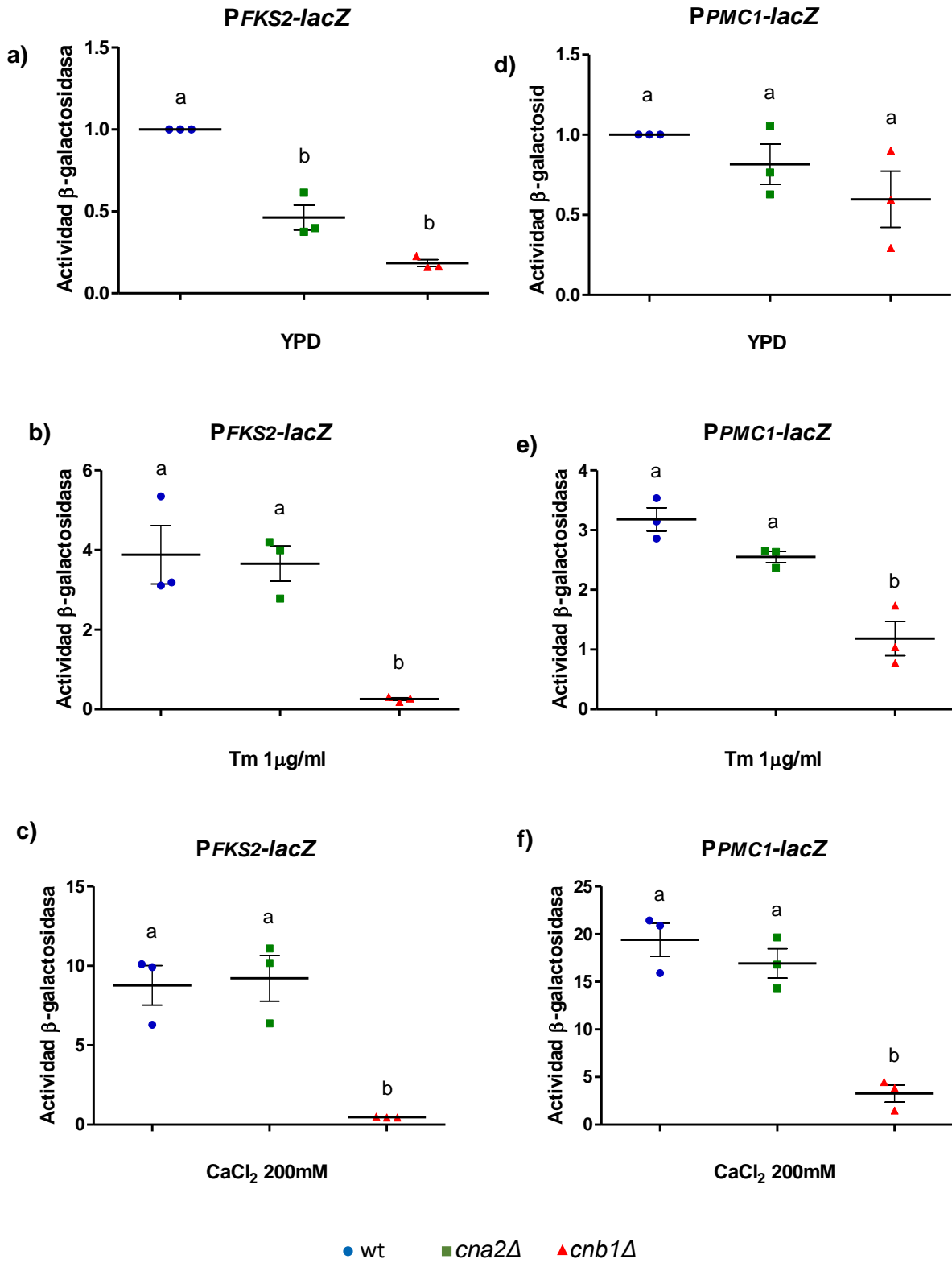


Figura 15. La subunidad Cnb1 se requiere para la inducción de *FKS2* y *PMC1* en estrés inducido con Tm y Ca²⁺. Ensayo cuantitativo de β-galactosidasa de los genes reporteros *PFKS2-lacZ*, *PPMC1-lacZ* en a) y d) condiciones control, b) y e) condiciones de

ERE inducido con Tm y c) y d) estrés con CaCl₂. Cada uno de los puntos en la gráfica representa el valor obtenido en un ensayo independiente, n=3. P<0.01. Se realizó una prueba ANOVA seguida de una prueba Bonferroni.

7.8 La vía Ca²⁺/calcineurina es independiente de la vía UPR en condiciones de estrés inducido con Tm

Finalmente, se quiso determinar por ensayos de epistasis si la vía Ca²⁺/calcineurina en respuesta a estrés inducido con Tm se encuentra relacionada con la vía UPR. Como se mencionó en la Introducción, los inductores de estrés de ER como la Tm activan la UPR, para lo cual el sensor Ire1 es indispensable. Una mutante de Ire1 es altamente sensible a concentraciones moderadas de Tm y una mutante de la subunidad reguladora de calcineurina (*cnb1Δ*) es moderadamente sensible a concentraciones altas de la droga (ver **Figura 9**). Se hizo un ensayo de crecimiento por diluciones seriadas en medios con concentraciones bajas de Tm con la intención de permitir el crecimiento tanto de la mutante *ire1Δ* como de la mutante *cnb1Δ* (**Figura 16**). Como puede observarse en este ensayo cualitativo, el crecimiento de la doble mutante *ire1Δcnb1Δ* fué apenas menor que la de la mutante sencilla *ire1Δ* en las concentraciones 0.075 y 0.1 μg/ml de Tm. En cambio, la mutante *cnb1Δ* creció mucho más que las otras dos mutantes y solo mostró sensibilidad moderada a la concentración más alta de Tm. Para confirmar o corregir esta observación, se hicieron ensayos de crecimiento en las mismas condiciones en cultivos líquidos y determinando la densidad óptica continuamente durante 24 horas. Como puede verse en la **Figura 17**, con este ensayo es claro que hay una diferencia en el crecimiento entre las dos mutantes sencillas y la doble mutante *ire1Δcnb1Δ*. Esto se aprecia claramente al ver la pendiente de la curva ajustada por regresión lineal tanto en las gráficas (**Figura 17** paneles **d**, **f** y **h**) como en el histograma (**Figura 17** panel **i**) donde se grafican las diferencias relativas de las pendientes normalizadas con la pendiente de la cepa silvestre en cada una de las condiciones. En resumen, los datos aquí presentados indican que las vías de Ca²⁺/calcineurina y de la UPR no son epistáticas y se requiere de ambas vías para un crecimiento óptimo de las células en condiciones de estrés inducido con Tm.

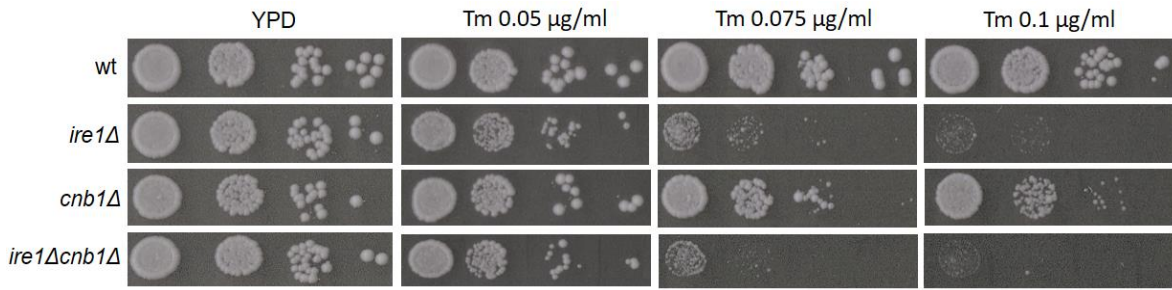
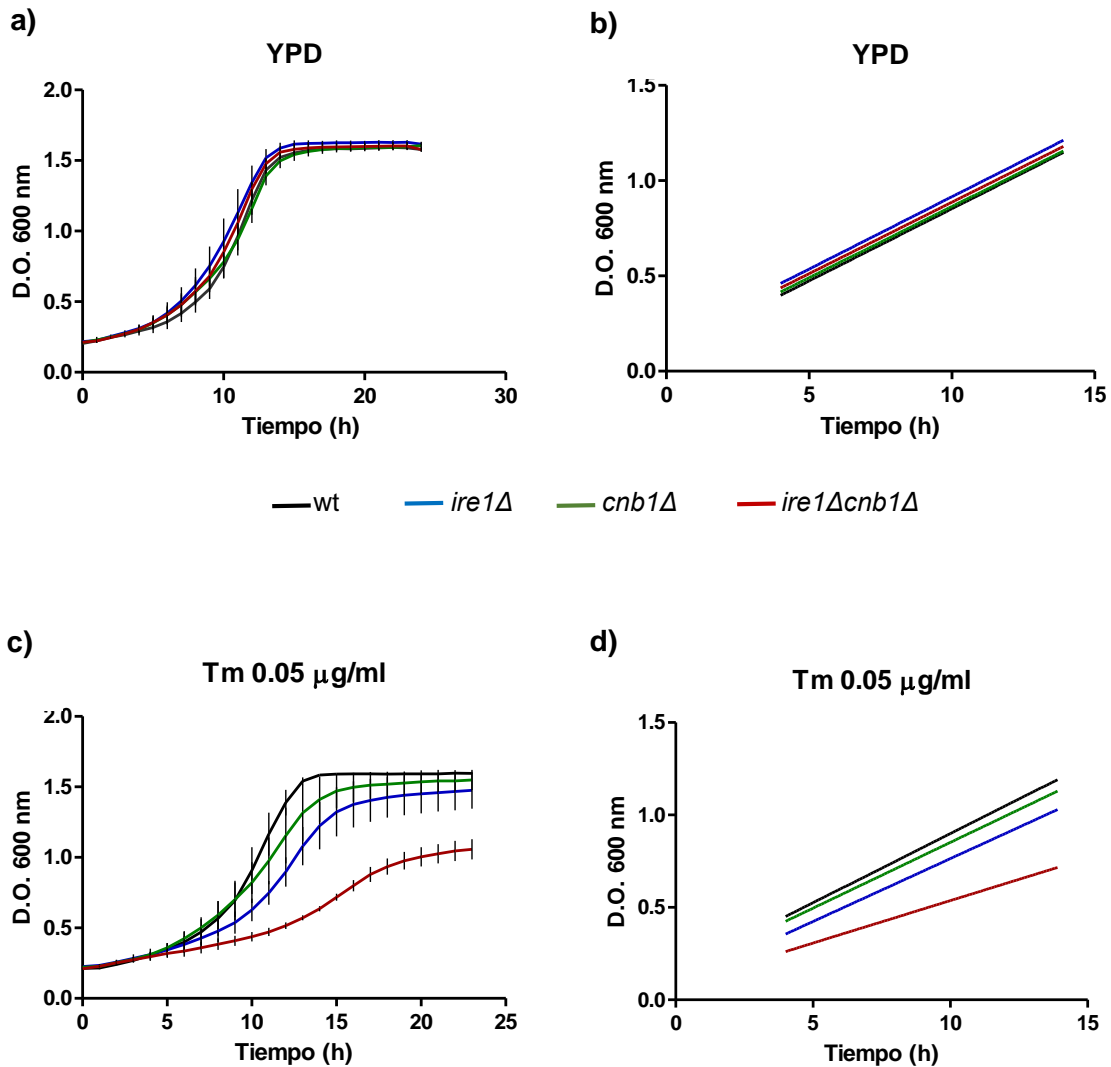
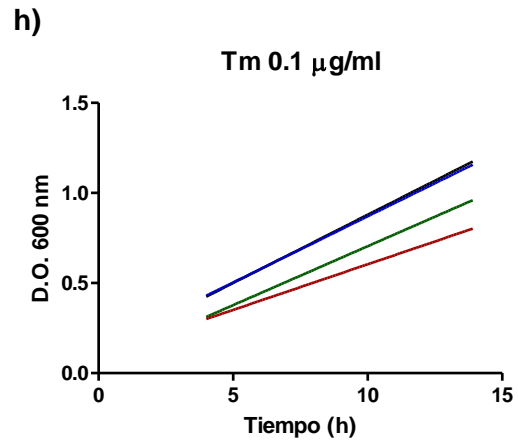
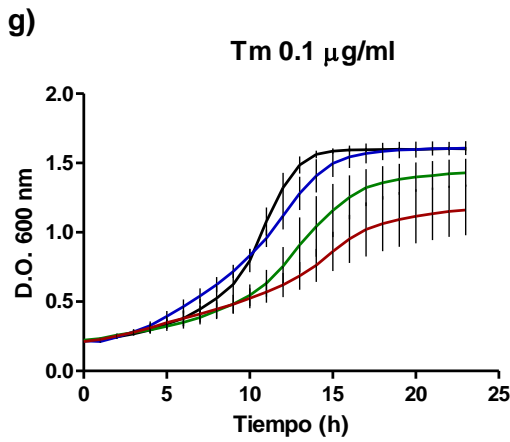
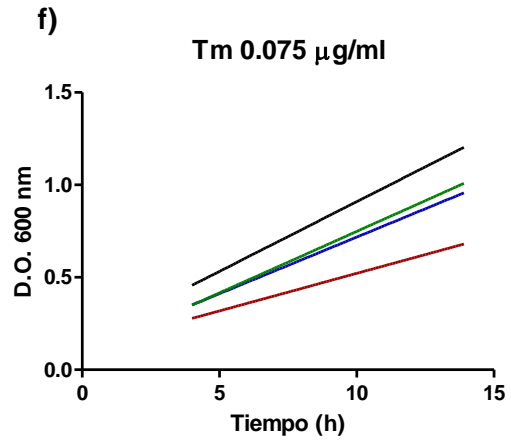
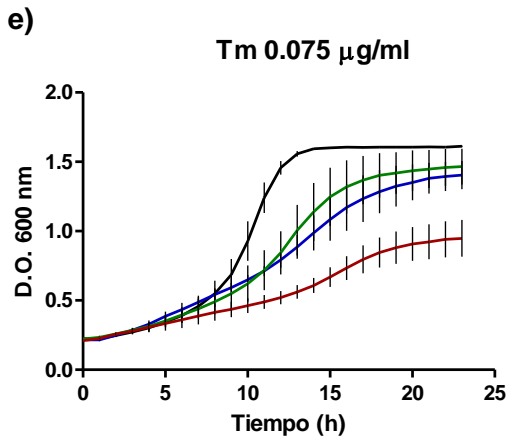


Figura 16. Las mutantes *ire1Δ* y *ire1Δcnb1Δ* son muy sensibles a estrés inducido con Tm. Se muestra el crecimiento de cepas wt, *ire1Δ*, *cnb1Δ* y *ire1Δcnb1Δ*. Cultivos de *S. cerevisiae* en diluciones seriadas en un factor de 10 fueron goteadas sobre medio YPD sólido con Tm a distintas concentraciones. Las cajas fueron incubadas a 30 °C durante 48 horas y posteriormente fueron evaluadas.





— wt — *ire1* Δ — *cnb1* Δ — *ire1* Δ *cnb1* Δ

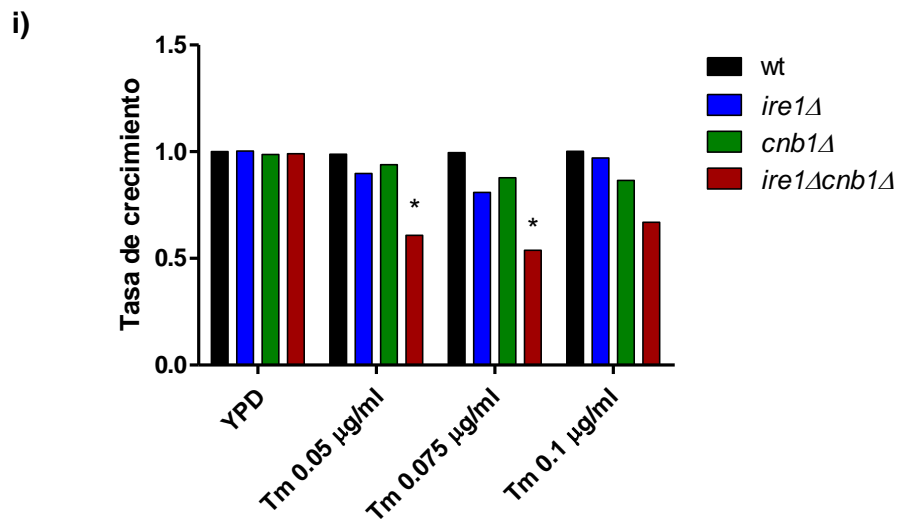


Figura 17. Tasas de crecimiento de la cepa silvestre wt y las mutantes *ire1Δ*, *cnb1Δ* e *ire1Δcnb1Δ* en estrés inducido con Tm a diferentes concentraciones. En a) y b) se representa la curva de crecimiento en condiciones control y la tasa de crecimiento respectivamente; c) y d) muestran la curva de crecimiento en ERE con Tm a 0.05 $\mu\text{g/ml}$ y su tasa de crecimiento; e) y f) muestran la curva de crecimiento y la tasa de crecimiento en ERE con Tm a 0.075 $\mu\text{g/ml}$; g) y h) muestra la curva de crecimiento y la tasa de crecimiento en ERE con Tm a 0.1 $\mu\text{g/ml}$; en i) se representa la tasa de crecimiento de las 4 cepas en las distintas concentraciones de Tm utilizadas para inducir ERE, cada barra representa el valor obtenido de la pendiente de la curva de crecimiento en fase exponencial (4-14 horas) normalizada con respecto a la wt en condiciones control. n=3, p<0.01, * vs wt, *ire1Δ* y *cnb1Δ*.

8. DISCUSIÓN

Los factores de transcripción Skn7 y Crz1 se requieren para generar una respuesta óptima al estrés inducido por Tm y por Ca^{2+} pero no son epistáticos

El análisis fenotípico de las mutantes sencillas *skn7Δ* y *crz1Δ* así como el de la doble mutante *skn7Δcrz1Δ* nos indica que ambos factores participan en la respuesta al estrés que genera el antibiótico Tm. En varios estudios anteriores se había demostrado que el factor transcripcional Crz1 es el elemento que dispara la respuesta transcripcional cuando la célula es sometida a una alta concentración de Ca^{2+} externo (Stathopoulos & Cyert, 1997; Williams & Cyert, 2001; Olivares, 2017). De la misma manera, en nuestro grupo de trabajo, se encontró que tanto Skn7 como Crz1 participan en la respuesta a la Tm (Olivares, 2019). Continuando con el estudio de este fenómeno, en este trabajo se demostró que el papel que juegan estos factores no es epistático para la respuesta a Tm y que probablemente participan en vías diferentes y acaso paralelas. Esta observación es consistente con los fenotipos que muestran las dobles mutantes carentes de Skn7 y de una de las subunidades catalíticas de la calcineurina o de la subunidad regulatoria, es decir, mutantes *skn7Δcna2Δ* o *skn7Δcnb1Δ*. La sensibilidad a Tm de estas mutantes es mayor a las que presentan las mutantes sencillas (ver sección de Antecedentes). Estas observaciones y los datos aquí encontrados, nos llevan a concluir que la eliminación de la vía Skn7 y de la vía calmodulina a nivel de la calcineurina o de Crz1 generan un efecto aditivo en la sensibilidad a Tm y que para responder a este antibiótico se activan independientemente una vía cuyo efector es Skn7 y la vía de la calcineurina cuyo efector es Crz1.

Crz1 induce la expresión de *FKS2*, en tanto que Skn7 la reprime

El glucano es uno de los componentes de la pared celular de *S. cerevisiae*. Está constituido principalmente de 1,3-β-glucano, el cual es sintetizado por la 1,3-β-glucano sintetasa. La subunidad catalítica de esta enzima está codificada por dos genes parálogos: *FKS1* y *FKS2* (Mazur *et al.*, 1995; Jhonson & Edlind, 2012). La expresión de *FKS1* predomina durante el crecimiento en condiciones óptimas, en cambio, la expresión de *FKS2* se induce en diferentes condiciones incluyendo el tratamiento con feromonas de apareamiento, con altas concentraciones de Ca^{2+} , en medios con fuentes de carbono pobres o en mutantes del gen parólogo *fks1Δ* (García-Rodríguez *et al.*, 2000; Mazur *et al.*, 1995). Se ha reportado que la expresión de *FKS2* bajo estas condiciones depende de la vía de la calcineurina (Mazur *et al.*, 1995). El análisis del promotor del gen *FKS2* reveló que tiene probables sitios de unión tanto para Crz1 como para Skn7 por lo que se esperaba que fuera regulado por ambos factores. La regulación dependiente de Crz1 de este promotor ya se observó experimentalmente, pero solamente en una condición de estrés inducido con Ca^{2+} (Williams & Cyert, 2001). Hasta ahora no se había estudiado el efecto de Crz1 sobre el promotor de *FKS2* en estrés inducido con Tm. Igualmente el papel de Skn7 en la regulación de este promotor en la respuesta a estrés por Ca^{2+} se reportó hace unos años en un solo trabajo (Williams & Cyert, 2002) en el cual se describe que Skn7 regula positivamente a *FKS2* en estas condiciones. En este trabajo se encontró que, en condiciones de estrés inducido con Tm, Crz1 genera un incremento en la transcripción de *FKS2*, de la misma manera como lo hace en respuesta a estrés por Ca^{2+} y que la actividad de este factor en ambas condiciones depende de la vía de Ca^{2+} /calcineurina. También se encontró que el promotor de *FKS2* es dependiente de Skn7 tanto en Tm como en Ca^{2+} , pero se comporta como un regulador negativo de la expresión. Esto contradice el reporte de Williams & Cyert (2001) el cual describe el efecto inductor de Skn7 sobre el promotor de *FKS2* en respuesta a estrés por Ca^{2+} . Aunque no podemos explicar la causa de la discrepancia, una posibilidad es que en el trabajo de Williams & Cyert se haya usado una versión del promotor mínimo que pierde elementos de regulación importantes. En este trabajo se empleó como promotor un fragmento que abarca 1000 nucleótidos corriente arriba del ORF que en nuestra opinión se comportaría más apegado a la actividad del promotor en su *locus* natural. Nuestros datos además se apoyan en dos observaciones importantes. Una es que, durante estrés por cadmio, ya se ha visto un efecto represor de Skn7 sobre algunos promotores de genes de respuesta a estrés oxidante y estrés térmico (Vido *et al.*, 2000) y la otra es que Skn7 se ha identificado como reclutador del complejo represor Tup1/Ssn6. Este complejo reprime la

expresión de varios genes que participan en la respuesta a estrés por sales, a estrés oxidante y en procesos de crecimiento pseudohifal (Hanlon *et al.*, 2011). Una perspectiva de este trabajo es el de disectar de manera detallada la región promotora de *FKS2* y definir si contiene elementos positivos y/o negativos de regulación dependientes de Skn7. Es importante recalcar que el efecto represor de Skn7 sobre el promotor de *FKS2* en respuesta a Tm y Ca^{2+} solo se observa cuando Crz1 está presente. Esta dependencia podría explicarse ya sea porque Skn7 no se une al DNA directamente, pero si a Crz1 y de esta manera forma el complejo represor, o bien, la unión de Skn7 al DNA depende de Crz1. La interacción física entre Skn7 y Crz1 ya se ha demostrado y la codependencia entre los dos factores para regular *FKS2* también se ha sugerido (Williams & Cyert, 2001).

La regulación de *PMC1* en estrés inducido con Tm y Ca^{2+} depende de Crz1, pero no de Skn7

El gen *PMC1* codifica para una ATPasa dependiente de Ca^{2+} que se encuentra en la membrana plasmática. Ya se ha reportado que *PMC1* es blanco del factor de transcripción Crz1 en condiciones que alteran la homeostasis de Ca^{2+} (Stathooulos & Cyert, 1997). Nuestros experimentos son los primeros en demostrar que un ERE inducido con Tm también incrementa la transcripción de *PMC1*. La expresión de *PMC1* depende de Crz1 tanto en estrés inducido con Ca^{2+} como en estrés inducido con Tm y requiere de la vía de la calcineurina, ya que la interrupción de esta vía al nivel de la subunidad regulatoria de la calcineurina abate la transcripción dependiente de Crz1. Como era de esperarse por el análisis *in silico*, la expresión de *PMC1* es independiente de Skn7 en ambos tipos de estrés. Nuevamente esta observación contradice el reporte de Williams & Cyert (2001). En este se menciona que Skn7 es un regulador positivo de *PMC1* en estrés por Ca^{2+} . De un análisis cuidadoso de los datos de ese artículo no se puede desprender esa conclusión ya que los autores no determinaron significancia estadística entre las diferencias de actividad del promotor de la mutante *skn7Δ* y de la cepa silvestre y no se observan diferencias de actividad en presencia y ausencia de Ca^{2+} . Finalmente, ya que la transcripción de *PMC1* no se abate completamente (como sí ocurre con *FKS2*) en la mutante *cnb1Δ* y en la doble mutante *crz1Δskn7Δ* es probable que factores independientes de la vía Ca^{2+} /calcineurina regulen la expresión de *PMC1* en condiciones de estrés.

GDT1 no es un gen que se regule por estrés inducido con Tm y Ca²⁺

El gen *GDT1* codifica para un intercambiador H⁺/Ca²⁺ localizado en aparato de Golgi. Se ha visto que, en presencia de concentraciones altas de Ca²⁺ extracelular, Gdt1 se requiere para que la N- y la O-glicosilación de proteínas se realice de manera adecuada (Demaegd *et al.*, 2013; Potelle *et al.*, 2016). Además, Gdt1 juega un papel importante en la homeostasis de calcio ya que regula su almacenamiento en Golgi ante un choque osmótico y cuando Pmr1 está ausente (Colinet, 2016). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la expresión de *GDT1* no cambia ni en condiciones de ERE ni estrés por Ca²⁺. A pesar de que Crz1 tiene un papel esencial en la regulación de la homeostasis de Ca²⁺ no participa en el control de la expresión de *GDT1*, lo cual es inesperado. Finalmente, Skn7 tampoco controla la expresión de *GDT1* a pesar de tener un probable sitio de unión en su promotor como lo mostró el análisis *in silico*.

La activación de la vía Ca²⁺/calcineurina no depende de la UPR inducida por Tm

Se ha observado que los inhibidores de la N-glicosilación incluyendo a la Tm inducen la entrada de Ca²⁺ a la célula de manera independiente de los canales Cch1/Mid1 (Bonilla *et al.*, 2002). Debido a esto, se incrementa la concentración de Ca²⁺ en el citoplasma lo cual activa a la vía de la calcineurina (Bonilla *et al.*, 2002; Olivares, 2019). Esto sugiere que la vía Ca²⁺/calcineurina es epistática a una condición de ERE inducido con inhibidores de la N-glicosilación. Con el objetivo de determinar si la vía Ca²⁺/Calcineurina depende de la inducción de la UPR se evaluó la sensibilidad a Tm de mutantes carentes de la UPR (mutante *ire1Δ*), de la vía de calcio (mutante *cnb1Δ*) o de ambas (mutante *ire1Δcnb1Δ*). Nuestras observaciones están de acuerdo con las de Bonilla *et al.* (2002), es decir, la activación de la vía Ca²⁺/calcineurina no depende de la activación de la UPR. Esto sugiere que el estrés que generan los agentes que inhiben la N-glicosilación por un lado inducen la activación de la UPR dependiente de Ire1 y por otro lado inducen la acumulación de Ca²⁺ en el citoplasma que activa la vía Ca²⁺/calcineurina. Finalmente es probable que la acumulación de Ca²⁺ promueva dos eventos independientes, uno regulado por Crz1 y el otro regulado por Skn7.

9. CONCLUSIONES

- Los factores de transcripción Crz1 y Skn7 participan en la respuesta a ERE inducido con Tm por vías independientes.
- El gen *FKS2* es regulado positivamente por Crz1 en condiciones de ERE inducido con Tm y estrés por CaCl_2 , Skn7 reprime su expresión.
- El gen *PMC1* es regulado por Crz1 durante ERE inducido con Tm y estrés por CaCl_2 .
- El gen *GDT1* no participa en la respuesta a ERE inducido con Tm ni estrés inducido con CaCl_2 .
- La subunidad reguladora Cnb1 de la calcineurina es indispensable en la activación de los genes *FKS2* y *PMC1* en ERE inducido con Tm.
- La ausencia de la subunidad catalítica Cna2 no afecta la expresión de los genes *FKS2* y *PMC1* en ERE y estrés por CaCl_2 .
- La vía Ca^{2+} /Calcineurina es independiente de la UPR durante un estrés inducido con Tm.

10. PERSPECTIVAS

- Disectar el promotor de *FKS2* y determinar su mecanismo de regulación dependiente de Skn7.
- Definir si la regulación del promotor *FKS2* depende de la unión directa de Skn7 o está mediada por Crz1.
- Determinar el transcriptoma dependiente de los factores Crz1 y Skn7 en condiciones de estrés inducido con Tm y de estrés por Ca^{2+} .
- Determinar si el incremento de Ca^{2+} citosólico induce la actividad transcripcional de Skn7.
- Definir los elementos epistáticos a Skn7 de la vía de respuesta a Ca^{2+} .
- Determinar los dominios de Skn7 necesarios para su activación directa o indirecta por el incremento de Ca^{2+} .

11. REFERENCIAS

- Aebi M, Bernascony R & Molinari M. 2010. N-Glycan structures: recognition and processing in the ER. *Trends Biochem Sci.* Vol 35 (2): 74-82.
- Alberts, A, Bouquin N, Johnston L & Treisman R. 1998. Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem.* 273 (15):8616–8622.
- Anglister J, Grzesik S, Wang A, Ren H., Klee C. & Bax A. 1994. ¹H, ¹³C, ¹⁵N nuclear magnetic resonance backbone assignments and secondary structure of human calcineurin B. *Biochemistry.* 33(12):3540-3547.
- Audrey B, Zaffino M, Muller C, Foulquier F, Houdou M, Schultz C, Bost F, De Fay E, Mazerbourg S & Flament S. 2018. Protein N-glycosylation alteration and glycolysis inhibition both contribute to the antiproliferative action of 2-deoxyglucose in breast cancer cell. *Breast Cancer Res Treat.* 171(3): 581-591.
- Aragón T, van Anken E, Pincus D, Serafimova I, Korenykh A, & Rubio C. 2009. mRNA targeting to ER stress signaling sites. *Nature.* 457 (7230): 736-740.
- Ariño J, Velazquez D & Casamayor A. 2019. Ser/Thr protein phosphatases in fungi: structure, regulation and function. *Microbial Cell.* 6(5).217-256.
- Batiza A, Schultz & Masson P. 1996. Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J Biol Chem.* 271(38). 23357-23362.
- Berner N, Reutter K & Wolf D. 2018. Protein quality control of the endoplasmic reticulum and ubiquitin-proteasome-triggered degradation of aberrant proteins: Yeast pioneers the path. *Annu Rev Biochem.* 87:751-782.
- Bonilla M, Nastase N & Cunningham K. 2002. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* 21 (10):2343-2353.
- Bouquin N, Johnson A, Morgan B & Johnston B. 1999. Association of the cell cycle transcription factor Mbp1 with the Skn7 response regulator in budding yeast. *Mol Biol Cell* 10(10):3389–3400.

Boustany L. & Cyert, M. 2002. Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site. *Genes Dev.* 16(5):608-619.

Braakman I & Hebert D. 2013. Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 5(5).17.

Brown J, Bussey H & Stewart R. 1994. Yeast Skn7 function in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* 13(21): 5186-5194.

Brown J, North S & Bussey H. 1993. *SKN7*, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall β -glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J Bacteriol.* 175 (21): 6908-6915.

Bub C. 2017. Dithiothreitol treatment of red blood cells. *Immunohematology.* 33(4): 170-172.

Chakraborty R, Baek J, Bae E, Kim W, Lee S & Kim M. 2016. Comparison and contrast of plant, yeast and mammalian stress and UPR. *Appl Biol Chem.* 59 (3):337-347.

Chen Y, Feldman D, Deng C, Brown J, De Giacomo A, Gaw A, Shi G, Le Q, Brown J & Koong A. 2005. Identification of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways that confers resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cancer Res.* 3 (12): 669-677.

Chen Y, Kozubowski L, Cárdenas M & Heitman J. 2010. On the roles of Calcineurin in fungal growth and pathogenesis. *Curr Fungal Infects Rep.* 4(4). 244-255.

Colinet A, Sengottaiyan P, Deschamps A, Colsoul M, Thines L, Demaegd D, Duchene M, Foulquier F, Hols P & Morsomme P. 2016. Yeast Gdt1 is a Golgi-localized calcium transporter required for stress-induced calcium signaling and protein glycosylation. *Scientific Reports.* 6(24282): 1-11.

Cox J & Walter P. 1996. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell.* 87(3):391-404.

Credle J, Finer-Moore J, Papa F, Stroud R & Walter P. 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102 (52): 18773-18764.

Cunningham K. 2011. Acidic calcium stores of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Calcium*. 50 (2): 129-138.

Cunningham K & Fink G. 1994. Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca^{2+} ATPases. *J Cell Biol*. 124(3): 351-363.

Cyert M. 2001. Genetic Analysis of Calmodulin and its targets in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*. 35: 647-672.

Cyert M & Philpott C. 2013. Regulation of cation balance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 193(3): 677-713.

Cyert M. 2003. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun*. Vol 311(4): 1143-1150.

Demaged D, Foulquier F, Colinet A, Gremillon L, Legrand D, Mariot P, Peiter E, Van Schaftingen E, Matthijs G. & Morsomme P. 2013. Newly characterized golgi-localized family of proteins is involved in calcium and pH homeostasis in yeast and human cells. *Proc Natl Acad Sci*. 110 (17): 6859-6864.

Denis V & Cyert M. 2002. Internal Ca^{2+} release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J Cell Biol*. 156 (1). 29-34.

Dudgeon D, Zhang N, Ositelu O, Kim H & Cunningham K. 2008. Non apoptotic death of *Saccharomyces cerevisiae* cells that is stimulated by Hsp90 and inhibited by calcineurin and Cmk2 in response to endoplasmic reticulum stresses. *Eukaryot Cell*. 7(12): 2037-2051.

Dunn T, Gable K & Beeler T. 1994. Regulation of cellular Ca^{2+} by yeast vacuoles. *J Biol Chem*. 269 (10):7273-7278.

Dürr G, Strayle J, Plemper R, Elbs S, Klee S, Catty P, Wolf D & Rudolph H. 1998. The medial-Golgi ion pump Pmr1 supplies the yeast secretory pathway with Ca^{2+} and Mn^{2+} required for glycosylation, sorting, and endoplasmic reticulum-associated protein degradation. *Mol Biol cell*. 9 (5):1149-62

English & Voeltz G. 2013. Endoplasmic reticulum structure and interconnections with other organelles. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 5(4).

Esko J, Bertozzi C & Schannar R. 2017. Chemical tools for inhibiting glycosylation. In Essentials of Glycobiology. Varki A. Cummings R & Esko, J. editors. 3rd. Edition. Cold Spring Harbor. New York.

Espeso E. 2016. The CRaZy calcium cycle. Adv Exp Med Biol. 892: 169-186.

Estojak J, Brent R & Golemis E. 1995. Correlation of two-hybrid affinity data with in vitro measurements. Mol Cell. 15(10): 5820-5829.

Garcia-Rodriguez L, Trilla J, Valdivieso C, Duran A & Roncero A. 2000. Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Letter. 478 (1-2): 84-88.

Garrett-Engle P, Moilanen B & Cyert M. 1995. Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin dependent protein-Phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H⁺-ATPase. Mol Cell Biol. 15(8): 4103-4114.

Goldman A, Roy J, Bodenmiller B, Wanka S, Landry C, Aebersold R & Cyert M. 2014. The calcineurin signaling network evolves via conserved kinase-phosphatase modules that transcend substrate identity. Mol Cell. 55(3).422-435.

Goldstein A & McCusker J. 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 15(14):1541-1553.

Hanlon S, Rizzo J, Tatomer D, Lieb J & Buck M. 2011. The Stress Response Factor Yap6, Cin5, Phd1, and Skn7 direct targeting of the conserved Co-Repressor Tup1-Ssn6 in *S. cerevisiae*. PLoS ONE. 6(4).

Hartley A, Bogaerts S & Garrett A. 1996. cAMP inhibits bud growth in a yeast strain compromised for Ca²⁺ influx into the Golgi. Mol Gen Genet. 251(5):556-564.

He J & Fassler J. 2005. Identification of novel Yap1p and Skn7p binding sites involved in the oxidative stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Microbiol. 58(5):1454-1467.

He X, Mulford K & Fassler J. 2009. Oxidative Stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. Eukaryotic Cell. Vol 8 (5): 768-778.

Hernández-Elvira M, Torres-Quiroz F, Escamilla Ayala A, Dominguez-Martin E, Escalante R, Kawasaki L, Ongay Larios L. & Coria R. 2018. The unfolded Protein response pathway in the yeast *Kluyveromyces lactis*. A comparative view among yeast species. *Cell*. 7 (8):106.

Hemming F.1985. Glycosyl phsphopolyprenols. *New Comprehensive Biochemistry*. 261-305.

Hill J, Myers A, Koerner T & Tzagoloff A. 1986. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*. 2(3):163-167.

Iida H, Sakaguchi S, Yagawa Y & Anraku Y. 1990. Cell cycle control by Ca²⁺ in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 265(34): 21216-21222.

Jhonson E & Edlind T. 2012. Topological and mutational analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Fks1. *Eukaryotic Cell*. 11(7):952-960.

Kadafar K, Zhu H, Snyder M & Cyert M. 2003. Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homologs of casein Kinase I. *Genes & Development*. 17(21): 2698-2708.

Ketela T, Brown J, Stewart R & Busset H. 1998. Yeast Skn7p activity is modulated by the Sln1p-Ypd1p osmosensor and contributes to regulation to the HOG pathway. *Mol Gen Genet*. 259 (4):372-378.

Kingsbury T & Cunningham K. 2000. A conserved family of calcineurin regulators. *Genes Dev*. 14 (13):1595-1604.

Kissinger C, Parge H, Knighton D, Lewis C, Pelletier L, Tempczyk A, Kalish V, Tucker K, Showalter R & Moomaw E. 1995. Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature*. 378 (6557):641-644

Li S, Dean S, Li Z, Horecka J, Deschenes R & Fassler J. 2002. The eukaryotic two-component histidine kinase Sln1p regulates OCH1 via the transcription factor Skn7p. *Mol. Biol. Cell*. 13 (2): 412-424.

Lorenz M & Heitman J. 1998. Regulators of pseudohyphal differentiation in *Saccharomyces cerevisiae* identified through multicopy suppressor analysis in ammonium permease mutant strain. *Genetics*. 150 (4) 1441-1457.

Loukin S & Kung C. 1995. Manganese effectively supports yeast cell-cycle progression in place of calcium. *J Cell Biol*. 131(4):1025-1037.

- Lu J, Deschenes R & Fassler J. 2004. Role for the Ran binding protein, Mog1p, in *Saccharomyces cerevisiae* SLN1-SKN7 signal transduction, *Eukaryot Cell*. 3(6):1544-1556.
- Matheos D, Kingsbury T, Ahsan U & Cunningham K. 1997. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 11 (24):3445-3458.
- Mazur P, Morin N, Baginsky W, El-Sherbeini M, Clemas J, Nielsen J & Foor F. 1995. Differential Expression and Function of Two Homologous Subunits of Yeast 1,3- β -D-Glucano Synthase. *Mol Cell Biol*. 15 (10): 5671-5681.
- Mehta S, Li H, Hogan P & Cunningham K. 2009. Domain architecture of the regulators of calcineurin (RCANs) and identification of a divergent RCAN in yeast. *Mol Cell Biol*. 29 (10): 2777-2793.
- Mere E, Trajano J & Flosi V. 2003. Expression of the yeast Calcineurin subunits CNA1 and CNA2 during growth and hyper.osmotic stress. *FEMS Microbiol Lett*. 221(2):197-202
- Morgan B, Banks G, Toone W, Raitt D, Kuge S & Johnston L. 1997. The Skn7 response regulator controls gene expression in the oxidative stress response of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 16(5):1035–1044.
- Morgan B, Bouquin N, Merrill G & Johnston L. 1995. A yeast transcription factor bypassing the requirement for SBF and DSC1/MBF in budding yeast has homology to bacterial signal transduction proteins. *EMBO J*. 14(22):5679–5689.
- Mori K, Ogawa N, Kawahara T, Yanagi H y Yura T. 2000. mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proc Natl Acad Sci USA*. 97 (9):4660-4665.
- Muller E, Locke E & Cunningham K. 2001. Differential regulation of two Ca²⁺ influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 159(4):1527-1538.
- Mulford K & Fassler J. 2011. Association of the Skn7 and Yap1 transcription factors in the *Saccharomyces cervisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell*. 10(6): 761-769.
- Muller E, Macking N, Erdman S & Cunningham K. 2003. Fig1p facilitates Ca²⁺ influx and cell fision during matting of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 278(40): 38461-38469.

Olivares A. 2017. Papel de los reguladores de respuesta del sistema de fosforrelievo de levaduras en la respuesta a estrés de retículo endoplásmico. Tesis para obtener el grado de licenciado en investigación biomédica básica. UNAM. Cd. De México.

Olivares A. 2019. Participación de la vía de calcio intracelular durante el estrés de retículo endoplásmico en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis para obtener el grado de maestro en ciencias. UNAM. Cd. de México.

Polizotto R & Cyert M. 2001. Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J Cell Biol.* 154(5):951-960.

Popa C, Dumitri I, Ruta L, Danet A & Farcasanu I. 2010. Exogenous oxidative stress induces Ca²⁺ release in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 277(19). 4027-4038.

Potelle A, Morelle W, Dulary E, Duvet S, Vicogne Dm Spriet C, Krzewinski-Recchi M, Morsomme P, Jaeken J, Matthijs G, De Bettignies G & Foulquier F. 2016. Glycosylation abnormalities in Gdt1/TMEM165 deficient cells result from a defect in Golgi manganese homeostasis. *Hum Mol Genet.* 25 (8): 1489-1500.

Raitt D, Johnson A, Erkine A, Makino K, Morgan B, Gross D & Johnston L. 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell.* 11(7):2335–2347.

Rispail N, Soanes D, Ant C, Czajkowski R, Grunler A, Huguet R, Perez-Nadales E, Poli A, sartorel E, Valiante V, Yang M, Beffa R, Brakhage A, Gow N, Kahmann R, Lebrun M, Lenasi H, Perez-Martin J. Talbot N, Wendland J & Di Prieto A. 2009. Comparative genomics of MAPs kinase and calcium-calcineurin signaling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal Genet Biol.* 46(4):287-298.

Ron D & Walter P. 2007. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8(7): 519-529.

Roy J & Cyert M. 2009. Cracking the phosphatase code: docking interactions determine substrate specificity. *Sci Signal.* 2(100):re9

Roy J, Li H, Hogan P & Cyert M. 2007. A Conserved docking site modulates substrate affinity for calcineurin, signaling output, and in vivo function. *Mol Cell* 25(6): 889–901.

Ruiz-Canada C, Kelleher D & Gilmore R. 2009. Cotranslational and posttranslational N-glycosylation of polypeptides by distinct mammalian OST isoforms. *Cell*. 136 (2): 272-283.

Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers J & Arino J. 2002. The transcriptional responses to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signaling. *Mol Microbiol*. 46 (5):1319-1333.

Shamu C & Walter P. 1996. Oligomerization and phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO J*. 15 (12):3028-3039.

Shibatani T, David I, McCormack A, Frueh K & Skach W. 2005. Proteomic analysis of mammalian oligosaccharyltransferase reveals multiple subcomplexes that contain Sec61, TRAP, and two potential new subunits. *Biochemistry*. 44(16):5982-5992.

Shigaki T, Rees I, Nakhleh H & Hirschi K. 2006. Identification of three distinct phylogenetics groups of CAX cation/proton antiporters. *J Mol Evol*. 63 (6):815-825.

Stathopoulos A & Cyert M. 1997. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1 encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev*. 11 (24):3432-3444.

Stie J & Fox D. 2008. Calcineurin regulation in fungi and beyond. *Eukaryot Cell*. 7(2):177-186.

Strayle J, Pozzan T & Rudolph H. 1999. Steady-state free Ca(2+) in the yeast endoplasmic reticulum reaches only qo microM and is mainly controlled by the secretory pathway pump pmr1. *EMBO J*. 18(17):4733-4743.

Thibault G, Ismail N & Ng D. 2011. The unfolded protein response supports cellular robustness as a broad-spectrum compensatory pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*. 108 (51):2597-2602.

Torres-Quiroz F, García-Marqués S, Coria R, Dandez-Gil F. & Prieto J. 2010. The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *J Biol Chem*. 285 (26):20088-20096

Travers K, Patil C, Woodicka L, Lockhart D, Weissman J & Walter P. 2000. Functional and genomic analyses reveals an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell*. 101(3):249-258.

Tsuzi D, Maeta K, Tajatsume Y, Izawa S & Inoue Y. 2004. Regulation of the yeast phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase GPX2 by oxidative stress is mediated by Yap1 and Skn7. *FEBS Lett.* 565(1-3):148-154.

Van Dalen K, Hodapp S, Keskin A, Otto G, Berdan C, Higdon A, Cheunkardee T, Nomura D, Jovanovic M & Brar G. 2018. Global proteome remodeling during ER stress involves Hac1-driven expression of long undecoded transcript isoforms. *Dev Cell* 46(2):219-235.

Vido K, Spector D, Lagniel G, Lopez S, Toledano M & Labarre J. 2001. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem.* 276 (11): 8469-74

Viotti C. 2016. ER to Golgi-dependent protein secretion: the conventional pathway. *Methods Mol Biol.* 1459:3-29.

West M, Zurek N, Hoenger A. & Voeltz GK. 2011. A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *J Cell Biol.* 193(2):333-346

William K & Cyert M. 2001. The eukaryotic response regulator Skn7p regulates calcineurin signaling through stabilization of Crz1. *EMBO J.* 20(13) :3473-3483.

Williams R. 1999. Calcium: the developing role of its chemistry in biological evolution. In calcium as a cellular regulator, ed. E. Carafoli y C Klee. Oxford, UK: Oxford University Press. 3-27.

Yoshimoto H, Saltsman K, Gash A, Li H, Ogawa N, Botstein D, Brown P & Cyert M. 2002. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 277(34):31079-3088.

Zelter A, Bencina M, Browman B, Yarden O & Read N. 2004. A comparative genomics analysis of the calcium signaling machinery in *Neurospora crassa*, *Magnaporthe grisea*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Fungal Genet Biol.* 41 (9):827-841.

12. ANEXO

Tabla 4. Desoxioligonucleótidos utilizados en la amplificación de productos por PCR.

Primer	Secuencia 5'-----3'
<i>lacZFW</i>	TCTAGAATGACTAAATCTCATTTCAGAAG
<i>lacZRV</i>	CAGCTGAATAAAAACTGTGGTCTGGT
Cnb1//FW	GAATCCATAGAAGCATTTTTATTTCTTAAAATGGAGGCCCAAGAAT ACCCTCCTTGACAGT
Nat1 //RV	AGCCGCCAAAATGGGATATACATTC
Cnb1FW	AACTTAACAGGGGTGCGGC

Tabla 5. Plásmidos empleados

Plásmido	Referencia
pGEM-T Easy Vector	Promega
pGEM- <i>lacZ</i>	Este trabajo
pGEM-PFKS2	Olivares (no publicado)
pGEM-PMC1	Olivares (no publicado)
pGEM-PGDT1	Olivares (no publicado)
YEp352-PFKS2- <i>lacZ</i>	Este trabajo
YEp352-PPMC1- <i>lacZ</i>	Este trabajo
YEp352-PGDT1- <i>lacZ</i>	Este trabajo
pSH18	Estojak <i>et al.</i> , 1995
pAG25	Goldstein <i>et al.</i> , 1999
YEp352	Hill <i>et al.</i> , 1996