

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



TESIS DOCTORAL

**Respuesta de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al
antifúngico clotrimazol: papel de la ruta de integridad de la
pared celular**

**Response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the
antifungal clotrimazole : role of the cell wall integrity
pathway**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Angela Sellers Moya

Directores

**María Molina Martín
Humberto Martín Brieva**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

RESPUESTA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* AL ANTIFÚNGICO
CLOTRIMAZOL: PAPEL DE LA RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR.

RESPONSE OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* TO THE ANTIFUNGAL
CLOTRIMAZOLE: ROLE OF THE CELL WALL INTEGRITY PATHWAY.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

ÁNGELA SELLERS MOYA

DIRECTORES

MARÍA MOLINA MARTÍN
HUMBERTO MARTÍN BRIEVA

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

RESPUESTA DE LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae* AL ANTIFÚNGICO
CLOTRIMAZOL: PAPEL DE LA RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED
CELULAR.

RESPONSE OF THE YEAST *Saccharomyces cerevisiae* TO THE ANTIFUNGAL
CLOTRIMAZOLE: ROLE OF THE CELL WALL INTEGRITY PATHWAY.

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA EN EL PROGRAMA DE
MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

PRESENTADA POR

ÁNGELA SELLERS MOYA

DIRECTORES

MARÍA MOLINA MARTÍN

HUMBERTO MARTÍN BRIEVA

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a la financiación de los siguientes proyectos:

- BIO2016-75030-P. “Reprogramación celular por fosforilación dependiente de la MAPK Slt2 e integración de un módulo de señalización por receptores de tipo Toll en *Saccharomyces cerevisiae*”, subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2016-2019).
- S2017/BMD-3691: “InGEMICS-CM: Ingeniería Microbiana, Salud y Calidad de Vida”, subvencionado por los *European Structural and Investment Funds* y por la Comunidad Autónoma de Madrid (2018-2022).
- PID2019-105342GB-100: “Ensamblaje y estudio de complejos de señalización endógenos y heterólogos en el modelo *Saccharomyces cerevisiae*: aplicación al análisis funcional y descubrimiento de fármacos”, subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación (2020-2023).

Así como a la concesión a la doctoranda de las siguientes ayudas económicas:

- Ayudas para contratos predoctorales para la formación de doctores (contratos FPI), convocatoria 2017 (CT70/17), financiado por el Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (01/07/2018 – 30/11/2022).
- Ayudas para la realización de estancias breves dentro del programa FPI. Estancia breve llevada a cabo en el laboratorio del Dr. Frank Uhlmann en el *Francis Crick Institute* de Londres (Reino Unido), del 06/09/2021 al 06/12/2021.

Esta tesis no habría sido posible sin las personas que me han acompañado en el camino, y a las que ahora quiero dar las gracias:

Gracias María y Humberto por haber confiado en mí desde el primer día, no sólo me habéis enseñado muchas cosas sobre ciencia, sino que con vosotros también he aprendido a trabajar desde el compañerismo, la honestidad y la ilusión. Siempre estaré agradecida por haberos tenido como mentores en estos primeros años profesionales. Gracias también a Victor, los 3 juntos habéis creado un ambiente en el que siempre me he sentido y me sentiré arropada.

Gracias a mis utresianas, porque sin vuestra ayuda, consejos y apoyo no habría llegado a ninguna parte. Sois todas personas generosas y maravillosas, con las que es imposible no estar a gusto. Todos los momentos que hemos vivido juntas dentro y fuera del laboratorio me los llevo en el recuerdo. Gracias a mis 'pollitos' Marcos y Elena, por vuestro granito de arena aportado a este trabajo. Gracias Elba, por haberme escuchado en esos ratitos de descanso cuando más lo necesité.

Gracias al resto del Departamento de Microbiología, dónde trabajar en ciencia es más fácil cuando siempre hay alguien dispuesto a echarte una mano. Gracias a los compis de levaduras de la U4, por la cantidad de cepas y materiales que me habéis prestado, y por el buen rollo que tenemos.

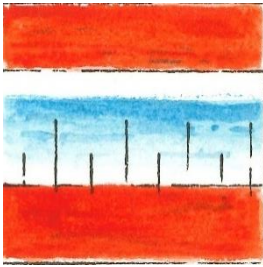
Thank you, Frank, for the great opportunity of joining your lab during 3 wonderful months in London. I learned a lot while I was there. Thanks to the proteomic facility and to the members of the CSL lab. Thanks Luca for your help with everything I needed, I wish you the best with your thesis and your personal projects.

Gracias a las personas que formaron parte de mi camino universitario en Valencia: a Amparo y Eladio por introducirme en el mundo de las levaduras y guiarme hasta el que sería mi grupo en Madrid, y por supuesto a mis amigos de la carrera, a los que echo de menos, pero a los que sigo sintiendo cerca.

Gracias al resto de amigos que han hecho que mis momentos de ocio sean más divertidos durante estos años: a Sonia, la primera amiga que hice en Madrid, siento que juntas hemos descubierto esta ciudad y que has sido un pilar fundamental para mí en esta etapa, gracias también por presentarme a alguien tan genial como Irene, estoy segura de que nos quedan muchos viajes y festivales por vivir las 3 juntas; a mis amigos de la estancia, por los momentos y las risas que hemos compartido en Londres, y por los que sigo compartiendo con algunos de vosotros in Spain; a mis Electroperras, por la amistad y el cariño que me dais desde que éramos unas adolescentes cutres; a Irene, por tu compañía durante estos últimos meses.

Gracias a los que han compartido hogar conmigo en Madrid: a Diego, por tu apoyo incondicional durante estos años y todas las experiencias vividas juntos; a Andrés y Diego, por hacer del piso de Remonta un lugar tranquilo pero divertido en el que vivir; a mi hermano, por tu apoyo económico y moral en los primeros años del doctorado, el tiempo que estuvimos en José de Cadalso fue una etapa muy feliz de nuestras vidas aunque no fuéramos del todo conscientes, gracias por la conexión tan especial que tenemos.

Gracias a mis padres, por la educación tanto en conocimientos como en valores que me habéis dado, sin la que ahora mismo no estaría escribiendo esto. Gracias también por haberme apoyado siempre en mis decisiones, por aconsejarme y por darme ese amor tan grande. Gracias, papá, por tu aportación artística a la portada. Os dedico esta tesis, a vosotros y al tío Francis.



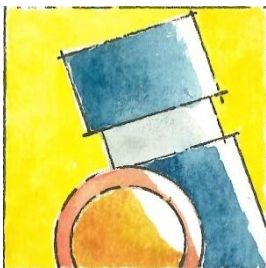
ÍNDICE

ÍNDICE	1
ABREVIATURAS	7
RESUMEN	13
SUMMARY	19
INTRODUCCIÓN	25
1. LAS RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKS	27
1.1. La ruta de apareamiento	28
1.2. La ruta de respuesta a elevada osmolaridad (HOG)	30
1.3. La ruta de integridad de la pared celular (CWI)	32
1.3.1. Sensores	33
1.3.2. Rho1	35
1.3.3. Pkc1	36
1.3.4. Módulo de MAPKs.....	37
1.3.5. Slt2.....	38
1.3.6. Reguladores negativos	41
1.3.7. Sustratos de Slt2.....	41
1.3.8. Estímulos activadores	43
1.4. Mecanismos de entrecruzamiento entre las rutas de señalización.....	46
2. LOS ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS	48
2.1. Los imidazoles	50
2.1.1. El clotrimazol.....	51
2.2. Los triazoles.....	51
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	53
MATERIALES Y MÉTODOS	57
1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS.....	59
2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	60
2.1. Obtención de construcciones y mutantes mediante PCR solapante	63
2.2. Mutagénesis dirigida	64
3. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	64
3.1. Medios de cultivo	64
3.2. Cultivo y recogida de células de levadura	65
4. COMPUESTOS UTILIZADOS.....	65
5. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS.....	66

ÍNDICE

5.1. Ensayo de sensibilidad a azoles en medio líquido	66
5.2. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones decimales seriadas.....	66
6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN BLOTTING</i>	66
6.1. Obtención de extractos proteicos.....	66
6.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas.....	67
7. ENSAYO CON FOSFATASA ALCALINA	69
8. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS CON Zn ²⁺ - <i>PHOS-TAG</i> SDS-PAGE	69
9. MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR CITOMETRÍA DE FLUJO	70
10. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y TINCIÓN DE ACTINA	70
11. PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)	71
12. ENSAYOS DE FOSFOPROTEÓMICA	71
12.1. Análisis por fosfoproteómica de Slt2-FLAG.....	71
12.2. Ensayo global cuantitativo de fosfoproteómica	73
13. SOPORTE INFORMÁTICO.....	74
RESULTADOS	77
1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL CLOTRIMAZOL (CLT) A TRAVÉS DE LA RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR (CWI) Y DE OTRAS RUTAS DE MAPKS	79
1.1. Los imidazoles activan a las rutas CWI y HOG y disminuyen la señalización a través de la ruta de apareamiento.....	79
1.2. La reducción en la fosforilación de Fus3 y Kss1 dependiente del CLT está mediada parcialmente por Hog1.....	83
1.3. El nivel de activación de la MAPK Slt2 depende de la concentración y tiempo de exposición al antifúngico.....	84
1.4. El módulo de MAPKs de la ruta CWI es esencial para la activación de Slt2 por el CLT85	
1.5. La proteína quinasa Pkc1 no es crucial para la transmisión de la señal a través de la ruta CWI en respuesta al CLT	87
1.6. La activación de la ruta CWI por el CLT es parcialmente dependiente del mecanosensor Wsc1	90
1.7. Los factores de transcripción Rlm1 y Swi4/Swi6 participan en la respuesta al CLT	92
1.8. La exposición al CLT genera un aumento del estrés oxidativo en las células de levadura.....	96
1.9. El estrés oxidativo generado por el CLT está implicado en los efectos de este compuesto sobre la señalización a través de las rutas de MAPKS	99
1.10. La subunidad Tpk3 de la PKA está relacionada con la aparición de la forma LP-Slt2 en respuesta al CLT.....	101

1.11. La ruta de biosíntesis de la trehalosa está implicada en la activación de Slt2 por el CLT a través de la enzima Tps1	103
2. ESTUDIO DE LA FORMA DE MENOR MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE FOSFO-SLT2 (LP-SLT2) CARACTERÍSTICA DEL TRATAMIENTO CON CLT.....	105
2.1. La forma LP-Slt2 se origina por fosforilaciones adicionales a las del motivo de activación TEY.....	105
2.2. Las fosforilaciones adicionales causantes de la forma LP-Slt2 son dependientes de la activación de la propia MAPK y de su actividad quinasa	108
2.3. La parte C-terminal de Slt2 está implicada en las fosforilaciones adicionales producidas por el CLT	109
3. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DEL CLT MEDIANTE UN ENSAYO GLOBAL DE FOSFOPROTEÓMICA.....	115
3.1. El tratamiento con el CLT conduce a cambios en el fosfoproteoma dependientes e independientes de la MAPK Slt2	115
3.2. El estudio de fosfoproteómica confirma la activación de Slt2 y Hog1 por el CLT e identifica nuevas fosforilaciones en componentes de la ruta CWI.....	120
3.3. El tratamiento con CLT promueve la fosforilación de 258 proteínas de forma dependiente de Slt2	122
3.4. Slt2 regula la fosforilación en respuesta al CLT de proteínas relacionadas con las rutas HOG y CWI.....	126
DISCUSIÓN	129
1. EL CLT PROVOCA CAMBIOS EN LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LAS RUTAS DE MAPKS EN LA LEVADURA <i>S. cerevisiae</i> DEBIDO AL DAÑO EN MEMBRANA Y AL AUMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO	131
2. LA RUTA CWI ES CAPAZ DE ACTIVARSE POR EL CLT A TRAVÉS DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE PKC1	134
3. EL CLT PROVOCA LA FOSFORILACIÓN DE SLT2 EN RESIDUOS ADICIONALES A LOS DE SU MOTIVO DE ACTIVACIÓN	137
4. IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN EL FOSFOPROTEOMA Y DE POSIBLES SUSTRATOS DE SLT2 EN RESPUESTA AL CLT MEDIANTE UN ENSAYO DE FOSFOPROTEÓMICA	139
CONCLUSIONES	145
CONCLUSIONS	149
BIBLIOGRAFÍA	153
ANEXO I	175
ANEXO II	195



ABREVIATURAS

A	
AS	Sensible a análogos (<i>Analog Sensitive</i>)
Asp	Asparagina (<i>Asparagine</i>)
ATP	Adenosín trifosfato (<i>Adenine Triphosphate</i>)
B	
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
C	
Caf	Cafeína
CD	<i>Common Docking</i>
cDNA	DNA complementario
CFW	Blanco de calcoflúor (<i>Calcofluor White</i>)
CIAP	Fosfatasa alcalina de intestino de ternero (<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>)
CLT	Clotrimazol
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CPZ	Clorpromazina
CRD	Dominio rico en cisteínas (<i>Cysteine Rich Domain</i>)
CWI	Ruta de integridad de la pared celular (<i>Cell Wall Integrity</i>)
CYP450	Citocromo P450 (<i>Cytochrome P450</i>)
D	
Da	Dalton
DHE	Dihidroetidio
DIC	Microscopía de contraste de interferencia diferencial (<i>Differential Interference Contrast</i>)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DO	Densidad Óptica
DSP	Fosfatasa de especificidad dual (<i>Dual Specificity Phosphatase</i>)
DTT	Ditiotreititol
E	
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicoltetraacético
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares (<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>)
F	
FDR	<i>False Discovery Rate</i>
FLC	Fluconazol
G	
G6PDH	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (<i>Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase</i>)
GAP	Proteína activadora de GTPasa (<i>GTPase Activating Protein</i>)
GDP	Guanosina difosfato (<i>Guanosine Diphosphate</i>)
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GPCR	Receptor acoplado a proteína G (<i>Guanine nucleotide-binding Protein-Coupled Receptor</i>)
Gly	Glicina (<i>Glycine</i>)
GO	<i>GeneOntology</i>
GTP	Guanosina trifosfato (<i>Guanosine Triphosphate</i>)
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
Glu	Ácido glutámico (<i>Glutamic acid</i>)

ABREVIATURAS

H	
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil) piperazin-1-iletanosulfónico
HOG	Ruta de respuesta a elevada osmolaridad (<i>High Osmolarity Glycerol</i>)
HR	<i>Homology Region</i>
I	
ITC	Itraconazol
K	
KD	Catalíticamente inactivo (<i>Kinase-Dead</i>)
KTC	Ketoconazol
L	
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem (<i>Liquid Chromatography with tandem Mass Spectrometry</i>)
LoaOOH	Ácido 13-hidroperoxilinoico
LP-Slt2	Forma de menor movilidad electroforética de Slt2 fosforilada (<i>Low Phospho-Slt2</i>)
Lys	Lisina (<i>Lysine</i>)
M	
MAPK	Proteín quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>)
MAPKK	MAPK quinasa quinasa (<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i>)
MAPKKK	MAPK quinasa quinasa quinasa (<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>)
min	Minutos
MMS	Metil Metano-Sulfato
MOPS	3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico
MP	Marcador de proteínas
mRNA	RNA mensajero
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem (<i>tandem Mass Spectrometry</i>)
N	
NAC	N-acetilcisteína
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
nm	Nanómetros
np	No fosforilada
P	
P	Fosforilación
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i>)
PAK	Proteín quinasa activada por p21 (<i>p21 Activated Kinase</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PBS-T	PBS-Tween-20
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenglicol
pH	Potencial de hidrógeno
PH	Dominio de homología de pleckstrina (<i>Pleckstrin homology</i>)
PHS	Fitoesfingosina (<i>Phytosphingosine</i>)
PI	Fosfatidilinositol (<i>Phosphatidylinositol</i>)
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PIP₂	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato

PKA	Proteín quinasa A (<i>Protein Kinase A</i>)
PKC	Proteín quinasa C (<i>Protein Kinase C</i>)
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>)
ppm	Partes por millón
Pro	Prolina (<i>Proline</i>)
PSA	Persulfato amónico
PTM	Modificación postraducciona (<i>Post-translational Modification</i>)
PTP	Tirosín fosfatasa (<i>Protein Tyrosin Phosphatase</i>)
R	
RC	Rojo Congo
Rd	Rodamina 123
Rho	Homólogo a Ras (<i>Ras homologous</i>)
RNA	Ácido ribonucleico (<i>Ribonucleic Acid</i>)
ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR de transcripción reversa cuantitativa a tiempo real (<i>Real-Time quantitative Reverse Transcription PCR</i>)
S	
SBF	SCB (<i>Swi4/Swi6-dependent Cell cycle Box</i>) Binding Factor
SD	Medio sintético de crecimiento de levaduras con glucosa (<i>Synthetic Dextrose</i>)
SDS	Dodecilsulfato sódico (<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>)
Ser	Serina (<i>Serine</i>)
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
T	
TAD	Dominio de activación transcripcional (<i>Transcriptional Activation Domain</i>)
TAE	Solución Tris-Acetato-EDTA
t-BOOH	Tert-butil hidroperóxido
TCA	Ácido tricloroacético (<i>Trichloroacetic Acid</i>)
TEMED	Tetrametiletilenediamina
Thr	Treonina (<i>Threonine</i>)
TOR	Diana de rapamicina (<i>Target of Rapamycin</i>)
TORC	Complejo TOR (<i>TOR complex</i>)
Tuni	Tunicamicina
Tyr	Tirosina (<i>Tyrosine</i>)
U	
UCM	Universidad Complutense de Madrid
UV	Ultravioleta
ufc	Unidades formadoras de colonias
V	
Val	Valina (<i>Valine</i>)
v/v	Volumen en volumen
W	
WT	Fenotipo silvestre (<i>Wild-Type</i>)
w/w	Peso en peso

ABREVIATURAS

X

X | Aminoácido desconocido

Y

YPD | Medio rico de crecimiento de levaduras (*Yeast extract Peptone Dextrose*)

Z

Zim | Zimoliasa

8-MOP 8-metoxipsoraleno

°C Grado centígrado

Δ Delección



RESUMEN

Respuesta de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* al antifúngico clotrimazol: papel de la ruta de integridad de la pared celular.

Introducción

Las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs son esenciales para la adaptación y supervivencia de las células eucarióticas ante situaciones de estrés o nuevos estímulos externos. En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* existen cinco rutas de MAPKs, entre las que destacan la de apareamiento, la de respuesta a elevada osmolaridad (HOG) y la de integridad de la pared celular (CWI), moduladas por las MAPKs Fus3 y Kss1, Hog1 y Slt2, respectivamente. Si bien la ruta CWI ejerce un papel fundamental en la respuesta de la célula al daño en la pared celular, se ha comprobado que también es capaz de activarse en respuesta a estreses que no afectan directamente a la pared, como la temperatura elevada o el estrés oxidativo. Para que un estímulo provoque la activación de la ruta CWI, es necesaria la acción de una serie de proteínas que actúan en cascada: la detección del estímulo por parte de los sensores (Wsc1, Mid2 y Mtl1), la transmisión de la señal hacia la GTPasa Rho1 a través de sus GEFs activadoras, la activación de la proteína quinasa Pkc1 y finalmente la activación del módulo de MAPKs, que culmina con la fosforilación de Slt2 en su motivo de activación conservado TEY. Posteriormente, Slt2 es capaz de regular mediante fosforilación a distintos sustratos con diferentes funciones, entre los que destacan los factores de transcripción Rlm1 y SBF. Los antifúngicos azólicos son los fármacos más empleados para el tratamiento de infecciones provocadas por hongos. Se dividen en dos familias, imidazoles y triazoles, y su mecanismo de acción se basa en la inhibición de la síntesis del ergosterol, lo que da lugar a un daño en la membrana y a la parada del crecimiento y la división celular. Algunos imidazoles como el clotrimazol, además, se ha descrito que provocan efectos adicionales sobre las células fúngicas.

Antecedentes y objetivos

En nuestro grupo de investigación se había descubierto que el clotrimazol era capaz de activar significativamente a la ruta CWI, por lo que decidimos estudiar en mayor profundidad como afecta este fármaco a las principales rutas de MAPKs de la levadura. Para ello, planteamos los siguientes objetivos:

- Caracterizar la señalización y la respuesta al clotrimazol a través de la ruta CWI y de otras rutas de MAPKs.

RESUMEN

- Estudiar la forma de menor movilidad electroforética de fosfo-Slt2 característica del tratamiento con el clotrimazol.
- Analizar la fosforilación de proteínas provocada por el clotrimazol mediante un ensayo global de fosfoproteómica, profundizando en aquellas fosforilaciones dependientes de Slt2.

Resultados

El tratamiento de la levadura con concentraciones elevadas de clotrimazol (CLT) provocó la alteración de las rutas de MAPKs: se produjo la activación de Slt2 con la aparición de una forma de menor movilidad electroforética (LP-Slt2), la activación de Hog1 y la reducción de la fosforilación de Kss1 y Fus3, efectos que no se observaron con los triazoles y que se relacionaron con un incremento del estrés oxidativo en las células. La ruta CWI, y en menor medida la ruta HOG, son necesarias para el crecimiento de la levadura en presencia de este antifúngico. La activación de la ruta CWI fue inducida por el CLT no solo a través del mecanismo de activación canónico mediado por la proteína quinasa Pkc1, sino también a través de un mecanismo alternativo capaz de activar directamente al módulo de MAPKs. Asimismo, proteínas implicadas en otras rutas, como la subunidad catalítica de la PKA Tpk3 y la trehalosa-6-P sintasa Tps1, resultaron ser importantes para esta activación, especialmente para la generación de la forma LP-Slt2. Rlm1 y SBF, los factores de transcripción principales de la ruta CWI, se fosforilaron de forma dependiente de Slt2 en presencia del CLT, pero esto no se tradujo en un aumento significativo de la actividad transcripcional de Rlm1. Por otro lado, se determinó que la forma de menor movilidad electroforética de fosfo-Slt2 propia del tratamiento con el CLT se origina por la presencia de fosforilaciones adicionales a las del motivo TEY, y su aparición es dependiente de la activación previa de la MAPK y de su actividad catalítica. Además, se identificaron algunos residuos situados en la parte final de la zona C-terminal de Slt2 como implicados en estas fosforilaciones. Un estudio global del fosfoproteoma de *S. cerevisiae* tras el tratamiento con el CLT permitió determinar que este fármaco es capaz de inducir cambios en la fosforilación de un número significativo de proteínas. Atendiendo a los eventos de fosforilación, se detectaron 661 proteínas que se fosforilaron de forma dependiente del CLT, de las cuales 258 debían su fosforilación a la presencia de Slt2. De este modo, se identificó la participación de Slt2 en la regulación de las rutas CWI y HOG y de otros procesos celulares importantes.

Conclusiones

1. La exposición de la levadura a los antifúngicos imidazólicos, en especial al clotrimazol (CLT), provoca cambios en la señalización de las rutas de MAPKs: activa a las rutas HOG y CWI, con la

aparición de una forma de menor movilidad electroforética de Slt2 que hemos denominado LP-Slt2, y reduce la fosforilación de las MAPKs Fus3 y Kss1 de la ruta de apareamiento.

2. La activación de la ruta CWI por el CLT es dependiente de la concentración y tiempo de exposición al antifúngico, y se lleva a cabo parcialmente a través de Wsc1 y Pkc1 y paralelamente mediante otro mecanismo independiente de Pkc1 todavía por identificar.
3. Los factores de transcripción clásicos de la ruta CWI (Rlm1 y SBF) se fosforilan tras el tratamiento con el CLT, aunque no se induce una respuesta transcripcional fuerte a través de Rlm1.
4. El CLT provoca estrés oxidativo en las células de levadura, el cual está implicado en los cambios en la señalización a través de las rutas de MAPKs que produce el antifúngico.
5. Las proteínas Tpk3 y Tps1, que forman parte de las rutas de la PKA y de biosíntesis de la trehalosa, respectivamente, están relacionadas con la activación de Slt2 y la generación de la forma LP-Slt2.
6. La forma LP-Slt2 se origina por la presencia de fosforilaciones adicionales a las del motivo de activación TEY en Slt2, y su aparición es dependiente de la activación previa de la MAPK y de su actividad catalítica.
7. Los residuos fosforilables Thr453 y Thr456, localizados en la zona C-terminal de Slt2, están implicados en la generación de LP-Slt2.
8. Gracias a la realización de un ensayo de fosfoproteómica global, se han detectado 661 proteínas que se fosforilan en respuesta al CLT, de las cuales 258 deben su fosforilación a la presencia de Slt2, entre las que destacan proteínas que participan en la propia ruta CWI y en la ruta HOG.
9. El ensayo de fosfoproteómica también ha permitido detectar la desfosforilación de 795 proteínas tras el tratamiento con el CLT.
10. La función de las proteínas fosforiladas de forma dependiente de Slt2 sugiere la regulación de diferentes e importantes procesos celulares en respuesta al CLT a través de esta MAPK.



SUMMARY

Response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to the antifungal clotrimazole: role of the cell wall integrity pathway.

Introduction

Signal transduction pathways mediated by MAPKs are essential for the adaptation and survival of eukaryotic cells to stress or new external stimuli. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* presents five MAPK pathways, including the mating, the High Osmolarity Glycerol (HOG), and the Cell Wall Integrity (CWI) pathways, mediated by Fus3 and Kss1, Hog1, and Slit2 MAPKs, respectively. Although the CWI pathway plays a key role in the response to cell wall damage, it is also able to respond to other stresses that do not directly affect the cell wall, such as heat or oxidative stress. For a particular stimulus to activate the CWI pathway, it is necessary the action of a series of proteins: the detection of the stimulus by the sensors (Wsc1, Mid2, and Mtl1), the transmission of the signal to the GTPase Rho1 through its activating GEFs, the activation of the protein kinase Pkc1, and the activation of the MAPKs module, which culminates in the phosphorylation of Slit2 at its conserved TEY activation motif. Subsequently, Slit2 can regulate different substrates with distinct functions through its phosphorylation. Among them, the transcription factors Rlm1 and SBF are the best characterized. Azole antifungals are the most widely used drugs for the treatment of fungal infections. They are divided into two families, imidazoles and triazoles, and their mechanism of action is based on the inhibition of ergosterol synthesis, resulting in membrane damage and cell growth and division arrest. Additionally, some imidazoles, such as clotrimazole, have been described to cause additional effects on fungal cells.

Background and objectives

In our research group, we found that clotrimazole is able to significantly activate the CWI pathway, so we decided to further study how this drug affects the main MAPK pathways in yeast. To this end, we set the following objectives:

- To characterize the signalling mechanism and the cell response to clotrimazole through the CWI pathway and other MAPK pathways.
- To study the characteristic lower electrophoretic mobility form of phospho-Slit2 that appears after clotrimazole treatment.
- To analyze clotrimazole-induced protein phosphorylation by a global phosphoproteomics assay, focusing on Slit2-dependent phosphorylations.

SUMMARY

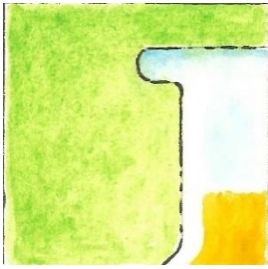
Results

Treatment of yeast cells with high concentrations of clotrimazole (CLT) caused signalling alteration through MAPK pathways, leading to the activation of Slt2 with the appearance of a lower electrophoretic mobility form (LP-Slt2), the activation of Hog1, and the reduction of phospho-Kss1 and phospho-Fus3 levels, effects that were not observed with triazoles and were related to an increase of oxidative stress within cells. The CWI and, to a lesser extent, the HOG pathways are necessary for growth under the presence of this antifungal drug. Regarding the CWI pathway, it was found that CLT induces its activation not only through the canonical mechanism mediated by the protein kinase Pkc1 but also by an alternative route that is able to directly activate the MAPK module. In addition, proteins involved in other pathways such as the PKA catalytic subunit Tpk3 and the trehalose-6-P synthase Tps1 proved to be important for this activation, especially for the generation of the LP-Slt2 form. Rlm1 and SBF, the major transcription factors of the CWI pathway, were phosphorylated in an Slt2-dependent manner in response to CLT, but the transcriptional activity of Rlm1 was not significantly induced. Concerning the LP-Slt2 form, it was shown that it originates due to the presence of additional phosphorylations to those at the TEY motif, and that its emergence depends on the activation and the catalytic activity of the MAPK. Furthermore, some residues located at the C-terminal end of Slt2 were proved to be involved in these additional phosphorylations. A global study of the *S. cerevisiae* phosphoproteome after treatment with CLT allowed us to determine that this drug induces changes in the phosphorylation of a great number of proteins. Focusing on the phosphorylation events, 661 proteins were detected as phosphorylated in a CLT-dependent manner, of which 258 were also dependent on the presence of Slt2. Thanks to this analysis, we demonstrated the participation of Slt2 in the regulation of CWI and HOG pathways and other important cellular processes after exposure to CLT.

Conclusions

1. Treatment of yeast cells with imidazole antifungals, especially with clotrimazole (CLT), leads to changes in MAPK pathways signalling: it activates the HOG and CWI pathways, with the appearance of a lower electrophoretic mobility form of Slt2 that we named LP-Slt2, and reduces the phosphorylation levels of the mating pathway MAPKs Fus3 and Kss1.
2. Activation of the CWI pathway depends on CLT concentration and time of exposure, and it is carried out partially through Wsc1 and Pkc1 and in parallel by an alternative mechanism independent of Pkc1 yet to be identified.
3. The transcription factors Rlm1 and SBF are phosphorylated after CLT treatment, but no strong transcriptional response is induced through Rlm1.

4. CLT induces oxidative stress within yeast cells, which is involved in the signalling changes through MAPK pathways caused by the antifungal.
5. Tpk3 and Tps1 proteins, which are part of the PKA and trehalose biosynthesis pathways, respectively, are involved in the activation of Slt2 and the generation of the LP-Slt2 form.
6. The LP-Slt2 form arises from the presence of additional phosphorylations to those of the TEY activation motif in Slt2. Moreover, its appearance is dependent on prior MAPK activation and its catalytic activity.
7. Phosphorylatable residues Thr453 and Thr456, located at the C-terminal region of Slt2, are involved in the generation of LP-Slt2.
8. By performing a global phosphoproteomics assay, 661 proteins were detected as phosphorylated in response to CLT, of which 258 were phosphorylated in an Slt2-dependent manner, including proteins involved in the CWI and HOG pathways.
9. The phosphoproteomics assay also detected the dephosphorylation of 795 proteins after CLT treatment.
10. Proteins that are phosphorylated in an Slt2-dependent manner are involved in different functions, suggesting the regulation of several important cellular processes through this MAPK in response to CLT.



INTRODUCCIÓN

1. LAS RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKS.

Una propiedad fundamental de todas las células eucarióticas es su capacidad para adaptarse a los cambios externos, respondiendo ante estímulos de diferente naturaleza para permitir su supervivencia. Uno de los mecanismos de los que disponen las células para hacer frente a estas variaciones ambientales son las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs (*Mitogen-Activated Protein Kinases*), las cuales deben su nombre a su capacidad de responder a la presencia de mitógenos y regular la proliferación celular en células de mamífero (Avruch, 2007). Cada ruta está compuesta por una serie de proteínas que actúan en cadena para detectar el estímulo y transmitir la señal: sensores, proteínas G, proteínas quinasas y factores de transcripción, entre otras. Asimismo, todas las rutas de este tipo presentan una estructura principal conocida como módulo de MAPKs, constituido por tres proteínas quinasas que se activan por fosforilación secuencial: la MAPKKK, la MAPKK y la MAPK. En primer lugar, actúan las MAPKKKs, unas serín/treonín quinasas que normalmente se activan mediante fosforilación por otras quinasas o por su interacción con pequeñas proteínas G de la familia Ras/Rho. Las MAPKKKs fosforilan entonces a las MAPKKs en dos residuos conservados de serina y treonina de su dominio de activación y estas MAPKKs activadas son capaces de fosforilar a las treonina y tirosina del motivo conservado de activación -Thr-X-Tyr- de las MAPKs, donde el residuo X puede variar entre glutámico, prolina o glicina según el tipo de MAPK. Finalmente, las MAPKs activadas llevan a cabo la fosforilación de sus sustratos en motivos -Ser/Thr-Pro-, desencadenando la respuesta celular adecuada al estímulo en cuestión, y que puede implicar la regulación de procesos vitales como la proliferación, diferenciación, supervivencia o apoptosis, entre otros (Chen and Thorner, 2007; Cargnello and Roux, 2011). Así, es esencial que las rutas de MAPKs se encuentren finamente reguladas, pues su funcionamiento defectuoso se ha relacionado con el desarrollo de enfermedades graves como el cáncer o el Alzheimer (Kim and Choi, 2015).

Dado el papel fundamental que ejercen estas rutas en las células y lo conservadas que están en todo el dominio eucariota, se han empleado diferentes organismos modelo para llevar a cabo estudios en profundidad de sus componentes y su funcionamiento. De este modo, la investigación realizada con la levadura modelo *Saccharomyces cerevisiae* ha aportado gran parte del conocimiento actual que se tiene sobre las rutas de MAPKs. Se conocen cinco rutas de MAPKs que operan en esta levadura: la ruta de apareamiento, la ruta de crecimiento invasivo o pseudofilamentoso, la ruta de integridad de la pared celular, la ruta de respuesta a elevada osmolaridad y la ruta de esporulación, mediadas por las MAPKs Kss1 y Fus3, Kss1, Slt2, Hog1 y Smk1, respectivamente (**Figura 1**) (Chen and Thorner, 2007).

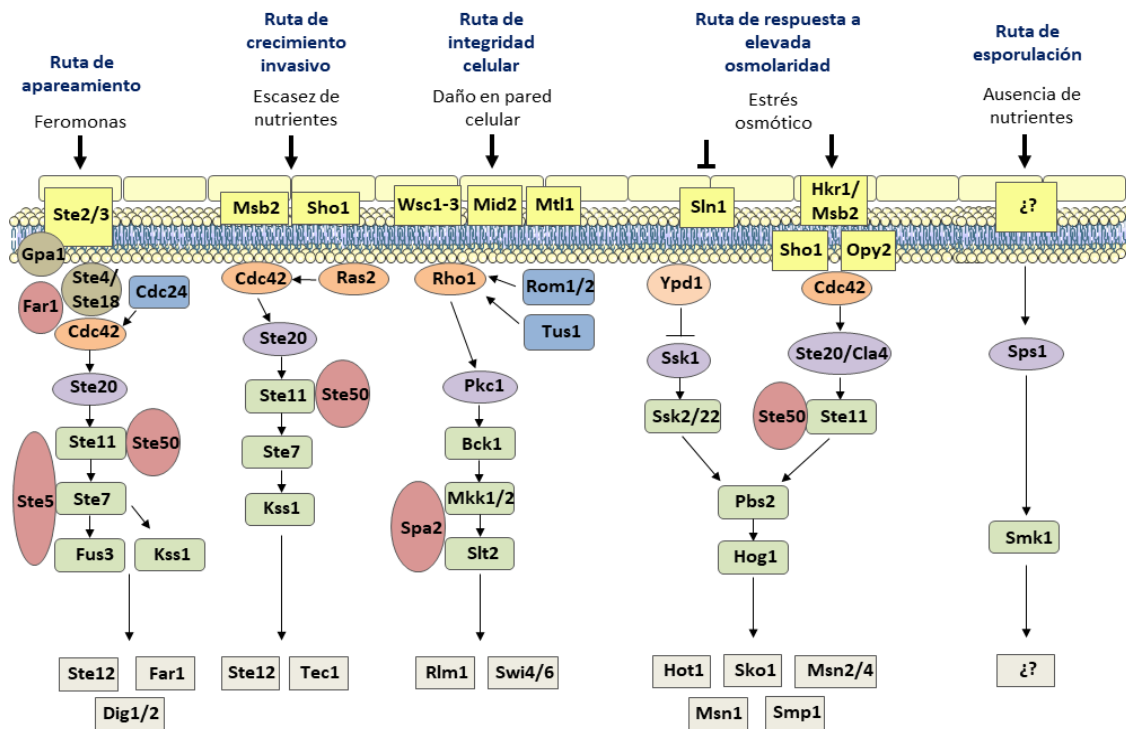


Figura 1. Representación esquemática de las rutas de señalización mediadas por MAPKs de *S. cerevisiae*. Se muestran sus principales componentes y los estímulos que las activan. Las proteínas representadas en verde corresponden al módulo de MAPKs.

En este trabajo, nos centraremos en tres de estas rutas: la de apareamiento, la de respuesta a elevada osmolaridad y la de integridad de la pared celular.

1.1. La ruta de apareamiento.

La levadura presenta dos tipos de células haploides: las *MAT α* y las *MAT a* , las cuáles son capaces de aparearse mediante fusión celular para formar el diploide *MAT α /MAT a* (Merlini *et al.*, 2013). Para que se lleve a cabo este apareamiento, es necesario que previamente las células secreten unos péptidos específicos (feromonas) llamados factor a en el caso de las células *MAT a* y factor α en el caso de las células *MAT α* . De este modo, una célula de un tipo determinado es capaz de detectar feromonas del tipo celular contrario y estimularse a través de la ruta de apareamiento, desencadenando una serie de cambios fisiológicos que la preparan para este proceso, como el crecimiento polarizado que conduce a la morfología *shmoo* o la parada de ciclo en fase G1 (Bardwell, 2005). En la **Figura 2** se muestran los componentes que constituyen esta ruta.

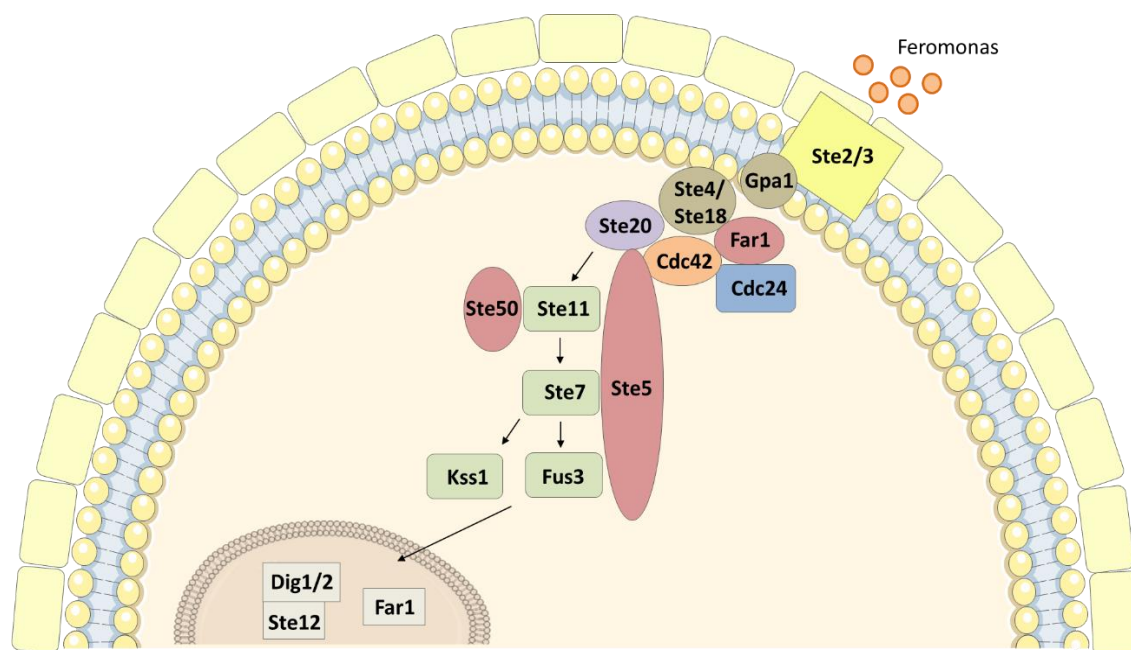


Figura 2. Representación esquemática de la ruta de apareamiento de *S. cerevisiae*.

En primer lugar, las feromonas son detectadas por receptores de membrana acoplados a proteínas G (GPCRs): Ste2 en el caso de las células *MAT α* y Ste3 en el de las células *MAT α* , que activan a una proteína G heterotrimérica constituida por la subunidad α Gpa1 y por el dímero $\beta\gamma$ Ste4/Ste18. Esta activación se produce gracias a que los receptores actúan como proteínas GEFs (*Guanine nucleotide Exchange Factor*), facilitando el intercambio de GDP por GTP en Gpa1 y provocando un cambio conformacional en la proteína G que permite la disociación del complejo $\beta\gamma$ Ste4/Ste18 (Dohlman, 2002; Alvaro and Thorner, 2016). Una vez producida esta liberación, el dímero $\beta\gamma$ es capaz de llevar a cabo múltiples interacciones esenciales para la transmisión de la señal. Así, se asocia con la proteína Far1 y con la GEF Cdc24, formando un complejo que se acumula en la membrana plasmática y activa a la proteína G pequeña Cdc42 (Nern and Arkowitz, 1999; Shimada *et al.*, 2000), recluta también a la proteína quinasa de tipo PAK (*p21-Activated Kinase*) Ste20 que a su vez es activada por Cdc42 (Leeuw *et al.*, 1998) e interacciona con la proteína de andamiaje Ste5 que se une a todo el módulo de MAPKs (Chol *et al.*, 1994; Whiteway *et al.*, 1995). Ste20 es la encargada de fosforilar a Ste11, la MAPKKK de la ruta, que transmite la señal hacia la MAPKK Ste7 y la MAPK Fus3 mediante fosforilaciones secuenciales (Van Drogen *et al.*, 2000). Otro componente que también es importante en este proceso es Ste50, una proteína adaptadora que interacciona con Ste11 y facilita su activación por Ste20 (Ramezani-Rad, 2003). Kss1, la MAPK de la ruta de crecimiento invasivo o pseudofilamentoso y que es homóloga a Fus3 también se fosforila en respuesta a feromonas, aunque de forma más rápida y transitoria (Sabbagh *et al.*, 2001), y ambas

INTRODUCCIÓN

MAPKs activas regulan las respuestas necesarias para que se produzca el apareamiento (Ma *et al.*, 1995; Farley *et al.*, 1999). Entre los diferentes sustratos de Fus3 y Kss1, destacan el factor transcripcional Ste12 junto a sus reguladores negativos Dig1 y Dig2, que se inactivan tras su fosforilación permitiendo una correcta activación transcripcional, y la proteína Far1, necesaria para la parada en G1 (Elion *et al.*, 1993; Cook *et al.*, 1996).

1.2. La ruta de respuesta a elevada osmolaridad (HOG).

La ruta de respuesta a elevada osmolaridad o ruta HOG (*High Osmolarity Glycerol*) dirige la adaptación fisiológica de las levaduras frente a un aumento de la osmolaridad externa, regulando procesos que resultan vitales para su supervivencia, ya que permite una mayor síntesis y retención de glicerol, un osmolito compatible cuya acumulación evita la pérdida de agua del interior celular, provoca una parada temporal del ciclo celular y ajusta los patrones de transcripción y traducción, entre otros mecanismos de adaptación (Saito and Posas, 2012; Hohmann, 2015; De Nadal and Posas, 2022). Estas respuestas están principalmente mediadas por la MAPK de la ruta Hog1, que es capaz de activarse a través de dos vías de señalización independientes que convergen en la MAPKK Pbs2: la rama SLN1 y la rama SHO1. Se ha demostrado que ambas ramas de la ruta son necesarias para la activación de Hog1 en respuesta a grandes concentraciones de osmolitos, mientras que en presencia de osmolaridades moderadas es la vía SLN1 la que juega un papel principal en la señalización (O'Rourke and Herskowitz, 2004). En la **Figura 3** se muestra un esquema de la ruta HOG, incluyendo los componentes de las dos vías.

La rama de SLN1 de la ruta HOG es una variante de los sistemas de señalización de dos componentes característicos de células procariontas, pero que también se pueden encontrar en algunos eucariotas como las plantas y los hongos (Casino *et al.*, 2010). En este caso, el sistema de señalización se compone del sensor histidín quinasa Sln1, la proteína intermedia Ypd1 y la proteína quinasa Ssk1, que actúan secuencialmente en una cascada de fosfotransferencia (Posas *et al.*, 1996). En ausencia de estímulo, Sln1 e Ypd1 actúan como reguladores negativos de la ruta: Sln1 se encuentra constitutivamente activa y se autofosforila, conduciendo a la fosfotransferencia a través de Ypd1 hasta Ssk1. De este modo, Ssk1 fosforilado se mantiene en una forma inactiva incapaz de interaccionar con las MAPKKs redundantes Ssk2 y Ssk22. Por el contrario, en presencia de estrés hiperosmótico Sln1 se inactiva, deteniendo la reacción de fosfotransferencia y dando lugar a la desfosforilación de Ssk1 (Fassler and West, 2010). Una vez Ssk1 se encuentra desfosforilada, se une a Ssk2 y Ssk22 liberándolas de su autoinhibición y facilitando su autofosforilación (Posas and Saito,

1998). Finalmente, las MAPKKKs activas transmiten la señal hasta la MAPKK Pbs2, la cual en última instancia fosforila a Hog1 (Maeda *et al.*, 1995). Mutantes deficientes en *SLN1* o *YPD1* dan lugar, por tanto, a una hiperactivación de la ruta HOG, lo que resulta letal para la levadura (Posas *et al.*, 1996).

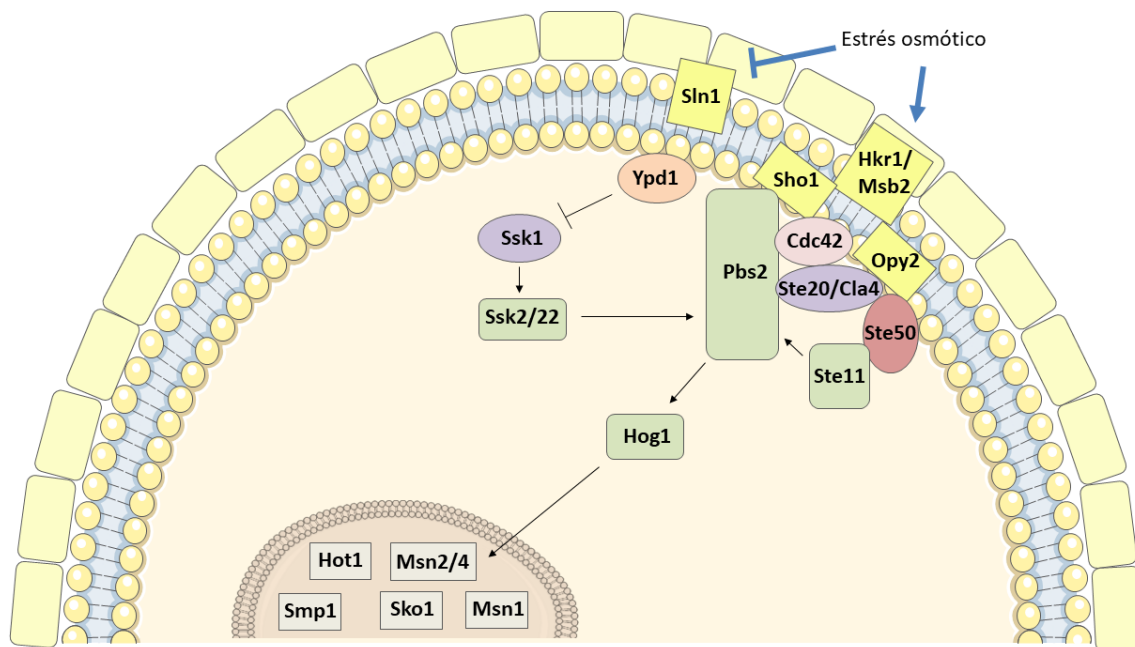


Figura 3. Representación esquemática de la ruta HOG de *S. cerevisiae*.

La rama SHO1 de la ruta tiene como componente principal a la proteína de andamiaje Sho1, la cual se localiza en la membrana celular actuando como co-osmosensor e interaccionando con diferentes componentes de la ruta. En primer lugar, el aumento en la osmolaridad del medio es detectado por los osmosensores Msb2 y Hrk1, unas proteínas transmembranales que se encuentran altamente glicosiladas (Tatebayashi *et al.*, 2007) y que permiten la transmisión de la señal a través de un mecanismo todavía desconocido que implica la interacción entre ambos osmosensores y Sho1. Opy2, otra proteína transmembrana, se considera un segundo co-osmosensor que también participa en la señalización de forma similar a Sho1 (Wu *et al.*, 2006). Seguidamente, la proteína G Cdc42 asociada a membrana atrae y activa a las proteínas quinasas de tipo PAK Ste20 y Cla4 (Lamson *et al.*, 2002), las cuales activan al módulo de MAPKs fosforilando a la MAPKKK Ste11 (Van Drogen *et al.*, 2000). Este proceso de activación es posible gracias a que Ste11 se encuentra asociada a la proteína adaptadora Ste50 (Posas *et al.*, 1998), la cual interacciona principalmente con Opy2 (Ekiel *et al.*, 2009) y de forma secundaria con Sho1 y Cdc42, facilitando la localización de Ste11 en la membrana. Pbs2, la MAPKK de la ruta que es fosforilada por Ste11, también se localiza en la membrana a través de su interacción con Sho1, actuando como proteína

INTRODUCCIÓN

de andamiaje (Tatebayashi *et al.*, 2006). Finalmente, y al igual que ocurre en la rama SLN1, Pbs2 fosforila a Hog1 produciendo la activación de la ruta.

Cuando Hog1 se activa por osmoestrés, su cinética de activación es rápida y transitoria, llegando a su pico máximo de fosforilación a los 5 minutos y bajando de forma gradual hasta niveles basales a los 30 minutos (Hao *et al.*, 2007). Hog1 activa se transloca al núcleo, dónde facilita la expresión de genes necesarios para la adaptación al estrés mediante la interacción con factores de transcripción como Hot1, Msn2/4 o Sko1 (Hohmann, 2002) y a través de su participación directa en otros pasos de la transcripción (De Nadal *et al.*, 2011). Por otro lado, Hog1 tiene como sustratos citosólicos a enzimas encargadas de la producción y acumulación de glicerol, de forma que, en condiciones en las que Hog1 es incapaz de translocarse al núcleo, las células pueden sobrevivir ante la presencia de estrés hiperosmótico (Westfall *et al.*, 2008).

Se ha identificado un gran número de estímulos más allá de la hiperosmolaridad que también son capaces de activar a la ruta HOG: el estrés térmico (Winkler *et al.*, 2002; Hayashi and Maeda, 2006), la hipoxia (Hickman *et al.*, 2011), el ácido acético (Mollapour and Piper, 2006), la inhibición de esfingolípidos (Tanigawa *et al.*, 2012) y el peróxido de hidrógeno (Lee *et al.*, 2017), entre otros. Con la mayoría de estos estímulos alternativos, la ruta se activa a través de una de sus ramas, pero no de ambas, con una fosforilación de Hog1 más moderada y con una cinética de activación diferente que en el caso del estrés hiperosmótico.

1.3. La ruta de integridad de la pared celular (CWI).

Las levaduras, al igual que el resto de los hongos, presentan pared celular: una estructura externa compuesta principalmente de polisacáridos (glucanos y quitina) y de proteínas (manoproteínas). En *S. cerevisiae*, la pared celular ejerce funciones esenciales para la levadura: proporciona protección frente a cambios en la presión osmótica y estrés mecánico, establece y mantiene la morfología celular y sirve de andamiaje para proteínas de superficie que participan en procesos celulares clave. Por ello, el mantenimiento de la integridad de la pared celular resulta vital para las células. Aunque existen diferentes rutas de señalización que contribuyen a este mantenimiento cuando la pared celular sufre alguna alteración, la principal responsable de la regulación de su composición y estructura es la ruta de integridad de la pared celular o CWI (*Cell Wall Integrity*) (Levin, 2011).

Los elementos que constituyen la ruta CWI se encuentran representados en la **Figura 4**. En primer lugar, el daño en la pared celular es detectado por una serie de mecanosensores llamados Wsc1-3, Mid2 y Mtl1 (Jendretzki *et al.*, 2011), los cuales transmiten la señal a la GTPasa Rho1 a través de alguna de sus GEFs (Rom1/2 y Tus1) (Krause *et al.*, 2012). Rho1 interacciona entonces con la proteína quinasa Pkc1, encargada de activar al módulo de MAPKs formado por Bck1, Mkk1/2 y Slt2 (Heinisch and Rodicio, 2018). Una vez fosforilada, la MAPK Slt2 activa a diferentes sustratos, entre los que destacan los factores de transcripción Rlm1 y SBF (complejo formado por Swi4 y Swi6), los cuales regulan la expresión de genes de reparación de la pared celular (Sanz *et al.*, 2018a). A continuación, se desarrolla en mayor profundidad la estructura y funcionalidad de cada uno de estos elementos.

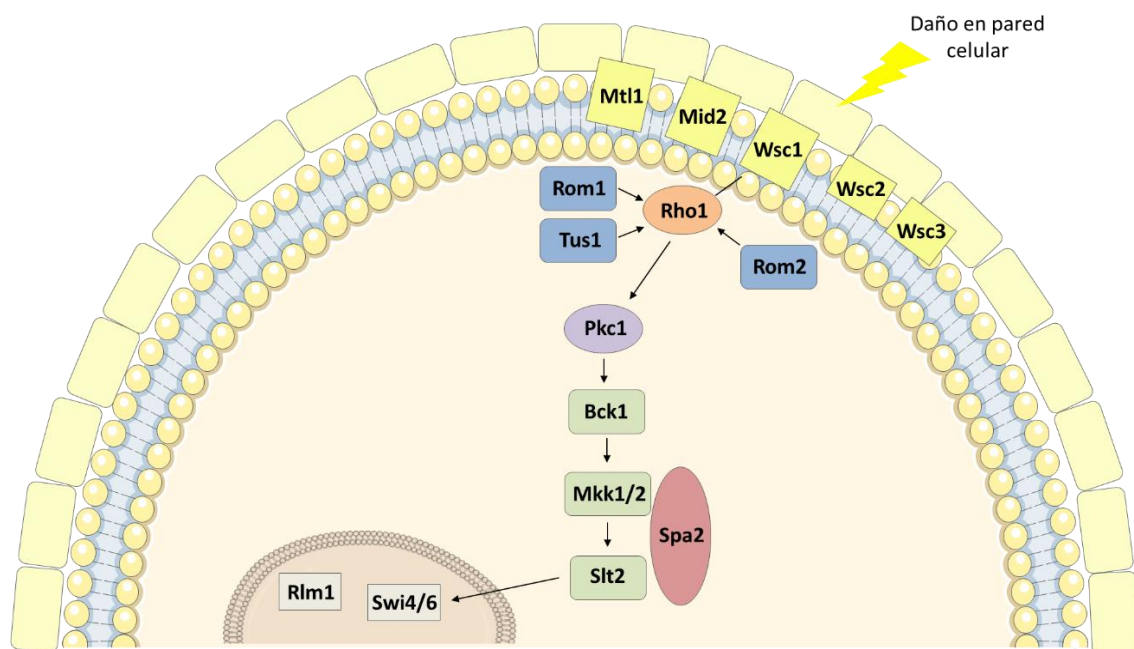


Figura 4. Representación esquemática de la ruta CWI de *S. cerevisiae*.

1.3.1. Sensores.

Los 5 sensores conocidos de la ruta CWI se dividen en dos pequeñas familias: los sensores de tipo Wsc (Wsc1, Wsc2 y Wsc3) y Mid2 y Mtl1 (Kock *et al.*, 2015). Se trata de proteínas de membrana que comparten una estructura similar: presentan un único dominio transmembranal conectado a una pequeña cola citoplasmática y una región extracelular larga rica en residuos de serina y treonina que se encuentra altamente O-manosilada (Lodder *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). El elemento que diferencia a las dos familias es un dominio situado en el extremo N-terminal en la zona extracitoplasmática, el cual se asume que interacciona con componentes de la pared celular.

INTRODUCCIÓN

En los sensores de tipo Wsc, este dominio está compuesto por una región rica en cisteínas llamada CRD (*Cysteine-Rich Domain*) que también se conoce por dominio WSC (Jendretzki *et al.*, 2011), mientras que en Mid2 y Mtl1 se trata de un residuo de asparagina N-glicosilado (Hutzler *et al.*, 2008). De este modo, los sensores se encuentran anclados por un lado a la membrana a través de su dominio transmembrana y por otro lado a la pared por la interacción con el dominio N-terminal, formando una estructura rígida de tipo nanomuelle capaz de actuar como un mecanosensor y detectar alteraciones de la pared o la membrana (Heinisch *et al.*, 2010a). Cuando el sensor se activa, es la cola citoplasmática la encargada de transmitir la señal a los componentes que se encuentran por debajo en la ruta, principalmente a través de su interacción con la proteína GEF Rom2 activadora de Rho1 (Philip and Levin, 2001).

Entre los 5 sensores existentes, Wsc1 y Mid2 ejercen un papel más relevante en la respuesta de la ruta CWI al estrés sobre la pared celular. Un mutante *wsc1Δ* muestra hipersensibilidad a temperaturas altas y a múltiples compuestos que alteran la pared celular o la membrana plasmática (Levin, 2005; Straede and Heinisch, 2007), mientras que la ausencia de Wsc2, Wsc3 o ambos no provoca un aumento significativo de la sensibilidad. A pesar de esto, los defectos en el crecimiento mostrados por *wsc1Δ* se potencian cuando también se delecionan *WSC2* y *WSC3* (Verna *et al.*, 1997), sugiriendo funciones solapantes de los sensores de tipo Wsc. Respecto al sensor Mid2, destaca su implicación en la respuesta a través de la ruta CWI a agentes de unión a quitina como el blanco de calcoflúor (CFW) (Ketela *et al.*, 1999) o el Rojo Congo (RC) (Bermejo *et al.*, 2010). Por otro lado, Mid2 también se ha asociado con el proceso de apareamiento, siendo el mutante *mid2Δ* hipersensible al tratamiento con feromonas (Ono *et al.*, 1994).

En cuanto a la distribución de estos sensores en la membrana, Wsc1 forma agrupaciones en zonas de crecimiento polarizado llamadas sensosomas, que aumentan de densidad y de tamaño en presencia de estrés sobre la pared, estableciendo una relación entre este agrupamiento y la activación de la ruta CWI (Heinisch *et al.*, 2010b). Por el contrario, Mid2 no tiende a formar estos sensosomas en presencia de estrés, sino que presenta una distribución uniforme alrededor de toda la membrana (Rajavel *et al.*, 1999; Spira *et al.*, 2012). A pesar de las diferencias entre Wsc1 y Mid2 descritas anteriormente, el doble mutante *wsc1Δmid2Δ* es sintético letal y sólo puede crecer en presencia del estabilizante osmótico sorbitol, lo que indica un posible solapamiento funcional de ambos sensores en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Ketela *et al.*, 1999).

El sensor Mtl1, considerado homólogo de Mid2 en un 50%, lleva a cabo algunas funciones redundantes a las de Mid2 (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999) y regula la activación de la ruta CWI y la autofagia en respuesta a la ausencia de glucosa y al estrés oxidativo (Petkova *et al.*, 2010;

Montella-Manuel *et al.*, 2021), sugiriendo un papel específico de este sensor en la respuesta de la ruta a algunos estreses no directamente relacionados con la pared celular.

1.3.2. Rho1.

En *S. cerevisiae* existen 6 GTPasas pertenecientes a la familia Rho (*Ras homologous*): Rho1-Rho5 y Cdc42, las cuales se localizan en la membrana plasmática y llevan a cabo diferentes funciones relacionadas con el establecimiento y el mantenimiento de la polaridad celular (Pérez and Rincón, 2010).

Entre ellas, Rho1, el ortólogo funcional de la GTPasa RhoA de mamíferos (Qadota *et al.*, 1994), juega un papel fundamental en el control de la señalización de la ruta CWI. La activación de Rho1 se encuentra mediada por 3 proteínas GEFs que permiten el intercambio de GDP a GTP: Rom1, Rom2 y Tus1. Tanto Rom1 como Rom2 poseen dominios homólogos de pleckstrina (PH) que permiten su unión al fosfatidilinositol (PI)-4,5-bisfosfato (PIP₂) y por tanto su localización en la membrana plasmática (Audhya and Emr, 2003; Yu *et al.*, 2004), además de un dominio N-terminal responsable de su asociación con los sensores de la ruta (Philip and Levin, 2001). Así, mutantes de delección de *ROM1* o *ROM2* son sensibles a temperaturas elevadas y el doble mutante es sintético letal (Ozaki *et al.*, 1996), lo que pone en evidencia que estas GEFs ejercen funciones solapantes esenciales para el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Por el contrario, Tus1 contiene un dominio PH que no interacciona con PIP₂ (Yu *et al.*, 2004) y carece del dominio N-terminal de unión a sensores. Además, se ha demostrado que Tus1 es la responsable de activar a Rho1 de forma dependiente del ciclo celular (Kono *et al.*, 2008), por lo que se asocia la actividad de esta GEF con la respuesta a señales de origen intracelular.

Rho1 activado se asocia entonces con la proteína quinasa Pkc1 facilitando su activación y la transmisión de la señal a través de la ruta CWI (Kamada *et al.*, 1996). Asimismo, también presenta otros sustratos como la β -1,3-glucano sintasa, las forminas Bni1 y Bnr1 o el factor de transcripción Skn7, los cuales regulan procesos independientes a la ruta CWI (Levin, 2011). La regulación negativa de Rho1 está mediada por una serie de proteínas GAPs (*GTPase-Activating Protein*) que actúan de forma inversa a las GEFs, favoreciendo la actividad hidrolítica de la proteína G y por tanto la transformación de GTP a GDP. Existen 4 GAPs para las que se ha demostrado una interacción con Rho1 tanto *in vitro* como *in vivo*: Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1, las cuales regulan a Rho1 dependiendo de su sustrato. De este modo, Lrg1 participa en la regulación de la β -1,3-glucano sintasa (Watanabe *et al.*, 2001), Bem2 y Sac7 colaboran en la regulación negativa de Pkc1 (Martín *et al.*, 2000; Schmidt

INTRODUCCIÓN

et al., 2002) y Bag7 junto a Sac7 controlan procesos relacionados con el citoesqueleto de actina (Schmidt *et al.*, 2002).

1.3.3. Pkc1.

El genoma de *S. cerevisiae* codifica una única proteína quinasa C (PKC) homóloga a las de mamíferos llamada Pkc1, la cual fue el primer componente de la ruta CWI en descubrirse (Levin *et al.*, 1990). La delección de *PKC1* resulta letal para el crecimiento de las células en condiciones normales, pero su viabilidad se puede rescatar en presencia de soporte osmótico (Levin *et al.*, 1990; Paravicini *et al.*, 1992). Así, un mutante *pkc1Δ* presenta mayores defectos en el crecimiento que los mutantes de delección en componentes del módulo de MAPKs que actúan por debajo, lo que sugiere una funcionalidad de Pkc1 en otros procesos más allá de la ruta CWI (Lee and Levin, 1992). Como se ha expuesto anteriormente, Pkc1 es activada tras la asociación con la GTPasa Rho1 en su forma activa, lo que confiere a la proteína quinasa la habilidad de ser estimulada por la fosfatidilserina como único cofactor (Kamada *et al.*, 1996). Cabe destacar que los cofactores clásicos de las PKCs de mamíferos como el diacilglicerol o el Ca^{2+} no funcionan en el caso de Pkc1 (Watanabe *et al.*, 1994).

La estructura de Pkc1 está compuesta por una serie de elementos característicos de las PKCs que participan en su activación: un dominio HR1 (*Homology Region*), formado por dos regiones repetidas HR1A y HR1B en su extremo N-terminal que contribuyen a la interacción con Rho1, un dominio C1 rico en cisteínas, también constituido por dos regiones repetidas C1A y C1B, que actúa como segundo sitio de interacción de Rho1, un dominio C2 imperfecto que permite la unión de la fosfatidilserina, y un sitio pseudosustrato que inhibe la actividad de la proteína quinasa en condiciones de inactivación mediante la interacción intramolecular con su dominio catalítico (Levin, 2005; Heinisch and Rodicio, 2018).

Las proteínas quinasas redundantes Pkh1 y Pkh2 también intervienen en la activación de Pkc1, fosforilando su residuo Thr983 localizado en el dominio catalítico (Inagaki *et al.*, 1999). Esta fosforilación es necesaria para la activación completa de Pkc1 en presencia de estrés térmico, y un mutante de Pkc1 incapaz de fosforilarse (*pkc1^{T983A}*) no puede complementar a la cepa *pkc1Δ* (Roelants *et al.*, 2004). Asimismo, también se ha descrito la fosforilación de Pkc1 en los residuos Thr1125 y Ser1143 por parte de TORC2 en algunas condiciones (Nomura and Inoue, 2015).

Respecto a la localización de Pkc1, se ha demostrado que reside en sitios de crecimiento polarizado de forma dependiente del ciclo celular y de su interacción con Rho1, y que en respuesta a estrés sobre la pared se relocaliza en zonas de la superficie celular dañadas (Andrews and Stark, 2000), lo cual se ajusta a su función principal de regulador de la ruta CWI. Por otro lado, también se ha observado la localización de Pkc1 en otras zonas menos típicas como el núcleo y el huso mitótico (Denis and Cyert, 2005), sugiriendo que Pkc1 también podría tener sustratos nucleares. En esta línea, se ha estudiado el papel de Pkc1 en la regulación de otros procesos celulares importantes como el ciclo celular, la síntesis de lípidos de membrana, la endocitosis, la citoquinesis o la autofagia (Heinisch and Rodicio, 2018).

Concretamente respecto al ciclo celular, Pkc1 participa en su regulación a distintos niveles. Se ha visto que regula negativamente al programa transcripcional del paso G2/M, donde destaca la expresión de genes relacionados con la ciclina mitótica *CLB2*, a través de la fosforilación directa del factor de transcripción Ndd1 (Darieva *et al.*, 2012). De forma similar, Pkc1 fosforila y regula negativamente a la fosfatasa Mih1 que participa en la entrada a la mitosis, provocando su salida del núcleo (Yano *et al.*, 2013). Por otro lado, regula positivamente a la fosfatasa PP2A^{Cdc55} fosforilando a sus inhibidores Igo1/Igo2 y Cdc55 (Thai *et al.*, 2017). Curiosamente, esta fosfatasa juega un papel ambivalente en la mitosis, pues desfosforila a Mih1 permitiendo su activación al mismo tiempo que contrarresta la actividad de la CDK Cdc28 (Pal *et al.*, 2008; Harvey *et al.*, 2011), por lo que Pkc1 podría estar implicada en la regulación tanto negativa como positiva del ciclo celular.

1.3.4. Módulo de MAPKs.

El primer paso para que se lleve a cabo la transmisión de la señal a través del módulo de MAPKs es la activación de la MAPKKK Bck1 por parte de Pkc1. Mediante un estudio de fosforilación *in vitro*, se ha demostrado que Pkc1 fosforila a Bck1 en los residuos Ser939, Thr1119 y Ser1134, localizados en una región bisagra entre el dominio regulador y el catalítico (Levin *et al.*, 1994). A continuación, Bck1 fosforila a las MAPKKs redundantes Mkk1 y Mkk2 en residuos de serina y treonina (Irie *et al.*, 1993). Tanto Bck1 como ambas Mkk1 y Mkk2 resultan esenciales para la respuesta al daño en pared, pues sus mutantes de delección muestran un fenotipo sensible a diferentes condiciones de estrés que se revierte mediante la estabilización osmótica del medio (Levin, 2011). Finalmente, las MAPKKs interactúan con la MAPK Slt2 y la fosforilan en su motivo conservado de activación -Thr-X-Tyr-, donde la X equivale a un residuo de ácido glutámico (Lee *et al.*, 1993; Soler *et al.*, 1995). A

INTRODUCCIÓN

pesar de la redundancia funcional de Mkk1 y Mkk2, se ha descrito un papel predominante de Mkk1 en la transmisión de la señal hacia Slt2 (Tatjer *et al.*, 2016). Además, estas MAPKKs activan también a una pseudoquinasa paróloga a Slt2 llamada Mlp1, que se induce en condiciones de activación de la ruta CWI y comparte funciones transcripcionales no catalíticas con Slt2 (Kim *et al.*, 2008).

Por otro lado, cabe mencionar el papel de Spa2, una proteína perteneciente al complejo del polarisoma que actúa como andamiaje para Slt2 y Mkk1/2. Así, la unión de estas proteínas a Spa2 facilita su localización en zonas de crecimiento polarizado (Van Drogen and Peter, 2002), aunque la localización predominante de Slt2 y Mkk1/2 es el núcleo y el citoplasma, respectivamente.

1.3.5. Slt2.

La MAPK Slt2, también conocida como Mpk1 (Lee *et al.*, 1993), es el último elemento del módulo de MAPKs de la ruta CWI que se activa en la cascada de fosforilación. Como se ha mencionado anteriormente, son las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 las encargadas de fosforilar a Slt2 en los residuos Thr190 y Tyr192 de su motivo conservado de activación. En un estudio reciente de nuestro grupo de investigación, se ha observado que esta fosforilación dual por parte de Mkk1/2 se lleva a cabo de manera ordenada, siendo la Tyr192 la primera en fosforilarse (González-Rubio *et al.*, 2021b). En este mismo estudio, también se demostró la coexistencia de las formas de Slt2 doblemente fosforiladas, monofosforiladas en treonina o tirosina y no fosforiladas, siendo estas últimas las más abundantes incluso en condiciones de activación de la ruta. Además, se detectó la presencia de cierta actividad biológica de las formas monofosforiladas en treonina, pero no en tirosina, sugiriendo que dicha fosforilación resulta esencial para la actividad de la MAPK.

Aparte de las fosforilaciones en el motivo TEY, las MAPKs también pueden fosforilarse en residuos adicionales por la acción de otras proteínas quinasas o por un fenómeno de autofosforilación, pudiendo dar lugar a cambios en la actividad catalítica, la localización subcelular o la interacción con otras proteínas, entre otros efectos. En el caso de Slt2, se ha identificado la fosforilación adicional de los residuos Ser423 y Ser428 cuando se activa a la ruta CWI con cafeína. Estas fosforilaciones son llevadas a cabo por las quinasas de control de ciclo Rad53 y Mec1/Tel1, respectivamente, y mientras que la fosforilación en la Ser423 provoca la inhibición de la unión de Slt2 al factor de transcripción Swi4, la fosforilación en la Ser428 no parece ejercer ningún impacto sobre la interacción Slt2-Swi4, siendo hasta el momento desconocida su función (Truman *et al.*, 2009).

El uso de técnicas de espectrometría de masas resulta muy útil para la realización de ensayos globales de fosfoproteómica que permiten la identificación de nuevos residuos fosforilados en las proteínas. De este modo, gracias a la realización de este tipo de ensayos en diferentes condiciones, se han podido identificar otros residuos de Slt2 que también se fosforilan: la Ser179, la Ser186, la Thr195, la Thr251, la Ser340, la Ser416, la Thr453 y la Thr456 (Breitkreutz *et al.*, 2010; Swaney *et al.*, 2013; Lanz *et al.*, 2021), si bien la posible implicación funcional de estas fosforilaciones requiere todavía una mayor investigación. En la **Figura 5** se muestran todos los residuos fosforilados identificados marcados en la secuencia de Slt2.

Para que cualquier proteína quinasa ejerza sus funciones correctamente, es necesario que disponga de una estructura que le permita fosforilar a sus sustratos mediante la interacción con una molécula de ATP y con el grupo fosfo-aceptor (Taylor *et al.*, 2012). La estructura de Slt2 está formada por dos mitades claramente diferenciadas: una parte N-terminal donde se encuentra el dominio quinasa (o catalítico) y una región C-terminal (**Figura 5**). Por un lado, el dominio quinasa está compuesto por doce subdominios canónicos de las proteínas quinasas (Hanks and Hunter, 1995), dentro de los cuales se sitúan elementos esenciales para la activación y actividad de Slt2. En los subdominios VII y VIII se encuentra el dominio de activación, donde, a parte del motivo TEY, hay una región P+1 que actúa como estabilizador de los sustratos de la MAPK (Yang *et al.*, 2005) y que contiene, además, al residuo Thr195 cuya delección afecta a la función catalítica de Slt2 (González-Rubio *et al.*, 2021b). En el subdominio VIb se encuentra el bolsillo catalítico, donde el ácido aspártico (Asp153 en Slt2) juega un papel importante en la catálisis (González-Rubio *et al.*, 2021a). En el subdominio II se localiza un residuo conservado de lisina (Lys54) que lleva a cabo un puente salino con el residuo Glu72 necesario para el acomodo del ATP y por tanto para la actividad quinasa de la proteína, de forma que, cuando este residuo se encuentra mutado (*slt2*^{K54F}), la MAPK es incapaz de llevar a cabo sus funciones de respuesta a estrés sobre la pared (Martín *et al.*, 1993). Aparte de esta lisina conservada, existe un residuo *gatekeeper* (Glu108) situado en el subdominio V que participa en el acceso del ATP a su sitio de unión (González-Rubio *et al.*, 2021a). Así, la mutación de este residuo por otro de menor tamaño se ha usado para obtener una versión de Slt2 sensible a análogos (Slt2-AS) que permite la inhibición específica y reversible de la MAPK haciendo uso de análogos voluminosos de ATP que pueden acomodarse en esta versión por disponer de un bolsillo catalítico más grande (Lopez *et al.*, 2014; Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016). Otros elementos para los que también se ha identificado una implicación en la actividad catalítica de Slt2 son: una zona rica en glicinas situada en el subdominio I, cuya Gly35 participa en la unión con el ATP y que está seguida de una valina conservada (Val37) que hace contacto hidrofóbico con la adenina del

INTRODUCCIÓN

ATP, y el residuo Gly173 situado al principio del dominio quinasa, el cual se une a iones Mg^{2+} para coordinar la orientación de los fosfatos del ATP (González-Rubio *et al.*, 2021a).

Por otro lado, Slt2 dispone de una región C-terminal característica de las MAPKs. En ella se sitúa un dominio de unión conservado conocido como *Common Docking* (CD), el cual permite la interacción de la MAPK con sus diferentes activadores, inhibidores y sustratos (Tanoue *et al.*, 2000; Palacios *et al.*, 2011), y dos dominios que intervienen en la actividad transcripcional (TADI y TADII) de Slt2 de manera independiente (Kim *et al.*, 2007). Además, en esta región también se encuentra una cola C-terminal extra característica de Slt2, como ocurre en su homóloga humana Erk5, y que no se encuentra en otras MAPKs. Se ha observado que esta zona extra y única de Slt2, que incluye una región de poliglutaminas, no es vital para su actividad catalítica pero sí que ejerce un papel en la inhibición de la propia autofosforilación de la MAPK (Levin-Salomon *et al.*, 2009; González-Rubio *et al.*, 2021b).



Figura 5. Esquema de la estructura primaria de Slt2 de *S. cerevisiae* (adaptada de González-Rubio *et al.*, 2021a). Se muestran los residuos fosforilados identificados mediante *Western Blotting* (rojo) y fosfoproteómica (azul). Los residuos implicados en funciones catalíticas están resaltados con fondo gris. Los subdominios (I-XI) del dominio quinasa están indicados en una caja azul debajo de la secuencia, y otras regiones importantes (zona rica en glicinas, bolsillo catalítico, dominio de activación, *Common Docking* (CD) y cola C-terminal) están marcadas con su color correspondiente. Las regiones con actividad transcripcional TAD I y TAD II están subrayadas en naranja.

1.3.6. Reguladores negativos.

La activación de las rutas de MAPKs debe estar minuciosamente controlada, siendo necesaria una regulación negativa que impida su activación excesiva y permita una vuelta a las condiciones basales tras la finalización del estímulo. Esta regulación negativa es llevada a cabo principalmente por las proteínas fosfatasa, que se clasifican en tirosín fosfatasa (PTPs), serín/treonín fosfatasa y fosfatasa de especificidad dual (DSPs), y son capaces de desfosforilar a las MAPKs en su residuo de tirosina, de treonina o en ambos, respectivamente (Saxena and Mustelin, 2000). En la ruta CWI, la MAPK Slit2 puede ser desfosforilada tanto por las tirosín fosfatasa Ptp2 y Ptp3 como por las de especificidad dual Msg5 y Sdp1 (Martín *et al.*, 2005; González-Rubio *et al.*, 2019). Asimismo, también existe una regulación negativa a nivel de las MAPKKs Mkk1/2 por la serín/treonín fosfatasa Ptc1, cuya ausencia da lugar a multitud de efectos fenotípicos relacionados con una hiperactivación de la ruta (Tatjer *et al.*, 2016). Por otro lado, la ubiquitinación y degradación de Pkc1 mediada por Upb3 constituye otro mecanismo de regulación negativa que se produce en la ruta CWI (Wang *et al.*, 2008).

1.3.7. Sustratos de Slit2.

Slit2 en su forma activa no solo está implicada en la remodelación de la pared celular, sino también en la regulación de distintas funciones celulares importantes como la dinámica del citoesqueleto de actina, la homeostasis del hierro, la progresión del ciclo celular o la mitofagia, entre otras. Las proteínas que son directamente fosforiladas por Slit2 y, por tanto, se consideran sustratos de esta MAPK, ejercen de intermediarios entre la activación de la ruta CWI y la modulación de estas funciones (González-Rubio *et al.*, 2022). Slit2, al igual que el resto de MAPKs, es una serín/treonín quinasa que reconoce y actúa sobre el motivo de fosforilación -S/T-P- (Roskoski, 2012), aunque la prolina de la posición +1 no está presente en algunos casos (Carlson *et al.*, 2011; González-Rubio *et al.*, 2022).

Entre los sustratos conocidos de Slit2, los que han sido estudiados en mayor profundidad son los factores de transcripción Rlm1 y SBF. En condiciones de activación de la ruta, Rlm1 es el elemento principal que conduce la respuesta transcripcional frente al daño en la pared celular, favoreciendo la expresión de proteínas de remodelación de la misma (Sanz *et al.*, 2022). A través de estudios de fosforilación *in vitro*, se detectaron los residuos Ser374, Ser427 y Ser439 como fosforilados por Slit2 y necesarios para la actividad transcripcional de Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002), aunque posteriormente se demostró la implicación también de otros sitios, ya

INTRODUCCIÓN

que la mutación adicional de otros siete residuos incluidos en motivos consenso de fosforilación por MAPKs, condujo a la inactivación completa de este factor de transcripción (Sanz *et al.*, 2018b). Adicionalmente, Rlm1 presenta un sitio de unión a MAPKs necesario para su interacción con Slt2 (Jung *et al.*, 2002). En menor medida, la respuesta transcripcional de la ruta CWI también se encuentra mediada por SBF, un complejo heterodimérico formado por la subunidad de unión a DNA Swi4 y por el activador transcripcional Swi6. En condiciones de estrés, Slt2 y/o su parólogo Mlp1 en sus formas activas e independientemente de su actividad catalítica se unen a Swi4 formando un complejo que se dirige a los promotores de un subgrupo específico de genes que se van a expresar. Entonces, Swi6 interacciona con este complejo, dando lugar al reclutamiento de la RNA polimerasa II necesaria para la transcripción. Finalmente, Slt2 fosforila a Swi6 en su residuo Ser238, lo que induce su salida del núcleo al citoplasma (Kim *et al.*, 2008; Truman *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2010). El factor SBF también está implicado en la regulación transcripcional de la fase G1 del ciclo celular; sin embargo, esta regulación parece no estar relacionada con la ruta CWI (Quilis *et al.*, 2021).

Más allá de Rlm1 y SBF, Slt2 regula la expresión de genes en respuesta a estrés mediante la fosforilación de la subunidad catalítica de la RNA polimerasa II Rpb1 y de los represores transcripcionales Ssn8 y Med13. En presencia de niveles altos de especies reactivas de oxígeno (ROS), Slt2 fosforila a Ssn8 y Med13 favoreciendo su salida del núcleo y degradación, lo que, además de permitir la expresión de genes de respuesta a estrés, provoca la fisión mitocondrial y el inicio de la muerte celular programada en las células (Jin *et al.*, 2014; Stieg *et al.*, 2018). En cuanto a Rpb1, cabe destacar que su fosforilación no se produce en un motivo -S/T-P- sino en una tirosina, constituyendo el único evento de fosforilación en tirosina por parte de Slt2 conocido hasta la fecha (Yurko *et al.*, 2017), aparte de la autofosforilación en el dominio TEY de activación que ocurre en ausencia de su cola C-terminal (Levin-Salomon *et al.*, 2009). Adicionalmente, Slt2 también se ha vinculado con el control epigenético de la expresión génica a través de la fosforilación de la proteína silenciadora Sir3 (Ai *et al.*, 2002; Ray *et al.*, 2003).

También se han descrito como sustratos de Slt2 otras proteínas con funciones diferentes a la regulación transcripcional. Los niveles de activación de la propia ruta CWI son modulados gracias a la retrofosforilación de algunos de sus elementos por parte de Slt2, como Rom2 y Mkk1/2, lo que da lugar a una regulación negativa que impide la hiperactivación de la ruta (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2009), o de Msg5, cuya fosforilación se ha propuesto como un mecanismo de inhibición de su acción sobre Slt2, lo que favorecería el mantenimiento de la activación de la MAPK (Flández *et al.*, 2004). Las rutas de señalización mediadas por la proteína quinasa PKA y por el complejo TORC2, implicadas en multitud de procesos celulares, también están reguladas por Slt2

en determinadas condiciones de estrés. Se ha visto que Bcy1, la subunidad reguladora de la PKA, puede fosforilarse de forma directa por Slt2 en su residuo Thr129 (no es un sitio -S/T-P-), provocando la inhibición de la actividad catalítica de la PKA (Soulard *et al.*, 2010). Asimismo, las subunidades Avo2 y Avo3 de TORC2 son fosforiladas por Slt2 en varios residuos, regulando negativamente la actividad de TORC2 sobre su efector Ypk1 (Leskoske *et al.*, 2018). De forma general, las MAPKs intervienen en la regulación del ciclo celular de los eucariotas. En esta línea, se ha descrito que la ruta CWI está involucrada en la parada del ciclo celular en condiciones de estrés a través de diferentes mecanismos (Quilis *et al.*, 2021). Entre ellos, se encuentra la fosforilación directa por parte de Slt2 de las proteínas Sic1 y Mrc1, lo que promueve la parada del ciclo en las fases G1 y S, respectivamente (Moreno-Torres *et al.*, 2017; Duch *et al.*, 2018). Slt2 también regula la exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma a través de la fosforilación de la proteína de unión a RNA Nab2 (Carmody *et al.*, 2010). Por último, existe una serie de proteínas que se han identificado como sustratos de Slt2, como Caf20, Rcn2 o Gga1, pero cuya fosforilación no se ha relacionado todavía con una función concreta (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016).

La fosforilación de los sustratos de Slt2 mencionados anteriormente se ha podido demostrar gracias al uso combinatorio de diferentes estrategias bioquímicas: ensayos quinasa *in vitro*, análisis del cambio en la movilidad electroforética de proteínas fosforiladas y uso de anticuerpos específicos que reconocen fosfo-proteínas, así como aproximaciones fosfoproteómicas, aunque en algunos casos no se han llegado a identificar los residuos implicados (González-Rubio *et al.*, 2022). Entre estas estrategias, el desarrollo de ensayos de fosfoproteómica mediante espectrometría de masas en diferentes condiciones de activación de la ruta CWI, como los que han llevado a cabo algunos investigadores (Mascaraque *et al.*, 2013; MacGilvray *et al.*, 2020; Dokládal *et al.*, 2021), resulta de especial interés para la detección de nuevos sustratos de Slt2, pues el carácter global y a gran escala de este tipo de ensayos permite identificar un alto número de proteínas fosforiladas.

1.3.8. Estímulos activadores.

Como se ha descrito anteriormente, la ruta CWI es la principal encargada de mantener la integridad de la pared celular de la levadura, permitiendo su regeneración en condiciones que afectan a su composición y estructura. Por ello, se ha estudiado en profundidad la respuesta de la ruta a diferentes compuestos que interfieren directamente con la pared celular. Entre ellos, se encuentran los ya mencionados RC y CFW que se unen a la quitina (Ketela *et al.*, 1999; García *et al.*, 2004), el complejo enzimático zimoliasa que tiene actividad β -1,3-glucanasa, proteasa y quitinasa

INTRODUCCIÓN

(Rodríguez-Peña *et al.*, 2013), o las equinocandinas que inhiben a la β -1,3-glucán sintasa (Reinoso-Martín *et al.*, 2003). Sin embargo, la existencia de múltiples funciones de Slr2 más allá de la biogénesis de la pared, indica que la ruta CWI es capaz de responder a otros estreses no relacionados con la estabilidad de la pared celular (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020b). Asimismo, existen estímulos que, aunque no tienen como diana principal a la pared celular, pueden afectar a su integridad de manera indirecta. En la **Tabla 1** se detallan los estímulos no específicos de pared celular que se han descrito como activadores de la ruta CWI, indicando el estrés que provocan e incluyendo en algunos casos algunas características como los sensores implicados en su detección, si se altera la activación o la sensibilidad de los mutantes de la ruta por la estabilización osmótica y si se produce despolarización de actina.

Tabla 1. Estímulos no específicos de pared celular que activan a la ruta CWI (adaptada de Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020b).

ESTRÉS	AGENTE/ ESTÍMULO	SENSOR	ESTABILIZACIÓN OSMÓTICA*	ACTINA **	REFERENCIAS
Mal plegamiento de proteínas	Tunicamicina	Wsc1	Sensibilidad: No		(Bonilla and Cunningham, 2003; Chen <i>et al.</i> , 2005; Babour <i>et al.</i> , 2010; Rousseau and Bertolotti, 2016)
	DTT				(Chen <i>et al.</i> , 2005; Mizuno <i>et al.</i> , 2018)
	β -mercaptoetanol				(Chen <i>et al.</i> , 2005)
	Fitoesfingosina (PHS)				(Piña <i>et al.</i> , 2018)
pH ácido	Ácido clorhídrico (pH 2.8)	Mid2	Sensibilidad: Sí Activación: No		(Claret <i>et al.</i> , 2005)
pH básico	KOH 35 mM (pH 8.2) / Tris 50 mM (pH 8.3)	Wsc1	Sensibilidad: Sí Activación: Sí	No	(Serrano <i>et al.</i> , 2006; Kwon <i>et al.</i> , 2016)
	Pn-AMP1 (péptido antimicrobiano catiónico)	Wsc1			(Kwon <i>et al.</i> , 2016)
Estrés de membrana	Mecanoestrés compresivo (presión 7 psi)	Mid2			(Mishra <i>et al.</i> , 2017)
	Mecanoestrés compresivo (presión 0.4 MPa)	Mid2			(Delarue <i>et al.</i> , 2017)
	Choque hipoosmótico			Sí	(Davenport <i>et al.</i> , 1995; Kamada <i>et al.</i> , 1995; Hatakeyama <i>et al.</i> , 2017)
	Dodecilsulfato sódico (SDS)			Sí	(Delley and Hall, 1999; Queralt and Igual, 2005)
	Clorpromazina				(Kamada <i>et al.</i> , 1995)

	Aceite de árbol del té/ Anfotericina B/ Nistatina				(Straede <i>et al.</i> , 2007)
	Ácido acético	Wsc1			(Mollapour and Piper, 2006; Mollapour <i>et al.</i> , 2009)
	Alta temperatura	Mid2 Wsc1	Sensibilidad: Sí Activación: Sí	Sí	(Kamada <i>et al.</i> , 1995; Verna <i>et al.</i> , 1997; Gray <i>et al.</i> , 1997; Ketela <i>et al.</i> , 1999; Rajavel <i>et al.</i> , 1999; Martín <i>et al.</i> , 2000; Mensonides <i>et al.</i> , 2005)
	Baja temperatura	Wsc1	Sensibilidad: Sí	No	(Córcoles-Sáez <i>et al.</i> , 2012)
Estrés oxidativo	Ácido 13-hidroperoxilinoico (LoaOOH)			Sí	(Alic <i>et al.</i> , 2003)
	Catecolaminas	Wsc1			(Staleva <i>et al.</i> , 2004)
	Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	Mtl1 Mid2 Wsc1	Activación: No	Sí	(Staleva <i>et al.</i> , 2004; Vilella <i>et al.</i> , 2005; Jin <i>et al.</i> , 2013)
	Diamida	Mtl1	Activación: Sí	Sí	(Vilella <i>et al.</i> , 2005)
	Cloroquina	Wsc1	Sensibilidad: Sí		(Baranwal <i>et al.</i> , 2014)
	Cadmio	Mid2			(Xiong <i>et al.</i> , 2015)
	Nanopartículas de óxido de Zinc	Wsc1			(Babele <i>et al.</i> , 2018)
	Ácido valproico		Sensibilidad: No		(Golla <i>et al.</i> , 2016)
Estrés genotóxico	Hidroxiurea		Sensibilidad: No Activación: No		(Queralt and Igual, 2005; Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012; Liu and Levin, 2018)
	Metil metano-sulfato (MMS)		Sensibilidad: No Activación: No		(Bandyopadhyay <i>et al.</i> , 2011; Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012; Liu and Levin, 2018)
	Pleomicina		Sensibilidad: No Activación: No		(Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012)
	Radiación UV		Sensibilidad: No/Sí (Bryan) Activación: No		(Bryan <i>et al.</i> , 2004; Soriano-Carot <i>et al.</i> , 2012)
	8-metoxipsoraleno (8-MOP)/UVA		Sensibilidad: Sí		(Dardalhon <i>et al.</i> , 2009)
Metaloides	Arsenito [As(III)]				(Ahmadpour <i>et al.</i> , 2016)
	Arsenato [As(V)]		Sensibilidad: Sí		(Matia-González and Rodríguez-Gabriel, 2011)
Inhibición de TORC1	Rapamicina	Mid2 Wsc1	Sensibilidad: Sí Activación: Sí	Sí	(Krause and Gray, 2002; Torres <i>et al.</i> , 2002; Soulard <i>et al.</i> , 2010; Moreno-Torres <i>et al.</i> , 2015)
	Cafeína		Activación: Sí		(Martín <i>et al.</i> , 2000; Kuranda <i>et al.</i> , 2006)

INTRODUCCIÓN

Despolimerización de actina	Latrunculina B	No	Activación: Sí	Sí	(Harrison <i>et al.</i> , 2001)
Estrés de carbonilo	Metilglioxal	No Wsc1/ Mid2		Sí	(Nomura and Inoue, 2015)
Otros	Quercetina				(Vilaça <i>et al.</i> , 2012)
	Cloruro de cesio		Sensibilidad: Sí		(Casagrande <i>et al.</i> , 2009)
	Vanadato de sodio		Activación: Sí		(Martín <i>et al.</i> , 2000)
	Etanol				(Udom <i>et al.</i> , 2019)

* Sensibilidad: si la sensibilidad al estímulo en cuestión de mutantes de delección en genes de la ruta se contrarrestó con estabilización osmótica. Activación: si la activación de Slt2 por el estímulo disminuyó en presencia de estabilización osmótica.

**Despolarización de actina.

El sorbitol se ha usado extensamente en el estudio de la ruta CWI como estabilizador osmótico con el fin de contrarrestar la falta de protección de una pared celular dañada. De este modo, la recuperación del crecimiento de mutantes de la ruta o la bajada en la activación de Slt2 en medios estabilizados osmóticamente es un indicador de si un estímulo concreto afecta a la pared celular (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020b). Por otro lado, se ha descrito la despolarización y repolarización de actina como un fenómeno ligado con la ruta CWI (Delley and Hall, 1999).

Respecto a los diferentes estímulos de la ruta identificados, cabe destacar la heterogeneidad en su naturaleza y en sus mecanismos de activación. Dos claros ejemplos de ello son: el estrés oxidativo, ya que para la detección de cada uno de los agentes oxidantes descritos actúa un sensor de la ruta diferente (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020b), y el estrés genotóxico, frente al que la activación de Slt2 se produce intracelularmente a través de la degradación proteosomal de la fosfatasa Msg5 en lugar de seguir el circuito de activación clásico (Liu and Levin, 2018).

1.4. Mecanismos de entrecruzamiento entre las rutas de señalización.

Las diferentes rutas de transducción de señales presentes en las células no actúan siempre de manera independiente en respuesta a sus estímulos específicos, sino que interaccionan entre ellas en determinadas condiciones.

Así, se ha visto que las rutas de MAPKs HOG y CWI interfieren en el proceso de apareamiento de la levadura a través de la inhibición de la ruta de apareamiento en ciertas situaciones de estrés (Van Droguen *et al.*, 2020). En primer lugar, se observó que en condiciones de hiperosmolaridad y

solamente en ausencia de Hog1, se activaba la ruta de apareamiento, sugiriendo un papel inhibitorio de esta MAPK sobre la activación de Fus3 y Kss1 (O'Rourke and Herskowitz, 1998). Posteriormente, se identificó la fosforilación por parte de Hog1 de la proteína adaptadora Ste50 y del represor de la traducción Rck2, los cuales limitan la activación de Fus3 y Kss1 en presencia de estrés hiperosmótico (Hao *et al.*, 2008; Nagiec and Dohlman, 2012). Asimismo, en un estudio reciente se ha observado que Hog1 regula a Cdc42 a través de su GAP Rga1, impidiendo la acción de esta proteína G en la ruta de apareamiento (Patterson *et al.*, 2021). La ruta CWI, por su parte, es capaz de reducir la señalización a través de la ruta de apareamiento en condiciones de estrés mecánico y estrés oxidativo mediante la fosforilación por parte de Pkc1 de la proteína de andamiaje Ste5, provocando su disociación de la membrana (Van Drogen *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020).

Por otro lado, se han detectado fenómenos de entrecruzamiento entre las rutas HOG y CWI en respuesta a determinados estímulos. La zimoliasa, que afecta de forma directa a la pared celular, provoca una activación de Slt2 que es dependiente del funcionamiento de la rama SHO1 de la ruta HOG (Bermejo *et al.*, 2008). De forma similar, en la activación de Slt2 en respuesta al detergente SDS también se requiere la participación de la ruta HOG, en este caso a través de su MAPKKK Ssk2. Además, se ha demostrado la interacción física entre las MAPKKs Mkk1 y Pbs2 y las MAPKs Slt2 y Hog1 (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020a), así como la interacción entre Ste11 (MAPKKK de la rama SHO1) y Mkk1 a través de Nst1 (Leng and Song, 2016). En otro estudio, se identificó la acumulación de glicerol como mediador del entrecruzamiento entre estas dos rutas (Laz *et al.*, 2020).

Más allá de la interacción de las rutas de MAPKs entre ellas, también se han identificado eventos de entrecruzamiento entre las rutas de MAPKs y otras rutas no-MAPKs presentes en la célula. Atendiendo a la ruta CWI, se han descrito múltiples situaciones en las que interactúa con otras vías de señalización o de regulación. Las rutas mediadas por la proteína quinasa PKA y el complejo TORC1, implicadas principalmente en el crecimiento celular en respuesta a nutrientes, están reguladas negativamente por la ruta CWI a distintos niveles en presencia de estrés. Así, el sensor Wsc1 media la activación y la inhibición de las rutas CWI y PKA, respectivamente, en respuesta a la caspofungina (García *et al.*, 2017) y Slt2 promueve la inactivación de la PKA a través de la fosforilación de su subunidad regulatoria Bcy1 en presencia de rapamicina (Soulard *et al.*, 2010). TORC1, por su parte, es inhibida cuando la levadura se expone a un estrés sobre el retículo endoplásmico de forma dependiente a Slt2 (Sánchez-Adriá *et al.*, 2022). Esta ruta, además, ejerce a su vez una regulación negativa de la ruta CWI en condiciones favorables para el crecimiento, a través del efector Sch9 (Dokládál *et al.*, 2021). La ruta mediada por el complejo TORC2 e implicada en la homeostasis de lípidos y proteínas también es regulada negativamente por Slt2, a través de

INTRODUCCIÓN

la fosforilación de sus subunidades Avo2/3 (Leskoske *et al.*, 2018). Por otro lado, la respuesta de la ruta CWI al estrés oxidativo requiere de la unión de Slt2 con las glutaredoxinas Grx3/4, unas proteínas esenciales para la homeostasis del hierro (Pujol-Carrion and De la Torre-Ruiz, 2017). En esta línea, la homeostasis del hierro es regulada a su vez por Slt2 a través de la fosforilación del factor de transcripción Aft1, dando lugar a su inactivación en condiciones de escasez de hierro (Pujol-Carrion *et al.*, 2021). La ruta de biosíntesis de trehalosa, un disacárido que se acumula en situaciones de estrés llevando a cabo una función protectora (Li *et al.*, 2009), también parece estar relacionada con la ruta CWI. En presencia de estrés térmico, la activación de Slt2 disminuye en un mutante carente de la enzima Tps1, lo que sugiere que la activación de la ruta en estas condiciones requiere de la acumulación de trehalosa en la célula (Mensonides *et al.*, 2005).

2. LOS ANTIFÚNGICOS AZÓLICOS.

En los últimos años, el número y la gravedad de las infecciones fúngicas ha aumentado considerablemente debido a un incremento de la población inmunocomprometida, en la que una infección fúngica invasiva puede llegar a ser mortal. Entre los hongos patógenos de humanos, *Candida albicans* y otras especies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans* y *Aspergillus fumigatus* son los causantes de la mayoría de las infecciones. La levadura *C. albicans*, además, es un componente habitual de la microbiota humana y responsable de infecciones superficiales muy comunes en individuos inmunocompetentes, como la candidiasis vaginal u orofaríngea (Pfaller and Diekema, 2010; Robbins *et al.*, 2017).

Dado que los hongos son organismos eucarióticos, el número de dianas selectivas disponibles para el desarrollo de terapias antifúngicas es limitado, por lo que sólo existe un número reducido de tipos de antifúngicos diferentes con utilidad para su uso en clínica, como son los azoles, que inhiben la síntesis del ergosterol, los polienos, que se unen al ergosterol alterando la membrana plasmática, las equinocandinas, que afectan a la pared celular, o las pirimidinas, que inhiben la síntesis de DNA (Robbins *et al.*, 2017; Wall and Lopez-Ribot, 2020). Entre ellos, los azoles son los antifúngicos más empleados en el mundo para el tratamiento de infecciones micóticas debido a su gran espectro de acción, su seguridad y su disponibilidad tanto en formulaciones orales como intravenosas. Su estructura se caracteriza por la presencia de uno o varios anillos azólicos de 5 átomos que incluyen dos (imidazoles) o tres (triazoles) átomos de nitrógeno (**Figura 6**) (Shapiro *et al.*, 2011).

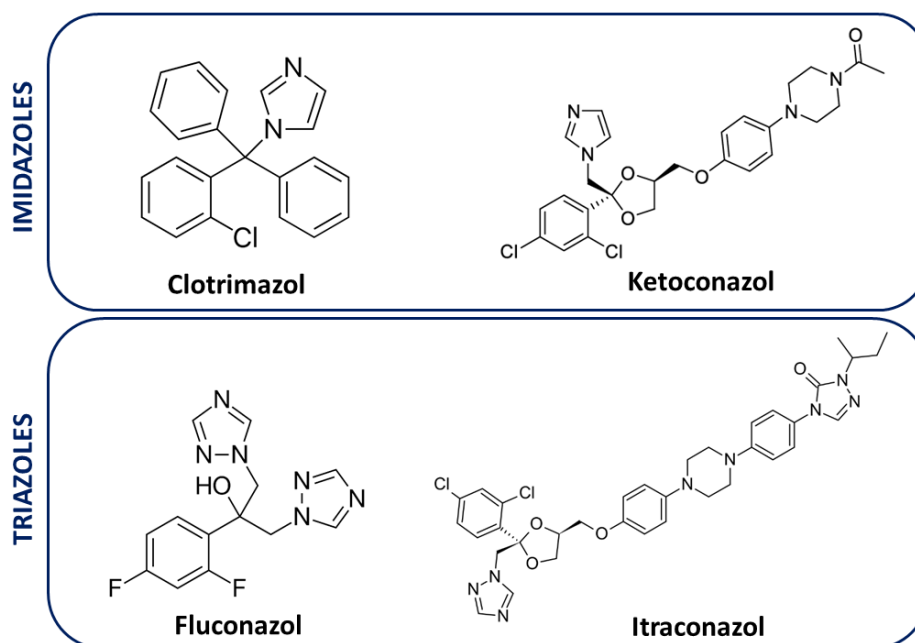


Figura 6. Estructura de dos imidazoles (clotrimazol y ketoconazol) y de dos triazoles (fluconazol e itraconazol).

El mecanismo de acción de los azoles se basa en la inhibición de la síntesis del ergosterol, un lípido de membrana presente en hongos, pero no en células animales, que ejerce un papel fundamental como bioregulador de la fluidez, asimetría e integridad de la membrana plasmática (Carrillo-Muñoz *et al.*, 2006). Esta inhibición se produce en el paso mediado por la enzima citocromo P450 (CYP450), también conocida como lanosterol 14 α -desmetilasa y codificada por el gen *ERG11*, la cual es bloqueada por los azoles a través de la unión de su grupo hemo con uno de los nitrógenos del anillo azólico. El resultado es una reducción significativa del ergosterol y una acumulación de intermediarios tóxicos, mediante la acción de Erg3 (**Figura 7**). Estos efectos, en última instancia, impiden el crecimiento y la división celular de los hongos e inducen estrés de membrana, lo que otorga a estos antifúngicos un carácter fungistático (Cowen and Steinbach, 2008).

INTRODUCCIÓN

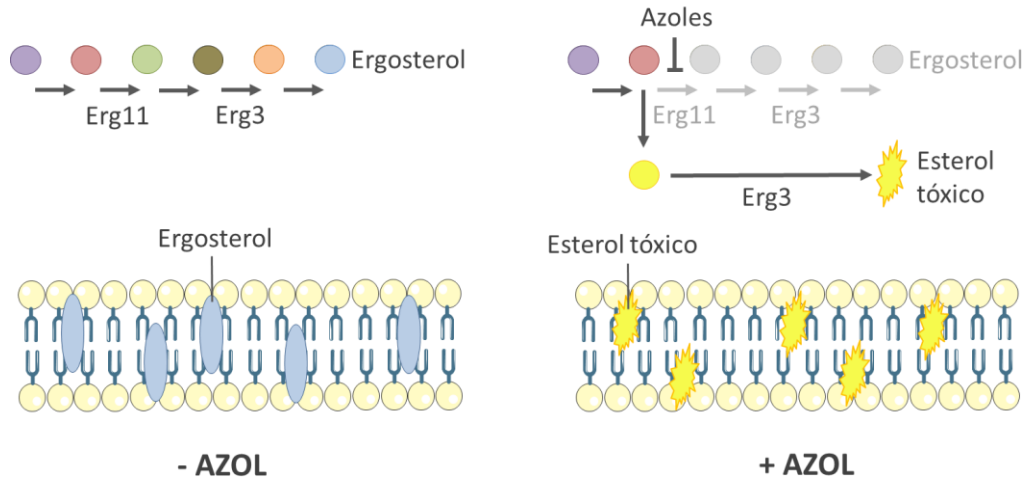


Figura 7. Mecanismo de acción de los azoles (adaptada de Cowen, 2008).

La aparición de cepas resistentes a los distintos antifúngicos y, en especial, a los azoles, es un problema emergente y que se asocia con el uso masivo de estos fármacos tanto en el ámbito clínico como en la agricultura (Fisher *et al.*, 2018). Algunos de los mecanismos de resistencia a azoles que han desarrollado los hongos patógenos son: la alteración de la enzima diana (Erg11), la sobreexpresión de bombas de expulsión, la pérdida de función de Erg3 o la activación de respuestas celulares al estrés (Cowen and Steinbach, 2008). Profundizando en este último mecanismo, se ha identificado a la chaperona Hsp90 como el principal regulador de la respuesta celular a azoles en *C. albicans*, función en la que también colaboran otros elementos implicados en señalización como la calcineurina y la ruta CWI, a través de su interacción con Hsp90 (Cowen *et al.*, 2008; Lafayette *et al.*, 2010).

2.1. Los imidazoles.

Los imidazoles fueron los primeros antifúngicos azólicos en descubrirse y utilizarse en clínica, y entre ellos destacan el clotrimazol, el ketoconazol, el miconazol y el econazol. Debido a que su selectividad hacia la enzima CYP450 de hongos no es suficientemente elevada y son capaces de inhibir a la misma enzima de mamíferos, su uso sistémico se ha asociado con la aparición de efectos secundarios serios. Por ello, actualmente tienen un uso predominantemente tópico, considerándose tratamiento de primera línea en muchas micosis superficiales (Allen *et al.*, 2015). A parte de la inhibición de la síntesis del ergosterol, se ha asociado a algunos imidazoles con un mecanismo de acción más complejo. Este es el caso del clotrimazol y el miconazol, para los cuales

se ha descrito un efecto fungicida a concentraciones elevadas relacionado con el daño directo en la membrana plasmática (Sud and Feingold, 1981; Fromtling, 1988). El tratamiento de *C. albicans* con miconazol, además, se ha asociado en diversas investigaciones con un incremento en los niveles de ROS de las células, lo que sugiere que este imidazol también es capaz de generar estrés oxidativo (Kobayashi *et al.*, 2002; François *et al.*, 2006; De Cremer *et al.*, 2016).

2.1.1. El clotrimazol.

El clotrimazol fue uno de los primeros imidazoles en desarrollarse, sintetizándose por primera vez en 1969. En la actualidad, su uso como antimicótico se centra en el tratamiento de infecciones superficiales como el pie de atleta (*tinea pedis*) y la candidiasis vaginal u orofaríngea (Fromtling, 1988; Crowley and Gallagher, 2014). Adicionalmente a su acción sobre los hongos, el clotrimazol también parece ejercer un papel antimicrobiano frente a otros microorganismos, como las bacterias del género *Mycobacterium* y *Streptomyces*, a través de la inhibición de sus citocromo P450 mono-oxigenasas (Mclean *et al.*, 2002), y el parásito causante de la malaria *Plasmodium falciparum*, mediante la inhibición de su hemoperoxidasa y un aumento del estrés oxidativo (Tiffert *et al.*, 2000; Trivedi *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha demostrado con ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* la actividad antiproliferativa del clotrimazol frente a diferentes tipos de cáncer, a través de una serie de mecanismos de acción diversos. Entre ellos, se encuentra la alteración de enzimas glicolíticas (Dummer *et al.*, 2005; McDonald *et al.*, 2019), la bajada de los depósitos de Ca²⁺ intracelular (Aktas *et al.*, 1998) o la inhibición de quinasas implicadas en señalización como la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K) (Furtado *et al.*, 2015). Esta variedad en las dianas y en las enfermedades sobre las que actúa el clotrimazol, hace que este compuesto resulte de especial interés para el desarrollo de futuros tratamientos.

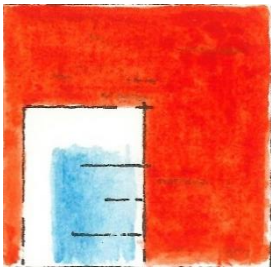
2.2. Los triazoles.

Los primeros triazoles (fluconazol e itraconazol) se descubrieron en la década de los 90, suponiendo un gran avance en el tratamiento de las infecciones fúngicas. Su mayor espectro de acción, su mayor selectividad hacia la enzima CYP450 de hongos y su mejor perfil farmacocinético hizo que sustituyeran rápidamente al ketoconazol en el tratamiento de infecciones sistémicas. El fluconazol en especial se ha utilizado extensamente como profilaxis y como terapia en diferentes tipos de infecciones (Maertens, 2004). De hecho, este fármaco es el azol que más se ha empleado

INTRODUCCIÓN

en estudios de susceptibilidad, de respuesta a estrés y de desarrollo de resistencias. En *C. albicans*, se ha visto que el fluconazol es capaz de activar a la ruta CWI a través de la fosforilación de su MAPK Mkc1 (Navarro-García *et al.*, 2005; Román *et al.*, 2016) y otros investigadores han observado una mayor susceptibilidad al fluconazol en mutantes de delección de diferentes genes de esta ruta (*PKC1*, *BCK1*, *SLT2* y *SWI4*) tanto en *S. cerevisiae* como en *C. albicans*, sugiriendo que el uso combinatorio del fluconazol con inhibidores de la ruta CWI podría considerarse una buena estrategia terapéutica (Lafayette *et al.*, 2010).

Por último, cabe mencionar que en las últimas décadas se han desarrollado nuevos triazoles considerados de “segunda generación” (voriconazol, posaconazol, isavuconazol y ravuconazol), que parten de análogos estructurales de los primeros triazoles, con el fin de conseguir fármacos más eficaces frente a infecciones sistémicas severas que en muchas ocasiones presentan resistencia a los azoles clásicos (Jović *et al.*, 2019).



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

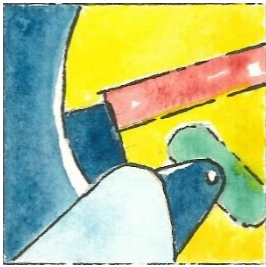
Dado el papel relevante que ejercen las rutas de MAPKs en la adaptación de las células eucarióticas a los cambios externos y su implicación en la regulación de múltiples funciones celulares esenciales, su estudio resulta de especial interés. Concretamente en nuestro grupo de investigación, nos hemos centrado en el análisis de la ruta de integridad de la pared celular (CWI) de *Saccharomyces cerevisiae*, abordando diferentes aspectos como la identificación de nuevos estímulos de la ruta, la elucidación de los mecanismos de activación y de regulación de la señalización a través de la ruta o el estudio de la funcionalidad de sus componentes, como la MAPK Slt2, entre otros.

Previamente a la realización de esta tesis doctoral, se llevó a cabo un *screening* con diferentes compuestos con el fin de encontrar algunos que fueran capaces de estimular a la ruta CWI. Entre ellos, el antifúngico clotrimazol resultó ser un potente activador, pues provocó un aumento considerable de la fosforilación de Slt2 junto con la aparición de una forma de menor movilidad electroforética de la MAPK que no había sido descrita para otros estímulos de la ruta.

Puesto que se ha estudiado poco cómo afectan los azoles a las rutas de MAPKs fúngicas, siendo este conocimiento útil para determinar cómo responden y se adaptan los hongos al tratamiento con estos antifúngicos e incluso poder desarrollar nuevas estrategias terapéuticas, decidimos profundizar en el papel de las rutas de MAPKs (en especial de la ruta CWI) en la respuesta de *S. cerevisiae* a los azoles, y concretamente al clotrimazol.

Para ello, se plantearon los siguientes objetivos:

- Caracterizar la señalización y la respuesta al clotrimazol a través de la ruta CWI y de otras rutas de MAPKs.
- Estudiar la forma de menor movilidad electroforética de fosfo-Slt2 característica del tratamiento con el clotrimazol.
- Analizar la fosforilación de proteínas provocada por el clotrimazol mediante un ensayo global de fosfoproteómica, profundizando en aquellas fosforilaciones dependientes de Slt2.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS.

Se utilizaron las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* detalladas en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo, su genotipo y su procedencia.

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	<i>Euroscarf</i> , Alemania
Y00993	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01328	Isogénica BY4741; <i>bck1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02724	Isogénica BY4741; <i>hog1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y07101	Isogénica BY4741; <i>pbs2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01561	Isogénica BY4741; <i>ssk1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06116	Isogénica BY4741; <i>sho1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02487	Isogénica BY4741; <i>mkk1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02112	Isogénica BY4741; <i>mkk2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y05280	Isogénica BY4741; <i>rom2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04700	Isogénica BY4741; <i>rom1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06028	Isogénica BY4741; <i>tus1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01784	Isogénica BY4741; <i>wsc1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y07814	Isogénica BY4741; <i>mid2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04653	Isogénica BY4741; <i>mtl1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02739	Isogénica BY4741; <i>rlm1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06109	Isogénica BY4741; <i>swi4Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04131	Isogénica BY4741; <i>swi6Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06913	Isogénica BY4741; <i>sod1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04718	Isogénica BY4741; <i>ctt1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01261	Isogénica BY4741; <i>tpk1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y01089	Isogénica BY4741; <i>tpk2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y05016	Isogénica BY4741; <i>tpk3Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y03265	Isogénica BY4741; <i>tps1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06692	Isogénica BY4741; <i>tps2Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y00847	Isogénica BY4741; <i>tps3Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06152	Isogénica BY4741; <i>tsl1Δ::kanMX4</i>	<i>Euroscarf</i>
YMJ29	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; mkk2Δ::kanMX4; mkk1Δ::SpHIS5</i>	(Jiménez-Sánchez <i>et al.</i> , 2007)
<i>pkc1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pkc1Δ::HIS3</i>	Dr. Javier Arroyo
CML128	<i>MATa; leu2-3,112; ura3-52; trp1; his4; can1^r</i>	(Gallego <i>et al.</i> , 1997)
MML344	Isogénica CML128; <i>pkc1::LEU2</i>	(De la Torre-Ruiz <i>et al.</i> , 2002)
WT-RLM1Myc	Isogénica BY4741; <i>RLM1-6MYC::HIS3</i>	(García <i>et al.</i> , 2016)
<i>slt2Δ</i> -RLM1Myc	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMX4; RLM1-6MYC::HIS3</i>	(García <i>et al.</i> , 2016)
WT-SWI6Myc	Isogénica BY4741; <i>SWI6-6MYC::LEU2</i>	(Sellers-Moya <i>et al.</i> , 2021)
<i>rlm1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>rlm1Δ::TRP1</i>	(Sanz <i>et al.</i> , 2018b)
BY4741-T	Isogénica BY4741; <i>trp1Δ::natMX6</i>	(Sellers-Moya <i>et al.</i> , 2021)
<i>bcy1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>bcy1Δ::kanMX4</i>	(García <i>et al.</i> , 2017)

Para el mantenimiento de plásmidos y la realización de técnicas de biología molecular, se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5α: *F'[K12Δ(lacZYA-argF) U169 deoR supE44thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 rtaI1(φ80lacZM15)] F'*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para su conservación durante largos periodos de tiempo, las cepas de levadura y de *E. coli* se mantuvieron a una temperatura de -80 °C en soluciones de glicerol al 50% y al 25% (v/v), respectivamente.

2. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

En general, se llevaron a cabo las técnicas básicas de biología molecular siguiendo los protocolos convencionales (Sambrook and Russel 2001; Ausubel *et al.*, 1993).

La extracción de DNA plasmídico de *E. coli* se realizó mediante lisis alcalina o mediante el empleo de los kits comerciales *NZTMiniprep* (Nzytech) o *Nucleospin plasmid* (MacheryNagel), siguiendo las instrucciones del fabricante. La pureza y concentración del DNA extraído se midió con un *Nanodrop 2000c* (Thermo Fisher Scientific).

La amplificación de DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo en un *MiniCycler PTC-150* (MJ Research), optimizando el protocolo y la elección de la enzima polimerasa según las necesidades. Las enzimas de restricción, la fosfatasa alcalina y la T4 DNA ligasa que se utilizaron para subclonación fueron suministradas por la casa comercial *Roche*, junto a sus respectivos tampones. El DNA se visualizó en geles de agarosa al 1% preparados en tampón TAE 1X (Tris Acetato 0.04 M, EDTA 0.1 mM) teñidos con solución del agente intercalante *Gel-Red* (Sigma). Para la obtención de imágenes se empleó el transiluminador de luz ultravioleta (UV) *MiniLumi* (DNR Bio-imaging systems) y el kit comercial *Gene-Clean* (Q-BIOgene-BIO101 systems) se usó para la elución del DNA de geles de agarosa.

La transformación de plásmidos en *E. coli* se realizó según el método de Inoue *et al.*, (1990) y la de *S. cerevisiae* empleando acetato de litio y polietilenglicol (PEG) (Ito *et al.*, 1983; Chen *et al.*, 1992).

La secuenciación de DNA fue realizada por la Unidad de Genómica de la UCM que cuenta con un secuenciador automático multicapilar *ABI Prism 3730* (Applied Biosystems).

Los plásmidos y oligonucleótidos empleados en este trabajo se encuentran detallados en las **Tablas 3 y 4**, respectivamente.

Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo, sus características y su procedencia.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA
pRS316	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pRS316-SLT2	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ SLT2</i>	(Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> , 2016)
pVD67	<i>Ori 2μ AmpR URA3 PKC1-GFP</i>	(Denis and Cyert, 2005)
pRS305myc	Integrativo <i>AmpR LEU2 6MYC</i>	Dr. Humberto Martín
pRS314	<i>Ori AmpR CEN6 TRP1 lacZ</i>	(Sikorski and Hieter, 1989)
pRS314-RLM1-HA	<i>Ori AmpR CEN6 TRP1 lacZ RLM1-HA</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2002)
pRS314-rlm1-3m-HA	<i>Ori AmpR CEN6 TRP1 lacZ rlm1-3m-HA</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2002)
pRS314-rlm1-L324A/V326A-HA	<i>Ori AmpR CEN6 TRP1 lacZ rlm1-L324A/V326A-HA</i>	(Jung <i>et al.</i> , 2002)
pRS314-rlm1-10m-HA	<i>Ori AmpR CEN6 TRP1 lacZ rlm1-10m-HA</i>	(Sanz <i>et al.</i> , 2018b)
pFA6a-natMX6	<i>Ori AmpR natMX6</i>	Dr. Humberto Martín
YEplac112-llv6-mCherry	<i>Ori 2μ AmpR TRP1 ILV6-mCherry</i>	(Fernández-Acero <i>et al.</i> , 2019)
p2313 (YEp351 SLT2-FLAG)	<i>Ori 2μ AmpR LEU2 lacZ SLT2-FLAG</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2007)
p2316 (YEp351 <i>slt2</i> ^{T190A,Y192F} -FLAG)	<i>Ori 2μ AmpR LEU2 lacZ slt2</i> ^{T190A,Y192F} -FLAG	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
pRS316- <i>slt2</i> ^{T190A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T190A}	(González-Rubio <i>et al.</i> , 2021b)
pRS316- <i>slt2</i> ^{Y192F}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{Y192F}	(González-Rubio <i>et al.</i> , 2021b)
pRS316- <i>slt2</i> ^{KD}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{KD}	(González-Rubio <i>et al.</i> , 2021b)
pRS316- <i>slt2</i> ^{T195V}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T195V}	(González-Rubio <i>et al.</i> , 2021b)
pRS316- <i>slt2</i> ^{Y143A,S146A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{Y143A,S146A}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{S179A,S186A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{S179A,S186A}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{S393A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{S393A}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{Y407A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{Y407A}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{T413A,S414A,S416A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T413A,S414A,S416A}	Este trabajo
p2826 (YEp351 <i>slt2</i> ^{S423A,S428A} -FLAG)	<i>Ori 2μ AmpR LEU2 lacZ slt2</i> ^{S423A,S428A} -FLAG	(Truman <i>et al.</i> , 2009)
pRS316- <i>slt2</i> ^{T251A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T251A}	Dra. Esmeralda Alonso
pRS316- <i>slt2</i> ^{ΔC374}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{ΔC374}	(González-Rubio <i>et al.</i> , 2021b)
pUC57- <i>slt2</i> -phosmut	<i>Ori AmpR lacZ slt2-phosmut</i>	GenScript
pRS316- <i>slt2</i> -phosmut	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2-phosmut</i>	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> -5m	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2-5m</i>	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{S445A}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{S445A}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{T453V}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T453V}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{T456V}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T456V}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{T467V}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T467V}	Este trabajo
pRS316- <i>slt2</i> ^{T453VT456V}	<i>Ori AmpR CEN6 URA3 lacZ slt2</i> ^{T453VT456V}	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo, su secuencia y la función para la que se emplearon.

NOMBRE	SECUENCIA 5' – 3'	FUNCIÓN
SWI6Myc Fw	<u>CTGACGAAATGCAAGATTTTTTAAAAAGCATGCTTCA</u> GCTATGGAGCAAAAGCTCATTTCTG	Fusión del gen <i>SWI6</i> al epítipo <i>6MYC</i> . Las zonas homólogas a <i>SWI6</i> están subrayadas. Se amplificó el plásmido pRS305myc que contiene la secuencia de <i>6MYC</i> y el fragmento obtenido se introdujo en la levadura para la recombinación con <i>SWI6</i> .
SWI6Myc Rv	<u>CAAATAAAGTCATAAAAAGTTAATGCAATGAAATCACAT</u> <u>GCCCTTTTTAAGCAAGGATTTTC</u>	
MLP1 Fw	TGAATTATCAAGAATGCACAAAAGC	Amplificación del gen <i>MLP1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real.
MLP1 Rv	TCCTTCCCTTCAAACATTGGTT	
CRG1 Fw	TCGATTTGGAGATATTGAAGTCACA	Amplificación del gen <i>CRG1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real.
CRG1 Rv	GCATTTGGGTCCGAAGGA	
PIR3 Fw	TCGTTGCCAACAGACAGTTC	Amplificación del gen <i>PIR3</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real.
PIR3 Rv	TACCTTCTGGGGTGATGGAC	
SRL3 Fw	TTCGTCCAAACATGCCAAA	Amplificación del gen <i>SRL3</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real.
SRL3 Rv	GACCAACGTAACGGCGAAA	
ACT1 Fw	ACGAAAGATTCAGAGCCCCA	Amplificación del gen <i>ACT1</i> mediante PCR cuantitativa a tiempo real.
ACT1 Rv	GCAGATTCCAAACCCAAAACA	
TRP1-nat Fw	<u>GCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGC</u> <u>TTGGCGTACGCTGCAGGTGCAC</u>	Interrupción del gen <i>TRP1</i> con la cassette natMX6. Las zonas homólogas a <i>TRP1</i> están subrayadas. Se amplificó el plásmido pFA6a-natMX6 y el fragmento obtenido se introdujo en la levadura para la recombinación con <i>TRP1</i> .
TRP1-nat Rv	<u>CAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAAC</u> <u>CTATTTCTTAGCATCGATGAATTCGAGCTCG</u>	
SLT2 Fw	CAATTCTGGGAGATGGCTG	Amplificación del gen <i>SLT2</i> completo. Se usaron como oligonucleótidos externos para llevar a cabo mutagénesis de <i>SLT2</i> por PCR solapante.
SLT2 Rv	CAAACCTCCGCGGAGTACG	
slt2^{Y143A,S146A} Fw	CAAATATTATGTGGTTTAAAGGCTATTCATGCCGCAGA TGTCTTGCATC	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en los residuos Y143 y S146 mediante PCR solapante.
slt2^{Y143A,S146A} Rv	GATGCAAGACATCTGCGGCATGAATAGCCTTTAAACCA CATAATATTTG	

<i>slt2</i> ^{S179A,S186A} Fw	GAGAATCCTGTGCGAAAACGCTCAATTTTTGACGGAG	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en los residuos S179 y S186 mediante PCR solapante.
<i>slt2</i> ^{S179A,S186A} Rv	GTTTTGACAGGATTCTCAGCATAACCTCGAGCTAAC	
<i>slt2</i> ^{S393A} Fw	GCAACAGCAGCCTGCTGATGTGGATAATGGC	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en el residuo S393 mediante mutagénesis dirigida.
<i>slt2</i> ^{S393A} Rv	GCCATTATCCACATCAGCAGGCTGCTGTTGC	
<i>slt2</i> ^{Y407A} Fw	GCAGCGAGTGAAGAAAATGCTCCAAAACAGATGGCC	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en el residuo Y407 mediante mutagénesis dirigida.
<i>slt2</i> ^{Y407A} Rv	GGCCATCTGTTTTGGAGCATTCTTCACTCGCTGC	
<i>slt2</i> ^{T413A,S414A,S416A} Fw	CCAAAACAGATGGCCGCTGCTAATGCTGTTGCGCCACA ACAAG	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en los residuos T413, S414 y S416 mediante PCR solapante.
<i>slt2</i> ^{T413A,S414A,S416A} Rv	GGCCATCTGTTTTGGAGCATTCTTCACTCGC	
Ext <i>SLT2</i> Fw	GCTATGACCATGATTACGCC	Obtención de la construcción pRS316- <i>slt2</i> -5m mediante PCR solapante usando como moldes los plásmidos pRS316-SLT2 y pRS316- <i>slt2</i> -phosmut.
Ext <i>SLT2</i> Rv	CACTATAGGGCGAATTGGAGC	
<i>slt2</i> -5m Fw	GGCATGATGCAGATTTCCAC	
<i>slt2</i> -5m Rv	GTGGGAAATCTGCATCATGCC	
<i>slt2</i> ^{S445A} Fw	CCTCGACCTCAAGAGGCTATGATGGAGATGAG	
<i>slt2</i> ^{S445A} Rv	CTCATCTCCATCATAGCCTCTTGAGGTCGAGG	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en el residuo S445 mediante mutagénesis dirigida.
<i>slt2</i> ^{T453V} Fw	GAGATGAGACCTGCCGTTGGAAATACCGCAG	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en el residuo T453 mediante mutagénesis dirigida.
<i>slt2</i> ^{T453V} Rv	CTGCGGTATTTCCAACGGCAGGTCTCATCTC	
<i>slt2</i> ^{T456V} Fw	CCTGCCACTGGAAATGTTGCAGATATTCCGCC	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en el residuo T456 mediante mutagénesis dirigida.
<i>slt2</i> ^{T456V} Rv	GGCGGAATATCTGCAACATTTCCAGTGGCAGG	
<i>slt2</i> ^{T467V} Fw	CAGAATGATAACGGCGTTCTTAGACCTTG	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en el residuo T467 mediante mutagénesis dirigida.
<i>slt2</i> ^{T467V} Rv	CAAGGTCTAGAAGAACGCCGTTATCATTCTG	
<i>slt2</i> ^{T453V,T456V} Fw	GAGATGAGACCTGCCGTTGGAAATGTTGCAGATATTCC GCC	Mutagénesis del gen <i>SLT2</i> en los residuos T453 y T456 mediante mutagénesis dirigida.
<i>slt2</i> ^{T453V,T456V} Rv	GGCGGAATATCTGCAACATTTCCAACGGCAGGTCTCAT CTC	

2.1. Obtención de construcciones y mutantes mediante PCR solapante.

Tanto para la obtención del plásmido pRS316-*slt2*-5m como de algunos mutantes en el gen *SLT2* se empleó la técnica de PCR solapante, para la que se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, unos externos y otros internos parcialmente solapantes en al menos 15 nucleótidos. Primero se

MATERIALES Y MÉTODOS

llevaron a cabo dos reacciones de PCR paralelas con ambas parejas de oligonucleótidos (formadas por uno interno y otro externo) y, posteriormente, los fragmentos solapantes resultantes de cada una de las reacciones se usaron como molde para una segunda reacción de PCR con los oligonucleótidos externos. El producto final se digirió con las enzimas de restricción correspondientes y se subclonó en el plásmido deseado. En el caso de los mutantes, los oligonucleótidos internos incluían la mutación deseada.

2.2. Mutagénesis dirigida.

Otros mutantes puntuales del gen *SLT2* se obtuvieron mediante la técnica de mutagénesis dirigida (Wang and Malcolm, 1999) empleando el kit *QuickChange II Site-directed Mutagenesis kit* (Agilent). Para ello, se diseñaron unos oligonucleótidos específicos siguiendo las instrucciones de la casa comercial que contenían la mutación deseada, y se llevó a cabo la PCR con la polimerasa *Pfu Turbo* que es de alta procesividad y fiabilidad. Como molde se empleó el plásmido sin la mutación. La PCR mutagénica se llevó a cabo mediante dos reacciones sucesivas: una primera reacción de corta duración dividida en dos mezclas separadas (cada una con solo uno de los oligonucleótidos mutagénicos) y una segunda reacción más larga donde se juntaron ambas mezclas con los dos oligonucleótidos. El resultado de esta segunda reacción se trató con la enzima de restricción *DpnI* que únicamente digiere DNA metilado, eliminando el DNA molde y dejando solo el DNA sintetizado *de novo* en la PCR y que contiene la mutación deseada. El producto se transformó directamente en *E. coli* y se comprobó mediante secuenciación.

3. CULTIVO Y MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

3.1. Medios de cultivo.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas fueron cultivadas de forma rutinaria en medio no selectivo YPD (1% extracto de levadura, 2% peptona y 2% glucosa) a una temperatura entre 24 y 30 °C según el experimento. Las cepas mutantes *pkc1Δ* se cultivaron en medio YPD suplementado con sorbitol 1 M. Para la selección de transformantes y el mantenimiento de los plásmidos se utilizó el medio mínimo sintético SD (0.17% base nitrogenada para levaduras, 0.5% sulfato amónico y 2% glucosa), suplementado con 1.24 g/L de una mezcla de aminoácidos comercial (*Formedium*). Los aminoácidos o bases nitrogenadas leucina, triptófano, uracilo, histidina, tirosina y lisina se añadieron *a posteriori*, evitando aquel empleado para la selección de transformantes. Las células de *E. coli* fueron

cultivadas en medio LB (1% triptona, 0.5% extracto de levadura y 1% cloruro sódico) suplementado con el antibiótico ampicilina o nourseotricina a una concentración de 100 µg/mL para la selección de transformantes, a una temperatura de 37 °C.

Para la preparación de todos los medios de cultivo se utilizó agua desionizada purificada mediante el sistema *Millipore (Mili-Ro)* y la esterilización se llevó a cabo con autoclave a una temperatura de 121 °C y una presión de 1 atm durante 20 minutos.

Para la obtención de medios sólidos se añadió agar al 2% previamente a la esterilización. Una vez atemperados, se añadieron compuestos en los casos indicados y se distribuyeron sobre placas Petri estériles.

3.2. Cultivo y recogida de células de levadura.

Primero las cepas se cultivaron en medio de cultivo líquido YPD (suplementado con sorbitol 1 M en el caso de *pkc1Δ*) o SD (si las cepas se encontraban transformadas con plásmidos) en agitación a 180 rpm y a una temperatura de 24 - 30 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de los cultivos con un espectrofotómetro *Beckman DU640 (Beckman)* y se refrescaron a una DO_{600} de 0.3 en medio YPD. Posteriormente se llevó a cabo una incubación de 2 horas en agitación a la misma temperatura para que las levaduras comenzaran su fase de crecimiento exponencial. Transcurridas las dos horas, se añadieron a los cultivos los compuestos a ensayar menos en el caso del cultivo control sin tratamiento y se incubaron durante el tiempo indicado para cada experimento. Las células se recogieron mediante centrifugación a 4 °C y 2600 rpm durante 3 minutos. Una vez se eliminaron los sobrenadantes, las células se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta su procesamiento.

4. COMPUESTOS UTILIZADOS.

Se utilizaron hasta 4 antifúngicos de tipo azol diferentes: clotrimazol, ketoconazol, itraconazol y fluconazol (*Sigma*) que se disolvieron en DMSO. Otros compuestos que se emplearon fueron rojo Congo (*Merck*), cafeína (*Sigma*), zimoliasa 100T (*MP Biomedicals*), tunicamicina (*Sigma*), N-acetilcisteína (*Sigma*) y clorpromazina (*Sigma*), que se disolvieron en agua estéril.

5. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A DIFERENTES COMPUESTOS.

5.1. Ensayo de sensibilidad a azoles en medio líquido.

El ensayo se llevó a cabo en placas de 96 pocillos, dónde se realizaron 10 diluciones seriadas 1:2 de los azoles partiendo de una concentración de 100 µg/mL. Para ello, en la primera columna de pocillos se dispensaron 150 µL de medio líquido YPD suplementado con los distintos azoles y en el resto de los pocillos 75 µL del medio sin antifúngicos. A continuación, se realizaron las correspondientes diluciones transfiriendo 75 µL de un pocillo al siguiente menos en el último, que ejerció de control positivo de crecimiento sin compuesto. Los cultivos de células que estuvieron creciendo la noche anterior a 30 °C se ajustaron a una DO₆₀₀ de 0.01 en medio YPD y se añadieron 75 µL de estas suspensiones a cada pocillo, obteniendo una DO₆₀₀ de partida de 0.005. Para cada azol se realizó un blanco, utilizando una fila completa con todas las diluciones dónde no se añadió la suspensión de células. Finalmente, las placas multipocillo se incubaron a 30 °C en estático durante 24 horas y se midieron las densidades ópticas a 595nm en un lector de placas *Microplate Reader Model 680 (Bio-Rad)*.

5.2. Ensayo de crecimiento en gota mediante diluciones decimales seriadas.

Las cepas se cultivaron en medio YPD o SD durante toda la noche a 30 °C y al día siguiente los cultivos se ajustaron a una DO₆₀₀ de 0.5 en 200 µL de agua estéril. Utilizando placas de 96 pocillos, se realizaron 3 diluciones seriadas 1:10 transfiriendo 20 µL sucesivamente al resto de pocillos, que contenían 180 µL de agua estéril.

Posteriormente, las diluciones se sembraron con un replicador *Multi-blot replicator VP407 (V&P Scientific, INC)* en placas petri con medio YPD sólido sin suplementar o suplementado con los diferentes compuestos a las concentraciones indicadas. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas.

6. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE WESTERN BLOTTING.

6.1. Obtención de extractos proteicos.

Las células se cultivaron y recogieron como se describe en el apartado 3.2., y se descongelaron para la extracción de proteínas. Una vez descongeladas, se resuspendieron en una proporción de 150 µL por 25 mL de volumen de cultivo recogido de tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, 10%

glicerol, 1% Tritón X-100, 0.1% SDS, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, y los inhibidores de fosfatasa NaF 50 mM, β -glicerol fosfato 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM y ortovanadato sódico 1 mM) suplementado con el cóctel de inhibidores de proteasas *Pierce™ Protease Inhibitor Mini Tablets EDTA-Free* (Thermo Fisher Scientific) en una proporción de 1 disco por 10 mL de tampón de lisis, ditioneitol (DTT) a 10 mM y el inhibidor de proteasas fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) a 3 mM. Posteriormente se añadió a cada suspensión 1/3 del volumen de bolas de vidrio de 0.75-1 mm de diámetro y se llevó a cabo la rotura mecánica de las células usando la *FastPrep-24* (MP Biomedicals), con dos ciclos de 30 segundos a 5.5 m/s. Las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 13000 rpm y se determinó la concentración proteica de los sobrenadantes, midiendo su absorbancia a 280 nm en el espectrofotómetro *Beckman DU 640*. Se ajustaron todas las muestras a una misma concentración de proteínas y se realizaron mezclas 1:1 con tampón de carga SDS-PAGE 2X (Tris-HCl 125 mM pH 6.8, 5% SDS, 25% glicerol, 0.6 g de azul de bromofenol y DTT 0.25 M) que se hirvieron durante 5 minutos a 99 °C para la desnaturalización proteica.

6.2. Electroforesis, transferencia e inmunodetección de proteínas.

Para la separación de las proteínas, se llevó a cabo una electroforesis en condiciones desnaturalizantes o SDS-PAGE (*SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) en un soporte compuesto de un gel separador al 10% (10% mezcla acrilamida-bisacrilamida al 30%, Tris-HCl 0.38 M pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfato amónico (PSA) y 1.3 μ L/mL tetrametiletilendiamina (TEMED)) y un gel concentrador al 5% (5% mezcla acrilamida-bisacrilamida al 30%, Tris-HCl 0.25 M pH 6.8, 0.1% SDS, 0.1% PSA y 2 μ L/mL TEMED).

Se cargaron en cada pocillo 10-15 μ L de muestra, así como 2 μ L del patrón de pesos moleculares (*Abcam*) como referencia del tamaño de las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo en cubetas *Mini-PROTEAN Tetra System* (Bio-Rad) con tampón de electroforesis (Tris base 25 mM, glicina 192.6 mM y 0.1% SDS) a un voltaje constante de 120-150 voltios durante 1 hora y media aproximadamente.

Posteriormente, las proteínas del gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μ M (*Amersham, Healthcare Life Sciences*). Para ello, se llevó a cabo una transferencia en condiciones de humedad empleando papel *Whatman 3MM Chr* y esponjas como material protector y absorbente, en cubetas *Mini Trans-Blot Transfer Cell* (Bio-Rad) con tampón de transferencia (Tris base 48 mM, glicina 38.6 mM, 0.037% SDS y 20% etanol) a un voltaje constante de 110 voltios durante 1 hora.

MATERIALES Y MÉTODOS

Una vez obtenida la membrana de nitrocelulosa con las proteínas, se realizó el bloqueo con una solución de leche desnatada al 5% en PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después, se incubó con la solución de anticuerpo primario durante toda la noche a 4 °C. Transcurrido el tiempo, se lavó la membrana 5 veces durante 5 minutos con PBS-Tween-20 al 0.1% (PBS-T), y se incubó con la solución de anticuerpo secundario conjugado a fluorocromo durante 1 hora a temperatura ambiente y en oscuridad. Para la visualización de las proteínas, se realizó un último ciclo de 5 lavados para retirar el anticuerpo secundario y se escaneó la membrana con el sistema *Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences)*.

Cada solución de anticuerpo se preparó con 4 mL de PBS-T, 1 mL de leche al 5% y el volumen correspondiente de anticuerpo para obtener la dilución deseada. Los anticuerpos empleados en este trabajo se encuentran recogidos en la **Tabla 5**.

La cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó mediante el procesamiento de las imágenes con el programa *Image Studio (LI-COR Biosciences)*.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados en este trabajo, sus características, la dilución que se usó y la casa comercial de procedencia.

NOMBRE	CARACTERÍSTICAS	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182 #9215)	Monoclonal de conejo	1:500	<i>Cell signaling</i>
Anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204 #4370)	Monoclonal de conejo	1:1000	<i>Cell signaling</i>
Anti-G6PDH	Policlonal de conejo	1:50000	<i>Sigma</i>
Anti-Slt2 (E-9)	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Anti-Myc (4A6)	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>Merck</i>
Anti-HA (12CA5)	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>Sigma</i>
Anti-Hog1 (γ215)	Policlonal de conejo	1:1000	<i>Santa Cruz Biotechnology</i>
Anti-actina (C4)	Monoclonal de ratón	1:1000	<i>MP Biomedicals</i>
IRDye 680CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (rojo)	1:5000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 800CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (verde)	1:5000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 680CW Goat anti-mouse	Ac. secundario de ratón (rojo)	1:5000	<i>LI-COR Biosciences</i>
IRDye 800CW Goat anti-mouse	Ac. secundario de ratón (verde)	1:5000	<i>LI-COR Biosciences</i>

7. ENSAYO CON FOSFATASA ALCALINA.

Se llevó a cabo la extracción de proteínas de las células recogidas como está descrito en el apartado 6.1., pero usando un tampón de lisis especial (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, NaF 50 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, β -glicerol-fosfato 50 mM, 0.1% NP 40 y 10% glicerol), sin detergentes y sin ortovanadato de sodio y EDTA, suplementado con 3 mM de PMSF y el cóctel de inhibidores de proteasas. Una vez obtenidos los extractos proteicos, se incubaron 200 μ L de estos con 40 μ L de la resina *FLAG-Sepharose beads* (Sigma) a 4 °C durante toda la noche en rotación. Posteriormente, la resina se lavó de forma exhaustiva con tampón de fosfatasa alcalina (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, $MgCl_2$ 10 mM y DTT 1 mM, ajustado a pH 7.9) y se resuspendió en 400 μ L de este tampón. Cuando se indica, se añadió a las muestras 15 μ L de fosfatasa alcalina de intestino de ternero (CIAP) y 40 μ L del inhibidor de fosfatasas ortovanadato de sodio (Na_3VO_4) a 100 mM para obtener una concentración final aproximada de 10 mM. Las muestras se incubaron entonces a 37 °C durante 1 hora y se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto. La resina precipitada se resuspendió en 20 μ L de tampón de carga SDS-PAGE 2X, se hirvieron las muestras a 99 °C durante 5 minutos y se llevó a cabo la electroforesis, transferencia e inmunodetección de las proteínas como se indica en el apartado 6.2.

8. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS CON Zn^{2+} -PHOS-TAG SDS-PAGE.

Se llevó a cabo la extracción de proteínas de las células recogidas como está descrito en el apartado 6.1., usando el mismo tampón de lisis, pero sin EDTA. Para llevar a cabo la separación de las diferentes formas fosforiladas de las proteínas, se realizaron geles de electroforesis compuestos de un gel separador al 8% (8% mezcla acrilamida-bisacrilamida al 30%, Bis-Tris/HCl 350 mM pH 6.8, solución *Phos-tag* AAL 20 μ M (Fujifilm Wako Chemicals), $ZnCl_2$ 40 μ M, 0.1% TEMED y 0.05% PSA) y un gel concentrador al 4.5% (4.5% mezcla acrilamida-bisacrilamida al 30%, Bis-Tris/HCl 350 mM pH 6.8, 0.1% TEMED y 0.05% PSA). La solución de *Phos-tag* AAL y el $ZnCl_2$ presentes en el gel separador son capaces de interactuar con los fosfatos de las proteínas, cambiando el peso molecular de estas y por tanto su movilidad en el gel.

Se cargaron 15 μ L de las muestras en el gel junto a 2 μ L del patrón de pesos moleculares. La electroforesis se llevó a cabo con un voltaje constante de 120 voltios durante 2 horas aproximadamente, utilizando un tampón de electroforesis compuesto de 200 mL de *Pre-Running buffer* (Tris base 0.5 M, MOPS 0.5 M y 0.5% SDS), 10 mL de bisulfito de sodio 0.5 M y 790 mL de agua destilada. Una vez finalizada la electroforesis, se realizaron 2 lavados de 10 minutos del gel

MATERIALES Y MÉTODOS

con 50 mL de tampón de transferencia (Tris base 48 mM, glicina 38.6 mM, 0.037% SDS y 10% metanol) incluyendo EDTA 5 mM y otro lavado de 10 minutos con el mismo tampón sin EDTA, para facilitar la retirada de los iones Zn^{2+} e impedir la alteración de la transferencia. Finalmente, la transferencia de las proteínas a una membrana y su inmunodetección se realizó como está descrito en el apartado 6.2.

9. MEDIDA DEL ESTRÉS OXIDATIVO POR CITOMETRÍA DE FLUJO.

Las células de levadura se cultivaron como está descrito en el apartado 3.2. a una temperatura de 24 °C y se separó 1 mL de cada muestra en los tiempos deseados. Para la detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de variaciones en el potencial de membrana mitocondrial, se añadió a cada mL recogido 2.5 $\mu\text{g/mL}$ de dihidroetidido (DHE) (*Sigma*) y 5 $\mu\text{g/mL}$ de rodamina 123 (*Sigma*), respectivamente. Las muestras con DHE se incubaron durante 5 minutos y las de rodamina 123 durante 30 minutos, a 24°C en agitación y oscuridad. Para realizar las medidas, las muestras se diluyeron 1:10 en PBS y se analizaron en la Unidad de Citometría de Flujo y Microscopía de Fluorescencia de la UCM, con un citómetro de flujo *FACScalibur* (*Beckton Dickinson*). Se empleó un láser de excitación de 488 nm y filtros de emisión de 530/30 nm (FL1) para la rodamina 123 y de 585/42 nm (FL2) para el DHE. Los datos se analizaron con el *software FlowJo* (*Becton Dickinson*).

10. MICROSCOPIA DE FLUORESCENCIA Y TINCIÓN DE ACTINA.

Para la visualización microscópica de levaduras marcadas con fluorocromos, las células se cultivaron como en el apartado 3.2. a una temperatura de 24 °C y se recogieron las muestras deseadas centrifugando 1 mL de cultivo a 3000 rpm. La visualización se llevó a cabo en el microscopio de fluorescencia *Eclipse TE2000U* (*Nikon*). Las imágenes digitales tanto de fluorescencia como de luz visible fueron captadas mediante la utilización de una cámara *Orca C4742-95-12ER* (*Hamamatsu*) acoplada al microscopio y procesadas con el programa *HCIImage* (*Hamamatsu*). Posteriormente se usó el *software* libre *Fiji* para un mayor procesamiento de las imágenes.

La tinción del citoesqueleto de actina se realizó sobre células fijadas con rodamina-faloidina (Jiménez *et al.*, 1998). Para ello, una vez las células fueron tratadas con el estímulo correspondiente y recogidas por centrifugación, se fijaron con formaldehído al 8% y se incubaron a 4 °C durante 1 hora. A continuación, se realizaron hasta cuatro lavados con tampón 1 (3 mL KH_2PO_4 1 M, 3 mL

MgCl₂ 0.1 M, 1.5 mL EGTA 0.2 M y 22.5 mL agua) y las células se resuspendieron en 100 µL de este tampón y 50 µL de tritón X-100 al 1%. Después de una incubación de 2 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron a 3000 rpm durante 1 minuto y se lavaron 3 veces con 500 µL de PBS. Las células se mantuvieron así a 4°C durante toda la noche y al día siguiente se tiñeron con 4 µL (concentración final 4 ng/mL) de la solución de rodamina-faloidina, incubándose 1 hora en oscuridad y a temperatura ambiente. Finalmente, las células se lavaron 3 veces con 500 µL de PBS y se resuspendieron en 100 µL para llevar a cabo la visualización en el microscopio de fluorescencia.

11. PCR CUANTITATIVA CON TRANSCRIPCIÓN REVERSA A TIEMPO REAL (RT-qPCR).

Las células se cultivaron a 24 °C y recogieron como se describe en el apartado 3.2., recogiendo un volumen de 5 mL de cada muestra. La extracción del RNA se hizo con el sistema comercial *Nucleospin RNA Mini Kit for RNA purification (Macherey-Nagel)*, siguiendo las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del RNA extraído se comprobó midiendo la absorbancia a 260 nm en un *Nanodrop 2000c*.

La síntesis de cDNA y los ensayos de RT-qPCR se llevaron a cabo en la Unidad de Genómica de la UCM según esta descrito (García *et al.*, 2004), usando el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)*. Para obtener los resultados de cuantificación, la abundancia de cada gen se normalizó respecto al gen de expresión constitutiva *ACT1* y el valor final de expresión relativa se calculó siguiendo el método $2^{-2\Delta\Delta Ct}$ (Livak and Schmittgen, 2001).

Los oligonucleótidos empleados se detallan en la **Tabla 3**, y fueron cedidos por el laboratorio del Dr. Javier Arroyo del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la UCM.

12. ENSAYOS DE FOSFOPROTEÓMICA.

12.1. Análisis por fosfoproteómica de *Slt2-FLAG*.

Las células se cultivaron a 24 °C como se describe en el apartado 3.2., y se recogió un volumen de 500 mL por muestra centrifugando en frío a 2600 rpm durante 3 minutos. Los sedimentos de células se mantuvieron en hielo y se procedió a la extracción proteica siguiendo los pasos descritos en el apartado 6.1., con un tampón de lisis sin detergentes (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 5 mM, NaF 50 mM, pirofosfato de sodio 5 mM, β-glicerol-fosfato 50 mM, ortovanadato de

MATERIALES Y MÉTODOS

sodio 1 mM, 0.1% NP40 y 10% glicerol) suplementado con 3 mM de PMSF y el cóctel de inhibidores de proteasas. Una vez obtenidos los extractos proteicos de cada condición, estos se repartieron entre 3 tubos con 50 μ L de la resina *FLAG-Sepharose beads*, y la mezcla se incubó a 4 °C durante toda la noche en rotación. Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 1 minuto y se desecharon los sobrenadantes. Las resinas se lavaron con 500 μ L de tampón de lisis 3 veces, y finalmente se resuspendieron con tampón de carga SDS-PAGE 5X (Tris-HCl 310 mM pH 6.8, 15% SDS, 25% β -mercaptoetanol, 20% glicerol y 1 g de azul de bromofenol) según el volumen final de resina obtenido. Las muestras se cargaron en un gel de acrilamida al 10%, y una vez transcurrida la electroforesis, el gel se tiñó con una solución de azul de Comassie durante 1 hora. Paralelamente, se cargó otro gel con las mismas muestras y se llevó a cabo un *Western Blotting* de comprobación como se describe en el apartado 6.2.

Todos los pasos que se describen a continuación se llevaron a cabo en la Unidad de Proteómica de la UCM. Las bandas correspondientes a la proteína Slt2-FLAG purificada se detectaron gracias a la tinción con el azul de Comassie, y se cortaron para llevar a cabo la digestión con tripsina. Se realizó de manera secuencial una reducción con DTT, una alquilación con iodoacetamida, y finalmente la digestión en una ratio 1/20 (w/w) con tripsina recombinante (*Roche*) durante toda la noche a 37 °C. Los péptidos resultantes se desalaron y concentraron con una comatografía de fase reversa usando el equipo OMIX C18 (*Agilent technologies*). Finalmente, las muestras se secaron por centrifugación a vacío con un *SpeedVac (Savant)*, se reconstituyeron en 2% de acetonitrilo y 0.1% de ácido fórmico y se guardaron a -20 °C hasta su análisis por LC-MS/MS.

Los péptidos desalados fueron analizados por nano-cromatografía líquida con el cromatógrafo *Easy-nLC 1000 (Thermo Scientific)* acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución *Q-Exactive HF (Thermo Scientific)*. Los espectros MS/MS adquiridos en las muestras se analizaron a través del *software Proteome Discoverer 2.2 (Thermo Scientific)*, utilizando el motor de búsqueda *Mascot v.2.3*. Como bases de datos, se emplearon la de *SwissProt* sin restricción taxonómica y otra construida con las secuencias de la proteína a identificar (Slt2). Los parámetros empleados en la búsqueda de péptidos fueron: tolerancia del péptido precursor de 10 ppm, tolerancia del fragmento de 0.1 Da, hasta 2 puntos de corte perdidos para la tripsina, carbamidometil-cisteína como modificación fija y oxidación de metionina y fosforilación de S/T/Y como modificaciones variables. Se estimó el FDR (*False Discovery Rate*) y se consideraron proteínas correctamente identificadas aquellas que presentaran un FDR inferior al 1% y que tuvieran al menos 1 péptido identificado con un intervalo de confianza superior al 95%.

La probabilidad de localización de un fosfo-sitio en los péptidos con esta modificación se estimó con el módulo ptm-RS del *software Proteome discoverer 2.2*, y se aceptaron aquellos con una probabilidad mayor al 75%.

12.2. Ensayo global cuantitativo de fosfoproteómica.

Las células se cultivaron a una temperatura de 25 °C como se describe en el apartado 3.2., y se recogió un volumen de 50 mL por muestra centrifugando a 4000 rpm en frío durante 3 minutos. Se descartó el sobrenadante y se añadió al sedimento de células 20 mL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% en frío. Se mezclaron bien las células con el TCA mediante vortex y se mantuvieron las muestras en hielo durante mínimo 1 hora. A continuación, se realizó una centrifugación a 4000 rpm en frío durante 5 minutos y se descartó el sobrenadante. Se realizaron dos lavados con 20 mL de acetona pura previamente enfriada y se dejaron secar los sedimentos hasta asegurarse de que no quedaban restos de acetona. Posteriormente, se resuspendió cada muestra en 200-400 µL de tampón de lisis (urea 8 M, HEPES 50mM pH 8.5 y EDTA 5 mM) según el tamaño del sedimento. Las suspensiones se transfirieron a tubos nuevos y se añadieron perlas de vidrio de 0.75-1 mm de diámetro. Se llevaron a cabo dos ciclos de *FastPrep-24* de 40 segundos a 6 m/s y se recogieron los sobrenadantes pinchando un agujero en la base de cada tubo y centrifugando a 1500 rpm durante 3 minutos. Una vez obtenidos los sobrenadantes, se realizó una nueva centrifugación a 13000 rpm durante 10 minutos. Finalmente, se midió la concentración proteica de cada muestra mediante el método de Bradford, se ajustaron a una misma concentración de 1 mg/mL y se guardaron a -80 °C hasta su procesamiento.

Los pasos correspondientes a la digestión de proteínas, etiquetado con el reactivo *TMT10plex Mass Tag*, enriquecimiento de fosfopéptidos y análisis por espectrometría de masas se llevaron a cabo en la Plataforma de Proteómica del *The Francis Crick Institute* (Londres, Reino Unido), siguiendo el protocolo descrito en Jones *et al.* (2020). El análisis de los datos se llevó a cabo con el *software* de *MaxQuant*, haciendo uso de una base de datos del proteoma de *S. cerevisiae* procedente de *UniProt*. Se seleccionaron los fosfopéptidos con una multiplicidad de 1 (identificación de un solo residuo fosforilado) y una probabilidad de localización del fosfositio superior a 0.75, y sus valores de abundancia (n) en cada muestra se transformaron revirtiendo el logaritmo en base 2 (2^n). Se utilizó el *software Perseus (MaxQuant)* para el análisis estadístico y la visualización de los datos.

13. SOPORTE INFORMÁTICO.

A lo largo de este trabajo, se han empleado varios programas informáticos, herramientas *online* y bases de datos, los cuales se detallan a continuación:

- *Saccharomyces Genome Database* (SGD): servidor de la Universidad de Standford con información sobre genes y proteínas de *S. cerevisiae*. <https://www.yeastgenome.org/>
- Pubmed: repositorio digital de artículos científicos del ámbito de la biomedicina y las ciencias de la vida, desarrollado por el NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST): herramienta *online* para la búsqueda de similitudes entre las secuencias de DNA o proteínas y las secuencias disponibles en las bases de datos, desarrollado por el NCBI. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- *GeneOntology Enrichment Analysis*: herramienta *online* que permite la identificación de categorías funcionales (clasificadas según el sistema PANTHER) enriquecidas en un grupo de genes. <http://geneontology.org/>
- *WebLogo*: herramienta *online* desarrollada por la Universidad de Berkeley que realiza alineamientos entre secuencias de nucleótidos o de aminoácidos y genera una imagen para su visualización. <https://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>
- *Nucleic Acid Sequence "Massager"*: herramienta *online* que facilita el procesamiento de secuencias de nucleótidos. <https://biomodel.uah.es/en/lab/cybertory/analysis/massager.htm>
- *GeneRunner*: programa que permite visualizar, analizar y editar secuencias de nucleótidos y de aminoácidos.
- *FlowJo VX.0.7* (*Beckton Dickinson*): programa empleado para el procesamiento de los datos obtenidos por citometría de flujo.
- *HCIImage* (*Hamamatsu*): programa utilizado en el procesamiento de las imágenes obtenidas con el microscopio *Eclipse TE2000U* (*Nikon*).
- *ImageJ* (NIH): programa empleado en el procesamiento de imágenes procedentes de microscopía.

- *Image Studio (LI-COR Biosciences)*: programa empleado para el procesamiento de imágenes procedentes de *Western blotting*, incluida la cuantificación de la intensidad de las bandas.
- *Perseus (MaxQuant)*: programa que permite el procesamiento y análisis estadístico de los datos obtenidos en ensayos de proteómica.
- *Photoshop CS6 (Adobe)*: programa utilizado para el procesamiento general de imágenes.
- *Illustrator CS6 (Adobe)*: programa empleado en la realización de las figuras.
- *Word (Microsoft)*: programa de procesamiento de texto empleado en la redacción del manuscrito.
- *Excel (Microsoft)*: programa utilizado en el procesamiento de datos, análisis estadístico y elaboración de gráficas.
- *Mendeley*: programa de gestión de la bibliografía, empleado en el tratamiento de las referencias y citas.



RESULTADOS

1. CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA AL CLOTRIMAZOL (CLT) A TRAVÉS DE LA RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR (CWI) Y DE OTRAS RUTAS DE MAPKS.

1.1. Los imidazoles activan a las rutas CWI y HOG y disminuyen la señalización a través de la ruta de apareamiento.

Con el fin de estudiar el efecto que producen los antifúngicos azólicos sobre las rutas de MAPKs de *Saccharomyces cerevisiae*, se seleccionaron dos imidazoles (clotrimazol y ketoconazol) y dos triazoles (itraconazol y fluconazol) como representativos de cada uno de estos grupos para realizar el análisis.

En primer lugar, se llevó a cabo un estudio de sensibilidad con nuestra cepa de referencia BY4741 para conocer la susceptibilidad de la levadura a estos azoles y establecer qué concentraciones utilizar de cada uno de ellos en futuros ensayos. Como resultado de los experimentos de crecimiento en medio líquido, se observó una sensibilidad al clotrimazol (CLT) 8 veces mayor que a la del resto de azoles, puesto que a partir de una concentración de 6.25 µg/mL de CLT el crecimiento de la levadura ya fue completamente inhibido, mientras que para el resto de azoles se necesitó llegar a una concentración de 50 µg/mL. La levadura, además, resultó ser especialmente resistente al fluconazol, mostrando a la mayoría de las concentraciones valores de densidad óptica significativamente superiores a los mostrados en presencia de los otros azoles (**Figura 8A**).

Una vez conocida la susceptibilidad de la levadura a los diferentes azoles, se realizó un ensayo de *Western blotting* para analizar el efecto de cada uno de ellos sobre la activación de las rutas de MAPKs más relevantes, haciendo uso de anticuerpos específicos que reconocen a las formas doblemente fosforiladas de Slt2, Kss1, Fus3 y Hog1. Se decidió utilizar una concentración inhibitoria de 50 µg/mL de CLT y una concentración equivalente 8 veces mayor del resto de azoles (400 µg/mL), a dos tiempos diferentes (**Figura 8B**).

La MAPK Hog1 de la ruta HOG se activó solamente a los 30 minutos en presencia de los imidazoles CLT y KTC, mientras que la MAPK Slt2 de la ruta CWI se activó en respuesta a ambos imidazoles tanto a los 30 como a los 240 minutos. Además, en el tiempo más largo se observó la aparición de una forma de menor movilidad electroforética de fosfo-Slt2, que a partir de ahora se indicará como **LP-Slt2** (*Low Phospho-Slt2*). Por el contrario, las MAPKs Kss1 y Fus3 de la ruta de apareamiento mostraron una disminución de su fosforilación tras el tratamiento con los imidazoles a ambos tiempos. Por otro lado, la exposición de la levadura a los triazoles (ITC Y FLC) provocó cierto incremento de la fosforilación de Slt2 a los 240 minutos, mientras que redujo la fosforilación de

RESULTADOS

Hog1. Además, a los 240 minutos se pudo observar cierto aumento de la fosforilación de Fus3 (**Figura 8B**). Estos resultados indican que los azoles, y en especial los imidazoles, alteran significativamente a las rutas de MAPKs, con efectos diferentes según el tipo de azol.

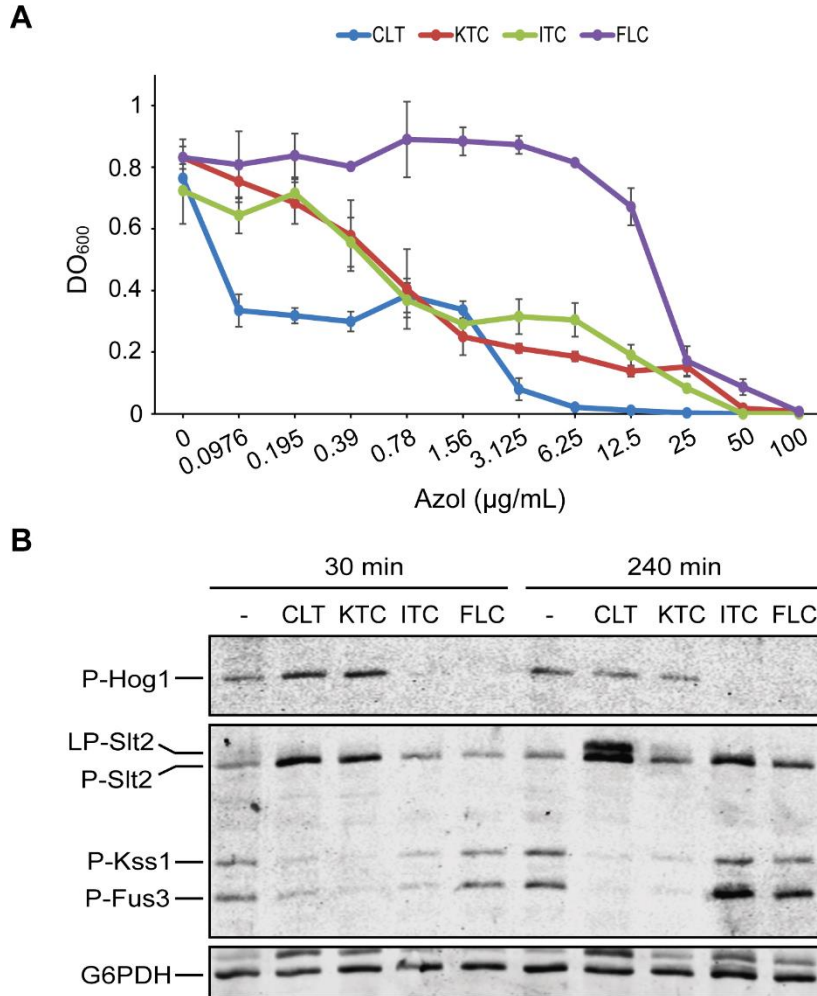


Figura 8. Estudio del efecto de los azoles sobre las rutas de MAPKs. **(A)** Ensayo de sensibilidad de *S.cerevisiae* en medio líquido a azoles. La cepa silvestre BY4741 se incubó en medio YPD suplementado con las concentraciones indicadas de clotrimazol (CLT), ketoconazol (KTC), itraconazol (ITC) y fluconazol (FLC), a 30 °C durante 24 horas en estático, y se midió la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes, y las barras de error representan la desviación estándar. **(B)** *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 cultivada en ausencia de azol (-) o en presencia de 50 µg/mL de CLT o 400 µg/mL de KTC, ITC y FLC, durante los tiempos indicados a 24 °C. La fosforilación dual de Hog1 fue detectada con el anticuerpo anti-phospho-p38, la fosforilación dual de Slt2, Kss1 y Fus3 con el anti-phospho-p44/42 y la proteína G6PDH, que se usó como control de carga, con el anti-G6PDH.

Como el CLT fue el azol que provocó más cambios en el estado de fosforilación de las MAPKs, lo seleccionamos para continuar con el estudio de su impacto sobre la señalización celular de la levadura.

A continuación, quisimos conocer si el funcionamiento de las rutas CWI y HOG, que se activan por CLT, es importante para la supervivencia de las células frente a este antifúngico. Para ello, se llevó a cabo un ensayo de crecimiento en gota de la cepa silvestre (WT, por *Wild-Type*) BY4741 y de los mutantes de delección en los genes codificantes de la MAPK Slt2 y la MAPKKK Bck1 de la ruta CWI y de la MAPK Hog1 y la MAPKK Pbs2 de la ruta HOG, en ausencia y presencia de CLT. También se analizó su crecimiento en presencia de rojo Congo (RC), un estímulo conocido de la ruta CWI, como control. Los mutantes *slt2Δ* y *bck1Δ* fueron incapaces de crecer tanto en presencia de CLT como de RC, mientras que *hog1Δ* y *pbs2Δ*, que no experimentaron una inhibición del crecimiento en el medio con RC, sí mostraron una leve sensibilidad a CLT en comparación con la cepa WT (**Figura 9**). Estos resultados confirman que estas dos rutas de MAPKs son importantes para la respuesta y supervivencia de la levadura al CLT, especialmente la ruta CWI.

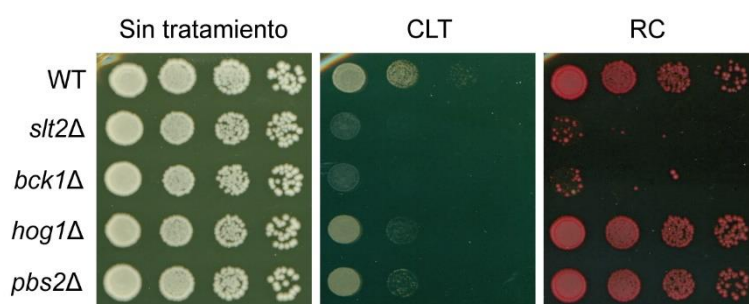


Figura 9. Análisis de la sensibilidad a CLT y RC de mutantes de delección de genes de las rutas CWI y HOG mediante un ensayo de crecimiento en gota. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares de la cepa silvestre BY4741 (WT) y de los mutantes isogénicos indicados se sembraron en placas de YPD sin estímulo, con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC, y se incubaron a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas.

Con el fin de confirmar que la doble banda detectada como consecuencia del tratamiento con el CLT se correspondía, efectivamente, con la proteína Slt2 fosforilada y su forma LP-Slt2, se realizó un ensayo de *Western blotting* con el mutante *slt2Δ* transformado con un vector vacío y con un plásmido portador de la versión silvestre de Slt2 de forma paralela. Así, se pudo comprobar que, solamente en las muestras transformadas con el plásmido que expresaba la MAPK se detectó señal de fosforilación tras el tratamiento con CLT y RC a la altura correspondiente al peso molecular de Slt2, con la aparición de la forma LP-Slt2 en el caso del CLT. Además, el anticuerpo anti-Slt2 no detectó proteína en las muestras transformadas con el vector vacío, mientras que si lo hizo en las que expresaban Slt2, reconociendo también a la forma LP-Slt2. Por otro lado, este ensayo también mostró que la disminución de la fosforilación de Kss1 y Fus3 provocada por el CLT no depende de la presencia de Slt2, pues también se produjo en su ausencia (**Figura 10**).

RESULTADOS

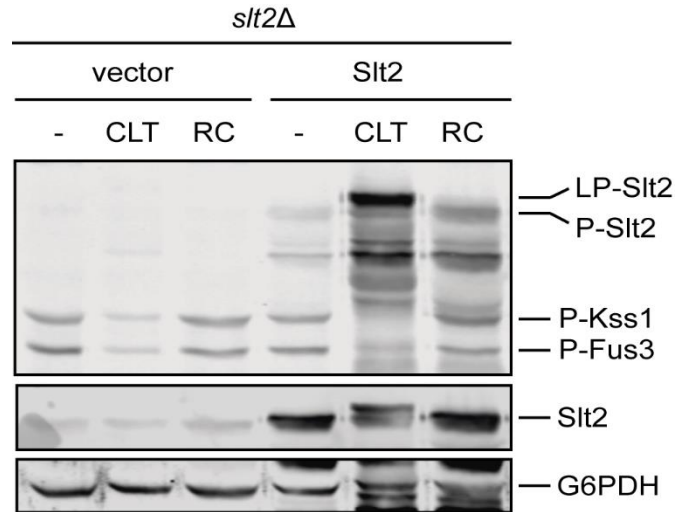


Figura 10. Estudio de la activación de Slt2 por CLT y RC. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con un vector vacío pRS316 o con el plásmido pRS316-*SLT2* en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC, durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, Kss1 y Fus3 fue detectada con el anticuerpo anti-phospho-p44/42, la proteína Slt2 con el anti-Slt2 y la G6PDH (como control de carga) con el anti-G6PDH.

En trabajos en los que se ha estudiado la activación de la ruta HOG por parte de otros estímulos diferentes al estrés hiperosmótico, se ha visto que la detección y transmisión de la señal se lleva a cabo a través de una de sus dos ramas (SHO1 o SLN1), pero no de ambas (Saito and Posas, 2012). Por ello, quisimos identificar cuál de las dos vías está implicada en la activación de esta ruta por el CLT. Se analizó la fosforilación de Hog1 tras 30 minutos de exposición al CLT en ausencia del co-sensibilizador Sho1 y de la proteína quinasa Ssk1 (perteneciente a la vía SLN1) mediante *Western blotting* y se observó que, mientras que en un mutante *ssk1Δ* la fosforilación de la MAPK en respuesta al CLT desapareció por completo, en el mutante *sho1Δ* la activación se produjo de forma similar que en la cepa silvestre (**Figura 11**). Este resultado indica que la activación de la ruta HOG por el CLT se produce a través de la rama SLN1. En este *Western blot*, además, también se pudo apreciar cierta reducción de la fosforilación de Slt2 en las muestras carentes de Hog1 y de Ssk1.

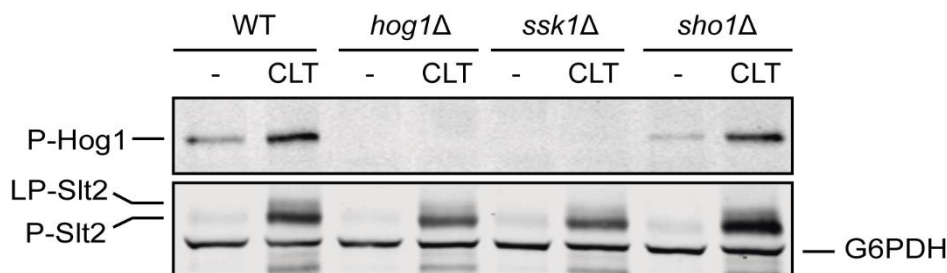


Figura 11. Estudio de la implicación de las ramas SHO1 y SLN1 en la activación de la ruta HOG por el CLT. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y los mutantes isogénicos indicados en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 µg/mL de CLT, durante 30 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Hog1 y de Slt2 y la proteína G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p38, anti-phospho-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

1.2. La reducción en la fosforilación de Fus3 y Kss1 dependiente del CLT está mediada parcialmente por Hog1.

Está descrito que la ruta HOG participa en la regulación de la señalización a través de las rutas CWI y de apareamiento en presencia de ciertos estímulos (Bermejo *et al.*, 2008; Hao *et al.*, 2008; Nagiec and Dohlman, 2012; Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020a). Por tal razón, se estudió un posible entrecruzamiento entre estas rutas en respuesta al CLT, a través del análisis de la fosforilación de Slt2, Kss1 y Fus3 en una cepa carente de Hog1.

Tras 30 minutos de tratamiento con el CLT, que es cuando la ruta HOG muestra una mayor activación, se observó una disminución en los niveles de fosforilación de Slt2 en ausencia de Hog1 (**Figura 12**), de forma similar a lo que se observó previamente en la **Figura 11** en las muestras correspondientes a los mutantes *hog1Δ* y *ssk1Δ*. A tiempos más largos de exposición al antifúngico (240 minutos), en cambio, lo que se apreció fue un aumento en la proporción de LP-Slt2 en ausencia de Hog1 (**Figura 12**). Estos resultados sugieren que la ruta HOG regula de forma sutil los niveles de activación de la ruta CWI en respuesta al CLT.

Por otro lado, se demostró que la ruta HOG es partícipe de la inhibición de la fosforilación de Kss1 y Fus3 que se produce en presencia del CLT. A los 30 minutos de exposición al CLT, la reducción de los niveles basales de fosfo-Kss1 y fosfo-Fus3 que se produjo en la cepa silvestre no se observó en el mutante *hog1Δ*, mientras que después de un tiempo de tratamiento de 240 minutos, si se apreció una reducción en la fosforilación de Kss1 y Fus3 en las células carentes de Hog1, pero esta fue significativamente menor que la mostrada por las células silvestres (**Figura 12**). Por ello, se intuye que el efecto que produce el CLT sobre la ruta de apareamiento está mediado, en parte, por Hog1, si bien participan otros mecanismos adicionales a tiempos prolongados de tratamiento.

RESULTADOS

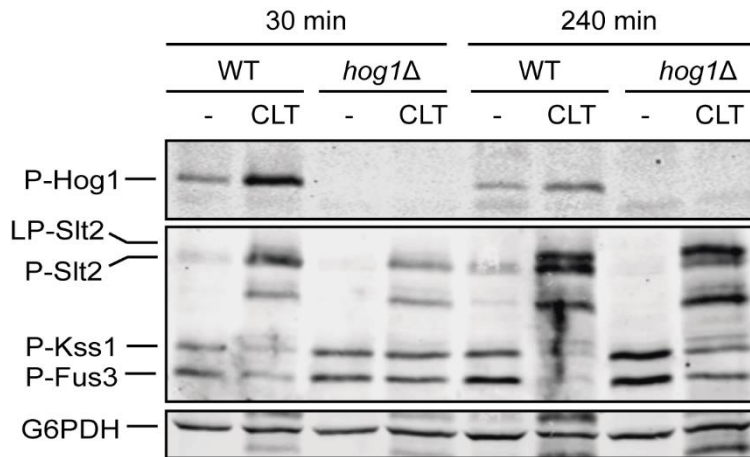


Figura 12. Análisis del entrecruzamiento entre la ruta HOG y las rutas CWI y de apareamiento en respuesta al CLT. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y del mutante isogénico *hog1Δ* en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT durante los tiempos indicados a 24 °C. La fosforilación dual de Hog1 fue detectada con el anticuerpo anti-phospho-p38, la fosforilación dual de Slt2, Kss1 y Fus3 con el anti-phospho-p44/42 y la proteína G6PDH (como control de carga) con el anti-G6PDH.

1.3. El nivel de activación de la MAPK Slt2 depende de la concentración y tiempo de exposición al antifúngico.

Como la ruta CWI es la ruta de MAPKs que experimenta mayores cambios en respuesta al CLT, decidimos analizar en mayor profundidad las condiciones necesarias para que se produzca la activación de Slt2 y la aparición de su forma de menor movilidad electroforética. Para ello, se estudiaron mediante *Western blotting* los niveles de fosforilación de Slt2 en la cepa silvestre BY4741 a diferentes concentraciones de CLT durante 240 minutos y tras un tratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a diferentes tiempos de exposición.

Por un lado, se observó que los niveles de Slt2 fosforilado se incrementaron de manera progresiva conforme aumentó la concentración de compuesto. Así, con la cuantificación que se llevó a cabo de las bandas correspondientes a fosfo-Slt2 en las muestras con CLT respecto a la muestra sin tratamiento, se apreció un aumento significativo del nivel de activación a partir de una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT. La banda LP-Slt2 apareció a partir de esta misma concentración, incrementándose su proporción hasta igualarse la intensidad de ambas bandas a partir de los 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (**Figura 13A**).

Por otro lado, la fosforilación de Slt2 también resultó ser dependiente del tiempo de exposición al antifúngico, aumentando de forma progresiva con el tiempo de tratamiento. A partir de los 30 minutos, se produjo la activación de la MAPK y apareció LP-Slt2 (**Figura 13B**). Se puede apreciar una

subida progresiva tanto del nivel de fosforilación como de la proporción de LP-Slt2 y una estabilización a partir de los 120 minutos de tratamiento. Teniendo en cuenta estos resultados, decidimos seleccionar la concentración más alta de las ensayadas de 50 µg/mL y el tiempo más largo de 240 minutos para llevar a cabo los siguientes experimentos de estimulación de la ruta CWI por el CLT.

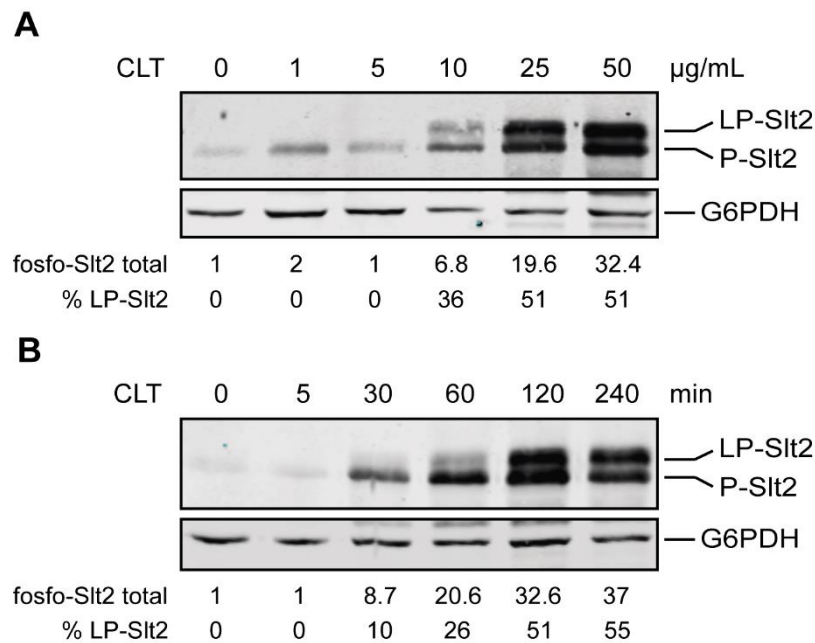


Figura 13. Análisis mediante *Western blotting* de la cinética de activación de la MAPK Slt2 por el CLT. La cepa BY4741 se cultivó con concentraciones crecientes de CLT durante 240 minutos (**A**) y con 50 µg/mL de CLT a diferentes tiempos (**B**), a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2 y la proteína G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. La cuantificación de las bandas de fosfo-Slt2 se llevó a cabo normalizando frente al control de carga en cada muestra (G6PDH) y frente al valor de la muestra sin tratamiento (0), utilizando el *software Image Studio*.

1.4. El módulo de MAPKs de la ruta CWI es esencial para la activación de Slt2 por el CLT.

Dependiendo de la naturaleza del estímulo, la entrada y transducción de la señal hasta la MAPK Slt2 en la ruta CWI se produce de diferentes formas (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020b). Con el fin de conocer qué componentes de la ruta son los que participan en la detección y transmisión de la señal originada por el CLT, se realizó un análisis de la fosforilación de Slt2 en mutantes carentes de las diferentes proteínas de la ruta, para así detectar cuales son capaces de cortar la señalización hacia la MAPK. Este estudio se llevó a cabo con la exposición a RC en paralelo como control, al tratarse de un estímulo muy estudiado para el que se conocen qué elementos son esenciales para la transmisión de la señal.

RESULTADOS

En primer lugar, se analizó la fosforilación de Slt2 en mutantes de delección de los genes codificantes de distintos componentes del módulo de MAPKs que participan en la activación de Slt2: las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 y la MAPKKK Bck1. En la **Figura 14A** se observa como en el doble mutante *mkk1/2Δ* no se apreció ningún incremento de fosfo-Slt2, tanto en la muestra tratada con CLT como en la tratada con RC, confirmando el papel esencial de las MAPKKs en la activación de Slt2. Al analizar la participación de cada una de las MAPKKs de forma individual, se observó que la transducción de la señal por el CLT se produce de forma mayoritaria a través de Mkk1. El predominio de Mkk1 sobre Mkk2 en la señalización también se advirtió en el caso del RC, como ya había sido descrito anteriormente por nuestro grupo de investigación (Tatjer *et al.*, 2016). Cabe destacar que, a pesar de que se observó una reducción significativa de los niveles de fosfo-Slt2 en el mutante *mkk1Δ*, la forma de menor movilidad electroforética siguió detectándose.

Posteriormente, se realizó el mismo análisis con una cepa carente de la MAPKKK Bck1, la cual es la encargada de activar a las MAPKKs. Así, en el mutante *bck1Δ*, al igual que ocurría con el doble mutante *mkk1/2Δ*, no se observó la presencia de Slt2 fosforilada tras el tratamiento con CLT o con RC, confirmando la importancia de un módulo de MAPKs funcional en la activación de la ruta CWI por el CLT (**Figura 14B**).

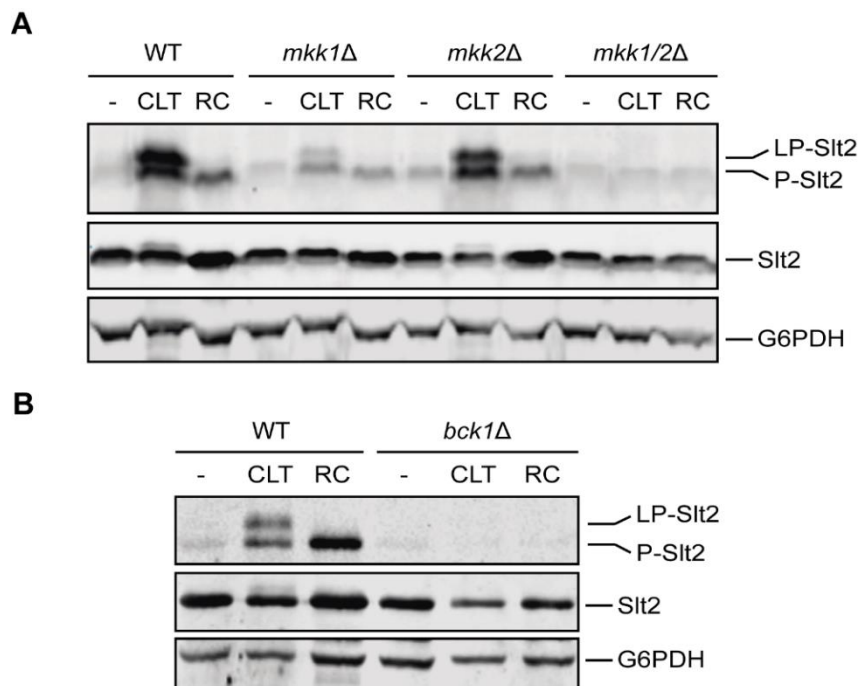


Figura 14. Estudio de la implicación de las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 y de la MAPKKK Bck1 en la activación de Slt2 por CLT y RC. (**A,B**) *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT), los mutantes isogénicos *mkk1Δ*, *mkk2Δ* y *bck1Δ*, y de la cepa YMJ29 (*mkk1/2Δ*), en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

1.5. La proteín quinasa Pkc1 no es crucial para la transmisión de la señal a través de la ruta CWI en respuesta al CLT.

Continuando con el estudio de las proteínas implicadas en la transmisión de la señal por el CLT a través de la ruta CWI, se estudió el nivel de participación de la proteín quinasa Pkc1, encargada de activar al módulo de MAPKs.

Se analizó la activación de Slt2 en un mutante *pkc1Δ* en comparación con la cepa silvestre y se observó que, aunque en ausencia de esta proteín quinasa la señal originada por el CLT se transmitió hasta Slt2 ya que se detectaba un incremento de su fosforilación y la aparición de su forma de menor movilidad electroforética, los niveles de fosfo-Slt2 fueron bastante inferiores a los mostrados por la cepa silvestre. Por el contrario, en presencia de RC no se detectó ningún incremento de fosforilación de Slt2 en el mutante *pkc1Δ* (**Figura 15A**). Este resultado indica que Pkc1 no es esencial para la activación del módulo de MAPKs en respuesta al CLT, aunque sí participa de forma parcial, mientras que, en respuesta a estímulos clásicos de la ruta como el RC, Pkc1 es crucial para la transmisión de la señal y la activación final de la ruta. Como control del experimento, se transformó esta cepa *pkc1Δ* con un plásmido que contenía a la construcción Pkc1-GFP. Tal y como se aprecia en la **Figura 15B**, cuando se expresó esta proteín quinasa en la cepa mutante, la activación de Slt2 por RC se restauró y los niveles de fosfo-Slt2 de la muestra tratada con CLT aumentaron, confirmando que el efecto observado en el mutante era debido a la ausencia de Pkc1 y, por tanto, que esta quinasa tiene un papel diferente en la transmisión de ambos estímulos.

Asimismo, se quiso analizar si la ausencia de Pkc1 afectaba a la reducción de la fosforilación de Kss1 y Fus3 típica del tratamiento con el CLT, pues se ha visto que en otras condiciones de estimulación de la ruta CWI como el estrés mecánico o el estrés oxidativo, se produce la inhibición de la fosforilación de Fus3 en células tratadas con feromonas, a través de la fosforilación de Ste5 por parte de Pkc1 (Van Drogen *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2020). Sin embargo, en las células carentes de Pkc1 se continuó apreciando dicha disminución de los niveles de fosfo-Kss1 y fosfo-Fus3 como consecuencia del tratamiento con el CLT (**Figura 15**).

RESULTADOS

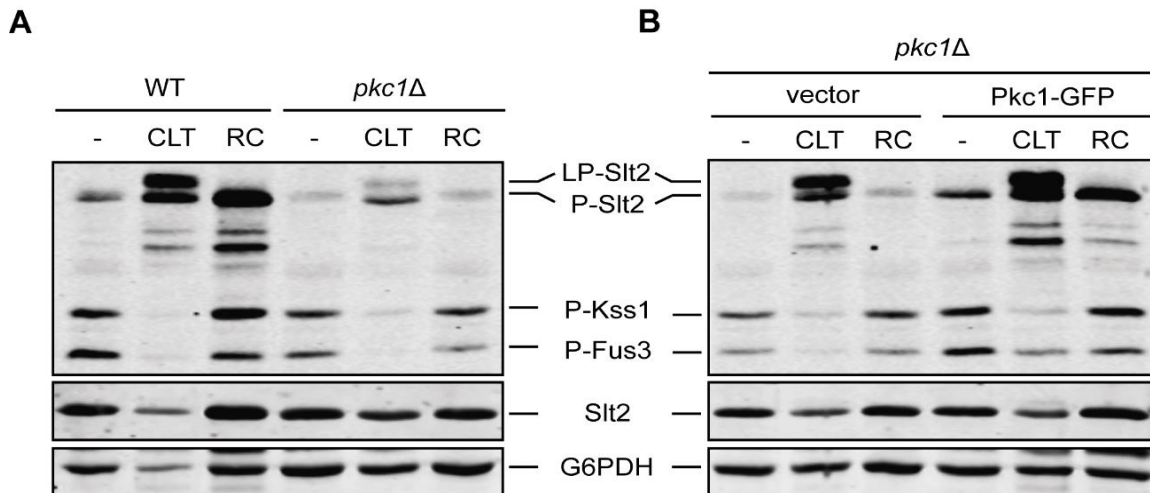


Figura 15. Estudio de la participación de Pkc1 en la activación de la ruta CWI por CLT y RC. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y el mutante isogénico *pkc1Δ* (A) y del mutante *pkc1Δ* transformado con el vector vacío pRS316 o el plásmido pVD67 (Pkc1-GFP) (B) en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. La fosforilación dual de Slt2, Kss1 y Fus3 se detectó con el anticuerpo anti-phospho-p44/42, la proteína Slt2 con el anti-Slt2 y la G6PDH (como control de carga) con el anti-G6PDH.

Teniendo en cuenta que era la primera vez que se identificaba un estímulo de la ruta CWI para el que la acción de Pkc1 no fuera completamente necesaria en la transmisión de la señal, decidimos contrastar estos resultados llevando a cabo los mismos experimentos que en la **Figura 15** pero con otra cepa de fondo genético diferente. De este modo, con la cepa CML128 se observaron resultados similares (**Figura 16**), reafirmando que, en ausencia de Pkc1, la transmisión de la señal originada por el CLT hacia el módulo de MAPKs no sólo se produce a través de Pkc1, sino también de otros elementos de señalización alternativos.

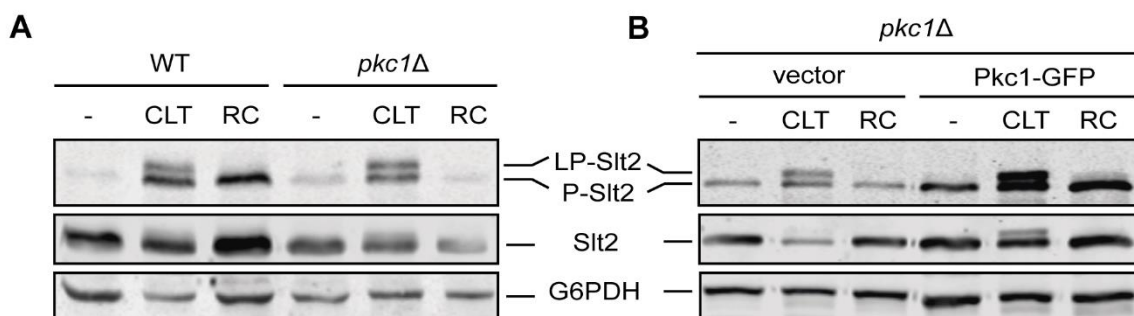


Figura 16. Estudio de la participación de Pkc1 en la activación de la ruta CWI por CLT y RC con la cepa CML128. *Western blotting* de los extractos celulares de las cepas CML128 (WT) y su isogénica MML344 (*pkc1Δ*) (A) y del mutante *pkc1Δ* transformado con el vector vacío pRS316 o el plásmido pVD67 (Pkc1-GFP) (B) en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

Posteriormente, se llevó a cabo un estudio de sensibilidad al CLT del mutante *pkc1Δ* mediante un ensayo de crecimiento en gota. Al trabajar con esta cepa, el medio YPD se tuvo que suplementar con sorbitol que, gracias a la estabilización osmótica que provoca, contrarresta el efecto que produce el estrés de pared sobre el crecimiento de este mutante. El CLT inhibió el crecimiento del mutante *pkc1Δ* aún en presencia de sorbitol, sugiriendo un papel de Pkc1 en la defensa de la levadura frente a este antifúngico más allá de su intervención en la ruta CWI. La participación de Pkc1 en otras funciones celulares importantes ha sido descrita con anterioridad (Heinisch and Rodicio, 2018). Por el contrario, en presencia de RC el mutante *pkc1Δ* sí que recuperó cierto crecimiento gracias al sorbitol, lo que sugiere que en respuesta a este estrés Pkc1 se centra en su función reguladora de la ruta CWI (**Figura 17**). En paralelo, se midió también la sensibilidad del mutante *slt2Δ* en estas condiciones. En presencia de estabilización osmótica, el mutante de delección del gen *SLT2* creció cuando se expuso al antifúngico, lo que sugiere que la estimulación de la ruta CWI a esta concentración de CLT (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se produce por el daño que el fármaco provoca en la superficie celular. Como era de esperar, en presencia de RC la cepa carente de Slt2 también fue capaz de crecer gracias a la estabilización osmótica (**Figura 17**).

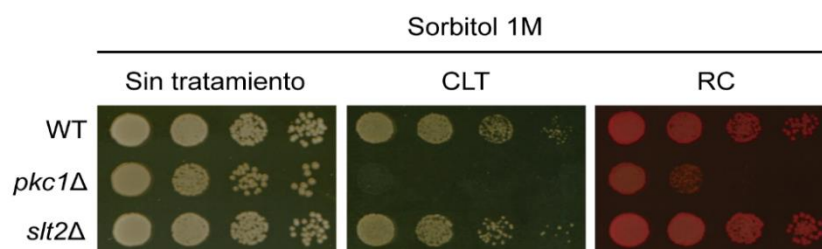


Figura 17. Análisis de la sensibilidad al CLT y al RC de *pkc1Δ* y *slt2Δ* en presencia de sorbitol mediante un ensayo de crecimiento en gota. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares de la cepa BY4741 (WT) y de los mutantes isogénicos indicados se sembraron en placas de YPD suplementadas con sorbitol 1 M sin estímulo, con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o con 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas.

Dado el carácter novedoso de los resultados anteriores, se quiso conocer si la activación de Slt2 de forma alternativa a la acción de Pkc1 es un fenómeno exclusivo del CLT o si también puede producirse con otros estreses. Para ello, se estudió si otros estímulos de la ruta CWI además del RC eran capaces de provocar la fosforilación de Slt2 en el mutante *pkc1Δ*. Se escogieron los siguientes compuestos: i) cafeína, que induce la activación de la ruta a través de la inhibición de TORC1 y además genera fosforilaciones adicionales en Slt2 (Kuranda *et al.*, 2006; Truman *et al.*, 2009); ii) zimoliasa, un complejo enzimático que ataca a la pared celular pero cuya activación de Slt2 requiere del entrecruzamiento con la ruta HOG (Bermejo *et al.*, 2008); y iii) tunicamicina, un compuesto que

RESULTADOS

genera estrés de retículo endoplasmático (Chen *et al.*, 2005). Como se observa en el *Western blot* de la **Figura 18**, ninguno de los estímulos anteriormente mencionados fue capaz de inducir un aumento de fosforilación de Slt2 en ausencia de Pkc1, en contraste con la activación de la MAPK observada en la muestra tratada con CLT. Este resultado evidencia que, hasta donde llega nuestro conocimiento, el CLT es el único estímulo de la ruta CWI capaz de producir su activación de forma independiente a la proteína quinasa Pkc1. Los resultados de este apartado, en conjunto, sugieren que existe un mecanismo de activación del módulo de MAPKs de la ruta CWI alternativo y específico de la respuesta al CLT, el cual aún está por determinar.

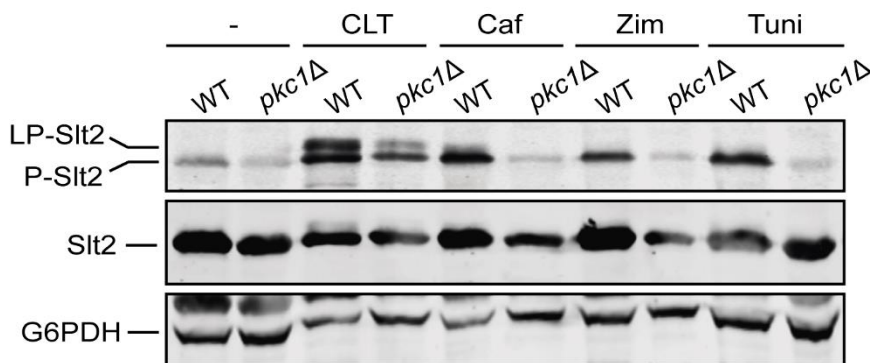


Figura 18. Estudio de la participación de Pkc1 en la activación de la ruta CWI en respuesta a diferentes estímulos. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y el mutante isogénico *pkc1Δ* en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT, 8 mM de cafeína (Caf), 0.4 U/mL de zimoliasa (Zim) o 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tunicamicina (Tuni), durante 120 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

1.6. La activación de la ruta CWI por CLT es parcialmente dependiente del mecanosensor *Wsc1*.

Actuando por encima de Pkc1 en la ruta CWI se encuentra la GTPasa Rho1, cuya activación está regulada positivamente por las proteínas GEFs Rom2, Rom1 y Tus1. Entre ellas, Rom2 es la GEF que mayoritariamente participa en la regulación de Rho1 en presencia de estrés de pared celular (Levin 2011). Para analizar si alguna de estas GEFs es esencial para la transmisión de la señal originada por el CLT, se realizó un ensayo de *Western blotting* con mutantes carentes de cada una de ellas. En respuesta al RC, se observó de forma clara que la GEF Rom2 es necesaria para que se produzca la activación de Slt2, mientras que en la estimulación con CLT ninguna de las 3 GEFs resultó fundamental para la transmisión de la señal (**Figura 19**). A pesar de ello, si que se observó una leve disminución de la señalización en la cepa carente de Rom2.

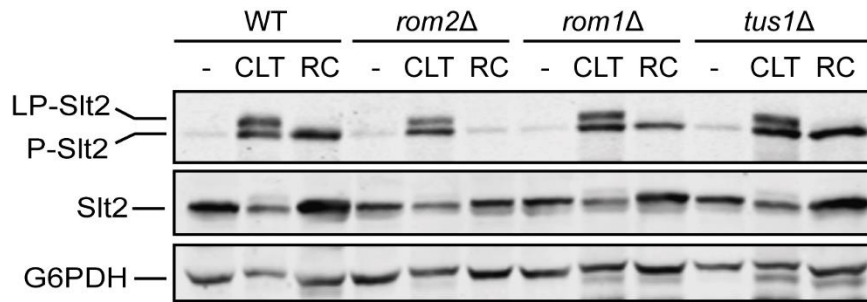


Figura 19. Estudio de la implicación de las GEFs de Rho1 en la activación de la ruta CWI por CLT y RC. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y los mutantes isogénicos indicados en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 µg/mL de CLT o 30 µg/mL de RC, durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

De forma previa a Rho1 y sus GEFs operan los mecanosensores de la ruta, elementos que se encargan de la detección del daño en superficie y transmisión de la señal, y entre los que destacan Wsc1, Mid2 y Mtl1 (Kock *et al.*, 2015). Se analizó si los mutantes de delección en los genes codificantes de cada uno de estos sensores provocaban la desaparición o reducción de la fosforilación de Slt2 en respuesta al CLT. Así, se determinó que solo el sensor Wsc1 participa de forma parcial en la detección del estímulo y transmisión de la señal, puesto que en la muestra tratada con CLT del mutante *wsc1Δ*, los niveles de fosfo-Slt2 disminuyeron considerablemente en comparación con los niveles mostrados por la cepa silvestre o por los mutantes *mid2Δ* y *mtl1Δ*. Paralelamente, se analizó la señalización por RC como en los experimentos anteriores, y se confirmó la función de Mid2 como sensor encargado de detectar la señal originada por este compuesto de unión a quitina (Bermejo *et al.*, 2010) (**Figura 20**).

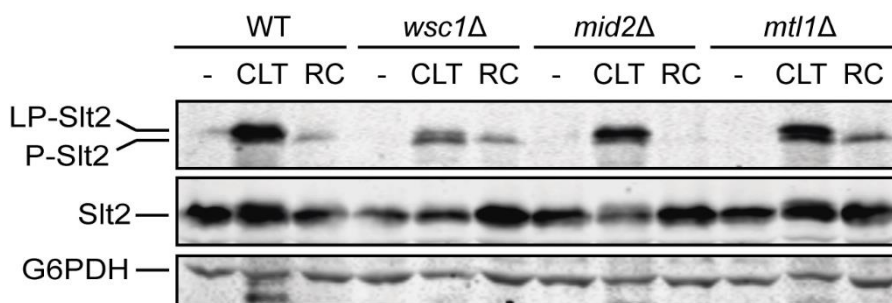


Figura 20. Estudio de la participación de los sensores de la ruta CWI en la transmisión de la señal en respuesta a CLT y RC. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y los mutantes isogénicos indicados en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 µg/mL de CLT o 30 µg/mL de RC, durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

RESULTADOS

1.7. Los factores de transcripción Rlm1 y Swi4/Swi6 participan en la respuesta al CLT.

La respuesta transcripcional de la ruta CWI es mediada principalmente por los factores de transcripción Rlm1 y SBF (formado por Swi4 y Swi6), los cuales son activados por Slt2 (Sanz *et al.*, 2018a). Con el fin de medir el nivel de implicación de estos factores de transcripción en la respuesta al estrés generado por el CLT, primero se estudió la sensibilidad al antifúngico de los mutantes de delección afectados en estas proteínas. Como se muestra en la **Figura 21**, los mutantes *swi4Δ* y *swi6Δ* exhibieron una gran sensibilidad al CLT, similar a la de *slt2Δ*, sugiriendo un papel relevante de estos factores de transcripción en la adaptación al CLT. En presencia de RC, también se apreció una elevada sensibilidad en ausencia de Slt2 o de Swi4, y algo menor en el mutante carente de Swi6. En cambio, la ausencia de Rlm1 no pareció afectar en gran medida a la sensibilidad de la levadura a ninguno de los dos estreses. La falta de sensibilidad a RC mostrada por el mutante *rlm1Δ* ya estaba descrita, a pesar de que se ha demostrado que la respuesta transcripcional al RC requiere de la funcionalidad de Rlm1 (García *et al.*, 2004), por lo que, para analizar una posible participación de Rlm1 en la respuesta transcripcional al CLT, fue necesaria la realización de otros experimentos.

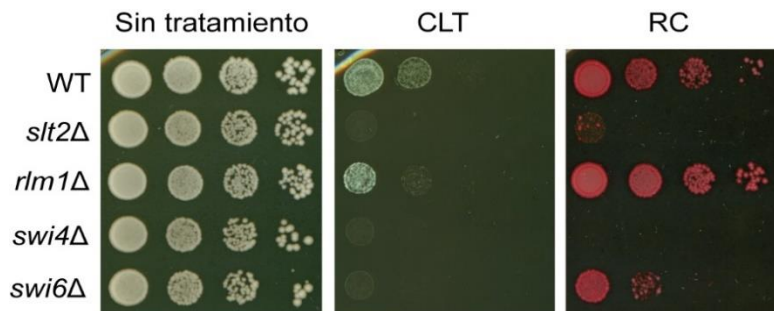


Figura 21. Medida de la sensibilidad a CLT y RC de los mutantes de delección de factores de transcripción de la ruta CWI mediante un ensayo de crecimiento en gota. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares de la cepa BY4741 (WT) y de los mutantes isogénicos indicados se sembraron en placas de YPD sin estímulo, con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC. Las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas.

Para ello, se decidió investigar si en condiciones de estimulación con CLT, se produce la fosforilación de Rlm1 y Swi6 mediada por Slt2 que se ha observado con otros estímulos de la ruta CWI (Watanabe *et al.*, 1997; Kim *et al.*, 2010). Con este fin, se realizó un ensayo de *Western blotting* con la cepa silvestre BY4741 con construcciones integradas de Rlm1 y Swi6 fusionadas al epítipo 6Myc. Esta técnica permite detectar si se produce un cambio de movilidad electroforética asociado a la fosforilación de la proteína, presuntamente a cargo de Slt2. Además, debido a la existencia de un mecanismo de retroalimentación positiva de la transcripción del gen *RLM1* (García *et al.*, 2016),

también se puede observar un incremento de la cantidad de Rlm1 en condiciones de activación de la ruta CWI. En las células tratadas con CLT se detectó el aumento de cantidad de Rlm1 y el cambio de movilidad tanto en Rlm1-myc como en Swi6-myc, apareciendo incluso formas adicionales de Rlm1-myc de menor movilidad electroforética que tras el tratamiento con RC (Figura 22A). Este último resultado sugiere que, en presencia de CLT, Rlm1 experimenta un mayor número de fosforilaciones que las que comúnmente se producen con otros estreses.

La aparición de estas formas adicionales de menor movilidad electroforética de Rlm1 tras el tratamiento con el CLT resultó interesante, por lo que se analizó el grado de implicación de Slt2 en estas fosforilaciones, utilizando una cepa carente de Slt2. Como se observa en la Figura 22B, en el mutante *slt2Δ* no se produjo ningún cambio de cantidad ni de movilidad de Rlm1-myc en respuesta al CLT, al igual que ocurrió con el RC, confirmando que este fenómeno es completamente dependiente de la presencia de la MAPK Slt2.

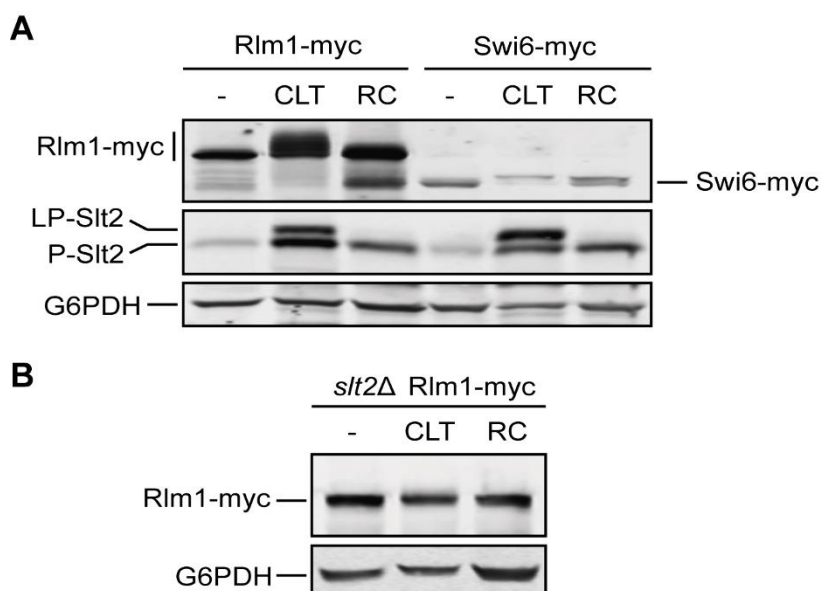


Figura 22. Análisis de la fosforilación de Rlm1 y Swi6 tras el tratamiento con CLT y RC mediante *Western blotting*. Las cepas WT-RLM1Myc, WT-SWI6Myc (A) y *slt2Δ*-RLM1Myc (B) se incubaron en ausencia de estímulo (-) y con 50 µg/mL de CLT o 30 µg/mL de RC, durante 240 minutos a 24 °C. Rlm1-myc y Swi6-myc, la fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-Myc, anti-phospho-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

En la misma línea, se quiso averiguar si estas formas de menor movilidad electroforética de Rlm1 eran originadas por fosforilaciones en los residuos de la proteína potencialmente fosforilables por Slt2. Para ello, se analizó la movilidad electroforética de una construcción de Rlm1 mutada en los tres residuos descritos inicialmente como causantes de su activación por Slt2: Ser374, Ser427 y

RESULTADOS

Ser439 (Rlm1-3m-HA) (Jung *et al.*, 2002), y de otra mutada en estos residuos más otros siete (Ser234, Ser261, Thr276, Ser299, Ser518, Thr646 y Thr654) (Rlm1-10m-HA), los cuales son posibles dianas de fosforilación por MAPKs y se ha descrito que son importantes para la activación completa de Rlm1 (Sanz *et al.*, 2018b). Adicionalmente, se analizó una versión de Rlm1 mutada en los residuos implicados en la interacción con Slt2 (Rlm1-L324AV326A-HA) (Jung *et al.*, 2002). Como se muestra en la **Figura 23**, ambas versiones no fosforilables (Rlm1-3m-HA y Rlm1-10m-HA) mostraron bandas con un menor retardo electroforético que las mostradas por la versión silvestre (Rlm1-HA), lo que indica que estos sitios de fosforilación por Slt2 son fosforilados en respuesta al CLT. Sin embargo, el cambio de movilidad de Rlm1 no desapareció por completo en Rlm1-10m-HA, lo que sugiere que existen modificaciones postraduccionales adicionales a las anteriormente descritas. El cambio de movilidad se redujo notablemente en la versión mutante Rlm1-L324AV326A, pero tampoco desapareció completamente, lo que sugiere que, aunque la existencia de las bandas adicionales de Rlm1 dependa de la presencia de Slt2 (**Figura 22B**), algunas de ellas podrían no ser consecuencia de una fosforilación directa por esta MAPK.

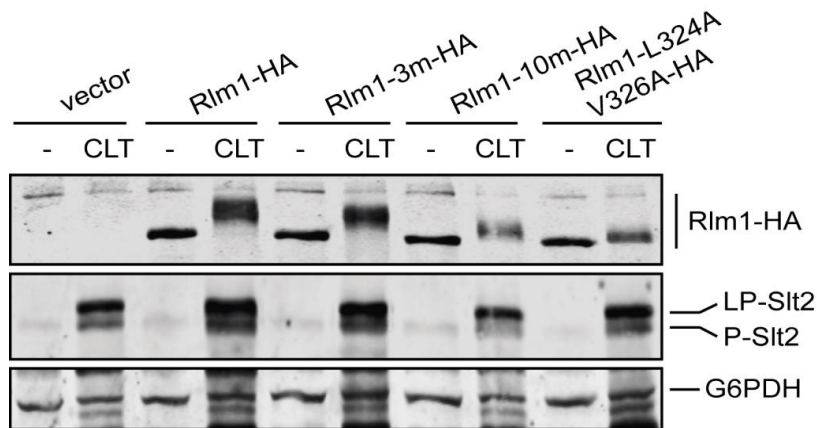


Figura 23. Análisis de la fosforilación de Rlm1 en respuesta al CLT en mutantes en sitios de fosforilación o de interacción de este factor de transcripción. *Western Blotting* de los extractos celulares de la cepa mutante *rlm1Δ* transformada con el plásmido pRS314 vacío (vector) o que porta las versiones de Rlm1 indicadas. Las células se cultivaron sin estímulo (-) o en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. Rlm1-HA, la fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-HA, anti-phospho-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

Para poder relacionar la fosforilación de Rlm1 con su funcionalidad como factor de transcripción, es necesario medir la expresión de genes dependientes de su actividad transcripcional. Con este fin, se seleccionaron cuatro genes cuya expresión en respuesta a estrés sobre la pared requiere de Rlm1 (*MLP1*, *CRG1*, *PIR3* y *SRL3*) (García *et al.*, 2016; Sanz *et al.*, 2018b) y se midieron sus niveles de mRNA en la célula tras el tratamiento con CLT, usando la técnica de RT-

qPCR. Como control, también se analizó la expresión en muestras tratadas con RC y los resultados se presentaron como la ratio de expresión de los genes en las células expuestas al estímulo respecto a las células control sin tratamiento. Paralelamente, se llevó a cabo el mismo análisis en una cepa mutante *slt2Δ* para establecer una relación entre esta expresión génica y la activación de la ruta CWI. En la **Figura 24** se muestra que, a pesar del gran nivel de fosforilación experimentado por Rlm1 en presencia del CLT descrito anteriormente, la inducción transcripcional de sus genes dependientes fue bastante débil comparado con la que se observó en las muestras tratadas con RC. Aun así, esta inducción fue significativamente superior a la producida en el mutante *slt2Δ* para todos los genes estudiados, lo cual refleja que esta pequeña respuesta transcripcional es totalmente dependiente de la ruta CWI.

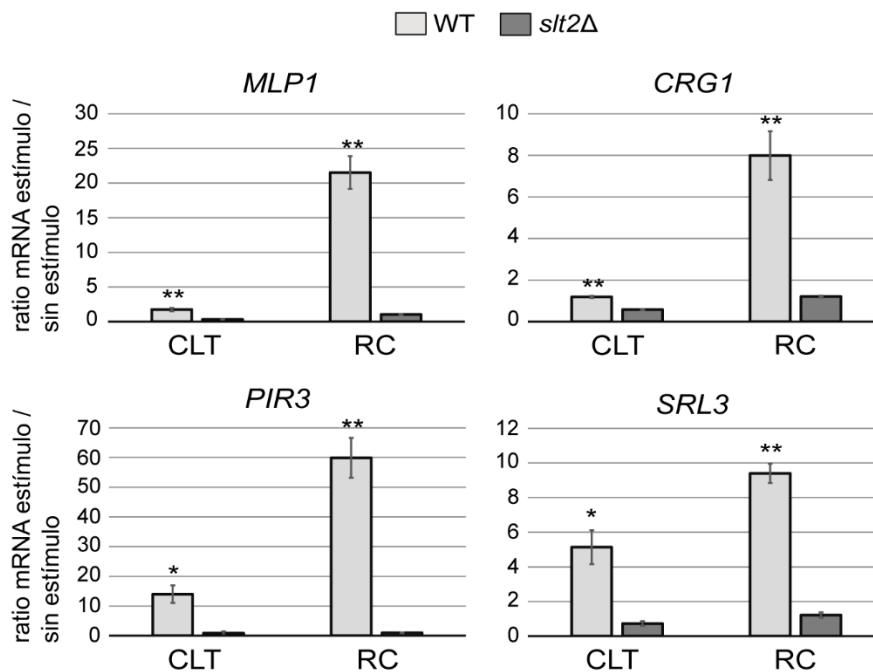


Figura 24. Medida de la inducción transcripcional de los genes *MLP1*, *CRG1*, *PIR3* y *SRL3* mediante RT-qPCR en respuesta a CLT y RC. La cepa BY4741 (WT) y el mutante isogénico *slt2Δ* se incubaron en condiciones basales sin estímulo y con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. Los valores representan la ratio de expresión entre las células tratadas y no tratadas, y corresponden a la media de 3 experimentos independientes. Las barras de error muestran la desviación estándar. Se realizó la prueba de *t-student* entre los valores de la cepa WT y la *slt2Δ*, siendo * un *p-value* < 0.05 y ** un *p-value* < 0.01.

RESULTADOS

1.8. La exposición al CLT genera un aumento del estrés oxidativo en las células de levadura.

Como se ha demostrado en apartados anteriores, el CLT provoca cambios profundos en la señalización a través de las rutas de MAPKs. Sin embargo, los triazoles no son capaces de generar los mismos efectos, sugiriendo que la alteración de membrana propia del tratamiento con azoles no constituye el origen de estos cambios. Se ha descrito que, además de la inhibición de la síntesis del ergosterol, algunos imidazoles presentan un mecanismo de acción más complejo, provocando mayores efectos en los hongos especialmente cuando se emplean a concentraciones elevadas. Entre ellos, destaca la acumulación de ROS en las células (Kobayashi *et al.*, 2002; François *et al.*, 2006; De Cremer *et al.*, 2016). A raíz de estas observaciones, decidimos investigar un posible aumento del estrés oxidativo por el tratamiento con CLT en nuestras condiciones y su relación con la señalización a través de las rutas de MAPKs.

Como primera aproximación, se realizó un ensayo de citometría de flujo tiñendo las células con los fluorocromos rodamina 123 y dihidroetidio (DHE), los cuáles se emplean para medir cambios en el potencial de membrana de las mitocondrias y niveles de ROS, respectivamente (Büttner *et al.*, 2007; Kwolek-Mirek and Zadrag-Tecza, 2014). Así, utilizando como control negativo muestras de células de levadura sin tratamiento, se midió la proporción de células que presentaron una mayor señal de fluorescencia para ambos fluorocromos que el control tras el tratamiento con CLT o con peróxido de hidrógeno (H₂O₂), sirviendo este último como control positivo del experimento. Los porcentajes de células positivas para la rodamina 123 y el DHE tras la exposición al CLT fueron significativamente elevados, lo que confirmó el poder oxidativo del antifúngico. Además, el porcentaje de células positivas fue especialmente alto en el caso de la rodamina 123, lo que sugiere que el daño oxidativo provocado por el CLT podría estar relacionado con una desestabilización de las mitocondrias. Por último, el hecho de que las células expuestas al H₂O₂ también mostraran una mayor fluorescencia que las células sin tratar permitió ratificar la utilidad del experimento para medir un aumento del estrés oxidativo (**Figura 25**).

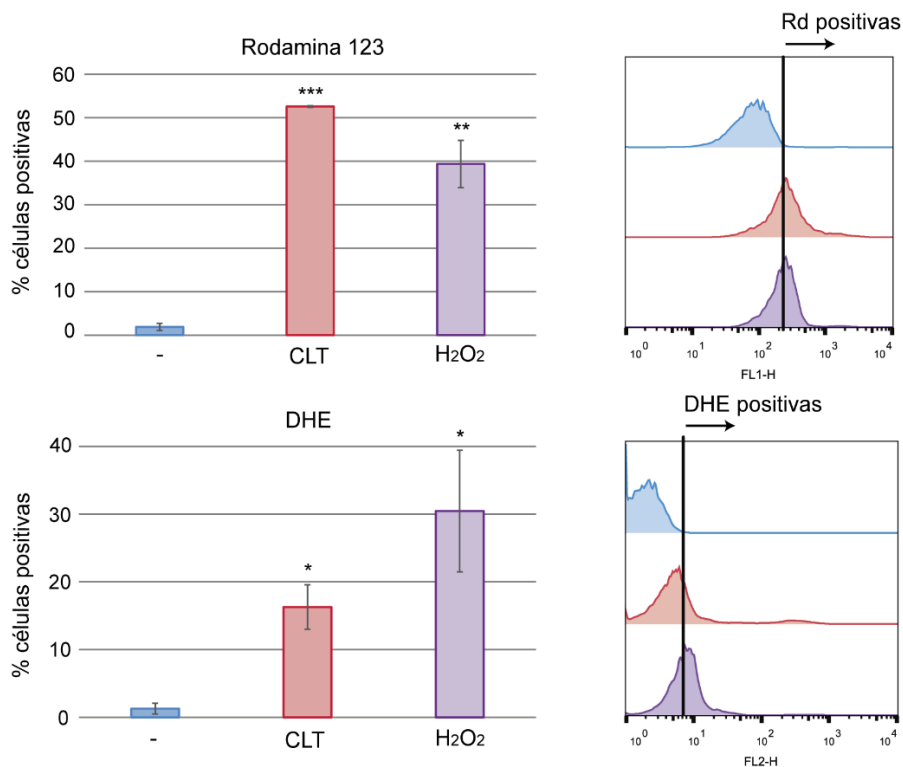


Figura 25. Medida del estrés oxidativo provocado por el CLT mediante citometría de flujo. Las células de la cepa BY4741 se cultivaron sin estímulo (-), con 50 µg/mL de CLT o 10 mM de H₂O₂, durante 240 minutos a 24 °C. Las gráficas representan el porcentaje de células positivas que expresan una señal de fluorescencia para la rodamina 123 (Rd) o el DHE superior al umbral establecido a partir de las células sin tratar. Los valores corresponden a la media de 3 experimentos independientes, y las barras de error muestran la desviación estándar. A la derecha se presentan histogramas representativos de uno de los experimentos. Se realizó la prueba de *t-student* entre los valores de las células tratadas (CLT o H₂O₂) y las no tratadas (-), siendo * un *p-value* < 0.05, ** un *p-value* < 0.01 y *** un *p-value* < 0.001.

Con el objetivo de corroborar los resultados de citometría de flujo y confirmar la presencia de daño oxidativo en la levadura tras la exposición al CLT, se analizó también el estado de las mitocondrias y del citoesqueleto de actina en las células. Es común que la morfología mitocondrial se altere cuándo la célula sufre estrés oxidativo (Deffieu *et al.*, 2009; Bhatia-Kissova and Camougrand, 2021) por lo que, para poder detectar posibles cambios en las mitocondrias inducidos por el CLT, la levadura se transformó con un plásmido portador de la proteína mitocondrial Ilv6 fusionada a la proteína fluorescente mCherry y se observó su localización al microscopio. En las células no tratadas (-), las mitocondrias presentaron su morfología típica en forma de túbulos, mientras que en las tratadas con CLT, las estructuras tubulares desaparecieron y se formaron agregados, indicando una clara alteración de la estructura mitocondrial por el tratamiento con el CLT (Figura 26).

RESULTADOS

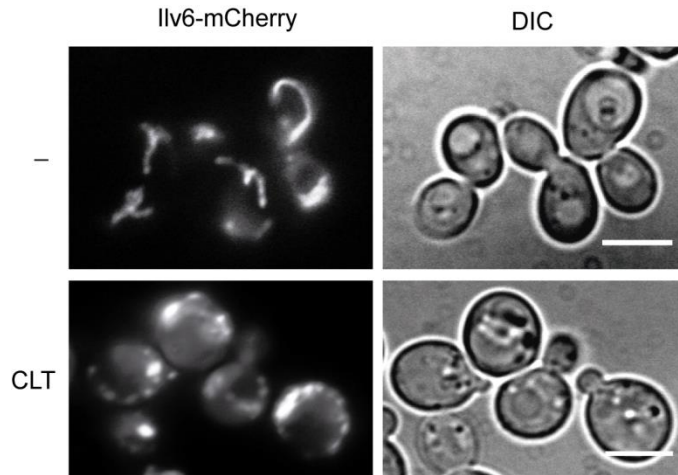


Figura 26. Análisis de la estructura mitocondrial mediante microscopía de fluorescencia tras el tratamiento con CLT. La cepa BY4741-T transformada con el plásmido YEplac112-Ilv6-mCherry se cultivó en ausencia (-) o en presencia de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT, durante 240 minutos a 24 °C. Se muestran fotografías de fluorescencia y de microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) representativas de dos experimentos independientes. La barra de escala equivale a 5 μm .

Por otro lado, se examinó la estructura del citoesqueleto de actina tras el tratamiento con el antifúngico, pues existe una fuerte correlación entre los niveles de ROS y el estado del citoesqueleto de actina de la levadura (Gourlay *et al.*, 2004). Asimismo, se ha visto que el miconazol, otro imidazol muy similar al CLT, induce agregación de actina debido a una acumulación de ROS en el interior de las células de levadura (Thevissen *et al.*, 2007). De este modo, se llevó a cabo una tinción con rodamina-faloidina de las células de levadura sin tratar y tratadas con el CLT, con el fin de visualizar la actina y comparar su estado en unas células y en otras. En la **Figura 27** se muestra cómo, en ausencia de estrés, la actina mostró su aspecto habitual, con la presencia de parches localizados en las yemas, mientras que, tras la exposición al CLT, la actina se encontraba despolarizada y formando agregados en otras zonas de la célula.

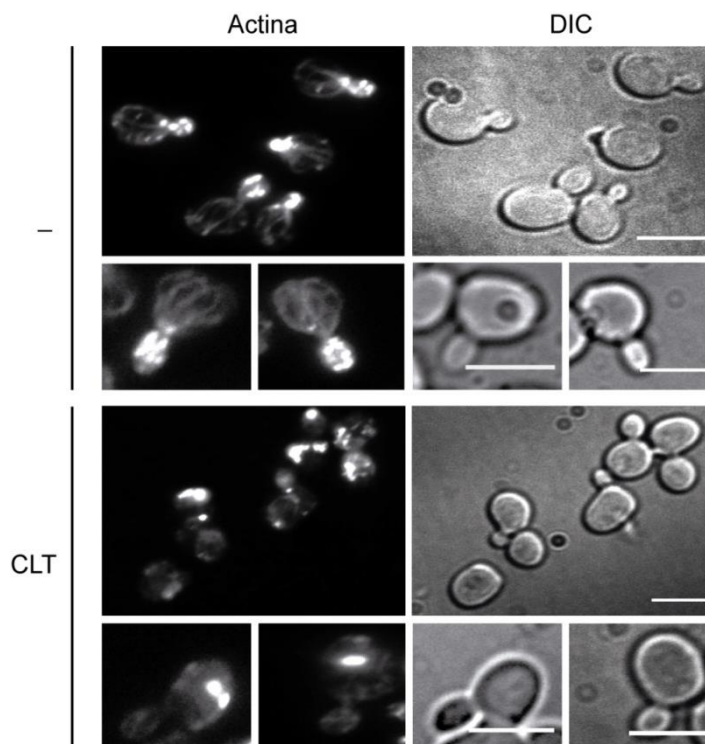


Figura 27. Análisis de la estructura del citoesqueleto de actina tras el tratamiento con CLT mediante microscopía de fluorescencia. Se muestra la cepa BY4741 teñida con rodamina-faloidina en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. Las imágenes corresponden a fotografías de fluorescencia y de DIC representativas de tres experimentos independientes. La barra de escala equivale a 5 μm .

1.9. El estrés oxidativo generado por el CLT está implicado en los efectos de este compuesto sobre la señalización a través de las rutas de MAPKs.

Existen trabajos que relacionan el estrés oxidativo con la activación de las rutas CWI y HOG (Staleva *et al.*, 2004; Vilella *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2017) y con la inhibición de la ruta de apareamiento (Lee *et al.*, 2020). Asimismo, también se ha relacionado la activación de Slt2 con la despolarización del citoesqueleto de actina (Delley and Hall, 1999). Teniendo en cuenta estos antecedentes, se deseó investigar la implicación del estrés oxidativo en los efectos que genera el CLT sobre las rutas de MAPKs. De este modo, se empleó el antioxidante N-acetilcisteína (NAC) para reducir los niveles de ROS de las células y evaluar una posible correlación con la alteración de las rutas de MAPKs.

En primer lugar, se analizó el efecto del NAC en ensayos de sensibilidad frente al CLT. Como se puede apreciar en la **Figura 28**, la sensibilidad al fármaco que habitualmente muestra el mutante *slt2 Δ* se contrarrestó al añadir NAC al medio, sugiriendo una posible relación entre el estrés

RESULTADOS

oxidativo y la activación de la ruta CWI. Complementariamente, se realizó el mismo análisis con mutantes carentes de las enzimas antioxidantes superóxido dismutasa (Sod1) y catalasa T (Ctt1), los cuales mostraron una inhibición del crecimiento en presencia del CLT que también se contrarrestó con la adición del NAC. Este resultado confirmó el carácter oxidativo del CLT y la funcionalidad del NAC como agente antioxidante.

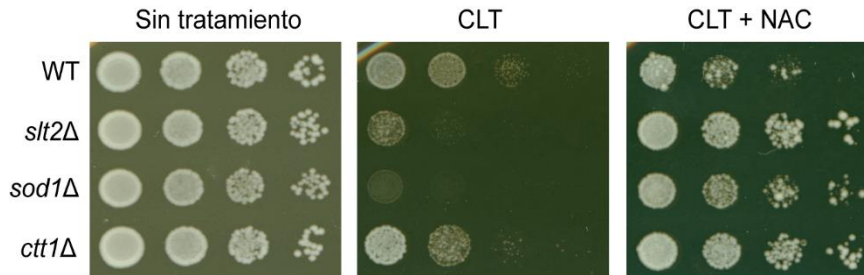


Figura 28. Estudio del efecto del estrés oxidativo sobre la sensibilidad al CLT del mutante *slt2Δ* y de mutantes carentes de las enzimas antioxidantes Sod1 y Ctt1. Ensayo de crecimiento en gota de la cepa BY4741 (WT) y de los mutantes isotécnicos indicados. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de YPD sin estímulo o con 1 µg/mL de CLT, suplementadas con 20 mM de NAC cuando se indica, y las placas se incubaron a 30 °C durante 72 horas.

En segundo lugar, se llevó a cabo un experimento de *Western blotting* con la cepa BY4741 tratada con CLT, y añadiendo NAC en paralelo para comparar el estado de fosforilación de las MAPKs entre las dos condiciones. Mientras que en la muestra tratada con CLT se produjo la activación de Slt2 habitual con la aparición de las formas P-Slt2 y LP-Slt2 características, en la muestra en la que se añadió NAC los niveles de P-Slt2 disminuyeron considerablemente y la forma LP-Slt2 desapareció. Asimismo, la reducción en la fosforilación de Kss1 y Fus3 que provoca el CLT se previno en presencia del NAC (**Figura 29A**). Por otro lado, la activación de Hog1 que induce el CLT a los 30 minutos tampoco se observó al añadir NAC al medio (**Figura 29B**). Adicionalmente, se llevó a cabo el ensayo con el compuesto clorpromazina (CPZ), un fármaco que se emplea como antipsicótico en clínica y que se ha descrito que altera la membrana plasmática, induce la producción de ROS y activa a la ruta CWI en las células de levadura (Kamada *et al.*, 1995; Caldara *et al.*, 2017), como lo hace el CLT. Efectivamente, el tratamiento con la CPZ generó los mismos efectos que habíamos observado con el CLT sobre las rutas de MAPKs: dio lugar a la fosforilación de Slt2 junto a la aparición de LP-Slt2 y provocó la activación de Hog1 y la desfosforilación de Kss1 y Fus3, efectos que también desaparecieron al añadir NAC (**Figura 29**).

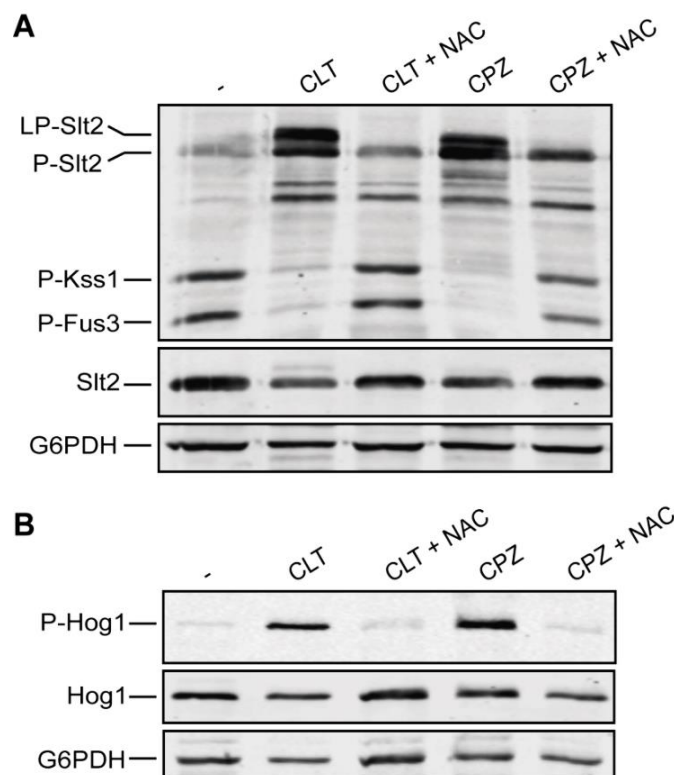


Figura 29. Análisis del efecto del estrés oxidativo inducido por el CLT y la CPZ sobre la señalización a través de las rutas de MAPKs. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 µg/mL de CLT o 50 µM de CPZ en combinación con 20 mM de NAC cuando se indica, durante 240 (A) o 30 (B) minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, Kss1 y Fus3 se detectó con el anticuerpo anti-phospho-p44/42, la fosforilación dual de Hog1 con el anti-phospho-p38, la proteína Slt2 con el anti-Slt2, la proteína Hog1 con el anti-Hog1 y la G6PDH (como control de carga) con el anti-G6PDH.

Todos estos resultados, en conjunto, permiten afirmar que, en las condiciones ensayadas, el estrés oxidativo generado por el CLT está implicado en la activación de las rutas CWI y HOG y en la disminución de la fosforilación basal de Kss1 y Fus3.

1.10. La subunidad Tpk3 de la PKA está relacionada con la aparición de la forma LP-Slt2 en respuesta al CLT.

La ruta de señalización mediada por la proteína quinasa PKA se ha asociado con la agregación de actina (Gourlay and Ayscough, 2006) y con la inducción de ROS mitocondrial en respuesta al tratamiento con diferentes antifúngicos (Belenky *et al.*, 2013). En concreto, su subunidad catalítica Tpk3 es capaz de ejercer funciones específicas en la respuesta celular al estrés oxidativo (Chevtzoff *et al.*, 2005; Gourlay and Ayscough, 2006). Sabiendo que el CLT es capaz de aumentar los niveles de

RESULTADOS

ROS de las células, alterar las mitocondrias y producir agregación de actina, y que estos efectos están relacionados con la activación de la ruta CWI, quisimos estudiar una posible implicación de la PKA en dicha activación.

Se llevó a cabo un análisis de la fosforilación de Slt2 por el CLT en mutantes carentes de cada una de las 3 subunidades catalíticas de la PKA: Tpk1, Tpk2 y Tpk3, y se observó una implicación parcial en la aparición de LP-Slt2 de la subunidad Tpk3 (**Figura 30A**). Cuando se analizó el crecimiento en gota de estos mismos mutantes, se observó una mayor sensibilidad al CLT del mutante *tpk3Δ*, pero no de *tpk1Δ* o *tpk2Δ*, reafirmando la función de esta subunidad en la respuesta a este compuesto. Como el mutante *tpk3Δ* no mostró una mayor sensibilidad al RC, se asoció una funcionalidad específica de esta proteína frente al CLT, pero no frente a otros estreses de la ruta más directamente relacionados con pared celular. Asimismo, también se ensayó la sensibilidad de un mutante que carecía de la subunidad reguladora Bcy1, la cual se encarga de regular negativamente a la PKA. Este mutante mostró sensibilidad tanto al CLT como al RC, lo que se podría relacionar con una mayor susceptibilidad en general de la levadura a situaciones de estrés cuando la PKA se encuentra hiperactiva (**Figura 30B**).

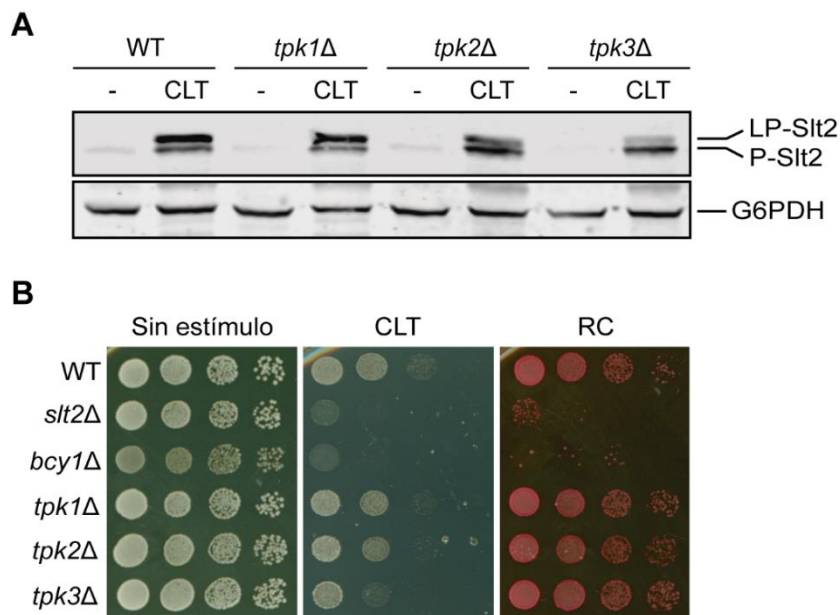


Figura 30. Estudio de la implicación de las subunidades catalíticas de la PKA en la activación de Slt2 por CLT. **(A)** *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y los mutantes isogénicos indicados en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. **(B)** Ensayo de crecimiento en gota de las mismas cepas que en **(A)** y de los mutantes *slt2Δ* y *bcy1Δ*. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de YPD sin estímulo o con 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT o 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de RC, y se incubaron a 30 $^{\circ}\text{C}$ durante 72 horas.

Por último, se analizó la activación de Slt2 en un mutante *bcy1Δ* y se comparó con la mostrada por la cepa WT y el mutante *tpk3Δ*. Se demostró que, al contrario de lo que ocurrió en el mutante *tpk3Δ*, en ausencia de Bcy1 la fosforilación basal de Slt2 sin tratamiento aumentó respecto a la cepa silvestre, así como los niveles de LP-Slt2 tras la exposición al CLT. Estos resultados confirmaron la relación entre la actividad de la PKA y la activación de Slt2 en estas condiciones (**Figura 31**).

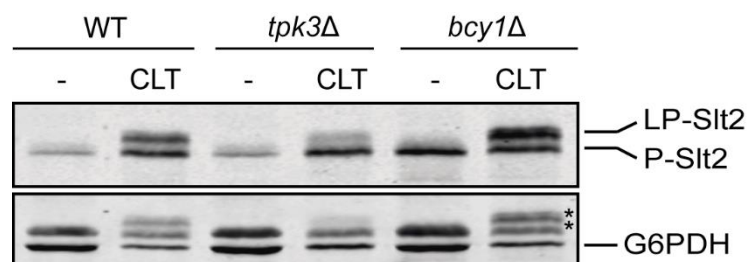


Figura 31. Estudio de la fosforilación de Slt2 por el CLT en los mutantes de delección carentes de las proteínas Tpk3 y Bcy1. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y los mutantes isogénicos indicados en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. La fosforilación dual de Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente. Los asteriscos marcan bandas correspondientes a LP-Slt2 y P-Slt2 cuya señal se arrastró de la incubación con el anticuerpo anti-phospho-p44/42.

1.11. La ruta de biosíntesis de la trehalosa está implicada en la activación de Slt2 por CLT a través de la enzima Tps1.

La trehalosa es un disacárido de glucosa único de plantas y hongos cuya síntesis se ha asociado con una respuesta de protección celular frente a diferentes estreses, entre los que se encuentra el estrés oxidativo (Vilaça *et al.*, 2012). Concretamente en *S. cerevisiae*, esta síntesis se lleva a cabo en dos pasos: la formación del intermediario trehalosa-6P por la enzima Tps1 y su posterior conversión en trehalosa por la enzima Tps2. Asimismo, Tps3 y Tsl1 son dos proteínas estabilizadoras que se unen a ambas enzimas formando un complejo (Gancedo and Flores, 2004). Dado que se ha vinculado la síntesis de la trehalosa con la activación de la ruta CWI por estrés térmico (Mensonides *et al.*, 2005), se planteó investigar una posible relación entre dicha síntesis y la activación de la ruta por el CLT. En la **Figura 32** se muestra que, en ausencia de la enzima Tps1, pero no del resto de elementos que participan en la síntesis de la trehalosa, se produjo una disminución importante de la activación de Slt2 y especialmente del nivel de LP-Slt2 tras el tratamiento con CLT. Este resultado indica que, a diferencia de lo que se planteó en este estudio previo (Mensonides *et al.*, 2005), en el caso de la respuesta a CLT no parece ser la acumulación de trehalosa intracelular en sí la que induce una mayor activación de Slt2, si no que sería el intermediario trehalosa-6P o la enzima Tps1

RESULTADOS

directamente a través de alguna función no identificada aún los que ejercerían un papel en la activación de la ruta CWI.

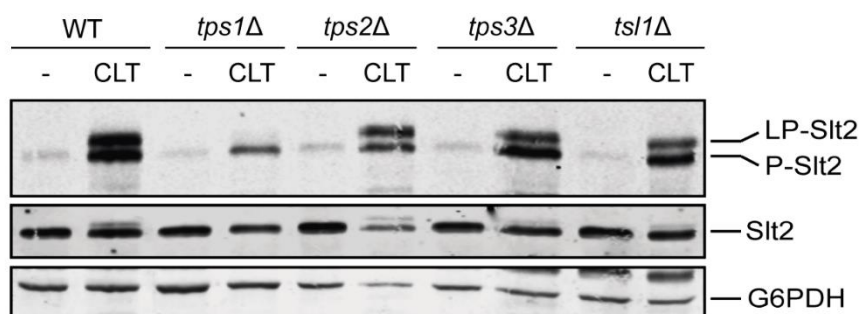


Figura 32. Estudio de la implicación de la ruta de biosíntesis de la trehalosa en la activación de la ruta CWI por CLT. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa BY4741 (WT) y los mutantes isogénicos indicados en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT, durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

2. ESTUDIO DE LA FORMA DE MENOR MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA DE FOSFO-SLT2 (LP-SLT2) CARACTERÍSTICA DEL TRATAMIENTO CON CLT.

2.1. La forma LP-Slt2 se origina por fosforilaciones adicionales a las del motivo de activación TEY.

Como primer paso para llevar a cabo la caracterización de la forma LP-Slt2 que aparece tras el tratamiento con CLT en nuestras condiciones, decidimos identificar la naturaleza de la modificación postraduccional que origina este cambio de movilidad electroforética. Entre las modificaciones existentes, la más común y característica de proteínas de señalización como las MAPKs es la fosforilación. En Slt2, además, se han descrito dos residuos, adicionales a la Thr190 y Tyr192 del motivo de activación, que se fosforilan en respuesta a la cafeína (Ser423 y Ser428) (Truman *et al.*, 2009) y otros que se han identificado a través de ensayos de fosfoproteómica en diferentes condiciones (Breitkreutz *et al.*, 2010; Swaney *et al.*, 2013; Lanz *et al.*, 2021). Para confirmar si esta banda de menor movilidad electroforética de Slt2 es producida por fosforilación, se siguieron dos estrategias experimentales: un ensayo con fosfatasa alcalina y un ensayo de Zn²⁺-Phos-tag SDS PAGE.

En la primera de ellas, se purificó a Slt2-FLAG a partir de los extractos celulares correspondientes y se trató con una enzima fosfatasa alcalina de intestino de cordero (CIAP) capaz de desfosforilar de manera inespecífica aminoácidos fosforilados. Así, se comparó lo que ocurría con la banda correspondiente a LP-Slt2 en la muestra en la que se añadió CIAP respecto a aquellas muestras en las que la enzima no estaba presente o se encontraba inhibida por la adición de ortovanadato sódico. En la **Figura 33** se observa de forma clara que, cuando la enzima actuó sobre Slt2, la forma LP-Slt2 provocada por el tratamiento con el CLT desapareció completamente, por lo que se puede asociar su aparición con un fenómeno de fosforilación.

RESULTADOS

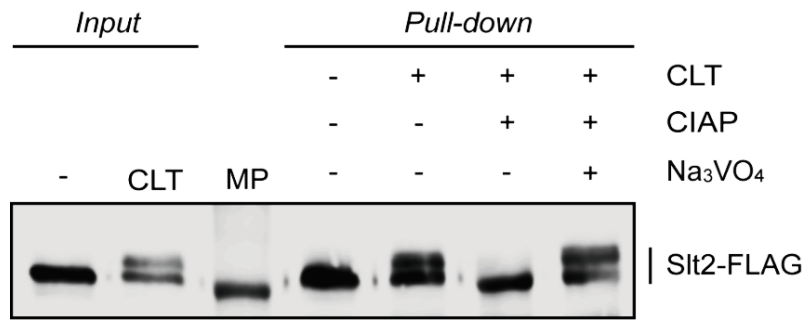


Figura 33. Ensayo con fosfatasa alcalina sobre la proteína Slt2-FLAG tratada con CLT. La cepa Y00993 (*slt2Δ*) se transformó con el plásmido p2313 (Slt2-FLAG) y se cultivó sin (-) o con (+) 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT durante 240 minutos a 24 °C. Slt2-FLAG inmunoprecipitada con anticuerpos anti-FLAG (*pull-down*) se trató sin (-) o con (+) fosfatasa alcalina de intestino de cordero (CIAP) en ausencia (-) o presencia (+) del inhibidor de fosfatasas ortovanadato de sodio (Na₃VO₄). Los extractos celulares sin inmunoprecipitar (*input*) también se analizaron. MP indica el carril donde se cargó el marcador de proteínas, y la banda corresponde a una proteína con un tamaño de 63 kDa. Slt2-FLAG se detectó con el anticuerpo anti-Slt2.

Como método complementario, se realizó un ensayo de Zn²⁺-*Phos-tag* SDS-PAGE, el cual permite separar a las distintas formas de fosforilación de la misma proteína gracias a que los iones de Zn²⁺ que contiene el reactivo *Phos-tag* se unen a los fosfatos, formando complejos que aumentan la masa molecular de las proteínas fosforiladas. De esta forma, se pueden detectar mediante *Western blotting* diferentes bandas correspondientes a una proteína que se correlacionan con la fosforilación de dicha proteína en distintos residuos. Como control, se analizaron muestras tratadas con RC durante dos horas, pues el patrón de movilidad de Slt2 con esta técnica *Phos-tag* se ha descrito previamente por nuestro grupo de investigación (González-Rubio *et al.*, 2021b).

En la **Figura 34** se muestra el resultado del ensayo de la proteína Slt2 en muestras procedentes de células sin estimular y tratadas con CLT y RC, así como de las versiones Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F} monofosforilables solo en uno de los residuos del dominio de activación al tener el otro mutado. Estos mutantes se emplearon con el objetivo de visualizar mejor la posible aparición de bandas adicionales a las provocadas por las formas de Slt2 doblemente fosforiladas y monofosforiladas en el motivo TEY. Se puede observar cómo, utilizando anticuerpos anti-Slt2, en la versión silvestre de Slt2 se apreciaron las mismas bandas originadas por el CLT y por el RC, que correspondían a la proteína no fosforilada (np), la proteína monofosforilada en treonina (pT), la forma doblemente fosforilada (pTpY) y la monofosforilada en tirosina (pY), en orden de mayor a menor movilidad electroforética, de acuerdo con lo descrito previamente (González-Rubio *et al.*, 2021b). Sin embargo, en la muestra con Slt2^{T190A} tratada con CLT, además de la banda correspondiente a la forma monofosforilada en la Y192 que aparece también con RC muy retardada en el gel, como ya

habíamos observado para esta versión mutante (González-Rubio *et al.*, 2021b), apareció al menos una banda extra de mayor movilidad que no se observó en la muestra expuesta a RC. Ninguna de estas bandas se detectó con el anticuerpo anti-phospho-p44/42 que se une a la forma doblemente fosforilada de Slt2. Este anticuerpo, sin embargo, es capaz de detectar adicionalmente la fosforilación en treonina (González-Rubio *et al.*, 2021b), por lo que permitió apreciar la forma monofosforilada en la T190 en células con la versión mutante Slt2^{Y192F} expuestas a ambos estímulos y también bandas adicionales exclusivas del tratamiento con CLT. Estos resultados sugieren que existen formas fosforiladas adicionales de Slt2 en células tratadas con CLT que presentan una movilidad diferente a las formas doblemente fosforiladas y monofosforiladas de Slt2 en el dominio de activación, como se pone de manifiesto en geles con *Phos-tag*. Además, con el uso del anticuerpo anti-phospho-p44/42, se comprobó que el CLT es un activador de la ruta CWI más potente que el RC, pues el nivel de fosforilación detectado de Slt2 fue notablemente superior, tanto en cuanto a la cantidad de proteína doblemente fosforilada como a la de la forma monofosforilada en la T190 (**Figura 34**).

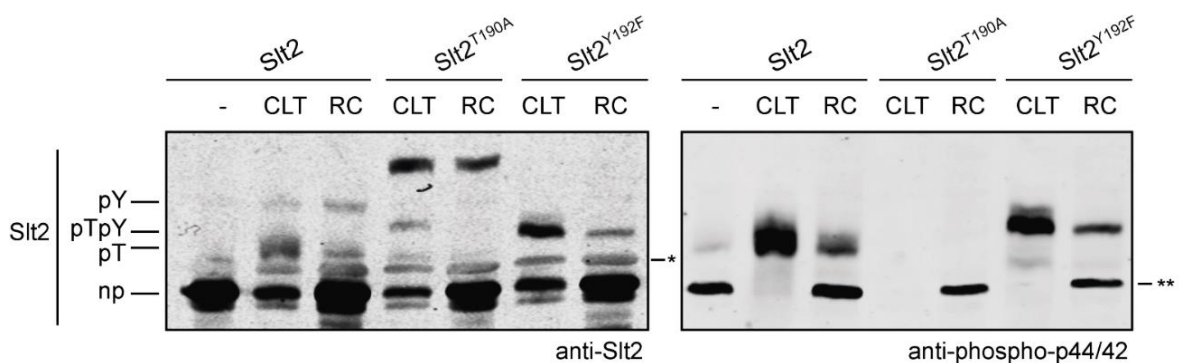


Figura 34. Análisis mediante Zn^{2+} -*Phos-tag* SDS-PAGE de Slt2 y sus versiones mutantes monofosforilables Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F} tras el tratamiento con CLT y RC. La cepa Y00993 (*slt2Δ*) se transformó con el plásmido pRS316 que porta las versiones de Slt2 indicadas, y se incubó sin tratamiento (-) y con 50 μ g/mL de CLT o 30 μ g/mL de RC, durante 120 (muestras con RC) o 240 (muestras con CLT y sin tratar) minutos a 24 °C. Todas las formas de Slt2 se detectaron con el anticuerpo anti-Slt2: las formas monofosforiladas en treonina (pT), monofosforiladas en tirosina (pY), doblemente fosforiladas (pTpY) y no fosforiladas (np) (panel izquierdo). Las formas fosforiladas de Slt2 (pT y pTpY) se detectaron con el anticuerpo anti-phospho-p44/42 (panel derecho). Las bandas marcadas con asteriscos corresponden a una banda inespecífica (*) y a np-Slt2, cuya señal se arrastró de la incubación con anti-Slt2 (**).

Estos resultados, en conjunto, indican que la forma LP-Slt2 que surge por la exposición al CLT tiene su origen en fosforilaciones en residuos de la proteína adicionales a los del motivo de activación TEY.

RESULTADOS

2.2. Las fosforilaciones adicionales causantes de la forma LP-Slt2 son dependientes de la activación de la propia MAPK y de su actividad quinasa.

Con el objetivo de profundizar en el mecanismo mediante el cual se producen estas fosforilaciones adicionales, analizamos su dependencia tanto de la activación como de la actividad catalítica de Slt2. Por un lado, se empleó una versión de la MAPK mutada en los dos residuos Thr190 y Tyr192 del motivo de activación TEY a alanina y fenilalanina, respectivamente, y que por tanto es incapaz de activarse (Slt2^{TAYF}), y se analizó su patrón de movilidad electroforética. Como era esperable, esta versión mutante no fosforilable no se detectó con el anticuerpo anti-phospho-p44/42, pero sí con el anti-Slt2. Así, la forma LP-Slt2 que apareció en la versión silvestre de Slt2 expuesta al CLT, y que se detectó con ambos anticuerpos, no se observó en la muestra tratada con el CLT que contenía a la construcción Slt2^{TAYF} (**Figura 35**).

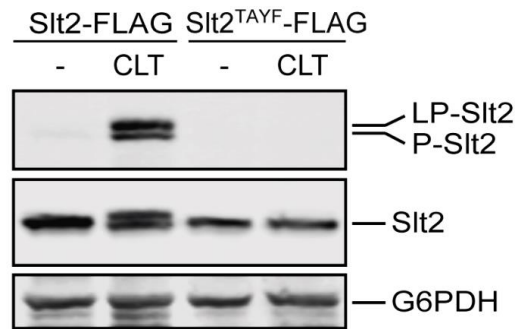


Figura 35. Análisis de la forma LP-Slt2 en una versión mutante de Slt2 no fosforilable en el motivo de activación TEY mediante *Western Blotting*. La cepa Y00993 (*slt2Δ*) se transformó con los plásmidos p2313 (Slt2-FLAG) y p2316 (Slt2^{TAYF}-FLAG) y se cultivó en ausencia de tratamiento (-) o con 50 µg/mL de CLT, durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

Por otro lado, se hizo uso de una versión catalíticamente inactiva (*Kinase-Dead*) de Slt2 mutada en el residuo Lys54 a fenilalanina (Slt2^{KD}), con la que tampoco se observó la aparición de LP-Slt2 tras el tratamiento con el CLT, mientras que en respuesta al RC se detectó la misma banda de fosforilación que en la versión silvestre (**Figura 36A**). De forma complementaria, se utilizó una versión de Slt2 mutada en el residuo Thr195 a valina (Slt2^{T195V}), cuya actividad quinasa está comprometida (González-Rubio *et al.*, 2021b), y se observó una disminución relevante de la cantidad de LP-Slt2 respecto a la versión silvestre tras el tratamiento con el CLT (**Figura 36B**). La banda LP-Slt2 no llegó a desaparecer del todo, dado que la ausencia del residuo Thr195 afecta significativamente a la actividad catalítica de la MAPK, pero no la elimina completamente (González-Rubio *et al.*, 2021b).

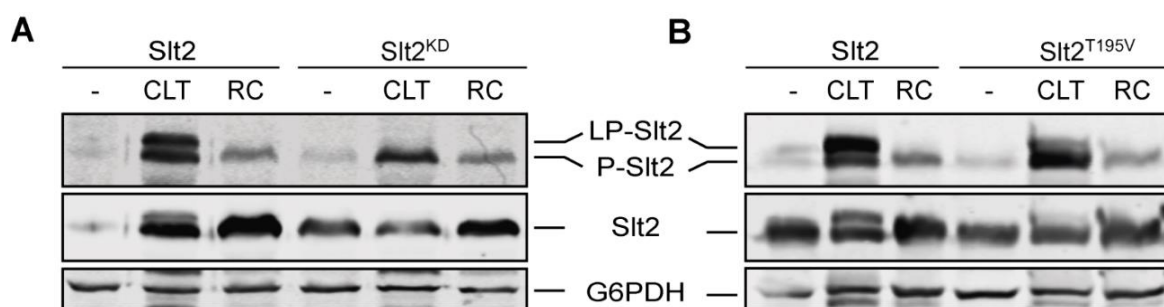


Figura 36. Estudio de la implicación de la actividad catalítica de Slt2 en la aparición de la forma LP-Slt2. (A,B) *Western Blotting* de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con el plásmido pRS316 que porta las versiones de Slt2 indicadas tras su incubación sin estímulo (-) y con 50 µg/mL de CLT o 30 µg/mL de RC, durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

Estos resultados, en conjunto, indican que tanto la activación de Slt2 por fosforilación en su dominio TEY como su actividad catalítica son importantes para la formación de estas fosforilaciones adicionales propias del CLT, lo que sugiere que o bien podrían originarse por un fenómeno de autofosforilación o bien por la acción de otra proteína quinasa activada por Slt2.

2.3. La parte C-terminal de Slt2 está implicada en las fosforilaciones adicionales producidas por el CLT.

Con el fin de identificar los residuos de Slt2 implicados en las fosforilaciones causantes de la forma LP-Slt2 característica del tratamiento con el CLT, se llevaron a cabo diferentes aproximaciones.

En primer lugar, se realizó un ensayo de fosfoproteómica con una construcción de Slt2-FLAG que se purificó, por una parte, a partir de células de levadura que se usaron como control sin tratamiento y por otra de células que fueron expuestas al antifúngico. Así, la proteína purificada mediante una resina con anticuerpos anti-FLAG se cargó en un gel de electroforesis y sus bandas correspondientes se utilizaron como muestras para la realización del análisis proteómico mediante nano-cromatografía líquida y espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). De esta forma, se detectaron una serie de péptidos tanto en la muestra sin tratar como en la tratada con CLT en los que se localizó fosforilación como modificación en uno o varios de sus residuos. En la **Figura 37A** se encuentran marcados en la secuencia primaria de Slt2 aquellos residuos que se identificaron como fosforilados en la muestra expuesta al CLT, que fueron los siguientes: Tyr143, Ser146, Ser179,

RESULTADOS

Ser186, Thr190, Tyr192, Ser393, Tyr407, Thr413, Ser414, Ser416, Ser423 y Ser428. Entre ellos, cabe destacar que los residuos Ser179, Ser186, Thr190, Tyr192, Ser423 y S428 solamente se encontraron en la muestra con el CLT, mientras que el resto también se identificaron en la muestra sin tratar. Además, las serinas situadas en las posiciones 423 y 428, como se ha mencionado antes, ya fueron identificadas como fosforiladas en respuesta a la cafeína (Truman *et al.*, 2009), mientras que las fosforilaciones en Ser179 y Ser186 se describieron en trabajos fosfoproteómicos previos (Breitkreutz *et al.*, 2010; Lanz *et al.*, 2021).

A

```

1  MADKIERHTFKVFNQDFSVDKRFQLIKEIGHGAYGIVCSARFAEAAEDTTVAIKKVTNVFSKTLCLKRSLRELK
75  LLRHFRGHKNITCLYDMDIVFYPDGSINGLYLEELMECDMHQIKSGQPLTDAHYQSFTYQLCGLKVIHSHAD
149 VLHRDLKPGNLLVNADCQLKICDFGLARGYS179ENPVENS186QFLTEY190VATRWYRAPEIMLSYQGYTKAIDVWSA
220 GCILAEFLGGKPIFKGKDYVNQLNQLVGLTTPPETLRRIGSKNVQDYIHQLGFIPKVPFVNLYPNANSQAL
293 DLLEQMLAFDPQKRITVDEALEHPYLSIWHDPADPEVPCSEKFEFSFESVNDMEDLKQMVIVQEVQDFRLEFVR
364 QPLLEEQRQLQLQQQQQQQQQQQQQQQQQQQ393SDVDNGNAAASEEN407PKQMAT413SNVAPOQES423FGIHS428
430 QNLPRHDADFPFRPQESMMEMRPATGNTADIPPQNDNGTLTLDLEKELEFGLDRKYF Cola C-terminal
  
```

B

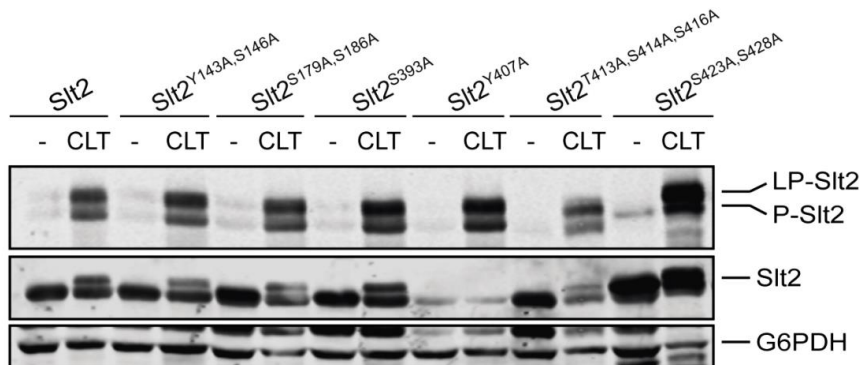


Figura 37. Análisis de la implicación de los residuos fosforilables de Slt2 detectados por fosfoproteómica en la generación de la forma LP-Slt2. **(A)** Secuencia primaria de Slt2 con los residuos identificados como fosforilados por fosfoproteómica en la muestra tratada con CLT marcados en verde. Los aminoácidos del motivo de activación TEY se encuentran subrayados en negro y los incluidos en la cola C-terminal en naranja. El ensayo de fosfoproteómica se realizó sobre una versión de Slt2-FLAG purificada de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con el plásmido p2313 (Slt2-FLAG) sin estímulo o tras el tratamiento con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. **(B)** *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con el plásmido pRS316 que porta las versiones de Slt2 indicadas, en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT durante 240 minutos a 24 $^{\circ}\text{C}$. En el caso de la construcción Slt2^{S423A,S428A}, el plásmido es el p2826 (Slt2^{S423A,S428A}-FLAG). La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

A raíz de estos resultados, se procedió a la construcción de versiones de Slt2 mutadas en uno o en varios de estos residuos, salvo en el caso de los aminoácidos del motivo de activación Thr190 y Tyr192, sustituyéndose los posibles aminoácidos fosforilados por alanina (aminoácido no fosforilable), y se analizó la fosforilación de Slt2 dependiente del CLT mediante *Western blotting*. Ninguno de estos residuos parece estar implicado en las fosforilaciones investigadas, pues en ninguno de los mutantes ensayados se observó una desaparición o disminución de intensidad de la banda de menor movilidad electroforética correspondiente a la forma LP-Slt2 (**Figura 37B**). Cabe especificar que, en el caso de la versión Slt2^{Y407A}, no se detectó señal con el anticuerpo anti-Slt2 porque la mutación del residuo Y407 afectó al reconocimiento de la proteína por parte del anticuerpo.

Por otro lado, como en el apartado anterior se planteó la posibilidad de que estas fosforilaciones adicionales se originaran por un fenómeno de autofosforilación o por otra proteína quinasa que podría tratarse de una MAPK, se realizó el mismo experimento con un mutante con el residuo Thr251 sustituido por alanina, el cual es el único sitio -S/T-P- presente en Slt2. En este mutante también se produjo la forma LP-Slt2, por lo que este residuo no está implicado en la fosforilación extra de la MAPK (**Figura 38**).

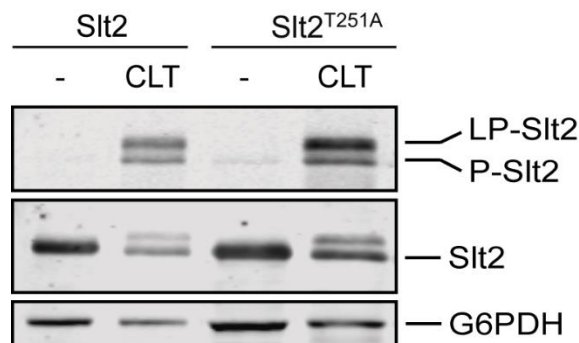


Figura 38. Análisis de la implicación del residuo T251 de Slt2 en la generación de la forma LP-Slt2. *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con los plásmidos pRS316-SLT2 y pRS316-*slt2*^{T251A}, en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 µg/mL de CLT durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-G6PDH, respectivamente.

Erk5, la MAPK propuesta como homóloga de Slt2 en mamíferos (Truman *et al.*, 2006), presenta al igual que esta una cola C-terminal característica, en la cual se han identificado múltiples residuos cuya fosforilación es necesaria para el desarrollo de diferentes funciones (Morimoto *et al.*, 2007; Díaz-Rodríguez and Pandiella, 2010; Iñesta-Vaquera *et al.*, 2010; Honda *et al.*, 2015; Pearson *et al.*, 2020). Ante la posibilidad de que en Slt2 pudiera ocurrir lo mismo, y aunque algunos de los posibles

RESULTADOS

sitios de fosforilación ya analizados se encontraban en esta región (**Figura 37**), decidimos investigar si las fosforilaciones adicionales generadas por el CLT se producían en alguno de los residuos S/T/Y restantes situados en esta zona de la MAPK. Para ello, en primer lugar, se estudió la fosforilación de una versión de Slt2 más corta (residuos 1-374) que carecía de la mayor parte de la cola C-terminal. En la **Figura 39** se muestra como con esta construcción Slt2^{ΔC374} no se originó una forma de menor movilidad electroforética de P-Slt2^{ΔC374}, a diferencia de la versión silvestre con la que sí apareció la forma LP-Slt2 tras la exposición al CLT, lo que sugiere que las fosforilaciones causantes del cambio de movilidad electroforética ocurren en la región C-terminal de la proteína.

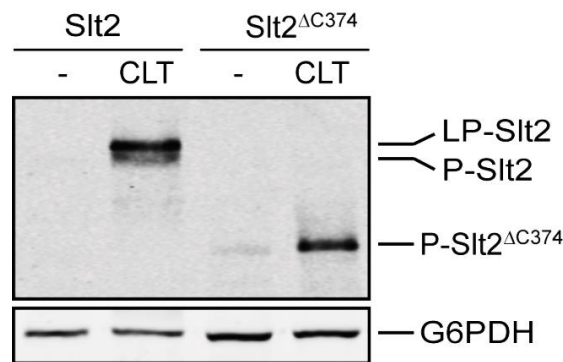


Figura 39. Análisis mediante *Western blotting* de la fosforilación por CLT de una versión de Slt2 sin la cola C-terminal. La cepa Y00993 (*slt2Δ*) se transformó con los plásmidos pRS316-*SLT2* y pRS316-*slt2*^{ΔC374} y se incubó en ausencia de estímulo (-) y con 50 μg/mL de CLT durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2 y la proteína G6PDH (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42 y anti-G6PDH, respectivamente.

Por tanto, este resultado apoyaba la idea de buscar los residuos implicados en estas fosforilaciones adicionales del CLT en la zona correspondiente a la cola C-terminal de Slt2. Para ello, decidimos solicitar a la casa comercial *GenScript* una versión de Slt2 con todos sus residuos fosforilables S/T/Y (excepto la Thr190 y la Tyr192) mutados a A/V/F respectivamente, siendo estos últimos los residuos no fosforilables más semejantes a la serina, treonina y tirosina. Esta construcción se subclonó en el plásmido pRS316 y a partir de ella se llevó a cabo una versión de Slt2 con los últimos 5 aminoácidos fosforilables mutados (Slt2-5m), puesto que correspondían a los residuos situados en esta zona cuya participación en la generación de LP-Slt2 no se había analizado todavía. En la **Figura 40A** se muestra la localización de estos residuos (Ser445, Thr453, Thr456, Thr467 y Tyr483) en la secuencia primaria de Slt2. En el *Western blot* de la **Figura 40B** se puede observar cómo, en presencia de la versión Slt2-5m, el nivel de LP-Slt2 disminuyó de forma muy considerable respecto a la versión de Slt2 silvestre, lo que sugiere la implicación de uno o varios de

estos aminoácidos en las fosforilaciones generadas por el CLT. En presencia de RC, en cambio, la fosforilación de Slt2 fue similar en las versiones silvestre y mutada.

A

1 MADKIERHTFKVFNQDFSVDKRFQLIKEIGHGAYGIVCSARFAEAAEDTTVAIKKVTNVFSKTLCKRSLRELK
 75 LLRHFRGHKNITCLYDMDIVFYPDGSINGLYEELMECDMHQIIKSGQPLTDAHYQSFTYQILCGLKYIHSAD
 149 VLHRDLKPGNLLVNADCLKICDFGLARGYSENPVENSQFLTEYVATRWRYPEIMLSYQGYTKAIDVWSA
 220 GCILAEFLGGKPIFKGKDYVNQLNQLQVLGTPPDETLRRIGSKNVQDYIHQLGFIPKVPFVNLYPNANSQAL
 293 DLLEQMLAFDPQKRITVDEALEHPYLSIWHDPADPEPVCSEKFEFSFESVNDMEDLKQMVVIQEVQDFRLEFVR
 364 QPLLEEQRLQLQQQQQQQQQQQQQQQQPSDVDNGNAAASEENYPKQMATSNSVAPQQESEFGIHSQ
 430 NLPRHDADFPPRPOESMMEMRPAIGNIADIPPQNDNGILLDLEKELEFGLDRKVF Cola C-terminal
 445 453 456 467 483

B

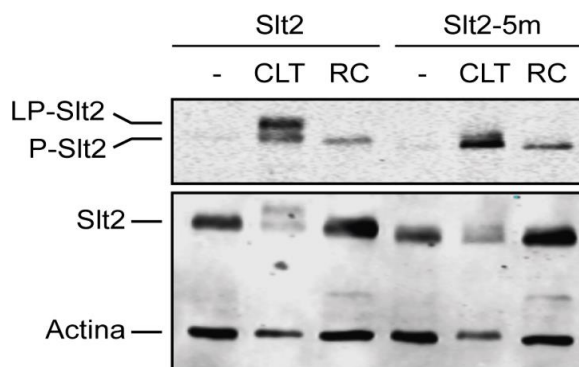


Figura 40. Análisis de la implicación de los últimos 5 residuos fosforilables de la cola C-terminal de Slt2 en la generación de la forma LP-Slt2. **(A)** Secuencia primaria de Slt2 con los residuos mutados en la versión Slt2-5m marcados en verde. Los aminoácidos incluidos en la cola C-terminal se encuentran subrayados en naranja. **(B)** *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con los plásmidos pRS316-*SLT2* y pRS316-*slt2-5m* en ausencia de estímulo (-) y tras la exposición a 50 µg/mL de CLT o 30 µg/mL de RC durante 240 minutos a 24 °C. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la actina (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-actina, respectivamente.

Con el objetivo de identificar los residuos concretos implicados en la generación de LP-Slt2, llevamos a cabo los mutantes individuales en los aminoácidos Ser445, Thr453, Thr456 y Thr467 y analizamos la fosforilación de Slt2 por CLT mediante *Western blotting*. Cabe mencionar que no se llevó a cabo la mutación individual del residuo Tyr483, puesto que se ha visto que la fosforilación en tirosina es poco común comparada con las fosforilaciones en serina y treonina (Ptacek and Snyder, 2006). Se comparó la movilidad y el nivel de intensidad de LP-Slt2 en las diferentes versiones mutadas respecto a la versión silvestre de Slt2 tras el tratamiento con el CLT, y se observó una menor presencia de esta forma en ausencia del residuo Thr453, lo que indica una probable implicación de este aminoácido en las fosforilaciones adicionales. En el caso de los residuos Ser445

RESULTADOS

y Thr467, por el contrario, no se detectaron cambios en LP-Slt2 en su ausencia, y en la versión mutada en el residuo Thr456, aunque no se observó la misma reducción de LP-Slt2 que en Slt2^{T453V}, si que se apreció cierto cambio en su movilidad y una disminución leve de su intensidad, lo que sugiere que este residuo también podría estar participando en la formación de LP-Slt2 (**Figura 41A**). Para confirmarlo, decidimos llevar a cabo una versión de Slt2 mutada en ambos residuos Thr453 y Thr456 y analizar su patrón de movilidad electroforética en comparación con los mutantes simples y la versión silvestre de Slt2, mediante el uso de un gel con un porcentaje menor de acrilamida (8%) respecto al empleado de forma habitual (10%), con el fin de conseguir una mayor separación de las bandas. En la **Figura 41B** se puede apreciar que, en las versiones Slt2^{T453V} y Slt2^{T456V} la forma LP-Slt2 se dividió en varias bandas con mayor movilidad, lo que sugiere, por un lado, que Slt2 se fosforila de forma adicional en más de un residuo diferente y, por otro lado, que los aminoácidos Thr453 y Thr456 son responsables de algunas de estas fosforilaciones, especialmente el primero de ellos. Este cambio en LP-Slt2, además, fue más notable en las versiones Slt2^{T453VT456V} y Slt2-5m, lo que confirma la participación de ambos residuos en las fosforilaciones adicionales causadas por el CLT.

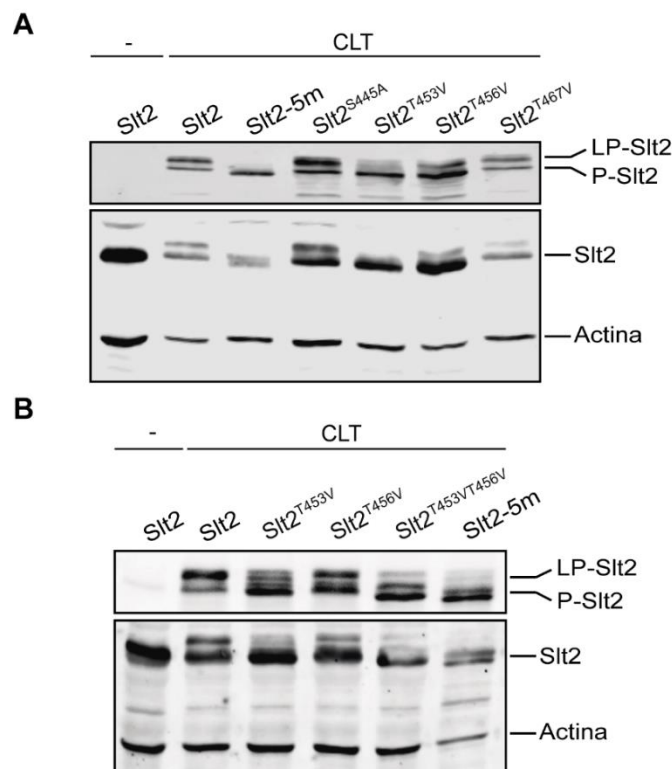


Figura 41. Análisis de la implicación de los residuos S445, T453, T456 y T467 de Slt2 en la generación de la forma LP-Slt2. (**A,B**) *Western blotting* de los extractos celulares de la cepa Y00993 (*slt2Δ*) transformada con el plásmido pRS316 que porta las construcciones de Slt2 indicadas. Las células se incubaron en ausencia de estímulo (-) y con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de CLT durante 240 minutos a 24 °C. El gel de electroforesis separador en (**B**) tiene un porcentaje de acrilamida del 8% en lugar del 10%. La fosforilación dual de Slt2, la proteína Slt2 y la actina (como control de carga) se detectaron con los anticuerpos anti-phospho-p44/42, anti-Slt2 y anti-actina, respectivamente.

3. ANÁLISIS DE LA FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DEPENDIENTE DEL CLT MEDIANTE UN ENSAYO GLOBAL DE FOSFOPROTEÓMICA.

3.1. El tratamiento con el CLT conduce a cambios en el fosfoproteoma dependientes e independientes de la MAPK Slt2.

Los ensayos globales de fosfoproteómica son herramientas muy útiles para la identificación de residuos fosforilados en las proteínas y para adquirir una visión amplia de qué procesos celulares se encuentran regulados por fosforilación en las condiciones de estudio. Por ello, con el fin de conocer cómo afecta el tratamiento con el CLT al estado de fosforilación general de las proteínas de la levadura, y más concretamente al de las proteínas relacionadas con la ruta CWI, se llevó a cabo un ensayo de fosfoproteómica con las células de levadura antes y después de su exposición al CLT a diferentes tiempos. Además, el ensayo se realizó paralelamente con la cepa silvestre BY4741 y con el mutante isogénico *slt2Δ*, con el objetivo de detectar entre las proteínas fosforiladas de forma dependiente del CLT, cuales deben su fosforilación a la presencia de la MAPK Slt2. Se llevó a cabo una estrategia empleada anteriormente en varios trabajos del grupo de investigación con el que realicé una estancia predoctoral, en los que se estudió la dinámica del fosfoproteoma de *S. cerevisiae* durante las fases del ciclo celular mediante proteómica cuantitativa *multiplex* (Touati *et al.*, 2019; Pirincci Ercan *et al.*, 2021). Así, la metodología consistió en la realización de una serie de pasos sucesivos descritos en Jones *et al.* (2020): el cultivo de células y recogida de muestras a diferentes tiempos, la obtención de extractos proteicos completos, la digestión de proteínas con tripsina, el marcaje de los péptidos con el sistema de etiquetado isobárico *TMT-10plex*, el enriquecimiento de fosfopéptidos mediante cromatografía de afinidad de óxidos de metal y el análisis proteómico por LC-MS/MS (**Figura 42**).

Para que los resultados del ensayo resultaran fiables, se llevaron a cabo dos réplicas biológicas del experimento en las mismas condiciones, y los datos que se obtuvieron se seleccionaron y procesaron de forma similar a como se realizó en las investigaciones previas (Touati *et al.*, 2019; Pirincci Ercan *et al.*, 2021). De este modo, solo se seleccionaron aquellos fosfopéptidos en los que se identificó un único residuo fosforilado y que aparecieron en ambas réplicas, obteniendo un total de 5089, correspondientes a 1428 proteínas. En cada réplica, por separado, los valores de abundancia de estos fosfopéptidos en las muestras con CLT (15', 30', 60' y 120') se normalizaron respecto al valor correspondiente a la muestra 0' para cada cepa, de forma que, el valor normalizado de abundancia de cada fosfopéptido en cada muestra se correlacionó con un mayor o menor nivel de fosforilación de dicho péptido respecto a la muestra control sin CLT (0').

RESULTADOS

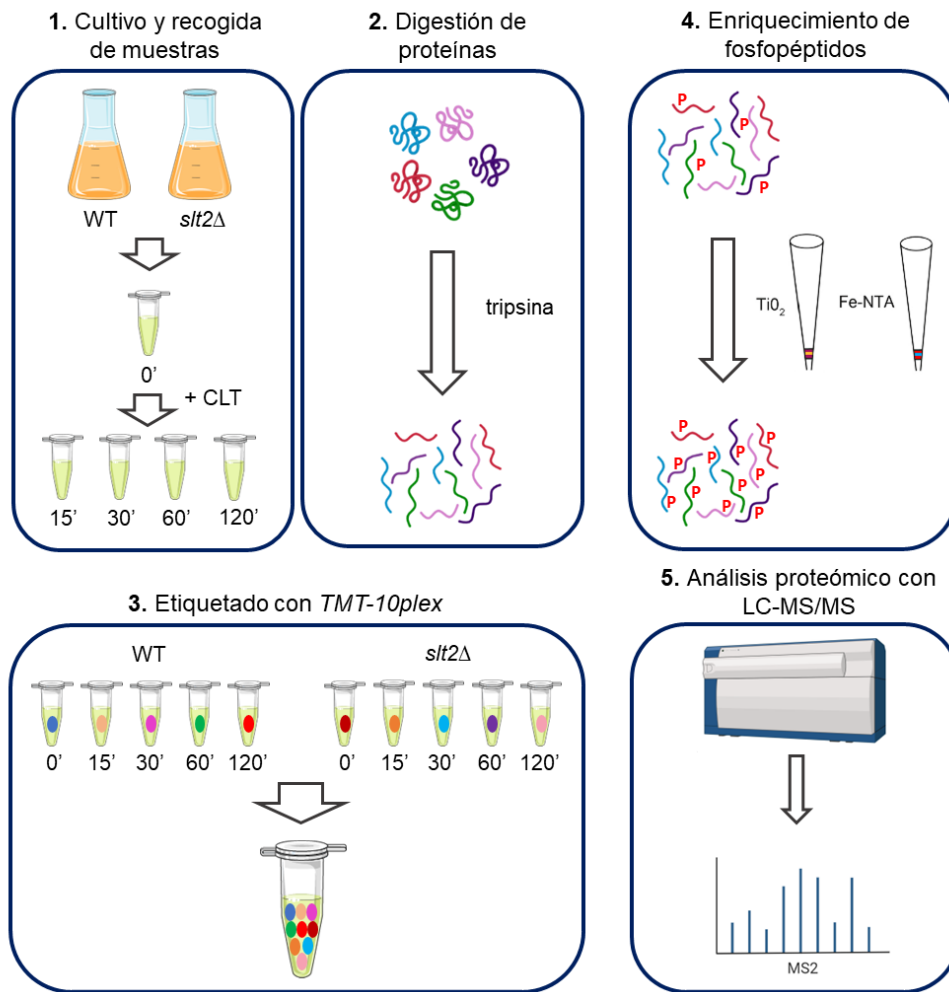


Figura 42. Representación esquemática del ensayo global de fosfoproteómica. Se cultivaron células de la cepa BY4741 (WT) y el mutante isogénico *slt2Δ* a 25 °C y se recogieron muestras previas al tratamiento con CLT (0') y tras la exposición a 50 µg/mL de CLT a diferentes tiempos (15', 30', 60', 120'). Las proteínas presentes en cada muestra se procesaron como se indica en los pasos 2-4, y se analizaron conjuntamente mediante LC-MS/MS. De esta forma se detectaron y cuantificaron los fosfopéptidos más abundantes en cada una de las muestras.

Para comparar el comportamiento a lo largo del tratamiento con el CLT de los 5089 fosfopéptidos identificados, se realizó un *clustering* jerárquico agrupándolos según sus datos de abundancia a los diferentes tiempos, y se representó mediante un mapa de calor o *Heatmap*, asociando un mayor valor de abundancia con una mayor intensidad de fosforilación (**Figura 43**). Se observó la presencia tanto de fosfopéptidos que aumentaron su concentración tras el tratamiento con el CLT como de otros que disminuyeron, siguiendo diferentes patrones. Asimismo, algunos fosfopéptidos presentaron un comportamiento diferente en el mutante *slt2Δ* respecto a la cepa WT. Ambas observaciones sugieren que el CLT es capaz de provocar tanto la fosforilación como la

desfosforilación de proteínas de forma dependiente del tiempo de exposición, y que la ausencia de Slt2 produce en algunos casos cambios en estos patrones.

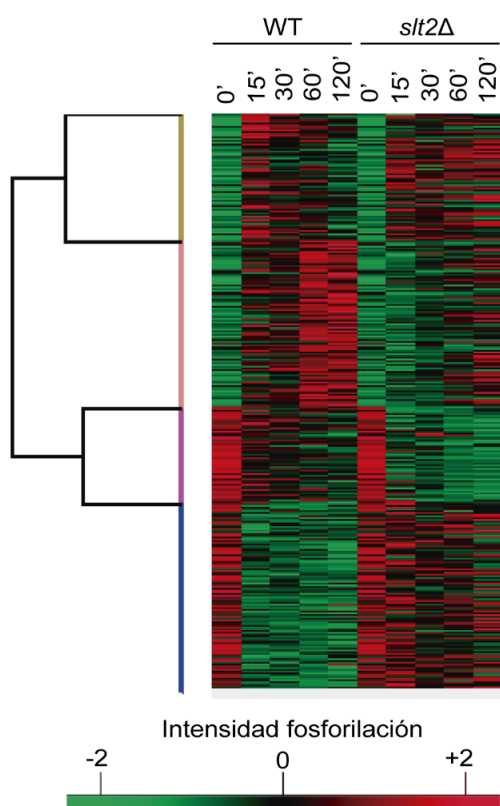


Figura 43. Representación mediante *Heatmap* de la cinética de fosforilación de los 5089 fosfopéptidos detectados e identificados por fosfoproteómica. Se calculó la media de los valores de cuantificación normalizados de los fosfopéptidos en ambos experimentos y se llevó a cabo un *clustering* jerárquico tras aplicar una segunda normalización de tipo *Z-Score*. El color rojo indica un mayor valor de abundancia y por tanto un mayor grado de fosforilación, y el verde un menor. Los fosfopéptidos se agruparon en cuatro grupos (indicados con diferentes colores en el dendograma) según su patrón de fosforilación en la cepa WT. Los datos de los mismos fosfopéptidos detectados en el mutante *slt2Δ* se dispusieron en paralelo. El análisis se llevó a cabo con el *software Perseus*.

A continuación, decidimos establecer unos criterios para relacionar un aumento o una disminución significativa de la abundancia de un fosfopéptido en una muestra determinada respecto a la muestra control con un evento de fosforilación o desfosforilación dependiente del CLT, respectivamente. Así, aquellos fosfopéptidos para los que a cualquier tiempo de exposición al CLT su valor de abundancia fuera 1.5 veces mayor que el correspondiente al tiempo 0' se consideraron fosforilados, mientras que los que presentaron una abundancia 1.5 veces menor se consideraron desfosforilados. Se aplicaron estos criterios en las dos réplicas del ensayo por separado, y solamente se escogieron los fosfopéptidos que cumplieron estas condiciones en ambos experimentos. Teniendo en cuenta estos criterios, se seleccionaron un total de 1576 fosfopéptidos

RESULTADOS

que se fosforilaron y 1770 fosfopéptidos que se desfosforilaron en respuesta al CLT en al menos alguna de las cepas. Este resultado indica que el tratamiento con el CLT afecta de forma similar a la fosforilación y a la desfosforilación de proteínas. En la **Tabla 6** se muestran los datos de fosforilación y desfosforilación, tanto de los fosfopéptidos identificados como de las correspondientes proteínas, desglosados por cepas.

Tabla 6. Número de fosfopéptidos y sus proteínas correspondientes fosforiladas o desfosforiladas en las condiciones indicadas.

	EN TOTAL	EN AMBAS CEPAS	SÓLO EN LA CEPA WT	SÓLO EN LA CEPA <i>slt2Δ</i>
Fosfopéptidos fosforilados	1576	888	360	328
Proteínas fosforiladas	661	425	258	214
Fosfopéptidos desfosforilados	1770	856	526	388
Proteínas desfosforiladas	795	473	287	297

Al ser los eventos de fosforilación dependientes del CLT de mayor interés para este trabajo, decidimos centrarnos en ellos y realizar un estudio en mayor profundidad. En la **Tabla I** del **Anexo I** se exponen los datos completos de los 1576 fosfopéptidos considerados fosforilados y en la **Figura 44** se muestra un *Heatmap* con su cinética de fosforilación en las cepas WT y *slt2Δ*. Se puede apreciar la presencia de fosfopéptidos que solamente aumentaron de concentración a tiempos largos de exposición al CLT (señalados con azul en el dendograma), otros que lo hicieron a tiempos cortos y mantuvieron los niveles a lo largo del tiempo (en verde), y un grupo reducido de fosfopéptidos que aumentaron significativamente su abundancia a los 15 minutos y posteriormente disminuyó (en rosa). Además, se observaron grupos de fosfopéptidos cuyo aumento de cantidad se produjo solo en la cepa WT y no en el mutante *slt2Δ* (en verde) y viceversa (en morado), sugiriendo la existencia de proteínas cuya fosforilación es dependiente de la presencia o ausencia de Slt2.

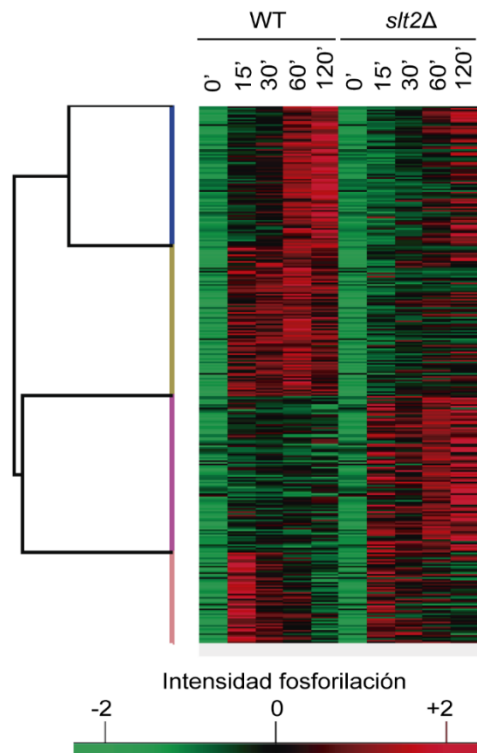


Figura 44. Representación mediante *Heatmap* de la cinética de fosforilación de los 1576 fosfopéptidos considerados fosforilados tras el tratamiento con el CLT. Se calculó la media de los valores de cuantificación normalizados de los fosfopéptidos en ambos experimentos y se llevó a cabo un *clustering* jerárquico tras aplicar una segunda normalización de tipo *Z-Score*. El color rojo indica un mayor valor de abundancia y por tanto un mayor grado de fosforilación, y el verde un menor. Los fosfopéptidos se agruparon en cuatro grupos (indicados con diferentes colores en el dendograma) según su patrón de fosforilación en la cepa WT. Los datos de los mismos fosfopéptidos detectados en el mutante *slt2Δ* se dispusieron en paralelo. El análisis se llevó a cabo con el *software Perseus*.

Por otro lado, se llevó a cabo un estudio de enriquecimiento haciendo uso de la herramienta *GeneOntology* (GO) con la lista de genes correspondientes a las proteínas que se clasificaron como fosforiladas de forma dependiente del tratamiento con el CLT. Este análisis permitió identificar los principales grupos funcionales GO (procesos biológicos) en los que se clasificaron los genes en cuestión y que, por tanto, se vieron más afectados por dicho tratamiento. Así, se seleccionaron aquellos procesos biológicos más específicos que se encontraron sobrerrepresentados (con enriquecimientos mayores de +2.5), y se mostró para cada uno su valor de enriquecimiento y su *p-value* (**Tabla 7**), siendo el primero un dato que representa el número de veces que se observan genes en nuestra lista pertenecientes al grupo GO en cuestión respecto a lo que se esperaría en base al genoma de referencia, en este caso al genoma de *S. cerevisiae*, y siendo el segundo la probabilidad de que los genes se hayan incluido en dicho grupo GO por azar. Se puede apreciar que la mayoría de los procesos biológicos resultaron estar relacionados con el citoesqueleto de actina,

RESULTADOS

lo que indica que el CLT afecta en gran medida a esta estructura celular y concuerda con la alteración de la actina provocada por el CLT descrita en el apartado 1.8.

Tabla 7. Lista de procesos biológicos más enriquecidos en las proteínas fosforiladas en respuesta al CLT. Se muestran sus datos de enriquecimiento y el *p-value*.

PROCESO BIOLÓGICO	ENRIQUECIMIENTO	P-VALUE
Ensamblaje de gránulos de estrés	+ 5.98	4.12E-04
Ensamblaje del parche cortical de actina	+ 5.98	7.73E-05
Regulación de la nucleación de actina mediada por el complejo Arp2/3	+ 5.13	8.71E-04
Regulación negativa de la actividad proteín quinasa	+ 4.79	1.22E-03
Regulación positiva de la organización de las fibras supramoleculares	+ 4.49	1.73E-05
Regulación positiva de la organización del citoesqueleto	+ 3.99	2.89E-06
Regulación de la endocitosis	+3.74	1.35E-03
Regulación negativa de la organización del citoesqueleto	+3.71	4.77E-04
Organización del anillo de septinas	+ 3.54	4.09E-04
Regulación de la polimerización de proteínas	+ 3.54	4.09E-04
Regulación negativa de la organización de las fibras supramoleculares	+ 3.53	1.15E-03
Regulación de la transcripción de genes implicados en la transición G1/S del ciclo celular	+ 3.53	1.15E-03
Regulación de la salida de la mitosis	+ 3.22	5.29E-04
Organización del filamento de actina	+ 3.19	1.72E-05
Regulación de la transcripción dependiente de la RNA polimerasa II en respuesta al estrés	+ 2.76	8.77E-04

3.2. El estudio de fosfoproteómica confirma la activación de Slt2 y Hog1 por el CLT e identifica nuevas fosforilaciones en componentes de la ruta CWI.

Dentro de los resultados que se obtuvieron en este ensayo de fosfoproteómica, decidimos buscar los fosfopéptidos que incluían a los motivos de activación conservados de Hog1 y de Slt2 y analizar su comportamiento a los diferentes tiempos de exposición al CLT, así como comparar estos resultados con la cinética de activación que se estudió previamente mediante *Western blotting* con los anticuerpos que detectan a las formas fosforiladas de estas dos MAPKs. Cabe mencionar que estos fosfopéptidos quedaron fuera del análisis llevado a cabo en el apartado anterior, pues se identificaron dos residuos como fosforilados (Thr174/Tyr176 en Hog1 y Thr190/Tyr192 en Slt2) en lugar de uno, y además el fosfopéptido correspondiente de Slt2 solamente se detectó en una de las réplicas del ensayo.

En la **Figura 45** se muestra el patrón de fosforilación obtenido por fosfoproteómica de estos residuos tras el tratamiento con el CLT en la cepa silvestre, a través de la medida de la abundancia de sus respectivos fosfopéptidos. Por un lado, Hog1 mostró su pico de intensidad de fosforilación a los 30 minutos, bajando hasta niveles basales tras un tiempo de exposición de 120 minutos. Slt2, en cambio, aumentó su nivel de fosforilación de forma progresiva con el tiempo, alcanzando su máximo a los 60 minutos y manteniendo esta intensidad a tiempos más largos. Estos comportamientos fueron similares a los identificados previamente por *Western blotting*, como se puede apreciar en las **Figuras 12 y 13**, lo que confirma los resultados del ensayo de fosfoproteómica.

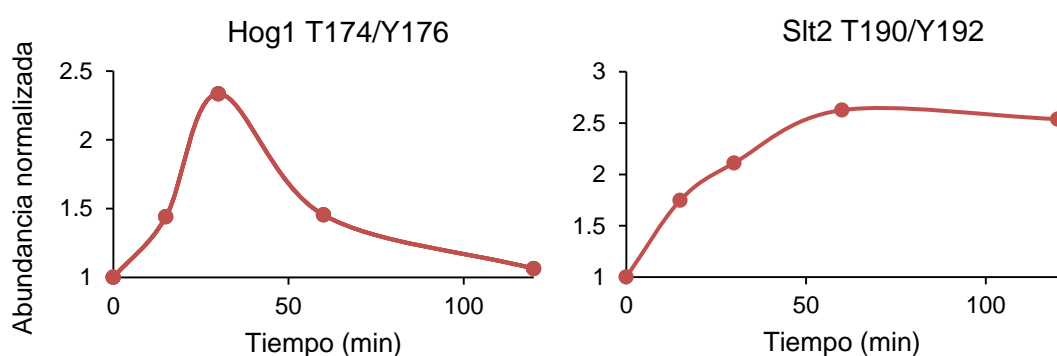


Figura 45. Representación de la cinética de fosforilación de Hog1 y Slt2 en sus motivos de activación tras el tratamiento con el CLT. Medida de la abundancia normalizada a los diferentes tiempos de exposición al CLT de los fosfopéptidos que contienen los residuos T174/Y176 y T190/Y192 de Hog1 y Slt2, respectivamente, en la cepa silvestre BY4741. Los valores de Hog1 corresponden a la media de dos experimentos independientes, y los de Slt2 a los de un solo experimento.

A continuación, buscamos entre los 1576 fosfopéptidos fosforilados (**Tabla I Anexo I**) fosforilaciones en proteínas relacionadas con la ruta CWI que pudieran resultar interesantes. De este modo, se encontraron fosforilaciones en las proteínas Bck1, Msg5, Rlm1, Rom2 y Spa2. Entre ellas, destacó especialmente la fosforilación identificada en el residuo Thr707 de la MAPKKK Bck1, la cual no ha sido descrita con anterioridad y se produce en un sitio típico de fosforilación de MAPKs (T seguida de P). La abundancia del fosfopéptido que incluía a este residuo aumentó con el tiempo de exposición al antifúngico en la cepa silvestre y también en el mutante *slt2Δ*, aunque de forma menos pronunciada, lo que sugiere que no es una fosforilación dependiente de la MAPK Slt2 (**Figura 46**).

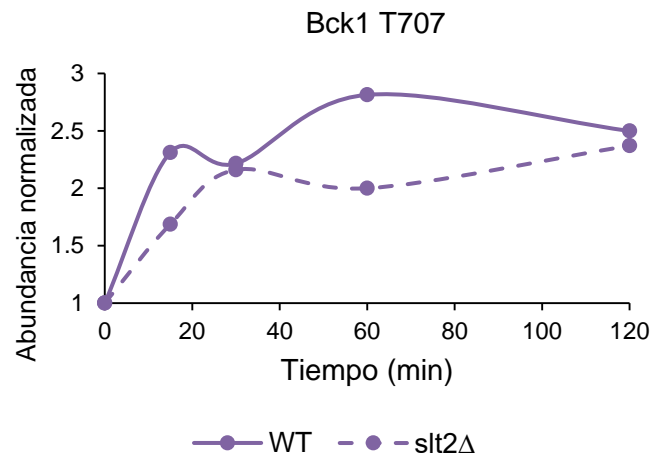


Figura 46. Representación de la cinética de fosforilación de Bck1 en su residuo Thr707 en las cepas WT y *slt2Δ*. Medida de la abundancia normalizada a los diferentes tiempos de exposición al CLT del fosfopéptido que contiene el residuo indicado. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes.

3.3. El tratamiento con CLT promueve la fosforilación de 258 proteínas de forma dependiente de Slt2.

Con el fin de investigar qué procesos se encuentran regulados por la ruta CWI en respuesta al CLT a través de la fosforilación dependiente de Slt2 y encontrar posibles sustratos de la MAPK, se analizaron los 360 fosfopéptidos que incrementaron su fosforilación tras el tratamiento con el antifúngico en la cepa silvestre pero no en el mutante *slt2Δ*, así como sus 258 proteínas correspondientes (**Tabla 6**).

Para ello, en primer lugar, se realizó de nuevo un estudio de enriquecimiento de estas proteínas mediante *GeneOntology*. En la **Tabla 8** se muestran los procesos biológicos más representados en este grupo de proteínas, ordenados de mayor a menor enriquecimiento, siempre que este fuera mayor de +2.5. El proceso que presentó un enriquecimiento más elevado fue la regulación de la actividad de la RNA helicasa, una enzima implicada en multitud de aspectos del metabolismo del RNA (Jankowsky, 2011). Seguidamente, los procesos biológicos más afectados fueron la “regulación negativa de la actividad proteín quinasa” y la “regulación de la cascada de MAPKs”, lo que sugiere que, en respuesta al CLT, Slt2 centra gran parte de su actividad en regular a proteínas implicadas en señalización celular. Otros procesos que se identificaron como enriquecidos fueron la regulación de la endocitosis, del crecimiento filamentoso, la transición G1/S del ciclo celular, la regulación del citoesqueleto, de la citoquinesis y la polaridad, y la remodelación de la cromatina, todos ellos importantes para el crecimiento y la morfogénesis de la levadura.

Aquellos procesos biológicos cuyo valor de enriquecimiento también fue elevado, pero son de carácter muy general, como, por ejemplo, la fosforilación de proteínas o la regulación del transporte, no se incluyeron en la tabla.


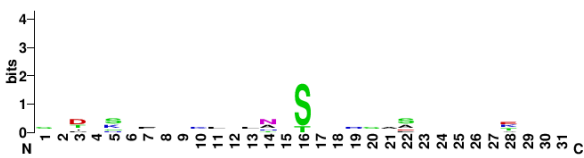

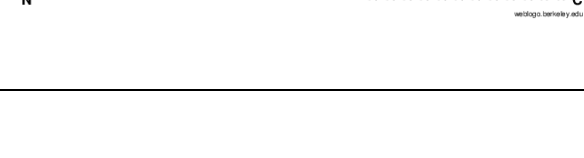
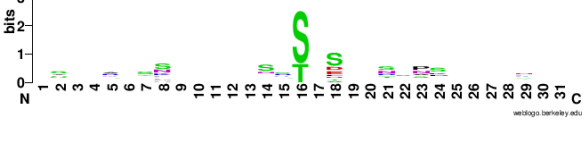

Tabla 8. Lista de procesos biológicos más enriquecidos en el grupo de proteínas fosforiladas solo en la cepa WT en respuesta al CLT. Se muestran los datos de enriquecimiento y el *p-value*.

PROCESO BIOLÓGICO	ENRIQUECIMIENTO	P-VALUE
Regulación de la actividad de la RNA helicasa	+ 22.92	1.83E-04
Regulación negativa de la actividad proteín quinasa	+ 10.69	2.05E-05
Regulación de la cascada de MAPKs	+ 8.33	2.20E-05
Regulación de la endocitosis	+ 7.64	3.68E-05
Regulación positiva del crecimiento filamentosos	+ 6.55	7.11E-04
Regulación de la citoquinesis	+ 5.35	7.22E-04
Transición G1/S del ciclo celular	+ 3.97	8.75E-04
Regulación de la organización del citoesqueleto	+ 3.35	2.96E-04
Establecimiento o mantenimiento de la polaridad celular	+ 3.21	1.54E-04
Remodelación de la cromatina	+ 3.11	1.32E-04

En segundo lugar, se identificaron las proteínas incluidas en cada uno de estos procesos biológicos, así como los residuos en los que se detectó la fosforilación, y se recogieron en la **Tabla 9**. Asimismo, se llevó a cabo un alineamiento con las secuencias de sus fosfopéptidos correspondientes mediante la herramienta *WebLogo*, obteniendo una secuencia consenso para cada grupo (**Tabla 9**). Al analizar estas secuencias, se pudo observar que las proteínas que se clasificaron dentro de los procesos de regulación de la cascada de MAPKs y de regulación positiva del crecimiento filamentosos se fosforilaron mayoritariamente en un sitio -S/T-P-, sugiriendo que podrían ser sustratos directos de Slt2. En otros grupos funcionales, sin embargo, la fosforilación en -S/T-P- fue minoritaria o inexistente, lo que indica que probablemente estas proteínas se fosforilaron de forma dependiente a Slt2, pero no a consecuencia de su fosforilación directa.

RESULTADOS

Tabla 9. Lista de proteínas fosforiladas en respuesta al CLT solo en la cepa WT, incluyendo los residuos en los que se fosforilan, el proceso biológico en el que participan y la secuencia consenso de sus fosfopéptidos.

PROCESO BIOLÓGICO	PROTEÍNAS Y RESIDUOS FOSFORILADOS	SECUENCIA CONSENSO
Regulación de la actividad de la RNA helicasa	Tif4632 (S503, S872) Yra1 (T58) Tif4631 (S163, S522) Tif3 (S194, S263)	
Regulación negativa de la actividad de la proteína quinasa	Sic1 (S152) Lsp1 (S41) Reg1 (S75) YPL014W (T100) Fpk1 (S339) Lre1 (S474) Pil1 (S41)	
Regulación de la cascada de MAPKs	Ptp3 (S58) Cla4 (S425) Ste20 (S228) Pbs2 (S248) Meh1 (T145) Msg5 (S151) Spa2 (S910, S937, S979) Snt1 (S1037)	
Regulación de la endocitosis	Hal5 (S160, S233, S275, T409) Rom2 (S144) Akl1 (S10, T575, S1099) Npr1 (S36, S51) Fpk1 (S339) Sat4 (T68) Aly2 (S900) Prk1 (T586, S642)	
Regulación positiva del crecimiento filamentoso	Snf2 (S358) Opy2 (S348) Gal83 (S279) Mig1 (S179, S231, T236) Sip1 (S331)	
Regulación de la citoquinesis	Rom2 (S144) Aim44 (S244) Net1 (S384) Vrp1 (T471) Skgl6 (S160, S215, S251, S357) Sli15 (S597) Bud14 (S376)	

<p>Transición G1/S del ciclo celular</p>	<p>Sic1 (S152) Srl3 (T14) Bck2 (S761) Yar1 (T15) Ace2 (S385) Ptk2 (S104, T160) Yox1 (S135, S252) Whi5 (T215) Sat4 (T68)</p>	
<p>Regulación de la organización del citoesqueleto</p>	<p>Ssk2 (S131) Kip2 (S88) Rom2 (S144) Aim44 (S244) Aim3 (T805, S813, S915) Vrp1 (T471) Bbc1 (T173, T213, S640) Spa2 (S910, S937, S979) Spc110 (T18) Bud14 (S376) Gic2 (S367) Prk1 (T586, S642) Mhp1 (S309, S85)</p>	
<p>Establecimiento o mantenimiento de la polaridad celular</p>	<p>Bud3 (S1515, S1594) Nis1 (T127) Mlf3 (S79) Rom2 (S144) Ste20 (S228) Axl2 (S658, T669) Bit61 (S144) Zds1 (S54) Vrp1 (T471) Spa2 (S910, S937, S979) Cdc10 (S311) Bud4 (S6) Bud14 (S376) Gic2 (S367) Avo1 (S308)</p>	
<p>Remodelación de la cromatina</p>	<p>Snf2 (S358) Cyc8 (S739) Rsc2 (S682) Htb2 (T40) Nhp6a (S26, T47) Rsc1 (S607) Msn4 (S537) Gis1 (S425) Msn2 (S308) Rph1 (S575, S590) Pho4 (S221) Htb1 (T40) Ies3 (S211) Rtt102 (T98) Hho1 (S130, S174)</p>	

RESULTADOS

	Swc5 (S68)	
--	------------	--

Esta tabla permite visualizar fácilmente las fosforilaciones más relevantes que se produjeron en respuesta al CLT de forma dependiente a la MAPK Slt2, así como los procesos biológicos en los que están implicadas las proteínas correspondientes y que podrían verse afectados por dichas fosforilaciones. Además, entre las proteínas que aparecieron en este análisis, se encontraron algunas cuya fosforilación dependiente de Slt2 ya fue descrita previamente en otros estudios: Rom2, Msg5, Sic1, Lsp1, Pil1, Spa2, Vrp1, Bbc1, Mig1 y Crz1 (González-Rubio *et al.*, 2022), lo que valida la utilidad de nuestro ensayo para la detección de fosforilaciones mediadas por la MAPK Slt2 y por tanto por la ruta CWI.

3.4. Slt2 regula la fosforilación en respuesta al CLT de proteínas relacionadas con las rutas HOG y CWI.

Finalmente, se estudió en mayor detalle la fosforilación dependiente de Slt2 de las proteínas relacionadas con las rutas de MAPKs. Entre ellas, se encontraron principalmente proteínas implicadas en las rutas HOG y CWI.

Respecto a la ruta HOG, se identificaron varias proteínas que actúan en la vía de SHO1 (Cla4, Ste20 y Opy2), la MAPKKK Ssk2 de la vía de SLN1 y la MAPKK Pbs2. La fosforilación de sus residuos correspondientes en la cepa silvestre mostró un patrón muy similar en las proteínas Pbs2, Ssk2 y Opy2, con niveles más elevados a tiempos más largos de exposición al CLT, mientras que Cla4 y Ste20 ya experimentaron un aumento significativo de la fosforilación a los 15 minutos de tratamiento (**Figura 47**). En estas gráficas, además, se puede comprobar que no se produjo un aumento de la fosforilación de las proteínas en el mutante *slt2Δ*.

En cuanto a la ruta CWI, se encontraron a las proteínas fosfatasa Ptp3 y Msg5, las cuales se encargan de regular negativamente a Slt2, al componente del polarisoma Spa2 y a la GEF Rom2. La cinética de fosforilación de sus residuos correspondientes se muestra en la **Figura 48**. Tanto Ptp3 como Spa2 mostraron un patrón de fosforilación similar con un aumento progresivo de la intensidad con respecto al tiempo de tratamiento, mientras que Msg5 y Rom2 llegaron a su máximo de fosforilación a tiempos cortos (20-30 minutos) para descender progresivamente después.

Estos resultados indican que *Slr2* ejerce una función reguladora de la propia ruta CWI y de la ruta HOG en presencia de CLT a distintos niveles y de forma dependiente del tiempo de tratamiento.

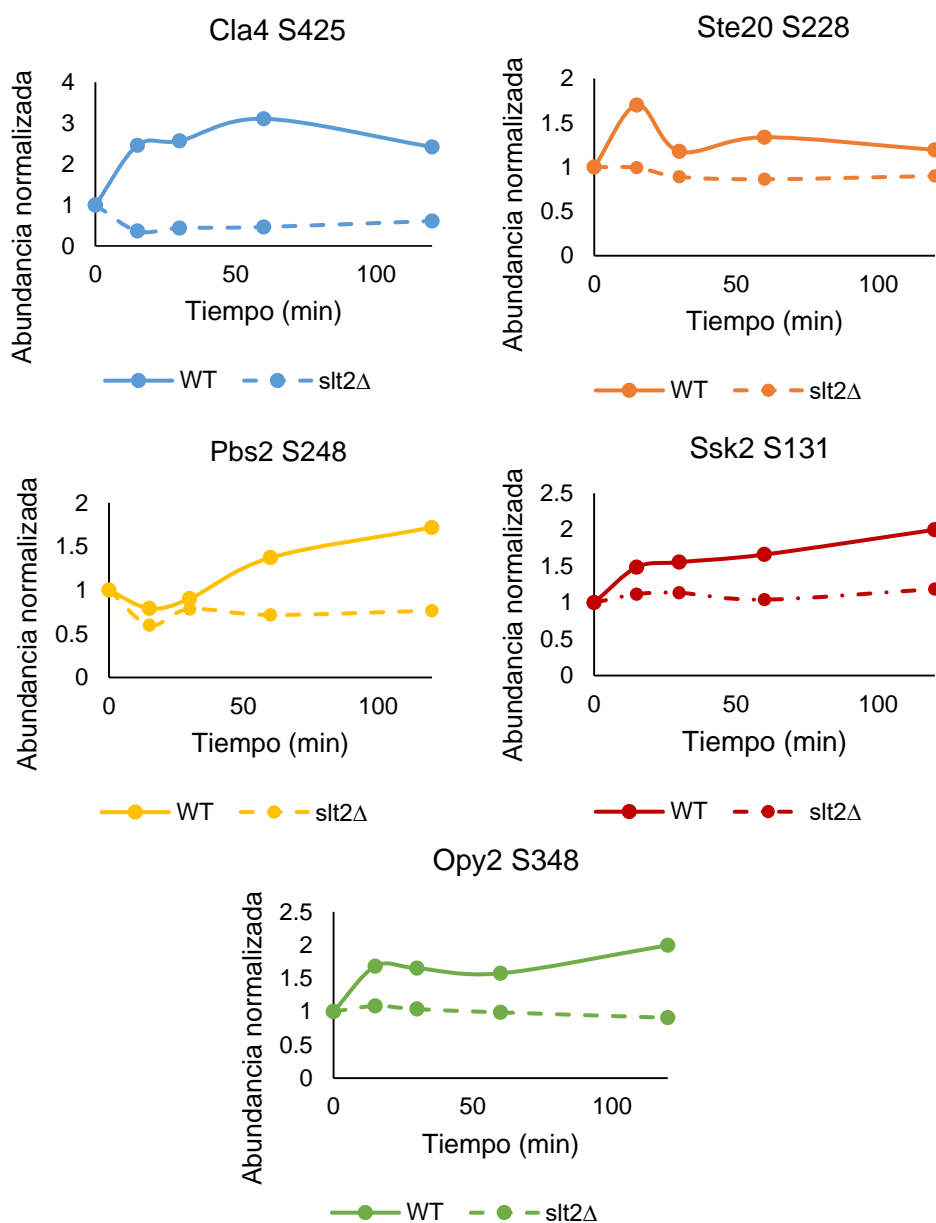


Figura 47. Representación de la cinética de fosforilación en respuesta al CLT de proteínas de la ruta HOG en sus residuos indicados. Medida de la abundancia normalizada a diferentes tiempos de exposición al CLT de los fosfopéptidos correspondientes, en la cepa WT y el mutante isogénico *slt2Δ*. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes.

RESULTADOS

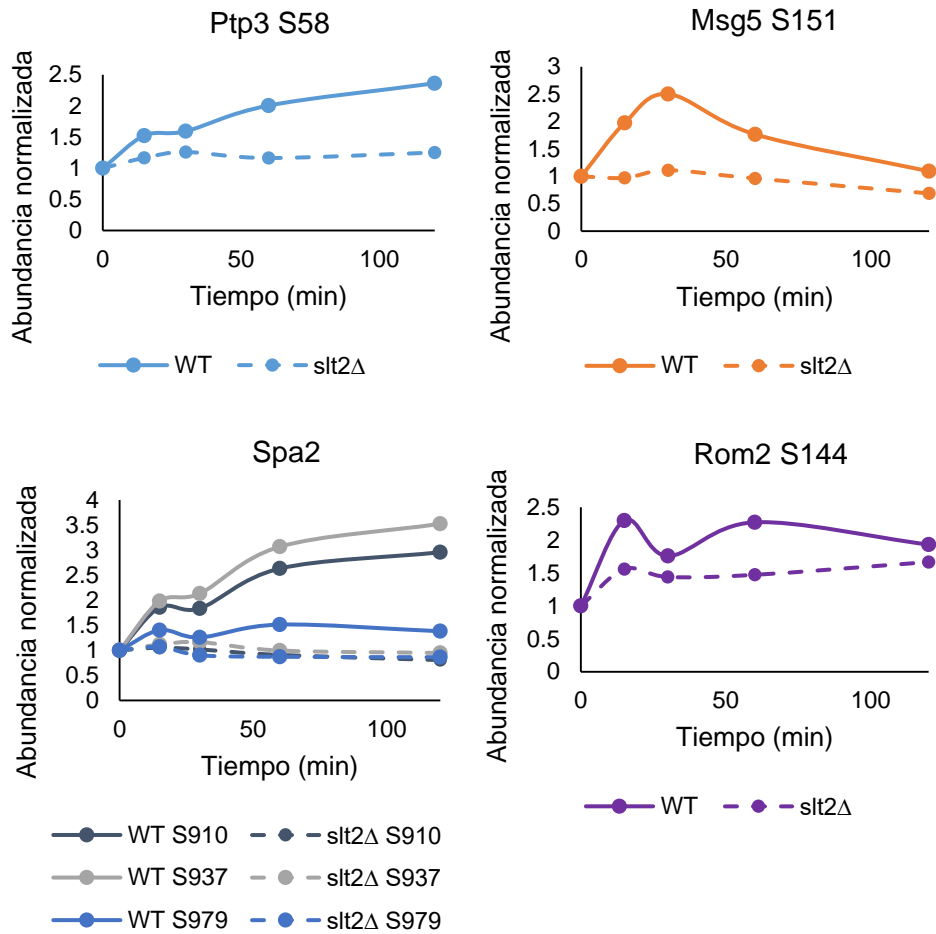
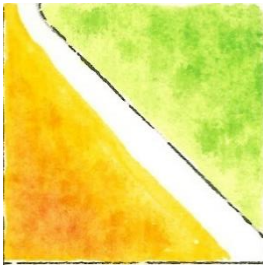


Figura 48. Representación de la cinética de fosforilación en respuesta al CLT de proteínas de la ruta CWI en los residuos indicados. Medida de la abundancia normalizada a diferentes tiempos de exposición al CLT de los fosfopéptidos correspondientes, en la cepa WT y el mutante isogénico *slt2Δ*. Los valores corresponden a la media de dos experimentos independientes.

Cabe indicar que las fosforilaciones identificadas en las proteínas Cla4, Pbs2, Opy2, Ptp3 y Spa2 se produjeron sobre residuos de serina seguidos de prolina, mientras que en el caso de Msg5, Ste20, Rom2 y Ssk2 sus residuos fosforilados no formaban parte de motivos -S/T-P-. Esto sugiere que, como se ha mencionado anteriormente, Slt2 podría regular tanto de forma directa como de forma indirecta la fosforilación de proteínas en respuesta al CLT.



DISCUSIÓN

Muchos de los componentes y mecanismos que operan en las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs fueron inicialmente descritos en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, un organismo eucariota que hoy en día sigue empleándose de manera extensa como modelo en el estudio de estas rutas, aportando información esencial para entender su funcionamiento (Chen and Thorner, 2007). Asimismo, la facilidad que presenta la levadura para su manipulación y experimentación y la gran cantidad de información de la que se dispone de ella a nivel genético y bioquímico, hace que también resulte útil su uso como organismo modelo para estudiar cómo afectan los antifúngicos azólicos a los hongos (Demuyser and Van Dijck, 2019). En concreto, la disponibilidad de colecciones de mutantes de todos los genes de *S. cerevisiae* ha permitido la identificación de aquellos implicados en la susceptibilidad o resistencia a los azoles, conocimiento que se ha visto ampliado con el uso de las diferentes técnicas 'ómicas' desarrolladas en los últimos años (Ribeiro *et al.*, 2022). En esta tesis, hemos utilizado la levadura para analizar cómo uno de estos azoles, el clotrimazol (CLT), es capaz de generar una respuesta específica a través de las rutas de MAPKs, estudio que además hemos complementado con un ensayo global de fosfoproteómica que ha permitido identificar proteínas y procesos biológicos relacionados con la respuesta celular al CLT.

1. EL CLT PROVOCA CAMBIOS EN LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LAS RUTAS DE MAPKS EN LA LEVADURA *S. cerevisiae* DEBIDO AL DAÑO EN MEMBRANA Y AL AUMENTO DEL ESTRÉS OXIDATIVO.

Los azoles son los antifúngicos más empleados en el mundo para el tratamiento de las infecciones fúngicas, tanto locales como sistémicas. Sin embargo, su efecto sobre las rutas de MAPKs de los hongos no se ha estudiado en profundidad. Sí que existen algunos trabajos en los que se ha relacionado al triazol fluconazol con las rutas de MAPKs en *C. albicans* y *S. cerevisiae* (Parsons *et al.*, 2004; Navarro-García *et al.*, 2005; Lafayette *et al.*, 2010; Román *et al.*, 2016) y en otros hongos patógenos como *C. neoformans* (Lee *et al.*, 2012), pero, en el caso de los imidazoles, no se había abordado con anterioridad cómo afectan a estas rutas.

En este trabajo, decidimos comenzar con un análisis y una comparación del efecto de los diferentes tipos de azoles sobre las rutas de MAPKs de la levadura *S. cerevisiae*, y para ello seleccionamos dos imidazoles y dos triazoles como representativos. La cepa de levadura ensayada (BY4741) presentó una mayor susceptibilidad al CLT que al resto de azoles con una inhibición completa del crecimiento a partir de una concentración de 6.25 µg/mL, mientras que, por el

DISCUSIÓN

contrario, presentó resistencia al fluconazol cuando se expuso a concentraciones inferiores a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Estos resultados son similares a los mostrados en otros trabajos en los que se investigó la susceptibilidad a azoles de *S. cerevisiae*: en un estudio en el que se calculó la concentración mínima inhibitoria (CMI) de varios azoles en la cepa BY4741, el CLT resultó ser el azol más inhibitorio con una CMI de 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Martins *et al.*, 2019), y en varios trabajos la levadura presentó resistencia al fluconazol con valores de CMI superiores a 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Lafayette *et al.*, 2010; Cabral *et al.*, 2013).

El tratamiento de la levadura con concentraciones inhibitorias equivalentes de estos compuestos mostró que los dos tipos de azoles afectan de forma diferente a las rutas de MAPKs. Así, el hecho de que los imidazoles, pero no los triazoles, provoquen efectos tan marcados sobre las rutas de MAPKs (activación de las rutas HOG y CWI y reducción de la fosforilación de las MAPKs de la ruta de apareamiento), especialmente apreciables en el caso del CLT, sugiere que esta familia de azoles provoca alteraciones en las células de la levadura más allá de la inhibición de la síntesis del ergosterol. Aunque generalmente se considera que los azoles ejercen un efecto fungistático, existen trabajos en los que se ha asociado un carácter fungicida a los imidazoles. En la década de los 80, se determinó que algunos imidazoles como el CLT y el miconazol producen dos tipos de efectos: a concentraciones bajas actúan como fungistáticos por la disminución de los niveles de ergosterol y a concentraciones elevadas actúan como fungicidas, a través del daño directo en la membrana plasmática (Sud and Feingold, 1981). Más recientemente, un estudio clasificó a estos mismos imidazoles como fungicidas, mientras que catalogó a varios triazoles (entre ellos al fluconazol y al itraconazol) como fungistáticos en unas condiciones de experimentación similares a las nuestras, considerando fungicida a aquel azol que produjera una reducción de las ufc/mL viables mayor de 10^3 a una concentración igual o doble a la CMI (Martins *et al.*, 2019). Por ello, es probable que el CLT produzca un efecto fungicida sobre las células de levadura cuando se emplea a concentraciones elevadas, lo que como consecuencia da lugar a los cambios sobre las rutas de MAPKs mencionados anteriormente. Cuando se emplea a concentraciones inferiores, sin embargo, su efecto sobre la ruta CWI es más similar al que producen los triazoles, lo que se correspondería con un carácter fungistático del fármaco.

Relacionado con este posible efecto fungicida de los imidazoles, existen numerosos estudios que asocian la exposición al miconazol con un aumento del estrés oxidativo en las células fúngicas (Kobayashi *et al.*, 2002; François *et al.*, 2006; Belenky *et al.*, 2013; De Cremer *et al.*, 2016). En nuestras condiciones de tratamiento con el CLT, hemos demostrado que se produce un aumento significativo del estrés oxidativo en las células de levadura que está implicado en la señalización a través de las rutas de MAPKs, tanto en el incremento de la fosforilación de Hog1 y Slt2 como en la

bajada en los niveles de fosfo-Kss1 y fosfo-Fus3. La activación de las rutas CWI y HOG por algunos agentes oxidantes (H_2O_2 , diamida o cadmio, entre otros) está bien caracterizada (Vilella *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2017; Zhao *et al.*, 2021); sin embargo, en ninguno de estos casos se detectó la aparición de una forma de menor movilidad electroforética de Slt2 que sí se produce tras el tratamiento con el CLT, debida a fosforilaciones adicionales a las que tienen lugar en el dominio de activación. Dado que el tratamiento con una concentración elevada del compuesto clorpromazina, el cual se conoce que altera de forma directa a las membranas de las células (De Filippi *et al.*, 2007) además de generar estrés oxidativo (Caldara *et al.*, 2017), da lugar a los mismos efectos sobre las rutas de MAPKs que los producidos por el CLT, se intuye que es una combinación del estrés oxidativo junto con un daño en membrana lo que origina estos cambios específicos en la fosforilación de las MAPKs.

La estimulación de la ruta HOG por estrés hiperosmótico da lugar a una activación rápida y transitoria de Hog1, llegando a su pico de fosforilación a los pocos minutos del inicio del estímulo y promoviendo su translocación al núcleo (De Nadal *et al.*, 2002; Westfall *et al.*, 2004). Cuando las células se exponen al CLT, en cambio, la fosforilación de Hog1 muestra una cinética de activación más lenta, observándose sobre todo a los 30 minutos. De forma similar, el tratamiento de la levadura con diferentes agentes oxidantes (Cd^{2+} , Zn^{2+} , tBOOH y H_2O_2) provoca un máximo de fosforilación de Hog1 a los 45-60 minutos (Bilsland *et al.*, 2004), y otros estímulos como el estrés sobre el retículo endoplásmico inducen una activación de Hog1 aún más tardía, apreciable a partir de las 2 horas de tratamiento (Bicknell *et al.*, 2010). En esta misma línea, hemos visto que, al igual de lo que ocurre en respuesta a H_2O_2 y al estrés de membrana causado por la hipoxia (Hickman *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2017), es únicamente la vía de SLN1 de la ruta HOG la que participa en la transmisión de la señal por el CLT. Estas observaciones sobre el mecanismo y la cinética de activación de la ruta HOG, por tanto, apoyarían la hipótesis de que es el estrés oxidativo junto al daño en membrana provocados por el CLT los fenómenos que están detrás de su efecto sobre las rutas de MAPKs.

Por otro lado, la ausencia de Hog1 afecta de forma sutil a los niveles de activación de Slt2 tras la exposición al CLT, lo que sugiere cierto entrecruzamiento de la ruta HOG hacia la CWI, aunque no sería tan importante como el que se produce en otros estímulos como la zimoliasa y el SDS (Bermejo *et al.*, 2008; Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020a). Además, Hog1 es responsable, a tiempos cortos, de la disminución de la fosforilación de Kss1 y Fus3 inducida por el CLT. La regulación negativa de estas MAPKs que participan en la ruta de apareamiento y en la de crecimiento pseudofilamentoso por parte de Hog1 ya fue descrita anteriormente en condiciones de activación de la ruta HOG (Hao *et al.*, 2008; Patterson *et al.*, 2021) y cuando se co-estimuló a las células con

DISCUSIÓN

estrés hiperosmótico y feromonas (Nagiec and Dohlman, 2012). Esta regulación negativa es un reflejo de cómo, en situaciones en las que se ve comprometida la supervivencia de la célula, las rutas de MAPKs se regulan entre ellas de forma que se favorece la activación de aquellas que generan respuestas de adaptación al estrés frente a las que potencian el apareamiento y el crecimiento celular. A tiempos largos, sin embargo, Hog1 solo ejerce esta regulación negativa de forma parcial, por lo que deben existir otros mecanismos adicionales que también participan en este fenómeno. Aunque existe un estudio en el que se demostró la inhibición de Fus3 a través de la fosforilación de Ste5 por parte de Pkc1 en presencia de estrés oxidativo sobre células previamente expuestas a feromonas (Lee *et al.*, 2020), nuestros datos no apoyan la participación de Pkc1 en la reducción de fosfo-Kss1 y fosfo-Fus3 por el CLT.

2. LA RUTA CWI ES CAPAZ DE ACTIVARSE POR EL CLT A TRAVÉS DE UN MECANISMO INDEPENDIENTE DE PKC1.

La MAPK Slt2 de la ruta CWI mostró un nivel de activación diferente según la concentración de CLT empleada, siendo la activación tras la exposición a concentraciones elevadas la que hemos investigado en mayor profundidad. En dichas condiciones, Slt2 sigue una cinética de fosforilación en la que la activación empieza a ser detectable a partir de los 30 minutos y aumenta a tiempos más largos de exposición, contrastando con lo que ocurre con Hog1. Otros estímulos activadores de esta ruta, como el rojo Congo (RC), la temperatura o el H₂O₂, también provocan cinéticas de activación similares sobre la MAPK (Pujol-Carrion and Torre-Ruiz, 2017; Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020a).

Uno de los descubrimientos más novedosos de este trabajo es el hecho de que la activación de la ruta CWI por parte del CLT no se produce únicamente a través del circuito de señalización clásico, siendo especialmente relevante que la proteína quinasa Pkc1, aunque participe de forma parcial, no resulte esencial para la transducción de la señal. Este fenómeno, además, parece ser específico del CLT, pues otros estímulos conocidos de la ruta son incapaces de producir la activación de Slt2 sin la presencia de Pkc1. Como el módulo de MAPKs sí es necesario para la transmisión de la señal generada por el CLT, sugerimos que existe una proteína quinasa alternativa que actúa por encima de Bck1, activándola de forma paralela a Pkc1 o solamente en ausencia de esta. En células de mamíferos, se ha descrito recientemente que la ruta ERK es capaz de activarse en ausencia de RAF en determinadas condiciones gracias a la acción de otras quinasas como la PI3K (Scheffler *et al.*, 2021), lo que confirma la plasticidad que presentan las rutas de MAPKs en su mecanismo de

activación. Curiosamente, a pesar de que Pkc1 no resulta esencial para esta activación, su presencia sí es vital para la supervivencia de las células frente al antifúngico, lo que podría estar relacionado con las otras funciones que regula esta proteína más allá de la ruta CWI (Heinisch and Rodicio, 2018).

Por otro lado, hemos demostrado que Wsc1, uno de los sensores característicos de la ruta, participa de forma parcial en la detección y transmisión de la señal inducida por el CLT. Está descrito que este sensor transmite la señal a los elementos que se encuentran por debajo en la ruta a través de la unión de su cola citoplasmática con la proteína GEF Rom2, la cual es la encargada de continuar con la propagación de la señal a través de la activación de Rho1 (Vay *et al.*, 2004). Aunque en el caso del CLT ninguna de las GEFs de Rho1 resulta esencial para la transmisión de la señal, podría existir una activación de la ruta mediada por el eje Wsc1-Rom2-Pkc1 que es complementada por otro mecanismo paralelo que actúa directamente sobre el módulo de MAPKs.

En un estudio reciente, se ha demostrado que los sensores Wsc1 y Mid2, aparte de unirse a Rom2, son capaces de interactuar con otras proteínas que también podrían estar implicadas en la transmisión de la señal a través de la ruta CWI (Santiago-Cartagena *et al.*, 2019). Así, resulta especialmente interesante la interacción entre Wsc1 y Ras2, la cual ya se había investigado con anterioridad (Verna *et al.*, 1997) y parece ser importante para la respuesta de la levadura al estrés oxidativo a través de la ruta CWI. Ras2 es una proteína G que, junto a Ras1, participa en la ruta de activación de la PKA a través de un incremento del cAMP intracelular (Tamaki, 2007). Por tanto, la implicación de la PKA en la activación de Slt2 por el CLT, y más concretamente en la generación de la forma LP-Slt2 que hemos detectado en este trabajo, estaría en consonancia con la hipótesis de una interacción Wsc1-Ras2. Esta regulación positiva de la ruta CWI por parte de la PKA, sin embargo, difiere de lo que se ha observado en otros estudios. De forma general, se ha descrito que la ruta Ras-PKA presenta una menor actividad en condiciones de estrés (Estruch, 2000). Más específicamente, en condiciones de estrés oxidativo por H₂O₂ y de ausencia de glucosa, se produce una inhibición de Ras2 mediada por el sensor de la ruta CWI Mtl1 (Petkova *et al.*, 2010), y en respuesta al antifúngico caspofungina se induce una inactivación de la PKA mediada por el sensor Wsc1 (García *et al.*, 2017). Por ello, es probable que en presencia del CLT la PKA sea menos activa, pero podría ocurrir que, a pesar de su menor actividad, fuera capaz de actuar de forma positiva sobre la fosforilación de Slt2 mediante un mecanismo aún desconocido. En esta relación entre la PKA y Slt2, además, solo participa la subunidad Tpk3, lo que sugiere que esta regulación se produce como consecuencia del estrés oxidativo generado por el CLT, pues la funcionalidad de esta

DISCUSIÓN

subunidad se ha relacionado en diferentes trabajos con la actividad mitocondrial, el aumento de ROS y la alteración de la actina (Chevtzoff *et al.*, 2005; Gourlay and Ayscough, 2006).

Por otra parte, hemos visto que el daño oxidativo que provoca el CLT sobre las células de levadura está asociado a una alteración de las mitocondrias. Existen estudios en los que se ha descrito un papel regulador de Slt2 en la mitofagia (Mao *et al.*, 2011) y otros en los que se ha localizado a Bck1, Mkk1 y Slt2 en la mitocondria cuando las células se exponen a estrés oxidativo (Fairn *et al.*, 2007). De este modo, podría ocurrir que la ruta CWI detectara el daño oxidativo producido por el CLT localizándose en la mitocondria y que además regulara procesos relacionados con ella.

En un estudio en el que se midió la respuesta transcripcional al tratamiento con antifúngicos fungicidas (entre ellos el miconazol), se observó una mayor expresión de genes relacionados con la síntesis de trehalosa: *TPS1*, *TPS2* y *TSL1* (Belenky *et al.*, 2013). En nuestro trabajo, hemos visto que Tps1, la enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis de trehalosa, es necesaria para que se produzca la activación completa de Slt2 por parte del CLT. Este disacárido, aparte de funcionar como reserva energética, ejerce una función protectora frente a diferentes tipos de estreses (Elbein *et al.*, 2003); sin embargo, no parece ser la acumulación de trehalosa en sí lo que está mediando la activación de la ruta CWI por el CLT, pues no se observó el mismo efecto con el resto de proteínas que participan en su biosíntesis (Tps2, Tps3 y Tsl1). Se ha visto que el precursor sintetizado por Tps1, la trehalosa-6-P, regula a la glicolisis mediante la inhibición de la enzima hexoquinasa (Blázquez *et al.*, 1993), por lo que dicha regulación podría estar detrás de la relación entre Tps1 y la activación de Slt2. Asimismo, la propia proteína Tps1 también podría estar ejerciendo alguna función desconocida en presencia del antifúngico. Como esta ruta de biosíntesis de la trehalosa no está presente en mamíferos, es una buena diana para desarrollar nuevas terapias antifúngicas, lo que hace que esta relación entre Tps1 y la respuesta al CLT a través de la activación de la ruta CWI resulte interesante para profundizar en ella en un futuro.

En cuanto a la respuesta transcripcional que se genera tras la activación de Slt2, hemos observado que los principales factores de transcripción de la ruta (Rlm1 y SBF) son activados por la MAPK en respuesta al CLT y, al menos Swi4 y Swi6, son importantes para la supervivencia de las células en presencia de este compuesto. No obstante, cuando se midió la funcionalidad de Rlm1 mediante la cuantificación de la expresión de sus genes dependientes, esta fue mucho menor que la mostrada en respuesta a un estrés típico sobre la pared celular como el provocado por RC. Este resultado sugiere que, en respuesta a CLT, la expresión de genes relacionados con la biogénesis y remodelación de la pared no es tan importante como en el caso de los estímulos más clásicos de la

ruta, en los que se requiere un mecanismo reparador de esta estructura que asegure su integridad (Sanz *et al.*, 2018a). Asimismo, la presencia de un mayor número de modificaciones postraduccionales en Rlm1 tras el tratamiento con el CLT podría significar que alguna de ellas está regulando de forma negativa la actividad de este factor de transcripción.

En resumen, la activación de la ruta CWI por el CLT se produce a través de un mecanismo específico y novedoso que incluye la participación de la vía canónica de activación, pero también la de componentes de otras rutas y de proteínas aún no identificadas. En la **Figura 49** se muestran las proteínas para las que se ha visto una implicación parcial o total en la respuesta al CLT a través de la ruta CWI, además de aquellas que participan en los efectos que produce el CLT sobre las rutas HOG y de apareamiento. De este modo, la figura constituye una representación esquemática del conocimiento que hemos adquirido sobre como el CLT afecta a las células de levadura y más concretamente a sus rutas de MAPKs.

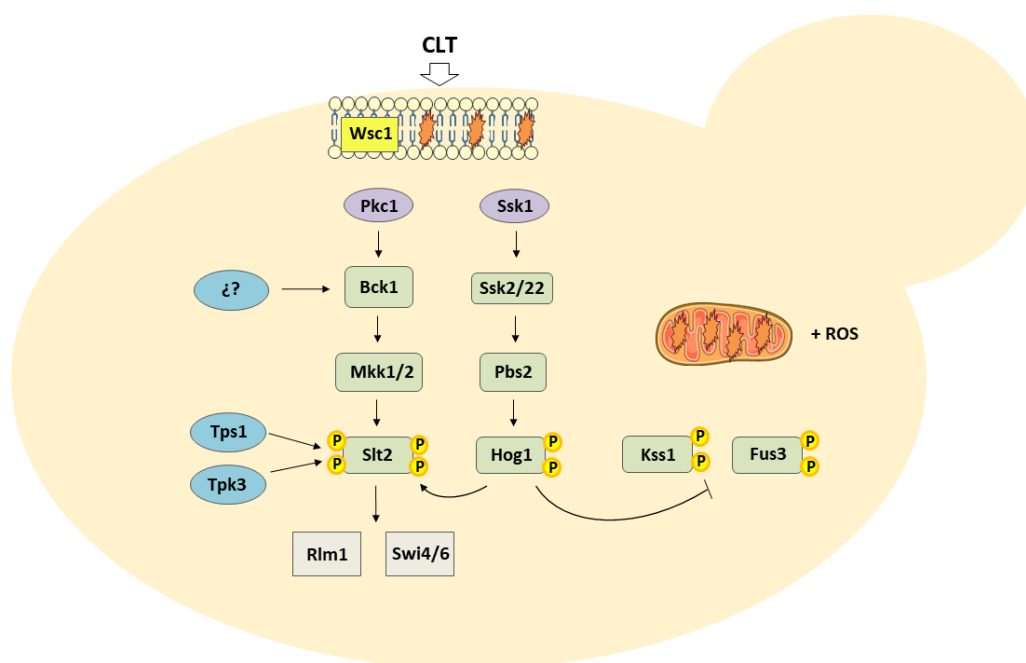


Figura 49. Representación esquemática de los efectos que produce el tratamiento con el CLT sobre la levadura y sus rutas de MAPKs.

3. EL CLT PROVOCA LA FOSFORILACIÓN DE SLT2 EN RESIDUOS ADICIONALES A LOS DE SU MOTIVO DE ACTIVACIÓN.

La exposición al CLT, además de inducir una potente activación de la ruta CWI, provoca la aparición muy evidente de una forma de menor movilidad electroforética de Slt2 que no se había observado con otros estímulos de la ruta. La generación de esta forma LP-Slt2 se relacionó con las modificaciones postraduccionales (PTMs) que puede sufrir una proteína, pues estas son capaces de

DISCUSIÓN

provocar un aumento de la masa molecular y/o un cambio en la conformación, dando lugar a un retraso de la movilidad proteica en la electroforesis (Shirai *et al.*, 2008). Existen más de 400 tipos de PTMs diferentes que afectan a la funcionalidad de las proteínas, siendo la fosforilación la más frecuente, seguida de otras como la acetilación, la ubiquitinación o la succinilación (Ramazi and Zahiri, 2021). Concretamente en las rutas de señalización mediadas por proteínas quinasas, la fosforilación juega un papel fundamental (Ardito *et al.*, 2017). Así, se investigó si la fosforilación era la modificación que se encontraba detrás de este cambio de movilidad en Slt2 y se confirmó mediante la realización de dos técnicas bioquímicas diferentes como son el ensayo de desfosforilación con fosfatasa alcalina y el Zn²⁺-Phos-tag SDS-PAGE. El CLT, por tanto, provoca que Slt2 se fosforile en uno o varios residuos además de los que conforman su motivo de activación TEY.

Existen trabajos en los que se ha descrito la existencia de este tipo de fosforilaciones adicionales en las MAPKs de mamíferos y, lo que es más interesante, se ha visto que son capaces de regular diferentes aspectos de las proteínas: (i) en ERK1 los residuos Thr207 y Tyr210 se fosforilan por autofosforilación y por MEK1, respectivamente, regulando negativamente la actividad catalítica de la quinasa (Lai and Pelech, 2016), (ii) en ERK2 el residuo Thr188 (equivalente a la Thr207 de ERK1) se autofosforila provocando una mayor interacción de la proteína con sustratos nucleares relacionados con la hipertrofia cardíaca (Lorenz *et al.*, 2009), y (iii) en ERK5 se han descrito fosforilaciones en un número considerable de residuos localizados en su zona C-terminal que regulan diversas funciones como la actividad catalítica, la translocación al núcleo o la unión a sustratos (Morimoto *et al.*, 2007; Díaz-Rodríguez and Pandiella, 2010; Iñesta-Vaquera *et al.*, 2010; Honda *et al.*, 2015; Pearson *et al.*, 2020). Asimismo, en la propia Slt2 de *S. cerevisiae* se ha reportado un caso de fosforilación adicional que altera la funcionalidad de la MAPK: en respuesta a la cafeína, los residuos Ser423 y Ser428 son fosforilados por las quinasas de control de ciclo Rad53 y Mec1/Tel1, respectivamente. La fosforilación en la Ser423 provoca la inhibición de la unión entre Slt2 y Swi4, mientras que la fosforilación en la Ser428 no se ha asociado a ninguna función todavía (Truman *et al.*, 2009).

Hemos demostrado que, para que las fosforilaciones adicionales causadas por el CLT tengan lugar, es importante la previa activación de Slt2 y su actividad catalítica, lo que indica que podrían tener su origen en un fenómeno de autofosforilación o en la acción de otra proteína quinasa que a su vez necesita activarse previamente por Slt2. Asimismo, es en la cola C-terminal de esta MAPK, una estructura única de Slt2 que regula algunas funciones importantes como la actividad transcripcional y la autofosforilación (González-Rubio *et al.*, 2021a), dónde parece ser que se producen estas fosforilaciones adicionales. Concretamente, hemos identificado a los residuos

Thr453 y Thr456 como potenciales receptores de esta fosforilación, siendo la participación del primero de ellos más importante. No obstante, como en las versiones de Slt2 mutadas en estos residuos continúan apareciendo bandas de menor movilidad electroforética tras el tratamiento con el CLT, consideramos que existen otros residuos que también se fosforilan y que todavía no hemos identificado. En un estudio fosfoproteómico global previo, en el que se detectaron fosfotios de todo el proteoma de la levadura, se identificó la fosforilación de estos dos residuos (Thr453 y Thr456) (Breitkreutz *et al.*, 2010), lo que reforzaría la hipótesis de que estos aminoácidos se fosforilan en respuesta al CLT. Por otro lado, cabe remarcar que estos residuos no forman parte de sitios -S/T-P-, lo que hace menos probable que se produzcan por autofosforilación o por la acción de otra MAPK.

Adicionalmente, sería importante explorar la posible alteración de las funciones llevadas a cabo por Slt2 por parte de las fosforilaciones en la Thr453 y la Thr456, pues esto permitiría obtener una visión completa de cómo responde la ruta CWI al tratamiento con el CLT. Se ha descrito que la región C-terminal de Slt2 dónde se encuentran estos residuos realiza una regulación negativa de la autofosforilación, evitando que se produzca una hiperactivación de la MAPK (Levin-Salomon *et al.*, 2009; González-Rubio *et al.*, 2021b), por lo que las fosforilaciones en estos dos residuos podrían estar implicadas en la regulación de este proceso. Por otro lado, también debe barajarse la posibilidad de que estas fosforilaciones regulen otras funciones, como, por ejemplo, las anteriormente mencionadas en el caso de las ERKs.

4. IDENTIFICACIÓN DE CAMBIOS EN EL FOSFOPROTEOMA Y DE POSIBLES SUSTRATOS DE SLT2 EN RESPUESTA AL CLT MEDIANTE UN ENSAYO DE FOSFOPROTEÓMICA.

Alternativamente al ensayo fosfoproteómico realizado con Slt2, en el que se examinó una única proteína purificada, decidimos llevar a cabo un estudio global con el que poder analizar todo el fosfoproteoma de la levadura. Este tipo de ensayos globales de fosfoproteómica realizados a partir de lisados celulares completos, empezaron a llevarse a cabo en *S. cerevisiae* a principios de los años 2000 (Ficarro *et al.*, 2002), y suponen una herramienta muy útil para identificar y caracterizar la fosforilación de proteínas a gran escala (Roux and Thibault, 2013). Esta metodología permite extraer una gran cantidad de datos que, en caso de querer profundizar en ellos, requieren una validación mediante la realización de técnicas bioquímicas clásicas, especialmente si se desea conocer la significación funcional de las fosforilaciones identificadas. De este modo, utilizamos un ensayo de este tipo como primera aproximación para obtener una visión amplia y dinámica de

DISCUSIÓN

cómo afecta el tratamiento con el CLT a la fosforilación de las proteínas, cuantificando los fosfopéptidos detectados a los diferentes tiempos de exposición al antifúngico.

Con los datos obtenidos, decidimos llevar a cabo una selección de péptidos y un procesamiento siguiendo unos criterios similares a los aplicados en trabajos previos que habían seguido la misma metodología (Touati *et al.*, 2019; Pirincci Ercan *et al.*, 2021), pero adaptados a nuestras condiciones. De esta forma, se detectaron tanto eventos de fosforilación como de desfosforilación dependientes del CLT y, aunque ambos son fenómenos clave en la regulación de multitud de procesos (Vitrac *et al.*, 2019), en este trabajo decidimos centrarnos en el primero de ellos.

La detección de péptidos que se fosforilaron tras una corta exposición al CLT para luego volver a desfosforilarse, de otros que se fosforilaron solamente tras tiempos largos y de otros que se mantuvieron fosforilados a todos los tiempos de tratamiento ensayados, demuestra que este estímulo afecta de forma diferente a las distintas proteínas de la levadura, y que la respuesta celular depende del tiempo de exposición. En el anexo de esta tesis se incluyen los datos detallados de los fosfopéptidos que se identificaron como fosforilados de forma dependiente al CLT, de manera que se puede consultar qué proteínas se fosforilaron en respuesta al CLT y con cuanta intensidad. Entre ellas, una proteína cuya fosforilación nos resultó especialmente interesante fue la mostrada por Bck1 en su residuo Thr707, el cual forma parte de un sitio de fosforilación típico de MAPKs. Como hemos visto que Bck1 podría ser activada por una proteína quinasa alternativa a Pkc1 en respuesta al CLT, sería interesante investigar si este residuo está implicado en dicha activación. Además, en la bibliografía solo existe un trabajo en el que se haya demostrado la fosforilación *in vitro* por parte de Pkc1 de los residuos Ser939, Thr1119 y Ser1134 de Bck1 (Levin *et al.*, 1994), pero no hay estudios *in vivo* en los que se haya investigado su activación, por lo que todavía hay mucho desconocimiento de cómo se regula esta proteína.

Los procesos biológicos en los que más participan estas proteínas fosforiladas están relacionados en su mayoría de alguna forma con la actina, lo que confirma el gran impacto que el estrés oxidativo y de membrana generado por el CLT provocan sobre la homeostasis de la célula en general y sobre la integridad de la actina en particular, como ya se demostró con la alteración de la actina observada al microscopio en células tratadas con el fármaco.

Por otro lado, el ensayo de fosfoproteómica se llevó a cabo de forma paralela con una cepa silvestre y con el mutante de delección *slt2Δ*, con el fin de detectar aquellas fosforilaciones provocadas por el CLT que dependen de la MAPK. La utilidad de este tipo de estrategias se ha visto en otros trabajos recientes: en *Schizosaccharomyces pombe* se identificaron nuevos sustratos de la

quinasa Dsk1 gracias a un estudio fosfoproteómico en el que se comparó el nivel de fosforilación de los péptidos en una cepa WT y en un mutante *dsk1Δ* (Wu *et al.*, 2020) y el análisis fosfoproteómico sobre mutantes carentes de Slt2, Npr1, Rim15 y Yak1 de *S. cerevisiae* permitió conocer qué proteínas regulan dichas quinasas en condiciones de inhibición de TORC1 (Dokládal *et al.*, 2021).

De esta forma, conseguimos detectar unas 258 proteínas que se fosforilaron de forma dependiente a Slt2 en respuesta al CLT y que por tanto podrían ser potenciales sustratos de la MAPK. Analizando los sitios de fosforilación identificados en estas proteínas, se observó que muchos de ellos no correspondían a sitios de fosforilación consenso de MAPKs (S/T seguidos de P), lo que podría tener dos explicaciones diferentes: (i) que en estas proteínas Slt2 es capaz de fosforilar residuos diferentes a los que constituyen su motivo de fosforilación canónico o (ii) que estas fosforilaciones son mediadas por otras proteínas quinasas, pero de forma dependiente a la presencia de Slt2. Aunque por norma general se ha descrito que las MAPKs solamente fosforilan a sus sustratos en sitios -S/T-P- (Sheridan *et al.*, 2008), se ha demostrado que Slt2 fosforila a Bcy1 en una treonina no seguida de prolina (Soulard *et al.*, 2010) y a Rpb1 en una tirosina (Yurko *et al.*, 2017), por lo que no podemos descartar que aquellas proteínas cuya fosforilación en sitios no típicos de MAPKs se ha detectado en este análisis sean sustratos directos de Slt2.

En este caso, las proteínas detectadas, además de relacionarse con la regulación del citosequeleto, están implicadas en su mayoría en funciones más variadas. Así, el proceso biológico más enriquecido en el análisis por *GeneOntology* fue la regulación de la actividad RNA helicasa, lo que podría indicar que, en respuesta al CLT, la ruta CWI participa en la regulación de la expresión génica (Bourgeois *et al.*, 2016). Una de las proteínas incluida en este grupo GO (Tif4632), además, ya había sido identificada como fosforilada de forma dependiente a Mkk1/2 en condiciones de activación de la ruta CWI en un estudio fosfoproteómico previo (MacGilvray *et al.*, 2020).

Los siguientes procesos GO que presentaron un mayor enriquecimiento fueron la regulación negativa de la actividad proteín quinasa y la regulación de la cascada de MAPKs. Profundizando en el primero de ellos, se detectó la presencia de 3 proteínas cuya fosforilación dependiente de Slt2 ya se había descrito previamente. Sic1 es un inhibidor de la quinasa de ciclo Cdk1 que es fosforilada de forma directa por Slt2 en su residuo Thr173 facilitando su estabilización (Moreno-Torres *et al.*, 2015), mientras que Lsp1 y Pil1 son dos proteínas que promueven la formación del eisosoma y cuya fosforilación en el residuo Thr233 se detectó en un ensayo de fosfoproteómica en condiciones de hiperactivación de Pkc1 (Mascaraque *et al.*, 2013), aunque su fosforilación directa por parte de Slt2 no se pudo demostrar posteriormente con un ensayo quinasa (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016).

DISCUSIÓN

Curiosamente, las fosforilaciones que se detectaron en nuestro estudio fueron en residuos diferentes (Ser152 en Sic1 y Ser41 en Lsp1 y Pil1), que además no forman parte de motivos -S/T-P-, lo que indica que la regulación que ejerce Slt2 sobre estas proteínas es diferente en el caso de la estimulación con el CLT.

En cuanto a las proteínas incluidas en el proceso biológico de regulación de la cascada de MAPKs, se encontraron algunas fosforilaciones interesantes en ellas. Está descrito que Msg5, la fosfatasa de especificidad dual que es capaz de desfosforilar tanto a Slt2 como a Fus3, es fosforilada de manera directa por Slt2, aunque no se conocen los residuos implicados (Flández *et al.*, 2004). En nuestro análisis, sí se reconoció al residuo Ser151 como fosforilado de forma dependiente al Slt2, y también se encontró una mayor desfosforilación del residuo Ser115 en el mutante *slt2Δ* respecto a la cepa WT (datos no mostrados), lo que postula a estos dos aminoácidos como posibles receptores de la fosforilación de Msg5 por parte de Slt2. Ptp3, otra proteína fosfatasa que actúa sobre la ruta CWI de forma similar a Msg5, también se identificó como fosforilada en este grupo, y Spa2, una proteína del polarisoma que interacciona con Mkk1 y Slt2 actuando como andamiaje (Van Drogen *et al.*, 2002) y cuya fosforilación dependiente de Mkk1/2 ya se detectó en un estudio fosfoproteómico previo (MacGilvray *et al.*, 2020), se fosforiló en nuestro análisis en 3 residuos diferentes (Ser910, Ser937 y Ser979). En este grupo, además, también se encontraron proteínas que intervienen en la ruta HOG: Cla4, Ste20 y Pbs2. Otras proteínas relacionadas con MAPKs, sin embargo, se clasificaron dentro de otros procesos GO, siendo el caso de Rom2, Opy2 y Ssk2. Rom2, cuya fosforilación dependiente de Slt2 ya había sido descrita con anterioridad en condiciones de estrés térmico (Guo *et al.*, 2009), se detectó como fosforilada en su residuo S144. El hecho de que la cinética de fosforilación de estas proteínas implicadas en rutas de MAPKs varíe entre ellas apunta a la existencia de mecanismos involucrados en la modulación temporal de la señalización por parte de Slt2, que operarían en momentos diferentes según el sustrato. En términos generales, lo que estos resultados sugieren es que, en respuesta al CLT, la ruta CWI es capaz de autoregularse a través de la funcionalidad de Slt2 y que la ruta HOG también es regulada por esta MAPK.

Por último, cabe mencionar la identificación de la fosforilación de otras proteínas de interés que se incluyeron en procesos GO menos enriquecidos. Es el caso de Msn2 y Msn4, dos factores de transcripción relevantes en la respuesta al estrés y que además pueden ser regulados por Hog1 (Estruch, 2000), de Whi5 y Srl3, dos importantes represores de la transcripción dependiente de ciclo que interaccionan con el factor SBF (Gomar-Alba *et al.*, 2017), y de las proteínas Vrp1, Bbc1, Mig1 y Crz1, implicadas en otras funciones importantes y cuya fosforilación asociada a Slt2 ya fue descrita en estudios fosfoproteómicos previos (MacGilvray *et al.*, 2020; Dokládal *et al.*, 2021). En la **Figura**

50 se muestran de manera esquemática todas las proteínas mencionadas anteriormente cuya fosforilación dependiente de Slt2 se ha detectado en respuesta al CLT, clasificadas según las funciones más relevantes en las que participan.

En conclusión, se puede afirmar que los ensayos de fosfoproteómica constituyen una buena primera estrategia para detectar a gran escala qué proteínas se ven afectadas por unas condiciones determinadas y para encontrar proteínas fosforiladas por la acción de una proteína quinasa. A pesar de esto, se deben tener en cuenta sus limitaciones. Así, hay fosforilaciones relevantes que no se detectan en estos ensayos porque sus fosfopéptidos correspondientes no son lo suficientemente abundantes en la célula. Por ejemplo, Swi6, cuya fosforilación dependiente de Slt2 en respuesta al CLT demostramos previamente mediante *Western Blotting*, no apareció como fosforilada en nuestro ensayo de fosfoproteómica, y tampoco se identificaron residuos adicionales de Slt2 que se fosforilaran en respuesta al CLT. Por último, la utilización de ensayos quinasa específicos desarrollados por nuestro grupo de investigación (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016) permitirán confirmar cuales de los posibles sustratos identificados en este estudio son objeto de fosforilación directa por Slt2, y así ampliar el conocimiento de la actividad de la ruta CWI en las células de levadura.

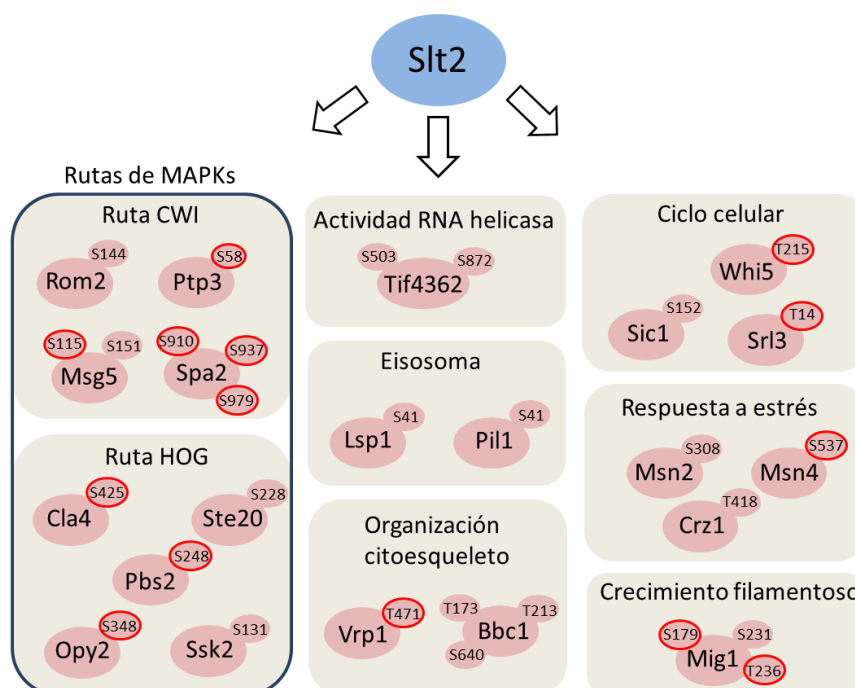
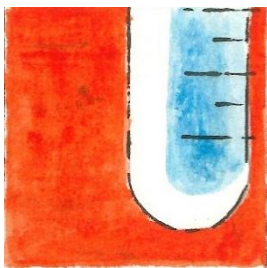
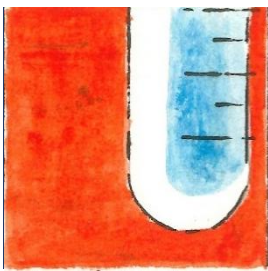


Figura 50. Esquema de algunas de las proteínas detectadas como fosforiladas en respuesta al CLT y de forma dependiente a Slt2. Aquellos sitios de fosforilación que forman parte de dominios -S/T-P-, y por tanto son más susceptibles de ser fosforilados directamente por Slt2, están marcados en rojo.



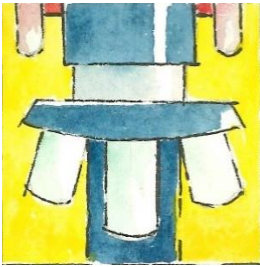
CONCLUSIONES

1. La exposición de la levadura a los antifúngicos imidazólicos, en especial al clotrimazol (CLT), provoca cambios en la señalización de las rutas de MAPKs: activa a las rutas HOG y CWI, con la aparición de una forma de menor movilidad electroforética de Slt2 que hemos denominado LP-Slt2, y reduce la fosforilación de las MAPKs Fus3 y Kss1 de la ruta de apareamiento.
2. La activación de la ruta CWI por el CLT es dependiente de la concentración y tiempo de exposición al antifúngico, y se lleva a cabo parcialmente a través de Wsc1 y Pkc1 y paralelamente mediante otro mecanismo independiente de Pkc1 todavía por identificar.
3. Los factores de transcripción clásicos de la ruta CWI (Rlm1 y SBF) se fosforilan tras el tratamiento con el CLT, aunque no se induce una respuesta transcripcional fuerte a través de Rlm1.
4. El CLT provoca estrés oxidativo en las células de levadura, el cual está implicado en los cambios en la señalización a través de las rutas de MAPKs que produce el antifúngico.
5. Las proteínas Tpk3 y Tps1, que forman parte de las rutas de la PKA y de biosíntesis de la trehalosa, respectivamente, están relacionadas con la activación de Slt2 y la generación de la forma LP-Slt2.
6. La forma LP-Slt2 se origina por la presencia de fosforilaciones adicionales a las del motivo de activación TEY en Slt2, y su aparición es dependiente de la activación previa de la MAPK y de su actividad catalítica.
7. Los residuos fosforilables Thr453 y Thr456, localizados en la zona C-terminal de Slt2, están implicados en la generación de LP-Slt2.
8. Gracias a la realización de un ensayo de fosfoproteómica global, se han detectado 661 proteínas que se fosforilan en respuesta al CLT, de las cuales 258 deben su fosforilación a la presencia de Slt2, entre las que destacan proteínas que participan en la propia ruta CWI y en la ruta HOG.
9. El ensayo de fosfoproteómica también ha permitido detectar la desfosforilación de 795 proteínas tras el tratamiento con el CLT.
10. La función de las proteínas fosforiladas de forma dependiente de Slt2 sugiere una regulación de diferentes e importantes procesos celulares en respuesta al CLT a través de esta MAPK.



CONCLUSIONS

1. Treatment of yeast cells with imidazole antifungals, especially with clotrimazole (CLT), leads to changes in MAPK pathways signalling: it activates the HOG and CWI pathways, with the appearance of a lower electrophoretic mobility form of Slt2 that we named LP-Slt2, and reduces the phosphorylation levels of the mating pathway MAPKs Fus3 and Kss1.
2. Activation of the CWI pathway depends on CLT concentration and time of exposure, and it is carried out partially through Wsc1 and Pkc1 and in parallel by an alternative mechanism independent of Pkc1 yet to be identified.
3. The transcription factors Rlm1 and SBF are phosphorylated after CLT treatment, but no strong transcriptional response is induced through Rlm1.
4. CLT induces oxidative stress within yeast cells, which is involved in the signalling changes through MAPK pathways caused by the antifungal.
5. Tpk3 and Tps1 proteins, which are part of the PKA and trehalose biosynthesis pathways, respectively, are involved in the activation of Slt2 and the generation of the LP-Slt2 form.
6. The LP-Slt2 form arises from the presence of additional phosphorylations to those of the TEY activation motif in Slt2. Moreover, its appearance is dependent on prior MAPK activation and its catalytic activity.
7. Phosphorylatable residues Thr453 and Thr456, located at the C-terminal region of Slt2, are involved in the generation of LP-Slt2.
8. By performing a global phosphoproteomics assay, 661 proteins were detected as phosphorylated in response to CLT, of which 258 were phosphorylated in an Slt2-dependent manner, including proteins involved in the CWI and HOG pathways.
9. The phosphoproteomics assay also detected the dephosphorylation of 795 proteins after CLT treatment.
10. Proteins that are phosphorylated in an Slt2-dependent manner are involved in different functions, suggesting the regulation of several important cellular processes through this MAPK in response to CLT.



BIBLIOGRAFÍA

- Ahmadpour, D., Maciaszczyk-Dziubinska, E., Babazadeh, R., Dahal, S., Migocka, M., Andersson, M., *et al.* (2016) The mitogen-activated protein kinase Slt2 modulates arsenite transport through the aquaglyceroporin Fps1. *FEBS Lett* **590**: 3649–3659.
- Ai, W., Bertram, P.G., Tsang, C.K., Chan, T.F., and Zheng, X.F.S. (2002) Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol Cell* **10**: 1295–1305.
- Aktas, H., Flückiger, R., Acosta, J.A., Savage, J.M., Palakurthi, S.S., and Halperin, J.A. (1998) Depletion of intracellular Ca²⁺ stores, phosphorylation of eIF2alpha, and sustained inhibition of translation initiation mediate the anticancer effects of clotrimazole. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 8280–8285.
- Alic, N., Higgins, V.J., Pichova, A., Breitenbach, M., and Dawes, I.W. (2003) Lipid Hydroperoxides Activate the Mitogen-activated Protein Kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 41849–41855.
- Allen, D., Wilson, D., Drew, R., and Perfect, J. (2015) Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev Anti Infect Ther* **13**: 787–798.
- Alonso-Rodríguez, E., Fernández-Piñar, P., Sacristán-Reviriego, A., Molina, M., and Martín, H. (2016) An analog-sensitive version of the protein kinase Slt2 allows identification of novel targets of the yeast cell wall integrity pathway. *J Biol Chem* **291**: 5461–5472.
- Alvaro, C.G., and Thorner, J. (2016) Heterotrimeric G protein-coupled receptor signaling in yeast mating pheromone response. *J Biol Chem* **291**: 7785–7798.
- Andrews, P.D., and Stark, M.J.R. (2000) Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci* **113**: 2685–2693.
- Ardito, F., Giuliani, M., Perrone, D., Troiano, G., and Lo Muzio, L. (2017) The crucial role of protein phosphorylation in cell signaling and its use as targeted therapy (Review). *Int J Mol Med* **40**: 271–280.
- Audhya, A., and Emr, S.D. (2003) Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *EMBO J* **22**: 4223–4236.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1993) Current protocols in molecular biology. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Avruch, J. (2007) MAP kinase pathways: The first twenty years. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* **1773**: 1150–1160.
- Babele, P.K., Thakre, P.K., Kumawat, R., and Tomar, R.S. (2018) Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* **213**: 65–75.
- Babour, A., Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010) A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* **142**: 256–269.
- Bandyopadhyay, S., Mehta, M., Kuo, D., Sung, M., Chuang, R., Fiedler, D., *et al.* (2011) Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* **330**: 1385–1390.
- Baranwal, S., Azad, G.K., Singh, V., and Tomar, R.S. (2014) Signaling of Chloroquine-Induced Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Requires the Hog1 and Slt2 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Antimicrob Agents Chemother* **58**: 5552–5566.
- Bardwell, L. (2005) A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* **26**: 339–350.

BIBLIOGRAFÍA

- Belenky, P., Camacho, D., and Collins, J.J. (2013) Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Rep* **3**: 350–358.
- Bermejo, C., García, R., Straede, A., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., Heinisch, J.J., and Arroyo, J. (2010) Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Omi A J Integr Biol* **14**: 679–688.
- Bermejo, C., Rodríguez, E., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Rodríguez de la Concepción, M.L., Rivas, C., *et al.* (2008) The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**: 1113–1124.
- Bhatia-Kissova, I., and Camougrand, N. (2021) Mitophagy in yeast: Decades of research. *Cells* **10**: 1–22.
- Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., and Niwa, M. (2010) Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *J Biol Chem* **285**: 17545–17547.
- Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A., and Sunnerhagen, P. (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol* **53**: 1743–1756.
- Blázquez, M.A., Lagunas, R., Gancedo, C., and Gancedo, J.M. (1993) Trehalose-6-phosphate, a new regulator of yeast glycolysis that inhibits hexokinases. *FEBS Lett* **329**: 51–54.
- Bonilla, M., and Cunningham, K.W. (2003) Mitogen-activated Protein Kinase Stimulation of Ca²⁺ Signaling Is Required for Survival of Endoplasmic Reticulum Stress in Yeast. *Mol Biol Cell* **14**: 4296–4305.
- Bourgeois, C.F., Mortreux, F., and Auboeuf, D. (2016) The multiple functions of RNA helicases as drivers and regulators of gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol* **17**: 426–438.
- Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J.R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., *et al.* (2010) A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science* **328**: 1043–1046.
- Bryan, B.A., Knapp, G.S., Bowen, L.M., and Polymenis, M. (2004) The UV response in *Saccharomyces cerevisiae* involves the mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Curr Microbiol* **49**: 32–34.
- Büttner, S., Eisenberg, T., Carmona-Gutierrez, D., Ruli, D., Knauer, H., Sigrist, S. *et al.* (2007) Endonuclease G Regulates Budding Yeast Life and Death. *Mol Cell* **25**: 233–246.
- Cabral, M.E., Figueroa, L.I.C., and Fariña, J.I. (2013) Synergistic antifungal activity of statin-azole associations as witnessed by *Saccharomyces cerevisiae*- and *Candida utilis*-bioassays and ergosterol quantification. *Rev Iberoam Micol* **30**: 31–38.
- Caldara, M., Graziano, S., Gulli, M., Cadonici, S., and Marmiroli, N. (2017) Off-target effects of neuroleptics and antidepressants on *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol Sci* **156**: 538–548.
- Cargnello, M., and Roux, P.P. (2011) Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 50–83.
- Carlson, S.M., Chouinard, C.R., Labadorf, A., Lam, C.J., Schmelzle, K., Fraenkel, E., and White, F.M. (2011) Large-scale discovery of ERK2 substrates identifies ERK-mediated transcriptional regulation by ETV3. *Sci Signal* **4**: rs11.
- Carmody, S.R., Tran, E.J., Apponi, L.H., Corbett, A.H., and Wenthe, S.R. (2010) The Mitogen-Activated Protein Kinase Slt2 Regulates Nuclear Retention of Non-Heat Shock mRNAs during Heat Shock-Induced Stress. *Mol Cell Biol* **30**: 5168–5179.

- Carrillo-Muñoz, A.J., Giusiano, G., Ezkurra, P.A., and Quindós, G. (2006) Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter* **19**: 130–139.
- Casagrande, V., Vescovo, V. Del, Militti, C., Mangiapelo, E., Frontali, L., Negri, R., and Bianchi, M.M. (2009) Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: an interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor Yaf9. *FEMS Yeast Res* **9**: 400–410.
- Casino, P., Rubio, V., and Marina, A. (2010) The mechanism of signal transduction by two-component systems. *Curr Opin Struct Biol* **20**: 763–771.
- Chen, D.C., Yang, B.C., and Kuo, T.T. (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* **21**: 83–84.
- Chen, R.E., and Thorner, J. (2007) Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1311–1340
- Chen, Y., Feldman, D.E., Deng, C., Brown, J.A., Giacomo, A.F. De, Gaw, A.F., *et al.* (2005) Identification of Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways That Confer Resistance to Endoplasmic Reticulum Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cancer Res* **3**: 669–677.
- Chevtzoff, C., Vallortigara, J., Avéret, N., Rigoulet, M., and Devin, A. (2005) The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg* **1706**: 117–125.
- Chol, K.Y., Satterberg, B., Lyons, D.M., and Elion, E.A. (1994) Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**: 499–512.
- Claret, S., Gatti, X., Thoraval, D., and Crouzet, M. (2005) The Rgd1p Rho GTPase-Activating Protein and the Mid2p Cell Wall Sensor Are Required at Low pH for Protein Kinase C Pathway Activation and Cell Survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1375–1386.
- Cook, J.G., Bardwell, L., Kron, S.J., and Thorner, J. (1996) Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **10**: 2831–2848.
- Córcoles-Sáez, I., Ballester-Tomas, L., De la Torre-Ruiz, M.A., Prieto, J.A., and Randez-Gil, F. (2012) Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **446**: 477–488.
- Cowen, L.E. (2008) The evolution of fungal drug resistance: modulating the trajectory from genotype to phenotype. *Nat Rev Microbiol* **6**: 187–198.
- Cowen, L.E., Singh, S.D., Köhler, J.R., Collins, C., Zaas, A.K., Schell, W.A., *et al.* (2008) Harnessing Hsp90 function as a powerful, broadly effective therapeutic strategy for fungal infectious disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 2818–2823.
- Cowen, L.E., and Steinbach, W.J. (2008) Stress, Drugs, and Evolution: the Role of Cellular Signaling in Fungal Drug Resistance. *Eukaryot Cell* **7**: 747–764.
- Crowley, P.D., and Gallagher, H.C. (2014) Clotrimazole as a pharmaceutical: past, present and future. *J Appl Microbiol* **117**: 611–617.
- Dardalhon, M., Agoutin, B., Watzinger, M., and Averbek, D. (2009) Slit2 (Mpk1) MAP kinase is involved in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxypsoralen plus UVA. *J Photochem Photobiol B Biol* **95**: 148–155.

BIBLIOGRAFÍA

- Darieva, Z., Han, N., Warwood, S., Doris, K.S., Morgan, B.A., and Sharrocks, A.D. (2012) Protein Kinase C Regulates Late Cell Cycle-Dependent Gene Expression. *Mol Cell Biol* **32**: 4651–4661.
- Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., and Gustin, M.C. (1995) A Second Osmosensing Signal Transduction Pathway in Yeast. *J Biol Chem* **270**: 30157–30161
- De Cremer, K., De Brucker, K., Staes, I., Peeters, A., Van den Driessche, F., Coenye, T., *et al.* (2016) Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms. *Sci Rep* **6**: 27463.
- Deffieu, M., Bhatia-Kiššová, I., Salin, B., Galinier, A., Manon, S., and Camougrand, N. (2009) Glutathione participates in the regulation of mitophagy in yeast. *J Biol Chem* **284**: 14828–14837.
- De Filippi, L., Fournier, M., Cameroni, E., Linder, P., Virgilio, C. De, Foti, M., and Deloche, O. (2007) Membrane stress is coupled to a rapid translational control of gene expression in chlorpromazine-treated cells. **2**: 171–185.
- Delarue, M., Poterewicz, G., Hoxha, O., Choi, J., Yoo, W., Kayser, J., Holt, L., and Hallatschek, O. (2017) SCWISH network is essential for survival under mechanical pressure. *Procl Natl Acad Sci U S A* **114**: 13465–13470.
- De la Torre-Ruiz, M.A., Torres, J., Arin, J., and Herrero, E. (2002) Sit4 Is Required for Proper Modulation of the Biological Functions Mediated by Pkc1 and the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 33468–33476.
- Delley, P., and Hall, M.N. (1999) Cell Wall Stress Depolarizes Cell Growth Via Hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* **147**: 163–174.
- Demuyser, L., and Van Dijck, P. (2019) Can *Saccharomyces cerevisiae* keep up as a model system in fungal azole susceptibility research? *Drug Resist Updat* **42**: 22–34
- De Nadal, E., Alepuz, P.M., and Posas, F. (2002) Dealing with osmostress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* **3**: 735–740.
- De Nadal, E., Ammerer, G., and Posas, F. (2011) Controlling gene expression in response to stress. *Nat Rev Genet* **12**: 833–845.
- De Nadal, E., and Posas, F. (2022) The HOG pathway and the regulation of osmoadaptive responses in yeast. *FEMS Yeast Res* **22**: foac013.
- Denis, V., and Cyert, M.S. (2005) Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot Cell* **4**: 36–45.
- Díaz-Rodríguez, E., and Pandiella, A. (2010) Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J Cell Sci* **123**: 3146–3156.
- Dohlman, H.G. (2002) G proteins and pheromone signaling. *Annu Rev Physiol* **64**: 129–152.
- Dokládál, L., Stumpe, M., Hu, Z., Jaquenoud, M., Dengjel, J., and De Virgilio, C. (2021) Phosphoproteomic responses of TORC1 target kinases reveal discrete and convergent mechanisms that orchestrate the quiescence program in yeast. *Cell Rep* **37**: 110149.
- Duch, A., Canal, B., Barroso, S.I., García-Rubio, M., Seisenbacher, G., Aguilera, A., *et al.* (2018) Multiple signaling kinases target Mrc1 to prevent genomic instability triggered by transcription-replication conflicts. *Nat Commun* **9**: 379.

- Dummer, D., Marinho-carvalho, M.M., Teixeira, C.A., Veiga, V.F., Da, A.T., Holandino, C., *et al.* (2005) Clotrimazole decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton-associated glycolytic enzymes. *Mol Genet Metab* **84**: 354–362.
- Ekiel, I., Sulea, T., Jansen, G., Kowalik, M., Minailiuc, O., Cheng, J., *et al.* (2009) Binding the Atypical RA Domain of Ste50p to the Unfolded Opy2p Cytoplasmic Tail Is Essential for the High-Osmolarity Glycerol Pathway. *Mol Cell Biol* **20**: 5117–5126.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I., and Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: A multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**: 17–27.
- Elion, E.A., Satterberg, B., and Kranz, J.E. (1993) FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: Evidence for STE12 and FAR1. *Mol Biol Cell* **4**: 495–510.
- Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469–486.
- Fairn, G.D., MacDonald, K., and McMaster, C.R. (2007) A chemogenomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers a primary role for the mitochondria in farnesol toxicity and its regulation by the Pkc1 pathway. *J Biol Chem* **282**: 4868–4874.
- Farley, F.W., Satterberg, B., Goldsmith, E.J., and Elion, E.A. (1999) Relative dependence of different outputs of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway on the MAP kinase Fus3p. *Genetics* **151**: 1425–1444.
- Fassler, J.S., and West, A.H. (2010) Genetic and Biochemical Analysis of the SLN1 Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* **471**: 291–317.
- Fernández-Acero, T., Bertalmio, E., Luna, S., Mingo, J., Bravo-Plaza, I., Rodríguez-Escudero, I., *et al.* (2019) Expression of Human PTEN-L in a Yeast Heterologous Model Unveils Specific N-Terminal Motifs Controlling PTEN-L Subcellular Localization and Function. *Cells* **8**: 1512.
- Ficarro, S.B., McClelland, M.L., Stukenberg, P.T., Burke, D.J., Ross, M.M., Shabanowitz, J., *et al.* (2002) Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Biotechnol* **20**: 301–305.
- Fisher, M.C., Hawkins, N.J., Sanglard, D., and Gurr, S.J. (2018) Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **360**: 739–742.
- Flández, M., Cosano, I.C., Nombela, C., Martín, H., and Molina, M. (2004) Reciprocal Regulation between Slt2 MAPK and Isoforms of Msg5 Dual-specificity Protein Phosphatase Modulates the Yeast Cell Integrity Pathway. *J Biol Chem* **279**: 11027–11034.
- François, I.E.J.A., Cammue, B.P.A., Borgers, M., Ausma, J., Dispersyn, G.D., and Thevissen, K. (2006) Azoles: mode of antifungal action and resistance development. Effect of miconazole on endogenous reactive oxygen species production in *Candida albicans*. *Antiinfect Agents Med Chem* **5**: 3–13.
- Fromtling, R.A. (1988) Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin Microbiol Rev* **1**: 187–217.
- Furtado, C.M., Marcondes, M.C., Carvalho, R.S., Sola-Penna, M., and Zancan, P. (2015) Phosphatidylinositol-3-kinase as a putative target for anticancer action of clotrimazole. *Int J Biochem Cell Biol* **62**: 132–141.

BIBLIOGRAFÍA

- Gallego, C., Garí, E., Colomina, N., and Herrero, E. (1997) The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J* **16**: 7196–7206.
- Gancedo, C., and Flores, C.L. (2004) The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* **4**: 351–359.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J.M., Francois, J., *et al.* (2004) The Global Transcriptional Response to Transient Cell Wall Damage in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Regulation by the Cell Integrity Signaling Pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183–15195.
- García, R., Bravo, E., Díez-Muñiz, S., Nombela, C., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2017) A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. *Sci Rep* **7**: 1–15.
- García, R., Sanz, A.B., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., and Arroyo, J. (2016) Rlm1 mediates positive autoregulatory transcriptional feedback that is essential for Slt2-dependent gene expression. *J Cell Sci* **129**: 1649–1660.
- Golla, U., Joseph, D., and Tomar, R.S. (2016) Combined Transcriptomics and Chemical-Genetics Reveal Molecular Mode of Action of Valproic acid, an Anticancer Molecule using Budding Yeast Model. *Sci Rep* **6**: 1–16.
- Gomar-Alba, M., Méndez, E., Quilis, I., Bañó, M.C., and Igual, J.C. (2017) Whi7 is an unstable cell-cycle repressor of the Start transcriptional program. *Nat Commun* **8**: 329.
- González-Rubio, G., Fernández-Acero, T., Martín, H., and Molina, M. (2019) Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases (MKPs) in Fungal Signaling: Conservation, Function, and Regulation. *Int J Mol Sci* **20**: 1709.
- González-Rubio, G., Sastre-vergara, L., Molina, M., Martín H., and Fernández-Acero, T. (2022) Substrates of the MAPK Slt2: Shaping Yeast Cell Integrity. *J Fungi* **8**: 368.
- González-Rubio, G., Sellers-Moya, Á., Martín, H., and Molina, M. (2021a) A walk-through MAPK structure and functionality with the 30-year-old yeast MAPK Slt2. *Int Microbiol* **24**: 531–543.
- González-Rubio, G., Sellers-Moya, Á., Martín, H., and Molina, M. (2021b) Differential role of threonine and tyrosine phosphorylation in the activation and activity of the yeast MAPK Slt2. *Int J Mol Sci* **22**: 1–21.
- Gourlay, C.W., and Ayscough, K.R. (2006) Actin-Induced Hyperactivation of the Ras Signaling Pathway Leads to Apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **26**: 6487–6501.
- Gourlay, C.W., Carpp, L.N., Timpson, P., Winder, S.J., and Ayscough, K.R. (2004) A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J Cell Biol* **164**: 803–809.
- Gray, J. V., Ogas, J.P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D.E., and Herskowitz, I. (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* **16**: 4924–4937.
- Guo, S., Shen, X., Yan, G., Ma, D., Bai, X., Li, S., and Jiang, Y. (2009) A MAP kinase dependent feedback mechanism controls Rho1 GTPase and actin distribution in yeast. *PLoS One* **4**: e6089.
- Hanks, S.K., and Hunter, T. (1995) The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* **9**: 576–596.

- Hao, N., Behar, M., Parnell, S.C., Torres, M.P., Borchers, C.H., Elston, T.C.C., and Dohlman, H.G. (2007) A Systems-Biology Analysis of Feedback Inhibition in the Sho1 Osmotic-Stress-Response Pathway. *Curr Biol* **17**: 659–667.
- Hao, N., Zeng, Y., Elston, T.C., and Dohlman, H.G. (2008) Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *J Biol Chem* **283**: 33798–33802.
- Harrison, J.C., Bardes, E.S.G., Ohya, Y., and Lew, D.J. (2001) A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* **3**: 417–420.
- Harvey, S.L., Enciso, G., Dephoure, N., Gygi, S.P., Gunawardena, J., and Kellogg, D.R. (2011) A phosphatase threshold sets the level of Cdk1 activity in early mitosis in budding yeast. *Mol Biol Cell* **22**: 3595–3608.
- Hatakeyama, R., Kono, K., and Yoshida, S. (2017) Ypk1 and Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses. *J Cell Sci* **130**: 1169–1178.
- Hayashi, M., and Maeda, T. (2006) Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem* **139**: 797–803.
- Heinisch, J.J., Dupres, V., Alsteens, D., and Dufrene, Y.F. (2010a) Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy. *Nat Protoc* **5**: 670–677.
- Heinisch, J.J., Dupres, V., Wilk, S., Jendretzki, A., and Dufrêne, Y.F. (2010b) Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One* **5**: e11104.
- Heinisch, J.J., and Rodicio, R. (2018) Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol Rev* **42**: 22–39.
- Hickman, M.J., Spatt, D., and Winston, F. (2011) The Hog1 Mitogen-Activated Protein Kinase Mediates a Hypoxic Response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **188**: 325–338.
- Hohmann, S. (2015) An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* **61**: 373–382.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in Yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300–372.
- Honda, T., Obara, Y., Yamauchi, A., Couvillon, A.D., Mason, J.J., Ishii, K., and Nakahata, N. (2015) Phosphorylation of ERK5 on Thr732 is associated with ERK5 nuclear localization and ERK5-dependent transcription. *PLoS One* **10**: 1–14.
- Hutzler, F., Gerstl, R., Lommel, M., and Strahl, S. (2008) Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol Microbiol* **68**: 1438–1449.
- Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M.N., and Matsumoto, K. (1999) PDK1 Homologs Activate the Pkc1–Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Yeast. *Mol Cell Biol* **19**: 8344–8352.
- Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**: 23–28.
- Iñesta-Vaquera, F.A., Campbell, D.G., Tournier, C., Gómez, N., Lizcano, J.M., and Cuenda, A. (2010) Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell Signal* **22**: 1829–1837.
- Irie, K., Takase, M., Lee, K.S., Levin, D.E., Araki, H., Matsumoto, K., and Oshima, Y. (1993) MKK1 and MKK2, Which Encode *Saccharomyces cerevisiae* Mitogen-Activated Protein Kinase-Kinase Homologs, Function in the Pathway Mediated by Protein Kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3076–3083.

BIBLIOGRAFÍA

- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163–168.
- Jankowsky, E. (2011) RNA helicases at work: binding and rearranging. *Trends Biochem Sci* **36**: 19–29.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A., and Heinisch, J.J. (2011) How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol* **90**: 740–744.
- Jiménez, J., Cid, V.J., Cenamor, R., Yuste, M., Molero, G., Nombela, C., and Sánchez, M. (1998) Morphogenesis beyond Cytokinetic Arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **143**: 1617–1634.
- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Alonso-Rodríguez, E., Fernández-Acero, T., Molina, M., and Martín, H. (2020a) Rewiring the yeast cell wall integrity (CWI) pathway through a synthetic positive feedback circuit unveils a novel role for the MAPKKK Ssk2 in CWI pathway activation. *FEBS J* **287**: 4881–4901.
- Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., Sellers-Moya, Á., Molina, M., and Martín, H. (2020b) Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int Microbiol* **23**: 107–119.
- Jiménez-Sánchez, M., Cid, V.J., and Molina, M. (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **282**: 31174–31185.
- Jin, C., Parshin, A. V, Daly, I., Strich, R., and Cooper, K.F. (2013) The Cell Wall Sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 Are Required for Stress-Induced Nuclear to Cytoplasmic Translocation of Cyclin C and Programmed Cell Death in Yeast. *Oxid Med Cell Longev* **2013**: 320823.
- Jin, C., Strich, R., and Cooper, K.F. (2014) Slit2p phosphorylation induces cyclin C nuclear-to-cytoplasmic translocation in response to oxidative stress. *Mol Biol Cell* **25**: 1396–1407.
- Jones, A.W., Flynn, H.R., Uhlmann, F., Snijders, A.P., and Touati, S.A. (2020) Assessing Budding Yeast Phosphoproteome Dynamics in a Time-Resolved Manner using TMT10plex Mass Tag Labeling. *STAR Protoc* **1**: 100022.
- Jović, Z., Janković, S.M., Ružić Zečević, D., Milovanović, D., Stefanović, S., Folić, M., *et al.* (2019) Clinical Pharmacokinetics of Second-Generation Triazoles for the Treatment of Invasive Aspergillosis and Candidiasis. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* **44**: 139–157.
- Jung, U.S., Sobering, A.K., Romeo, M.J., and Levin, D.E. (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* **46**: 781–789.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., and Levin, D.E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* **9**: 1559–1571.
- Kamada, Y., Qadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D.E. (1996) Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem* **271**: 9193–9196.
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* **181**: 3330–3340.
- Kim, E.K., and Choi, E.J. (2015) Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol* **89**: 867–882.
- Kim, K.Y., Cosano, I.C., Levin, D.E., Molina, M., and Martín, H. (2007) Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast* **24**: 335–342.

- Kim, K.Y., Truman, A.W., Caesar, S., Schlenstedt, G., and Levin, D.E. (2010) Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol Biol Cell* **21**: 1609–1619.
- Kim, K.Y., Truman, A.W., and Levin, D.E. (2008) Yeast Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Activates Transcription through Swi4/Swi6 by a Noncatalytic Mechanism That Requires Upstream Signal. *Mol Cell Biol* **28**: 2579–2589.
- Kobayashi, D., Kondo, K., Uehara, N., Otokoza, S., Tsuji, N., Yagihashi, A., and Watanabe, N. (2002) Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob Agents Chemother* **46**: 3113–3117.
- Kock, C., Dufrêne, Y.F., and Heinisch, J.J. (2015) Up against the wall: is yeast cell wall integrity ensured by mechanosensing in plasma membrane microdomains? *Appl Environ Microbiol* **81**: 806–811.
- Kono, K., Nogami, S., Abe, M., Nishizawa, M., Morishita, S., Pellman, D., and Ohya, Y. (2008) G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **19**: 1763–1771.
- Krause, S.A., Cundell, M.J., Poon, P.P., McGhie, J., Johnston, G.C., Price, C., and Gray, J. V. (2012) Functional specialisation of yeast Rho1 GTP exchange factors. *J Cell Sci* **125**: 2721–2731.
- Krause, S.A., and Gray, J. V. (2002) The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **12**: 588–593.
- Kuranda, K., Leberre, V., Sokol, S., Palamarczyk, G., and François, J. (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**: 1147–1166.
- Kwolek-Mirek, M., and Zadrag-Tecza, R. (2014) Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res* **14**: 1068–1079.
- Kwon, Y., Chiang, J., Tran, G., and Giaever, G. (2016) Signaling pathways coordinating the alkaline pH response confer resistance to the hevein-type plant antimicrobial peptide Pn-AMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta* **244**: 1229–1240.
- Lafayette, S.L., Collins, C., Zaas, A.K., Schell, W.A., Betancourt-Quiroz, M., Leslie Gunatilaka, A.A., et al. (2010) PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of Mkc1, Calcineurin, and Hsp90. *PLoS Pathog* **6**: 79–80.
- Lai, S., and Pelech, S. (2016) Regulatory roles of conserved phosphorylation sites in the activation T-loop of the MAP kinase ERK1. *Mol Biol Cell* **27**: 1040–1050.
- Lamson, R.E., Winters, M.J., and Pryciak, P.M. (2002) Cdc42 Regulation of Kinase Activity and Signaling by the Yeast p21-Activated Kinase Ste20. *Mol Cell Biol* **22**: 2939–2951.
- Lanz, M.C., Yugandhar, K., Gupta, S., Sanford, E.J., Faça, V.M., Vega, S., et al. (2021) In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Rep* **22**: e51121.
- Laz, E. V., Lee, J., and Levin, D.E. (2020) Crosstalk between *Saccharomyces cerevisiae* SAPKs Hog1 and Mpk1 is mediated by glycerol accumulation. *Fungal Biol* **124**: 361–367.
- Lee, B., Jeong, S.G., Jin, S.H., Mishra, R., Peter, M., Lee, C.S., and Lee, S.S. (2020) Quantitative analysis of yeast MAPK signaling networks and crosstalk using a microfluidic device. *Lab Chip* **20**: 2646–2655.

BIBLIOGRAFÍA

- Lee, H., Khanal Lamichhane, A., Garraffo, H.M., Kwon-Chung, K.J., and Chang, Y.C. (2012) Involvement of PDK1, PKC and TOR signalling pathways in basal fluconazole tolerance in *Cryptococcus neoformans*. *Mol Microbiol* **84**: 130–146.
- Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., *et al.* (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3067–3075.
- Lee, K.S., and Levin, D.E. (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* **12**: 172–182.
- Lee, Y.M., Kim, E., An, J., Lee, Y., Choi, E., Choi, W., *et al.* (2017) Dissection of the HOG pathway activated by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Microbiol* **19**: 584–597.
- Leeuw, T., Wu, C., Schrag, J.D., Whiteway, M., and Thomas, D.Y. (1998) Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **4**: 191–195.
- Leng, G., and Song, K. (2016) Direct interaction of Ste11 and Mkk1/2 through Nst1 integrates high-osmolarity glycerol and pheromone pathways to the cell wall integrity MAPK pathway. *FEBS Lett* **590**: 148–160.
- Leskoske, K.L., Roelants, F.M., Emmerstorfer-Augustin, A., Augustin, C.M., Si, E.P., Hill, J.M., and Thorner, J. (2018) Phosphorylation by the stress-activated MAPK Slr2 down-regulates the yeast TOR complex 2. *Genes Dev* **32**: 1576–1590.
- Levin-Salomon, V., Maayan, I., Avrahami-Moyal, L., Marbach, I., Livnah, O., and Engelberg, D. (2009) When expressed in yeast, mammalian mitogen-activated protein kinases lose proper regulation and become spontaneously phosphorylated. *Biochem J* **417**: 331–340.
- Levin, D.E. (2005) Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262–291.
- Levin, D.E. (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**: 1145–1175.
- Levin, D.E., Bowers, B., Chen, C.Y., Kamada, Y., and Watanabe, M. (1994) Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* **40**: 229–239.
- Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M., and Thorner, J. (1990) A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**: 213–224.
- Li, L., Ye, Y., Pan, L., Zhu, Y., Zheng, S., and Lin, Y. (2009) The induction of trehalose and glycerol in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various stresses. *Biochem Biophys Res Commun* **387**: 778–783.
- Liu, L., and Levin, D.E. (2018) Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1. *Mol Biol Cell* **29**: 2898–2909.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**: 402–408.
- Lodder, A.L., Lee, T.K., and Ballester, R. (1999) Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**: 1487–1499.
- Lopez, M.S., Kliegman, J.I., and Shokat, K.M. (2014) The logic and design of analog-sensitive kinases and their small molecule inhibitors. *Methods in Enzymol* **548**: 189–213.
- Lorenz, K., Schmitt, J.P., Schmitteckert, E.M., and Lohse, M.J. (2009) A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* **15**: 75–83.

- Ma, D., Cook, J.G., and Thorner, J. (1995) Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol Biol Cell* **6**: 889–909.
- MacGilvray, M.E., Shishkova, E., Place, M., Wagner, E.R., Coon, J.J., and Gasch, A.P. (2020) Phosphoproteome Response to Dithiothreitol Reveals Unique Versus Shared Features of *Saccharomyces cerevisiae* Stress Responses. *J Proteome Res* **19**: 3405–3417.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H. (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**: 554–558.
- Maertens, J.A. (2004) History of the development of azole derivatives. *Clin Microbiol Infect* **10**: 1–10.
- Mao, K., Wang, K., Zhao, M., Xu, T., and Klionsky, D.J. (2011) Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **193**: 755–767.
- Martín, H., Arroyo, J., Sánchez, M., Molina, M., and Nombela, C. (1993) Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol Gen Genet* **241**: 177–184.
- Martín, H., Flández, M., Nombela, C., and Molina, M. (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* **58**: 6–16.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511–1519.
- Martins, D., Nguyen, D., and English, A.M. (2019) Ctt1 catalase activity potentiates antifungal azoles in the emerging opportunistic pathogen *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* **9**: 1–10.
- Mascaraque, V., Hernández, M.L., Jiménez-Sánchez, M., Hansen, R., Gil, C., Martín, H., *et al.* (2013) Phosphoproteomic Analysis of Protein Kinase C Signaling in *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Slt2 Mitogen-activated Protein Kinase (MAPK) -dependent Phosphorylation of Eisosome Core Components. *Mol Cell Proteomics* **12**: 557–574.
- Matia-González, A.M., and Rodríguez-Gabriel, M.A. (2011) Slt2 MAPK pathway is essential for cell integrity in the presence of arsenate. *Yeast* **28**: 9–17.
- Mcdonald, A.J., Curt, K.M., Patel, R.P., Kozlowski, H., Sackett, D.L., Robey, R.W., *et al.* (2019) Targeting mitochondrial hexokinases increases efficacy of histone deacetylase inhibitors in solid tumor models. *Exp Cell Res* **375**: 106–112.
- Mclean, K.J., Marshall, K.R., Richmond, A., Hunter, I.S., Fowler, K., Kieser, T., *et al.* (2002) Azole antifungals are potent inhibitors of cytochrome P450 mono-oxygenases and bacterial growth in mycobacteria and streptomycetes. *Microbiology (Reading)* **148**: 2937–2949.
- Mensonides, F.I.C., Brul, S., Klis, F.M., Hellingwerf, K.J., and Mattos, M.J.T. De (2005) Activation of the Protein Kinase C1 Pathway upon Continuous Heat Stress in *Saccharomyces cerevisiae* Is Triggered by an Intracellular Increase in Osmolarity due to Trehalose Accumulation. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4531–4538.
- Merlini, L., Dudin, O., and Martin, S.G. (2013) Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open Biol* **3**: 130008.
- Mishra, R., Drogen, F. Van, Dechant, R., Oh, S., Li, N., and Sik, S. (2017) Protein kinase C and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 13471–13476.

BIBLIOGRAFÍA

- Mizuno, T., Nakamura, M., and Irie, K. (2018) Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* **8**: 13078.
- Mollapour, M., and Piper, P.W. (2006) Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **6**: 1274–1280.
- Mollapour, M., Shepherd, A., Piper, P.W., Piper, P.W., and Sheffield, S. (2009) Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slt2 (Mpk1)p activation, with acetic acid stress of yeast. *Microbiology* **155**: 3304–3311.
- Montella-Manuel, S., Pujol-Carrion, N., and De la Torre-Ruiz, M.A. (2021) The Cell Wall Integrity Receptor Mtl1 Contributes to Articulate Autophagic Responses When Glucose Availability Is Compromised. *J Fungi* **7**: 903.
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., and De Virgilio, C. (2015) TORC1 controls G 1 -S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat Commun* **6**: 1–10.
- Moreno-Torres, M., Jaquenoud, M., Péli-Gulli, M.P., Nicastro, R., and Virgilio, C. De (2017) TORC1 coordinates the conversion of Sic1 from a target to an inhibitor of cyclin-CDK-Cks1. *Cell Discov* **3**: 17012.
- Morimoto, H., Kondoh, K., Nishimoto, S., Terasawa, K., and Nishida, E. (2007) Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem* **282**: 35449–35456.
- Nגיע, M.J., and Dohlman, H.G. (2012) Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS Genet* **8**: e1002437.
- Navarro-García, F., Eisman, B., Fiuza, S.M., Nombela, C., and Pla, J. (2005) The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* **151**: 2737–2749.
- Nern, A., and Arkowitz, R.A. (1999) A Cdc24p-Far1p-Gβγ Protein Complex Required for Yeast Orientation during Mating. *Cell* **144**: 1187–1202.
- Nomura, W., and Inoue, Y. (2015) Methylglyoxal Activates the Target of Rapamycin Complex 2-Protein Kinase C Signaling Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **35**: 1269–1280.
- Ono, T., Suzuki, T., Anraku, Y., and Iida, H. (1994) The MID2 gene encodes a putative integral membrane protein with a Ca²⁺-binding domain and shows mating pheromone-stimulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **151**: 203–208.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I. (1998) The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **12**: 2874–2886.
- O'Rourke, S.M., and Herskowitz, I. (2004) Unique and Redundant Roles for HOG MAPK Pathway Components as Revealed by Whole-Genome Expression Analysis. *Mol Biol Cell* **15**: 532–542.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., *et al.* (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 2196–2207.
- Pal, G., Paraz, M.T.Z., and Kellogg, D.R. (2008) Regulation of Mih1/Cdc25 by protein phosphatase 2A and casein kinase 1. *J Cell Biol* **180**: 931–945.
- Palacios, L., Dickinson, R.J., Sacristán-Reviriego, A., Didmon, M.P., Marín, M.J., Martín, H., *et al.* (2011) Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **286**: 42037–42050.

- Paravicini, G., Cooper, M., Friedli, L., Smith, D.J., Carpentier, J.L., Klig, L.S., and Payton, M.A. (1992) The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol Cell Biol* **12**: 4896–4905.
- Parsons, A.B., Brost, R.L., Ding, H., Li, Z., Zhang, C., Sheikh, B., *et al.* (2004) Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat Biotechnol* **22**: 62–69.
- Patterson, J.C., Goupil, L.S., and Thorner, J. (2021) Cdc42-Specific GTPase-Activating Protein Rga1 Squelches Crosstalk between the High-Osmolarity Glycerol (HOG) and Mating Pheromone Response MAPK Pathways. *Biomolecules* **11**: 1–26.
- Pearson, A.J., Fullwood, P., Tapia, G.T., Prise, I., Smith, M.P., Xu, Q., *et al.* (2020) Discovery of a gatekeeper residue in the C-terminal tail of the extracellular signal-regulated protein kinase 5 (ERK5). *Int J Mol Sci* **21**: 1–16.
- Perez, P., and Rincón, S.A. (2010) Rho GTPases: Regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* **426**: 243–253.
- Petkova, M.I., Pujol-Carrion, N., Arroyo, J., García-Cantalejo, J., and De La Torre-Ruiz, M.A. (2010) Mtl1 is required to activate general stress response through TOR1 and RAS2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. *J Biol Chem* **285**: 19521–19531.
- Pfaller, M.A., and Diekema, D.J. (2010) Epidemiology of invasive mycoses in North America. *Crit Rev Microbiol* **36**: 1-53.
- Philip, B., and Levin, D.E. (2001) Wsc1 and Mid2 Are Cell Surface Sensors for Cell Wall Integrity Signaling That Act through Rom2, a Guanine Nucleotide Exchange Factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**: 271–280.
- Piña, F., Yagisawa, F., Obara, K., Gregerson, J.D., Kihara, A., and Niwa, M. (2018) Sphingolipids activate the endoplasmic reticulum stress surveillance pathway. *J Cell Biol* **217**: 495–505.
- Pirincci Ercan, D., Chrétien, F., Chakravarty, P., Flynn, H.R., Snijders, A.P., and Uhlmann, F. (2021) Budding yeast relies on G₁ cyclin specificity to couple cell cycle progression with morphogenetic development. *Sci Adv* **7**: eabg0007.
- Posas, F., and Saito, H. (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* **17**: 1385–1394.
- Posas, F., Witten, E.A., and Saito, H. (1998) Requirement of STE50 for Osmostress-Induced Activation of the STE11 Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase in the High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. *Mol Cell Biol* **18**: 5788–5796.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “two-component” osmosensor. *Cell* **86**: 865–875.
- Ptacek, J., and Snyder, M. (2006) Charging it up: global analysis of protein phosphorylation. *Trends Genet* **22**: 545–554.
- Pujol-Carrion, N., and De la Torre-Ruiz, M.A. (2017) Physical interaction between the MAPK Slt2 of the PKC1-MAPK pathway and Grx3/Grx4 glutaredoxins is required for the oxidative stress response in budding yeast. *Free Radic Biol Med* **103**: 107–120.
- Pujol-Carrion, N., Pavón-Vergés, M., Arroyo, J. and De la Torre-Ruiz, M.A. (2021) The MAPK Slt2/Mpk1 plays a role in iron homeostasis through direct regulation of the transcription factor Aft1. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1868**: 118974.

BIBLIOGRAFÍA

- Qadota, H., Anraku, Y., Botstein, D., and Ohya, Y. (1994) Conditional lethality of a yeast strain expressing human RHOA in place of RHO1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 9317–9321.
- Queralt, E., and Igual, J.C. (2005) Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **171**: 1485–1498.
- Quilis, I., Gomar-Alba, M., and Igual, J.C. (2021) The CWI Pathway: A Versatile Toolbox to Arrest Cell-Cycle Progression. *J Fungi* **7**: 1041.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B., and Levin, D.E. (1999) Mid2 Is a Putative Sensor for Cell Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 3969–3976.
- Ramazi, S., and Zahiri, J. (2021) Post-translational modifications in proteins: Resources, tools and prediction methods. *Database* **2021**: 1–20.
- Ramezani-Rad, M. (2003) The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr Genet* **43**: 161–170.
- Ray, A., Hector, R.E., Roy, N., Song, J.H., Berkner, K.L., and Runge, K.W. (2003) Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nat Genet* **33**: 522–526.
- Reinoso-Martín, C., Schüller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003) The Yeast Protein Kinase C Cell Integrity Pathway Mediates Tolerance to the Antifungal Drug Caspofungin through Activation of Slt2p Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Eukaryot Cell* **2**: 1200–1210.
- Ribeiro, G.F., Denes, E., Heaney, H. and Childers, D.S. (2022) What ‘Omics can tell us about antifungal adaptation. *FEMS Yeast Res* **21**: foab070.
- Robbins, N., Wright, G.D., and Cowen, L.E. (2017) Antifungal drugs: the current armamentarium and development of new agents. *Microbiol Spectr* **4**.
- Rodríguez-Peña, J.M., Díez-Muñiz, S., Bermejo, C., Nombela, C., and Arroyo, J. (2013) Activation of the yeast cell wall integrity MAPK pathway by zymolyase depends on protease and glucanase activities and requires the mucin-like protein Hkr1 but not Msb2. *FEBS Lett* **587**: 3675–3680.
- Roelants, F.M., Torrance, P.D., and Thorner, J. (2004) Differential roles of PDK1- and PDK2- phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology (Reading)* **150**: 3289–3304.
- Román, E., Prieto, D., Martín, R., Correia, I., Mesa Arango, A.C., Alonso-Monge, R., *et al.* (2016) Role of catalase overproduction in drug resistance and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiol* **11**: 1279–1297.
- Roskoski, R. (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* **66**: 105–143.
- Rousseau, A., and Bertolotti, A. (2016) An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* **536**: 184–189.
- Roux, P.P., and Thibault, P. (2013) The coming of age of phosphoproteomics—from large data sets to inference of protein functions. *Mol Cell Proteomics* **12**: 3453–3464.
- Sabbagh, W., Flatauer, L.J., Bardwell, A.J., and Bardwell, L. (2001) Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol Cell* **8**: 683–691.
- Saito, H., and Posas, F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **192**: 289–318.
- Sambrook, J., and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

- Sánchez-Adriá, I.E., Sanmartín, G., Prieto, J.A., Estruch, F., and Rande-gil, F. (2022) Slt2 Is Required to Activate ER-Stress-Protective Mechanisms through TORC1 Inhibition and Hexosamine Pathway Activation. *J Fungi* **8**: 92.
- Santiago-Cartagena, E., González-Crespo, S., Vélez, V., Martínez, N., Snider, J., Jessulat, M., *et al.* (2019) Identification and functional testing of novel interacting protein partners for the stress sensors Wsc1p and Mid2p of *Saccharomyces cerevisiae*. *G3 (Bethesda)* **9**: 1085–1102.
- Sanz, A.B., García, R., Pavón-Vergés, M., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2022) Control of Gene Expression via the Yeast CWI Pathway. *Int J Mol Sci* **23**: 1791.
- Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., and Arroyo, J. (2018a) The CWI pathway: regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. *J Fungi* **4**: 1–12.
- Sanz, A.B., García, R., Rodríguez-Peña, J.M., Nombela, C., and Arroyo, J. (2018b) Slt2 MAPK association with chromatin is required for transcriptional activation of Rlm1 dependent genes upon cell wall stress. *Biochim Biophys Acta - Gene Regul Mech* **1861**: 1029–1039.
- Saxena, M., and Mustelin, T. (2000) Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin Immunol* **12**: 387–396.
- Scheffler, L., Feicht, S., Babushku, T., Kuhn, L.B., Ehrenberg, S., Frankenberger, S., *et al.* (2021). ERK phosphorylation is RAF independent in naïve and activated B cells but RAF dependent in plasma cell differentiation. *Sci Signal*. **14**: eabc1648.
- Schmidt, A., Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2002) The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **45**: 1433–1441.
- Sellers-Moya, Á., Nuévalos, M., Molina, M., and Martín, H. (2021) Clotrimazole-Induced Oxidative Stress Triggers Novel Yeast Pkc1-Independent Cell Wall Integrity MAPK Pathway Circuitry. *J Fungi* **7**: 1–22.
- Serrano, R., Martín, H., Casamayor, A., and Ariño, J. (2006) Signaling Alkaline pH Stress in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 Cell Surface Sensor and the Slt2 MAPK Pathway. *J Biol Chem* **281**: 39785–39795.
- Shapiro, R.S., Robbins, N., and Cowen, L.E. (2011) Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol Mol Biol Rev* **75**: 213–267.
- Sheridan, D.L., Kong, Y., Parker, S.A., Dalby, K.N., and Turk, B.E. (2008) Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem* **283**: 19511–19520.
- Shimada, Y., Gulli, M.P., and Peter, M. (2000) Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* **2**: 117–124.
- Shirai, A., Matsuyama, A., Yashiroda, Y., Hashimoto, A., Kawamura, Y., Arai, R., *et al.* (2008) Global analysis of gel mobility of proteins and its use in target identification. *J Biol Chem* **283**: 10745–10752.
- Sikorski, R.S., and Hieter, P. (1989) A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**: 19–27.
- Soler, M., Plovins, A., Martín, H., Molina, M., and Nombela, C. (1995) Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and *in vivo* interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol* **17**: 833–842.

BIBLIOGRAFÍA

- Soriano-Carot, M., Bañó, M.C., and Igual, J.C. (2012) The yeast mitogen-activated protein kinase Slk2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div* **7**: 1–14.
- Soulard, A., Cremonesi, A., Moes, S., Schütz, F., Jenö, P., and Hall, M.N. (2010) The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell* **21**: 3475–3486.
- Spira, F., Mueller, N.S., Beck, G., Olshausen, P. Von, Beig, J., and Wedlich-Söldner, R. (2012) Patchwork organization of the yeast plasma membrane into numerous coexisting domains. *Nat Cell Biol* **14**: 640–648.
- Staleva, L., Hall, A., and Orlow, S.J. (2004) Oxidative Stress Activates FUS1 and RLM1 Transcription in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an Oxidant- dependent Manner. *Mol Biol Cell* **15**: 5574–5582.
- Stieg, D.C., Willis, S.D., Ganesan, V., Ong, K.L., Scuzorzo, J., Song, M., *et al.* (2018) A complex molecular switch directs stress-induced cyclin C nuclear release through SCFGrr1-mediated degradation of Med13. *Mol Biol Cell* **29**: 363–375.
- Straede, A., Corran, A., Bundy, J., and Heinisch, J. (2007) The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeast* **24**: 321–334.
- Straede, A., and Heinisch, J.J. (2007) Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett* **581**: 4495–4500.
- Sud, I.J., and Feingold, D.S. (1981) Mechanisms of action of the antimycotic imidazoles. *J Invest Dermatol* **76**: 438–441.
- Swaney, D.L., Beltrao, P., Starita, L., Guo, A., Rush, J., Fields, S., *et al.* (2013) Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* **10**: 676–682.
- Tamaki, H. (2007) Glucose-Stimulated cAMP-Protein Kinase A Pathway in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **104**: 245–250.
- Tanigawa, M., Kihara, A., Terashima, M., Takahara, T., and Maeda, T. (2012) Sphingolipids Regulate the Yeast High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. *Mol Cell Biol* **32**: 2861–2870.
- Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., and Nishida, E. (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* **2**: 110–116.
- Tatebayashi, K., Tanaka, K., Tomida, T., Maruoka, T., Kasukawa, E., and Saito, H. (2006) Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J* **25**: 3033–3044.
- Tatebayashi, K., Yang, H., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M., and Saito, H. (2007) Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* **26**: 3521–3533.
- Tatjer, L., Sacristán-reviriego, A., Casado, C., González, A., Rodríguez-Porrata, B., Palacios, L., *et al.* (2016) Wide-Ranging Effects of the Yeast Ptc1 Protein Phosphatase Acting Through the MAPK Kinase Mkk1. *Genetics* **202**: 141–156.
- Taylor, S.S., Keshwani, M.M., Steichen, J.M., and Kornev, A.P. (2012) Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **367**: 2517–2528.
- Thai, V., Dephoure, N., Weiss, A., Ferguson, J., Leitao, R., Gygi, S.P., and Kellogg, D.R. (2017) Protein kinase C controls binding of Igo/ENSA proteins to protein phosphatase 2A in budding yeast. *J Biol Chem* **292**: 4925–4941.

- Thevissen, K., Ayscough, K.R., Aerts, A.M., Du, W., De Brucker, K., Meert, E.M.K., *et al.* (2007) Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. *J Biol Chem* **282**: 21592–21597.
- Tiffert, T., Ginsburg, H., Krugliak, M., Elford, B.C., and Lew, V.L. (2000) Potent antimalarial activity of clotrimazole in *in vitro* cultures of *Plasmodium falciparum*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 331–336.
- Torres, J., Di Como, C.J., Herrero, E., and De la Torre-Ruiz, M.A. (2002) Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* **277**: 43495–43504.
- Touati, S.A., Hofbauer, L., Jones, A.W., Snijders, A.P., Kelly, G., and Uhlmann, F. (2019) Cdc14 and PP2A Phosphatases Cooperate to Shape Phosphoproteome Dynamics during Mitotic Exit. *Cell Rep* **29**: 2105–2119.
- Trivedi, V., Chand, P., Srivastava, K., Puri, S.K., Maulik, P.R., and Bandyopadhyay, U. (2005) Clotrimazole Inhibits Hemoperoxidase of *Plasmodium falciparum* and Induces Oxidative Stress. Proposed antimalarial mechanism of clotrimazole. *J Biol Chem* **280**: 41129–41136.
- Truman, A.W., Kim, K.-Y., and Levin, D.E. (2009) Mechanism of Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Binding to the Swi4 Transcription Factor and Its Regulation by a Novel Caffeine-Induced Phosphorylation. *Mol Cell Biol* **29**: 6449–6461.
- Truman, A.W., Millson, S.H., Nuttall, J.M., King, V., Mollapour, M., Prodromou, C., *et al.* (2006) Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slt2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* **5**: 1914–1924.
- Udom, N., Chansongkrow, P., Charoensawan, V., and Auesukaree, C. (2019) Coordination of the Cell Wall Integrity and High Osmolarity Glycerol Pathways in Response to Ethanol Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **85**: e00551-19.
- Van Drogen, F., Dard, N., Pelet, S., Lee, S.S., Mishra, R., Srejić, N., and Peter, M. (2020) Crosstalk and spatiotemporal regulation between stress-induced MAP kinase pathways and pheromone signaling in budding yeast. *Cell Cycle* **19**: 1707–1715.
- Van Drogen, F., Mishra, R., Rudolf, F., Walczak, M.J., Lee, S.S., Reiter, W., *et al.* (2019) Mechanical stress impairs pheromone signaling via Pkc1-mediated regulation of the MAPK scaffold Ste5. *J Cell Biol* **218**: 3117–3133.
- Van Drogen, F., O'Rourke, S.M., Stucke, V.M., Jaquenoud, M., Neiman, A.M., and Peter, M. (2000) Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling *in vivo*. *Curr Biol* **10**: 630–639.
- Van Drogen, F., and Peter, M. (2002) Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* **12**: 1698–1703.
- Vay, H.A., Philip, B., and Levin, D.E. (2004) Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology* **150**: 3281–3288.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13804–13809.
- Vilaça, R., Mendes, V., Mendes, M.V., Carreto, L., Amorim, M.A., De Freitas, V., *et al.* (2012) Quercetin Protects *Saccharomyces cerevisiae* against Oxidative Stress by Inducing Trehalose Biosynthesis and the Cell Wall Integrity Pathway. *PLoS One* **7**: 1–11.

BIBLIOGRAFÍA

- Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., and De la Torre-ruiz, M.A. (2005) Pkc1 and the Upstream Elements of the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, Are Required for Cellular Responses to Oxidative Stress. *J Biol Chem* **280**: 9149–9159.
- Vitrac, H., Mallampalli, V., and Dowhan, W. (2019). Importance of phosphorylation/dephosphorylation cycles on lipid-dependent modulation of membrane protein topology by posttranslational phosphorylation. *J Biol Chem* **249**: 18853–18862.
- Wall, G., and Lopez-Ribot, J.L. (2020) Current Antimycotics, New Prospects, and Future Approaches to Antifungal Therapy. *Antibiotics (Basel)* **9**: 445.
- Wang, W., and Malcolm, B.A. (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange(TM) Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* **26**: 680–682.
- Wang, Y., Zhu, M., Ayalew, M., and Ruff, J.A. (2008) Down-regulation of Pkc1-mediated signaling by the deubiquitinating enzyme Ubp3. *J Biol Chem* **283**: 1954–1961.
- Watanabe, D., Abe, M., and Ohya, Y. (2001) Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3- β -glucan synthesis. *Yeast* **18**: 943–951.
- Watanabe, M., Chen, C.Y., and Levin, D.E. (1994) *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J Biol Chem* **269**: 16829–16836.
- Watanabe, Y., Takaesu, G., Hagiwara, M., Irie, K., and Matsumoto, K. (1997) Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 2615–2623.
- Westfall, P.J., Ballou, D.R., and Thorner, J. (2004) When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science* **306**: 1511–1512.
- Westfall, P.J., Patterson, J.C., Chen, R.E., and Thorner, J. (2008) Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 12212–12217.
- Whiteway, M.S., Wu, C., Leeuw, T., Clark, K., Fourest-Lieuvin, A., Thomas, D.Y., and Leberer, E. (1995) Association of the yeast pheromone response G protein β ; γ subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**: 1572–1575.
- Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C.P., Burkholder, A., Knoche, K., and Ota, I. (2002) Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* **1**: 163–173.
- Wu, C., Jansen, G., Zhang, J., Thomas, D.Y., and Whiteway, M. (2006) Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes dev* **20**: 734–746.
- Wu, M., Feng, G., Zhang, B., Xu, K., Wang, Z., Cheng, S., *et al.* (2020) Phosphoproteomics Reveals Novel Targets and Phosphoprotein Networks in Cell Cycle Mediated by Dsk1 Kinase. *J Proteome Res* **19**: 1776–1787.
- Xiong, B., Zhang, L., Xu, H., Yang, Y., and Jiang, L. (2015) Cadmium induces the activation of cell wall integrity pathway in budding yeast. *Chem Biol Interact* **240**: 316–323.
- Yang, J., Garrod, S.M., Deal, M.S., Anand, G.S., Woods, V.L., and Taylor, S. (2005) Allosteric network of cAMP-dependent protein kinase revealed by mutation of Tyr204 in the P+1 loop. *J Mol Biol* **346**: 191–201.
- Yano, K., Uesono, Y., Yoshida, S., Kikuchi, A., Kashiwazaki, J., Mabuchi, I., and Kikuchi, Y. (2013) Mih1/Cdc25 is negatively regulated by Pkc1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes to Cells* **18**: 425–441.

Yu, J.W., Mendrola, J.M., Audhya, A., Singh, S., Keleti, D., DeWald, D.B., *et al.* (2004) Genome-wide analysis of membrane targeting by *S. cerevisiae* pleckstrin homology domains. *Mol Cell* **13**: 677–688.

Yurko, N., Liu, X., Yamazaki, T., Hoque, M., Tian, B., and Manley, J.L. (2017) MPK1/SLT2 Links Multiple Stress Responses with Gene Expression in Budding Yeast by Phosphorylating Tyr1 of the RNAP II CTD. *Mol Cell* **68**: 913–925.

Zhao, Y., Li, S., Wang, J., Liu, Y., and Deng, Y. (2021) Roles of high osmolarity glycerol and cell wall integrity pathways in cadmium toxicity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int J Mol Sci* **22**: 1–15.



ANEXO I

Tabla I. Lista con los 1576 fosfopéptidos considerados fosforilados tras el tratamiento con el CLT. Se incluyen las secuencias de los péptidos, el gen al que corresponden, el residuo en el que se fosforilan (aminoácido y posición en la proteína) y las medias de ambos experimentos de los valores de abundancia normalizados en cada muestra.

SECUENCIA PÉPTIDO	GEN	AMINOÁCIDO	POSICIÓN	ABUNDANCIA NORMALIZADA RESPECTO A 0' (MEDIA DE DOS EXPERIMENTOS)									
				WT					sit2 Δ				
				0'	15'	30'	60'	120'	0'	15'	30'	60'	120'
LDKTSSTRYQPKMPSVNVKWSKPDQIHTSDV	ABF1	S	531	1.00	1.63	2.16	1.81	2.17	1.00	2.01	1.85	2.48	2.13
EPVKTPSPAPAAKISSRVNDNDDDDWNEPE	ABP1	S	192	1.00	1.22	1.66	2.59	2.68	1.00	0.91	1.24	1.87	2.58
RIGRDLPEFEGKRNLTTEESDVWDHNAWVNE	ABP140	T	347	1.00	3.25	5.65	5.79	4.34	1.00	2.77	4.56	4.05	3.25
NLPKPTNEEDEEESMSENKIYSKGENADI	ABP140	S	93	1.00	0.71	0.76	0.75	0.99	1.00	1.71	1.22	1.97	2.85
APVQKEEPEQEEIAPSLPSRNSIPAPKQEEA	ABP1	S	475	1.00	1.28	1.43	1.78	1.37	1.00	1.50	1.62	1.74	1.73
KNSTGDNIFRLFEKTSPPGLSISPRINGNSL	ACE2	S	385	1.00	1.68	1.14	1.03	0.80	1.00	0.85	0.62	0.50	0.45
NTMKNANTTATAGENTPFLQRLNLFKNQNMNM	ACF4	T	239	1.00	1.61	1.57	1.95	2.17	1.00	1.62	1.45	1.46	1.73
PISSPQRSTTNQSPVSDHASPISDQDLIYK	ACF4	S	74	1.00	1.93	1.24	1.16	0.82	1.00	0.59	0.49	0.52	0.68
PQRSTTNQSPVSDHASPISDQDLIYKLAAK	ACF4	S	78	1.00	4.18	2.49	1.51	0.82	1.00	1.82	1.54	1.51	1.20
TSKHGGQNPETKISRSTDDVSEKKVVRKLSF	ACM1	S	188	1.00	1.45	1.47	1.53	1.66	1.00	1.74	1.71	2.00	2.16
KNVGVGKVKQKRSISTAERKRTRKLVKELN	ADF1	S	28	1.00	1.18	1.07	1.39	1.99	1.00	0.81	1.02	1.08	1.00
NKSSETMIPTLLREASTQEPAKLKAETTLKA	ADF1	S	58	1.00	1.99	1.76	1.44	1.19	1.00	3.55	3.10	2.97	1.91
KSSETMIPTLLREASTQEPAKLKAETTLKAE	ADF1	T	59	1.00	2.01	1.80	1.40	1.18	1.00	3.40	3.05	2.87	1.87
IPQAEKLDQMLKEQGTPLKAEIKLVDDDEL	ADK1	T	112	1.00	1.05	1.11	1.14	0.96	1.00	1.50	1.48	2.06	2.44
ELLVARITGRLIHPASGRSYHKIFNPPKEDM	ADK1	S	140	1.00	2.72	4.57	7.42	6.32	1.00	1.26	1.68	2.21	2.45
NEGRASASGNPAAVSPIMTLNLKSTHSLNI	AFT1	S	56	1.00	0.91	1.05	0.92	0.90	1.00	1.54	1.74	1.76	1.33
HSLPASNARLDQSSNSLQKTQPPSHLLST	AGE2	S	162	1.00	2.03	2.29	2.07	2.73	1.00	2.31	3.12	3.84	4.71
SLSKTTSNTSVTSATSISGAANTKTGNRVGE	AGE2	T	206	1.00	3.07	2.95	1.81	1.22	1.00	2.83	2.56	2.29	1.32
LTNELEGGPDAKSSYYNLRSKSRLRGSH	AHC1	S	551	1.00	3.28	2.93	2.62	2.41	1.00	2.74	3.23	3.58	3.06
NNVMNNTSKELEEISLKHNIHNVSRKKS	AIM21	S	104	1.00	1.84	1.74	1.80	1.77	1.00	3.34	2.38	2.86	3.46
__MPSEVTPKVPERPSSRRKTSSELPSSGSES	AIM21	S	14	1.00	4.58	6.35	10.09	11.93	1.00	3.05	3.99	8.22	10.16
SEVTPKVPERPSSRRKTSSELPSSGSESDIK	AIM21	T	18	1.00	1.42	1.03	0.74	0.66	1.00	2.54	1.46	1.30	1.23
DMKVQVDVSKDVEEGLNALPPSGITESDDK	AIM21	S	231	1.00	1.12	1.14	1.56	1.74	1.00	1.60	1.38	1.82	2.72
TESDDKAEKFTKHPESLLEELQKHQEQEKEE	AIM21	S	256	1.00	1.32	1.40	1.52	2.28	1.00	1.77	1.96	2.31	2.96
ESDDKAEKFTKHPESLLEELQKHQEQEKEE	AIM21	S	257	1.00	1.77	2.33	3.53	3.84	1.00	2.26	2.02	3.77	5.00
LFPLSGSESGDIKANSEPPTPAGTNPVTRR	AIM21	S	36	1.00	2.16	2.80	2.91	2.96	1.00	2.92	3.52	5.93	6.71
NSSATTASADIAKKHTDSSITSDTTKADFTS	AIM21	T	435	1.00	40.64	33.00	25.47	15.14	1.00	8.35	9.48	11.08	10.27
SATTASADIAKKHTDSSITSDTTKADFTSKL	AIM21	S	437	1.00	1.20	1.65	1.57	1.66	1.00	1.39	1.83	1.81	3.00
VNPGQLPPELEKLSPPDTESKLGPDDQSQQA	AIM21	S	477	1.00	8.46	8.63	16.23	15.76	1.00	2.78	6.29	8.93	12.47
GQLPPELEKLSPPDTESKLGPDDQSQQAQK	AIM21	T	480	1.00	7.36	6.44	6.98	5.38	1.00	3.83	5.58	6.72	7.31
NVSSSFSEKVLIDTTPGEQAERALDEKSKS	AIM21	T	552	1.00	1.23	1.40	2.15	2.58	1.00	1.42	1.49	2.35	3.60
GTPNVPTRRPILKAKTMTSFESGMDQESLPK	AIM21	T	58	1.00	6.86	5.83	5.32	3.68	1.00	6.16	4.85	5.17	5.01
__MPSEVTPKVPERPSSRRKTSSELPSSGSES	AIM21	T	6	1.00	1.27	1.63	2.82	5.06	1.00	1.14	1.40	2.90	4.70
NVPTRRPIKAKTMTSFESGMDQESLPKVLPL	AIM21	S	61	1.00	1.68	1.17	1.39	1.19	1.00	3.49	2.71	2.52	2.40
TRRPILKAKTMTSFESGMDQESLPKVLQRP	AIM21	S	64	1.00	4.44	3.80	3.56	2.74	1.00	4.71	4.12	4.22	4.12
KAKTMTSFESGMDQESLPKVLQRPVRRST	AIM21	S	70	1.00	3.62	2.64	2.42	1.99	1.00	5.11	3.74	3.72	3.43
ESLPKVLQRPVRRSTTEELNNVMNNTSKEL	AIM21	T	84	1.00	5.23	3.08	2.48	1.74	1.00	7.19	4.11	3.05	2.60
SLPKVPLQRPVRRSTTEELNNVMNNTSKELE	AIM21	T	85	1.00	4.22	2.33	1.51	1.12	1.00	6.98	3.75	2.59	2.14
VRRSTTEELNNVMNNTSKELEEISLKHNI	AIM21	T	95	1.00	8.70	6.15	4.03	2.61	1.00	7.57	6.76	4.48	3.79
__MNSTKRLKMSSTTFHDYDLEEPTLSNAR	AIM29	T	12	1.00	4.98	5.53	3.52	3.28	1.00	2.72	5.88	4.09	2.48
VHQEPAPSGIKPNTTSSAASLPAKHSRTTT	AIM3	T	471	1.00	1.18	1.05	1.10	0.80	1.00	1.41	1.06	1.24	1.64
PPPSGRNFERTESVLSTNAANVQEDPISNFL	AIM3	S	573	1.00	2.34	2.06	2.19	1.93	1.00	1.75	1.51	1.93	1.90
QNFQPPKPRFRSSQSSNSDSSYTDIGPEAN	AIM3	S	670	1.00	2.82	2.48	2.54	1.75	1.00	1.89	2.10	1.97	1.90
RSEKLEHGTITSEVDSSKANKYKESIPVPT	AIM3	S	750	1.00	1.20	1.37	1.58	1.73	1.00	1.46	1.47	1.63	2.04
SLKANEPKELTREATQDEVLSNITNLSH	AIM3	T	805	1.00	1.72	1.58	1.60	1.17	1.00	1.59	1.39	1.66	1.82
KELTREATQDEVLSNITNLSHILKLRKTNV	AIM3	S	813	1.00	1.63	1.46	1.47	1.16	1.00	1.45	1.16	1.39	1.37
LSNITNLSHILKLRKTNVLEKLGSKVKD	AIM3	T	826	1.00	9.42	10.93	13.27	10.77	1.00	4.09	4.72	5.74	5.95
LKSLPPIEMERAYSGDISAADDNLNPFER	AIM3	S	915	1.00	1.41	1.45	1.97	1.63	1.00	1.05	1.14	1.37	1.55
PKKKLNRVPTIRREVSFRSRSYSSVSSK	AIM44	S	244	1.00	2.96	2.77	2.42	1.90	1.00	1.30	1.56	1.43	1.29
KEVDELAELSPMRKQSDLSITLRSFPFAMLN	AIM44	S	717	1.00	2.16	2.02	1.57	0.91	1.00	1.75	2.00	2.03	1.64
RNLERNKEGQLLQTVSGHLEADSGHSLGRE	AIM4	S	51	1.00	1.43	1.75	2.34	2.58	1.00	1.26	1.44	1.65	1.76
GSKAEKTAELKSSYSCNLEKLVIFEDSKL	AIM45	S	76	1.00	1.11	0.95	0.81	1.01	1.00	1.71	1.33	1.38	1.59
RHMNRNSDENEDYQFSESIYDEDLPRPSHK	AIR2	S	223	1.00	1.60	1.74	1.84	1.68	1.00	1.62	1.81	1.68	1.73
MNRNSDENEDYQFSESIYDEDLPRPSHKRH	AIR2	S	225	1.00	1.62	1.83	2.01	1.98	1.00	1.24	1.76	1.73	1.88
SQNDHSHSGRNRKRASNFHPPYQKSNVIGP	AIR2	S	256	1.00	1.25	1.14	1.39	1.71	1.00	1.15	1.24	1.77	2.17
NSSNYRNYNSPYRSGTLGRR	AIR2	S	337	1.00	2.65	2.88	3.82	3.70	1.00	1.60	2.22	3.26	4.09
__MSITNGTSRSVSAMGHPAVERYTPG	AKL1	S	10	1.00	1.75	1.82	1.67	1.81	1.00	1.19	1.53	1.46	1.36
SPHASTAITENKRHSTGHSTSRNGKHETH	AKL1	T	1012	1.00	6.11	4.83	4.39	3.41	1.00	1.77	2.76	2.58	2.26
QRHDLERYRHSKDKDSNSITISTSTPSEM	AKL1	S	1048	1.00	1.80	2.21	2.61	2.39	1.00	1.18	1.43	1.37	1.94
ASSASSGGNGKRRSFFSVRSEK	AKL1	S	1099	1.00	1.60	1.16	1.34	1.17	1.00	1.23	1.30	1.41	1.29
SELDTYLDKELVQSSDPITSEQSPRLNTQS	AKL1	S	496	1.00	1.34	1.26	1.60	1.15	1.00	1.08	1.34	1.49	1.62
GRSMKSTSYGAATIGSDEALANEKTAGINKM	AKL1	S	541	1.00	3.14	3.11	4.21	2.92	1.00	1.63	2.05	1.71	1.56
ANEKTAGINKMKQHKSNNPFPKMNVAYHSTN	AKL1	S	561	1.00	2.00	2.06	3.33	3.80	1.00	1.73	1.99	2.53	2.70
KSNPFPKMNVAYHSTNELSDNASFFLEEQ	AKL1	T	575	1.00	1.80	1.72	2.03	1.63	1.00	1.17	1.23	1.28	1.32
DQPKGPANYSQRNFYTGDRDSNPKPMQLGGTI	AKL1	T	643	1.00	2.97	2.45	3.69	4.30	1.00	1.72	1.99	1.72	2.11
QPRQSLDLNFQEVNLSPTLTQEHNRKNNDSP	AKL1	S	971	1.00	2.55	2.25	2.59	2.17	1.00	2.01	2.20	2.28	2.10
ESQNSTAVTLQNASSPASITRRLTKKRAK	ALB1	S	80	1.00	1.19	2.01	1.07	0.99	1.00	3.18	4.28	3.92	1.99
GSAEDESQSFSTSDSPTSKTRPVGKTIEND	ALK2	S	70	1.00	2.47	1.96	2.39	2.30	1.00	1.47	1.58	1.62	1.57
ASSGNKSLASASSASPIKVRKSSLVSPVL	ALR1	S	176	1.00	1.55	1.04	1.12	1.15	1.00	0.75	0.70	0.61	0.65
EDEHEKIPSLHPGISFGKNNVEGEENENIP	ALR1	S	383	1.00	2.62	2.30	2.27	2.15	1.00	1.79	2.04	1.82	1.77
EQKATRYNSHVQDVSVPSSRGRMDFEDEGGQ	ALR1	S	85	1.00	1.90	1.70	1.90	1.82	1.00	1.59	1.53	1.61	1.55
PASARSFDYSYGINISKDLNMEPLLSKTE	ALY2	S	900	1.00	2.41	1.99	1.92	1.40	1.00	1.80	1.50	1.54	1.42
QATQRLNDLSLEPAPSHDEQDQSGGLVIDIQ	AMD1	S	19	1.00	1.32	1.52	2.47	2.53	1.00	0.89	1.00	1.19	1.64
RKSSNNPSSKSRPKTLRKLKMKRPF	APL1	S	687	1.00	2.14	2.04	1.83	1.51	1.00	0.97	1.41	1.05	0.75
__MVDSIHRIASALDTAKVITREAAAV	APL6	S	10	1.00	0.95	1.19	1.47	1.83	1.00	0.79	0.99	1.06	1.07
SSNAKLTGINDGDSNISGKGNVNTFTSQNG	APL6	S	726	1.00	2.12	1.98	1.71	1.68	1.00	1.89	2.01	1.67	1.38
DELSAEGRQARRFTFRKIVY	ARC35	T	336	1.00	1.90	3.25	2.75	2.54	1.00	1.04	2.32	2.07	1.55
EKELMAMRKNLHHRKSSPDVAVSVDGNDGAA	ARE2	S	175	1.00	1.75	1.92	1.73	2.12	1.00	1.26	1.70	1.71	1.76
DESYGDVDELKTRSLGSYSTRGNKIKNQS	ARK1	S	478	1.00	0.98	1.40	1.99	1.90	1.00	0.92	1.27	1.71	1.81
NIKKNQSVKESLSSLPSTFTPTKVN	ARK1	S	502	1.00	1.67	1.89	2.14	2.31	1.00	1.49	1.90	2.42	2.94
GGGRASARETIGRVASGAIKFLAQNSNVE	ARO2	S	135	1.00	0.93	1.35	1.27	1.32	1.00	1.37	1.78	2.08	1.91
DTSGNAIFLSKRLSSPVFNKIIRKTHSSH	ART5	S	159	1.00	1.63	2.32	2.07	1.90	1.00	1.43	2.50	1.99	1.60
LDAQLFQKPLNYPSE	ASG1	S	963	1.00	1.76	1.45	1.77	1.54	1.00	1.27	1.31	1.40	1.57

NSQPRLPLLDRLSSVLSKRPQPQLPSL	ASH1	S	151	1.00	1.38	1.60	2.03	2.16	1.00	1.69	1.52	2.43	3.25
TINRESPYQLTKKTNSTGNVPLCTAEKTHAH	ASK10	S	1045	1.00	2.14	1.86	2.14	1.78	1.00	1.97	2.04	2.12	2.21
INRESPYQLTKKTNSTGNVPLCTAEKTHAH	ASK10	T	1046	1.00	2.05	1.81	2.01	1.66	1.00	1.78	1.93	1.90	1.90
EKTHAHAFYKRGNNNSAQNLTSSTASRVH	ASK10	S	1070	1.00	2.14	1.69	2.07	1.74	1.00	1.22	1.60	1.44	1.45
KGRAEKQYIHIQNNSLADFDGNGFRSKVNT	ASK10	S	793	1.00	1.93	1.46	1.77	1.44	1.00	1.06	1.09	0.95	0.92
RTSSSSVNVMTAMRSTAGNSITANAPVVPKV	ASK10	S	985	1.00	1.24	1.25	1.63	1.48	1.00	0.90	0.99	0.93	0.81
GQADDNNEGPEDEESTKEVPKGTIHFSTN	ASK1	T	276	1.00	1.44	1.16	0.77	0.46	1.00	1.76	1.11	0.84	0.62
TQQQRQIPDRRSLSPCTTRANSFEPQSWQK	ATG13	S	348	1.00	2.33	2.04	1.80	1.57	1.00	1.96	2.14	1.73	1.71
LSLSPCTTRANSFEPQSWQKVPISRPVQPF	ATG13	S	360	1.00	1.71	1.48	1.58	1.47	1.00	1.14	1.12	0.99	1.08
EKVSQVAVKPLQPEQSEDLMDFVKLLEKFP	ATG13	S	461	1.00	1.92	1.68	1.98	1.55	1.00	1.37	1.42	1.27	1.24
LKTELQATSVLNRSDAFYQYKNGTAASE	ATP15	T	41	1.00	3.48	3.38	3.36	2.78	1.00	2.48	2.44	2.82	3.12
QTASVLRNSQDAFYQYKNGTAASEPTPIT	ATP15	T	46	1.00	5.79	5.78	6.63	5.41	1.00	4.50	4.28	5.44	6.18
___MLRSIIGKSASRSLNFVAKRSYEAEEAAA	ATP16	S	13	1.00	2.34	3.06	3.75	4.50	1.00	2.55	2.46	4.53	6.20
_____MIFKRAVSTLIPKVVSSKNIGS	ATP17	S	8	1.00	1.92	1.85	1.99	2.18	1.00	1.55	1.65	1.83	2.38
_____MLSRVSNNTATRSVMCHQAQVQ	ATP3	S	7	1.00	0.74	0.88	0.74	0.81	1.00	1.51	1.48	1.67	2.36
NDEARRQLLELQSQPTEVDFSHYRSVLKNKTS	ATP7	T	52	1.00	1.65	1.56	1.63	1.89	1.00	1.30	1.54	1.41	1.73
YTNNRNSISILDDRESSNNGISASRLKSHF	AVO1	S	308	1.00	1.39	1.35	1.70	1.60	1.00	1.20	1.34	1.56	1.34
STASSEHMKAPKVSQVSLVLRARSTLTKQD	AVO1	S	588	1.00	3.51	2.79	3.35	3.39	1.00	1.32	1.80	1.57	1.57
VNSLRFATSLRRANSFRNIELNADNERSFF	AVT1	S	77	1.00	2.03	2.16	3.03	2.75	1.00	0.94	1.49	1.43	1.58
NSNGNSRSTRSRKSSGTGGLLKPPLLVN	AVT3	S	59	1.00	1.95	1.67	1.69	1.42	1.00	2.03	1.59	1.82	1.76
PESPFDPQNRSSVYMDSEPAVNSKWRVTG	AXL2	Y	655	1.00	1.42	1.28	1.36	1.33	1.00	1.81	2.13	1.96	2.18
PFDPQNRSSVYMDSEPAVNSKWRVTGNLS	AXL2	S	658	1.00	2.48	2.17	1.92	1.66	1.00	1.91	1.85	1.69	1.64
VYMDSEPAVNSKWRVTGNLSVSDIVRDSYG	AXL2	T	669	1.00	1.63	1.82	1.69	1.41	1.00	1.30	1.36	1.41	1.37
PWNSNISPSPVKSVTPSPYVNTKXNRHLQ	AXL2	T	732	1.00	2.03	2.03	3.26	3.14	1.00	1.03	1.37	1.74	2.37
DRRSPKRLVDFSNKSNVNVGVQKDIHGRI	AXL2	S	805	1.00	2.58	2.63	2.92	2.68	1.00	2.48	2.55	2.87	2.88
NGLVHRFVDSFRRAESQRLLEEDNDLEGGTS	BAP3	S	64	1.00	1.95	3.03	3.47	3.45	1.00	1.69	3.40	4.03	4.02
ERKVPMDSPKLRKLSMFNQDITEQVPLPKS	BBC1	S	166	1.00	3.54	2.97	4.13	3.47	1.00	2.22	2.31	2.63	2.69
SPKLRKLSMFNQDITEQVPLPKSHTLDEEN	BBC1	T	173	1.00	2.17	1.94	2.43	1.91	1.00	1.31	1.46	1.47	1.52
DAPKYVPPGIPITNDTNSLERKSLKENEKK	BBC1	T	213	1.00	2.46	2.18	2.38	2.38	1.00	1.26	1.62	1.49	1.63
PEPINRAQVESGRIETENDQLKDLQPMSLK	BBC1	T	246	1.00	7.87	5.93	5.95	4.59	1.00	3.42	4.32	4.41	5.74
FVDPSSNPFRRKSNLSEKNQPTETKTLDPH	BBC1	S	497	1.00	3.28	2.71	5.72	5.09	1.00	2.25	1.61	2.99	4.35
RVARNGSINSLTSGENRRKSIYEHDTV	BBC1	S	640	1.00	1.31	1.31	1.99	2.03	1.00	0.73	1.09	1.34	1.60
TASTPSSMSTQQRVPTSVLSGAEKESRTLPP	BBC1	T	850	1.00	4.29	4.76	4.30	4.28	1.00	1.92	2.87	2.80	2.26
SPSSPPPPIKATNRSELEVIDEDTPKISS	BCK1	S	491	1.00	1.37	1.40	1.42	1.10	1.00	1.41	1.49	1.41	1.36
SFDEHAGSGRRYPTQPSYYDRVSNTPNTE	BCK1	T	707	1.00	2.31	2.22	2.81	2.50	1.00	1.69	2.16	2.00	2.37
SGIDASLTTKRSYNSFLKHNRNGKTPFSG	BCK2	S	190	1.00	2.46	2.49	2.96	3.35	1.00	3.98	3.46	4.17	4.21
YSRIRVASPGRARSATRGSSLYLRDLNSL	BCK2	T	432	1.00	4.22	3.53	3.81	3.49	1.00	1.51	1.46	1.93	2.35
VNEIFLDGQPQHKSQVKGHRKQESISIDA	BCK2	S	477	1.00	5.39	4.62	8.32	3.37	1.00	3.02	2.06	2.95	3.60
ESNNTGNRVSYSGSTPNVVDTKTNLQVYT	BCK2	T	718	1.00	1.24	1.19	1.19	1.01	1.00	2.13	1.52	2.01	2.07
EQSKLLGEMGHNSNNSAINMNEPKSADTY	BCK2	S	761	1.00	2.06	1.55	1.48	1.10	1.00	1.47	1.15	1.01	0.97
YSRNRSEFYGNDGSSLLKNDSSSTATNBS	BEM2	S	283	1.00	2.29	1.88	2.23	1.61	1.00	1.40	1.59	1.31	1.25
RKLSLEDKPRKQPRSMMLKPKRKLNSVTV	BFA1	S	150	1.00	1.37	1.39	0.98	0.80	1.00	1.48	1.74	1.29	0.66
DKESADHPRLFKSSSPLKISPAQYDVK	BFA1	S	267	1.00	1.64	2.29	1.81	1.58	1.00	1.35	2.04	1.85	1.27
EINLPVPGKSMKRSSPFLRSKQVNTFPV	BFA1	S	243	1.00	1.35	2.00	1.33	1.20	1.00	1.02	1.70	1.59	1.04
SQIRQIRADFDNFKSFRALDKRKLKREEE	BFR1	S	451	1.00	1.13	2.25	3.74	3.57	1.00	1.56	1.77	2.15	2.24
DKKLDLTVLQKIDTEIGLIRKQIDQHQVY	BFR1	T	32	1.00	3.56	5.78	6.44	8.75	1.00	2.51	5.16	6.41	4.93
NKEIIKQADLKTRRNSIHDSIQDLAQJRK	BFR1	S	76	1.00	1.19	1.68	1.53	2.46	1.00	1.02	1.63	1.59	1.88
ECSNNLSKLLSSDAISITQKSLHSTPSGRYM	BIT61	S	144	1.00	2.02	1.70	1.71	1.69	1.00	1.14	1.26	1.19	1.28
LSQLKRFERSPGRPSSSQGEIKRKSRLVAA	BLM10	S	35	1.00	1.29	2.00	1.96	1.47	1.00	1.29	1.74	1.81	1.64
AADGRPHSLRARATPTLQDQKLFNGMDST	BLM10	T	64	1.00	1.49	1.39	1.06	0.83	1.00	0.84	1.14	0.66	0.51
RKERLKLAKMEEKSQRDKEKKEKYFAQNG	BMS1	S	1150	1.00	1.09	1.94	3.12	4.36	1.00	0.59	1.70	2.57	3.23
NAYLPEFEPNRPVMSFKGLKAPRMNTSFID	BN14	S	788	1.00	1.40	1.50	1.25	1.00	1.00	1.97	1.66	1.74	1.42
SENCPRNCGGTPLDSTQKIFIPKKSKEGG	BN15	S	278	1.00	1.82	2.05	1.28	0.53	1.00	2.30	1.99	2.26	1.69
KKNSKEDGTNIHFNSDGGQKMANFETR	BN15	S	301	1.00	1.36	1.75	2.00	2.50	1.00	1.09	1.34	2.03	1.86
GDGQKMANFETRPTNPFVSVSSNSNR	BN15	T	318	1.00	2.04	2.54	3.26	3.15	1.00	2.37	2.56	3.06	2.77
FETRPTNPFVSVSSNSNRNGSRKSLN	BN15	S	327	1.00	1.48	1.74	2.35	2.78	1.00	1.42	1.43	2.32	3.50
ETRPTNPFVSVSSNSNRNGSRKSLNK	BN15	S	328	1.00	1.21	1.22	1.45	1.61	1.00	0.93	1.26	1.48	1.98
NSRNGSRKSLNKYDVPSPSITASELGS	BN15	S	346	1.00	2.15	2.02	1.58	1.31	1.00	2.64	2.85	2.83	2.37
GSRKSLLNKYDVPSPSITASELGSIAKLE	BN15	S	350	1.00	1.97	2.21	1.86	2.16	1.00	2.14	2.12	2.43	2.14
NVKDTGVDAVAVATALFSGNDGADSNP	BN15	T	59	1.00	2.44	3.61	3.62	3.03	1.00	2.36	2.49	2.49	2.36
QESGNSGVKYGNLNDASNIGVSSHQENR	BO11	S	104	1.00	4.25	5.19	3.30	2.53	1.00	5.72	6.83	6.28	4.39
SGNSGVKYGNLNDASNIGVSSHQENRYT	BO11	S	106	1.00	3.26	4.24	2.54	2.01	1.00	4.72	4.33	4.16	3.04
EQEVSKSPTRVPEVSTPQLQDEQTLIQEKTR	BO11	T	158	1.00	1.59	2.17	2.41	2.69	1.00	1.10	1.79	2.27	2.59
SKSNIKSLPESSESVRQLDKLMAKSWSP	BO11	S	216	1.00	1.81	1.89	1.61	1.38	1.00	1.97	2.09	1.75	1.41
SRDASLEMKHRRNSILSFFSKSQSNPT	BO11	S	589	1.00	0.98	1.29	1.16	1.33	1.00	1.46	2.14	2.19	1.92
SLVTSPLKTSPLNSKSNIAHAHSETPTSS	BO11	S	659	1.00	1.35	1.51	1.43	1.11	1.00	1.97	2.18	1.76	1.20
SEEKSKLFSSTKESFVGSKEFKRSPSELT	BO11	S	725	1.00	2.15	3.19	2.27	1.96	1.00	3.15	3.78	3.64	2.47
SKKLFSTKESFVGSKEFKRSPSELTQKST	BO11	S	729	1.00	1.78	2.43	2.00	1.64	1.00	2.12	2.38	2.22	1.55
TKESFVGSKEFKRSPSELTQKSTKSLPRSN	BO11	S	737	1.00	1.39	1.56	0.80	0.69	1.00	1.48	1.66	1.35	0.82
AIEKPENLHKSPTQESGNSGVKYGNLNDAS	BO11	S	91	1.00	2.05	3.29	2.85	2.37	1.00	2.30	4.12	4.53	3.22
ISSYATPTIPLSKAQLLEEARLQTLQDAE	BO11	T	919	1.00	1.74	2.31	1.65	1.50	1.00	1.49	2.09	1.96	1.32
SLRQMTARPAVAKKQTSAFIEGLRSISVKEA	BO12	T	750	1.00	4.16	7.34	4.02	3.50	1.00	4.68	6.61	5.81	4.02
DNISIKEEDVARRIPSGTKSQESPLNKP	BOP3	S	209	1.00	2.73	2.89	3.43	2.85	1.00	4.52	3.53	4.43	4.85
PTERKFEMGNRRDNASANKKPKVFTSVN	BRE5	S	398	1.00	2.20	3.16	2.24	3.29	1.00	1.76	3.49	3.66	3.12
TRPNKAEVTESSRSRIPDAVPERVKPAP	BSP1	S	225	1.00	1.44	1.84	3.42	4.90	1.00	1.63	1.52	2.40	3.04
SFLSLEDNKLTAKSYNSEMETPKTTVKSS	BSP1	S	265	1.00	1.76	1.89	2.02	1.42	1.00	1.21	1.28	1.63	1.68
DNKLTAKSYNSEMETPKTTVKSSHIDYLD	BSP1	T	272	1.00	2.80	2.63	3.05	2.87	1.00	1.73	1.67	1.94	1.94
PTPPSPAKRIPSEFISMLNSLNTTSS	BSP1	S	320	1.00	4.14	3.16	6.33	3.07	1.00	1.65	1.14	1.65	3.90
KLRSNRRNKKEEEDSIPPAIKIQLKKT	BSP1	S	408	1.00	1.14	1.39	1.41	1.40	1.00	1.38	1.24	1.22	2.00
LKTKQKQPAIPQKSLFNTNSKNTLKN	BSP1	S	434	1.00	4.39	5.37	6.00	4.75	1.00	5.78	7.88	10.08	10.82
NNLKRRTAPQKRLISLEALRVELMKKSK	BSP1	S	480	1.00	1.77	1.82	2.37	2.05	1.00	1.30	1.37	1.74	1.42
KVELMKKSKTEPVLESSNELSINAKLDAIA	BSP1	S	502	1.00	5.57	7.08	6.51	5.76	1.00	3.33	5.78	7.24	7.53
KLDAAIARNLRASNTLPELSEVNTNIATSD	BSP1	T	526	1.00	5.62	5.86	4.66	4.20	1.00	4.76	5.18	5.86	5.14
IASRNLRASNTLPELSEVNTNIATSDKYTTS	BSP1	S	531	1.00	5.88	7.83	7.88	5.57	1.00	4.97	5.35	6.71	6.30
AYNYEMTFSPKTHYSLELNERITPRPDL	BSP1	S	86	1.00	1.96	1.49	1.62	1.39	1.00	1.47	1.24	1.19	1.27
NYEMTFSPKTHYSLELNERITPRPDL	BSP1	S	88	1.00	1.87	1.57	1.71	1.69	1.00	1.53	1.44	1.35	1.57
RQKKEARLKARKESLQKTKRSQKQKL	BTN2	S	310	1.00	1.44	1.50	2.14	3.22	1.00	0.95	1.67	4.00	9.04
AQGHKIQEDSKIDSSFSRSKYDEKAERE	BUD13	S	141	1.00	1.79	2.25	2.13	2.09	1.00	1.78	1.94	2.38	2.31
NKTKKKKESKSDANSKDTSLIVKRLSTLQ	BUD13	S	33	1.00	1.31	1.36	1.57	1.65	1.00	1.26	1.21	1.59	1.91

MSNKEEHVDETSASGVK	BUD14	S	2	1.00	1.26	1.24	1.65	1.81	1.00	1.30	1.22	1.69	2.07
EHVDETSASGVKEVSSIAARHDNGYAPSLIT	BUD14	S	21	1.00	1.78	1.74	1.98	2.08	1.00	1.96	1.85	2.05	1.94
IIPTPALNGYGGKNGKSVSFNDVVGYADRFID	BUD14	S	376	1.00	1.52	1.41	1.79	1.36	1.00	1.54	1.20	1.27	1.34
PTPALNGYGGKNGKSVSFNDVVGYADRFIDDA	BUD14	S	378	1.00	1.40	1.33	1.40	1.35	1.00	1.74	1.53	1.58	1.50
NANRYVGOEKSEPVDSVDYDLDLKKVFEAPRM	BUD14	S	507	1.00	3.32	3.10	3.82	3.18	1.00	4.39	3.50	4.81	5.47
YMDEQRAVSSASINSSLSGRALSNTNMSDP	BUD14	S	662	1.00	2.14	1.64	1.37	1.08	1.00	2.02	1.68	1.56	1.61
PEKESNEALLKHLDSLTLANVKVTEPTLPWA	BUD20	S	129	1.00	2.04	2.66	2.74	1.96	1.00	2.65	3.08	5.60	5.73
MGRYSVKRYTKRRTRDLDL	BUD20	S	5	1.00	1.03	1.42	2.36	4.29	1.00	0.63	0.91	1.72	2.51
LPEELLKNIDQKDEGSTQYSSSRHVTFDKLDES	BUD21	S	127	1.00	1.11	1.20	1.24	1.37	1.00	1.36	1.38	1.83	2.04
KNIDQKDEGSTQYSSSRHVTFDKLDESDENE	BUD21	S	133	1.00	4.05	8.59	11.67	16.55	1.00	5.18	10.73	18.08	20.32
EGDVNKSLLPKLKSSFAENSDDKQKQKQVQ	BUD27	S	328	1.00	2.51	4.37	3.98	3.05	1.00	1.88	3.61	3.54	2.39
SSNKTVLGNAQKQVQESPLIYVLPQSSSTK	BUD3	S	1515	1.00	2.19	1.67	2.51	1.64	1.00	1.31	1.07	1.07	1.25
FLRKKQKDEPIVWVPSKIDFADLSRRTKALT	BUD3	S	1551	1.00	1.52	1.69	2.61	2.55	1.00	1.53	1.65	1.99	2.20
LKNNDSSRYKYTGEGSIGNMTNMLLTKDASY	BUD3	S	1589	1.00	2.32	1.92	2.46	1.99	1.00	1.70	1.62	1.73	1.93
SRKYKYTGEGSIGNMTNMLLTKDASYAYLKD	BUD3	T	1594	1.00	1.69	1.60	2.02	1.51	1.00	1.59	1.39	1.45	1.63
NFKDGEYRIVQHEESLQRTKSPENIIN	BUD4	S	494	1.00	1.79	1.70	2.66	2.80	1.00	1.17	1.31	1.44	1.64
YGQRTKSPENIINSEIGVDHGEAAENVEP	BUD4	S	511	1.00	1.55	1.67	2.12	2.02	1.00	1.44	1.65	1.70	1.88
MHDAESTVDSLKEIDNEMEQ	BUD4	S	6	1.00	1.79	1.38	1.82	1.49	1.00	1.22	1.05	1.10	1.08
MSEQSEDEVKRMKQLEE	BUG1	S	2	1.00	1.34	1.18	1.24	1.11	1.00	1.64	1.42	1.73	2.08
IGSETPDLEGTPEESTQETVKANSTKSEN	BUG1	S	62	1.00	1.15	1.14	0.91	0.72	1.00	2.26	1.73	2.01	2.09
STKSENNDQNDVDEESEKEIEQVKSDPSGT	BUG1	S	87	1.00	0.64	0.75	0.81	0.50	1.00	1.82	1.01	1.49	1.94
STGTPAGGNRSLRRSTANATPVETGRSLTD	BUL1	S	106	1.00	3.18	2.64	2.52	2.02	1.00	2.36	3.12	2.72	2.66
TGTPAGGNRSLRRSTANATPVETGRSLTDG	BUL1	T	107	1.00	3.71	2.97	2.89	2.30	1.00	2.22	3.01	2.67	2.57
TSSRKNRPLKSVSTEDNIHLKRRRQOQL	BUL2	T	22	1.00	3.43	2.97	3.33	2.86	1.00	2.14	2.46	2.22	2.11
TPRASDSQDDIRASSTNLDLRQEREENS	BUL2	S	68	1.00	1.26	1.34	2.22	2.36	1.00	1.17	1.19	1.33	1.62
ITITPGDKISLVARDTGSWGWTINNDTTGET	BZZ1	T	527	1.00	1.30	1.69	1.74	2.18	1.00	1.50	1.83	2.85	3.83
ANDRGPAPEVPPRRSTLPVRTMEIAYEAE	BZZ1	S	575	1.00	3.35	4.46	3.75	2.93	1.00	1.56	1.95	2.11	1.97
GTDIRKXSVSSGTSNEDEVDSPSMEKNSIV	CAB3	S	233	1.00	1.17	1.09	0.99	0.86	1.00	1.77	3.20	2.93	3.06
RNIYKNDYSTNLRDFSFAHLKQNSERNKDGH	CAB3	S	81	1.00	2.72	3.64	5.35	7.59	1.00	1.33	1.60	2.03	2.49
GRPKIKHNKPKVTTDSGWCTFEAKKKGSGE	CAF20	S	78	1.00	1.23	1.64	1.68	1.83	1.00	1.22	1.89	1.81	1.45
FVGKLMKEDSTTGGSSVMIDGVKAKRADLV	CAR1	S	80	1.00	0.97	1.30	1.19	1.22	1.00	1.58	1.68	1.94	1.99
VGKLMKEDSTTGGSSVMIDGVKAKRADLVG	CAR1	S	81	1.00	0.93	1.26	1.39	1.42	1.00	1.79	1.91	2.22	2.35
PSNEGVPNTSLEGMTSSPMESTQKSKNDML	CBF1	T	154	1.00	0.57	0.63	0.36	0.32	1.00	1.61	1.42	1.46	0.93
SHENLSRPLKSLKTASFGAAESSRRNVSPST	CCH1	S	110	1.00	1.18	1.56	2.39	2.66	1.00	0.94	1.14	1.35	1.80
KTASFGAAESSRRNVSPSTKSAKSSQYIDL	CCH1	S	122	1.00	0.89	0.93	1.81	1.70	1.00	0.45	0.66	0.61	0.68
RARQLIALKENANSRSSAHMSSNAIQR	CDC10	S	311	1.00	1.62	1.47	1.44	1.33	1.00	0.44	0.88	0.67	0.67
MIRRAPTLQLSHDDVTSLDDLDNEQK	CDC26	S	12	1.00	1.58	1.50	1.46	1.45	1.00	1.93	1.58	1.86	2.02
QQKVESEKELKQSETELFARHKEMKELTK	CDC3	T	468	1.00	2.90	3.80	2.42	2.72	1.00	1.56	2.86	2.13	1.48
RFFTSMKNKPTGETPSPKSSKHMLEDMDN	CDC9	S	58	1.00	1.48	1.52	1.71	1.51	1.00	0.95	1.29	1.05	1.02
YLCGITFGKTLIEISPKKLEGLGAWFFT	CDS1	S	248	1.00	1.27	1.40	1.82	2.41	1.00	1.47	1.55	1.70	1.67
QNSTLAKSIAPSSRLKIKKTTILAPRNA	CEX1	S	696	1.00	1.46	1.87	3.11	3.59	1.00	0.99	1.33	1.55	1.89
MVNETGESQAAKGTTPVSGKVVVK	CGR1	S	8	1.00	1.35	1.84	2.35	3.56	1.00	1.40	2.15	3.10	3.38
EPSYELQNAHSGLFHSSNEELTNRNQRYTNQ	CHS1	S	34	1.00	1.18	1.05	1.64	1.28	1.00	1.30	0.98	1.23	1.49
SNDNLNANRALKRSGETIRKFKLWNGNFVFD	CHS1	T	373	1.00	0.98	1.21	1.88	2.18	1.00	0.43	0.58	0.80	0.98
MSDEAKEKRELESQKESHNKSEKSVPEP	CHZ1	S	13	1.00	2.82	2.76	4.12	5.09	1.00	1.78	1.84	2.75	3.26
MGRSENVGTVREGSRV	CKB2	S	3	1.00	1.55	1.38	1.47	2.02	1.00	1.02	1.76	1.31	1.48
MVQESRPGSVRSVYVQYARSSRSSQRRH	CK1	S	14	1.00	2.68	2.71	2.41	1.78	1.00	2.43	3.28	2.82	2.40
RPHHNMINPYSKQPQSPSSQSTQNAQAI	CLA4	S	425	1.00	2.46	2.57	3.11	2.42	1.00	0.36	0.44	0.46	0.61
RQYAKKKQESDNDANSK	CMC2	S	108	1.00	1.32	1.49	1.43	2.12	1.00	2.69	3.13	3.59	2.94
NGDGLISAAELKHVLTSIGELTDAEVDML	CMD1	T	111	1.00	3.83	5.94	5.39	5.97	1.00	2.26	3.06	4.85	4.29
EEEDSSKTLHDDRESKED	CMK2	S	443	1.00	1.96	2.70	2.46	2.23	1.00	1.76	2.21	2.08	1.84
WDDQREKGFAGDINS	COX12	S	82	1.00	1.31	1.24	1.55	1.85	1.00	1.29	1.27	1.61	2.43
VVDGYDIVKVESLSPSGATKARIVVAKSG	CPR1	S	145	1.00	1.39	1.15	1.45	2.02	1.00	1.26	1.22	1.54	2.17
GSPSGATKARIVVAKSGEL	CPR1	S	159	1.00	2.12	3.47	9.35	12.08	1.00	1.99	2.69	10.41	30.51
FRALCTGEGFGYAGSPFHRVIPDFMLQGGD	CPR1	S	49	1.00	1.99	2.29	3.80	6.19	1.00	1.93	2.72	4.87	9.58
LQGGDFTAGNTGGKSIYGGKFPDENFKKH	CPR1	S	75	1.00	2.22	2.83	4.67	6.06	1.00	2.67	3.23	5.53	9.43
MFKRSIIQQSRLFSNASRLLGKVF	CPR3	S	10	1.00	1.20	1.24	1.49	1.58	1.00	1.01	1.39	1.29	1.57
MFKRSIIQQSRLFSNASRLL	CPR3	S	5	1.00	1.48	1.45	1.76	2.05	1.00	1.24	1.28	1.78	2.68
PKLPLTDEQTAEGRKSAPVSEKELKQKQK	CRP1	S	390	1.00	0.70	0.93	1.02	1.56	1.00	1.36	1.25	1.42	1.29
KKQKQKSEKVRSETSEKKEKPSAVEKQQT	CRP1	T	415	1.00	1.53	3.10	2.18	2.95	1.00	1.17	1.14	1.77	1.70
IINGRKLKLSRRSSQTSNNSFTSRSSRS	CRZ1	S	409	1.00	1.86	1.45	1.45	1.05	1.00	2.43	2.28	2.52	2.44
IINGRKLKLSRRSSQTSNNSFTSRSSRS	CRZ1	S	410	1.00	1.29	1.03	0.86	0.59	1.00	2.76	2.37	2.70	2.27
KKSRSSQTSNNSFTSRSSRSRSPDEK	CRZ1	T	418	1.00	1.72	1.50	1.75	1.54	1.00	3.92	2.99	2.91	2.42
KKSRSSQTSNNSFTSRSSRSRSPDEKA	CRZ1	S	419	1.00	1.58	1.32	1.69	1.33	1.00	5.03	4.16	4.66	3.89
TSNNSFTSRSSRSRSPDEKAKSISANRE	CRZ1	S	427	1.00	2.34	2.42	3.35	3.26	1.00	4.28	4.07	7.21	10.06
ETLTGSIRHLKCKLSIENEDTKDLLSKS	CSE2	S	103	1.00	2.63	2.72	2.61	2.10	1.00	2.18	2.06	2.09	2.20
KKVINPTKDSALGDQSVIYKSSQQRNFVNAP	CST6	S	344	1.00	1.55	2.33	2.00	1.97	1.00	2.06	2.18	2.33	1.89
NFVNAPSKNTPAESISDLEGMTFFATPTTGG	CST6	S	369	1.00	0.55	0.84	0.83	0.72	1.00	1.52	1.40	1.94	1.81
ENRGSALRESHNSPFTPKSGSHLNLAN	CST6	S	399	1.00	1.39	1.36	1.13	1.28	1.00	1.87	1.60	1.92	1.53
ESKVAISENNQKKTPTQEGCNCATDSGKNQ	CTR1	T	358	1.00	0.97	0.97	1.10	1.60	1.00	0.97	1.31	1.69	2.02
PSAPEERVARLNRHGSDRKRAVNSDMVEIVM	CUE4	S	68	1.00	3.42	4.49	4.57	4.51	1.00	1.84	2.81	2.91	3.11
QPVRKNPEAPARRRQLTEQDELLARQLDEQ	CUE5	T	167	1.00	4.28	4.65	5.52	4.79	1.00	2.43	3.02	3.58	3.94
QDELLARQLDEQFNSSSHRRNRDRATRSMH	CUE5	S	186	1.00	1.43	1.31	1.48	1.89	1.00	1.07	1.15	1.51	2.24
ELLARQLDEQFNSSSHRRNRDRATRSMH	CUE5	S	188	1.00	1.16	1.13	1.45	2.11	1.00	1.06	1.06	1.67	2.58
EDVPPQLPTRTKSGESTGKVAETTYIDPT	CUE5	S	351	1.00	1.42	1.32	1.63	1.23	1.00	1.46	1.05	1.68	2.37
EKVNKSSGIDEDEVVTPAEDAKEEEEEHPP	CUE5	T	70	1.00	1.10	1.12	1.31	1.38	1.00	1.41	1.16	1.50	1.80
FNGPEPIKRLKAKSEGEVEIDYNDDES	CUS2	S	163	1.00	2.04	3.64	3.70	4.31	1.00	0.96	3.25	4.17	2.33
SNDEAYFSLPERASVRIQVSETREPLRG	CUZ1	S	90	1.00	1.85	2.46	2.35	2.30	1.00	1.63	2.38	2.43	1.99
RPQLEARSGAKAAAYPTPTGIEHARLLPGHT	CWC15	T	21	1.00	1.61	1.60	1.90	2.60	1.00	1.24	1.24	1.24	1.44
YTPTGIEHARLLPGHTTKYRKFEEENLRA	CWC15	T	35	1.00	3.83	4.88	6.11	6.25	1.00	2.00	3.27	3.74	3.94
LTNEWQEQQRMSLYTPRKARLTEEQRHE	CWC21	T	121	1.00	2.20	2.25	2.08	2.02	1.00	1.30	1.47	1.33	1.29
SSDEKNQKQRKQNFSEELKVASDEEKSSSD	CWC24	S	26	1.00	2.84	3.07	4.70	6.22	1.00	2.31	2.49	4.39	5.05
LGKKKLDSSILNQPATPPVRAAATISSASGAA	CWC25	T	109	1.00	2.55	2.47	2.56	2.13	1.00	1.70	2.02	2.11	2.08
LNQPATPPVRAAATISSASGAAATISSQKQK	CWC25	S	119	1.00	3.92	3.88	5.95	9.32	1.00	3.11	6.88	9.38	10.79
NTSQEKPVKANSIPVIGAQEPPEQASPAE	CYC8	S	793	1.00	1.58	1.56	1.74	1.37	1.00	1.32	1.15	1.13	1.23
QRSQANANGCSTKINDSQEFQDSNASSRNGM	CYK3	S	313	1.00	2.40	1.75	1.66	2.56	1.00	2.10	2.30	2.42	2.34
NHLADNVPSTLRRKVSLSVGRSSVHDIINGI	CYR1	S	234	1.00	5.02	4.85	6.79	5.34	1.00	2.37	3.39	3.58	3.77
PSTLRRKVSLSVGRSSVHDIINGIADKQIRP	CYR1	S	241	1.00	4.52	3.67	5.37	4.59	1.00	2.10	2.39	2.45	2.96
IETPISCKPSFLRLDNLLEDVTDITKTVPPT	CYR1	T	389	1.00	2.42	1.82	1.56	0.68	1.00	1.80	1.88	1.68	1.62

SPKTVMPEGPRKSVSMADLSVAAAAPNGEF	CYR1	S	435	1.00	3.16	2.16	3.20	2.32	1.00	1.60	1.33	1.42	1.67
KSVNRLKSNLAMSPPSIRYAPSNLDGDYDTS	CYR1	S	562	1.00	1.43	1.65	2.18	2.15	1.00	1.42	1.91	1.92	2.12
NSGHKSRNSAYSYYSPRSLMTKRESITP	CYR1	S	66	1.00	2.51	1.98	2.11	2.56	1.00	1.67	1.88	1.84	2.43
LGAEIIRTPAAAWDSPEFHIGVAKKEKEI	CYS4	S	134	1.00	0.78	0.91	0.88	1.15	1.00	1.51	1.32	1.51	1.45
DLSQSRVSTIPRTNSDRNWYIPSEKQFYEA	CYT2	S	74	1.00	1.25	1.27	1.33	1.37	1.00	1.19	1.19	1.47	1.69
LGTTTSATVEYRLSISAPTSRRSSMGESSSL	DAM1	S	23	1.00	1.71	1.84	1.35	1.14	1.00	1.25	1.90	1.49	1.03
REGRKPGRRRRQDTGGKETDGSQQDQESR	DAT1	T	39	1.00	3.95	3.78	6.03	7.73	1.00	1.91	1.69	2.52	3.66
PGSGRRRRQDTGGKETDGSQQDQESRLISSR	DAT1	T	44	1.00	2.81	2.29	3.24	3.22	1.00	2.42	2.01	3.06	3.61
GRRRRQDTGGKETDGSQQDQESRLISSRDM	DAT1	S	47	1.00	2.31	2.21	2.15	2.00	1.00	2.46	2.73	3.69	3.73
ADSKVHNDIKITTESPTASKKSTNTVTLH	DBF4	S	623	1.00	1.67	1.72	1.97	2.19	1.00	1.08	1.15	1.14	1.11
ADIQADPNPLYSAKSFDELGLAPPELLKIY	DBP5	S	93	1.00	3.05	3.25	2.85	2.46	1.00	2.44	2.77	2.75	2.37
VQSSKPKLILQRGTDLNSIKQNNNDETAH	DCP2	T	471	1.00	3.95	4.76	6.59	6.42	1.00	2.09	3.36	2.92	3.11
NDASKTNLNASAESNSVEWGPKSSPTQSK	DCP2	S	589	1.00	2.29	2.66	3.92	4.16	1.00	2.01	2.74	3.25	3.63
TVKKVPVKILKRGETFASLANDKKAFFDSS	DCP2	T	710	1.00	5.59	4.71	4.72	3.15	1.00	3.05	3.37	3.35	3.14
INEPNFVRSNGTSGSNELLSILHRK	DCP2	S	960	1.00	1.38	1.57	3.22	4.06	1.00	1.43	1.91	2.44	3.70
LDFKFECHKRHRKLYSVEAKQNLIDAKRPE	DDP1	S	158	1.00	1.94	1.72	1.79	1.78	1.00	1.32	1.30	1.53	1.52
DDSYGSSNKNKSSYGNNDSDSYGSSNDDSYG	DDR48	S	183	1.00	1.51	1.21	1.31	1.40	1.00	1.22	1.20	1.36	1.66
SSNKNKSSYGNNDSDSYGSSNDDSYGSSNKK	DDR48	S	188	1.00	3.64	2.26	3.22	4.21	1.00	1.10	1.83	2.37	3.15
SNKNKSSYGNNDSDSYGSSNDDSYGSSNKKK	DDR48	Y	189	1.00	3.14	2.20	3.46	3.55	1.00	1.41	1.71	2.08	2.61
KNKSSYGNNDSDSYGSSNDDSYGSSNKKKSS	DDR48	S	191	1.00	1.22	0.95	1.08	1.20	1.00	1.30	1.15	1.28	1.60
NNDDSYGSSNDDSYGSSNKKKSSYGSSNDD	DDR48	S	199	1.00	1.77	1.45	1.61	1.82	1.00	1.22	1.23	1.46	1.69
DKVKQFANSNNNDSDSYGSSNDDSYGSSNKK	DDR48	S	20	1.00	1.19	1.30	1.35	1.46	1.00	1.29	1.28	1.73	2.11
SNKNKSSYGNNDSDSYGSSNDDSYGSSNKK	DDR48	S	292	1.00	12.20	6.38	12.73	15.64	1.00	0.83	2.31	2.87	4.04
NKSSYGNNDSDSYGSSNDDSYGSSNKKKSS	DDR48	S	295	1.00	7.69	4.08	7.43	9.71	1.00	1.37	3.54	4.07	5.76
SNKKKSSYGNNDSDSYGSSNDDSYGSSNKKK	DDR48	Y	346	1.00	3.01	1.83	3.13	3.61	1.00	1.20	1.40	1.77	2.34
DDSYGSSNRRNKNKSSYGNNDSDSYGSSNKK	DDR48	S	401	1.00	5.61	4.38	8.42	8.83	1.00	1.41	3.23	3.33	3.88
DSYGSSNRRNKNKSSYGNNDSDSYGSSNKK	DDR48	S	402	1.00	1.65	1.49	2.09	2.36	1.00	0.97	1.15	1.50	1.79
YGSSNRRNKNKSSYGNNDSDSYGSSNRRG	DDR48	Y	404	1.00	1.69	1.48	2.05	2.10	1.00	1.06	1.27	1.64	1.91
SSNYGSSNDDSDSYGSSNRRGRNQYGGDDDY	DDR48	S	416	1.00	1.71	1.67	2.39	2.86	1.00	1.63	1.48	2.05	2.97
QFKSKIGEDRFDKMESKVRQFNTSINDND	DDR48	S	58	1.00	1.30	1.58	1.81	1.70	1.00	1.85	1.57	1.94	1.99
ESFKTGSPQPEQSFYQKAYPTAVIMAP	DED1	S	218	1.00	1.98	2.81	3.19	3.71	1.00	1.69	2.39	2.73	3.20
EANQEVPSFLKAMMSAPGSRNSRRGGFGR	DED1	S	535	1.00	1.96	2.23	1.57	1.07	1.00	2.36	2.54	1.68	1.10
EVPSFLKAMMSAPGSRNSRRGGFGRNNNR	DED1	S	539	1.00	1.62	1.54	0.99	0.85	1.00	1.94	2.02	1.44	1.13
RDYRKAGGASAGGWSRSRDNFRGGSGWG	DED1	S	569	1.00	1.67	1.81	1.15	1.08	1.00	2.29	2.84	2.21	2.01
RKAGGASAGGWSRSRDNFRGGSGWGSDS	DED1	S	572	1.00	2.66	3.45	2.38	1.74	1.00	2.76	3.39	3.07	2.23
GASAGGWSRSRDNFRGGSGWGSDSKSSG	DED1	S	576	1.00	2.43	3.16	2.68	2.39	1.00	2.06	3.11	2.95	2.40
LPNPEDDITYKSSNNSFTSTKHNSNNYVT	DEF1	S	108	1.00	0.77	1.06	1.21	1.93	1.00	1.15	1.47	2.18	2.30
KSSNNSFTSTKHNSNNYVTQARNKKKQVT	DEF1	S	118	1.00	1.20	2.12	2.23	3.11	1.00	1.04	1.61	2.33	2.63
__MGSINNNFNNTNNSNTDLDRDWKALTALNIP	DHH1	S	14	1.00	1.86	2.80	3.43	2.99	1.00	1.34	2.16	2.13	1.97
RIQAVRSSDQMTRMSSEATGLLAGMNRMTMNL	DID4	S	107	1.00	1.47	1.69	1.48	1.32	1.00	1.55	1.56	1.70	1.88
__MSLFEVFGKNTVQPER	DID4	S	2	1.00	2.79	3.49	2.30	2.50	1.00	4.90	4.86	7.27	5.87
SASNYRNRKRVNDYDPSLGSASTGKTRRSE	DIG1	S	272	1.00	1.61	1.32	1.31	1.03	1.00	1.65	1.65	1.58	1.46
EEEGTDLAIEDGAVPTPTFTTQRTSQQPQQ	DIG1	T	379	1.00	2.14	1.40	1.36	1.06	1.00	1.37	1.23	1.10	1.05
SGISSLNTFGIRQNSQTASSAAPDQRLFG	DMA2	S	71	1.00	1.43	2.13	1.95	2.23	1.00	1.21	2.32	3.28	3.19
VLLSSKRRGLANWSRRSFFNVSSNNTSR	DOT6	S	318	1.00	1.96	1.98	1.74	1.27	1.00	1.74	1.55	1.29	1.25
SKSRRLGLANWSRRSFFNVSSNNTSRSSMI	DOT6	S	322	1.00	1.74	1.98	1.70	1.04	1.00	1.09	1.05	1.07	1.04
GLANWSRRSFFNVSSNNTSRSSMILAPNS	DOT6	S	327	1.00	2.41	1.58	1.33	0.94	1.00	1.83	1.36	1.09	1.08
NWSRRSFFNVSSNNTSRSSMILAPNSVNI	DOT6	S	331	1.00	3.11	2.43	1.81	1.11	1.00	1.73	1.29	1.18	0.91
LHRAKQSSNKTVFSSSSNISKDVSPDPPIF	DOT6	S	553	1.00	1.66	1.82	2.13	2.22	1.00	2.51	1.67	1.96	2.30
SSNISKDVSPDPPIFSPDPADDSNTSDAGS	DOT6	S	569	1.00	1.08	1.12	1.08	0.83	1.00	1.55	1.17	1.28	1.00
LQDVEESSEKQKTESQDVETRVQNLQEQ__	DPB4	S	183	1.00	1.05	0.93	0.93	0.91	1.00	1.44	1.11	1.50	1.94
VRGRYTSRPLRALHLEAADDSDSKQL	DPH2	T	449	1.00	6.04	8.55	9.26	7.27	1.00	2.00	3.19	2.37	2.28
KLQSGSKLPTFKKASSSTNLPSFKADHSR	DRE2	S	157	1.00	5.07	6.87	6.30	4.95	1.00	3.15	4.74	5.62	6.24
LQSGSKLPTFKKASSSTNLPSFKADHSRQ	DRE2	S	158	1.00	2.93	3.87	3.85	3.90	1.00	2.25	2.80	3.30	3.52
KKADHSRQPIVKETDSFKPPSFMTTEPKVY	DRE2	S	181	1.00	2.74	3.84	3.49	3.58	1.00	2.87	2.74	3.33	3.09
SRQPIVKETDSFKPPSFMTTEPKVYRVD	DRE2	S	186	1.00	1.14	1.51	1.38	1.31	1.00	2.47	2.00	2.39	2.17
LIDEDSGSKMITMITCGKSKTKKKKACDC	DRE2	T	251	1.00	1.69	1.82	1.66	1.47	1.00	2.01	2.00	1.88	1.78
CGMKEQEENEINDIRSQQDKVVKTEDELTE	DRE2	S	283	1.00	0.62	0.63	0.49	0.48	1.00	1.91	1.15	1.10	0.89
EIDFTIDGKVVGGCGSCSLGDFRCSGCPYL	DRE2	S	313	1.00	1.33	1.52	1.42	1.45	1.00	1.27	1.52	1.68	1.75
QARQMLQSPMFRQMLTNPDMIRQMQFARM	DSK2	T	205	1.00	1.96	2.00	2.48	2.19	1.00	1.35	1.54	1.59	1.83
QNLNAQGATIERSVTRDRFTCGCKEKKVSY	DST1	T	266	1.00	5.90	14.23	24.87	39.06	1.00	2.92	6.89	14.24	22.77
NGRVRKTHVPASKRPSGIPRVTRWTKPTAS	DUO1	S	225	1.00	1.35	0.87	0.73	0.76	1.00	1.81	1.45	1.30	1.14
LEMDKNLQGGDVGHSIADFEDWKKMKKE	EAP1	S	227	1.00	1.74	2.26	3.71	4.75	1.00	1.61	1.91	2.55	3.10
SNSTAIAPRESASHPTRDLRPVPRGSSIT	EAP1	T	268	1.00	3.01	3.12	4.27	7.96	1.00	1.16	1.37	1.53	1.61
STAIAPRESASHPTRDLRPVPRGSSITD	EAP1	T	270	1.00	2.06	1.89	2.48	3.48	1.00	1.36	1.14	1.22	1.36
HETPTDLRPVPRGSSITDFLNLKRQDKKE	EAP1	S	281	1.00	7.73	7.19	7.44	4.38	1.00	4.07	4.53	5.31	5.11
ETPTDLRPVPRGSSITDFLNLKRQDKKE	EAP1	S	282	1.00	2.04	1.95	2.64	2.03	1.00	1.50	1.19	1.85	2.24
PTDLRPVPRGSSITDFLNLKRQDKKEESS	EAP1	T	284	1.00	4.06	4.03	3.99	2.52	1.00	1.95	2.42	2.70	2.81
LSKTSIEQVNELETNSDLGKSSSRFSFFFN	EAP1	S	327	1.00	1.51	1.28	1.89	2.06	1.00	1.56	1.43	1.86	2.46
TPHQSGSRLMSFFKESRSTPNAESQLLSAS	EAP1	S	387	1.00	6.61	6.94	9.18	9.17	1.00	7.49	7.03	9.82	11.17
SGSRLMSFFKESRSTPNAESQLLSASDKDN	EAP1	T	391	1.00	3.73	4.35	5.02	3.82	1.00	5.20	4.88	5.87	5.23
MSFFKESRSTPNAESQLLSASDKDNKGMQT	EAP1	S	396	1.00	2.08	2.39	2.08	2.31	1.00	3.88	3.08	3.74	3.13
VQNATLQKRLKREKRELEKIKSKLKNRKHNE	EBP2	T	333	1.00	3.23	14.67	17.12	16.74	1.00	4.30	14.88	13.18	10.66
AFNDYCTVCDRLIPTSPQKTNINTRKIQRD	ECL1	S	19	1.00	2.72	2.46	3.70	4.01	1.00	1.52	2.24	2.91	3.77
SRAKYQNTKAGWSDNETIKKELAFNLGG	ECM1	S	147	1.00	2.28	2.04	1.85	1.62	1.00	2.25	1.87	2.35	2.26
NETIKKELAFNLGGLSVQAQKASEGNAEKNE	ECM1	S	164	1.00	1.67	1.67	1.97	1.81	1.00	1.48	1.57	1.75	1.84
GNAEKEDIEIPEVFDLSAEDNTVQKTPTRNF	ECM1	S	188	1.00	1.58	1.67	1.76	1.71	1.00	2.18	2.25	3.62	4.31
PEVFDLSAEDNTVQKTPTRNFGLPDDVEE__	ECM1	T	198	1.00	1.64	2.51	5.74	7.55	1.00	1.18	1.05	1.66	2.24
TTGGNNNGNIRSSNTDAQLLGKQKQKOPP	ECM21	T	87	1.00	4.35	4.65	4.55	4.29	1.00	1.18	1.22	1.16	1.32
KETPRQNNKDDTRLLSQNLKLLNLKQKQSPH	EDC1	S	117	1.00	2.05	2.08	2.27	2.06	1.00	1.65	1.48	1.38	1.07
YFNSSRLPSAGRNKTNLNLKQKTRNRARRG	EDC1	T	22	1.00	2.75	3.22	4.14	4.12	1.00	1.15	1.71	2.22	2.05
ASLSKGPVNRGVATTPKSLAVEELSGMGFT	EDE1	T	1340	1.00	1.09	1.09	1.39	1.12	1.00	1.62	1.60	2.10	2.38
LTRHSTISRLSTGAFSNAASDWSLSFEKKQQ	EDE1	S	265	1.00	1.17	1.43	1.44	1.24	1.00	1.28	1.66	2.12	1.98
SDTFSAQPPVPKHAASSPVKRTASTTLQPQV	EDE1	S	526	1.00	2.95	4.21	4.41	3.00	1.00	1.70	3.28	4.42	4.65
AAVGAALGASAFSRSSNNAFNKQDLFADGE	EDE1	S	579	1.00	6.40	8.85	7.84	5.71	1.00	10.22	11.39	12.87	11.46
AVGAALGASAFSRSSNNAFNKQDLFADGEA	EDE1	S	580	1.00	19.03	26.30	25.94	19.27	1.00	10.79	12.64	15.63	12.98
MANLSNQVNSLSKQASITNDKKSRAATQELKR	EDE1	S	621	1.00	2.39	3.08	3.61	2.87	1.00	3.03	2.77	3.75	4.16
NLSNQVNSLSKQASITNDKKSRAATQELKRVT	EDE1	T	623	1.00	1.90	2.57	2.75	2.25	1.00	2.93	3.04	3.87	4.09
LSKQASITNDKKSRAATQELKRVTMKNISIQI	EDE1	T	631	1.00	13.90	16.35	16.99	12.05	1.00	10.00	12.29	14.77	13.75

GQLPEDAKDIIAKSASNTDTTTEKATSRGNV	EDE1	S	900	1.00	0.59	0.72	0.44	0.86	1.00	1.24	0.94	1.80	2.62
HEDTVSKFVETTVENSNLNVNRVKDDEEKTE	EDE1	S	931	1.00	1.22	1.64	2.07	1.98	1.00	1.57	1.79	2.23	2.49
SKKGAQILLSRDNQISTDILLSQVTRTPLL	EFR3	S	564	1.00	1.77	1.84	2.07	1.69	1.00	1.42	1.65	1.53	1.38
ENIVGLDKIDVARSNSLRAPISLSDRSSI	EFR3	S	727	1.00	1.66	1.38	1.74	1.40	1.00	1.02	1.14	1.07	1.31
AEKKDEAIPELVEGQTFDADVE_____	EGD1	T	151	1.00	6.34	9.28	9.73	8.95	1.00	3.99	5.62	6.85	6.32
NKVGGTRRLKLNKAGSSAGANKDDTKLQSQL	EGD1	S	33	1.00	3.92	4.40	5.05	3.51	1.00	1.32	1.72	2.24	2.35
LNKKAGSSAGANKDDTKLQSQLAKLHAVTID	EGD1	T	42	1.00	2.48	3.47	4.69	2.39	1.00	4.08	3.50	5.21	4.72
KALKAHNGDLVNAIMSLSK_____	EGD2	S	171	1.00	1.42	1.40	1.79	1.66	1.00	1.22	1.23	1.44	1.82
_____MSAIPENANVTVLNKNE	EGD2	S	2	1.00	1.48	1.45	2.60	1.91	1.00	1.15	1.24	1.37	1.51
RNNSITSATSKTSKESQTKRKSKEPGAAS	EIS1	S	142	1.00	0.91	0.95	0.71	1.01	1.00	2.47	1.20	1.62	2.42
SLRKPVYQTTGTEPLSREALYKAKLYGVYQ	EIS1	S	56	1.00	0.99	1.07	1.33	1.79	1.00	1.34	1.45	1.55	2.26
GVPVSTAACEATETSSAVQTKPEEKISIGN	EIS1	S	763	1.00	0.66	0.72	0.55	0.59	1.00	1.46	1.12	1.41	1.51
STAAKEATETSSAVQTKPEEKISIGNKSSG	EIS1	T	767	1.00	1.35	1.20	1.24	1.19	1.00	1.39	1.20	1.60	1.83
ERIGQVKRGRGALVDSDE_____	ELF1	S	142	1.00	1.66	1.29	1.10	0.84	1.00	1.31	1.20	1.29	1.23
_____MKRHVSLSDILTGNKRKVRVQ	ELG1	S	6	1.00	1.15	1.22	1.77	1.93	1.00	0.79	0.92	0.91	1.03
NVGEARIPQAHTKTGTGFINSQGTGYRQVSD	ENT1	T	388	1.00	2.54	2.65	2.15	1.85	1.00	2.35	2.32	2.10	1.96
ANRAARPRRQRTRSNPHDSSPSYQDDLEK	ENT2	S	167	1.00	2.00	2.48	2.35	2.22	1.00	1.05	1.15	1.28	1.50
FGNTGEARIPQAHTKTGTGFINSQGTGYQV	ENT2	T	470	1.00	1.21	1.34	1.50	1.66	1.00	0.78	0.96	0.95	1.06
_____MSLEDTLANMSLYDAKK	ENT3	S	2	1.00	2.65	2.66	2.69	1.75	1.00	2.05	2.53	2.01	1.38
FSQNGYNDNASRATSTPGQKQEPEDFVDF	ENT3	T	228	1.00	1.29	2.19	2.23	3.26	1.00	0.91	1.21	1.62	1.62
SNSKIDLLDWDGPKSDTDTTAAAGTSLPFA	ENT5	S	363	1.00	1.13	1.53	1.68	1.91	1.00	1.25	1.25	1.59	1.51
EKKQKARPQATKDKSKGNDAFSDLSFSYSKS	ENT5	S	394	1.00	2.90	5.31	10.83	7.70	1.00	1.61	2.59	3.29	3.82
TKDKSKGNDAFSDLSFSYSKLV_____	ENT5	S	405	1.00	2.25	2.52	3.14	3.46	1.00	1.31	1.34	1.53	1.42
CVEKTHNEVLFERRATTIENTKALENNTNMH	ESC1	T	1073	1.00	4.71	7.60	9.89	7.93	1.00	4.15	7.62	10.46	11.03
SVEPLKPEDRSNIFSSPIRVIGAVVKGVGK	ESC1	S	1144	1.00	1.32	1.26	1.50	1.14	1.00	1.74	1.51	1.52	1.95
GAVVKGVGKVDVAESFVKIDVMDSESDDN	ESC1	S	1166	1.00	1.39	1.58	1.90	1.52	1.00	1.86	1.76	2.20	2.25
KRQQLKNLSDLENYSQRLIEDSRGKNOQEE	ESC1	S	1332	1.00	1.44	1.48	1.58	1.63	1.00	1.26	1.41	1.71	2.04
QRLIEDSRGKNOQEEDEVNTSRERDLTFEK	ESC1	S	1348	1.00	1.33	1.36	1.28	1.07	1.00	1.41	1.36	1.77	1.94
LDLSNNQERSEIEENSEPEAELEYELEIEGP	ESC1	S	1409	1.00	1.51	1.30	1.52	1.37	1.00	1.20	1.29	1.56	1.67
QNDGSKTQISFSTDSPDNFQESNDTEFFSS	ESC1	S	888	1.00	1.17	1.14	1.20	1.16	1.00	1.45	1.30	1.56	1.82
STKYVNRNDEDESELKELTAEVVDKLD	ESC1	S	918	1.00	0.82	0.99	0.95	0.94	1.00	1.65	1.27	1.81	2.03
KKRKVESVEKKSDEPSPRESTPVRSQMSVELD	ETT1	S	30	1.00	1.17	1.44	1.41	1.33	1.00	0.53	0.82	0.73	0.72
DGIVYQDDQVIGKARSRTLEMLRLNRLSRVNG	FAF1	S	208	1.00	1.76	2.81	3.54	5.04	1.00	1.81	2.90	3.60	3.57
ASGRSHSGPIHRSVLEDLKRNSFKGNLK	FAR11	S	18	1.00	1.40	1.45	1.65	1.58	1.00	1.00	1.13	1.24	1.35
LNMGRRNSFHADKRKNSDGNISALTFKARSGL	FAR11	S	81	1.00	1.11	1.07	1.64	1.73	1.00	0.82	0.83	0.99	1.40
_____MGVEQILKRKTGVIVGEDVHNLFTYA	FBA1	T	11	1.00	3.91	5.08	5.18	4.54	1.00	2.68	3.84	4.89	5.20
_____MYTGGMASKWDQKGMEDIA	FCY1	T	3	1.00	1.14	1.11	1.46	1.43	1.00	1.55	1.53	1.91	2.64
NIPSDKDNVFRVLSMPLRTTSQKFLKPPM	FIN1	S	36	1.00	1.74	1.72	1.20	1.22	1.00	0.88	1.13	0.89	0.70
MSPECLGYVSKETQSLDRPQFKNSKNVKI	FIN1	S	88	1.00	1.73	1.70	1.33	1.31	1.00	0.79	0.99	0.77	0.63
SISQMNRRQSPNNALVSFTNACANSKIINIS	FKH2	S	596	1.00	5.75	4.95	4.02	1.93	1.00	6.39	5.57	6.21	4.70
SLRLSQPYDTLLRSPTKAFHITAMEAYTPER	FKH2	T	685	1.00	4.13	5.28	4.09	2.48	1.00	2.39	3.24	4.81	5.01
EKILSKFSRPNENASTDALRVEAPKQQTFF	FLC3	S	687	1.00	1.91	2.09	2.29	2.30	1.00	1.42	1.72	1.75	1.91
FLRTPRQLMRKSPRASFSIVTRAAFPHLKN	FMP16	S	21	1.00	2.24	1.78	2.59	5.52	1.00	1.57	1.22	3.75	12.41
HDIPKDLSLKDTLNGSPRSRGSSTPTITQT	FPK1	S	339	1.00	1.57	1.34	1.19	1.00	1.00	0.87	0.99	0.93	0.91
HDSLQRPTTGSERTRISFSKLLTRSWKRNA	FPK1	S	35	1.00	1.92	1.96	2.90	3.43	1.00	1.15	1.79	2.31	3.05
PESHLSRRRSRSTRSNTAGHSANTGATNGRT	FPS1	S	185	1.00	2.01	1.66	1.62	1.24	1.00	1.07	1.32	1.04	1.19
VSEVNKASVDNKAASPEHSTAKRVLGFFKR	FRK1	S	845	1.00	1.81	1.53	1.58	1.58	1.00	0.90	0.85	0.61	0.51
KEEKLLERRRAALLSSGNVAVGLAKKDGE	FUN12	S	257	1.00	1.85	2.89	5.44	6.04	1.00	1.52	2.18	1.95	2.28
ISKQKQYNGLVRDRESFTRLSKEDLEFYQKS	FYV6	S	78	1.00	3.25	3.89	3.96	4.86	1.00	2.44	3.14	4.02	3.95
TTFNPTPRNGNEHLSDDGVSEKQDDEFKVS	FYV8	S	238	1.00	1.64	1.62	1.38	1.31	1.00	1.83	1.62	1.98	1.90
EKEENLQEQDDEGEVSSGALEKKEKSEKETS	FYV8	S	280	1.00	1.13	0.99	1.08	1.10	1.00	1.76	1.41	2.26	3.09
SSGALEKKEKSEKETSIRNRNNTSSGQDKVA	FYV8	S	295	1.00	1.00	0.84	1.11	1.53	1.00	1.11	1.08	1.93	2.91
ASMKPRVSTYSEMESTWDAFSPKGEDDDLE	FYV8	S	586	1.00	2.21	1.78	1.73	1.13	1.00	1.69	1.56	1.45	1.22
DNSNNTANDLAARSASFSENRTVSSQEMETS	FYV8	S	666	1.00	1.40	1.39	1.94	1.61	1.00	1.69	1.40	1.70	1.80
QHIIASKLVPVSGDPSLKESLPTSEKSSSTD	FZF1	S	193	1.00	2.94	3.15	3.25	3.19	1.00	2.28	2.82	2.68	2.33
PETLVKYSIHLKPSVWDLFEY_____	FZF1	S	292	1.00	4.31	3.98	4.89	3.83	1.00	2.93	4.40	6.64	5.75
PNTNPSPLKTQTKNGTNPNNMKTQVSPMGA	GAL11	T	820	1.00	1.07	1.05	1.01	1.01	1.00	1.54	1.36	1.39	1.40
_____MAGDNPENKDASMLDVDAASNTTNG	GAL83	S	12	1.00	1.04	1.21	1.59	1.26	1.00	1.35	1.14	1.55	1.81
NTLQKMDYQPSQQPDSLQNGFQQQQEQQQG	GAL83	S	135	1.00	5.31	5.14	4.92	3.31	1.00	5.88	4.46	4.46	4.01
HVDDSKLSKRPMSARSRIALIEIEKPEDDMGD	GAL83	S	279	1.00	1.64	1.83	3.27	3.13	1.00	1.44	1.23	1.67	1.99
GFRGGFRGRTGARSFQQGPPDTVLEMGA	GAR1	S	28	1.00	1.70	1.95	2.29	2.21	1.00	1.24	1.42	1.65	1.89
IKKRQRSSTKINNNITPPSSSLNPGAAGKK	GAT1	T	369	1.00	1.38	1.10	1.22	1.21	1.00	1.39	1.15	1.33	1.49
LGVVAYNRKQRSIPLVIPESDDPAALKRA	GCN4	S	218	1.00	1.41	1.33	1.73	1.81	1.00	2.97	2.47	2.41	2.53
ATSQTAASATPGVAQSRGTEPLNRRSATPA	GCS1	S	157	1.00	0.70	0.78	1.05	1.23	1.00	1.02	0.89	1.13	1.62
TAASATPGVAQSRGTEPLNRRSATPANSSN	GCS1	T	161	1.00	0.87	1.07	1.21	1.46	1.00	1.15	1.16	1.52	1.82
AQSREGTLENRRSATPANSSNGANFQKEKN	GCS1	T	170	1.00	2.24	3.14	4.58	4.71	1.00	2.86	3.55	5.62	7.80
LGTLSRGWGLFSSAVTKSFEDVNETVIKPHV	GCS1	T	258	1.00	5.49	8.20	7.46	6.94	1.00	6.62	9.55	10.86	9.25
DVNETVIKPHVQWQSGELSEETKRAAAQFG	GCS1	S	278	1.00	2.76	3.95	4.29	3.58	1.00	1.91	2.73	3.20	3.10
YSSSMTDMKNMSSNSFSKLNLVGNLAFSL	GDS1	S	269	1.00	1.75	1.75	1.43	1.02	1.00	1.84	1.71	1.38	0.97
WVDDDEEELIQLRKLTKSLK_____	GFD1	T	184	1.00	3.10	3.60	4.17	4.07	1.00	2.60	3.71	4.09	3.92
PSVLGDSVSEKTNPSSPSVSSFGKFKPREL	GIC1	S	253	1.00	2.83	2.28	2.40	2.02	1.00	3.41	2.55	2.81	2.60
SQRSSAYRSLLETPNSNKDSAKAFFPQRSQP	GIC2	S	323	1.00	1.68	1.28	1.23	0.91	1.00	1.78	1.29	1.29	1.24
QSKFYSVSDSPVNHKSFDDVLYSFNQLEPLQ	GIC2	S	367	1.00	1.51	1.05	1.42	0.95	1.00	0.93	0.88	0.95	1.05
TATTAPVSDGLRKLKISEIRVPQFTRKSRHFS	GIN4	S	790	1.00	1.42	1.59	2.37	1.93	1.00	0.85	1.14	1.23	1.12
DSEDSKLPALKHVESGYHVEPEEKIQPENVD	GIP3	S	1042	1.00	2.26	3.48	3.89	3.11	1.00	1.32	2.85	2.89	2.81
DNGSSTQFVRKRSTISINAVVSSKPRLASS	GIP3	S	143	1.00	1.67	1.38	1.75	1.53	1.00	1.07	1.00	1.08	1.14
SGNRSSNDKPRARSSVSNAAALCNTEKPLDK	GIP3	S	66	1.00	1.73	1.38	1.68	1.47	1.00	1.32	1.13	1.22	1.39
NQFLNMNQTTISRISPLSRMMDLSNIVEP	GIS1	S	425	1.00	2.54	2.79	2.63	2.43	1.00	0.99	1.68	1.24	0.83
GPNHMAKDCMKEDGIGLKYTCGQAAGHMSR	GIS2	S	114	1.00	1.82	2.16	2.91	3.08	1.00	2.10	2.19	3.17	3.50
CTVQRCFNCNQTHISRECPKPKTSRFSKV	GIS2	S	77	1.00	1.35	1.05	1.04	1.18	1.00	1.27	1.32	1.25	1.57
NQTHISRECPKPKTSRFSKVSCYKCGGPN	GIS2	T	86	1.00	3.25	3.85	7.51	7.38	1.00	1.55	1.97	2.27	2.99
HISRECPKPKTSRFSKVSCYKCGGPNHMAK	GIS2	S	90	1.00	1.80	1.26	1.90	2.07	1.00	1.36	1.02	1.52	2.14
IASSELPNKRIRQKSLNNTNFKLYSIETSC	GIS3	S	333	1.00	2.01	2.23	2.27	2.02	1.00	1.61	1.72	2.13	2.48
EHCLKISRDDGALHWSVSSKVFYPKSIFYA	GIS3	S	34	1.00	1.46	1.47	1.42	1.08	1.00	1.87	1.83	1.67	1.52
KSREALKDEDEDEDDSTTKEP_____	GLC8	S	224	1.00	1.39	1.50	1.99	2.22	1.00	2.37	1.79	3.60	5.04
SREALKDEDEDEDDSTTKEP_____	GLC8	T	225	1.00	1.91	2.46	3.86	4.65	1.00	2.25	2.31	3.85	4.91
EIIGTSSTFLPKDTLSLKHQDMLAKMTPEE	GLC8	S	74	1.00	1.21	1.80	3.28	4.15	1.00	1.29	1.23	1.88	2.20
SNNSNIQHPLFKSDSGLSSSNTTNSVRKN	GLN3	S	251	1.00	2.46	2.52	2.98	2.53	1.00	1.75	1.96	2.24	2.63
NIQHPLFKSDSGLSSSNTTNSVRKNLSLK	GLN3	S	255	1.00	2.26	2.20	2.44	2.37	1.00	1.83	2.01	2.57	3.38

KKSDSGLSSNTTNSVRKNSLIKPMSSLSL	GLN3	S	262	1.00	2.23	1.45	1.20	0.95	1.00	2.76	2.17	1.92	1.64
NTTNSVRKNSLIKPMSSLSLANFKRAAIVSS	GLN3	S	273	1.00	1.53	1.50	1.41	1.20	1.00	1.90	1.74	1.99	1.75
NAKPIRSRKSLLQNSLRVPIEIHNDIG	GLN3	S	400	1.00	3.97	3.34	2.63	1.51	1.00	4.98	4.49	3.46	2.51
NTNTNSNRQNWNSNSVSTNSRNSFVSQPK	GLN3	S	619	1.00	1.90	1.47	1.26	1.00	1.00	3.66	2.82	2.75	2.65
SSNFVSQKPNFDIFNTPVDSVSRPSSRKS	GLN3	T	641	1.00	5.83	4.06	3.38	2.48	1.00	4.15	3.39	2.69	1.87
ASRSTKENSVDFFSNWQKPSNSSSKLNLV	GLO3	S	176	1.00	1.49	2.00	1.17	0.81	1.00	2.31	3.08	2.16	1.12
VNTGSLAPKNNTTGSTPKTTVTKTRSSILTA	GLO3	T	206	1.00	2.66	4.22	4.28	9.92	1.00	1.52	2.45	2.88	2.81
NTTGSTPKTTVTKTRSSILTA SRKKPVLNSQ	GLO3	S	216	1.00	2.34	3.35	4.23	5.60	1.00	1.86	2.81	3.33	3.58
TTGSTPKTTVTKTRSSILTA SRKKPVLNSQD	GLO3	S	217	1.00	1.73	2.35	2.08	2.23	1.00	1.90	2.31	2.65	2.57
TNSSSTKIRQNDYDSQFMNNSKGNNSID	GLO3	S	293	1.00	1.31	1.49	1.68	1.87	1.00	1.75	1.66	1.89	1.92
SNSFDTRRKEQDQLTKPKAKLFGGMTMND	GLO3	T	340	1.00	1.17	1.67	2.06	3.90	1.00	1.03	1.18	1.40	1.23
YTGRAIERYGTQKAISSDQLFGRGSFDEAAN	GLO3	S	389	1.00	2.33	3.19	3.25	3.28	1.00	2.43	3.84	4.69	4.48
TGRIAEYGTQKAISSDQLFGRGSFDEAANR	GLO3	S	390	1.00	1.64	2.21	2.25	2.28	1.00	1.91	2.66	3.02	2.82
GTQKAISSDQLFGRGSFDEAANREAHDKLKT	GLO3	S	398	1.00	1.28	1.79	1.56	1.28	1.00	1.38	1.67	1.68	1.39
QMLRDVVEQGAELGSLYLRDLRK	GLO3	S	485	1.00	3.52	6.13	6.07	3.81	1.00	6.85	7.76	8.37	5.95
DGSQLYLGLQLRTLTGLQDDINEFLTGRME	GON7	T	75	1.00	2.11	2.33	2.93	3.02	1.00	1.38	1.30	1.67	1.82
MPAKRTRKT VKKTVSFDLTTLTHQNRK	GPI11	S	16	1.00	1.80	1.79	1.64	1.66	1.00	1.32	1.78	1.30	1.26
_____MVSQETIKHKDLIAENE	GRX1	S	3	1.00	0.88	0.78	0.78	0.91	1.00	1.10	1.13	1.50	2.26
TVPNVYINGKHIGGNSDLETLLKNGKLAEL	GRX2	S	123	1.00	2.13	2.38	3.38	4.36	1.00	2.25	2.36	3.83	6.53
IITLFATRIIAKRFSTPKMVSQETVAHVKD	GRX2	S	31	1.00	1.73	7.76	5.88	4.01	1.00	7.22	6.07	5.38	5.08
TRIIAKRFLSTPKMVSQETVAHVKGUIGQKE	GRX2	S	37	1.00	1.41	1.56	1.73	2.44	1.00	0.93	1.15	1.46	1.90
VAAKTYCPYKATLSTLQELNVPKSKALVL	GRX2	T	70	1.00	1.24	1.17	1.50	1.39	1.00	1.30	1.33	1.48	1.96
NVPKSKALVLEDEMSEIQDLEEISGQ	GRX2	S	91	1.00	1.36	1.08	1.17	1.15	1.00	1.40	1.44	1.46	1.72
___MFLPKFNPIRSFPIRLAKTLRYQNRM	GRX5	S	13	1.00	1.78	1.95	1.67	1.16	1.00	2.65	2.01	2.39	2.54
KPEDFGSRMDDFDGEDRFRDERNRNSR	GTS1	S	153	1.00	1.14	1.38	1.18	1.39	1.00	1.76	1.87	2.60	2.84
GESDRFERNRNSRSHSFYKGGHNRSYD	GTS1	S	166	1.00	1.14	1.18	0.63	0.56	1.00	1.65	1.54	1.61	1.04
SDRFERNRNSRSHSFYKGGHNRSYDYG	GTS1	S	168	1.00	1.22	1.28	0.79	0.67	1.00	1.78	1.51	1.50	1.06
AAATTSPPPLRRRATSGPQAIFDGNTVI	GTS1	T	258	1.00	1.86	2.47	1.95	2.07	1.00	2.65	3.32	3.28	2.94
REYGPATLKVIDDNSLFLKGMNDSTVVMWSHG	GUA1	S	124	1.00	1.54	1.60	2.04	2.16	1.00	1.27	1.56	1.59	1.60
EPKTLNYALSKVALNSSECLNKMFPTEEQPL	GVP36	S	145	1.00	0.74	0.86	0.92	1.00	1.00	1.07	1.11	1.41	1.72
MAKQQASTRRTNSYSPLRYVNTLSTASNE	GYP1	S	91	1.00	1.48	1.24	1.35	1.33	1.00	0.82	1.00	1.07	0.93
SAKRNDPAPLFSHMASINDMLETDRDAISNV	GZF3	S	424	1.00	1.94	1.93	2.37	2.12	1.00	1.63	1.30	1.44	1.53
GASISNMNFKANDKSFSTSTAGRMSPTDMS	GZF3	S	82	1.00	2.76	2.74	2.21	1.74	1.00	2.84	2.96	3.34	3.18
SFSTSTAGRMSPTDMSHLHILPKNQVKNNGQ	GZF3	S	97	1.00	2.51	2.36	2.89	2.68	1.00	1.53	1.75	1.81	2.03
HQHSKSGNNWQDSSVSLPAKADSRNLNMDKN	HAA1	S	241	1.00	1.21	0.96	0.81	0.71	1.00	1.79	1.29	1.20	1.23
SRVGEVSPLEEYIPSDIDGVRVTDKSSLV	HAA1	S	291	1.00	2.20	1.95	2.62	2.47	1.00	1.86	1.75	2.51	3.18
IERNFSTTATAATGESKFDINDNCRNINSK	HAA1	S	330	1.00	1.79	1.62	1.70	1.50	1.00	2.88	2.01	2.12	2.09
STLSRANLLQEKIGSQENSVKQENYSKNPQ	HAA1	S	413	1.00	1.12	1.36	1.37	1.18	1.00	1.80	1.47	1.77	1.75
RANLLQEKIGSQENSVKQENYSKNPQLRHQ	HAA1	S	417	1.00	1.85	1.98	2.21	1.86	1.00	1.95	1.68	2.10	2.13
SNDIGKGEVLSLTPSFMDIPEKERETERSP	HAA1	S	473	1.00	1.39	1.37	1.29	1.25	1.00	1.83	1.44	1.64	1.30
LSQLENVPEDEMNQMFSPPLKSMNRPDAREN	HAA1	S	622	1.00	1.88	1.70	1.77	1.35	1.00	1.52	1.43	1.33	1.48
PPLKSMNRPDARENSSNFIIQGNMSIST	HAA1	S	638	1.00	1.35	1.19	1.19	1.14	1.00	1.85	1.54	1.40	1.56
FTPSPLNCTMEPATLSPKSMRDSASDQETS	HAC1	S	146	1.00	0.96	1.11	1.37	1.37	1.00	1.00	1.27	1.51	2.00
REKKRLHLQYLERKCSLLENLNSVNLKLA	HAC1	S	72	1.00	3.53	3.52	5.44	6.38	1.00	3.66	6.30	10.85	16.54
QYLERKCSLLENLNSVNLKLAHEDALTC	HAC1	S	80	1.00	4.66	3.62	6.19	6.78	1.00	2.41	4.08	7.17	10.78
RSKEAVPHHRVTGSDVEVERQPRELRKNFP	HAL5	S	160	1.00	2.39	1.96	2.38	2.12	1.00	1.15	1.19	1.15	1.26
GDEKLSRHTSLKRARSLESIKLGFKPSGIS	HAL5	S	17	1.00	1.42	1.30	1.79	1.60	1.00	0.99	1.06	1.51	2.01
EKLSRHTSLKRARSLESIKLGFKPSGIS	HAL5	S	19	1.00	1.75	1.49	1.86	1.93	1.00	1.56	1.79	2.47	3.38
AMLDYDEESKLRNRSLGVRNHSNRTRSRKN	HAL5	S	217	1.00	1.38	1.29	1.51	1.55	1.00	1.01	1.17	1.41	1.82
LGVRNHSNRTRSRKNSTPRSPMKNGNGG	HAL5	S	233	1.00	1.78	1.57	1.82	1.66	1.00	0.99	1.15	1.32	1.46
GTGNRIYMRGRNHSISASSLPKFGQIECK	HAL5	S	275	1.00	2.45	1.77	1.90	1.83	1.00	1.13	1.26	1.37	1.56
DDGNDSEANMHKQKSVFSLGFLKSHKDG	HAL5	S	353	1.00	1.37	1.54	2.25	2.47	1.00	1.52	1.74	2.10	2.39
PSQRFIKSQTLKSRSTNLKNGNDELKND	HAL5	T	409	1.00	1.66	1.60	1.85	1.55	1.00	0.94	1.19	1.14	1.10
_____MGDEKLSRHTSLKRARSLES	HAL5	S	7	1.00	1.24	1.25	1.83	2.11	1.00	1.20	1.18	1.92	3.02
ITGRSDISNVNHQTGTPRLVPETQIWSMPPV	HAL9	T	43	1.00	2.32	2.00	2.27	2.31	1.00	1.16	1.39	1.49	1.58
VKSLEKLSKVHSSPNSLSYNTPESSNL	HAP1	S	136	1.00	1.62	1.16	1.00	1.05	1.00	1.04	1.22	1.37	1.27
AMKSKSGASDPPDSDKIKTKIIQEQP	HAP2	S	237	1.00	1.20	1.13	1.09	1.25	1.00	1.18	1.09	1.48	2.04
STHSAEHTPRHHQYGSDEGEQDYHDEQEGE	HBT1	S	1005	1.00	1.39	1.18	1.29	1.30	1.00	1.07	1.01	0.79	2.41
TPRHHQYGSDEGEQDYHDEQEGEAGKQSF	HBT1	Y	1012	1.00	1.18	0.91	1.07	1.14	1.00	1.02	0.91	0.67	2.02
EEQAGKQSFMRVRSKISGGTFGRSEI	HBT1	S	1034	1.00	0.81	0.66	0.76	0.93	1.00	0.91	0.77	1.12	2.41
QAGKQSFMRVRSKISGGTFGRSEI	HBT1	S	1036	1.00	1.60	1.82	2.05	2.42	1.00	1.70	1.86	2.16	4.25
QKQSFMRVRSKISGGTFGRSEI	HBT1	T	1039	1.00	2.00	2.17	2.77	3.32	1.00	2.95	3.51	4.39	8.12
DNSSATKYSNTSDNSDRVIPGSFRMGTT	HBT1	S	303	1.00	1.15	1.09	1.20	1.22	1.00	1.20	1.08	1.43	3.11
PGSYSDSQAQRKSFSTTKPTEYNLPEEQ	HBT1	S	41	1.00	0.67	0.66	0.60	1.12	1.00	0.94	0.62	1.53	3.15
TRSNFIDQIEPRAKTTQDIASDAKDFTNPN	HBT1	T	731	1.00	3.19	4.00	4.98	4.55	1.00	2.52	2.46	4.39	10.06
NSSKGSYDYNNSHSAEHTPRHHQYGSDEG	HBT1	S	993	1.00	1.30	1.37	1.53	1.66	1.00	1.18	1.03	1.67	2.42
EREERQARLARVRGGTATGGAGKKKVKGKT	HCR1	T	223	1.00	4.08	4.53	2.46	2.66	1.00	2.33	2.19	2.34	2.14
DENVETNKRKRQISTDNEAKMQIQEESPK	HEH2	T	110	1.00	1.42	1.59	1.97	2.33	1.00	1.38	2.00	2.11	2.45
VSQQQVPTRRTRSHSVYGLLQKNNNDT	HER1	S	102	1.00	1.54	1.23	1.53	1.45	1.00	0.94	0.95	1.00	1.08
YGLLQKNNNDTDDSPKISRRTAQDQPVK	HER1	S	120	1.00	2.77	2.82	2.94	3.66	1.00	1.40	1.59	1.41	1.44
LAKKSPVEKKEVSPKPKQAATSVSATAS	HHO1	S	130	1.00	1.28	1.36	1.22	1.35	1.00	1.23	1.31	1.21	1.19
VVKKSPVTAKKASSPSSLYKEMILKSM	HHO1	S	174	1.00	1.56	1.43	1.10	1.18	1.00	1.09	1.14	1.01	0.94
DIDLQTSINERVRLSPQSSIKYFSGDKG	HLR1	S	295	1.00	4.61	3.82	3.47	3.00	1.00	1.60	1.72	1.99	2.14
CDGLARIQDPQMTGYVSTRYRAPEIMLTW	HOG1	Y	176	1.00	1.19	1.42	1.19	1.07	1.00	1.17	1.64	1.33	0.98
MNETTKQLPKRSLSSYLSNVSTRREELEK	HOS4	S	16	1.00	1.96	1.96	2.16	2.41	1.00	1.53	2.50	2.36	2.58
TAGTRMLSQLTNDSPNEISDTQLKIFQR	HOT1	S	153	1.00	1.40	1.35	1.30	1.02	1.00	1.82	1.58	2.08	2.01
KSGVNTNIVNRNRSTLPSYKPMVTKSNVD	HOT1	T	520	1.00	1.97	1.84	1.88	1.49	1.00	1.80	1.26	1.48	1.60
NRFNKNTVELYHSPSPVMTTKTDEEKRQ	HPC2	S	128	1.00	1.23	1.36	1.76	2.20	1.00	1.36	1.37	1.69	1.98
NRNMDNKNTPERGSSFAAKQLKISSLLTIS	HPC2	S	160	1.00	2.79	2.82	3.49	2.49	1.00	3.34	2.76	3.84	5.27
SSKKTPEKAKSSASAILPKPTTKTSK	HPC2	S	332	1.00	4.97	4.51	4.75	4.22	1.00	3.29	2.91	3.59	3.85
SKKPTSEKAKSSASAILPKPTTKTSKKA	HPC2	S	334	1.00	3.29	3.06	3.19	2.78	1.00	2.70	2.83	3.22	3.43
AELKRFPRSVNKLMSQLRSKSHSTHSP	HRK1	S	139	1.00	1.47	1.46	1.50	1.31	1.00	0.90	1.26	1.06	0.99
LKRRFPRSVNKLMSQLRSKSHSTHSPPS	HRK1	S	141	1.00	1.71	1.56	1.74	1.58	1.00	0.73	1.22	0.99	0.87
ENSSNPPQLRSKSFNLFIGRQKSNLSR	HRK1	S	37	1.00	3.07	2.83	3.37	3.05	1.00	3.47	4.75	4.97	5.55
ERKEKRQRFNLHSDCSAINQQPAHESNLKT	HRK1	S	472	1.00	1.33	1.55	1.89	1.60	1.00	1.09	1.22	1.20	1.13
DTTEDNREYFGYGTVDLKIMKDPATGRS	HRP1	T	184	1.00	1.07	1.14	1.60	2.86	1.00	1.55	2.23	1.97	3.80
PNGPKGPSQYNDHNSGYGNDRGDRDRND	HRP1	S	483	1.00	1.01	1.10	1.33	1.50	1.00	1.38	1.30	1.67	1.85
IGDMYGSVTPRLPQVTRMLGYAKEKEDMLS	HSE1	T	339	1.00	1.65	1.83	1.67	1.42	1.00	1.70	1.74	1.42	1.62
GHNRENTNPNSTLLSKLHAPVYQGNP	HSE1	S	123	1.00	3.02	3.51	3.55	2.57	1.00	3.74	2.97	4.09	3.98

NESVSDAPRIEPLSLNDDDEIKLQPNDI	HSF1	S	26	1.00	1.64	2.11	2.34	2.14	1.00	2.59	2.45	3.53	4.10
EKLNSANNIGLNRDNTGTIDELKSNDSFINN	HSF1	T	439	1.00	2.58	3.09	3.04	2.59	1.00	3.91	2.95	3.35	3.33
NRDNTGTIDELKSNDSFINDDRRNSFTNATT	HSF1	S	450	1.00	2.06	2.00	1.52	1.34	1.00	3.90	2.41	2.17	1.97
DELKSNDSFINDDRRNSFTNATTNARNMSPN	HSF1	S	458	1.00	1.70	1.69	1.49	1.29	1.00	2.71	2.15	2.16	2.17
RNSFTNATTNARNMSPNDDNSIDTASTNT	HSF1	S	471	1.00	3.74	2.92	1.79	1.05	1.00	4.49	3.01	2.04	1.33
TTNARNMSPNDDNSIDTASTNTTRNKKNI	HSF1	S	478	1.00	3.84	3.09	1.68	0.83	1.00	5.02	3.29	2.08	1.13
KNRANSSTSEENPSLTPFDIESNDRKISEI	HSF1	T	555	1.00	3.31	2.93	2.51	1.87	1.00	3.59	2.63	2.41	1.88
QDARLQNLNEMVHLSPGYPNKFNNKTSST	HSF1	S	655	1.00	3.69	3.40	3.36	2.75	1.00	2.85	2.02	1.98	1.78
KFSATENTKVSNDLPSFNDHSYSTQADTAPE	HSF1	S	783	1.00	2.91	2.49	2.93	2.26	1.00	2.51	2.06	2.52	3.22
DSRKPSTSTHLVRRGTPGLIYQNTLNGHNSR	HSF1	T	97	1.00	3.42	3.13	3.01	2.68	1.00	2.76	2.61	2.70	2.84
ADILESSMSYKRRPSEESVNPQKRVMTLFD	HSL1	S	1284	1.00	1.62	1.36	1.35	1.29	1.00	1.05	1.06	1.01	1.08
_____MSTLLKSAKIVPLMDRVLVQRIKA	HSP10	S	10	1.00	1.43	1.46	1.63	1.97	1.00	1.41	1.41	1.89	2.48
DRVLVQRIKAQAKTASGLYLPKNEVKLNQA	HSP10	S	31	1.00	1.38	1.44	2.17	2.75	1.00	1.96	1.75	2.62	3.91
QVKVGDQVLIPQFGGSTIKLGNDDDEVIFRD	HSP10	S	81	1.00	2.07	2.14	1.98	2.68	1.00	2.58	1.92	2.58	3.70
RKGFGEKASEALPKDSDKQSYAEQKQYITDK	HSP12	S	21	1.00	0.79	0.74	0.76	1.12	1.00	1.29	0.85	1.41	3.45
DSAEEKGDNAEQGQESLADQARDYMGAAKSK	HSP12	S	73	1.00	1.28	1.23	1.54	2.17	1.00	1.21	0.96	1.70	4.72
DGKNHVKKIEVSSQESWGN	HSP26	S	211	1.00	0.89	0.94	0.80	1.10	1.00	1.19	1.16	1.63	2.19
EGGLRGYAPRRQLANTPAKDSGKEVARPNM	HSP26	T	42	1.00	1.03	0.87	0.82	1.17	1.00	1.19	0.91	1.47	2.95
KNVAAGCNPMDLRRGQSVAQEKVIEFLSANK	HSP60	S	141	1.00	0.23	0.32	0.20	0.36	1.00	0.74	0.62	1.18	1.74
VRSRATLRPLLRRAYSHKLKFGVEGRASL	HSP60	S	22	1.00	1.04	1.33	0.82	1.23	1.00	5.49	4.24	6.44	8.19
RSRATLRPLLRRAYSHKLKFGVEGRASLL	HSP60	S	23	1.00	3.98	3.05	3.92	7.61	1.00	3.29	6.68	9.64	16.01
HQNLPLPKSAKATKASQEL	HTA1	S	129	1.00	2.81	2.90	3.93	6.71	1.00	1.45	4.02	5.45	6.33
HQNLPLPKSAKATKASQEL	HTA2	S	129	1.00	3.77	3.40	4.29	7.67	1.00	1.52	4.13	5.33	6.54
STSTDGKKRSKARKETYSYIYKVLQTHPD	HTB1	T	40	1.00	1.99	1.57	1.59	1.91	1.00	1.08	1.26	1.27	1.31
ASKAPAEKPKAAKTTSTSDGKKRSKVRKET	HTB2	S	25	1.00	1.36	1.17	1.21	1.57	1.00	1.13	1.15	1.32	1.82
SKAPAEKPKAAKTTSTSDGKKRSKVRKETY	HTB2	T	26	1.00	1.97	2.87	4.60	7.53	1.00	1.04	1.36	1.89	2.24
STSDGKKRSKVRKETYSYIYKVLQTHPD	HTB2	T	40	1.00	1.74	1.48	1.40	1.67	1.00	1.10	1.15	1.21	1.29
MNSTPDLISQKSNSSNYSLESGRSKAMNT	HXT1	S	16	1.00	1.97	1.87	1.21	1.01	1.00	2.25	3.17	2.16	1.50
ANVELDLFSNRGRKASHPIAFGVAIPTNVN	IES3	S	211	1.00	1.40	1.49	1.68	1.64	1.00	1.05	1.17	1.20	1.17
_____MSQESSVLSSEQLANPNKIEDTSP	IES4	S	11	1.00	2.07	2.20	2.54	2.32	1.00	2.25	2.07	2.71	3.01
YSRENSNKNKSVKLSPKKEEENEQKEEKEK	IFH1	S	208	1.00	0.71	0.77	0.62	0.46	1.00	1.63	1.16	1.40	1.14
_____MSNENLSPNNSPDLTKLNGGESGT	IGO1	S	10	1.00	1.31	1.13	1.13	0.99	1.00	1.84	1.66	1.87	2.22
TNPSKLRDIIKRISTCPSTASTAGVVDNA	IGO1	S	105	1.00	1.29	1.03	1.21	1.50	1.00	1.77	1.31	2.27	3.06
_____MSNENLSPNNSPDLTKLNGGESGT	IGO1	S	11	1.00	1.27	1.10	1.16	0.95	1.00	1.82	1.60	1.84	2.20
PVGNHSSSSSLEYTESPIR	IGO1	S	165	1.00	11.08	6.92	3.74	2.72	1.00	4.18	4.44	3.37	2.20
KDIFKHTMQKRKYFDSDGYALQKAGIQQNDP	IGO1	S	64	1.00	13.14	8.38	7.60	4.22	1.00	6.83	6.87	5.84	4.53
SGLRESIIRRMSSSSGGDSISRGSSISSGP	IGO2	S	109	1.00	2.16	1.50	1.26	1.13	1.00	1.98	1.93	1.52	1.34
IIRRMSSSSGGDSISRGSSISSGPPRSPN	IGO2	S	115	1.00	1.90	1.40	1.08	1.08	1.00	2.18	1.80	1.77	1.72
_____MSEDLSPTSSRVDLSNPHGFT	IGO2	S	6	1.00	2.76	1.97	2.85	1.89	1.00	1.07	1.01	1.06	1.53
KDLLRHKMQDRQYFDSDGYALKKAGVIKSD	IGO2	S	63	1.00	15.28	9.74	7.81	4.95	1.00	10.03	9.03	8.79	6.19
KKAGVIKSDVIVNNSNNLPTNPSGLRES	IGO2	S	84	1.00	4.75	4.47	3.22	3.47	1.00	2.71	2.80	2.81	2.19
ANNSNPTKLEKIRSSLELDSEKNEKIAYI	IMH1	S	856	1.00	2.01	2.38	2.00	1.84	1.00	0.98	1.43	1.26	1.15
PTTSNSNFNSRKNSMSPTRKPPRLS	INN1	S	398	1.00	2.02	1.99	1.41	1.21	1.00	0.90	0.92	0.82	0.84
PALSLSKPSLQKSSSELQHAKEITIDNGKIV	INP52	S	1055	1.00	1.73	2.05	2.54	2.79	1.00	1.28	1.88	1.81	2.08
FSQNLTPKSTSNLSPMSKVDLYNSASES	INP53	S	1035	1.00	1.57	1.74	1.68	1.14	1.00	1.32	1.12	1.19	0.99
KAKLNHMTLDSWQPLTPK	INP53	T	1105	1.00	2.22	2.41	3.22	4.06	1.00	1.12	1.13	1.25	1.42
IKKPVLRPPPPAHKVSAPAPSTSKESPT	INP53	S	973	1.00	2.39	3.68	7.11	8.99	1.00	1.84	3.71	4.03	5.77
STEKRNLSVKVPTVGSYVAGATLPEITPTS	IST2	S	729	1.00	3.17	2.09	2.14	1.69	1.00	2.03	1.75	1.40	1.21
LVKVPTVGSYVAGATLPEITPSKNNYLR	IST2	T	736	1.00	2.15	1.42	1.39	1.05	1.00	2.10	1.82	1.52	1.25
KNVNTNSKTTSESSSSAAKEPKHKGLL	IST2	S	925	1.00	1.50	1.63	0.89	1.50	1.00	2.18	1.86	2.32	3.05
_____MPDNNEQLQSGSPSDQQLRVDWDNNG	IVY1	S	12	1.00	0.87	1.03	0.84	0.90	1.00	1.63	1.43	1.92	1.22
QQQQQQHPVVKLSSTQSIERRKQKQKQ	IXR1	S	345	1.00	1.47	1.55	1.78	2.26	1.00	1.83	1.95	2.44	2.52
RGSSDFNLPHQISRTRNNTMSSQITSISSI	JSN1	T	170	1.00	1.47	1.38	1.79	1.80	1.00	1.09	1.25	1.36	1.77
AIPNSVWSNTRQSQSNASSIYTDAPLYEQP	JSN1	S	275	1.00	2.00	1.72	1.78	1.60	1.00	1.04	1.12	1.19	1.51
SRAGKFSNTLSNLLPSISAKLHSHKSNHSG	JSN1	S	69	1.00	1.53	1.56	2.44	3.01	1.00	1.20	1.18	1.37	1.68
KHVAHRNNITEGGSGEDIAKQSQSHQPVQL	KCS1	S	150	1.00	1.46	1.50	2.43	2.30	1.00	1.46	1.54	1.99	2.68
NRHTFKVKTYSLSQSLRQENVNRNSNEKPP	KCS1	S	267	1.00	2.11	1.54	1.79	1.46	1.00	0.81	0.91	0.76	0.67
PDTLREQQLRQKESEGCITTLKDLNVPET	KCS1	S	27	1.00	4.18	3.95	4.95	4.14	1.00	2.04	2.78	3.02	3.06
NRLDDLERSQELTISKEKLSSEYHALMEH	KEL1	S	1003	1.00	2.64	2.79	2.08	1.58	1.00	3.23	3.32	2.87	2.30
LSSEYHALMEHSSLSQDVLVKEIKEIKKI	KEL1	S	1022	1.00	2.52	2.18	1.75	1.73	1.00	1.74	1.91	1.61	1.38
SSPSKQDFIKHYNESELSQNNTEIDKLSE	KEL1	S	703	1.00	1.94	1.88	1.69	1.65	1.00	1.43	1.68	1.34	1.23
VNKTSPPMFARKQVSESRIQPSVPPQQRN	KEL1	S	77	1.00	2.25	2.62	2.47	2.01	1.00	1.70	2.48	2.06	1.44
VARNVMAASFVKRHASTSLFKQANKVESLGS	KGD2	S	34	1.00	2.04	2.04	2.34	2.51	1.00	0.96	1.15	1.56	1.71
AYLHKQSLPSKNESEILERQKLEKEIAR	KIN2	S	151	1.00	1.43	1.64	1.68	1.71	1.00	1.17	1.78	1.79	1.72
HVMVPPKLTPEQAHTSPTSRSKSSDIHTEL	KIN2	T	608	1.00	1.34	1.43	1.55	1.37	1.00	0.63	0.72	0.74	0.86
EHQEKNITIGIFRRISQSGSQHPTRQQEPL	KIN2	S	663	1.00	1.35	1.18	1.77	1.51	1.00	0.26	0.49	0.52	0.54
DPFLHPGIRIRIRSDSINNSRKNDDTYGSI	KIP2	S	88	1.00	1.38	1.40	1.51	1.45	1.00	0.68	0.81	0.70	0.68
TGSGASNSPTRHRISGEEIEVNSLPEYKR	KKQ8	S	113	1.00	1.54	1.30	1.85	1.72	1.00	0.92	0.93	0.93	1.16
QEEKRQQPVTTRVRSFSEFKNLRPPRRSR	KKQ8	S	19	1.00	1.35	1.94	3.15	3.44	1.00	0.79	1.19	1.56	1.81
EKKRQQPVTTRVRSFSEFKNLRPPRRSRDS	KKQ8	S	21	1.00	2.49	1.98	2.14	2.02	1.00	1.32	1.36	1.29	1.35
HRQGSLSRPLGITLSGLFKHKKNECDIENA	KKQ8	S	304	1.00	3.22	4.93	4.79	4.47	1.00	2.68	6.05	7.16	6.70
TYITPPKFKKQRTISLQLPKSLKSYQSNY	KNS1	S	185	1.00	1.52	1.56	2.19	2.53	1.00	1.40	1.66	2.12	2.73
NSFLQPPHRAIASSPSLNSLKNALDSPPE	KRE6	S	136	1.00	1.61	1.60	1.55	1.27	1.00	1.35	1.29	1.15	1.21
THEPNYPHFKHVSISNPEFLAKYAHKKG	KRS1	S	102	1.00	5.34	5.65	6.86	8.33	1.00	3.02	4.53	7.47	10.25
AKKAAAQPKASKKTLDFADLPSQYFETR	KRS1	T	62	1.00	6.08	12.56	18.36	17.77	1.00	2.27	6.32	6.42	5.60
LGAGRKTSIQDEMVGSLQYKNNWLIQQQD	KSP1	S	1014	1.00	3.72	3.00	3.03	2.07	1.00	2.23	2.12	1.82	1.52
LSVSHNSVNFSGSYNSRRSSANESNPLHMNK	KSP1	S	880	1.00	1.46	1.50	1.61	1.69	1.00	1.50	1.48	1.34	1.59
_____MSTIKPSPNNLKVRSRPRKSS	LAC1	S	9	1.00	1.26	1.72	1.91	1.93	1.00	0.88	1.56	1.45	1.21
RNNRPVPPPPMRTTTEGSGVRLPAPPPPR	LAS17	T	334	1.00	3.42	3.11	3.37	2.85	1.00	2.44	3.43	3.07	3.02
NLNSAGNSLLPQATGRRGPAPPPPRASR	LAS17	T	380	1.00	1.62	1.30	1.67	1.75	1.00	1.42	1.72	1.89	2.03
TESNVSTSKLKRKSTFGSALSSRLSSLSA	LDB19	S	92	1.00	1.65	1.66	1.32	1.27	1.00	1.76	2.14	1.84	1.67
NMSVSNHPPGNARRNSQANEMLASQIQDFQ	LEE1	S	21	1.00	0.92	0.90	1.05	1.24	1.00	1.08	1.18	1.24	1.80
SMDPEVEKELERKQSLRDRRRRQLKEKE	LEO1	S	339	1.00	1.29	3.10	3.01	3.66	1.00	2.15	3.03	5.40	5.08
EEYSRYEARREKYSFLEGGSKLLKFDVNP	LEU1	S	748	1.00	5.32	10.62	10.08	10.99	1.00	1.91	3.63	4.75	5.35
QRGNSQDTNGRTTASQEDNDEKRVKRSRYRN	LGE1	S	121	1.00	1.49	1.70	1.78	1.60	1.00	1.84	1.81	2.98	2.93
SYRGGNASYGARNSDYEQPQEGDLRQTG	LGE1	S	51	1.00	1.48	1.72	1.63	1.59	1.00	1.56	1.85	2.01	1.86
RQNLREVAVEVFDQSQARNQLANVPHLTK	LOC1	S	24	1.00	1.42	1.90	2.13	2.36	1.00	1.43	1.73	1.83	2.04
TPDGKEEMNRLKSNDSNYSKSEGGIQTNSQ	LRE1	S	474	1.00	1.66	1.06	0.88	0.77	1.00	1.27	0.82	0.73	0.67
NKIGIFANVYKPAFTRASAPSKAEAASSST	LSB1	T	112	1.00	2.41	2.63	2.91	4.18	1.00	2.39	1.61	3.30	5.68

NTRSTRRAAQSGSRVYFDDDDDDDDYGTGYS	LSB3	T	275	1.00	2.08	2.80	2.56	1.96	1.00	1.83	3.40	3.36	2.94
__MHRTYSLNRQAPTAELQAPPPPPSTK	LSP1	T	14	1.00	4.22	5.72	6.07	6.23	1.00	2.55	3.87	3.82	3.83
SSTSKFFKGASIASFRKNAAGNFGPELAR	LSP1	S	41	1.00	1.30	1.51	1.65	1.87	1.00	1.05	1.35	1.48	1.61
SITNSLRLQVVSHETDINDEEHAHYEDKH	LYP1	T	90	1.00	1.40	1.74	1.31	1.18	1.00	0.80	1.19	0.90	0.78
KNNLPSLFLNARAGSLGGFINHKQMTSPSN	LYS14	S	67	1.00	0.86	0.87	1.14	1.39	1.00	0.98	0.99	1.78	2.44
KVNEDIRREALALGASEEDKLIQGLSDDDD	MAK21	S	62	1.00	1.16	1.26	1.28	2.12	1.00	1.77	1.72	2.41	2.87
PKFKYSGVKASYPLTRPRYVPEDIPKPDWA	MAP1	T	95	1.00	1.65	1.55	1.57	1.75	1.00	1.09	1.11	1.15	1.18
KMSQKDLATKINEKPTVVNDYEAARAINPQQ	MBF1	T	108	1.00	2.07	2.83	4.29	5.12	1.00	1.48	2.05	3.22	4.64
LERALGVKLRGNNISPLGAPKKK	MBF1	S	143	1.00	1.67	1.36	1.61	1.99	1.00	1.39	1.18	1.28	1.31
RARAGSGPRANVARSQGQINAARRQLVVS	MBF1	S	28	1.00	2.18	2.23	3.25	3.75	1.00	1.81	2.12	2.79	3.44
ARRQGLVSVDKKYGSTNTRGDNEGRLTKV	MBF1	S	50	1.00	2.18	3.08	3.60	3.66	1.00	1.38	2.46	2.57	2.81
QGLVSVVDKKGSTNTRGDNEGRLTKVDRE	MBF1	T	53	1.00	2.04	2.54	3.81	3.78	1.00	1.12	2.72	2.36	3.15
HHASKVDRKKAIRASASTAIMETKRNNKKA	MBP1	S	133	1.00	1.86	2.08	1.42	1.45	1.00	1.29	1.83	1.66	1.35
AAISYATGNRAALIGSLGFIKTVKGGMGNN	MCA1	S	325	1.00	2.40	1.99	1.60	0.80	1.00	3.97	2.92	2.86	2.10
RVHMRRNDIHTSLSPPRIVDFDTRSGVNT	MCM4	S	145	1.00	1.27	1.29	1.68	1.68	1.00	0.55	0.71	0.62	0.64
GERSFISQEVVLPDSEDETQVVKTKGNAD	MDG1	S	160	1.00	1.62	1.31	1.79	1.12	1.00	1.16	1.15	1.26	1.43
AFKDPYDTLGLKKSATGAEIKKAYYLAKKY	MDJ1	T	73	1.00	1.88	3.33	4.83	7.82	1.00	1.51	2.64	5.43	7.52
ADGKRVAEQVRRVDSVATRSIASVESTPT	MDR1	S	862	1.00	1.75	1.54	1.73	1.73	1.00	1.21	1.09	1.35	2.04
QKQGMAKKEGTPKTSDFIDGTAKEVGDEAD	MED4	S	242	1.00	0.85	1.21	1.05	0.84	1.00	1.92	1.65	1.61	1.35
GSAQATHTQTAPRTNTFTLLTSPDSAKISKE	MEH1	T	140	1.00	3.19	3.60	4.83	4.47	1.00	2.08	2.62	2.72	2.82
THQTAPRTNTFTLLTSPDSAKISKEQLKLL	MEH1	T	145	1.00	2.55	3.08	4.00	3.57	1.00	1.42	1.69	1.71	1.74
NNRQRNPHFLTQRNFTLSQYDQSKSRFSS	MET4	T	206	1.00	2.13	3.33	2.99	2.97	1.00	2.80	3.91	4.51	4.15
ASSDHHKNSLKRSHSGDLKKNKVPVDRKYS	MET4	S	549	1.00	0.52	1.06	0.90	1.29	1.00	1.78	1.72	2.31	2.36
SGDLKKNKVPVDRKYSNEDDEYDDADLHG	MET4	S	564	1.00	0.82	1.22	0.99	0.94	1.00	1.35	1.43	1.45	1.27
DSDDTYEENNGEIHSLHGLEKNTTFEEDLV	MBF1	S	196	1.00	1.14	1.39	1.51	1.47	1.00	1.08	1.55	1.33	1.34
TKKKNPRLKLSLSANDEDFRKISPPSD	MBF1	S	319	1.00	1.75	1.92	1.66	1.43	1.00	2.57	3.65	2.66	2.12
LSANDEDFRKISPPSDILPKVGRRSVSRGY	MBF1	S	333	1.00	2.73	3.20	3.50	3.68	1.00	1.57	2.65	2.47	2.62
GINSKGGTPLETRTADSLNNSYKQVKGD	MGM101	T	83	1.00	2.14	3.54	2.36	2.31	1.00	2.38	3.37	3.38	2.52
IKSSASPTTKNRRASFSLHNDKQPAKSLA	MHP1	S	309	1.00	1.87	1.26	1.50	1.53	1.00	0.76	0.94	0.93	1.05
ILSSNDKGRHRSVAASLLMDNQRANAGSTV	MHP1	S	85	1.00	1.36	1.23	2.11	1.99	1.00	1.00	1.00	1.15	1.32
RKTKFEIGESGNDPVMVSSPKTMAKIPVSV	MIG1	Y	175	1.00	2.83	2.55	2.65	2.23	1.00	1.87	1.44	1.34	1.32
FEIGESGNDPVMVSSPKTMAKIPVSVPPP	MIG1	S	179	1.00	2.70	2.46	2.59	2.20	1.00	1.53	1.33	1.22	1.23
SNSHSGSRLKLNALSSQMMTPIASSAPRTV	MIG1	S	231	1.00	1.68	1.59	1.88	1.53	1.00	1.68	1.50	2.18	2.24
GSRLKLNALSSQMMTPIASSAPRTVFIDG	MIG1	T	230	1.00	1.26	1.33	2.28	3.27	1.00	1.27	1.11	1.18	1.30
QLQQQNSLSPRYNTVILPRPSLTDFOGL	MIG1	T	276	1.00	1.82	2.51	4.45	5.48	1.00	1.24	1.38	1.95	2.38
ANPNNGSLRAQTQSSVQLKRPSSVLSLNDL	MIG1	S	303	1.00	3.43	3.11	3.49	3.26	1.00	2.44	2.07	2.42	2.38
LHQHQIPQQYQHTASPSVAKQKQTFVHSLA	MIG2	S	231	1.00	2.94	1.96	2.46	2.05	1.00	0.75	1.05	0.76	0.87
PSVAKQKQTFVHSLASALSTLQKRTVPSAPS	MIG2	S	247	1.00	1.48	1.61	2.67	4.87	1.00	1.81	1.91	3.03	3.90
_____MARSRGSSRPISRSRPTQTRSA	MIX17	S	7	1.00	3.53	3.79	4.92	7.33	1.00	2.34	5.79	9.65	13.93
_____MARSRGSSRPISRSRPTQTRSA	MIX17	S	8	1.00	7.72	5.89	6.26	6.58	1.00	2.17	2.37	2.78	3.73
LPPTAKQNVLRPMTPSAIAQGAHDRSLDN	MKS1	T	128	1.00	3.17	3.82	3.94	3.84	1.00	1.58	2.21	2.85	2.74
NDVKNDVAPNRQFSKSTTSLGFSNFADKQYK	MKS1	T	164	1.00	1.80	1.99	2.33	2.21	1.00	1.68	2.04	2.49	2.18
VKNDVAPNRQFSKSTTSLGFSNFADKQYKMK	MKS1	T	166	1.00	9.16	6.90	5.57	4.28	1.00	3.24	4.17	4.31	3.70
LENMGRSKSSFPQKESLGRPRSYKNDQNGQ	MKS1	S	257	1.00	4.43	4.24	2.79	2.45	1.00	3.71	3.67	3.24	2.14
_____MCVYKSNNSNPSFIFERTVQEASS	MLF3	S	11	1.00	1.30	0.97	0.85	0.63	1.00	1.69	1.24	1.25	1.24
LPSSSPASPDCLKLSRSHSAAATRPTLNN	MLF3	S	189	1.00	1.07	0.80	0.73	0.63	1.00	2.55	1.52	1.66	1.62
YVDMLNDEKLAQANNTPSRPPMKSQAYSCP	MLF3	T	244	1.00	2.08	1.72	1.80	1.50	1.00	2.28	1.89	1.98	2.06
NNTPSRPPMKSQAYSCFILKRSPPQAYSS	MLF3	S	257	1.00	2.23	1.85	2.12	1.65	1.00	2.47	2.16	2.40	2.74
SNPSFIFERTVQEASSNDFLQPPVASNTS	MLF3	S	26	1.00	1.61	1.42	1.71	1.49	1.00	1.43	1.45	1.21	1.53
TFSNPFIKTTELPAATSPYVSPQASARQYSSN	MLF3	S	293	1.00	1.63	1.81	2.03	1.63	1.00	2.06	2.12	2.54	2.52
SNPFIKTTELPAATSPYVSPQASARQYSSNAN	MLF3	Y	295	1.00	3.38	3.87	3.90	2.89	1.00	4.67	5.45	6.57	6.30
YSNNANNNAKSPKNRSSILFQRQSILSNVD	MLF3	S	320	1.00	1.06	1.06	1.55	1.67	1.00	1.24	1.17	1.46	1.87
EVRTPSLRKNSNNSPLDNVPTSRASANS	MLF3	S	79	1.00	1.38	1.22	2.02	2.22	1.00	1.43	1.18	1.22	1.37
RNSVLRTPAVLRRGITTLTPVSTKLAPPAAS	MMF1	T	19	1.00	3.83	4.85	4.21	3.73	1.00	4.98	5.71	8.27	8.83
_____MFLRNSVLRTPAVLRRGITTL	MMF1	S	6	1.00	1.65	1.71	2.54	2.86	1.00	1.23	0.82	1.65	2.63
KNAEGLPSYVVPVATPLEDPENHGVKRVED	MMR1	T	199	1.00	1.30	1.34	1.52	1.69	1.00	1.14	1.16	1.01	1.26
NSARIPCPKTRLARVSLDLKIEEQDSSV	MMR1	S	414	1.00	1.24	1.48	1.40	1.43	1.00	1.54	1.52	1.95	1.76
_____MSLRILAKRSSIWMKTRVTPALISP	MNP1	S	11	1.00	4.32	3.92	3.00	2.53	1.00	3.73	3.53	3.13	2.61
LKRRKSVHKSFDVENSPTDRRQSNANNDVVI	MNR2	S	175	1.00	2.00	1.72	1.67	1.51	1.00	1.50	1.49	1.33	1.22
KRIRRTTGIPKFLKSIDPETMTPPEEMAQ	MPE1	S	221	1.00	1.46	1.63	1.95	1.73	1.00	1.46	1.47	1.53	1.55
YSELRKEGIVSGRKTFGDSDSDSGSRKRF	MPP6	T	114	1.00	1.83	1.95	2.55	3.30	1.00	0.85	1.32	1.53	1.99
KDKFTGSQDDGEDEYDLKLFKDSIKKKT	MPP6	Y	158	1.00	1.46	1.29	1.24	1.33	1.00	1.43	1.63	1.88	1.94
KGKFLGLDSSAWDLNSYKDDLKISGKKEKK	MPP6	S	65	1.00	3.88	5.40	8.36	12.33	1.00	3.71	5.28	7.62	9.48
KTKTNSNKLFEFGQDSFDN	MRC1	S	1093	1.00	1.16	1.60	1.10	1.15	1.00	2.28	2.57	2.44	1.70
YDGGEELEKSEVKDNSYSEKNSVSSFTQQR	MRC1	S	112	1.00	0.90	1.27	0.90	0.94	1.00	4.64	2.94	3.35	2.61
PGATQRIDSSGATSQTIKQSIPEQSQIIT	MRC1	T	191	1.00	0.77	1.04	1.08	0.85	1.00	2.31	1.51	1.47	1.44
KSLFLKSNYEDFETDKELSRIOHGNDDEAI	MRC1	T	932	1.00	1.19	1.70	1.17	1.17	1.00	2.89	2.42	2.71	2.29
KAPVASPRPAATPNLSKDKKSKSKSKSKSK	MRH1	S	299	1.00	0.90	1.19	1.06	1.11	1.00	0.74	1.51	2.08	2.16
GRNSRQGGIRLSSPSASSSLANREFFRDM	MRL1	S	337	1.00	1.99	1.95	1.65	1.26	1.00	1.62	2.09	1.71	1.17
LQESLGSMPFRQRGNSISIGVKCYFTDREI	MRPL1	S	226	1.00	1.31	1.23	1.33	1.34	1.00	1.42	1.28	1.40	1.67
TTKSIVKSLGLGKRGSIYVKVNPAAIGSLA	MRPL33	S	33	1.00	1.46	1.44	1.24	1.66	1.00	1.61	1.09	1.65	2.39
IHLPMEDMKKLCSGVTIRNIKPLQPELILV	MRP58	T	114	1.00	3.31	3.28	3.72	3.28	1.00	1.98	1.90	2.26	2.57
PPGYTTNGSRMNSMTSGANVRRNYGKNKSTA	MSC3	S	130	1.00	1.79	1.47	1.84	1.81	1.00	1.17	1.19	1.19	1.10
TVKTTQVTDPSGRTQSIKTKIRKINGYEVV	MSC3	S	172	1.00	1.64	1.19	1.22	0.97	1.00	1.96	1.56	1.56	1.41
AKRNVYHTDAASDNASAPLGSNKRKSRMGQ	MSC3	S	367	1.00	1.87	1.60	1.65	1.43	1.00	1.40	1.23	1.25	1.28
SRKSRMGQKMTLRSSSDSPTATANLVKSNVE	MSC3	S	390	1.00	1.67	1.51	1.97	1.80	1.00	1.27	1.25	1.23	1.16
KSRMGQKMTLRSSSDSPTATANLVKSNVEVQ	MSC3	S	392	1.00	1.51	1.57	2.02	2.63	1.00	1.22	1.33	1.66	1.93
RMGQKMTLRSSSDSPTATANLVKSNVEVQPK	MSC3	T	394	1.00	6.13	6.62	6.31	5.25	1.00	9.31	10.79	12.61	14.08
ANLVKSNVEVQPKRFTSSFRNTKSPAPHEV	MSC3	T	412	1.00	6.56	7.44	8.20	7.85	1.00	2.70	3.87	4.58	3.96
NLVKSNVEVQPKRFTSSFRNTKSPAPHEVH	MSC3	S	413	1.00	2.93	3.15	3.96	3.96	1.00	1.39	1.34	1.50	1.42
ASAASPDRTNYSRSHSLVSHAPRQRSSV	MSC3	S	57	1.00	1.43	1.29	1.22	1.05	1.00	1.81	1.17	1.26	1.29
QENYQHQKKEQGEQTPVTRNAEESFPAASI	MSC3	T	573	1.00	3.74	4.11	7.85	12.18	1.00	1.29	1.60	1.62	1.58
GNVPTSAVASTTRRSPPELQDNLKSSSSLLQ	MSC3	S	648	1.00	1.59	1.23	0.90	0.60	1.00	1.19	0.72	0.55	0.56
IPRQRSVSPGRRLTSSAAPPTSRAAAKQ	MSC3	S	80	1.00	1.71	1.32	1.26	1.14	1.00	1.38	1.23	1.32	1.28
PLSSFSEKPHLNRVHLSVKTKDLKLGKRG	MSG5	S	151	1.00	1.98	2.50	1.77	1.09	1.00	0.97	1.11	0.96	0.69
KVSPRPTPPLSMRREASISYTLPTSLKNT	MSG5	S	98	1.00	2.60	2.72	2.11	1.77	1.00	3.47	3.61	2.90	2.34
TTEPKSTTDEDLSSQSRNHRKRRVNYAES	MSH6	S	130	1.00	2.12	1.70	2.27	1.81	1.00	1.32	1.37	1.34	1.27
SRPNQAPSRSYNPSHSQPSATSKSKFNKQN	MSH6	S	258	1.00	1.85	1.89	2.71	2.72	1.00	1.46	1.59	1.41	1.83
QSLLSFFSKQVPSGTPSKVKQKPTATLEN	MSH6	T	42	1.00	1.87	1.56	1.42	1.23	1.00	1.57	1.32	1.20	0.98

ADSNKNRDARTIENDSEIKSTNNASGSGANQ	MSN2	S	110	1.00	1.34	1.47	1.95	2.46	1.00	2.36	1.74	2.04	2.46
NQFPMSMTRNSRSHSLDLWNHPKINPSNRN	MSN2	S	308	1.00	2.08	1.58	1.51	1.28	1.00	1.02	0.79	0.58	0.64
LGTSTSGKNKSCAPSFDDANAMTKINPSQQL	MSN2	S	398	1.00	1.09	0.89	1.01	1.05	1.00	2.65	2.04	2.15	2.36
KQLTSSHNNSSTNMKSFNSDLYSRRLSLP	MSN2	S	438	1.00	1.65	1.82	2.54	1.58	1.00	1.83	1.70	1.79	1.66
TSSHNSSTNMKSFNSDLYSRRLSLP	MSN2	S	441	1.00	1.11	1.12	1.28	1.35	1.00	1.48	1.43	1.43	1.55
NGKKNKGDKIYSSVATPQALNDELKLEQLE	MSN4	T	142	1.00	3.39	2.72	2.49	2.01	1.00	4.47	3.23	3.33	2.88
ASAAKATSGVDNITPFAFQRSSYDISMN	MSN4	T	479	1.00	1.81	1.68	2.09	2.21	1.00	1.76	1.83	2.14	2.52
VSPNTRRRKSSSVLSPHSHNNNGKVPVQ	MSN4	S	537	1.00	3.78	3.84	3.92	2.71	1.00	1.29	1.36	1.17	1.14
VKHDMKQNSRHFSFNSRRKASSEDPMGT	MSO1	S	102	1.00	2.57	1.76	2.02	2.33	1.00	1.40	1.27	1.50	1.71
HDMKKQNSRHFSFNSRRKASSEDPMGT	MSO1	S	104	1.00	1.88	1.84	2.66	3.51	1.00	0.85	1.67	2.08	2.85
PSSNGTPEYTPASKSFQDIYNNHSTSSSAT	MSO1	S	133	1.00	1.90	1.89	2.44	3.01	1.00	0.97	0.86	1.04	1.44
GQEFASLGRSKTSNSFNSTPTPPPDPASS	MSO1	S	177	1.00	1.76	1.28	1.34	1.19	1.00	1.77	1.17	1.35	1.52
FRASLGRSKTSNSFNSTPTPPPDPASSGVM	MSO1	T	180	1.00	2.50	1.64	1.88	1.37	1.00	1.88	1.39	1.45	1.72
KILDQVQKHMKKQNSRHFSFNSRRKASS	MSO1	S	96	1.00	2.84	2.56	2.66	2.36	1.00	1.48	2.26	1.97	2.32
SAVTATSTTIKQRNTQDNLPIPHFASKH	MSS4	T	222	1.00	2.09	1.55	1.80	1.97	1.00	1.07	1.12	1.17	1.68
LHLTTSTRKTEQEPSLHSAIERHQDRSV	MSS4	S	29	1.00	1.09	1.28	1.96	2.33	1.00	0.75	0.92	1.00	1.29
NTTTTTAATGLKRSEATAEIKKMRQSLHK	MSS4	S	341	1.00	2.89	2.92	3.38	3.13	1.00	1.34	1.98	1.87	1.73
GHPNNGITPVEKPSVADGELGNSKQLQF	MTC1	S	273	1.00	0.82	1.28	1.19	1.35	1.00	1.36	2.00	2.55	2.13
DKMGQDATVPIQPNNTGNRRNPDMNKPRL	MTR2	T	125	1.00	0.91	1.04	0.74	0.80	1.00	1.49	1.05	1.33	1.46
IVPTIQRPDVTRSNSYDGFRTVDFSLLKNI	MUK1	S	475	1.00	1.33	1.61	1.41	1.26	1.00	1.35	1.89	1.65	1.32
KFDARCGWPAFYEEVSPGAIYHNDLSLMPA	MXR2	S	107	1.00	1.40	1.28	1.61	1.72	1.00	1.37	1.37	1.62	1.93
LAKALMAGESNMNFTTKKEGRCLFPHCP	NAB2	T	254	1.00	1.42	1.34	1.23	0.99	1.00	1.53	1.37	1.16	1.12
SDPEYALKSQTLRSSSQTVINSKRPKIEDE	NAB6	S	1018	1.00	1.65	2.13	2.55	2.37	1.00	0.83	1.20	1.31	1.25
QQQHVSGNNDYNSRSSSLNNEVDSRFLSKG	NAM8	S	258	1.00	1.60	1.31	1.01	0.65	1.00	2.76	1.92	1.93	1.64
IRTKPKSSMQIDNAPTPHNPASVLNPSYK	NAP1	T	20	1.00	2.26	2.21	1.87	1.51	1.00	1.35	1.78	1.25	1.08
INEEDILANQPLLQSIQDRLGSLVGDQSGY	NAP1	S	69	1.00	2.29	2.62	2.15	1.27	1.00	2.40	3.24	2.52	1.66
SLPMLPSEATLTKHLSQDQSTKSNNTADEIV	NBA1	S	147	1.00	1.25	2.11	2.42	2.16	1.00	1.74	1.89	2.22	1.77
QEKVMRSISGSGNLASESSSTYNTKFHQSI	NBA1	S	213	1.00	1.65	2.08	2.32	2.18	1.00	2.98	2.46	2.30	1.99
PNEDSRVTSNLRDDBTLKAHDRANHTST	NBA1	T	373	1.00	1.35	1.67	2.12	1.18	1.00	1.85	1.33	1.57	1.91
TNKQDDMYEDIIEETPKTKLKKDKTKKLN	NBA1	T	403	1.00	0.74	0.90	0.74	0.66	1.00	1.57	1.26	1.10	0.91
RENDEIKPLKIDLSPRIRNTLSFTSSPMK	NBP1	S	253	1.00	0.44	0.61	0.38	0.49	1.00	1.19	1.38	1.15	0.70
SNGAFSGSFSKRRRTGQVGPVTISQV	NCE102	T	162	1.00	1.83	1.60	1.99	1.92	1.00	0.93	1.60	1.67	1.50
FLVASPEQKFEFLDPSPTNFNFHKTPAKT	NDD1	S	168	1.00	2.20	1.58	1.67	1.30	1.00	2.03	1.63	1.18	1.45
TGTSALQIPELPMKFSRSDTGINPISSNT	NDD1	S	437	1.00	2.13	2.20	2.72	2.50	1.00	2.12	2.11	2.54	2.65
RSDTGINPISSNTVFSKSGSNNSKGRK	NDD1	S	454	1.00	5.44	4.29	3.73	2.18	1.00	4.44	3.24	3.09	2.50
SNSNVTKRASKLRQSLSDSGSKSQARK	NDD1	S	525	1.00	1.75	1.60	1.43	1.12	1.00	2.15	1.75	2.00	2.02
SNVTKRASKLRQSLSDSGSKSQARKSC	NDD1	S	527	1.00	2.32	1.87	2.15	1.79	1.00	2.24	1.80	2.14	2.06
RRVVNTPREPVRSSKIEAPSPVSKINA	NET1	S	1026	1.00	0.68	1.03	1.58	1.77	1.00	1.22	1.17	1.62	1.93
SSILHDLPRKVRPSLSDLVSRGIPDVKE	NET1	S	1084	1.00	2.48	3.14	3.53	2.47	1.00	2.20	2.29	2.79	2.66
SILHDLPRKVRPSLSDLVSRGIPDVKEK	NET1	S	1085	1.00	1.09	1.23	1.85	2.23	1.00	1.21	1.08	1.72	2.46
LHDLPRKVRPSLSDLVSRGIPDVKEKTS	NET1	S	1087	1.00	2.07	2.42	3.18	2.16	1.00	1.84	2.12	2.49	2.28
SGDSSDDGKSFISAKASAAALGKKKPSGGF	NET1	S	1164	1.00	1.09	1.11	2.09	3.73	1.00	1.25	1.20	1.66	1.81
VSNNSDDEDEDIGERSFLPPPTQPSPIRI	NET1	S	242	1.00	2.43	1.85	3.00	2.11	1.00	1.08	1.40	1.27	1.91
EPRISEIEKELKEGPPSPASILPAKAAKIPM	NET1	S	384	1.00	3.19	2.12	3.86	3.17	1.00	1.05	1.12	1.01	1.13
ETPEPEHASKASLQRSQSIADNNGSPVKNS	NET1	S	437	1.00	0.86	0.91	1.27	1.45	1.00	1.66	1.42	1.83	2.10
PETEPEHASKASLQRSQSIADNNGSPVKNSPL	NET1	S	439	1.00	1.43	1.27	1.35	1.16	1.00	3.84	3.44	3.82	3.33
DNDEVDTTVRVPPQSDSSSFPKDLFKMIE	NET1	S	611	1.00	0.96	0.99	1.07	0.87	1.00	1.39	1.24	1.53	1.71
VDTTVRVPQSDSSSFPKDLFKMIEGDIT	NET1	S	615	1.00	1.17	1.32	1.48	1.21	1.00	1.26	1.27	1.55	1.67
NMSVPNNGPKDISLSLKGSSVVPVKDSKIN	NET1	S	747	1.00	1.29	1.49	1.57	1.44	1.00	2.40	1.68	2.81	2.83
NDKRDSQKKSVAESSVTSNKSIEQMAKSFY	NET1	S	785	1.00	1.03	1.16	1.34	1.15	1.00	1.51	1.42	2.22	2.37
ESSVTSNKSIEQMAKSFYPSNKKQNEATKV	NET1	S	798	1.00	9.96	15.56	16.26	6.94	1.00	12.70	14.99	31.74	27.18
PVVGSGSPVATKGTTSFNEEGNRKNVTKAK	NET1	S	840	1.00	6.14	5.69	7.26	5.37	1.00	8.99	8.02	11.29	11.96
EEGNRKNVTKAKNESAQDRQKQETTSRVA	NET1	S	858	1.00	1.00	1.29	1.54	1.60	1.00	1.79	1.62	2.37	2.68
KNESAQDRQKQETTSRVAADLKSANIGGEDL	NET1	S	870	1.00	2.02	2.63	3.42	2.56	1.00	2.51	2.67	4.91	6.18
SANDKLDLKAFTNSKTLVPPGIISNEKNN	NET1	S	959	1.00	1.73	2.20	2.90	3.44	1.00	2.98	3.22	5.00	5.60
TNLSSSGGRLKRITPTSLGKIHSLVDKKG	NHA1	T	765	1.00	1.88	1.50	2.03	1.94	1.00	1.28	1.38	1.44	1.70
HKSDDKSKNRPRNDSVSRALTAVGLKSKA	NHA1	S	830	1.00	4.76	3.02	3.57	3.32	1.00	3.35	3.00	2.95	3.44
SKNRPRNDSVSRALTAVGLKSKANSVPPP	NHA1	T	837	1.00	6.54	5.62	9.44	9.71	1.00	10.42	14.43	15.87	17.90
TTRKKKDPNAPKRALSAYMFFANENRDIRS	NHP6A	S	26	1.00	1.32	1.49	2.08	2.65	1.00	0.90	1.06	1.14	1.27
_____MVTTPREPKRTRRKKKDP	NHP6A	T	3	1.00	1.54	1.30	1.71	2.30	1.00	1.47	1.57	2.32	2.92
ANENRDIRSENPDITFGVQKKGKLEKWKAL	NHP6A	T	47	1.00	1.05	1.13	1.85	2.56	1.00	0.91	0.95	1.14	1.24
QFTQWSNYKMRSRPTINAKPIRHSTQRRTD	NIS1	T	127	1.00	1.51	1.93	2.04	1.73	1.00	1.47	1.57	1.71	1.38
SGSSPDKMANLQRAATFIERAMKEQPDKLV	NIT3	T	34	1.00	1.97	2.30	2.07	1.72	1.00	1.66	2.27	2.53	2.51
WQKSTEDLYEFRSSATPQVQKDSGKGNVYL	NNK1	T	161	1.00	1.29	1.32	1.28	1.30	1.00	1.48	2.00	1.64	1.89
SNFQWNNRGNRYSVASPLSKNSQKRYGKKGH	NOB1	S	367	1.00	1.93	2.48	1.64	1.55	1.00	1.44	2.02	1.33	1.03
GKEIRNKGNLIRAAFSQDSTIPDARVQDR	NOG2	S	60	1.00	2.85	4.55	4.74	3.91	1.00	4.17	8.51	6.28	4.30
RVQDRRWFGNTRVISQDALQHFRSALGETQ	NOG2	S	85	1.00	1.66	1.98	2.46	2.72	1.00	0.82	1.14	1.21	1.12
TESGEITSAHPARFSPDDKYSRQRVTLKKR	NOP10	S	36	1.00	1.84	1.29	1.33	1.37	1.00	1.10	1.01	1.04	1.02
TKSAHPARFSPDDKYSRQRVTLKKRFGLVPG	NOP10	S	42	1.00	1.98	1.65	2.08	1.62	1.00	0.69	0.80	0.79	0.80
KLEELASRPVIRKERSQSEREEEWLEKLYK	NOP16	S	176	1.00	1.45	1.82	1.23	1.21	1.00	2.67	3.53	2.99	1.73
EELASRPVIRKERSQSEREEEWLEKLYKHG	NOP16	S	178	1.00	1.66	2.27	2.24	2.91	1.00	1.62	2.11	2.37	2.18
DGKKAFFKLVQIGSGLHFRTQDDASAKED	NOP19	S	73	1.00	2.01	4.00	5.83	11.15	1.00	1.45	2.63	4.09	4.09
LQIGSGLHFRTQDDASAKEDIHTIGFIEGD	NOP19	S	84	1.00	0.96	1.13	1.61	2.93	1.00	1.23	1.33	1.74	1.90
SSRKGKAWRKNIDLSDVEQYMEKKIDHEIT	NOP53	S	31	1.00	1.53	1.82	2.29	2.52	1.00	0.99	1.50	1.67	1.51
NQKIAKTATAAQSTGDNKPVPAIHPPDR	NOP6	S	3	1.00	0.99	1.25	1.26	1.35	1.00	1.61	1.50	1.96	2.05
_____MGSEEDKLTQKQKAAQ	NOP6	S	205	1.00	1.23	1.47	0.90	0.97	1.00	1.66	1.59	2.20	2.16
SKEKAYSNISLKKSETLDPQERERRDISEYL	NOT3	T	113	1.00	2.37	3.42	3.25	3.38	1.00	1.48	2.59	2.11	2.01
TFPGEERTKGEVENSAPDLQRRYQEQAMQQV	NPA3	S	352	1.00	0.99	1.52	2.21	3.68	1.00	0.83	1.48	1.48	2.12
LQKASMDSNANATQSRISRSRGSFSSQLGN	NPR1	S	249	1.00	1.78	1.31	1.41	1.65	1.00	1.43	1.33	1.53	1.57
PRTSADTLTTTPESQSLDLHSRKNSSSHIGS	NPR1	S	36	1.00	3.27	2.61	3.02	2.21	1.00	1.34	1.41	1.13	1.24
SLDLHSRKNSSSHIGSVNSSSSDRNRANVP	NPR1	S	51	1.00	3.33	2.45	1.76	1.32	1.00	0.75	1.25	0.82	0.71
NKEEKLFGSGTKTASQIALNESAKSYNTAI	NPR3	S	76	1.00	1.66	1.73	2.26	2.04	1.00	1.32	1.35	1.64	1.96
ERERERYNRRNRSPAPPFSQSTGRKDR	NRD1	S	265	1.00	1.83	2.14	1.93	1.53	1.00	1.87	2.30	2.20	1.68
HSKSEPLTRRRKLVLSQGHYKTPARSKIKTP	NRM1	S	157	1.00	2.58	2.31	2.46	2.52	1.00	1.84	1.54	1.85	1.96
IKSLMVSPEVYENTKSLPVLPLMRSSGGGMAC	NRM1	S	63	1.00	4.65	4.79	5.47	5.30	1.00	7.12	8.14	11.70	11.92
EYENTKSLPVLPLMRSSGGGMACASKSSCQD	NRM1	S	71	1.00	2.24	2.16	1.98	1.93	1.00	2.39	2.16	2.54	2.52
QPSSTGLDKAQEILSFPFQSKNKPAPGPDWN	NRP1	S	345	1.00	1.56	1.80	2.58	3.38	1.00	1.13	1.35	1.17	1.13
ALTYNRAHFPAITPLSRQNSLNMAPSNSGSP	NRP1	S	455	1.00	2.34	2.31	2.40	2.17	1.00	1.79	1.90	1.96	1.59
FGTATSDNKTTNTPSFSFGAKSDENKAGAT	NSP1	S	283	1.00	1.49	1.67	2.02	1.92	1.00	2.79	1.68	2.23	2.67

TATSDNKTNTTTPSFGAKSDENKAGATSK	NSP1	S	285	1.00	2.17	2.56	3.55	3.36	1.00	2.25	1.71	2.00	1.88
KPEEKDDNSKPAFSGAKSNEDKQDGTAK	NSP1	S	323	1.00	1.71	1.97	2.79	2.81	1.00	2.41	1.74	2.27	2.49
KPAEKNNNETSKPAFSGAKSDEKDKGDASK	NSP1	S	361	1.00	1.56	1.86	2.52	2.56	1.00	1.69	1.50	1.76	1.82
ESDESKAFSGKPTGKEEGDGAKAAISFG	NSP1	T	557	1.00	4.56	7.06	7.25	6.32	1.00	8.35	13.81	16.73	19.89
KPTGKEEGDGAKAAISFGAKPEEQKSSDTSK	NSP1	S	570	1.00	1.51	1.69	2.37	2.21	1.00	1.83	1.23	1.59	1.83
ILNSHFDALRSLDDNSTLEKQINSIKK	NSP1	S	811	1.00	1.68	1.80	2.17	1.83	1.00	1.83	1.63	2.04	2.43
SGANTAPLGRSRNTASFAGSKTFD	NSR1	S	405	1.00	3.31	5.77	4.69	4.14	1.00	4.58	6.77	8.21	5.56
EEWETQLLSKGNINKSNEKIITPLPVLPDD	NTR2	S	255	1.00	2.32	3.02	3.65	4.38	1.00	2.54	3.71	5.63	6.59
VSDLVKDLGSLVLETNFKRHLDMMKNTTMTQ	NUD1	T	147	1.00	2.39	2.65	3.14	1.90	1.00	1.98	2.81	2.13	1.57
NGSCTRQLAGKSGEDTNVGLPKLSLKNRSN	NUP1	T	180	1.00	1.09	1.06	1.54	1.65	1.00	1.11	1.12	0.94	1.09
GKTDKSTKTAEAPLTSFNFSQKANKTKAVDN	NUP1	S	383	1.00	5.95	6.02	7.35	4.83	1.00	4.10	4.04	4.51	4.25
HTKPSPTATVKKPTFTFGQSTSENKISEG	NUP1	T	570	1.00	5.58	7.11	8.24	8.53	1.00	2.39	2.24	2.77	2.60
TSENKISEGSAKPTFSFSKSEERKSSPISN	NUP1	S	592	1.00	3.98	4.35	6.00	3.25	1.00	5.74	3.81	4.41	4.30
DVQAPTDDKTLKPTFSFTEPAQKDSVVSEPE	NUP1	S	637	1.00	3.88	5.48	6.18	5.06	1.00	3.76	5.14	6.20	5.96
ASTAAANTEKLSNGFSFTFNHNKESNSPT	NUP1	S	754	1.00	1.77	1.58	1.55	0.99	1.00	2.42	1.78	1.97	1.83
DIEIKGPEKFGSGTVSSDVFKLNPSTDKNK	NUP2	S	223	1.00	2.73	4.52	6.82	9.33	1.00	3.26	5.85	10.50	11.92
KTETNAKPFSSATSTTEQTKSNPLSLTE	NUP2	S	254	1.00	1.25	1.39	2.32	1.99	1.00	1.17	1.11	1.52	1.73
EATKTNVDNNSKAEASFTFGTKHAADSQNNK	NUP2	S	284	1.00	1.33	1.46	1.62	1.41	1.00	1.45	1.43	1.70	1.74
FVFGQAAAKPSLEKSFSTFGSTTIEKKNDEN	NUP2	S	317	1.00	4.98	5.35	5.63	5.71	1.00	7.01	5.65	7.30	7.66
FGQAAAKPSLEKSFSTFGSTTIEKKNDENST	NUP2	T	319	1.00	3.33	5.52	7.78	7.82	1.00	2.98	4.16	5.64	5.43
AAAKPSLEKSFSTFGSTTIEKKNDENSTNS	NUP2	S	322	1.00	2.79	2.80	4.54	3.29	1.00	2.19	1.63	2.19	2.36
NSKPEKSSDNDNSPFSFSIPSKNTPDASK	NUP2	S	351	1.00	3.32	3.44	3.71	2.56	1.00	2.45	2.26	2.59	2.77
KPEKSSDNDNSPFSFSIPSKNTPDASKPS	NUP2	S	353	1.00	2.95	3.03	3.08	2.04	1.00	2.63	2.45	2.83	2.96
SFSIPSKNTPDASKPSFSGVPSNSKNETSK	NUP2	S	368	1.00	1.69	1.90	1.72	1.34	1.00	4.33	2.91	3.76	3.70
SKNETSKPVFSFGAATPSAKEASQEDDNNNV	NUP2	T	392	1.00	1.05	1.53	1.75	2.35	1.00	1.64	1.35	1.71	1.63
KPFGSAKSDETKQASSFSLNRADGTGEAQV	NUP2	S	66	1.00	4.55	4.04	4.47	3.03	1.00	3.91	4.26	4.98	4.56
FGSAKSDETKQASSFSLNRADGTGEAQVDN	NUP2	S	68	1.00	6.17	5.76	5.78	3.72	1.00	6.38	6.13	6.92	5.60
TKQASSFSLNRADGTGEAQVDNSPTTESNS	NUP2	T	76	1.00	2.53	2.66	3.29	3.44	1.00	2.04	2.43	3.12	3.13
TSKVRNAEFKVKNSSTSFKNPRRLEIKDGRS	NUP53	T	412	1.00	2.52	4.31	3.57	4.13	1.00	2.14	4.05	6.43	7.45
SIGSRKYSFNYSLLSPYKTYVRYSAAKKI	NUP60	S	222	1.00	2.34	1.95	2.45	2.21	1.00	1.65	1.33	1.20	1.09
QLNATKISPSAPSKDFTTKYPARSSLSRNS	NUP60	S	360	1.00	5.01	5.28	5.98	3.99	1.00	5.38	5.11	6.80	7.04
KKDGGDKPPSAFNFSFNTRNVEPTENAYK	NUP60	S	400	1.00	2.41	2.55	2.20	1.59	1.00	2.27	2.18	2.25	2.00
TELTKGDSTVPQDLSVTPQKSSSGKGFVNS	NUP60	S	458	1.00	1.67	1.34	1.45	1.05	1.00	1.14	1.01	0.98	0.93
VSPRNNVANKQPRNESFNRRISSMPGGYFHS	NUP60	S	63	1.00	1.66	1.63	1.95	1.48	1.00	1.33	1.12	1.41	1.68
VANKQPRNESFNRRISSMPGGYFHSSEIPDS	NUP60	S	69	1.00	1.25	1.21	1.68	1.72	1.00	1.11	0.92	1.12	1.36
YNDGERAVLQFGKNRSEIILSYKDMNVLEG	NVJ1	S	156	1.00	1.26	1.44	1.59	1.83	1.00	1.25	1.90	2.46	2.70
QERNNSPLKRLKNNTG DANTEAAARSVQVG	OM45	T	207	1.00	1.96	2.09	2.34	3.28	1.00	2.38	2.44	3.92	8.31
IPESIRESTQGSRTSEPFEDKFEIHDR	OPY2	S	348	1.00	1.68	1.65	1.58	2.00	1.00	1.08	1.04	0.99	0.91
NDHEAGRKAIEQLNYTPIKGRLCRIMWVSQRD	PAB1	T	102	1.00	1.72	1.80	2.49	3.11	1.00	1.42	1.39	2.20	3.44
IKGRLCRIMWVSQRDPSLRKKGSGNIFIKNLH	PAB1	S	119	1.00	1.67	2.00	3.17	4.77	1.00	1.52	1.45	5.05	15.74
RIMWVSQRDPSLRKKGSGNIFIKNLHPDIDNK	PAB1	S	125	1.00	1.28	1.59	2.02	2.69	1.00	1.34	1.41	2.78	5.66
QEIVVAPHLRKRERDSQLEETKAHYTNLYVK	PAB1	S	209	1.00	0.68	0.76	0.78	1.02	1.00	0.97	0.66	0.95	1.72
EQDEENKQDENRAADTPETSDAVHTEQKPEE	PAF1	T	422	1.00	0.33	0.47	0.25	0.29	1.00	1.44	1.32	1.55	1.14
_____MENRNSSTSSRPFVNNPFRNATVD	PAL1	S	10	1.00	1.66	1.44	1.48	1.47	1.00	2.04	1.70	1.86	1.87
SRPLSSKNPFLDDVSSATDFRRSPPPVSRNK	PAL1	S	114	1.00	1.44	1.17	0.99	0.91	1.00	2.04	1.81	1.92	1.51
_____MENRNSSTSSRPFVNNPFRNATVDSSIN	PAL1	S	14	1.00	2.04	1.53	1.61	1.60	1.00	2.41	1.95	2.24	2.14
EASSSTPSKKGKRSKIVVPKNVDITDKLD	PAL1	S	227	1.00	2.66	2.37	11.51	3.03	1.00	1.53	1.08	1.93	2.86
TSSRPFVNNPFRNATVDSSINQYKNDSSQFQ	PAL1	T	23	1.00	3.65	3.46	2.82	2.74	1.00	5.24	3.76	4.41	4.49
VDTIDKLDVTLFGGFSFHHGDFPDAVTPHRN	PAL1	S	250	1.00	4.57	4.30	5.39	4.66	1.00	2.35	3.11	3.72	3.55
RPFSVNNPFRNATVDSSINQYKNDSSQFQEWA	PAL1	S	26	1.00	6.58	5.28	3.62	4.24	1.00	2.39	2.29	2.50	2.24
STKKSALDEVFGRDDTDDSDIYQSSQTLRR	PAL1	T	304	1.00	1.53	1.44	1.95	1.84	1.00	1.49	1.22	1.51	2.08
KSALDEVFGRDDTDDSDIYQSSQTLRRGGD	PAL1	S	307	1.00	2.18	1.91	1.94	1.91	1.00	1.83	1.72	1.81	1.78
DIYQSSQTLRRGGDTQDAIKANVGNVQQMD	PAL1	T	323	1.00	18.11	16.93	15.05	12.92	1.00	12.78	11.77	15.75	15.26
TELVHGVPVTAAGLSSFLDGPASSAAIRND	PAL1	T	358	1.00	5.92	5.73	6.43	5.90	1.00	2.24	3.35	3.64	3.54
NYDVGHSGNEGVRRSKTVNSP NRTHKSNYTTD	PAL1	T	436	1.00	1.93	1.89	2.07	1.60	1.00	1.71	1.38	1.85	1.89
SKTVNSP NRTHKSNYTTDFDGGDDHNEDEED	PAL1	T	449	1.00	3.50	3.60	3.39	2.76	1.00	2.39	2.77	2.72	2.70
KTVNSP NRTHKSNYTTDFDGGDDHNEDEEDV	PAL1	T	450	1.00	2.08	2.09	2.11	1.74	1.00	1.49	1.67	1.57	1.46
APSAAFSQNSTNAPRSVHAAVTPAAGKNSTG	PAN1	S	1219	1.00	1.27	1.40	1.56	1.48	1.00	1.64	1.60	2.13	2.13
SQNSTNAPRSVHAAVTPAAGKNSTGLPSTTM	PAN1	T	1225	1.00	5.50	7.37	7.48	6.26	1.00	4.72	7.70	7.26	6.14
STTMGHNPYFKDASASSTFDARAAEMQRR	PAN1	S	1252	1.00	3.47	2.20	1.71	1.39	1.00	5.73	3.04	2.21	1.93
TTMGNHPYFKDASASSTFDARAAEMQRRRI	PAN1	S	1253	1.00	1.59	1.40	1.20	0.94	1.00	2.93	1.78	1.64	1.54
GHNHPYFKDASASSTFDARAAEMQRRIRG	PAN1	T	1256	1.00	7.13	3.01	1.67	1.07	1.00	22.41	7.98	4.63	4.81
PPSNFATMPLTAQKTGFNGNNEYTKSNFNN	PAN1	T	570	1.00	0.67	0.67	0.52	0.49	1.00	1.61	1.23	1.22	1.06
DDDVLNPNRNRKVKYSAKNEEQSSFSPSAK	PAN1	S	737	1.00	1.42	1.98	1.82	1.75	1.00	1.85	1.96	2.88	3.64
EQSSFSPSAKSVNHSSTLQTDIDISVKTV	PAN1	S	757	1.00	3.48	4.00	4.31	4.21	1.00	3.06	3.92	5.30	5.41
DRKKA SRALLRARSALTKGKSTESDLSM	PAN1	S	887	1.00	12.27	14.53	9.02	4.46	1.00	14.69	13.96	14.30	13.06
ARMSALTKGKSTESDLSMEDEQQAIEIKRI	PAN1	S	899	1.00	2.46	3.46	4.75	2.91	1.00	2.64	2.32	4.40	5.51
MSALTKGKSTESDLSMEDEQQAIEIKRIQQ	PAN1	S	901	1.00	1.08	1.08	1.00	0.80	1.00	1.36	1.06	1.38	1.60
SNKSVTESSFPVSPSTPVDRRSSPSYSQ	PAN1	T	993	1.00	1.71	2.72	3.48	3.78	1.00	2.08	2.04	3.79	4.68
GRGGAGNIHKSMKSPVLLPKNSKTVAN	PAR32	S	39	1.00	1.99	1.84	2.09	1.96	1.00	1.40	1.23	1.49	1.59
GGRYKRDIALQRMQSQVEKAVTVAKERPSK	PAT1	S	355	1.00	1.56	2.00	2.78	2.94	1.00	1.05	1.57	1.86	2.02
SGNAIGGNGVGATARSYVAATAEGISGPRTD	PAT1	T	78	1.00	1.10	1.24	1.82	1.68	1.00	1.14	1.18	1.48	1.70
HNDVIENVEEDKEVHTN	PBI2	T	74	1.00	1.35	1.34	1.42	1.50	1.00	1.51	1.34	1.84	2.40
HFDINKGALEDDASAWDQFVAVNEKFGVKS	PBP1	S	215	1.00	1.32	1.33	1.21	1.03	1.00	1.74	1.49	1.47	1.34
GNIHIAEDRGIIDDGLDEEDLVSGVDRRG	PBP1	S	284	1.00	1.55	1.92	1.66	1.79	1.00	2.26	2.42	3.00	2.79
PYDIPKDMLEVLKRSSTLKSNSLPPKPI	PBP1	S	412	1.00	1.86	2.27	1.56	1.25	1.00	1.88	2.19	2.15	1.67
YDIPKDMLEVLKRSSTLKSNSLPPKPIK	PBP1	S	413	1.00	3.85	5.35	2.70	1.62	1.00	13.19	10.38	10.58	6.40
HTTRSSTLRRNRHGSFFGAKNPHNTDAKR	PBP1	S	479	1.00	3.66	4.44	3.44	3.38	1.00	4.38	3.89	4.30	3.76
KNPHNTDAKRVLFGKSNFMFKSKAEHDEK	PBP1	S	499	1.00	6.12	7.95	5.63	4.49	1.00	11.14	11.12	11.17	8.02
TYKQVLESETASGRVSTATDGTWVSSKKNK	PBP4	T	155	1.00	3.92	4.94	5.89	5.31	1.00	2.31	2.98	3.80	4.01
_____MTTSTTSVDRGRTSLKATLSA	PBP4	S	8	1.00	2.18	1.63	1.79	1.59	1.00	1.84	1.66	1.58	1.32
KMPTKTAQQPQQFAPSNSKHITLSNSKV	PBS2	S	248	1.00	0.79	0.90	1.37	1.72	1.00	0.60	0.78	0.72	0.76
TVKLCDFGVSGNLVLAIAKTNIGQCSYMAPE	PBS2	S	514	1.00	1.53	1.62	1.10	0.93	1.00	1.34	1.45	1.19	0.96
_____MEDKFAANLHEKTKGSSILQNEK	PBS2	S	9	1.00	1.43	1.41	1.88	2.07	1.00	1.07	1.11	1.20	1.50
_____MLAASFQRQPSQLVRLGAVLRTPTR	PDA1	S	11	1.00	1.03	1.21	1.17	1.44	1.00	0.79	1.54	1.17	1.30
GPLVLEYETRYGGHMSDPGTTYRTRDEIQ	PDA1	S	313	1.00	1.31	1.61	1.05	0.92	1.00	2.59	2.93	2.34	1.63
LVLEYETRYGGHMSDPGTTYRTRDEIQHM	PDA1	S	315	1.00	1.40	1.82	1.03	0.82	1.00	2.92	3.06	2.42	1.42
KLSILFEDVYVKGTEPTLRGRIPEDTWDFK	PDA1	T	397	1.00	1.08	1.44	1.17	1.39	1.00	1.13	1.50	1.91	2.22
LPTFGAKDYETHRVATTGEWDKLTQDKSFND	PDC1	T	514	1.00	2.22	3.68	4.22	4.24	1.00	1.82	3.33	4.40	4.84

DNEDLAATSQRSRHSNLSNEEGIERLESM	PDR12	S	52	1.00	1.96	1.89	1.81	1.51	1.00	1.18	1.25	1.29	1.21
KFDPREEMEKLLKLSNQKD	PET191	S	104	1.00	0.92	1.01	1.47	1.62	1.00	1.00	1.05	1.25	1.46
SKLSEKFIQLMRNNSGDVTLKKNADGNSA	PEX21	S	244	1.00	2.23	2.06	2.19	1.89	1.00	1.71	1.53	1.98	1.85
SQIAQEMTVSLRNARTQLDMVYNQQLAYLDRQ	PGD1	T	17	1.00	2.37	3.41	4.41	4.29	1.00	1.40	2.31	2.79	3.02
VHSYTDLAYRMTTDTYPSLPKPLNRPPQKAI	PGD1	T	184	1.00	3.39	6.29	5.49	5.21	1.00	1.86	4.34	4.26	3.23
STVPEYLKADNRDRSFQLELSTYNNKNGN	PGD1	S	115	1.00	1.65	1.47	1.55	1.53	1.00	1.33	1.37	1.40	1.48
MQHNPLAGKRGPKSGSTMGTPTVHNSTAAAP	PGD1	S	191	1.00	1.01	1.01	1.02	1.06	1.00	1.66	1.35	1.88	2.24
PLAGKRGPKSGSTMGTPTVHNSTAAAP	PGD1	T	195	1.00	1.61	1.51	1.54	1.44	1.00	1.79	1.61	1.61	2.11
FQKDAKRFELNKFTFDYDGSKILFDYSKLN	PGI1	T	53	1.00	1.71	2.08	2.12	1.83	1.00	1.18	1.67	1.46	1.38
PESRKLFAATVAKAKTIVWNGPPGVFEFEK	PGK1	T	331	1.00	1.49	2.01	1.79	1.86	1.00	1.25	1.60	1.75	1.62
AIKSRDYVELKRLDTARDIAKLASSPNRV	PHB2	T	273	1.00	2.80	3.56	3.70	3.00	1.00	2.04	2.36	2.68	2.56
KPKPKQYKVLPSNSTRRVSPTAKTSSSA	PHO4	S	199	1.00	3.27	4.34	6.38	6.91	1.00	1.74	2.57	3.83	4.41
VTAKTSSSAEGVVVASESPVIAPHGSSHSRS	PHO4	S	221	1.00	1.53	1.24	1.45	1.36	1.00	1.08	1.10	1.06	1.12
TGAGTGFVDRKQIQSPAMVSLRKNASAEEN	PIB2	S	113	1.00	2.07	1.90	1.72	1.24	1.00	2.12	1.87	1.73	1.42
FTDDQRSNPELDPNTSVVDSVRGKNTKSKTV	PIB2	S	174	1.00	2.22	2.35	2.55	1.64	1.00	2.15	2.26	2.18	1.96
KVENIVDKLTTTSSSSMLRFGNTNVIIDS	PIB2	S	268	1.00	1.37	1.51	1.39	1.28	1.00	2.12	1.86	1.85	1.80
KKPLYPALVRKVSETNITNDLLNATLSSY	PIB2	T	346	1.00	2.86	2.56	2.91	1.66	1.00	1.63	1.64	1.66	1.70
LYIPAVLRKVSETNITNDLLNATLSSYYK	PIB2	T	349	1.00	2.35	2.08	1.80	1.29	1.00	2.09	1.81	1.95	1.74
LESYKNKISSYLPSPINSDRINLIPTISN	PIB2	S	420	1.00	1.22	1.36	1.62	1.33	1.00	1.76	1.64	1.81	1.78
KSMVNHRRQQLQESSTGAGTGFVDRKQIQ	PIB2	S	96	1.00	2.38	2.45	2.20	1.51	1.00	2.73	2.51	2.67	2.41
SMVNHRRQQLQESSTGAGTGFVDRKQIQ	PIB2	S	97	1.00	1.79	2.10	2.52	1.88	1.00	2.94	2.74	3.31	3.04
VNLHDVDRLLQSRKSVHFRVLPKLFNEN	PIG2	S	196	1.00	1.52	1.29	1.50	1.18	1.00	0.60	0.73	0.66	0.62
STTKRFFGKGLAYSFRSAAGAFGEPELSR	PIL1	S	41	1.00	0.98	1.40	1.26	1.57	1.00	0.69	0.94	1.19	1.38
MSASLINRSLNIRTELDFLKGSNVI	PIN3	T	11	1.00	3.81	6.61	10.86	13.15	1.00	2.50	4.95	12.46	21.37
MSASLINRSLNIRTELDFLKGSNVINDV	PIN3	T	15	1.00	5.12	8.89	14.29	19.62	1.00	2.60	5.17	12.68	20.07
REKREKRGLEEQHRSSNLSLDSLKMSSGS	PIN4	S	189	1.00	2.31	2.81	2.06	1.46	1.00	1.82	2.10	2.16	1.98
AAQQQSFLRQQATLTPSSRIPSGYSANHYQ	PIN4	T	512	1.00	2.22	3.04	2.45	1.79	1.00	3.95	3.61	3.74	2.86
SHSGLDDGLEQLNRSLSGLDLQNKKNLW	PIN4	S	653	1.00	1.54	1.47	1.27	1.04	1.00	1.85	1.25	1.23	1.25
LKQCENTRPAKLFASSPSIEGFRKSSIKFS	PMD1	S	1641	1.00	3.20	3.19	3.46	2.83	1.00	2.18	2.87	2.79	3.00
RYANDVQDLDLDDVENSPPVATKRQNVLQDTL	POL1	S	240	1.00	1.80	1.73	2.21	2.06	1.00	0.87	0.88	0.80	0.73
PPSSSTKRPSSTRSSYNTKAAADLPPSMIQ	PPZ1	S	172	1.00	3.99	3.36	3.27	2.51	1.00	1.66	2.23	2.00	1.72
KHKSSYSTYENALDDDDNDKDDNDISHTK	PPZ1	T	121	1.00	1.23	1.19	1.55	1.60	1.00	1.32	1.33	1.34	1.47
ESPSMAKVTIRNTSSSADRGSKRTPLRHNS	PPZ2	S	188	1.00	1.71	1.48	1.55	1.27	1.00	1.09	1.27	1.12	1.21
VGSHSNLTPMLKTSVPLSDEFASLYKEL	PRK1	S	402	1.00	1.99	2.85	3.65	2.97	1.00	1.52	2.70	2.80	2.56
SNLTSPLMKTSPVLSDEFASLYKELHPFQ	PRK1	S	406	1.00	1.88	2.50	3.10	2.62	1.00	1.45	2.08	2.14	2.18
QTIDNMAVPNLKLSPITTSKLSSTKEIAP	PRK1	T	486	1.00	2.14	2.51	2.69	2.19	1.00	3.16	3.63	4.16	3.84
NGNGNNTNRRLVSSSSFPKFNDSKTRKEE	PRK1	T	586	1.00	2.78	2.66	2.84	2.42	1.00	1.36	1.68	1.59	1.42
RNNSRTGSRDYRSHSPVKKTQASAKTSSKP	PRK1	S	642	1.00	1.86	1.90	2.10	1.79	1.00	0.81	0.99	0.97	0.99
VGEDIRPKAKIASSPSRKLNSPESGDSVNR	PRM5	S	270	1.00	1.77	1.75	2.27	2.82	1.00	1.30	1.51	1.77	1.95
DSDDKAKVPLIRIVSGLSOTKQKGGKFL	PRP11	S	184	1.00	2.44	2.75	3.02	3.02	1.00	1.38	2.20	2.66	2.41
MGSKRRFSEHPDPVETSIPEQA	PRP43	S	8	1.00	1.51	1.25	1.29	1.08	1.00	0.58	0.65	0.49	0.43
SSATANNNFDIKKTLFSRIPMIPGGKLLQNT	PR55	S	183	1.00	0.97	1.65	1.50	1.08	1.00	0.65	1.38	1.19	0.87
DVDKQFTFKNVERHSSMSRTKYNNGHNNNG	PSP2	S	401	1.00	3.16	6.28	8.69	11.62	1.00	1.89	6.40	10.48	11.65
NASVGSNGSVSSHSSVALQDLIKHNNNPY	PTK2	S	104	1.00	1.31	1.42	1.71	2.33	1.00	0.98	1.18	1.47	1.75
DREKEERARNKERNTHHAGLPQRSNSMASH	PTK2	T	160	1.00	2.34	2.55	2.90	3.87	1.00	0.81	1.14	1.02	1.09
SAEQLGNRSLRKRPTSPISGSGGNSPS	PTK2	T	56	1.00	5.83	6.05	6.12	5.71	1.00	4.57	7.36	6.43	6.54
SNPFLKKTETLSKPRSMLEIAESPSLKQSK	PTK2	S	623	1.00	4.19	4.00	3.77	2.97	1.00	3.51	5.47	4.56	3.45
LTSKPRSMLEIAESPSLKQSKVKDSAKTKT	PTK2	S	632	1.00	2.25	3.21	3.43	3.74	1.00	1.90	3.81	4.11	3.98
TPLPAKAGTQLDKRMSDLSLSETPASTKNF	PTK2	S	752	1.00	2.21	1.87	1.44	1.02	1.00	2.40	2.42	1.77	1.28
HNSMNSNIYHSPKASSPLVSYKTSPPVLLKR	PTP3	S	58	1.00	1.52	1.59	2.01	2.36	1.00	1.17	1.26	1.16	1.25
NARSVRVSDKRGRSSSTSPQKIGSYRTRAGR	PUF2	S	55	1.00	2.80	2.55	1.81	1.79	1.00	2.37	2.19	2.45	2.97
MSEENLRPAYDDQVNE	PUS1	S	2	1.00	1.26	1.24	1.58	2.16	1.00	0.94	1.14	1.25	1.52
DTKPRNPFSSQRNASTGSLQASVKSPPITRQ	PXL1	T	44	1.00	2.28	2.26	2.26	1.60	1.00	3.15	2.52	2.48	2.27
KPRNPFSSQRNASTGSLQASVKSPPITRQRN	PXL1	S	46	1.00	2.16	1.66	1.17	1.04	1.00	1.96	1.55	1.49	1.29
FKQSNVEYSNNEGMSGQETFRKLTPIEALQ	PXL1	S	485	1.00	1.34	1.41	1.03	0.83	1.00	1.82	1.58	1.69	1.38
QASVKSPPITRQRNVAAPSPVMTMSAYTA	PXL1	S	63	1.00	1.59	1.36	1.29	1.07	1.00	1.71	1.45	1.55	1.46
VSAAPSPVMTMSAYTASKSAYSSVKGESD	PXL1	T	77	1.00	1.53	1.83	1.72	1.66	1.00	1.37	1.76	1.77	1.76
RNYSNAKRRKREGDDEDDDDKEDKDSK	PXR1	S	159	1.00	0.14	0.39	0.19	0.25	1.00	2.98	1.27	1.59	0.80
KTKETKTSKLKSESASIPDAVNTRLSVR	PXR1	S	230	1.00	0.41	0.86	1.01	1.91	1.00	1.43	1.02	1.52	1.43
QIVATSERKLAKRSMTDILPLSSKSRNFA	RAD18	T	155	1.00	2.53	4.02	4.00	3.62	1.00	1.92	3.46	4.12	3.67
PTRLSHIQYTLRRSFTVPIKGYVQRHSLPLT	RAD54	T	132	1.00	2.16	2.49	2.47	2.52	1.00	1.79	2.66	2.71	2.69
ERSADNYDCALEGIVTPKRYKDELSKGGMQ	RAD9	T	218	1.00	1.67	1.45	1.68	1.39	1.00	1.41	1.34	1.26	1.27
AIEEKNPVKKSSENYSDDLRERNNQIQSN	RAD9	S	298	1.00	1.58	1.78	3.08	3.10	1.00	1.36	1.45	2.04	2.66
GSPKANPNPVKFMNTSEIFQSLGLLDESPR	RAD9	S	70	1.00	1.59	1.43	2.08	1.82	1.00	1.44	1.31	1.38	1.59
SNMKFYLNDRADAHDSLNDIDLARLIRANG	RAP1	S	142	1.00	1.88	2.05	2.71	2.67	1.00	1.51	2.03	2.34	2.23
LTSSATADREKNNNGSYVLDNSLTNAGTGSS	RAS1	S	211	1.00	1.17	1.45	1.86	2.21	1.00	0.73	0.96	1.06	1.18
HRKMSNAANGKNVNSSTTVNARNASIESKT	RAS2	S	225	1.00	2.74	3.59	3.42	3.45	1.00	3.52	4.62	4.36	3.27
QFYDSRRGRGRRRTNNYKDAYRGQSRNRK	RBS1	T	271	1.00	5.56	5.81	4.75	4.32	1.00	4.09	4.22	4.72	3.95
NSYSGAIPKRSDDSNKNEGIRRASVEGSP	RBS1	S	425	1.00	1.25	1.32	1.38	1.36	1.00	1.59	1.52	1.99	1.98
NSNKNEGIRRASVEGSPSRDTSVEMKFDK	RBS1	S	439	1.00	3.35	3.54	2.28	1.51	1.00	3.45	2.71	2.30	1.63
NKNEGIRRASVEGSPSRDTSVEMKFDKLN	RBS1	S	441	1.00	3.17	3.32	2.10	1.58	1.00	5.20	4.50	4.06	2.62
RRASVEGSPSRDTSVEMKFDKLN	RBS1	S	447	1.00	1.07	1.10	0.85	0.75	1.00	2.30	1.86	1.98	1.30
GAFSKVFRAPAKNSSNEFLTKNYKAVAIKV	RCK2	S	187	1.00	1.19	1.45	1.84	2.28	1.00	1.01	1.45	1.68	2.05
KKQFQLQRDSSLLFSPAAMRDAFDIGNA	RCK2	S	520	1.00	2.37	2.43	2.03	1.70	1.00	1.26	1.51	1.32	1.29
SPKKSFDQKNIVQYPSVADDHMMKSLTDEL	RCK2	S	61	1.00	4.67	6.55	6.77	5.72	1.00	2.09	3.79	3.37	3.06
ALLEDHRNKPLSINTDPGVTVGDVSSSLNKG	RCN2	T	132	1.00	4.97	7.16	6.07	4.86	1.00	2.82	3.94	5.13	5.60
TDSKPFYQEPKLSRSSSTSNLSLRSS	RCN2	S	183	1.00	1.17	1.51	1.75	1.50	1.00	0.70	0.91	1.74	2.44
PFSYQEPKLSRSSSTSNLSLRSSQTSLS	RCN2	S	187	1.00	2.39	1.32	0.60	0.55	1.00	2.15	2.14	1.85	1.50
SSSTSNLSLRSSQTSLSQLENKDKSASG	RCN2	T	200	1.00	9.78	8.91	4.54	2.07	1.00	7.19	7.38	5.79	3.58
SSSTSNLSLRSSQTSLSQLENKDKSASGT	RCN2	S	201	1.00	2.09	2.04	1.54	0.93	1.00	1.83	2.05	2.66	2.65
IITSEGIERSFKNEHNSLAVEDNIPPEEPEK	RCO1	S	68	1.00	0.98	0.93	0.83	0.87	1.00	1.72	1.36	1.20	0.99
PISKAKVTVNLKRSAGPTLNLAKPNNLS	RDH54	S	85	1.00	2.14	2.40	3.26	3.50	1.00	1.60	2.32	2.24	2.44
EEERNNDQYKYSAKKTVDEYKNLDAEDES	RD11	T	27	1.00	12.90	16.38	8.96	7.76	1.00	11.21	11.50	10.33	5.65
KKTVEYKNLDAEDESIAKWKESLGLSSDVL	RD11	S	40	1.00	1.32	1.50	0.92	1.16	1.00	2.43	2.50	2.52	1.77
MFKHSTGILSRVTSARSPTLVLRTF	RDL2	S	10	1.00	2.74	2.89	3.53	3.88	1.00	1.37	1.71	1.74	1.71
FKHSTGILSRVTSARSPTLVLRTFTTKAPI	RDL2	S	17	1.00	1.66	1.39	1.55	1.75	1.00	1.22	1.19	1.25	1.16
SOLLQSAATKASSLVLSSSSATPSTSRNSN	REB1	S	386	1.00	1.60	1.78	1.85	1.60	1.00	1.70	1.80	1.85	1.86
WLYGPVIRDSENAQSEEHDLERGYGSDDE	REG1	S	242	1.00	0.91	0.92	0.93	1.09	1.00	1.25	1.04	1.29	1.75
SKSIAAAPKPIKRRVTEIEDNALWKLNE	REG1	T	284	1.00	5.67	6.97	10.86	8.41	1.00	4.39	7.13	7.83	8.98

SIAAAPKILKRTVTEIIEDNALWKLNEAR	REG1	T	286	1.00	4.25	5.56	7.25	5.69	1.00	1.81	2.21	2.88	3.03
KLNEARKHMTMKHASVIMDPNGNKNVHDDF	REG1	S	311	1.00	1.40	1.93	3.26	3.49	1.00	1.64	1.44	2.15	2.72
VSMVAQAKNDDDFHKSTFNLRKTRSMGLLDE	REG1	S	66	1.00	2.82	3.69	5.40	5.06	1.00	2.54	2.71	4.03	5.23
DDDFHKSTFNLRKTRSMGLLDEYIDPTKLL	REG1	S	75	1.00	1.45	1.40	1.65	1.36	1.00	1.56	1.26	1.72	1.77
GKSGSTNSLYDLAQPSLSAATPQQKNPTNFT	REG1	S	786	1.00	1.63	1.46	1.01	0.65	1.00	1.74	1.55	1.52	1.57
KRTRSMGLLDEYIDPTKLLGRSDDLVDNDN	REG1	T	86	1.00	1.39	1.17	1.30	1.12	1.00	1.55	1.44	1.69	1.75
ANSQLVNRSLKGSVTPANISSQKKKALPKQ	REG1	T	865	1.00	2.50	4.22	10.07	12.47	1.00	2.64	4.96	9.50	13.72
SQKKKALPKQPKASDSSQSFVNVNTPSPA	REG1	S	886	1.00	1.39	1.28	1.72	1.81	1.00	1.38	1.35	1.76	2.12
KKALPKQPKASDSSQSFVNVNTPSPA	REG1	S	889	1.00	1.70	2.59	3.24	2.74	1.00	3.55	4.41	6.32	6.14
ASDSSQSFVNVNTPSPA	REG1	S	898	1.00	2.36	2.12	2.00	1.29	1.00	3.20	2.88	2.97	2.78
LRKKQLLENQTKNSSKEDFPIKLPERSVKR	RGA2	S	142	1.00	4.44	5.97	5.26	3.45	1.00	5.55	7.56	7.16	5.33
DVTYRLLKQRANRSDIVVKDPRIPNSNSNA	RGA2	S	277	1.00	1.50	1.41	1.68	1.62	1.00	1.62	1.56	1.55	1.49
TSKSMNHVSPITRDTVEMKSTSSSSTLRLS	RGA2	T	387	1.00	1.96	2.50	2.41	2.35	1.00	1.69	2.41	2.28	1.79
REPTHTIKNPKFRNTRSDISDSTGDTSVSI	RHO4	T	262	1.00	4.72	5.42	3.54	2.49	1.00	3.31	4.59	3.05	2.14
NGKKLEDAEAGENAASSE	RIM1	S	133	1.00	0.85	0.90	0.82	1.05	1.00	1.10	1.04	1.52	2.14
NSSDSPMTMFKFSPSPANTTTVSSVFSRQ	RIM15	S	1568	1.00	1.38	1.41	1.70	1.33	1.00	1.11	1.08	1.11	1.30
QSRIGNFFKLLSDNTPVVEKSDYKFFLFP	RLF2	T	242	1.00	0.87	1.66	1.49	2.05	1.00	1.37	1.89	2.22	2.31
TSFLAQRQTQQYQMSFKKSQTVPPLTTTTL	RLM1	S	470	1.00	3.09	3.87	3.70	2.78	1.00	5.91	6.06	6.35	5.58
EKANGAEENSVDLEETEEEDDGLIREKTTY	RLP7	T	120	1.00	0.92	1.31	1.10	1.14	1.00	0.89	1.79	1.64	1.35
IKKRSNKNKFRVAESIVAKTLATSREKERI	RLP7	S	60	1.00	1.35	2.14	2.70	3.62	1.00	1.17	2.41	2.58	2.62
ALDRQRPKVGSMKSNFDRPLRPRYSKESKMAR	RMD8	S	175	1.00	2.85	2.60	2.43	2.00	1.00	1.39	2.26	2.23	2.39
SEASREASPAPTGSLSLTKGMALNVQESKV	RNR1	S	824	1.00	1.17	1.41	1.61	1.69	1.00	1.20	1.54	1.61	1.38
DVATAGKTTFFKVKVSDYKASDMKSKSATPS	RNR4	S	321	1.00	1.03	1.75	2.05	2.42	1.00	0.84	1.62	1.97	2.64
KARDATSSHPIVHAKSMHIYSTNSASRQA	ROM2	S	144	1.00	2.30	1.76	2.27	1.93	1.00	1.56	1.44	1.47	1.67
LPPMSRNEVYQKNKSTAFVPRKPKSLPQL	ROM2	S	182	1.00	3.88	3.35	5.19	5.77	1.00	2.30	3.27	3.48	3.97
QKNKSTTAFVPRKPKSLPQLALAGLKKQSS	ROM2	S	193	1.00	1.41	1.38	1.53	1.21	1.00	1.48	1.20	1.50	1.54
PSLPQLALAGLKKQSSFGSASTTPQARK	ROM2	S	207	1.00	1.41	0.86	0.78	0.50	1.00	2.09	2.54	2.50	2.35
NLKVVTTADDAFPSSLRKKSVMVTKSLKKN	RPA12	S	59	1.00	1.96	1.99	2.46	2.13	1.00	1.61	1.65	2.00	2.26
KETSIGVSATGGKKTFFADE	RPA14	T	133	1.00	2.46	3.77	8.38	7.17	1.00	1.28	1.96	2.86	4.31
TTMTIDKHDKYKIMDDTDIESSLTQDNLNSMT	RPA34	T	93	1.00	2.02	2.21	2.29	1.90	1.00	1.82	2.02	2.43	2.71
VHTTRGVSVVDGLTISDADEEGNGVNSRSQ	RPA43	S	251	1.00	0.99	1.09	1.06	1.00	1.00	1.16	1.30	1.60	1.70
ADLERNRIDSDLTDSADIVDSVRTASKDL	RPA49	S	157	1.00	1.70	2.60	2.81	3.37	1.00	1.50	2.62	3.06	2.88
TLKYICAECSKLSLRSRDAVRCKDCGHRIL	RPC10	S	41	1.00	1.89	1.68	1.96	1.69	1.00	1.31	1.23	1.43	1.54
_MTEDIEQKKTATEVTPQEPKHIQEEEEQDV	RPC19	T	15	1.00	0.88	0.79	0.77	1.04	1.00	1.51	1.13	1.33	1.41
KSGKRRKPNILDEDDTNDGIERYSDKYLKRR	RPC31	T	101	1.00	1.54	1.29	1.45	1.50	1.00	1.34	1.38	1.40	1.65
NEQEKESEVKAEDDTGEEEEDDPVEIEFPL	RPC37	T	61	1.00	0.60	0.63	0.48	0.55	1.00	1.78	1.26	1.61	1.62
RPTLKEMESSLRSSTPDVGHFNSFKSSSG	RP11	S	412	1.00	2.06	2.05	2.28	2.10	1.00	1.49	2.08	1.78	1.54
EPTLEDPDLKRISSFOEQPLNKLKRETS	RP11	S	459	1.00	2.06	2.08	2.44	2.04	1.00	1.82	2.50	2.14	1.93
HSPVNPINISLIKRVKSPINIVLNISRESSRS	RP11	S	575	1.00	1.12	1.37	1.93	2.10	1.00	0.97	1.26	1.45	1.21
SPNIVLNISRESSRPIALNIEARQQHSQQ	RP11	S	590	1.00	1.33	1.49	2.04	2.11	1.00	1.08	1.33	1.27	1.25
ERPNNHKTANRILKESPVETSNSLILSKVA	RP11	S	652	1.00	1.25	1.41	1.43	1.63	1.00	1.07	1.28	1.39	1.73
DSFTSRNDDLDKEQSSPLNSKFAEIEVLVS	RP11	S	688	1.00	2.57	2.98	4.24	3.70	1.00	1.58	1.71	1.87	2.03
VFPDRGKAPEAEQVLSAAATFPIAQPADTVE	RPL13B	S	140	1.00	0.90	1.29	1.35	1.82	1.00	1.17	1.29	1.50	1.35
DGKAPEAEQVLSAAATFPIAQPADTVEARAV	RPL13B	T	144	1.00	1.53	2.66	2.49	2.10	1.00	1.10	1.44	1.36	1.46
VVKGNGKALKVRTSATFRPKTKLKLARAP	RPL25	S	29	1.00	2.35	5.81	8.51	10.22	1.00	0.57	2.02	1.85	1.35
KGTNGKALKVRTSATFRPKTKLKLARAPKY	RPL25	T	31	1.00	5.22	11.37	11.78	13.09	1.00	1.11	2.41	2.19	1.39
SSDRRKARKAYFTAPSERRVLLSAPLSKEL	RPL26B	S	24	1.00	1.35	1.31	1.60	1.73	1.00	0.88	1.17	1.05	1.04
SDRRKARKAYFTAPSERRVLLSAPLSKELR	RPL26B	S	25	1.00	1.31	1.26	1.21	1.80	1.00	0.81	0.96	0.97	0.82
AHRNGIKPKTYKYPSLKGVDPKFRNRHKA	RPL29	S	31	1.00	1.66	3.35	10.68	19.78	1.00	0.91	0.98	1.53	1.63
PRHGHGLFPRKRAASIRARVAFKPKDRSK	RPL3	S	24	1.00	1.94	2.13	3.01	3.54	1.00	0.74	1.40	1.29	1.33
GKPRQTKFKVGRSSLYTLVINDAGKAKKL	RPL38	S	50	1.00	1.14	1.39	1.71	2.52	1.00	1.05	1.00	1.08	1.04
FRQTKFKVGRSSLYTLVINDAGKAKLIQS	RPL38	T	53	1.00	1.17	1.34	1.75	2.20	1.00	1.06	1.02	1.05	1.05
QNRPLPQWIRLNTNIRYNKRRNRWRRTKM	RPL39	T	34	1.00	1.35	3.07	6.04	7.89	1.00	0.50	1.16	0.97	0.93
DDIYDLSLKNRKRKQSFVLNKNNTIDFERFSP	RPN4	S	326	1.00	0.51	0.53	0.57	0.62	1.00	0.90	1.03	1.63	1.70
PEHIVPGTYIQERNPSRQRRY	RPS10B	S	98	1.00	1.25	1.23	1.66	2.68	1.00	0.78	1.67	2.22	4.26
MSQAVNAKRVKFTHSYRGVLEKLLMESTE	RPS15	S	16	1.00	2.68	4.07	5.00	5.36	1.00	1.28	2.48	2.69	2.63
__MSSVQSKILQAPSELELQVAKTFIDLES	RPS7B	S	14	1.00	1.82	2.19	2.52	2.67	1.00	1.26	1.57	1.77	2.02
NCRPVTVPRLFNRSFSQSFIILKKKSSTPTE	RRF1	S	24	1.00	1.98	1.86	1.58	1.32	1.00	2.31	2.29	2.20	1.94
__MNSLEERLANSSAFDGLLALIPAKYYY	RRP14	S	13	1.00	2.19	2.38	2.46	3.09	1.00	0.98	1.53	1.70	1.73
__MNSLEERLANSSAFDGLLALIPAKYYY	RRP14	S	14	1.00	1.78	2.13	2.21	2.70	1.00	1.02	1.60	1.69	1.65
TDHERKYLNLKLRNSQNLRSWDLEEEVRE	RRT14	S	123	1.00	1.98	4.70	5.30	8.22	1.00	1.20	2.98	2.48	2.88
IITDLTSSMPRVNSSSITRPLTKQTKSI	RSC1	S	607	1.00	1.12	1.29	2.01	1.92	1.00	0.79	1.11	1.23	1.52
EEVARANAARAESSMNSTEARLRKTRT	RSC2	S	169	1.00	3.00	5.11	4.12	3.03	1.00	24.13	43.52	40.63	24.31
QNAIGQQIPLSRVSGPAGGGLTVQGLKQH	RSC2	S	682	1.00	1.24	1.20	1.79	1.66	1.00	0.87	0.83	0.81	0.92
PAPNSTSFASKRRHSVAADPTDLHIKIA	RSF2	S	84	1.00	1.46	1.13	1.47	1.28	1.00	0.85	0.89	0.79	0.95
VGHKLEFAPTRKRFSTYQTKNK	RSM19	S	231	1.00	0.97	0.87	0.89	1.22	1.00	1.05	0.91	1.25	2.05
FTPFRPPTLKAGPTFTSKSLTLASGASSFNS	RTC1	S	620	1.00	2.49	3.08	2.38	2.13	1.00	1.82	2.45	2.23	2.31
__MSSIPAGTDPGSCGANFNKDRKRRDKI	RTG1	S	12	1.00	3.63	2.39	2.28	1.63	1.00	3.51	2.42	2.70	2.56
ATNDDSVRPPAKRSLSEFYGGYGEYNGS	RTG1	S	164	1.00	2.25	1.87	1.93	1.60	1.00	2.35	2.18	2.23	2.17
IIPKDFRDYNGSGSNDLSESTPGALGLS	RTG1	S	52	1.00	1.87	1.73	2.05	1.93	1.00	1.34	1.38	1.63	1.63
KDFFRDYNGSGSNDLSESTPGALGLSSKA	RTG1	T	55	1.00	1.87	1.69	1.93	1.85	1.00	1.68	1.68	1.92	2.13
DYNGSGSNDLSESTPGALGLSSKAKGTGT	RTG1	T	60	1.00	3.10	1.68	1.42	0.99	1.00	3.85	2.84	2.55	2.45
IGQGRLRSSYMAVSDPDRAMNTPLQQQEG	RTG3	S	142	1.00	1.08	1.00	0.73	0.63	1.00	1.57	1.42	1.30	1.04
SYSMAYDSPVDRAMNTPLQQQEGKALPHD	RTG3	T	150	1.00	1.03	1.01	0.80	0.73	1.00	2.40	1.90	1.92	1.44
PASVSTYSPKRVSPSSFRAGSFLSSFRH	RTG3	S	229	1.00	0.93	0.92	0.83	0.78	1.00	1.57	1.47	1.61	1.64
FLSSFRHGSINTPRTRHTSISNMTEINIGP	RTG3	T	259	1.00	1.44	1.71	1.26	1.34	1.00	1.10	1.26	1.56	1.45
NDYKIHGSAYGGGETPAQQHEKLSYINTHN	RTG3	T	56	1.00	3.59	2.56	2.54	2.67	1.00	4.10	3.37	3.11	2.43
IDATVAQQVEISKQKTQEFQMACCKTKPYL	RTN1	T	186	1.00	10.06	9.08	7.55	6.56	1.00	4.57	6.78	4.90	3.67
QMACKTKPYLDKVESKLGIPISNLVKSXTAP	RTN1	S	206	1.00	6.32	11.06	11.62	8.95	1.00	5.24	10.75	9.45	6.77
NHASSQSIDIPRSSHSFERLPTTKLNPDT	RTS1	S	236	1.00	1.21	1.14	2.18	1.62	1.00	0.77	0.90	1.29	2.08
LKLTGASRHTVLPLTKPDSMTHISHARRS	RTS3	T	152	1.00	1.45	1.69	2.51	5.73	1.00	1.32	1.56	4.57	7.88
HISHARRSRNASISNGTISDITFPIETK	RTS3	S	174	1.00	1.07	1.02	1.31	2.67	1.00	1.15	2.15	6.25	7.83
HSARRSRNASISNGTISDITFPIETKHS	RTS3	T	177	1.00	1.17	1.34	1.72	2.84	1.00	1.52	2.73	6.26	7.55
TSISDITFPIETKHSAPTNRNRLPSADLPH	RTS3	S	192	1.00	0.92	1.15	1.67	4.30	1.00	0.86	1.31	3.03	7.70
PSADLPHHTLPRLSGISSSDLTESGALLH	RTS3	S	216	1.00	1.44	1.77	2.30	3.80	1.00	1.42	2.49	6.00	8.17
DLPHTLPRLSGISSSDLTESGALLHDDR	RTS3	S	219	1.00	1.46	1.57	2.20	3.01	1.00	1.17	1.82	3.10	3.79
DLTESGALLHDDRNRSSNYLDGSNSLKADL	RTS3	S	237	1.00	1.18	1.43	1.71	2.12	1.00	1.41	2.68	5.28	6.25
LTESGALLHDDRNRSSNYLDGSNSLKADLM	RTS3	S	238	1.00	2.38	3.13	5.36	8.61	1.00	1.43	5.63	13.32	15.97
SGALLHDDRNRSSNYLDGSNSLKADLMAKR	RTS3	S	241	1.00	1.17	1.58	1.81	1.81	1.00	1.66	3.02	4.74	4.58

GSNSLADLMAKRFQTSGLK	RTS3	T	259	1.00	1.83	2.84	4.67	9.37	1.00	1.69	3.12	7.74	10.00
NSLKADLMAKRFQTSGLK	RTS3	S	261	1.00	1.39	1.78	2.76	5.53	1.00	1.37	3.41	7.05	8.83
KHKKAOKPCREQTSVTRAMRPAVARDPRR	RTS3	S	30	1.00	2.07	1.55	2.16	4.51	1.00	0.99	2.39	5.62	7.78
SSPSSPMSAQRRLSREIINEMEKQDAI	RTS3	S	64	1.00	1.06	1.13	1.40	2.51	1.00	1.39	1.96	4.48	5.66
EFDRRLKSLMSTHTKGDTSKATGAPSANQ	RTT102	T	101	1.00	2.88	4.66	7.44	9.61	1.00	1.52	2.35	3.53	3.76
__MDPQTLITKANKVSYVGNPTSKESWRVYW	RTT102	S	14	1.00	2.15	2.30	2.69	2.44	1.00	1.56	1.71	1.74	1.98
DLKEFDRRLKSLMSTHTKGDTSKATGAPS	RTT102	T	98	1.00	1.80	2.11	3.12	3.72	1.00	1.35	1.81	2.71	3.98
SSRRDRSQDFGPHSSPIAPSERQADQRS	RTT105	S	87	1.00	1.35	1.27	1.42	1.43	1.00	0.82	0.76	0.72	0.87
MSFKGFTKAVSRAPQSFQKFMGEQTEDPV	RVS167	S	16	1.00	1.77	2.26	2.53	1.64	1.00	1.31	1.74	1.71	1.85
TNVPSASKAKFGLHTPTTATPRVSNPSNT	SAT4	T	68	1.00	2.00	2.35	3.11	2.69	1.00	1.13	1.08	1.29	1.55
EATTDGSKMALQKSMFDDTAAEKTMNKSRH	SBE22	S	201	1.00	3.15	2.96	3.26	2.51	1.00	2.42	2.60	2.74	2.80
SQSSLLNKQRSRAKSQTCSSTGYNNSSILK	SBE22	S	242	1.00	3.16	2.61	3.16	2.53	1.00	1.65	1.54	1.74	1.76
KPLTPSQYRLRKEQSEMNLNRTIKRKEFY	SBE22	S	305	1.00	2.01	1.79	1.91	2.14	1.00	1.84	1.74	1.79	1.98
GSHVQRPPSQTTLGRSRAGSNTMKNVSGLDI	SBE22	S	52	1.00	1.86	1.62	1.85	2.02	1.00	1.10	1.72	1.75	2.18
QRPPSQTTLGRSRAGSNTMKNVSGLDIARRP	SBE22	S	56	1.00	3.13	2.67	2.35	2.15	1.00	2.30	1.90	2.10	2.16
PPSQTTLGRSRAGSNTMKNVSGLDIARRP	SBE22	T	58	1.00	5.20	3.95	4.91	4.50	1.00	3.82	3.06	3.91	5.11
TPPGGQRTLKRRKQSSQKVAASAPKNTNS	SBH1	S	20	1.00	7.69	12.11	10.32	13.81	1.00	4.22	8.75	10.05	11.49
PPGGQRLQKRRQAQSIKEQAKQTPTRQ	SBH2	S	21	1.00	1.46	2.08	3.28	2.83	1.00	0.87	1.27	1.43	1.50
TKVKDRREIHKRARTPGMQRGGFRGRGGF	SBP1	T	119	1.00	1.27	1.46	1.66	1.91	1.00	1.17	1.15	1.63	2.25
DGHIPASKHALVKFPTKIDFDNKENYDTKV	SBP1	T	91	1.00	3.41	8.21	11.34	10.23	1.00	5.24	8.29	15.87	17.84
FDQSNNAKFTKGDSTVVEKEKESAVHHKQ	SCD6	T	220	1.00	2.12	2.47	3.66	8.14	1.00	3.19	2.56	4.00	5.97
KEHLKKPLYTHRSSQLDQLNCSSTVDP	SCH9	S	290	1.00	2.34	2.34	1.97	1.33	1.00	1.44	1.84	1.54	1.33
VTNQVKIESSSTNSVIESSEPKISKLEN	SDC1	S	95	1.00	1.69	1.63	1.68	1.37	1.00	2.11	1.84	2.31	2.30
REEQEERLQRIATSQEAIDQYNAQATGDR	SDH8	S	61	1.00	1.69	1.71	1.91	2.52	1.00	1.99	2.04	2.49	3.31
YNAQATGDRTEKESLPLTKNDIGSFSPEF	SDH8	S	83	1.00	1.15	1.29	2.39	3.14	1.00	0.93	0.96	0.96	1.19
FAAAEQMASLRRVRTDQHTNEKALKSQQIL	SEC16	T	1539	1.00	7.72	7.78	10.26	8.43	1.00	3.68	5.17	5.27	5.27
FPAPPKLGTVPSNVYSPDLVRESIISTGS	SEC16	S	1602	1.00	1.52	1.57	1.67	1.62	1.00	1.18	1.16	1.36	1.47
SIENERSSEEQPENISKASSAYLPSTGGLS	SEC16	S	1778	1.00	0.91	1.04	2.11	3.36	1.00	1.67	1.41	2.36	4.18
VVEKDFQPTIRKASTNQYRAFKPLESDADK	SEC16	T	1962	1.00	6.00	4.19	6.26	4.31	1.00	1.90	1.46	1.77	1.94
TGDKKVKAKLGHKNTLYDEKLRVWNKDA	SEC16	T	2049	1.00	7.98	8.36	8.40	8.73	1.00	2.31	3.53	3.64	3.92
PSPTGPNNPNSPSSPISRISGVLNLSKKA	SEC16	S	2144	1.00	1.95	1.52	1.52	0.76	1.00	0.78	0.71	0.54	0.55
RDKGYEGNEALKSECTAADERSYSEETSE	SEC16	S	360	1.00	1.15	1.51	2.44	3.20	1.00	1.26	1.26	2.17	3.07
KGYEGNEALKSECTAADERSYSEETSEDI	SEC16	T	362	1.00	1.34	1.60	2.46	3.05	1.00	2.78	3.15	4.50	5.14
VTPQQFHGLTKGLTGNQVSPVNIQPK	SEC16	T	595	1.00	2.53	2.36	2.89	3.11	1.00	1.21	1.62	1.56	1.65
TQEPSSRTNSAISQSPVNYAFPNYKIQQL	SEC16	S	706	1.00	2.25	1.94	2.63	1.94	1.00	1.07	0.90	0.73	0.51
APPPIRARGVSNASVGSASFGARHATQYGLN	SEC16	S	765	1.00	1.65	1.46	1.57	1.38	1.00	1.25	1.19	1.12	1.30
VPLHSPFLMGHPMTKSVYETPKITAAEQSF	SEC65	S	247	1.00	2.38	2.63	2.38	2.83	1.00	2.58	3.28	3.66	2.70
DDLDMELAEPLDPLRTPPIAPKITPKVVRSD	SEC65	T	29	1.00	1.95	1.68	2.18	3.50	1.00	0.92	1.07	1.13	0.95
SNSVWVNAANGRNSLHNSNTLVNPGSRQTRQP	SEC9	S	190	1.00	1.84	1.55	1.38	1.03	1.00	1.51	1.43	1.42	1.41
NVGPQRTRQPPVSTNSLSLDQRSPLANP	SEC9	S	210	1.00	1.43	1.45	1.36	1.10	1.00	1.66	1.68	1.59	2.32
PSRQTRQPPVSTNSLSLDQRSPLANPMQE	SEC9	S	213	1.00	2.08	1.62	1.55	1.39	1.00	1.87	1.73	1.67	1.75
GSSKNANPYASMANDSYNGNLNRSANPYSS	SEC9	S	271	1.00	2.92	2.36	2.67	2.34	1.00	3.85	3.72	3.67	4.11
SKNANPYASMANDSYNGNLNRSANPYSSRS	SEC9	S	273	1.00	2.95	2.58	2.96	2.77	1.00	3.37	2.90	3.46	4.13
TYTSPFIASDEAARNSEVDLNEEPRTEGDF	SEC9	S	315	1.00	1.14	1.05	0.79	0.67	1.00	2.35	1.44	1.54	1.29
EAVDEIKQEIFTKQSSVASTRNTLKMADA	SEC9	S	439	1.00	2.02	1.58	1.46	1.14	1.00	1.78	1.58	1.73	1.74
EIKQEIFTKQSSVASTRNTLKMADAERAG	SEC9	S	443	1.00	1.94	1.76	2.34	2.24	1.00	1.65	1.61	1.88	2.33
AELKLNRSILAVHVNPNFNSKRRRREEEQ	SEC9	S	509	1.00	2.26	2.51	2.45	2.19	1.00	1.05	1.20	1.13	1.26
QLKNRKIEEKLMEQTSQQLSQSTQRIEGAM	SEC9	T	539	1.00	3.96	3.81	3.92	3.28	1.00	1.96	2.33	2.30	2.34
LKNRKIEEKLMEQTSQQLSQSTQRIEGAMN	SEC9	S	540	1.00	18.62	15.75	13.63	13.09	1.00	18.20	19.05	23.00	18.16
KIEEKLMEQTSQQLSQSTQRIEGAMNANN	SEC9	S	544	1.00	2.68	2.40	1.69	1.69	1.00	3.05	2.90	3.36	3.29
EELKMEQTSQQLSQSTQRIEGAMNANNIS	SEC9	S	546	1.00	2.15	2.03	1.77	1.80	1.00	2.58	2.23	2.56	2.38
KELDSQKRLNIEESTDDLDLNLHMNTNRL	SEC9	S	632	1.00	1.45	1.29	1.43	1.28	1.00	1.37	1.42	1.41	1.62
SLTRSSMGKGDLSNPLTKEPQHKTSHNR	SEG1	S	100	1.00	2.47	2.22	2.88	5.41	1.00	0.64	0.61	0.46	0.58
QRSSMGKGDLSNPLTKEPQHKTSHNR	SEG1	T	103	1.00	1.35	1.70	1.63	2.48	1.00	0.81	0.92	0.94	0.88
TKEPQHKTSHNRSSLNPNRQGGQSRNSSL	SEG1	S	118	1.00	2.47	1.63	1.39	1.30	1.00	2.55	2.41	2.26	2.31
TSSLNPNRQGGQSRNSSLNPNRQGGQSR	SEG1	S	131	1.00	1.99	1.28	0.86	0.78	1.00	2.28	2.03	1.89	1.78
FRRRTTAPEMEQAADPTAVAAAASIGKLLMK	SEG1	T	17	1.00	7.80	7.04	6.81	5.54	1.00	3.32	3.33	3.40	2.44
RGILTGHRTENPSGSIPLRTRKYPGPN	SEG1	S	177	1.00	1.47	1.24	1.72	1.57	1.00	1.17	1.30	1.30	1.60
KPSNANTSLLRRNSAHSALNARNGSLLR	SEG1	S	217	1.00	2.46	1.95	1.71	1.98	1.00	1.77	1.94	1.63	1.83
NANTSLLRRNSAHSALNARNGSLLRKKVS	SEG1	S	220	1.00	2.38	1.77	1.65	1.55	1.00	1.44	1.57	1.60	1.48
RRNSAHSALNARNGSLLRKKVSQESLSQP	SEG1	S	228	1.00	1.26	1.03	0.72	0.70	1.00	2.72	2.33	2.33	2.32
AAAASIGKLLMKGNQSDNEQPTRYRSASMTN	SEG1	S	36	1.00	1.76	1.70	1.65	1.83	1.00	1.54	1.46	1.37	1.48
TQDLEKRSIEEKDTLEGTESSKVEKPDN	SEG1	T	467	1.00	1.26	1.09	1.21	1.07	1.00	1.78	1.54	1.61	1.74
GNQSDNEQPTRYRSASMTNLRKPSAPKRMSS	SEG1	S	48	1.00	1.62	1.20	1.01	0.93	1.00	1.62	1.39	1.39	1.22
SNQTEPTPSLAQYLRTSNTYLSRKNQSQKAE	SEG1	T	544	1.00	3.21	3.56	4.44	5.15	1.00	3.48	4.03	3.90	3.23
NQTEPTPSLAQYLRTSNTYLSRKNQSQKAE	SEG1	S	545	1.00	3.27	3.60	4.04	4.57	1.00	1.50	2.00	1.77	1.88
TEPTPSLAQYLRTSNTYLSRKNQSQKAEQEK	SEG1	T	547	1.00	5.72	5.63	6.56	6.39	1.00	3.70	4.85	5.23	4.76
EPTPSLAQYLRTSNTYLSRKNQSQKAEQEK	SEG1	Y	548	1.00	3.01	3.42	3.68	2.81	1.00	2.85	4.02	4.74	4.54
SSGSSNHSSMSYDNSPANGAYLSLTTAENT	SEG1	S	602	1.00	1.69	0.92	0.98	0.83	1.00	0.57	0.54	0.48	0.59
SRRASLRSSIKRPQSVGQFRSIRSNPSPP	SEG1	S	645	1.00	2.87	3.12	3.33	3.31	1.00	2.24	2.26	2.15	1.80
PQSVGQFRSIRSNPSPPPEKINNRKHSIPL	SEG1	S	658	1.00	1.98	1.76	2.06	2.26	1.00	2.15	2.09	1.43	1.48
NLRKPSAPKRMSSISSISSERSRSDGKGRPG	SEG1	S	66	1.00	1.68	1.36	1.24	1.12	1.00	1.25	1.24	1.11	1.19
KPSAPKRMSSISSISSERSRSDGKGRPGKIN	SEG1	S	69	1.00	2.02	1.58	1.49	1.35	1.00	1.64	1.51	1.37	1.42
_____MFRRTTAPEMEQAADPTAVAAA	SEG1	T	7	1.00	7.89	7.27	7.17	6.00	1.00	5.21	6.38	6.15	5.17
PNKPKNQINKIKRGSQAQNNKPSKDMNS	SEG1	T	724	1.00	1.28	1.34	1.44	1.87	1.00	1.15	1.02	1.18	1.37
NGQASQNSTNVNRDTAQEFFKYLGHSSRFA	SEG1	T	799	1.00	5.76	6.62	5.59	5.87	1.00	3.30	3.21	2.95	2.02
ESRRSDGKGRPGKINSLTQRSSMGKGDLSN	SEG1	S	85	1.00	2.53	1.70	1.25	0.87	1.00	2.55	2.20	2.21	2.07
RRSDGKGRPGKINSLTQRSSMGKGDLSN	SEG1	T	87	1.00	1.81	1.42	0.92	0.75	1.00	2.46	2.14	2.09	1.86
GLSLRAASEAEPAKNSPMTNRLRFFSNPE	SEG1	S	911	1.00	1.57	1.26	1.79	1.83	1.00	0.64	0.72	0.73	0.80
LRAASEAEPAKNSPMTNRLRFFSNPENGE	SEG1	S	914	1.00	1.72	1.47	1.96	2.11	1.00	1.04	1.35	1.63	2.09
LNISSTGQNSKRTSLGNSGSTITIKKY	SEG2	T	136	1.00	1.52	1.56	1.23	1.08	1.00	0.94	1.51	1.18	0.79
EKERPAKNDLGRFSMSRLEPLIKNATATAA	SEG2	S	939	1.00	2.12	2.78	2.45	2.49	1.00	0.86	1.35	1.26	0.84
_____MSTDVAQAQSKIDLTKKNEEINIK	SEM1	S	12	1.00	2.05	2.44	3.87	3.54	1.00	1.92	2.02	2.64	3.39
IPRNDEPEIKVTRSLSLVLEKQLGLKETRT	SEN1	S	2025	1.00	2.33	2.40	4.90	4.97	1.00	3.49	3.54	4.77	6.19
EESQSKNEHLKSRTPSLNFNKELSKAQHS	SET3	S	684	1.00	1.37	1.52	1.58	1.41	1.00	1.09	1.27	1.64	1.80
YAMGNLQNNRANSFTQLAQNQFPFGSGKV	SFB2	T	53	1.00	1.23	1.39	1.65	1.31	1.00	0.80	1.05	0.98	1.02
NSDVPILLPKLRSPVNRSTFKPTRYEPS	SFG1	S	189	1.00	1.87	1.60	1.58	1.55	1.00	2.26	2.04	2.16	2.26
SKCKYSSGFIADPTPSKFRFLYQAKFKTS	SFG1	T	45	1.00	1.91	1.60	1.61	1.22	1.00	1.66	1.36	1.37	1.39
KGDIEGLKHKRRASSRNNSSINRSKNSNQ	SFL1	S	208	1.00	3.01	2.36	1.87	1.68	1.00	2.38	2.00	1.65	1.48

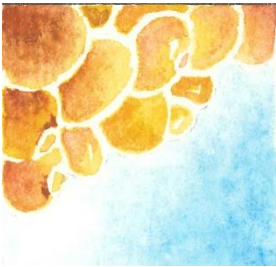
SVRDYNKVPVQNMASPIPIPEPTTRLSQ	SFL1	S	556	1.00	1.99	2.04	2.53	2.70	1.00	1.86	1.69	2.04	2.49
NINMGSKNAMVNRPHTFNNYSLNKTSRNPQ	SFP1	T	446	1.00	3.34	3.68	4.16	3.59	1.00	2.23	2.55	2.97	2.95
YKNDSSFNPLKRSTSMESANTPNMDTKRSK	SGF73	S	184	1.00	2.61	2.20	2.02	1.09	1.00	1.60	1.73	1.39	1.09
NDSSFNPLKRSTSMESANTPNMDTKRSKGT	SGF73	S	187	1.00	1.68	1.67	1.35	0.86	1.00	1.64	1.80	1.43	0.96
SFNPPLKRSTSMESANTPNMDTKRSKGTGPQT	SGF73	T	190	1.00	2.77	2.15	2.06	1.24	1.00	2.08	1.52	1.47	1.20
SANTPNMDTKRSKGTGPQTFSSSIKQKQV	SGF73	T	202	1.00	1.70	1.97	2.01	1.92	1.00	3.41	3.19	4.53	5.49
EIKGKPKVIEEYLSQSGSPNSDWSKLSMS	SGF73	S	22	1.00	1.25	1.25	1.42	1.44	1.00	1.35	1.23	1.86	2.44
QQQQQQQHKSDQDTGLTLEIQSQQLRQQQ	SGF73	T	535	1.00	4.99	4.57	8.37	12.46	1.00	2.47	2.57	3.04	3.83
NLDAKSNRDFVDDQSYEEKQHASFYNRK	SGM1	S	336	1.00	0.69	0.81	0.79	1.02	1.00	1.20	0.97	1.29	1.57
CSEESQHFDRKNVDFSIDDIEEAAALQAIR	SGM1	S	549	1.00	1.89	2.42	2.05	2.22	1.00	2.45	2.30	2.79	2.50
GQIKRITLLYDRNTGTPKGYGIEFESPAYR	SGN1	T	103	1.00	2.28	2.23	3.57	3.42	1.00	1.41	1.46	1.79	2.89
RNTGTPKGYGIEFESPAYREKALQNGGEL	SGN1	S	114	1.00	1.80	1.77	2.34	2.31	1.00	1.68	1.71	2.01	2.34
MSQEEKVDKATKLTKEI	SGN1	S	2	1.00	1.46	1.35	1.77	1.48	1.00	1.69	1.26	1.82	2.72
HFNSAKDSTKNIRSTSQKPVVMPSDNVKSS	SGN1	S	229	1.00	0.97	1.04	1.40	1.68	1.00	1.12	1.28	1.91	2.25
QSRVQNSNESRYKNSPNSRYHNRPRVYKVP	SGV1	S	549	1.00	2.20	1.96	2.18	2.04	1.00	1.19	1.51	1.27	1.12
GQHQLTSPKPIEKKNSFKDERAKPDESKEFG	SGV1	S	634	1.00	1.86	2.63	3.78	3.81	1.00	1.75	2.92	3.37	3.45
FGQMESLDTHYLLHTPKRSQHAIPQDRSD	SHE1	T	117	1.00	2.17	1.47	1.51	1.30	1.00	1.20	1.12	0.99	0.93
PKRSQHAIPQDRSDSMKRSRSPSIPTYP	SHE1	S	133	1.00	2.95	1.91	1.80	1.54	1.00	1.19	1.22	1.06	1.22
STASSIPRSKVRHSIRDLHAKTKPVERTP	SHE1	S	242	1.00	3.04	2.68	3.45	2.45	1.00	2.21	2.25	2.43	3.03
TPVAQGTNSQLKNSVSVFRLRYKQTFRST	SHE1	S	271	1.00	2.19	3.04	3.80	3.60	1.00	1.69	1.93	2.43	2.85
HTNVKTRLVKSKTSGLSNKLQSTATGK	SHE1	S	317	1.00	2.83	2.64	2.67	2.39	1.00	2.51	2.40	2.70	2.67
PKSASVPLPGVRTASVRKPSSSSKTNTVTH	SHE3	S	372	1.00	2.17	2.32	2.70	1.86	1.00	1.63	1.14	1.87	2.52
TSPTISVPGVTRTVSSHTKKGNSMVVHGA	SHE3	S	408	1.00	2.03	1.93	2.54	2.42	1.00	0.88	0.91	1.16	1.32
GSTIDADEVVEDNTSQSRRPEKVTREITF	SHP1	S	224	1.00	1.18	1.14	1.02	1.01	1.00	1.77	1.27	1.67	2.18
TIDADEVVEDNTSQSRRPEKVTREITFWK	SHP1	S	226	1.00	1.43	1.38	1.50	1.74	1.00	1.62	1.24	1.73	2.05
LLPPSRPTSARQLHLSLERDFDQTHRKII	SIC1	S	152	1.00	1.66	1.71	1.90	1.71	1.00	1.48	1.67	1.71	1.85
FDQTHRKIIKDVPGTPSDKVTIFELAKNWN	SIC1	T	173	1.00	1.72	1.74	2.24	1.52	1.00	1.88	1.71	2.16	2.18
DKVITFELAKNWNNSPKNDARSQSEDEED	SIC1	S	191	1.00	1.43	1.23	1.39	1.18	1.00	1.60	1.34	1.73	2.03
MTPTPPRSRGRTRYLAQPSG	SIC1	T	5	1.00	2.64	1.83	1.72	1.58	1.00	1.61	1.34	1.44	1.60
GNIENNRNKGAGGNSDDFTAPISATAKMM	SIP1	S	331	1.00	1.10	1.30	1.73	1.51	1.00	1.58	1.52	1.62	1.44
ARLMRRSANATAIHISNRILDPSSRRRNTS	SIP5	S	419	1.00	1.40	1.57	1.79	1.84	1.00	0.90	1.12	1.00	1.09
IESNPNHSDASRLASFEQTAFSRHAQQT	SIR4	S	135	1.00	1.75	1.84	2.12	1.91	1.00	1.94	2.09	2.42	2.44
YKNQGDYNPQTGRKTLQFVIEKSHPNFKR	SIS1	T	248	1.00	1.27	1.23	1.66	2.09	1.00	1.37	1.24	1.92	3.22
QNKASMIELKHNRQSSNENLRNLQDFDQ	SKG1	S	215	1.00	1.73	1.21	0.86	1.00	1.00	0.73	0.70	0.62	0.63
LNGNISNASFHTRNSISITSVNKRDALEDF	SKG1	S	257	1.00	2.90	2.98	2.44	1.81	1.00	2.08	2.33	2.28	2.24
ENRSPERYVGTSAESKTFEIGNVRESKSTI	SKG3	S	663	1.00	2.10	1.58	2.01	2.09	1.00	1.90	2.08	2.29	2.49
LRVEDSRKSKNEDLSLKEFEELSQKISNM	SKG3	S	701	1.00	1.63	1.25	1.51	1.33	1.00	1.63	1.58	1.62	1.58
TLQQSPDPFVGSMSHSSKYNVRSATPPAIGR	SKG6	S	160	1.00	1.62	1.38	1.18	1.11	1.00	1.10	1.55	1.40	1.34
DPFVGSMSHSSKYNVRSATPPAIGRSWVDP	SKG6	S	167	1.00	1.61	1.56	1.31	1.30	1.00	1.41	1.78	1.90	1.77
FVGSMSHSSKYNVRSATPPAIGRSWVDPFQL	SKG6	T	169	1.00	1.56	1.43	1.32	1.30	1.00	1.23	1.52	1.60	1.59
RVEDGLGGYKVAASRNASQTSLHPDNFSN	SKG6	S	215	1.00	1.83	1.45	1.55	1.47	1.00	1.06	1.23	1.15	1.22
ASSRFQESSEFRSHGSPHNNQLSRGATG	SKG6	S	251	1.00	2.58	1.78	1.45	1.30	1.00	1.15	1.13	0.94	0.88
SSKSQDDYYVSLSPNEEDIKRMKSIYQ	SKG6	S	357	1.00	4.84	4.95	7.86	7.90	1.00	1.15	1.18	1.04	1.21
NPSDLTAKPSYKAGSFRSVATNSRNNSLT	SKG6	S	659	1.00	3.12	4.26	4.31	3.66	1.00	1.56	2.17	2.20	2.20
SQMPGFLNLSKGLTPNESNIRTLGTPGIL	SKO1	T	219	1.00	3.24	3.97	3.32	2.53	1.00	4.93	5.34	6.13	5.46
KSGLTPNESNIRTLGTPGILTSQYNYVPLVS	SKO1	T	226	1.00	3.97	6.54	5.49	4.04	1.00	4.89	6.23	6.92	5.24
SVLQKVIEWAEHHRDSNFPEDDDSDRSKAP	SKP1	T	100	1.00	1.67	1.58	1.76	2.24	1.00	1.58	1.21	1.43	2.40
SPEIRTFNIVNDFTEEEAIRRENEWAE	SKP1	T	177	1.00	1.84	2.32	3.08	3.28	1.00	1.61	2.12	3.20	3.85
SAETDDAWTVKPAKSESNNLSKSEFTGSM	SLA1	S	785	1.00	1.94	2.10	2.68	3.09	1.00	2.32	3.60	3.95	2.94
KSESNNLSKSEFTGSMQDLDLQLEPKKA	SLA1	S	799	1.00	1.46	1.40	1.61	1.23	1.00	1.61	1.69	1.55	1.28
VKESPIAFKKSTINSPAIRAVENSOTAGT	SLI5	S	280	1.00	1.48	1.24	1.09	0.91	1.00	1.54	1.40	1.28	1.20
NVGHYSSSIDLTGSPMKKVSQKFKSINST	SLI15	S	335	1.00	2.15	1.83	1.67	1.15	1.00	1.92	1.72	1.69	1.62
QSPVRYLRPTKASIPNKNKLNLTSTQTPHR	SLI15	S	462	1.00	2.40	2.35	2.48	2.18	1.00	2.52	2.39	2.77	3.21
FDNHVRDTINKNTAFSTNDILATINTVDHRE	SLI15	S	597	1.00	1.13	1.13	1.25	1.69	1.00	1.15	1.19	1.38	1.24
ATINTVDHREIIGNVTPKIASVNDLSPEINT	SLI15	T	618	1.00	2.25	2.57	2.82	2.34	1.00	6.75	7.34	9.64	9.00
LGAVDEKSKMFRRLTGEGKLNLNELQFARS	SLU7	T	293	1.00	2.60	5.26	3.98	3.90	1.00	2.51	5.13	5.26	3.01
RKLREELKPRMQDLTSLLEQEKDLRGIENS	SLX9	T	109	1.00	1.96	2.22	2.45	2.03	1.00	1.68	1.87	2.08	1.79
KLREELKPRMQDLTSLLEQEKDLRGIENS	SLX9	S	110	1.00	3.54	3.76	5.56	4.26	1.00	2.39	3.08	3.84	3.57
NSKDMNDDDDIDMDSKIRFVTKEMNKLI	SLX9	S	138	1.00	1.65	1.95	2.02	1.99	1.00	1.72	1.68	1.97	1.88
FVDTKEMNKLIKIEGSRVRIKKNQPNIRKQ	SLX9	S	157	1.00	2.59	3.76	5.13	6.97	1.00	2.27	3.47	5.16	5.76
QPKETKKEKLLNRQNTFLSNLKGKSTLNDGI	SLX9	T	62	1.00	6.35	12.21	17.04	14.63	1.00	2.54	4.73	6.37	6.53
SLNLDLLVDQKQLNLSRRSGQIANDPSKRR	SMD1	S	115	1.00	3.45	4.32	4.32	4.80	1.00	2.90	4.11	5.95	6.63
DSLVDQKQLNLSRRSGQIANDPSKRRRDF	SMD1	S	119	1.00	1.20	1.21	1.29	1.60	1.00	1.30	1.29	1.58	2.04
SQQGLSHVTSTGSSSMELNGNKFKLPNIP	SMI1	S	203	1.00	1.52	1.58	1.22	0.99	1.00	1.27	1.99	1.69	1.14
DYFYAQRNCQQQAPSTLRTVTMAEFRRVPL	SM11	S	21	1.00	2.38	2.30	2.28	1.72	1.00	2.66	2.68	2.62	2.77
NRCQQQAPSTLRTVTMAEFRRVPLPPMAEV	SM11	T	27	1.00	13.21	11.66	9.91	5.93	1.00	6.60	6.75	6.42	5.81
RLNSIDHDMNNKFGSGELKSMFNQGVVEEM	SM11	S	87	1.00	1.41	1.33	1.49	1.26	1.00	2.44	1.74	2.83	4.14
AASVNTVPGSTFRSNTPLLGGRHPLSRTSSL	SMY2	T	70	1.00	1.36	2.00	1.37	1.44	1.00	2.10	2.78	2.74	1.49
NTPLLGGRHPLSRTSSLISIGIQAASPF	SMY2	S	84	1.00	1.61	1.78	1.33	1.15	1.00	2.01	2.09	2.02	1.49
RTSSLISIGIQAASPFSSMKPFIPQSSG	SMY2	S	96	1.00	1.70	2.11	1.67	1.59	1.00	3.39	3.77	3.13	1.83
RNAPLDSKDFENFASVSPAGPSSVHNKNGTL	SNF2	S	358	1.00	2.03	1.26	1.83	1.73	1.00	1.00	0.91	0.75	0.94
HEMKTQAAELQEKPLTPLKYTKLIAAEDGS	SNF6	T	165	1.00	0.83	0.77	0.70	0.59	1.00	1.64	1.13	1.20	1.18
AAPISENKVSLPSVPSNKIKQSENSVKDQEE	SNF7	S	204	1.00	1.14	1.37	1.35	1.69	1.00	0.80	1.05	1.03	1.10
KGKVMMAKNALKKKKTIEQLLSKVEGTMESM	SNF7	T	72	1.00	8.85	10.45	6.79	6.90	1.00	7.12	10.27	10.07	7.75
EKKMEKKSSSLSLEFMKS	SNM1	S	194	1.00	3.10	3.61	3.55	2.88	1.00	2.20	2.95	3.46	3.14
KISAPLTLPPRPLPSIQFPRSEMAEPTVTD	SNT1	S	1037	1.00	2.12	1.96	2.44	2.26	1.00	1.46	1.66	1.77	1.75
KGSKDLIKLIGPSTVVGSRVVIHAGQDDL	SOD1	S	112	1.00	1.81	1.73	1.87	1.82	1.00	0.77	0.92	1.01	1.24
MTGKAVGPESDSRVSPGMTGQIKSLNMAGK	SPA2	S	910	1.00	1.86	1.84	2.63	2.96	1.00	1.05	1.02	0.91	0.81
MAGKVVGPEADSRVSPGMEQIKSLGTMGK	SPA2	S	937	1.00	1.98	2.13	3.07	3.53	1.00	1.12	1.16	1.00	0.95
AQESIKSPEAARKLASSGEVDKIESPRMVR	SPA2	S	970	1.00	2.39	2.19	3.17	3.82	1.00	1.71	2.20	2.59	3.65
QESIKSPEAARKLASSGEVDKIESPRMVRES	SPA2	S	971	1.00	2.17	2.24	3.63	4.11	1.00	2.49	2.66	3.18	4.35
AARKLASSGEVDKIESPRMVRESLEAVGN	SPA2	S	979	1.00	1.40	1.26	1.51	1.38	1.00	1.07	0.90	0.87	0.86
EVDKIESPRMVRESLEAVGNTIPSNMVTK	SPA2	S	988	1.00	1.85	1.91	2.56	2.66	1.00	1.35	1.48	1.59	1.88
EASHLPNGSLKNMFEPTVPFIKSRNTTQTQ	SPC110	T	18	1.00	2.08	1.88	2.13	2.01	1.00	1.39	1.59	1.38	1.17
TKRVFRLVPEYDVERSKLDLIEVEPLVRTL	SPC19	S	58	1.00	1.31	1.55	1.90	2.12	1.00	1.48	1.47	1.80	2.07
TSDQSRKAIERTSLVLTNYVMRESDEGND	SPC42	S	195	1.00	1.55	1.51	1.63	1.54	1.00	1.30	1.49	1.66	1.59
TNYVMRESDEGNDRMSPPLNLTIPINNR	SPC42	S	213	1.00	1.36	1.32	1.37	1.19	1.00	1.27	1.36	1.51	1.47
LRLKCRLLNPASYYTPRRTSQSLSGSTF	SPL2	T	81	1.00	1.12	1.37	1.19	1.66	1.00	1.56	1.53	1.99	2.18
ARTASILKTDITRENTITRSSSSNNDNYHH	SPO12	T	25	1.00	1.59	1.69	1.62	1.80	1.00	1.81	1.16	1.18	1.08

GDLGKNSRDYEETEYSVI	SPP381	S	289	1.00	1.56	1.59	1.76	1.75	1.00	1.16	1.33	1.29	1.35
DQNVSLTEKSASLSHSDLGEIILNGTGKNR	SPP381	S	42	1.00	1.21	1.18	1.62	2.14	1.00	1.13	1.24	1.47	1.76
TAISRRASKASRDASSVELTEVPSKPKKPS	SPP41	S	563	1.00	1.34	1.52	1.40	1.72	1.00	1.38	1.48	1.43	1.67
RILSRPKSEHHEWPLSDSSASQNYDAHLKTV	SPP41	S	769	1.00	1.73	1.56	1.20	1.08	1.00	0.66	0.71	0.49	0.48
TTFQSEEDIKRAAPESEKDTSATSGIVPTLQ	SPT15	S	53	1.00	5.81	4.42	4.07	3.12	1.00	7.26	6.15	6.26	6.13
RSMMKMGRLRPNRYSSTDLQAGRAAFRRKP	SQS1	S	105	1.00	1.40	1.26	1.36	2.08	1.00	1.13	1.32	1.49	1.82
IEAIKKKLLRHVDSLIEDFVGDGIANSKKS	SRB7	S	124	1.00	3.55	5.50	5.25	4.62	1.00	5.53	6.46	6.56	4.99
ENKIDNKLNLSSDSEIEQDYQAKKRRKTS	SRC1	S	206	1.00	1.58	1.59	2.00	1.86	1.00	1.29	1.42	1.51	1.85
GTGHSTPLSKLVSASFADKLPQKEVPSTIL	SRC1	S	301	1.00	2.77	3.57	3.87	3.83	1.00	2.76	3.13	3.34	3.33
__MFLKTPNWETVNETPKSRVLTINELISP	SRL3	T	14	1.00	2.46	1.92	1.75	1.36	1.00	1.37	1.15	1.12	1.09
HNAKKQQMMKDGFEAVGEEDSKDATSQEN	SRO9	S	148	1.00	1.47	1.96	1.54	2.13	1.00	1.95	2.61	3.07	2.74
KSKQVNLTPAPLPTSSPWKLAPTEIPVSTIS	SRO9	S	40	1.00	1.37	1.44	1.67	1.98	1.00	0.96	1.41	1.41	1.52
SPWKLAPTEIPVSTISIEDLDATRRKKNRTP	SRO9	S	55	1.00	2.39	3.33	3.67	4.34	1.00	2.73	4.38	4.47	3.91
ISIEDLDATRRKKNRTPPKSSTATKWVPIK	SRO9	T	69	1.00	0.44	0.71	1.37	2.33	1.00	0.50	0.78	1.10	1.45
KSSTATKWVPIKASITVSGTKRSKSGKNGASN	SRO9	T	88	1.00	1.61	2.38	2.85	3.24	1.00	1.24	2.10	2.27	2.55
ATKWVPIKASITVSGTKRSKSGKNGASNGSN	SRO9	T	92	1.00	1.38	2.68	2.89	4.32	1.00	2.55	4.47	5.55	4.32
VPEYRRTNFKNKRFSADLRRRRDQQLVEL	SRP1	S	28	1.00	1.58	2.92	2.96	2.00	1.00	0.93	1.05	1.16	1.18
YKFTTNKSDVSRLLSALGPRGVSITPGKIE	SRP21	S	69	1.00	2.33	2.68	2.94	3.09	1.00	2.33	2.13	2.74	2.93
KSQQTHKNPELRQSSTVSTGSKGPPRRPK	SRV2	T	344	1.00	8.60	13.28	6.84	10.23	1.00	2.66	6.87	5.24	4.08
IVVPRNTTVPKIRRTFTTTCADNQTTVQFPV	SSB1	T	431	1.00	1.98	2.38	3.19	3.93	1.00	1.12	1.96	2.22	2.59
DLSVRRRSSTINNDSDLSSTKSGVRRRS	SSD1	S	487	1.00	2.00	2.33	2.11	1.54	1.00	0.99	1.65	1.53	1.19
GIDIVVNEVSNRSTPSVVGFGPKNRYLGETG	SSE1	S	38	1.00	1.46	1.57	1.91	2.22	1.00	1.45	1.65	1.91	2.53
KQFPATTKSPLRFAVSVPYKPHSDNQIMA	SSK1	S	193	1.00	1.58	2.03	2.05	1.79	1.00	1.33	1.56	1.54	1.52
FEKQNGIGIQKLSNNSHSLKGTSKRFSDQA	SSK1	S	587	1.00	1.48	2.67	2.84	2.92	1.00	1.34	1.85	2.54	2.69
RPSNIGLPLPKNPQQSLPLKSTQPPVHVKK	SSK2	T	131	1.00	1.48	1.56	1.66	2.00	1.00	1.12	1.13	1.04	1.19
VEKLEAVPEVFEVREGTOFLAKCKKPKLKEYT	SSS1	T	33	1.00	1.50	2.29	2.85	3.20	1.00	1.14	1.37	1.65	1.79
YSFGRRSQVVFADSTPENIEHEIAQKIRP	STB3	T	262	1.00	1.99	1.57	1.81	1.52	1.00	1.68	1.33	1.18	1.24
KHQQPVASSTVNSKSSDIRRATPVSTPVI	STE20	S	195	1.00	1.98	1.91	3.52	3.41	1.00	1.06	1.12	1.43	1.70
PSMTTTPRQINSASHLSLNPKHQKPKVVPK	STE20	S	228	1.00	1.70	1.18	1.34	1.19	1.00	0.99	0.89	0.86	0.90
IPSRPAPKPPSSASAPIKSPVMNSAANV	STE20	S	486	1.00	3.83	4.88	6.04	4.18	1.00	2.33	4.17	5.52	5.84
FRQPSLSHSHKLDKSNKVPQISTNQSHPS	STE50	S	222	1.00	6.79	7.78	4.47	4.08	1.00	7.65	11.77	9.83	6.25
KADPKYFSHTGNYGESPNHKKQSGKNGWGW	STF2	S	28	1.00	1.80	1.54	1.75	2.14	1.00	1.40	1.50	1.42	1.46
YKASQRFQPGTSNETPEEYQRAMKDPVEVA	STI1	T	526	1.00	2.07	2.34	3.41	3.46	1.00	3.09	5.01	7.49	12.33
AAEAEDAGPKTAQLSLQDYLNQANQNFNK	STM1	S	150	1.00	2.76	3.45	7.04	9.02	1.00	1.60	1.76	3.17	5.06
VPEAKKVELDAERITAEKEAYVPATKVKNV	STM1	T	181	1.00	1.27	1.64	2.24	3.21	1.00	1.40	1.25	1.90	3.30
KSKQLTKKEYLEFDATFVESNTRKNFGDRNN	STM1	T	212	1.00	1.33	1.51	1.97	2.34	1.00	1.13	1.36	1.45	1.53
TKEYLEFDATFVESNTRKNFGDRNNSRNRF	STM1	T	218	1.00	2.46	3.43	5.04	5.83	1.00	1.38	1.74	2.22	2.44
VESNTRKNFGDRNNSRNRFNRRGRGARK	STM1	S	229	1.00	1.40	1.93	2.92	5.31	1.00	1.20	1.35	2.43	3.75
FNNRRGRGARKGNNTANATNSANTVQKRN	STM1	T	248	1.00	2.17	2.32	2.30	2.98	1.00	1.44	1.64	2.11	2.16
GRGARKGNNTANATNSANTVQKRNIDVSNL	STM1	S	254	1.00	1.64	1.84	2.12	3.32	1.00	1.43	1.66	2.18	3.08
ARKGNNTANATNSANTVQKRNIDVSNLPSL	STM1	T	257	1.00	1.53	1.45	1.23	1.62	1.00	1.65	1.33	1.39	1.44
NTVQKRNIDVSNLPSLA	STM1	S	271	1.00	2.08	2.34	2.81	2.85	1.00	1.56	1.61	1.99	2.15
PSRSIPILKVGAPSSVGGAGVSTPHSTKIN	STP3	S	121	1.00	1.57	1.43	1.60	1.52	1.00	1.56	1.39	1.46	1.44
KDEFMQUIARESNNNGADDQDDTARTSANN	STP4	S	343	1.00	2.28	1.79	1.96	1.87	1.00	2.69	2.78	3.84	3.82
ADDQDDTARTSANNDSNDKLAASSSSSEE	STP4	S	360	1.00	0.88	0.91	0.60	0.72	1.00	1.35	1.20	1.92	2.05
_MSIENLKSDFPFDGDDTATSNIYHIRI	SUI1	T	15	1.00	1.64	1.52	1.65	1.86	1.00	1.72	1.58	1.98	2.52
PSNPVQAPVRSRATQEIQIKSLELASL	SUM1	S	395	1.00	2.10	2.02	3.06	3.10	1.00	2.01	2.45	2.63	3.09
NPVQAPVRSRATQEIQIKSLELASL	SUM1	T	397	1.00	2.80	2.58	3.76	4.07	1.00	1.78	2.06	2.24	2.53
QKQAAKPKKTLKLVSSGKLANATKVKGT	SUP35	S	148	1.00	2.10	2.98	3.85	4.17	1.00	1.49	2.36	2.58	2.68
QQRFNNSNIPRKPSPFPQLQSANVRSNSR	SVL3	S	551	1.00	1.42	1.16	1.38	1.19	1.00	0.78	0.85	0.81	0.82
PTHSIVNQNLRSQQSKNLMPPHATNPNT	SVL3	S	679	1.00	2.05	1.76	2.17	1.62	1.00	0.91	1.14	1.11	1.18
_____MSDPFAHLTSLKNKDS	SWA2	S	2	1.00	1.16	1.16	1.39	1.37	1.00	1.20	1.28	1.36	1.62
APAAPVQLEKAVRTKSNESRQLHRRPLKRP	SWC5	S	206	1.00	1.24	1.37	0.74	0.96	1.00	2.09	1.37	2.14	2.94
KDGFARQEFILQVGSFAEDERYKELRRQQLA	SWC5	S	278	1.00	0.91	1.22	1.41	1.32	1.00	1.36	1.30	1.71	1.81
KELRRQQLAQQQLQDSEAS	SWC5	S	300	1.00	1.60	1.45	1.39	1.38	1.00	2.00	2.08	2.76	3.22
DDGVNRDKGRNKVDYSRIESEGGLIKTRRA	SWC5	S	68	1.00	1.37	1.74	2.66	2.24	1.00	1.27	1.23	1.24	1.28
KQPTMQANKLDSQETPSTESRAQNVFGQD	SWI3	T	91	1.00	1.06	1.23	1.29	1.24	1.00	1.73	1.69	2.09	2.01
PNENLSSKTKFITPFPKSRVSSATSANSANI	SWI5	T	323	1.00	1.21	1.10	0.99	0.78	1.00	1.60	1.08	0.96	0.81
AYARNNGWHELALPQSR	SWM1	S	169	1.00	1.61	1.78	1.76	1.90	1.00	1.04	1.30	1.59	1.39
RKRQMNAKTLVGVESFINDKNKQFNEKLSR	SYF2	S	194	1.00	4.83	5.15	4.93	4.30	1.00	4.28	5.34	6.28	4.93
YDAWERRHPQKGTGQSQRGGISYDQLAKLSY	SYF2	S	90	1.00	1.36	1.52	1.90	2.28	1.00	1.95	1.87	2.42	2.60
WEQVQKTKKFNRRASLDDFISRTPSPSSA	SYH1	S	638	1.00	2.02	2.84	1.77	1.31	1.00	2.23	3.17	2.27	1.33
NTEREKSPQKDKRKSFAFNIGHRLASASSS	SYP1	S	297	1.00	1.06	1.24	0.89	1.20	1.00	1.34	1.69	1.31	1.44
QDEISKRRFRRRSRVDFVYINKNNTAKN	SYT1	T	277	1.00	1.55	1.36	1.42	1.16	1.00	1.15	1.08	1.06	1.04
ASHPDHQVLSRSRQSTSFVQGGKGRKSIE	SYT1	S	356	1.00	1.67	1.37	1.75	1.41	1.00	1.00	1.07	0.96	1.13
NTITATNPNRGNVNTSQTEQSKAKVTNVAAT	TAF12	S	325	1.00	2.87	3.71	3.58	3.41	1.00	5.99	6.37	9.19	10.76
GLRAGSKKQYQWLTSSVKNPSTLGAKSSGKV	TAF4	S	321	1.00	8.45	8.14	6.03	4.01	1.00	10.74	9.11	10.21	8.87
TQAIQMCQQGLRYTSTAETHVAIRSKLQYRLE	TAH1	T	70	1.00	2.45	3.36	4.62	4.57	1.00	1.64	2.57	4.03	5.11
DIASKGLGTGLKAGTTVIGGGVGAIGIKKGG	TCB1	T	1147	1.00	9.28	7.03	6.34	4.96	1.00	270.08	288.26	196.62	137.23
GNFATKGLGTGKAGSTVFALGTNVVSTGLG	TCB2	S	1136	1.00	7.00	7.44	11.53	9.41	1.00	1.61	2.81	2.68	2.77
_____MVHRGRTLKSDTDVTSLNASTVSHQ	TCO89	S	10	1.00	1.23	1.18	1.73	1.75	1.00	0.65	0.79	0.92	1.09
TRVKSNGQKRSASFHSVPVHNTLSPKNSHS	TCO89	S	107	1.00	6.67	2.84	2.73	2.57	1.00	1.57	1.47	1.27	1.41
MVHRGRTLKSDTDVTSLNASTVSHQSKPFRQ	TCO89	S	16	1.00	1.93	1.21	1.31	1.21	1.00	1.56	1.38	1.28	1.21
SKKSESTTDEEVECFSEDNIEDGKVNNDKVI	TCO89	S	166	1.00	2.07	2.34	1.49	1.04	1.00	2.32	1.72	1.56	1.49
EGQSKVTKEADIDDLSSHQNLRLASLVKAGD	TCO89	S	287	1.00	1.76	1.60	1.43	1.32	1.00	1.23	1.32	1.36	1.49
SKVTKEADIDDLSSHQNLRLASLVKAGDNIS	TCO89	S	290	1.00	1.67	1.62	1.90	1.46	1.00	1.92	1.76	1.91	1.80
ADIDDLSSHQNLRLASLVKAGDNISEAPYDK	TCO89	S	296	1.00	1.61	1.45	1.21	0.65	1.00	1.63	1.39	1.18	0.95
SQNLRLASLVKAGDNISEAPYDKKIKLIDVGN	TCO89	S	305	1.00	1.36	1.45	2.27	2.84	1.00	2.14	1.86	2.42	2.77
APRSNRRKSDSSFMRLRROSSKQKHLNEE	TCO89	S	361	1.00	3.63	2.99	2.12	1.25	1.00	3.23	2.55	2.05	1.70
KLLNEEELIKPDDISSAGTKDIEGHSLLEN	TCO89	S	386	1.00	2.26	2.30	2.10	2.10	1.00	4.64	3.41	3.63	3.23
SISLTLNLRRAAPESFHGRMNNIFHKKGN	TCO89	S	512	1.00	4.87	3.51	3.09	2.41	1.00	3.70	3.58	3.29	3.10
RAKSNASFGLRRVLTHTDGLDNDYFNKHN	TCO89	T	52	1.00	1.76	2.28	3.11	2.67	1.00	1.51	1.42	2.00	2.12
NASFGLRRVLTHTDGLDNDYFNKHNVSQK	TCO89	T	56	1.00	1.68	1.88	2.05	1.86	1.00	1.59	1.82	1.94	1.81
GSDANRQNSGAKFNFAFLKSDGIDAESR	TCO89	S	575	1.00	8.89	9.88	8.78	7.01	1.00	31.53	29.07	32.38	27.93
SNSGAKFNFAFLKSDGIDAESRTRKRLW	TCO89	S	582	1.00	5.05	5.46	6.78	4.89	1.00	4.26	4.10	4.36	3.92
NSFAFLKSDGIDAESRTRKRLWLRQNSIM	TCO89	S	589	1.00	4.08	4.67	5.58	4.34	1.00	4.48	5.55	6.94	8.09
AESRTRKRLWLQRENSIMDLSSQNDGSDSIF	TCO89	S	602	1.00	0.97	1.20	1.67	1.41	1.00	1.70	1.49	1.72	1.86
DDLFTNYDKKFDLPHLPHLAKIAQVLSGI	TCO89	Y	702	1.00	1.83	2.70	3.15	3.00	1.00	2.06	2.97	4.80	5.09
TNYDKKFDLPHLPHLAKIAQVLSGIWKS	TCO89	Y	707	1.00	3.06	4.07	6.30	6.31	1.00	3.04	3.60	6.40	7.38

DLYPHLASAKIQAVLSGIWKSESYLFNKDQVN	TCO89	S	715	1.00	1.55	2.02	2.68	4.10	1.00	1.73	2.22	4.09	5.36
SAKIQAVLSGIWKSESYLFNKDQVNPINKNRT	TCO89	S	722	1.00	4.43	5.33	6.89	6.22	1.00	4.64	5.84	8.20	7.08
DVNPINKNRTTSTNHSVGHASQANRNLRRG	TCO89	S	743	1.00	6.96	3.64	2.34	1.79	1.00	3.45	2.81	2.11	2.13
TASQANRNLRRGPMGSSSTLHHQRVINSLOP	TCO89	S	762	1.00	5.19	4.28	3.13	2.59	1.00	5.34	5.51	5.64	4.85
ASQANRNLRRGPMGSSSTLHHQRVINSLOP	TCO89	S	763	1.00	3.56	3.30	2.17	1.59	1.00	3.52	3.00	3.22	3.22
PMGSSSTLHHQRVINSLOPTRAVNRRMENV	TCO89	S	774	1.00	4.57	4.94	5.12	3.82	1.00	6.73	7.06	7.81	7.28
TRAVNRRMENVGYMHTQPQQR	TCO89	T	794	1.00	1.60	1.67	2.68	2.69	1.00	1.33	1.56	1.59	1.71
DLVDVSTRNISI MSPVRKTGRKIRSASSN	TDA11	S	29	1.00	1.72	1.53	1.19	0.75	1.00	1.69	1.40	1.13	0.83
FEESLDDQLLRRSLTPQGEKKKPLVKGSL	TEA1	T	230	1.00	1.44	1.50	1.97	2.00	1.00	1.08	1.24	1.58	1.83
DEDFGSSPKKVRPGSIAAALQANQTDISK	TFA2	S	106	1.00	1.06	1.37	2.71	1.47	1.00	0.75	0.98	0.92	0.90
PVTFHLPVRLHRKDRNLQFLTRAIEVQR	TFG1	T	144	1.00	3.96	5.50	4.89	4.38	1.00	3.10	4.86	4.33	3.03
SGTVSLNNTVKDGSQTPVDSVTKDNTANGV	TFG1	T	200	1.00	0.47	0.92	0.51	0.54	1.00	1.26	1.74	1.74	0.84
DAMIHSDLAGNFRRHSDIGRPPSQATKSSPF	TGL4	S	877	1.00	1.55	1.26	1.51	1.25	1.00	0.58	0.71	0.61	0.63
SKSSFTQQGTRQKANSLSFAIGASSLRKKS	TGL5	S	645	1.00	2.01	1.73	1.92	1.70	1.00	1.23	1.25	1.16	1.12
_____MADYSSLTVVQLKDLLTKRN	THO1	S	5	1.00	1.67	2.26	4.13	8.26	1.00	1.15	1.45	2.82	6.06
KANPYQASSYKRDSPSENEEKPKRFKQDET	THO2	S	1528	1.00	2.41	3.45	5.65	6.21	1.00	1.53	3.34	4.44	4.75
SVAAPRRGGADVDWSSARGSNFQDGREDA	TIF3	S	194	1.00	1.24	1.52	1.47	1.96	1.00	1.34	1.33	1.70	1.73
VAAAPRRGGADVDWSSARGSNFQDGREDA	TIF3	S	195	1.00	2.33	3.17	3.24	4.97	1.00	1.72	1.93	2.69	3.05
RRGGADVDWSSARGSNFQDGREDA	TIF3	S	199	1.00	1.50	1.62	1.83	2.19	1.00	1.35	1.56	1.98	1.86
GREDA	TIF3	S	220	1.00	1.56	1.82	1.99	2.43	1.00	1.65	2.09	3.40	3.43
VDIDWTAARGSNFQSSRPRREREVIDID	TIF3	S	247	1.00	5.05	5.92	8.89	12.65	1.00	3.52	5.07	10.43	11.57
DIDWTAARGSNFQSSRPRREREVIDID	TIF3	S	248	1.00	3.59	3.84	5.52	7.05	1.00	2.58	4.06	8.02	9.19
SRPPREREVIDIDWSSARGSNFQSSRPPR	TIF3	S	263	1.00	1.45	1.59	1.85	2.13	1.00	1.24	1.35	1.35	1.70
SRPPREREVIDIDWSSARGSNFQSSRPPR	TIF3	S	289	1.00	1.50	1.55	1.90	2.29	1.00	1.23	1.30	1.57	2.00
QFGPQQTKNTYKDRSLNKKTTDEQPKIQK	TIF3	S	364	1.00	1.95	2.73	2.99	3.19	1.00	3.73	4.88	8.84	9.86
GKPQQTKNTYKDRSLNKKTTDEQPKIQKSV	TIF3	T	366	1.00	3.98	5.96	5.75	6.29	1.00	5.21	9.10	10.24	8.99
QTKNTYKDRSLNKKTTDEQPKIQKSVYDVL	TIF3	T	370	1.00	5.98	10.41	12.12	12.42	1.00	5.98	12.36	19.90	23.02
TKNTYKDRSLNKKTTDEQPKIQKSVYDVL	TIF3	T	371	1.00	13.26	24.27	29.79	29.80	1.00	6.35	11.36	25.09	30.58
QVGGAGSIPGQYVPPSRRAGARDPSSDAYRD	TIF35	S	168	1.00	1.36	1.65	1.48	1.72	1.00	2.15	1.47	1.98	1.81
IPLSELAHAKNNSNTRSGGFGGSGGSRSL	TIF3	T	63	1.00	1.76	2.18	2.35	2.12	1.00	1.68	2.27	2.48	2.95
LSELAHAKNNSNTRSGGFGGSGGSRSLDP	TIF3	S	65	1.00	1.91	2.12	2.44	2.61	1.00	2.25	3.16	4.70	5.17
AKNNSNTRSGGFGGSGGSRSLDPALGGGS	TIF3	S	71	1.00	4.31	4.90	4.53	3.78	1.00	8.47	12.70	17.23	15.83
NNTRSGGFGGSGGSRSLDPALGGGSSDRRE	TIF3	S	76	1.00	2.30	2.53	2.02	1.84	1.00	3.45	3.88	4.86	4.27
EQHKAKLQSQERSTVSPQESKKTSDS	TIF4631	S	163	1.00	0.77	0.67	1.34	2.81	1.00	0.59	0.64	0.69	0.92
TPSTNDSKASSEENISEAEKTRNFIEQVLT	TIF4631	S	200	1.00	1.47	1.62	2.14	2.73	1.00	1.94	2.03	2.73	3.93
NIPMKTTPENVEEKGSDDPEVTEKTPAAEEK	TIF4631	S	251	1.00	1.37	1.44	1.91	1.90	1.00	1.10	1.12	1.40	1.94
GRGNRSRDSGRFGNNSRGGHDFRNTSVRNMDD	TIF4631	S	502	1.00	5.02	4.20	2.79	2.85	1.00	3.58	4.39	3.41	2.21
RGNRSRDSGRFGNNSRGGHDFRNTSVRNMDD	TIF4631	S	503	1.00	5.19	6.18	4.95	4.05	1.00	3.86	5.75	4.64	3.89
RFGNNSRGGHDFRNTSVRNMDDRANSRSTSSK	TIF4631	S	512	1.00	7.39	7.37	7.90	5.77	1.00	4.70	7.52	6.59	6.06
DFRNTSVRNMDDRANSRSTSSKRKRMRMDDDR	TIF4631	S	522	1.00	2.12	1.70	1.60	1.19	1.00	1.13	1.18	0.94	0.63
TSSKRKRMRMDDRRSNRSYTSRRDREGRSY	TIF4631	S	539	1.00	5.00	4.32	3.54	2.23	1.00	2.16	2.67	1.68	1.17
RSNRSYTSRRDREGRSYRNEEKREDDKPKKEE	TIF4631	S	553	1.00	5.72	5.61	3.53	4.86	1.00	4.05	5.38	4.81	3.54
NRHSFRDAPPASKSDSFIITRTYQSRNSQRA	TIF4631	S	908	1.00	1.87	3.01	2.87	2.62	1.00	1.50	2.35	2.38	1.95
KPKDSRGGDFRSPMRGMDDHTSSSRVSSK	TIF4632	S	476	1.00	6.16	6.05	6.12	5.13	1.00	2.42	4.14	3.78	3.78
VSSKRKRMRMDDRRSNRGTYSRKDREKAAE	TIF4632	S	503	1.00	2.76	2.92	2.00	2.17	1.00	1.22	1.89	1.52	1.25
RYSSNRRNMQNTQRDSFASTKGTGSRNMQRN	TIF4632	S	872	1.00	1.54	2.50	2.08	1.92	1.00	1.13	1.81	2.02	1.65
MQNTQRDSFASTKGTGSRNMQRNARKVEEVS	TIF4632	S	880	1.00	3.88	5.71	4.69	4.37	1.00	2.96	5.93	5.34	4.05
QGSQANAPSDGTGSSTPQHDEDELSRQI	TIF5	T	191	1.00	0.95	1.40	1.39	2.25	1.00	0.47	0.96	1.16	1.10
_____MSFLGGGGQQLSSQQ	TIM10	S	2	1.00	1.18	1.21	1.57	1.44	1.00	1.17	1.50	1.51	2.21
_____MSSSLTSDLASLDDTSKKEIATFLEG	TIM8	S	11	1.00	0.96	0.84	0.66	0.64	1.00	1.86	1.08	1.12	1.18
KSNPKYFTHNGNFGESPNNHVKGGYKGNWVG	TMA10	S	28	1.00	1.09	1.36	1.71	3.44	1.00	1.25	1.41	2.98	4.73
KTRRGNSQNNERRSLDLQYHI	TMA10	S	79	1.00	3.36	8.23	29.96	126.07	1.00	2.04	28.31	100.18	157.70
IEDKSTYHAKIKSDSGVLGAIPLNSRSSS	TMC1	S	43	1.00	1.70	1.42	1.69	1.58	1.00	1.19	1.34	1.33	1.44
YMDRKLITQRSTSFSDHEPQHTKPRKLFVK	TOD6	S	206	1.00	1.85	1.23	1.18	1.00	1.00	1.07	0.99	0.85	0.80
LFVKPRFSHSITNTNPVKTAAQNTNLSLYN	TOD6	T	233	1.00	2.30	1.89	2.01	2.23	1.00	1.17	1.80	1.22	1.61
HSTTKRKNHSVSSRSSFNMHMSRSSF	TOD6	S	304	1.00	1.64	1.32	1.33	1.08	1.00	1.80	1.78	1.76	1.36
SRRSFSNHAPTEPISRASLVVSPYMSPRR	TOD6	S	329	1.00	3.14	2.37	2.01	1.73	1.00	2.80	2.90	2.48	1.85
SFNHAPTEPISRASLVVSPYMSPRR	TOD6	S	333	1.00	1.52	1.29	1.19	1.00	1.00	1.73	1.70	1.80	1.63
AKHDNPKSSELSMTSANDIRNEQDELPGIN	TOD6	S	503	1.00	1.39	1.33	1.66	1.51	1.00	1.44	1.20	1.38	1.49
LELKDYSKVLRRASANEGLGKFADAMPDL	TOM70	S	174	1.00	9.78	21.62	16.05	13.52	1.00	5.30	15.25	17.77	13.30
NPSELSMKPRYPKAGSLRNLIKAQYLPGNSS	TOS2	S	537	1.00	1.53	1.64	1.78	1.57	1.00	1.54	1.68	1.74	1.65
NQLEDEIEIKLEAGLSDSKQTEQDNVEKENQ	TPM1	S	65	1.00	0.24	0.32	0.29	0.30	1.00	1.79	1.12	1.16	0.81
TEGGGADLAIQRTTMMNSAAESEVNITRRL	TPO1	T	69	1.00	1.45	1.61	1.64	1.54	1.00	1.46	2.07	1.72	1.54
PSVEEFPASPARVCSPEQASASSISASRS	TPS3	S	148	1.00	1.91	1.91	3.04	3.40	1.00	1.32	1.54	1.73	1.80
HHNDLSSLMKNPNLSDHPPRVRSSKSA	TPS3	S	181	1.00	1.63	1.65	2.12	2.13	1.00	1.16	1.41	1.56	1.66
GKNVPSLRTNTHRSNPGIAITDNETDKKH	TRK1	S	414	1.00	1.47	1.57	1.65	1.32	1.00	0.96	1.22	1.12	1.21
FPKARRIQKRRSLSTGSEIKNSSNVS	TRK1	S	490	1.00	1.45	1.13	1.41	1.24	1.00	0.75	0.84	0.79	0.88
HTPTSKTMLKPRKNGSVERFFSPSNIPDR	TSL1	S	129	1.00	2.96	4.55	12.06	20.89	1.00	1.96	5.14	13.10	25.79
PAPEQGVPPAISRSATRSPSAFNRASSTNT	TSL1	T	75	1.00	1.16	1.64	2.02	2.38	1.00	0.97	1.89	2.92	3.96
PEQGVPPAISRSATRSPSAFNRASSTNTAT	TSL1	S	77	1.00	1.72	2.08	5.21	10.13	1.00	1.28	2.21	4.15	8.13
ALLRKNTSVKLVSDSASPLSTFRVNSEKP	TWF1	S	170	1.00	2.73	5.34	4.02	2.83	1.00	1.95	3.45	3.66	2.67
SLLMATNKEDSLDHSNPDLPNKSMLKFNKP	TWF1	S	308	1.00	0.89	1.26	1.22	1.34	1.00	1.27	1.42	2.24	2.54
ELHPEQPRNVLSKAVSPTDSTPPSTHTEDSK	TY1B-PR3	S	960	1.00	1.69	1.28	1.86	2.37	1.00	0.68	1.06	0.80	0.81
EQPRNVLSKAVSPTDSTPPSTHTEDSKPISE	TY1B-PR3	S	964	1.00	1.54	1.33	1.35	1.23	1.00	0.94	1.11	1.11	1.13
ETEDPFTKAAEKVLSLEEILDPEDRIRAEQ	UBC6	S	196	1.00	3.22	2.29	2.74	2.35	1.00	1.19	2.84	2.25	2.00
PAAKSWSAIAASDAIKSRQASNKTVSGSMVTK	UBP3	S	360	1.00	2.68	3.83	8.24	7.65	1.00	1.54	2.33	5.34	7.98
PNNTTSSKANNQSENNATSSQGTSRST	UME6	S	754	1.00	1.23	1.01	1.07	1.23	1.00	1.83	1.81	2.46	3.21
LSEDISVNTNKRSLSDVYILT	USV1	S	385	1.00	1.03	0.88	1.14	1.52	1.00	1.07	0.95	1.43	2.26
PDVKPDVKGKNSGLRSFLRKKTQNWIDERKL	UTP7	S	499	1.00	5.62	8.07	10.11	8.71	1.00	3.61	5.53	6.50	4.41
VTAKGAEFELRRYNSHESILSNKPAPSKSL	VAC17	S	269	1.00	1.62	1.38	1.40	1.23	1.00	0.85	1.05	0.88	0.75
NKKSLLVASNPAFASDVLSKKKPAVISNNA	VAC7	S	164	1.00	3.30	3.66	5.61	6.43	1.00	1.53	1.80	1.91	1.89
NKPKIERTPMHVTNSREILLGENLLDDTKA	VAC7	S	260	1.00	2.81	2.23	2.34	1.85	1.00	1.50	1.63	1.71	1.63
LYGVSTPNKRYLYSEFWKLRLEDRVGS	VAM7	S	43	1.00	0.69	1.42	1.21	1.44	1.00	1.81	2.73	3.61	3.13
NIKKAMDNLGSLPISRNQSSNNIKDKRSEH	VAN1	S	25	1.00	2.17	2.61	2.44	2.42	1.00	1.42	2.39	1.99	1.77
NTNKHKTINNNIKNSPFTNSNPSKSN	VHS2	S	409	1.00	1.52	1.41	1.54	1.35	1.00	1.68	1.35	1.41	1.71
NTINNNIKNSPFTNSNPSKSNSTTSM	VHS2	S	415	1.00	1.19	1.20	1.38	1.22	1.00	1.62	1.33	2.01	2.28
AVVSNTPEPGLKRIPTVTFSDPKLGLSLSDV	VHS3	T	90	1.00	3.51	3.88	3.72	3.20	1.00	2.71	3.25	3.43	3.12
QQETKNLNPASPEMSPLFLNKNKTQKAMQSI	VIP1	S	31	1.00	1.43	1.60	2.09	2.04	1.00	0.94	1.38	1.25	1.31
TQKAMQSIAPILEGFSPKTASENMSLKLPP	VIP1	S	54	1.00	1.24	1.30	1.56	1.87	1.00	1.38	1.44	1.57	1.84

QNIQKNLQRSNNKQPSLRKQALKILNKRKQL	VPS60	S	65	1.00	1.46	1.47	2.05	2.37	1.00	1.43	1.41	2.94	5.01
DAIANKQSTVDEAPNSQPKNIINEQKITN	VPS72	S	425	1.00	0.63	0.93	0.90	1.06	1.00	1.86	1.53	2.04	1.74
PAGGLPFLAEINARRSERGAVEGVSSTKIQT	VRP1	S	284	1.00	6.81	6.88	11.03	9.00	1.00	3.94	6.12	8.66	13.79
SKQSKISSSSSAVTPGGPLPFLAEIQKR	VRP1	T	471	1.00	2.04	2.10	4.28	7.30	1.00	1.20	1.20	1.48	1.37
LLGDIRKGMKLLKAETNDRSAPIVGGGVSS	VRP1	T	49	1.00	33.20	23.86	9.43	11.48	1.00	14.01	12.63	15.54	10.26
PPPPSPSTMDTGTSSPSKNLQRFLSTGGGS	VRP1	S	720	1.00	1.60	1.41	0.67	0.36	1.00	1.78	1.41	1.42	1.16
NLNEKFLIERAFSSSSETPVLSKEATYMP	WHI4	S	24	1.00	1.71	1.67	1.47	1.15	1.00	1.52	1.42	1.46	1.30
LNEKFLIERAFSSSSETPVLSKEATYMP	WHI4	S	25	1.00	1.52	1.62	1.43	1.21	1.00	1.28	1.27	1.38	1.30
DGHVSMPLPPTPKSRRESEVFLSPSRLRS	WHI5	S	146	1.00	1.78	1.72	1.97	2.19	1.00	1.66	1.53	1.98	2.80
KTLELELELAPAVQTPRRYHNRFPDSADA	WHI5	T	215	1.00	1.68	1.23	1.20	0.98	1.00	1.49	1.14	1.01	0.95
LLSTPVRKNGFGTSPSPSPGKITSKSR	WHI5	S	59	1.00	2.25	2.19	2.19	2.26	1.00	1.83	2.00	2.53	2.88
IPSRNNTALSKNASTFATYDLPTRAPGGRD	WSC2	T	405	1.00	2.07	1.80	1.44	1.50	1.00	1.57	1.56	1.61	1.62
PKFVSRVDNLVHQKSLTFNSVVPDKNNNT	WTM1	S	37	1.00	0.89	1.15	0.98	0.82	1.00	1.66	1.81	2.10	2.35
QAPMPAAAPQAYYGTAPSTKSGSHGGAMM	WWM1	T	128	1.00	2.33	2.07	1.84	1.48	1.00	1.82	1.44	1.25	1.14
KVLEYLARDDPNLHFSKNNVHNSNEPIDTP	YAP1	S	151	1.00	2.23	3.19	3.93	3.00	1.00	1.43	2.02	2.40	2.82
DPNLHFSKNNVHNSNEPIDTPNDIQENVK	YAP1	S	160	1.00	1.41	1.37	2.33	1.24	1.00	1.48	1.40	1.49	1.98
FSKNNVHNSNEPIDTPNDIQENVKQKMNF	YAP1	T	165	1.00	3.28	2.58	2.46	2.34	1.00	3.13	2.65	2.29	2.15
SVSTAKRSLDVSPGSLAEFEKSRHDEIE	YAP1	S	17	1.00	1.90	1.76	2.10	1.61	1.00	1.43	1.42	1.42	1.46
IENEHRTGTDRGEDSEKPKKSKTSKKQD	YAP1	S	46	1.00	1.69	2.39	2.06	2.13	1.00	1.82	1.64	2.26	2.98
AQRKRVRHLHEDYETEENDEELQKRRQNR	YAP5	T	54	1.00	2.39	2.51	2.30	2.17	1.00	2.51	2.68	3.74	3.59
_MGLHSEPLDQEDQTIILDARAGDLSLKD	YAR1	T	15	1.00	1.76	1.72	2.11	2.05	1.00	1.31	1.57	1.77	1.95
FLKKYDVEPEDEEDTQTEGKNVQITKGTG	YAR1	T	161	1.00	2.12	2.34	2.33	3.82	1.00	2.39	2.12	3.60	6.31
AKNQKSGDPKRMESDAEILRQKQAAADAR	YDLO85C-A	S	37	1.00	1.33	1.43	1.70	1.82	1.00	0.93	1.16	1.18	1.20
DHTNVLKFDLKDTEESLGHDSASASSSRKF	YDL121C	S	73	1.00	1.75	2.19	2.92	2.86	1.00	1.39	2.24	2.87	2.78
GNMEKNGLALNFKSRPTDALMANSIKNSNN	YDR186C	T	740	1.00	2.41	2.45	4.65	4.88	1.00	1.28	1.65	1.90	2.30
RTNPFITTSANSNAHFSKIKRSPPPMDMK	YDR239C	S	144	1.00	1.05	0.94	1.11	1.35	1.00	0.99	0.90	1.18	2.39
ENYINEHKVSSGSLSDTSENSDTKASQDK	YDR239C	S	224	1.00	1.35	0.96	0.62	0.38	1.00	1.98	1.10	0.88	0.61
DDDDGLQEKGFVDESSEKAFINYSDDQSSIK	YDR239C	S	382	1.00	1.04	1.00	1.33	1.46	1.00	3.13	2.15	3.62	4.63
KSVRKPSPSTIKKSTIARTSTAETSADI	YDR239C	T	44	1.00	5.80	6.42	6.96	7.10	1.00	3.19	3.91	5.09	5.47
RSVKCSPLTSVVSNKSEKSVLVSSYVEELR	YDR239C	S	546	1.00	1.05	1.15	1.45	1.18	1.00	1.40	1.18	1.84	2.27
KVKQKLLALETRNEESDGTATGLKKNINVDH	YDR239C	S	625	1.00	1.29	1.11	0.86	0.87	1.00	1.72	1.58	1.69	1.79
PLREKRGQNGSVDSVSRNTVSVYTRSQNR	YDR239C	S	704	1.00	2.96	3.20	2.60	2.67	1.00	3.36	2.61	2.90	2.50
KRGQNGSVDSVSRNTVSVYTRSQNRMRSG	YDR239C	T	708	1.00	1.59	1.33	1.30	1.09	1.00	1.23	1.21	1.07	1.00
QNGSVDSVSRNTVSVYTRSQNRMRSGTLD	YDR239C	S	711	1.00	1.94	1.84	1.83	1.59	1.00	1.79	1.78	2.01	1.59
PDIPRSPNRNHRSHSIQAPLQKELTKNT	YDR239C	S	722	1.00	2.40	2.35	2.93	2.64	1.00	3.05	2.54	3.85	4.30
NTVSVYTRSQNRMRSGTLDNDVYNRQKLP	YDR239C	S	722	1.00	2.05	1.69	1.72	1.58	1.00	1.68	1.48	1.57	1.66
VSVYTRSQNRMRSGTLDNDVYNRQKLP	YDR239C	T	724	1.00	2.47	1.94	1.87	1.64	1.00	1.76	1.49	1.53	1.58
LDNDVYNRQKLPHTHISLQDVRDANARSISR	YDR239C	S	740	1.00	5.55	5.41	5.93	4.97	1.00	3.18	3.16	4.10	4.96
ANKDTLKIKDLQKMTDELNRWLGRQNTTSA	YER034W	T	122	1.00	2.41	3.21	3.86	4.01	1.00	1.79	3.30	4.69	4.99
DSHSISSKDVASISLYDSIYTNRSTNL	YER079W	S	18	1.00	1.90	1.82	2.01	2.27	1.00	1.58	1.58	1.76	1.98
IYTNRSTNLDLQDRSMSPNSIASGEDRTR	YER079W	S	39	1.00	1.28	1.05	1.07	0.89	1.00	1.34	1.26	1.42	1.77
VKRDGIPKYSLLNLSMVRKQYDHNNGTKSP	YER079W	S	94	1.00	5.16	4.98	4.83	3.52	1.00	4.26	4.79	5.76	6.24
CVTTATSSNQLERLRSISDYRTENGNYEYE	YER130C	S	88	1.00	0.91	0.82	0.79	0.65	1.00	1.77	1.47	1.53	1.56
AHPQYRCRPNRSHSLMTEIPEKYSGRSYL	YER158C	S	146	1.00	1.32	1.36	1.29	1.29	1.00	1.53	2.01	2.11	2.59
_____MIKRSLASLVRSVVMGRRYMIA	YFH1	S	8	1.00	2.40	2.19	2.98	3.09	1.00	3.60	3.70	6.41	5.82
QIKANRRDITVILSSVGETEEASTRDAIS	YFR016C	S	101	1.00	1.26	1.61	2.13	2.16	1.00	1.48	1.68	2.02	2.33
KNKKKTTNRRGRNNSPADTTLDSKQSTLD	YFR016C	S	202	1.00	2.42	1.99	1.30	0.85	1.00	2.36	1.52	1.23	1.12
PSTNDIIESRDLQTESLDLEAINATENQDRA	YFR016C	S	51	1.00	1.11	1.02	0.97	0.75	1.00	1.76	1.32	1.46	1.29
VKAMKDDKIAMRGAESISEDMKKKQEGTAL	YFR016C	S	628	1.00	1.06	1.35	1.67	1.70	1.00	1.73	1.54	2.27	2.57
QVPNKVITKEDITPLSRSHTKKADTRGTADG	YGR079W	S	81	1.00	2.10	2.58	3.28	3.08	1.00	1.75	1.77	2.09	2.16
ENGVLPRTTDQSGSGKSGVPTDEQKEKS	YGR130C	S	284	1.00	0.73	0.76	0.61	0.80	1.00	1.31	1.00	1.43	1.92
SRKERTGIFALWKSPTSSTQKSKTAAPSNP	YGR130C	T	383	1.00	3.16	4.93	2.78	7.16	1.00	1.76	1.80	3.76	5.02
LATEEKELEAVKRERTRLQAEKAEIQQTRQK	YGR130C	T	742	1.00	1.49	1.45	1.79	1.76	1.00	1.35	1.40	1.75	2.18
SPAYTDDAHSRLKANSSTLGLFRAYSKEFH	YHL008C	S	546	1.00	1.88	1.85	2.42	2.08	1.00	1.34	1.61	1.61	1.76
RVGGNPDIPLKPTFTESPAKGSQKAAAS	YHR080C	T	66	1.00	2.39	2.26	2.80	3.04	1.00	2.50	2.35	3.57	4.32
VDTIDKMDVTLFGGFSFHHGDFDACTPQRN	YHR097C	S	145	1.00	2.45	2.37	2.81	2.54	1.00	2.68	3.55	5.14	5.55
RTSKSTLDEVFGRETVDDSETLNQLQDRA	YHR097C	T	198	1.00	3.74	4.16	5.94	4.79	1.00	3.19	3.48	4.82	6.07
STLDEVFGRETVDDSETLNQLQDRAYLFNK	YHR097C	S	203	1.00	1.94	1.90	2.44	2.08	1.00	2.03	1.83	2.36	3.14
LDEVFGRETVDDSETLNQLQDRAYLFNKAN	YHR097C	T	205	1.00	2.14	1.55	1.68	1.78	1.00	2.15	1.89	2.12	2.65
NQLQDRAYLFNKANSSTTLDAIKPNSKNIT	YHR097C	S	222	1.00	1.61	1.58	2.16	2.02	1.00	1.42	1.37	1.88	2.53
LQDRAYLFNKANSSTTLDAIKPNSKNITQF	YHR097C	T	224	1.00	1.46	1.36	1.73	1.66	1.00	1.30	1.21	1.69	2.16
QDRAYLFNKANSSTTLDAIKPNSKNITQF	YHR097C	T	225	1.00	2.75	1.71	1.50	1.37	1.00	2.94	2.26	2.32	2.73
QNGVNTVINPFRVSPEDRVSRRDETPRNYN	YHR097C	S	27	1.00	1.48	1.46	1.40	1.40	1.00	2.13	1.99	2.33	3.22
TVINPFRVSPEDRVSRRDETPRNYNPFNL	YHR097C	S	32	1.00	1.19	0.97	1.36	1.73	1.00	1.99	1.57	2.36	3.76
VINPFRVSPEDRVSRRDETPRNYNPFNL	YHR097C	S	33	1.00	1.29	1.24	1.42	1.63	1.00	1.47	1.30	1.72	2.37
AHNSVSSNSRQERLPSYEEAAGTPKQAPYP	YHR097C	S	69	1.00	0.78	0.82	1.01	1.07	1.00	0.98	0.95	1.24	1.81
NSRQERLPSYEEAAGTPKQAPYPKEKRSS	YHR097C	T	76	1.00	2.26	1.88	1.99	1.79	1.00	1.45	1.38	1.53	1.91
TTIKVERPMHRNRAISMQRQSLRAISEEV	YHR131C	S	511	1.00	1.66	1.46	1.30	1.29	1.00	0.89	0.97	0.83	0.74
_____MTRDTPEDVSTAGAKDILDV	YIL002W-A	T	5	1.00	1.65	1.65	1.74	1.89	1.00	1.54	2.28	3.06	2.73
DDEELENLRKKNLEMSQRAEMINRSKAHQE	YJU2	S	194	1.00	1.80	2.11	1.64	1.85	1.00	1.09	1.39	1.57	1.24
EKMRSSELKLNNTAASSTGPGR	YKE2	S	109	1.00	1.46	1.94	2.68	2.94	1.00	1.92	1.91	2.80	3.00
KMRSELKLNNTAASSTGPGR	YKE2	T	110	1.00	1.90	2.22	2.71	2.98	1.00	1.93	1.87	2.71	3.24
RDKKQFDRPTYVKNKSDTAQNRKTEEKAHD	YKR023W	S	487	1.00	3.68	7.69	8.08	7.98	1.00	8.75	17.53	24.62	24.77
EDKQSLGQKNTKRAFSAFADEGRKQSEMS	YLR177W	S	84	1.00	0.63	0.68	0.91	1.19	1.00	1.50	0.94	1.53	2.27
KKKQRNKSINSEFSSPLRASKNSLITST	YLR257W	S	129	1.00	2.53	2.68	3.84	4.04	1.00	2.06	2.42	2.83	2.86
KQRNKSINSEFSSPLRASKNSLITSTDP	YLR257W	S	131	1.00	2.35	1.94	2.65	2.98	1.00	1.66	2.38	2.97	3.57
KSINSEFSSPLRASKNSLITSTDPVEDH	YLR257W	S	135	1.00	3.17	3.30	6.79	3.65	1.00	1.99	1.32	2.19	2.81
SEFSSPLRASKNSLITSTDPVEDHISKY	YLR257W	S	139	1.00	2.68	2.10	2.40	1.66	1.00	1.89	1.63	1.95	1.97
FSSPLRASKNSLITSTDPVEDHISKYSS	YLR257W	T	142	1.00	1.79	1.42	1.35	1.01	1.00	1.38	1.25	1.44	1.41
EDIIRNSYGMIKNNSNRPHLAKGESYQSAE	YLR257W	S	187	1.00	1.76	2.11	2.94	6.61	1.00	1.72	2.26	4.24	6.25
MIKNNNSRPHLAKGESYQSAEQEIDHTAPEK	YLR257W	S	197	1.00	3.99	4.20	6.12	4.03	1.00	2.39	2.78	3.32	3.78
NNSNRPHLAKGESYQSAEQEIDHTAPEKSEK	YLR257W	S	200	1.00	4.24	4.04	4.42	3.95	1.00	4.23	4.58	5.84	6.29
AKGESYQSAEQEIDHTAPEKSEKRSRSGRS	YLR257W	T	208	1.00	4.10	4.36	5.45	4.47	1.00	4.27	4.76	5.99	8.16
EKRQERSGRSFRQKSSAEFLRSLRSISRG	YLR257W	S	229	1.00	1.81	2.30	3.14	4.10	1.00	0.97	1.38	1.60	1.64
GRSFRQKSSAEFLRSLRSISRGPTKKNTP	YLR257W	S	236	1.00	1.95	2.37	3.02	2.77	1.00	1.03	1.09	1.38	1.70
SPSKGEDSRMYSTSNYSISLVDLENGPKIP	YLR257W	Y	267	1.00	2.53	2.67	2.50	1.79	1.00	3.32	2.10	3.46	3.37
PSKGEDSRMYSTSNYSISLVDLENGPKIPE	YLR257W	S	268	1.00	2.70	2.81	3.31	2.95	1.00	2.37	2.29	3.19	3.41
KGEDSRMYSTSNYSISLVDLENGPKIPETL	YLR257W	S	270	1.00	2.12	1.69	2.04	1.41	1.00	1.40	1.66	1.59	1.64
NEESEASRLTPTQSSNHALSKMQDDDIRD	YLR257W	S	49	1.00	1.46	1.43	2.11	2.98	1.00	0.99			

SKMQKDDDIRDSYTSVAELNREGALLTDEV	YLR257W	S	69	1.00	1.00	1.23	2.37	5.45	1.00	1.20	1.03	2.05	3.19
_____MVDARGSTPCLIGDSIRNVNDG	YLR257W	S	7	1.00	1.88	1.87	2.08	2.10	1.00	1.93	1.88	2.10	1.91
_____MVDARGSTPCLIGDSIRNVNDGN	YLR257W	T	8	1.00	1.25	1.35	1.76	2.28	1.00	1.56	1.62	2.29	2.73
SYTSVAELNREGALLTDEVLDLENVDASKVRS	YLR257W	T	81	1.00	0.75	0.96	2.41	4.54	1.00	1.17	0.82	1.54	3.06
TDEVLDLENVDASKVRSNRDDLEAEERKRL	YLR257W	S	96	1.00	0.76	0.99	1.77	3.37	1.00	1.06	1.07	2.04	2.94
KKKSLQHLKLLKSSSLTETTERLVASKVGH	YLR363W-A	S	51	1.00	1.17	2.23	3.84	6.05	1.00	0.48	1.63	2.95	4.20
KSLQHLKLLKSSSLTETTERLVASKVGHLE	YLR363W-A	T	53	1.00	1.85	2.19	6.16	12.96	1.00	0.88	1.41	1.84	2.42
NTTTTASHTLSNKKSTQNFENYVVEERIK	YLR407W	S	116	1.00	1.43	1.58	1.94	2.10	1.00	1.29	1.72	2.22	2.30
TTTTTASHTLSNKKSTQNFENYVVEERIKL	YLR407W	T	117	1.00	2.54	3.19	3.88	4.57	1.00	1.51	1.95	2.75	3.59
VSTSKTPKKNIKYTLTHTLQKWETLKKITH	YLR407W	T	18	1.00	4.10	4.91	4.29	3.17	1.00	1.53	1.81	1.81	1.84
PTSHQETINTTFKQSPSRGSKPKITTSQ	YML037C	S	120	1.00	1.85	1.34	1.48	1.01	1.00	1.18	1.12	1.02	1.67
KSKRKSFFGFVGHSGSKSSEKPIEAK	YML037C	S	226	1.00	2.23	2.04	2.47	2.61	1.00	1.80	1.76	2.39	2.85
_____MMHFRKKSISNTSDHDGANRASDVK	YMR295C	S	11	1.00	7.84	4.06	4.92	3.90	1.00	3.12	1.26	2.33	3.94
_____MMHFRKKSISNTSDHDGANRASDVKIS	YMR295C	T	13	1.00	3.86	2.31	1.73	1.28	1.00	2.94	2.09	1.55	1.25
_____MMHFRKKSISNTSDHDGANRASDVKISE	YMR295C	S	14	1.00	4.18	2.51	1.97	1.44	1.00	2.47	1.90	1.37	1.13
_____SSISNTSDHDGANRASDVKISEDDKARKLKR	YMR295C	S	23	1.00	2.51	1.73	1.39	1.39	1.00	2.28	2.07	2.17	1.76
_____MMHFRKKSISNTSDHDGANRASDV	YMR295C	S	9	1.00	2.63	1.89	1.35	1.32	1.00	2.00	1.85	1.86	2.15
TDVDFKDVYRMKSSMFDLGSATMQREH	YND1	S	579	1.00	1.18	1.56	1.83	1.70	1.00	0.94	1.28	1.18	1.16
DDGMAYDKRRSTSTVIESESGLKNGSVNS	YOL019W	S	311	1.00	1.54	1.49	1.57	1.34	1.00	0.86	1.08	0.89	0.97
AYKRRMQKNLPRATSLNPNYGFGR	YOL019W	T	542	1.00	1.80	1.87	2.32	2.01	1.00	1.64	1.90	1.67	1.76
SVREQQNNAPLREERSNSALASTLRDTI	YOL036W	S	312	1.00	1.32	1.49	1.67	1.34	1.00	1.11	1.31	1.72	2.21
VERKLSRNSRNRKNTVTFEDRLQKLPPLST	YOL036W	T	353	1.00	2.10	1.67	1.41	1.16	1.00	1.40	1.00	1.09	1.08
GLTGGKMPFLRRASSALLRKTSAKNCSNL	YOL036W	S	424	1.00	1.45	1.11	0.90	0.70	1.00	1.83	1.53	1.56	1.58
LTGGKMPFLRRASSALLRKTSAKNCSNL	YOL036W	S	425	1.00	2.32	1.60	1.28	0.92	1.00	2.65	2.02	2.07	1.80
KFANSSRASEEVLSTPNDEHVYRKTSLGS	YOL036W	T	509	1.00	3.53	3.52	4.48	4.22	1.00	1.14	1.22	1.29	1.28
KIKRGTFRILSDSNNSKEILTSPKSMVTTG	YOL036W	S	540	1.00	2.13	1.72	1.40	1.12	1.00	2.61	1.83	1.64	1.42
_____MTITVGDVAVSETELENKSNQNVVLS	YOR1	S	10	1.00	1.39	1.38	1.26	1.10	1.00	0.96	1.09	0.99	0.99
DYSVSKNDILTPLSAAKSIIPSAKSKER	YOX1	S	135	1.00	1.45	1.51	1.78	1.38	1.00	1.04	1.20	1.16	1.19
ATSKSTIIQTVSPSPPLDVHATPLASRVK	YOX1	S	252	1.00	1.79	1.64	2.08	1.78	1.00	0.96	1.01	0.93	1.04
ISSSPVSPFTNPTSFHLDGRGTIKLPLLN	YOX1	S	35	1.00	1.99	1.82	1.31	1.11	1.00	2.20	1.77	1.78	1.39
QRRLERRHRKLEKRSYSPNAYEIQPDYSE	YPI1	S	131	1.00	1.34	1.56	2.20	2.31	1.00	1.05	1.30	1.45	1.66
TVSVEVPAVLQLRATQDPPRSQEAAMPTRH	YPI1	T	35	1.00	3.81	4.02	4.33	3.50	1.00	2.12	2.35	2.49	2.49
EHDASITRSLDRKGTINPNSSSVPPVRVSY	YPK1	T	57	1.00	3.61	3.56	3.52	3.01	1.00	1.92	2.27	2.08	2.18
SSDASYFPYLNANRTRQNSASSLASSVSD	YPL014W	T	100	1.00	1.60	1.54	1.68	1.50	1.00	1.49	1.33	1.43	1.44
VRQLLQEVKRGVLSRNTSLSLPPPPDF	YPL014W	S	213	1.00	1.76	1.66	1.33	1.07	1.00	2.68	2.01	2.10	1.73
YSLQRSNVSMKNRNGSSQYISELQPQILAR	YPL014W	S	287	1.00	1.78	1.72	1.90	1.65	1.00	1.50	1.51	1.37	1.53
IRNSGFRPSYSQIPSTRSLFNYYNRSSAN	YPL077C	S	56	1.00	3.31	3.10	2.90	2.18	1.00	2.56	2.59	2.56	2.67
ESAENSRSISFDGKVSPPPIRNRPLSEISQI	YPL150W	S	62	1.00	2.04	1.93	2.07	1.76	1.00	0.88	0.98	0.97	1.08
IPSLSPVSPSSRKNSDANVDDLNLAIANAA	YPRO36W-A	S	320	1.00	0.77	0.61	0.72	0.78	1.00	0.83	0.88	1.27	1.82
TRHDLLIAHEMKQRASLERSNSIRNLQSQGK	YPR145C-A	S	52	1.00	1.10	1.31	1.77	2.65	1.00	1.48	3.11	6.36	7.17
IAHEMKQRASLERSNSIRNLQSQGKRSDSK	YPR145C-A	S	58	1.00	1.10	1.47	2.40	4.40	1.00	1.55	3.35	7.86	14.40
YAKYKLPQTNILRESPTEDSVPHAE	YPR174C	S	211	1.00	1.37	1.29	1.44	2.05	1.00	1.04	1.03	0.97	0.92
KYPKLPQTNILRESPTEDSVPHAE	YPR174C	T	213	1.00	1.69	2.07	2.31	2.82	1.00	1.92	1.75	2.05	1.97
KLPQTNILRESPTEDSVPHAE	YPR174C	S	216	1.00	1.84	2.02	1.73	1.49	1.00	2.33	2.55	2.73	2.29
IQAFVWGSAPADEEESVPLSKNSQDCVPLQ	YPR174C	S	77	1.00	1.86	1.94	2.17	1.86	1.00	2.19	2.16	2.48	2.44
RAVERFNGSPIDGGRSLRNLNLIQPNQRPV	YRA1	S	149	1.00	1.39	1.24	2.22	8.59	1.00	0.85	0.76	1.26	3.10
_____MSANLDKSLDEIIGSNKAGSNRARVGGTRG	YRA1	S	15	1.00	1.13	1.41	1.58	1.84	1.00	1.11	1.28	1.54	1.76
_____MSANLDKSLDEIIGSNK	YRA1	S	2	1.00	1.76	2.29	5.10	4.46	1.00	1.06	1.18	2.13	3.09
AKSQNKPKREKPAKKSLELDKEMADYFEKK	YRA1	S	211	1.00	1.35	2.00	3.41	4.30	1.00	1.27	1.75	3.61	4.57
PAKKSLELDKEMADYFEKK	YRA1	Y	222	1.00	1.47	2.27	4.26	4.55	1.00	1.10	1.61	3.20	4.60
QRRSLPNRRGPIRKNTRAPPNAVAVAKLLD	YRA1	T	58	1.00	1.65	2.59	4.14	6.06	1.00	0.68	0.97	1.12	1.24
_____MSANLDKSLDEIIGSNKAGSNRA	YRA1	S	8	1.00	1.35	1.43	2.67	4.15	1.00	1.13	1.26	1.95	2.52
AASKFGTGFVAKKDTKDDATTSTESLSPAS	YRB2	T	117	1.00	1.25	2.17	1.84	1.95	1.00	1.82	2.41	4.14	3.59
KTKKPFAGSGLSFGSGFNILKNKTENNSES	YRB2	S	150	1.00	3.71	4.52	3.75	5.26	1.00	1.68	2.92	3.20	2.65
NTRSSRRRGMSLGSRSDYDDYDDYDGRGR	YSC84	S	279	1.00	1.11	1.13	0.93	0.95	1.00	1.79	1.71	1.43	1.23
_____MRDEATRKRKRSFSDGHFFKLLKMSRKK	YSP2	S	13	1.00	5.36	3.43	4.44	3.67	1.00	2.14	2.03	1.86	1.80
RRSLQNSKAGLKKPNTPSQGYFNIPVTIDRA	YSP2	T	156	1.00	2.83	2.99	3.04	2.62	1.00	1.71	2.41	2.31	1.99
DKHTQVEEGDDEELSPSKAFSLPSTQLVP	YSP2	S	359	1.00	2.43	1.94	2.76	3.60	1.00	0.90	1.04	0.93	0.92
QPVMERSKTRTRKESTNSAAKSSLSLRRAN	YSP2	S	44	1.00	2.82	1.60	1.75	1.50	1.00	1.14	1.02	0.94	0.91
MERSKTRTRKESTNSAAKSSLSLRRANNGR	YSP2	S	47	1.00	1.79	1.72	1.19	1.24	1.00	1.36	1.40	1.42	1.19
SYRNSTYIDMARFENSQSNLSSHRARSKTLP	YSP2	S	505	1.00	1.57	1.41	2.16	2.42	1.00	1.11	1.21	1.28	1.37
NASLIRPSTLRRSYTFEDDNEDDDNKGDASA	ZDS1	T	242	1.00	4.18	5.06	5.31	3.86	1.00	2.97	3.68	3.80	3.75
NEIRSVKNLKRSLGSMDDLLDPELDIKFGG	ZDS1	S	54	1.00	1.57	1.82	1.91	2.08	1.00	1.34	1.07	1.22	1.24
EEEEAKKKNKRSNTTEISNQHSKHVQKEN	ZDS1	T	731	1.00	3.39	3.02	2.52	2.29	1.00	2.02	2.49	2.16	1.34
KKEGGFLKLNRIASIFN	ZEO1	S	110	1.00	7.70	8.27	13.16	10.69	1.00	3.56	3.53	4.74	5.32
GNVDGIPSNRRTFFASPRSSFLYSAKEGNN	ZRG17	S	58	1.00	1.61	1.57	2.08	2.02	1.00	1.11	1.12	1.03	1.05
YKKTSPAKDFNRTDLSLPAIKGTIHSWGD	ZRG8	S	163	1.00	2.05	1.90	1.64	1.39	1.00	3.75	2.77	2.62	2.33
RSFIKAHKKSTSFDESPKRHSNFSGNTNNS	ZRG8	S	17	1.00	3.44	3.32	2.72	2.01	1.00	4.32	3.37	3.50	3.16
DLYAAMGLSKLFRATESQIIKAHRKQVVY	ZUO1	T	112	1.00	4.38	6.40	5.52	5.50	1.00	2.45	3.94	4.39	3.38



ANEXO II

Esta tesis doctoral ha dado lugar a la publicación del siguiente trabajo científico:

Sellers-Moya, Á., Nuévalos, M., Molina, M., and Martín, H. (2021) Clotrimazole-Induced Oxidative Stress Triggers Novel Yeast Pkc1-Independent Cell Wall Integrity MAPK Pathway Circuitry. *J Fungi* **7**: 1–22.

Y a la de las siguientes revisiones:

González-Rubio, G., **Sellers-Moya, Á.**, Martín, H., and Molina, M. (2021) A walk-through MAPK structure and functionality with the 30-year-old yeast MAPK Slt2. *Int Microbiol* **24**: 531–543.

Jiménez-Gutiérrez, E., Alegría-Carrasco, E., **Sellers-Moya, Á.**, Molina, M., and Martín, H. (2020) Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int Microbiol* **23**: 107–119.

Article

Clotrimazole-Induced Oxidative Stress Triggers Novel Yeast Pkc1-Independent Cell Wall Integrity MAPK Pathway Circuitry

Ángela Sellers-Moya, Marcos Nuévalos, María Molina *  and Humberto Martín * 

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain; angelle@ucm.es (Á.S.-M.); marnueva@ucm.es (M.N.)

* Correspondence: molmifa@ucm.es (M.M.); humberto@ucm.es (H.M.); Tel.: +34-91-3941888 (M.M. & H.M.)

Abstract: Azoles are one of the most widely used drugs to treat fungal infections. To further understand the fungal response to azoles, we analyzed the MAPK circuitry of the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* that operates under treatment with these antifungals. Imidazoles, and particularly clotrimazole, trigger deeper changes in MAPK phosphorylation than triazoles, involving a reduction in signaling through the mating pathway and the activation of the MAPKs Hog1 and Slt2 from the High-Osmolarity Glycerol (HOG) and the Cell Wall Integrity (CWI) pathways, respectively. Clotrimazole treatment leads to actin aggregation, mitochondrial alteration, and oxidative stress, which is essential not only for the activation of both MAPKs, but also for the appearance of a low-mobility form of Slt2 caused by additional phosphorylation to that occurring at the conserved TEY activation motif. Clotrimazole-induced ROS production and Slt2 phosphorylation are linked to Tpk3-mediated PKA activity. Resistance to clotrimazole depends on HOG and CWI-pathway-mediated stress responses. However, Pkc1 and other proteins acting upstream in the pathway are not critical for the activation of the Slt2 MAPK module, suggesting a novel rewiring of signaling through the CWI pathway. We further show that the strong impact of azole treatment on MAPK signaling is conserved in other yeast species.

Keywords: yeast; cell wall integrity; MAPK; phosphorylation; azoles; clotrimazole



Citation: Sellers-Moya, Á.; Nuévalos, M.; Molina, M.; Martín, H. Clotrimazole-Induced Oxidative Stress Triggers Novel Yeast Pkc1-Independent Cell Wall Integrity MAPK Pathway Circuitry. *J. Fungi* **2021**, *7*, 647. <https://doi.org/10.3390/jof7080647>

Academic Editor: Robert A. Arkowitz

Received: 13 July 2021

Accepted: 5 August 2021

Published: 9 August 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Signal transduction pathways mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are essential for eukaryotic cells to respond to external stimuli, regulating vital cell processes such as proliferation, differentiation, survival, and apoptosis. As they play a central role in cellular homeostasis, compromised MAPK pathways may be involved in the development of serious diseases such as cancer or neurodegenerative disorders [1]. These pathways are composed of a module of three evolutionarily conserved kinases that are activated by sequential phosphorylation: a MAP kinase kinase kinase (MAPKKK), a MAP kinase kinase (MAPKK), and a MAP kinase (MAPK) [2]. For full activation, MAPKs need to be phosphorylated by MAPKKs on conserved T (threonine) and Y (tyrosine) within the activation domain [3]. Activated MAPKs then phosphorylate a diverse set of target proteins with different functions, including transcription factors, which are fundamental to the adaptive response.

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, five MAPK routes govern mating, filamentous growth, osmolarity, spore wall assembly, and cell wall integrity [3]. The pheromone response pathway is crucial for yeast to initiate the process of mating differentiation [4]. Pheromones from the opposite mating partner are detected by G-protein-coupled receptors, transmitting the signal to the p21-activated kinase (PAK) Ste20 through G-protein activation. The MAPK module is composed of MAPKKK Ste11, MAPKK Ste7, and MAPK Fus3, which are attached to the scaffold protein Ste5. Kss1, the homolog MAPK of Fus3 responsible for filamentous and invasive growth, is also phosphorylated in response to pheromones but in

a more transient manner than Fus3 [5]. The High-Osmolarity Glycerol (HOG) pathway is necessary for adaptation to hyperosmotic stress and is composed of two branches [6]. The first branch is named after the protein Sho1, a membrane-localized scaffold protein that interacts with the sensors Hkr1 and Msb2. The signal is transmitted to Ste20, which in turn activates MAPKKK Ste11. The second branch is named after the sensor histidine kinase Sln1, which signals through the phosphotransfer protein Ypd1 to the response regulator Ssk1, which activates the redundant MAPKKKs Ssk2 and Ssk22. Both branches converge in MAPKK Pbs2, leading to MAPK Hog1 activation [7].

The Cell Wall Integrity (CWI) pathway is necessary to maintain cell wall stability in response to cell surface stress, although it can also be activated by other stimuli not directly related to cell wall damage such as oxidative or genotoxic stress [8]. Perturbations in the cell wall or the plasma membrane are detected by a group of membrane-spanning sensors (the Wsc-type sensors Wsc1, Wsc2, and Wsc3, Mid2, and Mtl1) [9], which activate Rho1 GTPase through GDP/GTP exchange factors (GEFs) Rom2, Rom1, and Tus1 [10]. Activated Rho1 interacts with the protein kinase Pkc1, which in turn activates the MAPK module composed of MAPKKK Bck1, two redundant MAPKKs Mkk1 and Mkk2, and MAPK Slt2 [11]. Once activated, Slt2 can phosphorylate a diverse set of substrates, including the transcription factors Rlm1 and SBF complex (consisting of Swi4 and Swi6), which regulate the expression of genes implicated in cell-wall repair such as *MLP1* and *FKS1*, respectively [12]. In addition to Slt2 dual phosphorylation in its conserved TEY domain, other residues have been described to be phosphorylated under specific conditions. This is the case with caffeine treatment, which leads to DNA damage checkpoint kinases-mediated Slt2 phosphorylation at Ser423 and Ser428, affecting Slt2 interaction with Swi4 [13].

In recent years, the emergence of pathogenic fungi resistant to distinct antifungals has been alarming, as they have rapidly developed diverse resistance mechanisms against the different classes of drugs used in the clinic [14]. It is thus important to understand fungal cell responses to antifungal treatment, as this knowledge will aid the development of new therapeutic strategies to overcome this problem. Azoles are the most widely used class of antifungals. They are divided in two families, including imidazoles, which are commonly used for the treatment of superficial mycoses, and triazoles, which are preferably used in systemic mycosis due to their better pharmacokinetic profile, spectrum of activity, and safety [15]. Within imidazoles, clotrimazole is effective against skin, vulvovaginal, and oropharyngeal fungal infections and has become a drug of interest for the treatment of other diseases such as malaria and some cancers [16]. The main effect of azole antifungals is the inhibition of the ergosterol biosynthetic pathway, and thus alterations in the permeability and fluidity of the cell membrane [17]. Additionally, some of the azoles were reported to have a more complex mode of action, triggering other effects such as the induction of farnesol production [18] or the generation of reactive oxygen species (ROS) [19,20]. Regarding the effect of azoles on MAPK signaling, little is known. Activation of CWI, HOG, and Cek1 routes was observed in *Candida albicans* after exposure to the triazole fluconazole [21], and deletion of CWI pathway components encoding genes *PKC1*, *BCK1*, *SLT2*, and *SWI4* rendered cells of both *S. cerevisiae* and *C. albicans* more sensitive to fluconazole [22]. However, the effect of imidazoles on fungal MAPK pathways has not yet been explored.

The use of *S. cerevisiae* as a model system in antifungal research is currently considered opportune [23]. Here, we exploited the powerful genetics and biochemistry of this yeast to gain insight into the nature of the stress imposed by clotrimazole and the MAPK signaling circuitry that enables resistance to this azole.

2. Materials and Methods

2.1. Yeast Strains and Plasmids

The *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this work were the wild-type BY4741 (*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*) and the isogenic *kanMX4* deletion mutants from Euroscarf (Frankfurt, Germany); the YMJ29 strain (BY4742 isogenic, *MATα his3Δ1 leu2Δ0*

lys2Δ0 ura3Δ0 mkk2Δ::kanMX4 mkk1Δ::SpHIS5) [24]; the wild-type CML128 (*MATa leu2-3 112 ura3-52 trp1 his4 can1r*) and its isogenic *pkc1::LEU2* mutant strain MML344 [25]; WT-RLM1Myc (BY4741 isogenic *RLM1-6MYC::HIS3*) and *slt2Δ*-RLM1Myc (BY4741 isogenic *slt2Δ::kanMX4 RLM1-6MYC::HIS3*) [26]; mutant *rlm1Δ* (BY4741 isogenic *rlm1Δ::TRP1*) [27]; and mutant *bcy1Δ* (BY4741 isogenic *bcy1Δ::KanMX4*) [28]. Mutant *pkc1Δ* (BY4741 isogenic *pkc1Δ::HIS3*) was kindly provided by Dr. Javier Arroyo. Strains YSTH1 (Y3656 isogenic, *MATα can1Δ::MFA1pr-HIS3-MFα1pr-LEU2 his3 leu2 ura3 met15 lys2 HO::natMX6::SSB1*) and YSTH2 (Y3656 isogenic, *HO::pMPL1-MKK1^{S386P}-tADH-natMX6::SSB1*) including IPAC [29] were a gift from Dr. Elena Jiménez-Gutiérrez. The WT-SWI6Myc strain (BY4741 isogenic *SWI6-6MYC::LEU2*) was obtained by amplifying the pRS305m plasmid containing a Myc₆ epitope [30] with primers 5'-CTGACGAAATGCAAGATTTTTTAAAAAAGCATGCTTCAGCTATGGAGCAAAGCTCATTCTG-3' and 5'-CAAATAAAGTCATAAAAAGTTAATGCAATGAAATCACATGCCCTTTTAAAGCAAGGATTTTC-3' (regions homologous to the *SWI6* sequence are underlined) and integrating the PCR product into the *SWI6* locus. To obtain BY4741-T (BY4741 isogenic *trp1Δ::NatMX6*), the disruption cassette amplified with the primers 5'-GCACGTGAGTATACGTGATTAAGCACACAAAGGCAGCTTGGCGTACGCTGCAGGTCGAC-3' and 5'-CAATACTTAAATAAATACTACTCAGTAATAACTATTCTTAGCATCGATGAATTCGAGCTCG-3' (regions homologous to *TRP1* are underlined) was integrated into the *TRP1* locus.

For the experiments with different yeast species, the wild-type strains used were *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, *Pichia pastoris* GS115 (Invitrogen, Waltham, MA, USA), *Pichia anomala* 1026, *Kluyveromyces lactis* 1049, *Hansenula mrakii* K9, *Candida glabrata* ATCC 2001 CBS138, *Meyerozyma guilliermondii* TP11010 CNM-CL9533, *Candida albicans* 4482A, and *Candida tropicalis* 4458 CNM-CL9537. Strains were kindly provided by Ana Alastruey-Izquierdo from the Instituto de Salud Carlos III, Spain (CNM-strains) and by Elvira Marín (Departamento de Microbiología y Parasitología, Universidad Complutense de Madrid, Spain).

The plasmids used in this work were pRS316 [31], pRS316-*SLT2* [32], p2313 (YE_p351-*SLT2-FLAG*) [33], pVD67 (pGRU2-*PKC1-GFP*) [34], pRS314 [31], pRS314-RLM1-HA, pRS314-*rlm1*-3m-HA, pRS314-*rlm1*-L324A/V326A-HA, pRS314-*rlm1*-10m-HA [27,35], pMPL1-*LacZ* [36], and YE_{plac}112-Ilv6-mCherry [37].

2.2. Culture Conditions

Depending on the experimental approaches used, yeast cells were grown on YPD (2% glucose, 2% peptone, and 1% yeast extract) or SD medium (a 0.17% yeast nitrogen base, 0.5% ammonium sulfate, and 2% glucose) supplemented with the required amino acids, either broth or agar. For routine cultures, yeast cells were grown overnight at 24 or 30 °C on YPD or SD medium. The cultures were refreshed to an OD₆₀₀ of 0.3 and grown on YPD for 2 h at the same temperature to allow cells to enter into the exponential phase. For further experiments, the cultures were either grown under the same conditions (the untreated samples) or supplemented with the corresponding compound. The compounds tested were clotrimazole, ketoconazole, itraconazole, fluconazole, chlorpromazine, N-acetylcysteine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and Congo red (Merck, Darmstadt, Germany). Cells were collected at the indicated times and processed as mentioned in the following assays. For the experiments with different yeast species, YPD was supplemented with 1 M MES buffer.

2.3. Multi-Well-Plate Sensitivity Assay

Yeast cells from an overnight culture were diluted to a final OD₆₀₀ of 0.005 and cultured at 30 °C in multi-well plates containing YPD with serial dilutions of the azoles clotrimazole, ketoconazole, itraconazole, and fluconazole at concentrations from 0.0976 to 100 µg/mL, as well as a control without compound. Growth was determined as OD₅₉₅ after 24 h of static incubation using a microplate reader (Bio rad 680; Bio rad, Hercules, CA, USA).

2.4. Yeast Drop Dilution Growth Assays

Growth assays on solid media were performed by culturing cells in YPD to an OD₆₀₀ of 0.5 and spotting samples (5 µL) of 10-fold dilutions of the cell suspensions onto the surface of YPD plates, followed by incubation at 30 °C for 72 h. YPD plates were supplemented with 1 µg/mL of clotrimazole, 30 µg/mL of Congo red, 20 mM of N-acetylcysteine, or 1 M of sorbitol (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, Spain) when indicated.

2.5. Preparation of Yeast Extracts and Immunoblotting Analysis

The preparation of yeast extracts from routine cultures, fractionation by SDS-PAGE, and transfer to nitrocellulose membranes were described previously [38]. When indicated, staining of membranes with 0.5% Ponceau in 5% acetic acid was performed. Rabbit monoclonal anti-phospho-p44/42 (Erk1/2, Thr202/Tyr204, #4370; Cell Signaling; Danvers, MA, USA), rabbit monoclonal anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182, #9215; Cell Signaling), mouse monoclonal anti-Mpk1 (E-9; Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), rabbit polyclonal anti-Hog1 (y215; Santa Cruz), mouse monoclonal anti-Myc clone 4A6 (Millipore, Burlington, MA, USA), mouse monoclonal anti-HA (12CA5, Sigma-Aldrich), and rabbit polyclonal anti-G6PDH (Sigma-Aldrich) antibodies were used to recognize dually phosphorylated Slt2, Kss1, and Fus3; dually phosphorylated Hog1; Slt2; Hog1; Myc-tagged proteins; HA-tagged proteins; and G6PDH, respectively. Detection of Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) encoded by the gene *ZWF1* was used as a loading control. The primary antibodies were detected using a fluorescence-conjugated secondary antibody with an Odyssey Infrared Imaging System (Li-Cor Biosciences; Lincoln, NE, USA).

2.6. Alkaline Phosphatase Assay

Collected cells were resuspended in cold lysis buffer (50 mM TrisHCl at pH 7.5, 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 50 mM β-glycerol-phosphate, 0.1% NP 40, and 10% glycerol) supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and a protease inhibitors mixture (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Cells were lysed using glass beads, and the protein concentration of the extracts was measured at 280 nm and normalized with lysis buffer. For immunoprecipitation, 200 µL of extracts were incubated with 40 µL of FLAG-Sepharose beads (Sigma-Aldrich) overnight at 4 °C. Beads were extensively washed with alkaline phosphatase buffer (50 mM Tris-HCl at pH 7.5, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, and 1 mM DTT, adjusted to a pH of 7.9) and finally resuspended with 400 µL of the same buffer. When indicated, 15 µL of alkaline phosphatase from calf intestine (ALP) or 40 µL of 100 mM sodium orthovanadate (Na₃VO₄), as a phosphatase inhibitor, to a final concentration of 10 mM were added. Samples were incubated at 37 °C for 1 h and centrifugated at 3000 rpm for 1 min. We added 2× SDS loading buffer. Proteins were boiled for 5 min and then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.

2.7. Microscopy Techniques

For mCherry in vivo fluorescence microscopy, yeast transformants were cultured as usual and cells were collected by centrifugation of 1 mL of culture at 2500 rpm. For actin staining, cells were cultured as usual, fixed with *p*-formaldehyde, and stained with rhodamine-phalloidin as described previously [39]. Samples were prepared for visualization and the microscope used was an Eclipse TE2000U (Nikon, Tokyo, Japan) with the appropriate sets of filters. Digital images were acquired with an Orca C4742-95-12ER charge-coupled device camera (Hamamatsu, Hamamatsu city, Japan) and processed with HImage software (Hamamatsu).

2.8. Quantitative RT-PCR Assays

RNA isolation and purification from yeast cells were conducted using the NucleoSpin RNA Mini kit for RNA purification (Macherey-Nagel, Düren, Germany), following the manufacturer's instructions. Real-time quantitative PCR (RT-qPCR) assays were performed as previously detailed [40]. For quantification, the abundance of each gene was determined

relative to the standard transcript of *ACT1*, and the final data of relative gene expression were calculated following the $2^{-2\Delta\Delta Ct}$ method [41]. Primers were kindly provided by Dr. Javier Arroyo.

2.9. Flow Cytometry Evaluation of Oxidative Damage

For the detection of oxygen free radicals (ROS) and variations in the mitochondrial membrane potential, yeast cells were grown on YPD and cultured as usual, and 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of dihydroethidium (DHE) or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of rhodamine 123, respectively, were added to 1 mL of each sample and incubated at 24 °C for 5 and 30 min. Then, samples were diluted 1:10 in PBS and analyzed on a FACScalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Data were analyzed with FlowJo software (Becton Dickinson).

3. Results

3.1. Clotrimazole Activates the CWI and HOG Pathways and Attenuates the Mating Pathway

To test the changes in yeast MAPK circuitry imposed by antifungal azoles, we began by analyzing the sensitivity of the reference *S. cerevisiae* wild-type strain (BY4741) to four clinically relevant azoles: two imidazoles, clotrimazole (CLT) and ketoconazole (KTC); and two triazoles, itraconazole (ITC) and fluconazole (FLC). As observed in Figure 1A, CLT was the most potent azole, exhibiting inhibitory concentrations eight-fold lower than the rest of the azoles, with the sensitivity to FLC being the lowest.

We thus analyzed the impact of treating exponentially growing yeast cells with an inhibitory CLT concentration of 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and a comparable eight-fold-higher concentration of KTC, ITC, and FLC at two different time points on MAPK phosphorylation (Figure 1B). Treatment with both imidazoles, CLT and KTC, led to the activation of the MAPKs Hog1 and Slt2 of the HOG and CWI pathways by dual phosphorylation, respectively, after a short exposure of 30 min. Interestingly, at a longer exposure time of 240 min, in addition to the increase in Slt2 phosphorylation levels, a slower phospho-Slt2 migrating band was apparent after treatment with either CLT or KTC. The phosphorylated Slt2 form that ran with low mobility is hereafter called lowphospho-Slt2 (LP-Slt2), in contrast with the canonical phospho-Slt2 (P-Slt2). The stimulation of yeast cells with either of these two imidazole drugs induced a reduction in the basal phosphorylation levels of the MAPKs from the pheromone response pathway Fus3 and Kss1. After the longest exposure time, triazoles prompted some activation of Slt2, but neither the appearance of the LP-Slt2 form, nor the activation of Hog1, nor a reduction in Fus3 and Kss1 phosphorylation occurred. All these results indicate that imidazoles, but not triazoles, elicit specific and profound changes in yeast-MAPK-mediated signal transduction. Since CLT imposed the most severe changes in MAPK phosphorylation, we decided to focus on the effect of this imidazole on signaling in yeast cells.

We first identified the HOG pathway branch that senses and transmits the stimulus in response to CLT. In contrast to Sho1, removal of Ssk1 impaired signaling to Hog1 (Figure 1C), indicating that CLT is detected and transmitted through the branch of the HOG pathway in which the Sln1-Ypd1-Ssk1 phospho-relay system operates. We also explored the crosstalk between HOG and other MAPK pathways, as the HOG pathway regulates signaling through the CWI and mating pathways under some stimuli [29,42,43]. Lack of this MAPK caused only a slight reduction in Slt2 phosphorylation at 30 min without interfering with the appearance of the LP-Slt2 form, indicating that Slt2 activation does not depend on this crosstalk mechanism (Figure 1D). In contrast, CLT-imposed Fus3 and Kss1 dephosphorylation disappeared at 30 min and was partially impaired at 240 min in the absence of Hog1, suggesting that Hog1 modulates signaling through the mating pathway in response to this azole.

The importance of the essential components for signaling through the HOG and CWI MAPK pathways for resistance to CLT was also analyzed. As observed in Figure 1E, *hog1* Δ and *pbs2* Δ mutants exhibited a slight sensitivity to CLT, whereas *slt2* Δ and *bck1* Δ mutants displayed a significantly higher sensitivity to the antifungal drug. In contrast, only the CWI

pathway kinases proved to be necessary for cells to grow under the cell-wall-altering agent Congo red (CR). These results confirm the relevance of these pathways for responding to this azole.

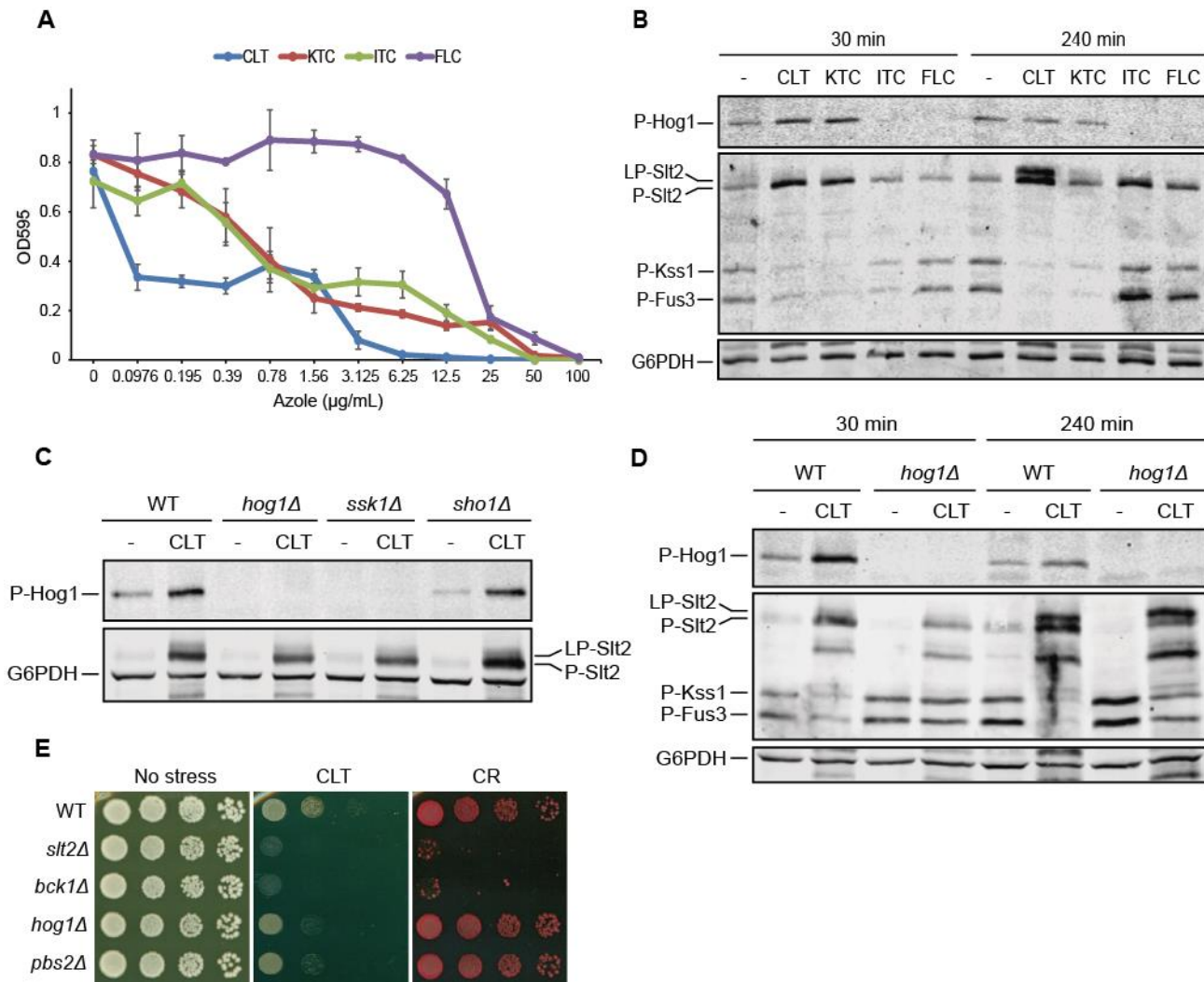


Figure 1. Impact of azole treatment on *S. cerevisiae* MAPK signaling. **(A)** Multi-well-plate sensitivity assay of the BY4741 strain for the indicated concentrations of clotrimazole (CLT), ketoconazole (KTC), itraconazole (ITC), and fluconazole (FLC). Cells were cultured at 30 °C for 24 h and the optical density at 595 nm (OD₅₉₅) was measured. Data are presented as the mean of three independent experiments. Error bars indicate standard deviation. **(B)** Western blotting analysis of extracts of BY4741 cells treated with 50 µg/mL of CLT; 400 µg/mL of KTC, ITC, and FLC; or without any azole (-) for the indicated times at 24 °C. Dually phosphorylated Hog1 was detected with anti-phospho-p38; dually phosphorylated Slt2, Kss1, and Fus3 were detected with anti-phospho-p44/42; and G6PDH, encoded by the gene *ZWF1* (as the loading control), with anti-G6PDH. **(C,D)** Western blotting analysis of cell extracts of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains. Cells were cultured without (-) or with 50 µg/mL of CLT for 30 min (C) or 30 and 240 min (D) at 24 °C. Dually phosphorylated MAPKs and G6PDH were detected as described in (B). Representative blots from three independent experiments are shown. **(E)** Drop dilution growth assay of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains. Ten-fold serial dilutions of cell suspensions were spotted onto YPD plates in the absence (no stress) or presence of 1 µg/mL of CLT or 30 µg/mL of Congo red (CR) and incubated at 30 °C for 72 h. A representative assay from three independent experiments is shown.

3.2. Clotrimazole Induces a Phosphorylation-Dependent Mobility Shift in *Slt2*

To further investigate the effect of CLT on MAPK signaling, we compared *Slt2*, *Fus3*, and *Kss1* phosphorylation under CLT and CR treatment in an *slt2Δ* strain transformed with either a centromeric plasmid carrying the *SLT2* gene or the corresponding empty

vector (Figure 2A). Whereas CLT led to the appearance of LP-Slt2 and stronger Slt2 phosphorylation than CR, neither the absence nor the presence of this MAPK had an impact on reducing the amount of phosphorylated Fus3 and Kss1 upon treatment with this azole. Interestingly, the use of anti-Slt2 antibodies showed that a significant proportion of the overall amount of Slt2 within the cell experienced the SDS-PAGE mobility shift.

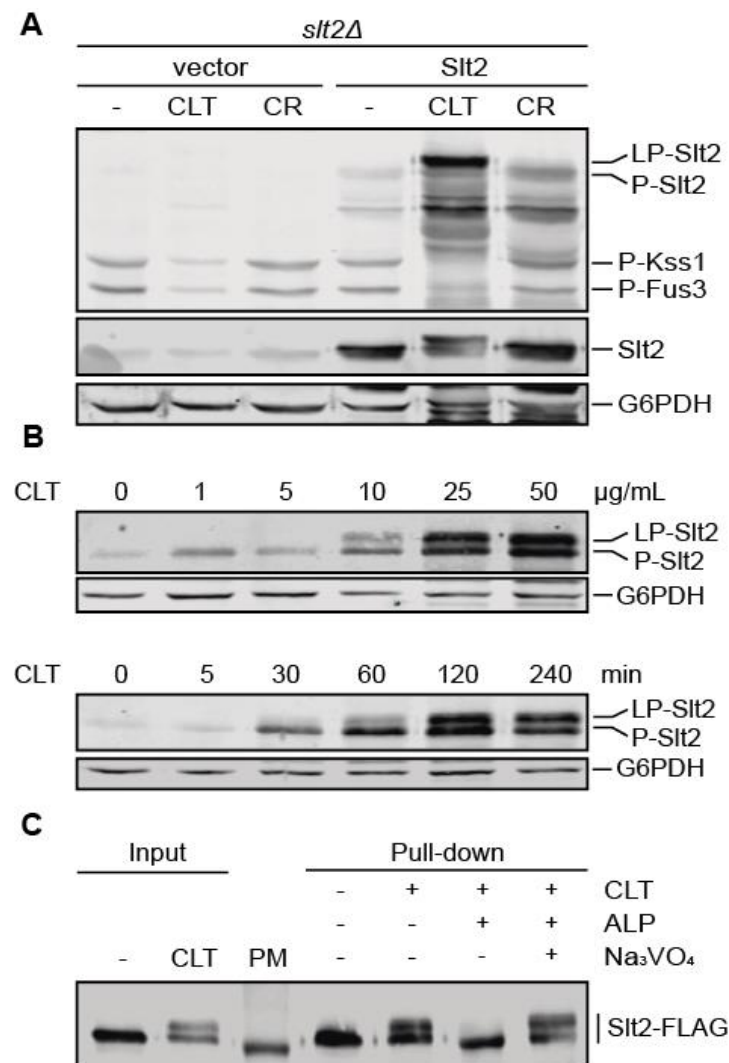


Figure 2. Characterization of Slt2 phosphorylation and LP-Slt2 emergence upon clotrimazole treatment. (A) Western blotting analysis of extracts of BY4741 *slt2Δ* cells transformed with either the empty vector pRS316 or pRS316-*SLT2* and cultured with 50 μg/mL of CLT, 30 μg/mL of CR, or without treatment (–) for 4 h at 24 °C. Dually phosphorylated Slt2, Kss1, and Fus3; Slt2 protein; and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42, anti-Mpk1, and anti-G6PDH, respectively. (B) Western blotting analysis of extracts of BY4741 cells treated with increasing concentrations of CLT for 4 h (upper panel) and with 50 μg/mL of CLT for different times (lower panel) at 24 °C. Dually phosphorylated Slt2 and G6PDH were detected as described in (A). (C) Alkaline phosphatase assay of BY4741 *slt2Δ* cells transformed with p2313 plasmid (Slt2-FLAG) and cultured with (+) or without (–) 50 μg/mL of CLT for 4 h at 24 °C. Immunoprecipitated Slt2-FLAG with anti-FLAG antibodies (pull-down) was treated with (+) or without (–) alkaline phosphatase (ALP) from calf intestine in the absence (–) or presence (+) of sodium orthovanadate (Na₃VO₄), a phosphatase inhibitor. Cell extracts (input) were also analyzed. Slt2-FLAG was detected with anti-Mpk1 antibody. PM corresponds to the lane loaded with the molecular weight protein marker. Representative blots from three (A,B) and two (C) independent experiments are shown.

Having found that Slt2 shifted upward when cells were treated with imidazoles, we next sought to determine the dose-dependence and kinetics of this Slt2 modification upon CLT treatment. As shown in Figure 2B, Slt2 activation was dependent on CLT concentration and exposure time. Thus, treatment with CLT concentrations higher than 10 µg/mL and exposure times longer than 30 min resulted in a strong and progressive increase in both Slt2 phosphorylation and LP-Slt2 levels.

To gain insight into the origin of this LP-Slt2 emergence with CLT treatment, we assessed whether it can be promoted by phosphorylation events. Therefore, we analyzed the effect of phosphatase treatment on Slt2 electrophoretic mobility (Figure 2C). The removal of phosphates from Slt2 purified from CLT-treated cells led to the disappearance of the low-mobility form, suggesting that Slt2 can be phosphorylated in one or more sites additional to the conserved T and Y at the activation loop in response to CLT stimulation.

3.3. *Pkc1 Is Not Critical for Clotrimazole-Induced Signal Transduction through the CWI Pathway*

To characterize how the CWI pathway senses the stimulus and transmits the signal when cells are exposed to CLT, we studied the contribution of different components of this pathway. CR-treated cells were analyzed in parallel, since the proteins involved in signal transduction for this stimulus are well-known [44,45].

As observed for CR, CLT-induced Slt2 phosphorylation was abolished in the absence of both Mkk1 and Mkk2 or Bck1, indicating the essential role of protein kinases from the MAPK module in conveying signaling through the pathway (Figure 3A,B). As expected [46], Mkk1 played a central role in phosphorylating Slt2, but the low level of phosphorylated Slt2 observed in the *mkk1Δ* mutant was also accompanied by the appearance of a slow migrating band. This result reflects that this additional post-translational modification does not depend on the level of Slt2 activation.

Strikingly, and in contrast to what occurs with other CWI pathway stimuli such as CR, Pkc1 proved to be dispensable for CLT-induced Slt2 phosphorylation. As observed in Figure 3C, signaling through the CWI pathway in response to CLT was possible in the absence of Pkc1, leading to an increase in Slt2 phosphorylation, although P-Slt2 and LP-Slt2 levels were lower than in the wild-type strain. Therefore, when *pkc1Δ* cells were transformed with a plasmid bearing Pkc1-GFP, the phosphorylation levels of Slt2 increased in CLT-treated cells and CR-induced activation of Slt2 was restored (Figure 3D). Drop growth assays in the presence of sorbitol were also performed (Figure 3E). The *pkc1Δ* mutant, in contrast to the *slt2Δ* one, was sensitive to CLT even in the presence of an osmotic stabilizer, suggesting a role for Pkc1 in cell defense against this antifungal, in addition to its role in CWI pathway signal transmission. As this was the first time that Pkc1 did not seem to be essential for CWI pathway signaling, we wanted to confirm these results. We thus performed the same experiments mentioned above using a *pkc1Δ* mutant derived from another yeast strain with a different genetic background and observed similar results (Figure S1).

To further ascertain the specificity of these observations for CLT treatment and not for other stimuli of the pathway, we also analyzed the activation of Slt2 in the *pkc1Δ* mutant in response to caffeine, zymolyase, and tunicamycin. As shown in Figure 3F, none of these stimuli led to Slt2 activation in the absence of Pkc1, whereas CLT clearly prompted Slt2 phosphorylation to some extent. Altogether, these results show that, although Pkc1 seems to be important for the cell to respond to and survive CLT stress, an alternative route independent of Pkc1 is also capable of activating the MAPK module of the CWI pathway in response to this azole.

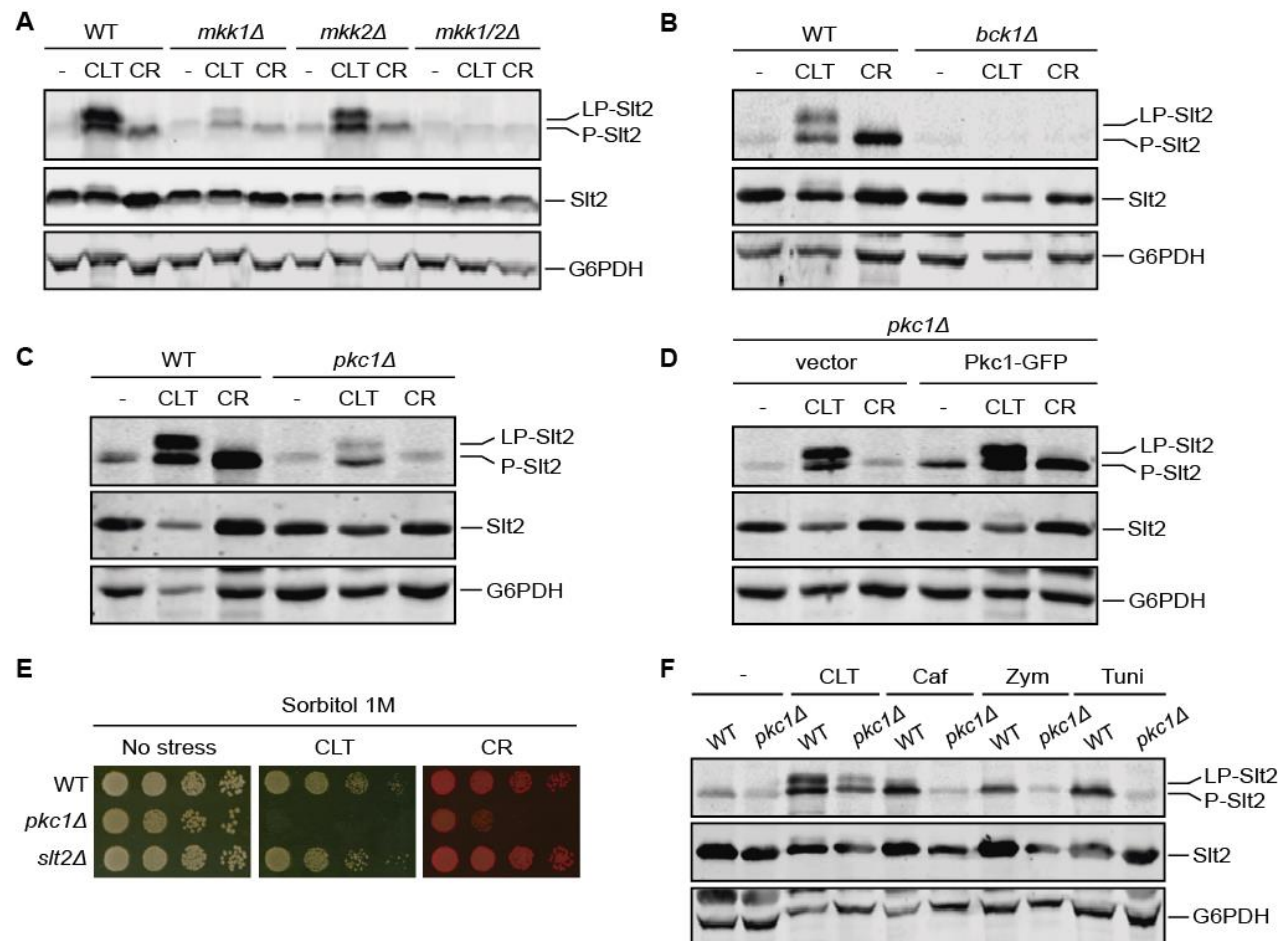


Figure 3. Involvement of protein kinases operating at the CWI pathway in clotrimazole-induced signaling to Slt2. (A–C) Western blotting analysis of extracts of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains. Cells were cultured without stimulus (-), with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT, or with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CR for 4 h at 24 $^{\circ}\text{C}$. Dually phosphorylated Slt2, Slt2 protein, and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42, anti-Mpk1, and anti-G6PDH, respectively. (D) Western blotting analysis of *pkc1Δ* cells transformed with either the empty vector pRS316 or with pVD67 (Pkc1-GFP). Cells were cultured and proteins were detected as described in (A–C). (E) Sensitivity of BY4741 (WT) and the indicated mutant strains to CLT and CR per drop dilution growth assay. Ten-fold serial dilutions of cell suspensions were spotted onto YPD plates supplemented with 1 M sorbitol in the absence (no stress) or presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT or 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CR, and incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 72 h. A representative assay from three independent experiments is shown. (F) Western blotting analysis of extracts of BY4741 (WT) and its isogenic *pkc1Δ* strain. Cells were cultured without stimulus (-), with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT, 8 mM of caffeine (Caf), 0.4 U/mL of zymolyase (Zym), or 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of tunicamycin (Tuni) for 2 h at 24 $^{\circ}\text{C}$. Proteins were detected as described in (A–C). Representative blots from two independent experiments are shown.

3.4. The Mechanosensor Wsc1 Is Involved in CWI Signaling Induced by Clotrimazole

Since Pkc1 is not essential for CLT-induced Slt2 activation, we analyzed the importance of the CWI pathway components upstream of Pkc1 for signal transmission. Removal of any of the Rho1 GEFs, namely Rom1, Rom2, or Tus1, neither prevented Slt2 activation nor Slt2 band shift (Figure 4A). Notably, the effect of *ROM2* deletion on CR-induced Slt2 activation is in sharp contrast to that of CLT-induced Slt2 activation. Since Rom2 is likely the main GEF for Rho1 activation after cell-wall damage [45], this shows that CLT does not impact yeast cells as a typical cell-wall-stress stimulus.

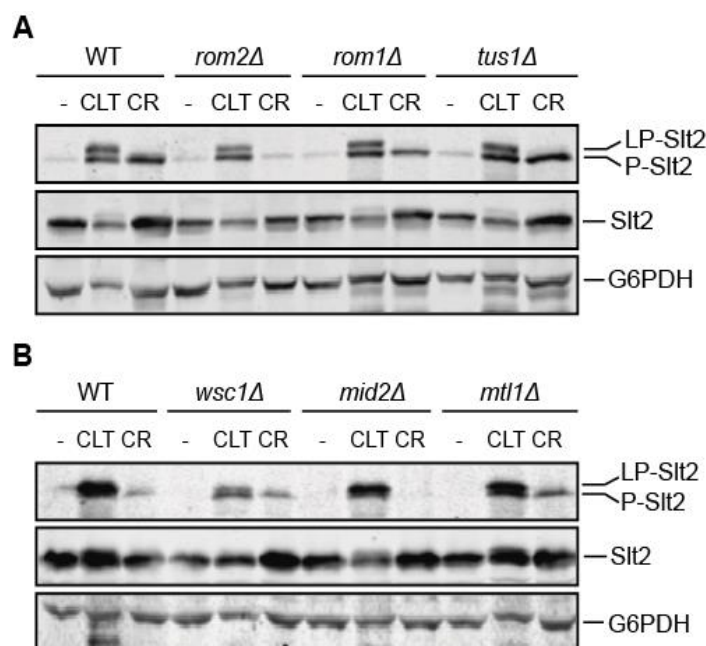


Figure 4. Involvement of components upstream of Pkc1 in clotrimazole-triggered signaling through the CWI pathway. **(A,B)** Western blotting analysis of extracts of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains. Cells were cultured without stimulus (-), with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT, or with 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CR for 4 h at 24 $^{\circ}\text{C}$. Dually phosphorylated Slt2, Slt2 protein, and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42, anti-Mpk1, and anti-G6PDH, respectively. Representative blots from three independent experiments are shown.

The analysis of cells lacking each of the three main cell-wall-stress sensors (Wsc1, Mid2, and Mtl1) revealed that unlike the observation for Mid2 and Mtl1, the lack of Wsc1 considerably reduced Slt2 activation (Figure 4B), but without completely compromising MAPK activation. These results indicate an active but partial role of this mechanosensor in the response to CLT.

3.5. The Transcriptional Rlm1-Driven CWI Pathway Response to Clotrimazole Is Weak

To explore the transcriptional response to CLT driven by the CWI pathway, we studied the involvement of the principal transcription factors activated by Slt2, namely Rlm1 and the SBF complex (composed of Swi4 and Swi6 proteins). First, we analyzed the sensitivity of the mutants *rlm1Δ*, *swi4Δ*, and *swi6Δ* to CLT (Figure 5A). As in the case of CR, cells deficient in Swi4 and Swi6 showed a high sensitivity to the azole, similar to that observed for *slt2Δ* cells, whereas the lack of Rlm1 did not seem to severely impact CLT sensitivity.

As shown in Figure 5B, both Rlm1 and Swi6 experienced Slt2-dependent phosphorylation after CLT exposure, which was detectable by a characteristic SDS-PAGE mobility shift [47,48]. Intriguingly, whereas the CLT-induced mobility shift in Swi6 followed the same pattern as that generated by CR, Rlm1 forms of slower mobility than those observed in the presence of CR appeared when cells were treated with this azole. This result suggests that under CLT treatment, Rlm1 is likely phosphorylated at sites additional to those targeted by other stimuli of the pathway. Moreover, this additional modification is dependent on the presence of Slt2 (Figure 5C). We thus used Rlm1 mutants in three and ten potential targets of Slt2-phosphorylation (Rlm1-3m-HA and Rlm1-10m-HA), which were previously described to be important for full Rlm1 activation [27], and analyzed their mobility shift after CLT treatment (Figure 5D). Both Rlm1 mutant versions migrated faster than the wild-type form, indicating that these phosphorylation sites are involved in a CLT-dependent mobility pattern. An Rlm1 version unable to interact with Slt2 (Rlm1-L3124AV326A-HA) [35] showed an even more reduced CLT-induced mobility shift. Note that the mobility shift was not completely abolished in either the Rlm1-10m-HA version or

the Rlm1-L3124AV326A-HA version, again suggesting the presence of post-translational modifications in other residues apart from those already known for this transcription factor.

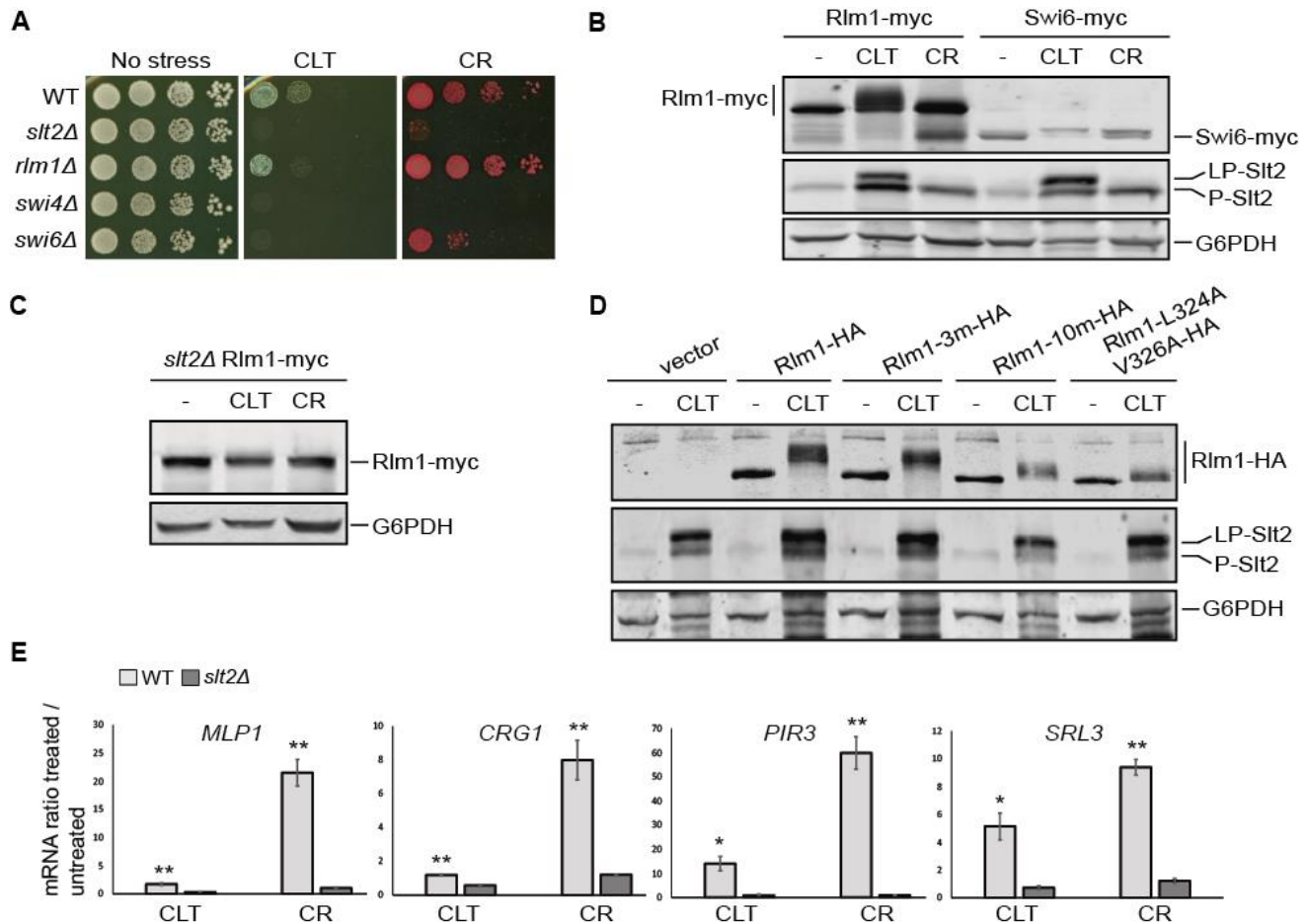


Figure 5. Analysis of the role of transcription factors Rlm1 and SBF in the clotrimazole response. (A) Drop dilution growth assay of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains. Ten-fold serial dilutions of cell suspensions were spotted onto YPD plates in the absence (no stress) or presence of 1 µg/mL of CLT or 30 µg/mL of CR and incubated at 30 °C for 72 h. A representative assay from three independent experiments is shown. (B,C) Western blotting analysis of the extracts of WT-RLM1Myc, WT-SWI6Myc, and *slt2Δ*-RLM1Myc cells after treatment with 50 µg/mL of CLT, 30 µg/mL of CR, or without treatment (-) for 4 h at 24 °C. Rlm1-myc and Swi6-myc, dually phosphorylated Slt2, and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-myc, anti-phospho-p44/42, and anti-G6PDH, respectively. (D) Western blotting analysis of extracts of the *rlm1Δ* mutant strain transformed with the pRS314 plasmid bearing the indicated versions of Rlm1-HA. Cells were cultured without stimulus (-) or with 50 µg/mL of CLT for 4 h at 24 °C. Rlm1-HA was detected with anti-HA antibody and dually phosphorylated Slt2 and G6PDH were detected as described in (A). Representative blots from two independent experiments are shown. (E) Transcriptional expression of *MLP1*, *CRG1*, *PIR3*, and *SRL3* was analyzed by RT-qPCR in BY4741 WT and isogenic *slt2Δ* strains after treatment with 50 µg/mL of CLT, 30 µg/mL of CR, or in basal conditions for 4 h at 24 °C. Values represent the expression ratio between treated and non-treated cells. Data correspond to the mean and standard deviation of three independent experiments. Student’s t-test was calculated between the WT and *slt2Δ* strains. * *p*-value < 0.05; ** *p*-value < 0.01.

Surprisingly, when the expression of different Rlm1-dependent genes (*MLP1*, *CRG1*, *PIR3*, and *SRL3*) was analyzed by RT-qPCR (Figure 5E), the relative mRNA levels were notably lower in cells treated with CLT compared with those stimulated with CR, indicating that the observed additional phosphorylation of Rlm1 does not result in higher activity of this transcription factor. Nevertheless, while CLT-induced gene expression occurred at a low level, it showed a statistically significant reduction in the absence of Slt2, reflecting that this response is fully dependent on the CWI MAPK. To determine whether that induction

was sufficient to generate a response of the pathway in cells exposed to this azole, we performed a sensitivity assay of cells bearing the *MLP1*-mediated positive feedback circuit called Integrity Pathway Activation Circuit (IPAC), which amplifies the signal and renders cells hypersensitive to CWI activators [29]. As confirmed in Figure S2, cells carrying the IPAC were considerably more sensitive to CLT than those without the circuit. This indicated that the minimal induction of the Rlm1-dependent *MLP1* promoter was sufficient to activate the circuitry and amplify the CLT-induced signal.

3.6. Oxidative Stress Is Necessary for *Slt2* Activation by Clotrimazole

Since some azoles induce the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in fungal cells [19,20], we studied whether CLT would induce oxidative stress and, if so, whether the produced ROS are responsible for CWI pathway activation and LP-Slt2 formation. To this end, we measured the mitochondrial membrane potential and ROS generation following CLT treatment by flow cytometry using the fluorescent dyes rhodamine 123 and dihydroethidium (DHE), respectively [49,50]. As a positive control, we treated cells with H_2O_2 , a strong inducer of hydroxyl radical formation. After 4 h, we found that both CLT and H_2O_2 led to a significant increase in the fluorescence signal with both dyes (Figure 6A), confirming that CLT induces the formation of ROS and the alteration of mitochondrial activity. Furthermore, under CLT-treatment conditions, the mitochondrial morphology was clearly affected (Figure 6B). The branched tubular structure found in normal cells disappeared and deformed structures emerged, as revealed by analyzing the localization of the mitochondrial protein Ilv6 tagged with mCherry used as a mitochondrial marker.

To associate oxidative stress with CWI signaling following CLT stimulation, we used the antioxidant N-acetylcysteine (NAC). As shown in Figure 6C, the sensitivity of the *slt2Δ* mutant to CLT was suppressed by NAC addition to the medium, suggesting that oxidative stress may be responsible for CWI pathway activation by CLT. The sensitivity to CLT displayed by cells deficient in antioxidant systems such as superoxide dismutase (*Sod1*) or catalase (*Ctt1*) was also eliminated by NAC, further supporting the oxidative effect of CLT and the utility of NAC in preventing it. The growth of all these deletion mutants was slightly higher than that of the WT strain onto CLT+NAC plates (Figure 6C), suggesting that these mutant strains might have some additional compensatory mechanisms to promote growth under oxidative stress that keep operating when this stress disappears. Additionally, we found that simultaneously exposing exponentially growing yeast cells to NAC and CLT significantly reduced Slt2 activation and eliminated the characteristic CLT-induced Slt2 shift (Figure 6D). The reductions in P-Kss1 and P-Fus3 basal levels induced by CLT were also abolished by NAC.

As we have observed for CLT, chlorpromazine (CPZ) has been reported to alter the plasma membrane, induce ROS production, and activate the yeast CWI pathway [51,52]. Therefore, we analyzed whether CPZ has a similar impact on yeast MAPK signaling to that of CLT. As shown in Figure 6D, this agent also provoked the appearance of LP-Slt2 and the reductions in P-Kss1 and P-Fus3 levels. Moreover, both effects were prevented by the addition of NAC. Hog1 phosphorylation was also induced by CPZ, and NAC hindered both the CPZ- and CLT-induced Hog1 activation (Figure 6E). These results suggest that the alteration in the plasma membrane together with the oxidative damage generated by any of these two compounds trigger this characteristic MAPK signaling response, not observed for other stimuli.

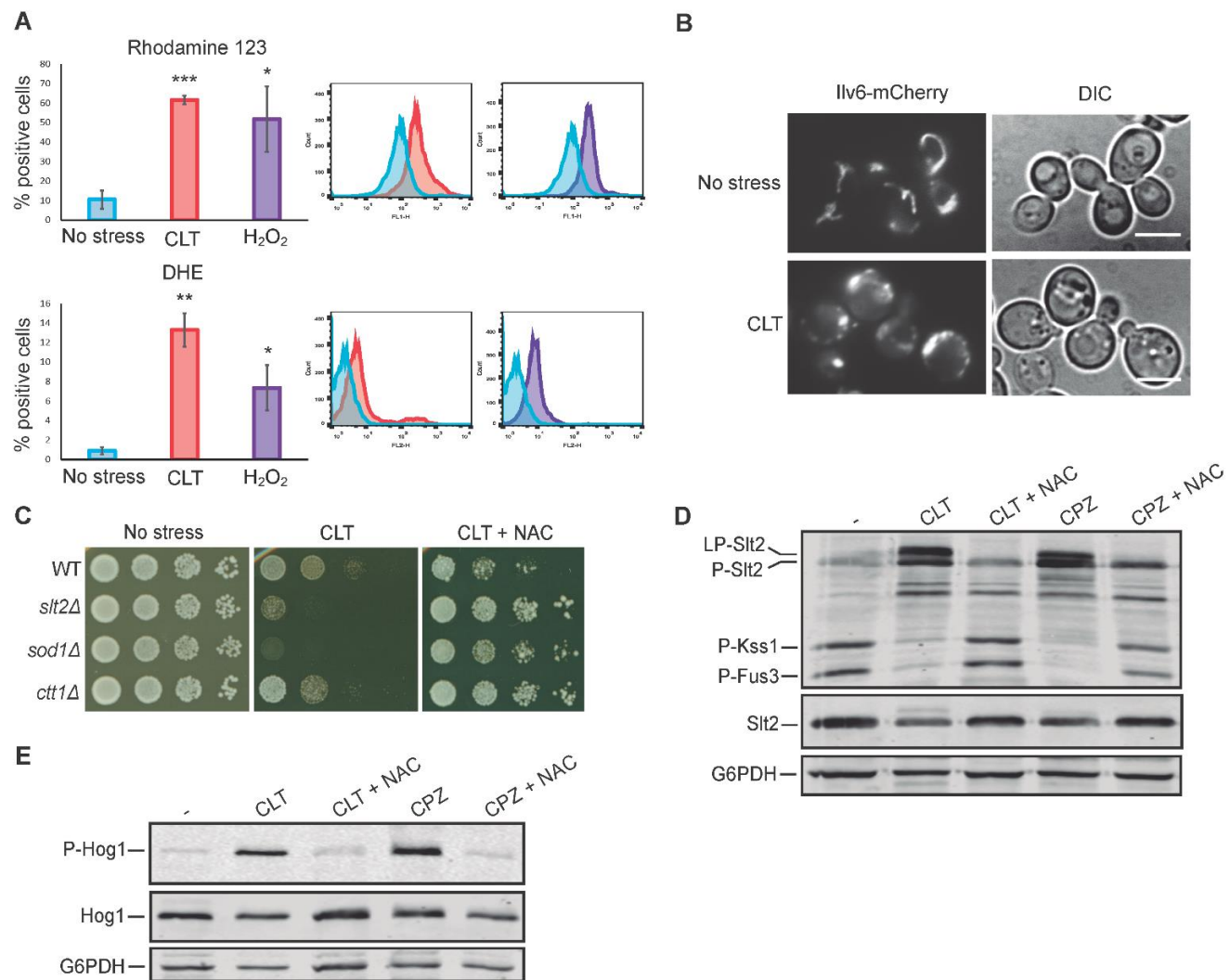


Figure 6. Effect of clotrimazole on mitochondrial morphology and oxidative stress: impact on MAPK phosphorylation. (A) Flow cytometry assay of the BY4741 strain after treatment with 50 µg/mL of CLT, 10 mM of H₂O₂, or basal conditions (no stress) for 4 h. Graphs represent the percentage of positive cells detected with flow cytometry that express a fluorescence signal for rhodamine 123 or dihydroethidium (DHE) fluorochromes. Data are presented as the mean of three independent experiments, and error bars indicate the standard deviation. Histograms from a representative experiment are shown. Student’s t-test was calculated between treated (CLT or H₂O₂) and non-treated (no stress) cells. *p*-value of < 0.05 (*), < 0.01 (**), or < 0.001(***). (B) Mitochondrial morphology alteration upon CLT treatment. Fluorescence and DIC microscopy images of BY4741-T cells transformed with YEplac112-Ilv6-mCherry plasmid after treatment with 50 µg/mL of CLT or in basal conditions (no stress) for 4 h. Representative photographs from two independent experiments are shown. Scale bar = 5 µm. (C) Sensitivity of BY4741 (WT) and the indicated isogenic mutant strains to CLT per a drop dilution growth assay. Ten-fold serial dilutions of cell suspensions were spotted onto YPD plates in the absence (no stress) or presence of 1 µg/mL of CLT and incubated at 30 °C for 72 h. Plates were supplemented with 20 mM of N-acetylcysteine (NAC) when indicated. A representative assay from three independent experiments is shown. (D,E) Western blotting analysis of the extracts of BY4741 cells treated with 50 µg/mL of CLT or 250 µM of chlorpromazine (CPZ) in combination with 20 mM of NAC, when indicated. Cells were cultured for 4 h (D) or 30 min (E) at 24 °C. Dually phosphorylated Slt2, Kss1, and Fus3; Slt2 protein; dually phosphorylated Hog1; Hog1 protein; and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42, anti-Mpk1, anti-phospho-p38, anti-Hog1, and anti-G6PDH, respectively. Representative blots from three (D) and two (E) independent experiments are shown.

3.7. *Tpk3*-Mediated PKA Activity Modulates *Slt2* Phosphorylation in Response to Clotrimazole

A strong correlation exists between ROS levels and the state of the actin cytoskeleton in yeast [53]. Additionally, miconazole was shown to induce yeast actin aggregation, which precedes ROS accumulation [54]. CLT-treated cells also displayed aberrant actin aggregates, as revealed by the actin dye rhodamine-phalloidin (Figure 7A), suggesting that actin alteration can contribute to CWI pathway activation.

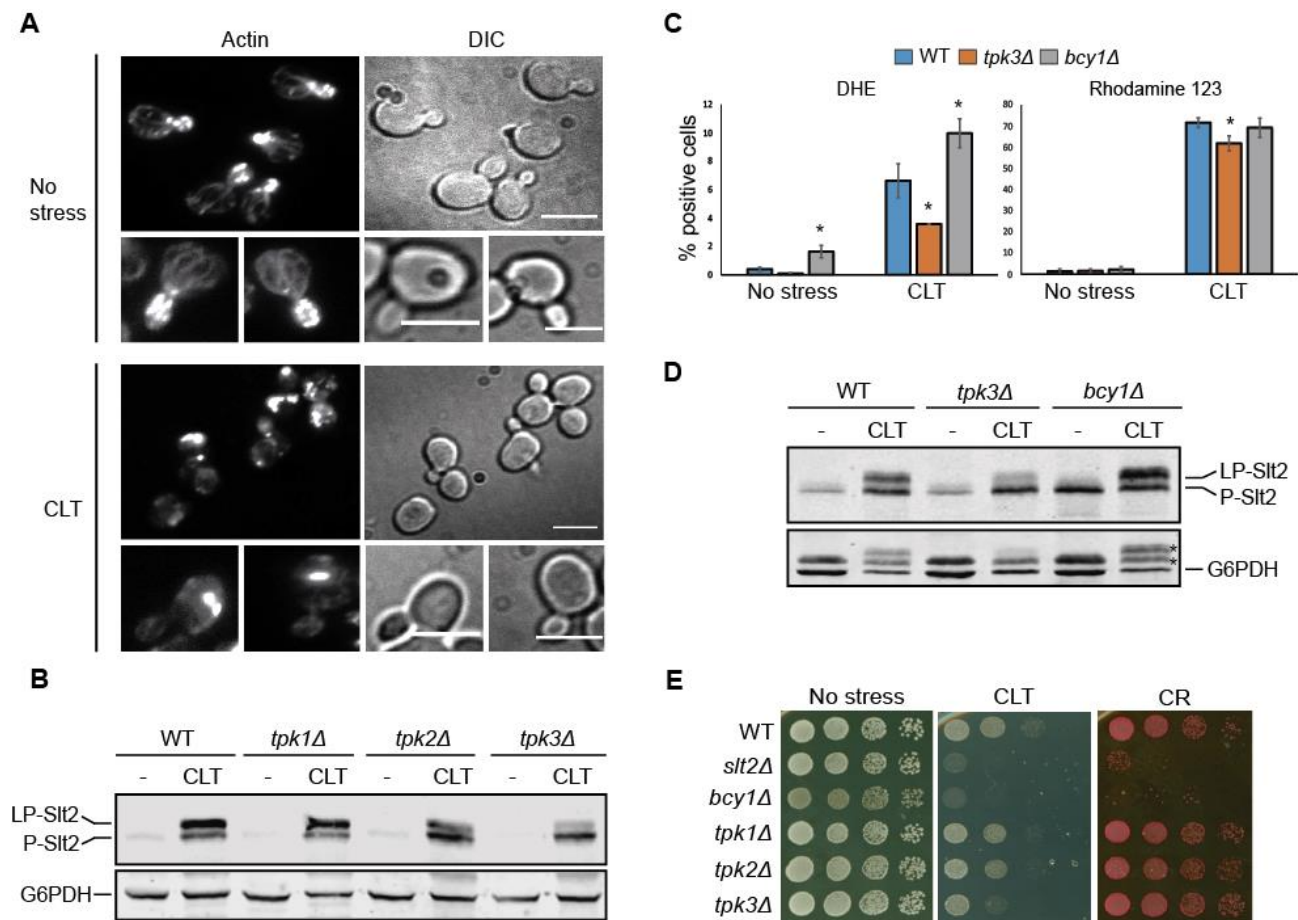


Figure 7. Involvement of the PKA kinase activity in clotrimazole-induced ROS production and *Slt2* phosphorylation. (A) Rhodamine-phalloidin-based actin staining of BY4741 cells treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT or in basal conditions (no stress) for 4 h. Representative fluorescence and DIC photographs from three independent experiments are shown. Scale bar = 5 μm . (B) Western blotting analysis of the BY4741 (WT) strain and the indicated isogenic mutants. Cells were cultured without stimulus (-) or with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT for 4 h at 24 $^{\circ}\text{C}$. Dually phosphorylated *Slt2* and G6PDH (as a loading control) were detected with anti-phospho-p44/42 and anti-G6PDH, respectively. A representative blot from two independent experiments is shown. (C) Flow cytometry assay of the BY4741 (WT) strain and the isogenic *tpk3Δ* and *bcy1Δ* mutants. Cells were either left untreated (no stress) or treated with 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT for 4 h at 24 $^{\circ}\text{C}$. Graphs represent the percentage of positive cells detected with flow cytometry that express a fluorescence signal for rhodamine 123 or dihydroethidium (DHE) fluorochromes. Data are presented as the mean of three independent experiments. Error bars indicate the standard deviation. Student's t-test was calculated between the WT and mutant strains. * p -value < 0.05. (D) Western blotting analysis of the same samples as in (C). Proteins were detected as in (B). Asterisks in the lower panel showing G6PDH levels indicate bands that correspond to P-*Slt2* and LP-*Slt2*. (E) Sensitivity of BY4741 *slt2Δ* and the same strains as in (B,D) to CLT and CR per the drop dilution growth assay. Ten-fold serial dilutions of cell suspensions were spotted onto YPD plates in the absence (no stress) or presence of 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CLT or 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of CR and incubated at 30 $^{\circ}\text{C}$ for 72 h. A representative assay from two independent experiments is shown.

Since actin aggregation was linked to Ras/PKA signaling [55], and the Ras/PKA pathway was related to the induction of mitochondrial ROS in response to distinct anti-fungal drug treatments [56], we next analyzed the involvement of this signaling pathway in Slt2 activation by CLT. First, we assessed the possible implication of each of the three PKA catalytic subunits, Tpk1, Tpk2, and Tpk3, on CWI signaling, as each of them can play specific functional roles [57,58]. As shown in Figure 7B, Tpk3 seemed to be partially involved in LP-Slt2 formation in response to CLT. Next, we measured the ROS levels and mitochondrial membrane potential of *tpk3Δ* cells in parallel to cells deficient in Bcy1, the negative regulatory subunit of the PKA kinase (Figure 7C). Compared with wild-type cells, the absence of Tpk3 led to a significant reduction in ROS levels, whereas the lack of Bcy1 resulted in even higher ROS generation after CLT exposure, as measured using DHE fluorescent dye. Nevertheless, differences in the mitochondrial membrane potential were not so remarkable, as monitored using rhodamine 123. When analyzing the same samples with Western blotting (Figure 7D), a reduction and a rise in LP-Slt2 levels were clearly observed in *tpk3Δ* and *bcy1Δ* mutants, respectively, confirming the relationship between the PKA pathway, oxidative stress, and the appearance of LP-Slt2 in the presence of CLT. Performing drop growth assays, we found that deletion of *TPK3* resulted in increased sensitivity to CLT but not to other stimuli of the pathway such as CR, which supports the specific implication of this PKA subunit in CLT-induced CWI pathway signaling (Figure 7E). Conversely, cells lacking Bcy1 were sensitive to either CLT or CR, which suggested that the lack of this protein can impair cell growth in any stress condition.

3.8. Conservation of Azole-Induced MAPK Signaling in Saccharomycotina

To investigate whether the MAPK-mediated response to azoles observed in *S. cerevisiae* is conserved in other yeast species, we compared the MAPK phosphorylation of distinct yeast species belonging to the Saccharomycotina subphylum (budding yeasts) in response to CLT and FLC. Wild-type strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Pichia anomala*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia pastoris*, and *Hansenula mrakii* species were grown in rich medium and treated with FLC or CLT, and dual phosphorylation of the corresponding Slt2 and Hog1 orthologues was analyzed at distinct time points by Western blotting using anti-phospho-p44/42 and anti-phospho-p38 antibodies, respectively, as these antibodies can recognize dually phosphorylated MAPKs at the activation loop from different organisms. As shown in Figure 8, the phosphorylated forms of Slt2 orthologues were detected with the anti-phospho-p44/42 antibody in all the yeast species, as the protein bands matched the predicted molecular weights of the corresponding MAPKs. In general, CLT induced a phosphorylation of the CWI pathway MAPK, which increased with time, with an activation peak at 30 min in most species. The exception was the phosphorylated MAPK from *M. guilliermondii*, whose levels decreased after CLT treatment. In the case of FLC, Slt2 orthologues were also phosphorylated, but the highest phosphorylation was generally reached at the longest time point of 240 min.

The anti-phospho-p38 antibody recognized all Hog1 orthologues excepting for *P. anomala*, whose extracts showed no signal against this antibody. As with Slt2 orthologues, CLT induced the highest level of HOG pathway phosphorylation at short time points (5 or 30 min), with the signal decreasing at the longest time point of 240 min. However, in the cases of *C. glabrata* and *M. guilliermondii*, MAPK phosphorylation levels decreased after CLT treatment. In contrast to CLT, the response to FLC through the HOG pathway was weak and heterogeneous between species. Despite a CLT-dependent Slt2 mobility shift seeming to be a feature of *S. cerevisiae* Slt2, activation of this MAPK upon azole treatment is conserved in other yeast species. Altogether, these results indicate that the CWI and HOG pathways respond to azoles in different budding yeasts. Since some of them are of clinical interest, the implication of these pathways in azole-resistance should be addressed.

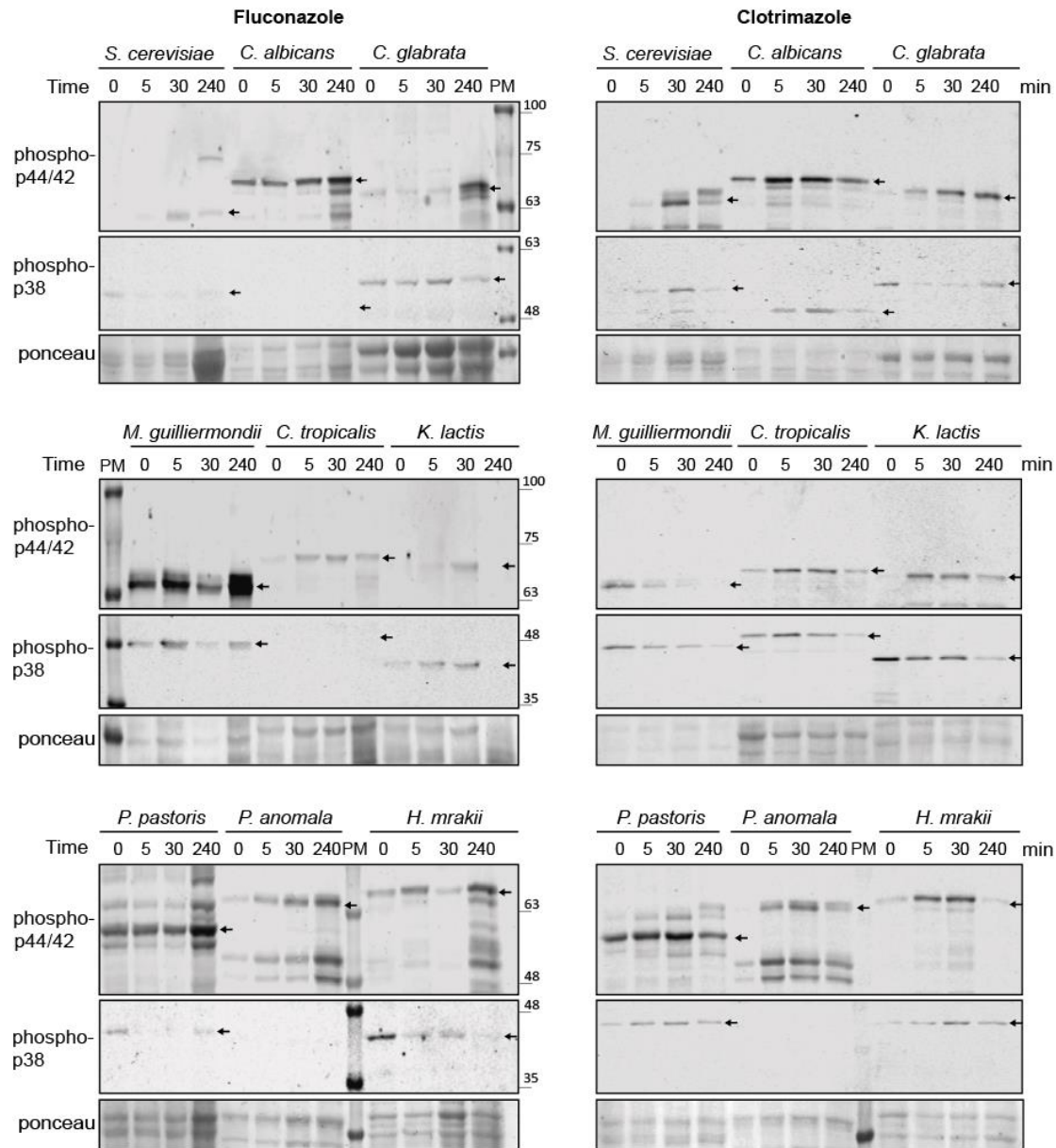


Figure 8. Activation of CWI and HOG pathways by azoles in other yeast species. Western blotting analysis of extracts of *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, *Candida albicans* 4482A, *Candida glabrata* CBS138, *Meyerozyma guilliermondii* TP11010, *Candida tropicalis* 4458, *Kluyveromyces lactis* 1049, *Pichia pastoris* GS115, *Pichia anomala* 1026, and *Hansenula mrakii* K9 strains. Cells were cultured with 200 µg/mL of fluconazole (left panels) or with 50 µg/mL of clotrimazole (right panels) for the indicated times at 30 °C. Dually phosphorylated MAPK homologues of Slt2 and Hog1 were detected with anti-phospho-p44/42 and anti-phospho-p38, respectively, and the corresponding bands are indicated by black arrows in the blots. Ponceau staining was used for the loading control. PM corresponds to the lane loaded with the molecular weight protein marker. Representative blots from three independent experiments are shown.

4. Discussion

In many aspects, *S. cerevisiae* has guided our understanding of the eukaryotic cell for decades, and especially when studying fungal biology. Although it lacks pathogenicity, this yeast species is considered a useful model system for studying azole susceptibility, as it provides information on sterol metabolism and cellular signaling [23]. Surprisingly, although they are the most widely used antifungals, not much is known about the action of azoles on MAPK signaling in fungi. To gain more insight into the mode of action of azoles and, in particular, to discover how imidazole antifungals act on fungal MAPK

pathways, we explored the effect of CLT on *S. cerevisiae* MAPK circuitries. Our results show that unlike triazoles, imidazoles trigger profound changes in MAPK signaling, affecting all four MAPKs operating in vegetative yeast cells. Whereas MAPKs Hog1 and Slt2 are activated, signaling through mating MAPKs Fus3 and Kss1 is significantly reduced in a Hog1-dependent manner following CLT treatment, suggesting that similar mechanisms known to downregulate the mating pathway by hyperosmotic stress [43] are likely operating under CLT treatment. However, the actual crosstalk mechanisms that regulate mutual modulation between these two pathways are still poorly understood. Among them, Hog1-dependent Ste50 phosphorylation was found to negatively regulate signaling toward Kss1 and Fus3 [43,59]. Since CLT activates the Sln1 branch of the HOG pathway and Ste50 operates both in the alternative Sho1 branch and in the mating pathway, this Ste50 negative feedback phosphorylation may be a mechanism prioritizing the most necessary among pathways sharing components against a condition that threatens survival. The sensitivity of mutants to CLT with disrupted signaling through the HOG or CWI pathways revealed the importance of prioritization of these pathways specialized in responding to stress conditions.

Knowledge is limited of the mode of activation of the HOG pathway by other stressors distinct from hyper-osmotic shock. As mentioned above, CLT activates the HOG pathway through stimulation of the Sln1 branch of the pathway. Other stimuli use this branch for activating Hog1, such as citric acid [60] or acetic acid [61]. Interestingly, sphingolipid or ergosterol depletion also triggers this pathway [62], and the alteration in the membrane fluidity during hypoxia, probably through ergosterol deficiency, also leads to Hog1 activation through the Sln1 branch [63]. Therefore, the depletion of ergosterol generated by CLT may account for the observed Hog1 activation. However, the treatment of yeast cells with the triazoles FLC and ITC did not result in Hog1 phosphorylation, suggesting that other biological effects are also necessary for triggering the HOG pathway. Here, we showed that oxidative stress underlies CLT-induced Hog1 phosphorylation. Accordingly, FLC was reported to lack significant ROS-inducing capacity in yeast [64], and compounds that generate oxidative stress, such as hydrogen peroxide [65], also signal to Hog1 through the Sln1 branch.

The activation of Hog1 is important for the subsequent activation of the CWI pathway in response to some stresses. This is the case with SDS [29] and zymolyase [42] treatments. Zymolyase, a mixture of cell-wall-digesting enzymes, promotes Slt2 activation partly because of Hog1-driven glycerol accumulation [66]. However, genome-wide expression studies found no induction of genes coding the prototypical glycerol-producing proteins *GPD1* and *GPD2* after treatment with antifungals targeting ergosterol biosynthesis, including clotrimazole [67]. Consistently, we found that Slt2 activation in response to CLT does not rely on previous Hog1 activation, suggesting independence and limited crosstalk between the HOG and CWI pathways under treatment with imidazoles. The most remarkable traits in imidazole-induced MAPK signaling are related to the CWI pathway. Treatment of yeast cells with either clotrimazole or ketoconazole promoted Slt2 MAPK phosphorylation not only at the TEY activation loop but also at additional sites, producing an Slt2 form of low electrophoretic mobility (LP-Slt2). Although phosphorylation sites other than T190 and Y192 were reported [13], no changes in mobility such as that induced by CLT have been observed to date for Slt2. The strong Slt2-dependent phosphorylation of Rlm1 and Swi6 suggests that LP-Slt2 is fully catalytically active, at least on Rlm1 and Swi6. Therefore, the extra phosphorylation on Slt2 does not seem to negatively impact the activity of MAPK Slt2. Although the effects on the kinase activity and functionality merit further research, this additional post-translational modification is likely to impose an additional layer of regulation on Slt2.

Another striking feature of CLT-induced signaling is Pkc1-independent Slt2 activation. To the best of our knowledge, this is the first stimulus of the CWI pathway for which Pkc1 is not fully required for Slt2 activation, indicating that a novel signaling circuitry is operating under this stress. Under this condition, none of the Rho1 GEFs are necessary for signaling

through the route, which also suggests the formation of alternative protein complexes. Nevertheless, the mechanosensor *Wsc1* seems to be at least partially implicated in CLT sensing and transduction of the signal. We unsuccessfully attempted to find an alternative protein kinase distinct to *Pkc1* that is able to activate the *Slr2* MAPK module. Therefore, although the most presumable possibility is a surrogate kinase operating in this non-canonical *Pkc1*-independent signaling, other phosphorylation-independent mechanisms that can enhance signaling through the MAPK module cannot be ruled out. This is another example of the extraordinary plasticity of MAPK pathways, as recently observed with RAF-independent ERK phosphorylation in mammalian cells [68]. Although dispensable for *Slr2* activation, we showed that *Pkc1* is essential for cell viability under CLT stress. This finding is in line with the increased efficacy of antifungal drugs targeting the cell membrane, such as fluconazole, following the pharmacological inhibition of PKC [22]. These authors suggested that PKC1 enables tolerance to drugs that affect the cell membrane via the MAPK cascade, because the lack of MAPK module components results in sensitivity to these compounds [22]. However, in contrast to the absence of *Slr2*, we showed that the lack of *Pkc1* promotes a non-osmotically remediable CLT sensitivity, indicating additional functions to the activation of the MAPK cascade for *Pkc1* in this condition. Several targets, in addition to the *Slr2* MAPK cascade, were already found for *Pkc1*, as well as roles for this kinase independent of CWI signaling [69] that can account for this phenotype.

We suggest that imidazole-induced CWI pathway rewiring occurs due to a combination of membrane alteration and intense oxidant activity. Different evidence supports this model. First, both FLC and CLT are antifungal agents that target *Erg11*, affecting the ergosterol biosynthesis pathway, as readily observed by their similar chemical–genetic profiles [70]. However, whereas FLC induces only a limited amount of ROS [64], here, we showed that CLT, which promotes LP-*Slr2* formation, generates a high level of ROS in yeast, similar to the strong oxidant hydrogen peroxide (H_2O_2). Second, the antioxidant N-acetylcysteine eliminates the *Slr2* band shift and significantly reduces *Slr2* phosphorylation in response to CLT, indicating the importance of oxidative stress in CWI pathway activation in response to this imidazole. Notably, oxidative stress generated by other compounds, such as hydrogen peroxide or diamide, leads to *Slr2* phosphorylation, but does not trigger the phosphorylation pattern observed for CLT (our unpublished results, [71]). Third, CPZ, one of the most-used antipsychotic and neuroleptic drugs, damages cell membranes and affects transport activity. CPZ also induces the unfolded protein response and inhibits protein synthesis [72]. Interestingly, CPZ also induces oxidative stress with high ROS generation not only in mammalian [73] but also in yeast cells [51], in which it also promotes an *Slr2* phosphorylation pattern similar to CLT, suggesting the involvement of the same MAPK signaling circuitry. Fourth, the activity of the PKA pathway was linked to mitochondrial damage and ROS generation via *Tpk3*, which is a master regulator of mitochondrial activity. Cells lacking this catalytic subunit of the PKA show decreased respiratory activity and mitochondrial content [58]. Actin aggregation induces Ras/cAMP/PKA signaling, leading to the production of ROS from dysfunctional mitochondria [53,55]. Under this condition, the deletion of *TPK3* is sufficient to prevent the production of ROS [55]. Here, we showed that *Slr2* phosphorylation correlates with PKA activation in response to CLT, with the PKA catalytic subunit *Tpk3* being important for LP-*Slr2* formation. Together, it is thus likely that the actin aggregation promoted by CLT can contribute to PKA-mediated mitochondrial alteration and ROS production, leading to CWI pathway activation. In this regard, distinct components of the CWI pathway, including *Bck1*, *Mkk1*, and *Slr2*, were found to localize to mitochondria under oxidative stress [74]. Moreover, *Slr2* is required for mitophagy [75]. Therefore, it is tempting to speculate that the CWI pathway may sense oxidative stress at the mitochondria, and thus be involved in their mitophagy. In this line, it was observed that fungicidal drugs induce the switch from fermentative growth to ROS-producing mitochondrial respiration [56], and mitophagy is usually induced by prolonged respiration [76].

In addition to *S. cerevisiae*, the sub-phylum Saccharomycotina contains over 1000 other known species of budding yeasts, with more than 300 with a known genome, including the opportunistic pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata* [77]. Conservation occurs in many aspects between *S. cerevisiae* and pathogen yeasts, including some canonical drug resistance mechanisms [78]. Our studies with different budding yeasts of this sub-phylum highlight the evolutionary conservation of the CWI and HOG pathways as stress-responsive pathways following azole treatment. Defining the differences and similarities between *S. cerevisiae* and pathogenic fungi underpinning the response to azoles will enable the rational design of combination therapies to tackle resistance to these antifungal drugs.

Supplementary Materials: The following are available online at <https://www.mdpi.com/article/10.3390/jof7080647/s1>, Figure S1: Analysis of the role of Pkc1 in clotrimazole signaling through the CWI pathway in the CML128 background. Figure S2: Effect of clotrimazole on cells bearing the Integrity Pathway Activation Circuit (IPAC).

Author Contributions: Conceptualization, Á.S.-M., M.M. and H.M.; methodology, Á.S.-M. and M.N.; validation, Á.S.-M., M.N., M.M. and H.M.; formal analysis, Á.S.-M., M.N., M.M. and H.M.; investigation, Á.S.-M., M.N., M.M. and H.M.; resources, M.M. and H.M.; data curation, Á.S.-M.; writing—original draft preparation, Á.S.-M., M.M. and H.M.; writing—review and editing, Á.S.-M., M.M. and H.M.; visualization, Á.S.-M.; supervision, M.M. and H.M.; project administration, M.M. and H.M.; funding acquisition, M.M. and H.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), grant number PID2019-105342GB-I00; Comunidad de Madrid and European Structural and Investment Funds, grant number S2017/BMD-3691 (InGEMICS-CM); and Á.S.-M. was recipient of an FPI contract from Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Spain).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding authors.

Acknowledgments: We thank Esmeralda Alonso-Rodríguez for her initial work on this subject. We thank Javier Arroyo, María Angeles de la Torre, Elena Jiménez-Gutiérrez, Ana Alastruey-Izquierdo, and Elvira Marín for providing some of the materials used in this study. We also thank Lucía Sastre for technical support, and other colleagues from Unit 3 of the Departamento de Microbiología y Parasitología at UCM for their useful comments and discussions throughout our work. We acknowledge the Servicio de Genómica y Proteómica (UCM, Madrid, Spain) for conducting the DNA sequencing and RT-qPCR assays.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Kim, E.K.; Choi, E.J. Compromised MAPK signaling in human diseases: An update. *Arch. Toxicol.* **2015**, *89*, 867–882. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Cargnello, M.; Roux, P.P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75*, 50–83. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chen, R.E.; Thorner, J. Function and Regulation in MAPK Signaling Pathways. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Res.* **2007**, *1773*, 1311–1340. [[CrossRef](#)]
4. Li, Y.; Roberts, J.; Aghdam, Z.A.; Hao, N. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) dynamics determine cell fate in the yeast mating response. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 20354–20361. [[CrossRef](#)]
5. Sabbagh, W.; Flatauer, L.J.; Bardwell, A.J.; Bardwell, L. Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol. Cell* **2001**, *8*, 683–691. [[CrossRef](#)]
6. Saito, H.; Posas, F. Response to hyperosmotic stress. *Genetics* **2012**, *192*, 289–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Hohmann, S. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr. Genet.* **2015**, *61*, 373–382. [[CrossRef](#)]
8. Jiménez-Gutiérrez, E.; Alegría-Carrasco, E.; Sellers-Moya, Á.; Molina, M.; Martín, H. Not just the wall: The other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int. Microbiol.* **2020**, *23*, 107–119. [[CrossRef](#)]

9. Jendretzki, A.; Wittland, J.; Wilk, S.; Straede, A.; Heinisch, J.J. How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur. J. Cell Biol.* **2011**, *90*, 740–744. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Krause, S.A.; Cundell, M.J.; Poon, P.P.; McGhie, J.; Johnston, G.C.; Price, C.; Gray, J.V. Functional specialisation of yeast Rho1 GTP exchange factors. *J. Cell Sci.* **2012**, *125*, 2721–2731. [[CrossRef](#)]
11. González-Rubio, G.; Sellers-Moya, Á.; Martín, H.; Molina, M. A walk-through MAPK structure and functionality with the 30-year-old yeast MAPK Slt2. *Int. Microbiol.* **2021**, 1–13. [[CrossRef](#)]
12. Sanz, A.B.; García, R.; Rodríguez-Peña, J.M.; Arroyo, J. The CWI pathway: Regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. *J. Fungi* **2018**, *4*, 1. [[CrossRef](#)]
13. Truman, A.W.; Kim, K.-Y.; Levin, D.E. Mechanism of Mpk1 Mitogen-Activated Protein Kinase Binding to the Swi4 Transcription Factor and Its Regulation by a Novel Caffeine-Induced Phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* **2009**, *29*, 6449–6461. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Fisher, M.C.; Hawkins, N.J.; Sanglard, D.; Gurr, S.J. Worldwide emergence of resistance to antifungal drugs challenges human health and food security. *Science* **2018**, *360*, 739–742. [[CrossRef](#)]
15. Allen, D.; Wilson, D.; Drew, R.; Perfect, J. Azole antifungals: 35 years of invasive fungal infection management. *Expert Rev. Anti-Infect. Ther.* **2015**, *13*, 787–798. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Crowley, P.D.; Gallagher, H.C. Clotrimazole as a pharmaceutical: Past, present and future. *J. Appl. Microbiol.* **2014**, *117*, 611–617. [[CrossRef](#)]
17. Odds, F.C.; Brown, A.J.P.; Gow, N.A.R. Antifungal agents: Mechanisms of action. *Trends Microbiol.* **2003**, *11*, 272–279. [[CrossRef](#)]
18. Hornby, J.M.; Nickerson, K.W. Enhanced production of farnesol by *Candida albicans* treated with four azoles. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2305–2307. [[CrossRef](#)]
19. Kobayashi, D.; Kondo, K.; Uehara, N.; Otokozaawa, S.; Tsuji, N.; Yagihashi, A.; Watanabe, N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46*, 3113–3117. [[CrossRef](#)]
20. François, I.E.J.A.; Cammue, B.P.A.; Borgers, M.; Ausma, J.; Dispersyn, G.D.; Thevissen, K. Azoles: Mode of antifungal action and resistance development. Effect of miconazole on endogenous reactive oxygen species production in *Candida albicans*. *Anti-Infect. Agents Med. Chem.* **2006**, *5*, 3–13. [[CrossRef](#)]
21. Navarro-García, F.; Eisman, B.; Fiuza, S.M.; Nombela, C.; Pla, J. The MAP kinase Mkc1p is activated under different stress conditions in *Candida albicans*. *Microbiology* **2005**, *151*, 2737–2749. [[CrossRef](#)]
22. Lafayette, S.L.; Collins, C.; Zaas, A.K.; Schell, W.A.; Betancourt-Quiroz, M.; Leslie Gunatilaka, A.A.; Perfect, J.R.; Cowen, L.E. PKC signaling regulates drug resistance of the fungal pathogen *Candida albicans* via circuitry comprised of *mkc1*, calcineurin, and *hsp90*. *PLoS Pathog.* **2010**, *6*, 79–80. [[CrossRef](#)]
23. Demuyser, L.; Van Dijck, P. Can *Saccharomyces cerevisiae* keep up as a model system in fungal azole susceptibility research? *Drug Resist. Update* **2019**, *42*, 22–34. [[CrossRef](#)]
24. Jimenez-Sanchez, M.; Cid, V.J.; Molina, M. Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 31174–31185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. De la Torre-Ruiz, M.A.; Torres, J.; Arin, J.; Herrero, E. Sit4 Is Required for Proper Modulation of the Biological Functions Mediated by Pkc1 and the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 33468–33476. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. García, R.; Sanz, A.B.; Rodríguez-Peña, J.M.; Nombela, C.; Arroyo, J. Rlm1 mediates positive autoregulatory transcriptional feedback that is essential for Slt2-dependent gene expression. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 1649–1660. [[CrossRef](#)]
27. Sanz, A.B.; García, R.; Rodríguez-Peña, J.M.; Nombela, C.; Arroyo, J. Slt2 MAPK association with chromatin is required for transcriptional activation of Rlm1 dependent genes upon cell wall stress. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* **2018**, *1861*, 1029–1039. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. García, R.; Bravo, E.; Díez-Muñiz, S.; Nombela, C.; Rodríguez-Peña, J.M.; Arroyo, J. A novel connection between the Cell Wall Integrity and the PKA pathways regulates cell wall stress response in yeast. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 5703. [[CrossRef](#)]
29. Jiménez-Gutiérrez, E.; Alegría-Carrasco, E.; Alonso-Rodríguez, E.; Fernández-Acero, T.; Molina, M.; Martín, H. Rewiring the yeast cell wall integrity (CWI) pathway through a synthetic positive feedback circuit unveils a novel role for the MAPKKK Ssk2 in CWI pathway activation. *FEBS J.* **2020**, *287*, 4881–4901. [[CrossRef](#)]
30. Flández, M.; Cosano, I.C.; Nombela, C.; Martín, H.; Molina, M. Reciprocal Regulation between Slt2 MAPK and Isoforms of Msg5 Dual-specificity Protein Phosphatase Modulates the Yeast Cell Integrity Pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 11027–11034. [[CrossRef](#)]
31. Sikorski, R.S.; Hieter, P. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **1989**, *122*, 19–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Alonso-Rodríguez, E.; Fernández-Piñar, P.; Sacristán-Reviriego, A.; Molina, M.; Martín, H. An analog-sensitive version of the protein kinase Slt2 allows identification of novel targets of the yeast cell wall integrity pathway. *J. Biol. Chem.* **2016**, *291*, 5461–5472. [[CrossRef](#)]
33. Kim, K.Y.; Cosano, I.C.; Levin, D.E.; Molina, M.; Martín, H. Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast* **2007**, *24*, 335–342. [[CrossRef](#)]
34. Denis, V.; Cyert, M.S. Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot. Cell* **2005**, *4*, 36–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Jung, U.S.; Sobering, A.K.; Romeo, M.J.; Levin, D.E. Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol. Microbiol.* **2002**, *46*, 781–789. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. García, R.; Rodríguez-Peña, J.M.; Bermejo, C.; Nombela, C.; Arroyo, J. The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 10901–10911. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Fernández-Acero, T.; Bertalmio, E.; Luna, S.; Mingo, J.; Bravo-Plaza, I.; Rodríguez-Escudero, I.; Molina, M.; Pulido, R.; Cid, V.J. Expression of Human PTEN-L in a Yeast Heterologous Model Unveils Specific N-Terminal Motifs Controlling PTEN-L Subcellular Localization and Function. *Cells* **2019**, *8*, 1512. [[CrossRef](#)]
38. Martín, H.; Rodríguez-Pachón, J.M.; Ruiz, C.; Nombela, C.; Molina, M. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1511–1519. [[CrossRef](#)]
39. Jiménez, J.; Cid, V.J.; Cenamor, R.; Yuste, M.; Molero, G.; Nombela, C.; Sánchez, M. Morphogenesis beyond Cytokinetic Arrest in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 1617–1634. [[CrossRef](#)]
40. García, R.; Bermejo, C.; Grau, C.; Pérez, R.; Rodríguez-Peña, J.M.; Francois, J.; Nombela, C.; Arroyo, J. The Global Transcriptional Response to Transient Cell Wall Damage in *Saccharomyces cerevisiae* and Its Regulation by the Cell Integrity Signaling Pathway. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 15183–15195. [[CrossRef](#)]
41. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **2001**, *25*, 402–408. [[CrossRef](#)]
42. Bermejo, C.; Rodríguez, E.; García, R.; Rodríguez-Peña, J.M.; Rodríguez De La Concepción, M.L.; Rivas, C.; Arias, P.; Nombela, C.; Posas, F.; Arroyo, J. The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol. Biol. Cell* **2008**, *19*, 1113–1124. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Nagiec, M.J.; Dohlman, H.G. Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, e1002437. [[CrossRef](#)]
44. Bermejo, C.; García, R.; Straede, A.; Rodríguez-Peña, J.M.; Nombela, C.; Heinisch, J.J.; Arroyo, J. Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Omic J. Integr. Biol.* **2010**, *14*, 679–688. [[CrossRef](#)]
45. Levin, D.E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **2011**, *189*, 1145–1175. [[CrossRef](#)]
46. Tatjer, L.; Sacristán-Reviriego, A.; Casado, C.; González, A.; Rodríguez-Porrata, B.; Palacios, L.; Canadell, D.; Serra-Cardona, A.; Martín, H.; Molina, M. Wide-Ranging Effects of the Yeast Ptc1 Protein Phosphatase Acting Through the MAPK Kinase Mkk1. *Genetics* **2016**, *202*, 141–156. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Marín, M.J.; Flández, M.; Bermejo, C.; Arroyo, J.; Martín, H.; Molina, M. Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Mol. Genet. Genom.* **2009**, *281*, 345–359. [[CrossRef](#)]
48. Kim, K.-Y.; Truman, A.W.; Caesar, S.; Schlenstedt, G.; Levin, D.E. Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol. Biol. Cell* **2010**, *21*, 1609–1619. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Büttner, S.; Eisenberg, T.; Carmona-Gutierrez, D.; Ruli, D.; Knauer, H.; Ruckstuhl, C.; Sigrist, C.; Wissing, S.; Kollroser, M.; Fröhlich, K.U.; et al. Endonuclease G Regulates Budding Yeast Life and Death. *Mol. Cell.* **2007**, *25*, 233–246. [[CrossRef](#)]
50. Kwolek-Mirek, M.; Zdrag-Tecza, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Res.* **2014**, *14*, 1068–1079. [[CrossRef](#)]
51. Caldara, M.; Graziano, S.; Gulli, M.; Cadonici, S.; Marmiroli, N. Off-target effects of neuroleptics and antidepressants on *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol. Sci.* **2017**, *156*, 538–548. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Kamada, Y.; Jung, U.S.; Piotrowski, J.; Levin, D.E. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* **1995**, *9*, 1559–1571. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Gourlay, C.W.; Carpp, L.N.; Timpson, P.; Winder, S.J.; Ayscough, K.R. A role for the actin cytoskeleton in cell death and aging in yeast. *J. Cell Biol.* **2004**, *164*, 803–809. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Thevissen, K.; Ayscough, K.R.; Aerts, A.M.; Du, W.; De Brucker, K.; Meert, E.M.K.; Ausma, J.; Borgers, M.; Cammue, B.P.A.; François, I.E.J.A. Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 21592–21597. [[CrossRef](#)]
55. Gourlay, C.W.; Ayscough, K.R. Actin-Induced Hyperactivation of the Ras Signaling Pathway Leads to Apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **2006**, *26*, 6487–6501. [[CrossRef](#)]
56. Belenky, P.; Camacho, D.; Collins, J.J. Report Fungicidal Drugs Induce a Common Oxidative-Damage Cellular Death Pathway. *Cell Rep.* **2012**, *3*, 350–358. [[CrossRef](#)]
57. Robertson, L.S.; Causton, H.C.; Young, R.A.; Fink, G.R. The yeast A kinases differentially regulate iron uptake and respiratory function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5984–5988. [[CrossRef](#)]
58. Chevtzoff, C.; Vallortigara, J.; Avéret, N.; Rigoulet, M.; Devin, A. The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2005**, *1706*, 117–125. [[CrossRef](#)]
59. Hao, N.; Zeng, Y.; Elston, T.C.; Dohlman, H.G. Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 33798–33802. [[CrossRef](#)]

60. Lawrence, C.L.; Botting, C.H.; Antrobus, R.; Coote, P.J. Evidence of a New Role for the High-Osmolarity Glycerol Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway in Yeast: Regulating Adaptation to Citric Acid Stress. *Mol. Cell. Biol.* **2004**, *24*, 3307–3323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Mollapour, M.; Piper, P.W. Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **2006**, *6*, 1274–1280. [[CrossRef](#)]
62. Tanigawa, M.; Kihara, A.; Terashima, M.; Takahara, T.; Maeda, T. Sphingolipids Regulate the Yeast High-Osmolarity Glycerol Response Pathway. *Mol. Cell. Biol.* **2012**, *32*, 2861–2870. [[CrossRef](#)]
63. Hickman, M.J.; Spatt, D.; Winston, F. The Hog1 mitogen-activated protein kinase mediates a hypoxic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **2011**, *188*, 325–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Román, E.; Prieto, D.; Martín, R.; Correia, I.; Mesa Arango, A.C.; Alonso-Monge, R.; Zaragoza, O.; Pla, J. Role of catalase overproduction in drug resistance and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiol.* **2016**, *11*, 1279–1297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Lee, Y.M.; Kim, E.; An, J.; Lee, Y.; Choi, E.; Choi, W.; Moon, E.; Kim, W. Dissection of the HOG pathway activated by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ. Microbiol.* **2017**, *19*, 584–597. [[CrossRef](#)]
66. Laz, E.V.; Lee, J.; Levin, D.E. Crosstalk between *Saccharomyces cerevisiae* SAPKs Hog1 and Mpk1 is mediated by glycerol accumulation. *Fungal Biol.* **2020**, *124*, 361–367. [[CrossRef](#)]
67. Bammert, G.F.; Fostel, J.M. Genome-wide expression patterns in *Saccharomyces cerevisiae*: Comparison of drug treatments and genetic alterations affecting biosynthesis of ergosterol. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000**, *44*, 1255–1265. [[CrossRef](#)]
68. Scheffler, L.; Feicht, S.; Babushku, T.; Kuhn, L.B.; Ehrenberg, S.; Frankenberger, S.; Lehmann, F.M.; Hobeika, E.; Jungnickel, B.; Baccarini, M.; et al. ERK phosphorylation is RAF independent in naïve and activated B cells but RAF dependent in plasma cell differentiation. *Sci. Signal.* **2021**, *14*, eabc1648. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Heinisch, J.J.; Rodicio, R. Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol. Rev.* **2018**, *42*, 22–39. [[CrossRef](#)]
70. Parsons, A.B.; Lopez, A.; Givoni, I.E.; Williams, D.E.; Gray, C.A.; Porter, J.; Chua, G.; Sopko, R.; Brost, R.L.; Ho, C.H.; et al. Exploring the Mode-of-Action of Bioactive Compounds by Chemical-Genetic Profiling in Yeast. *Cell* **2006**, *126*, 611–625. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Vilella, F.; Herrero, E.; Torres, J.; De La Torre-Ruiz, M.A. Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 9149–9159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. De Filippi, L.; Fournier, M.; Cameroni, E.; Linder, P.; De Virgilio, C.; Foti, M.; Deloche, O. Membrane stress is coupled to a rapid translational control of gene expression in chlorpromazine-treated cells. *Curr. Genet.* **2007**, *52*, 171–185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Elmorsy, E.; Al-Ghafari, A.; Aggour, A.M.; Khan, R.; Amer, S. The role of oxidative stress in antipsychotics induced ovarian toxicity. *Toxicol. In Vitro* **2017**, *44*, 190–195. [[CrossRef](#)]
74. Fairn, G.D.; MacDonald, K.; McMaster, C.R. A chemogenomic screen in *Saccharomyces cerevisiae* uncovers a primary role for the mitochondria in farnesol toxicity and its regulation by the Pkc1 pathway. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 4868–4874. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Mao, K.; Wang, K.; Zhao, M.; Xu, T.; Klionsky, D.J. Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **2011**, *193*, 755–767. [[CrossRef](#)]
76. Okamoto, K.; Kondo-Okamoto, N.; Ohsumi, Y. Article Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Dev. Cell* **2009**, *17*, 87–97. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Shen, X.; Oplente, D.A.; Kominek, J.; Kurtzman, C.P.; Hittinger, C.T.; Rokas, A.; Shen, X.; Oplente, D.A.; Kominek, J.; Zhou, X.; et al. Tempo and Mode of Genome Evolution in the Budding Yeast Subphylum. *Cell* **2018**, *175*, 1533–1545. [[CrossRef](#)]
78. Shapiro, R.S.; Robbins, N.; Cowen, L.E. Regulatory Circuitry Governing Fungal Development, Drug Resistance, and Disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2011**, *75*, 213–267. [[CrossRef](#)]



A walk-through MAPK structure and functionality with the 30-year-old yeast MAPK Slt2

Gema González-Rubio¹ · Ángela Sellers-Moya¹ · Humberto Martín¹ · María Molina¹

Received: 1 April 2021 / Revised: 29 April 2021 / Accepted: 5 May 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature Switzerland AG 2021

Abstract

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are evolutionarily conserved signaling proteins involved in the regulation of most eukaryotic cellular processes. They are downstream components of essential signal transduction pathways activated by the external stimuli, in which the signal is conveyed through phosphorylation cascades. The excellent genetic and biochemical tractability of simple eukaryotes such as *Saccharomyces cerevisiae* has significantly contributed to gain fundamental information into the physiology of these key proteins. The budding yeast MAPK Slt2 was identified 30 years ago and was later revealed as a fundamental element of the cell wall integrity (CWI) pathway, one of the five MAPK routes of *S. cerevisiae*. As occurs with other MAPKs, whereas Slt2 displays the core typical structural traits of eukaryotic protein kinases, it also features conserved domains among MAPKs that allow an exquisite spatio-temporal regulation of their activity and binding to activating kinases, downregulatory phosphatases, or nuclear transcription factors. Additionally, Slt2 bears a regulatory extra C-terminal tail unique among *S. cerevisiae* MAPKs. Here, we review the structural and functional basis for the signaling role of Slt2 in the context of the molecular architecture of this important family of protein kinases.

Keywords Yeast cell wall · CWI pathway · Slt2 · MAPK · Stress response · Phosphorylation

Introduction

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are key mediators of signal transduction in eukaryotic organisms. They are the last elements of three-tiered protein kinase modules that are involved in cell responses to mitogens or different environmental stresses, which are initially detected by sensors at the cell surface. These signaling pathways, which take their name from MAPKs, are evolutionarily conserved from yeasts to humans and regulate essential processes such as cell survival, proliferation, and development. Nowadays, we well know that MAPKs belong to a family of serine/

threonine protein kinases that share the feature of being activated by the addition of phosphate groups to both a tyrosine and a threonine within their activation loop (Morrison 2012). However, until 1986, none of the members of this family had been identified yet. The term MAPK was firstly used to designate a mammalian protein kinase capable of phosphorylating a microtubule-associated protein (MAP) upon insulin stimulation (Sturgill and Ray 1986). A later study found that this protein kinase resulted to be the same whose phosphorylation was stimulated by several mitogenic stimuli (Rossomando et al. 1989). This prompted the redesignation of the acronym “MAP” from “microtubule-associated protein” to “mitogen-activated protein,” which is how MAPKs are now known (Avruch 2007). Then, a cDNA that encoded this previously biochemically characterized MAPK was cloned and named extracellular signal-regulated kinase 1 (ERK1) (Boulton et al. 1990). In those years, several *Saccharomyces cerevisiae* protein kinases with a remarkable similarity to mammalian MAPKs were also identified, Kss1 (Courchesne et al. 1989) and Fus3 (Elion et al. 1990), both of which regulate the cell response to mating pheromones, and Slt2, involved in the maintenance of the cell wall integrity (Torres et al. 1991). The analysis of the structural and

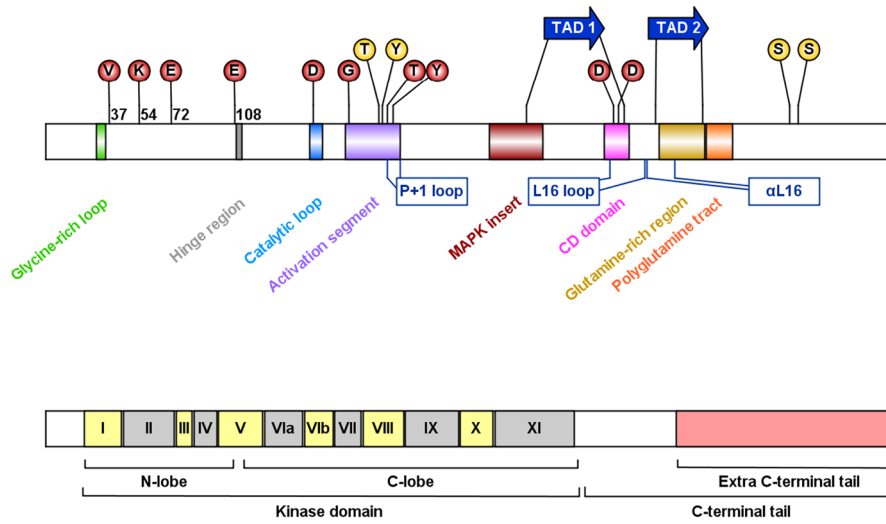
Gema González-Rubio and Ángela Sellers-Moya contributed equally to this work.

✉ Humberto Martín
humberto@ucm.es

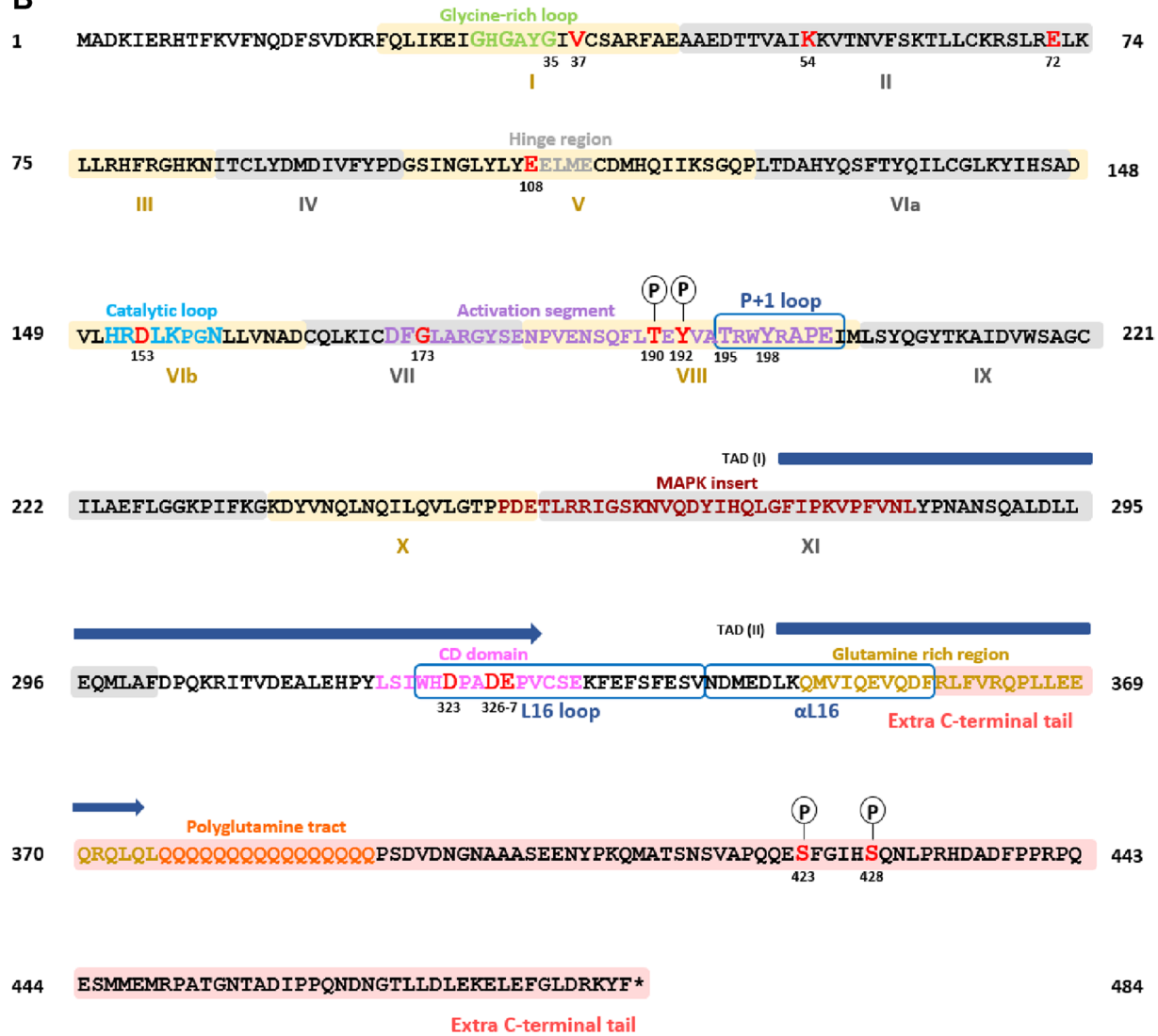
✉ María Molina
molmifa@ucm.es

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Universidad Complutense de Madrid, Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

A



B



◀Fig. 1 **A** Schematic representation of the overall structure and functional domains of the *Saccharomyces cerevisiae* MAPK Slt2. Slt2 consists of 484 amino acids and presents an N-terminal kinase domain and a large C-terminal tail. The kinase domain is subdivided into 12 conserved subdomains that contain the glycine-rich loop (30–35); the hinge region (109–112); the catalytic loop (151–158); the activation segment (171–202); the P+1 loop (195–202); the MAPK insert (253–283); and the transcription activation domain (TAD) I (274–329). The C-terminal tail contains the common docking (CD) domain (318–332); L16 loop (321–341); α L16 helix (342–358); TAD II (347–374); glutamine-rich region (349–375); polyglutamine region (376–391); and extra C-terminal tail (359–484). The numbers are those of amino acid residues. Conserved amino acid residues are circled in red. Phosphorylated amino acid residues are circled in yellow. **B** The primary structure of Slt2. The color code is the same as in **A**. Conserved residues are in bold red color. P indicates phosphorylation

functional features of these mammalian and yeast proteins led to consider that they constitute a family of evolutionarily conserved enzymes involved in regulating the response of eukaryotic cells to extracellular signals.

Before genetic engineering, classical genetics based on obtaining mutants and analyzing phenotypes was the best way to carry out functional studies in yeast. Dozens of mutants altered in cell division cycle (*cdc*), mating (sterile), osmoregulation (osmosensitive), or cell wall integrity (lytic) were obtained by different groups in the 1970s. Later, complementation and suppression genetic screenings allowed the isolation of the gene defective in some of these mutants, leading to the identification not only of the MAPK itself but of other components of the MAPK-mediated signaling pathways regulating these yeast processes. Indeed, complementation of the thermosensitive lytic phenotype of a *S. cerevisiae* *lyt* mutant (Cabib and Duran 1975) by the *SLT2* gene, which encoded a member of the MAPK family, initiated the study of the cell wall integrity (CWI) pathway 30 years ago (Torres et al. 1991). This gene was also isolated as a dosage-dependent suppressor of the cell lysis defect associated with the deletion of the *BCK1* gene, which coded for the first tier of the CWI MAPK module (the MAPK kinase kinase), and it was designated *MPK1* (Lee et al. 1993). In turn, mutational activation of *BCK1* was shown to bypass the requirement for *PKC1* (Lee and Levin 1992), placing the function of Bck1 downstream of Pkc1. Loss of this yeast homolog of mammalian protein kinase C also resulted in a cell lysis defect, due to a deficiency in cell wall construction (Levin and Bartlett-Heubusch 1992). Later, the suppression of the cell lysis defect of *pkc1* and *bck1* mutants by *MKK1* and *MKK2* indicated that these two redundant genes encode the MAPK kinases (MAPKKs) corresponding to the second tier of the module (Irie et al. 1993). The small GTPase Rho1 was also reported to be involved in cell wall integrity by controlling signal transmission through Pkc1 (Kamada et al. 1996). Moreover, several surface proteins required for sensing the cell wall stress and transmit the signal via Rho1-Pkc1

to the CWI MAPK module were later identified, namely, Wsc1/2/3, Mid2, and Mtl1 (Jacoby et al. 1998; Ketela et al. 1999; Verna et al. 1997). Therefore, in less than 10 years, the basic structure of the Slt2-mediated CWI pathway was unveiled, and its role in the stress response that leads to the maintenance of a stable cell wall was established.

Since then, a huge body of work has uncovered many aspects of the CWI pathway and, particularly, of Slt2, among them (i) the mechanisms of activation/inactivation of this MAPK (Gonzalez-Rubio et al. 2019; Levin 2011); (ii) the regulation of gene expression for the adaptive response to cell wall damage, which is mainly mediated through the transcription factor Rlm1 (Sanz et al. 2017); (iii) the existence of multiple stimuli, other than cell wall stress, which trigger Slt2 activation (Jimenez-Gutierrez et al. 2020), such as heat shock (Kamada et al. 1995), hypotonic shock (Davenport et al. 1995), stationary phase (Torres et al. 2002), oxidative stress (Vilella et al. 2005), genotoxic stress (Queralt and Igual 2005), or high pH (Serrano et al. 2006); and (iv) its involvement in diverse cellular processes not related to cell wall construction, namely, mitophagy and pexophagy (Mao and Klionsky 2011), or endoplasmic reticulum inheritance (Du et al. 2006).

In this review, we will focus on the structure of Slt2, by analyzing the available information about key protein domains and important residues for the activation, kinase activity, regulation, protein interaction, and cellular function of the CWI MAPK. Since domain structures of MAPKs are evolutionarily conserved in other fungi (Xu et al. 2017), knowledge accumulated in the *S. cerevisiae* model can be applied to Slt2 orthologs of different species.

Look globally: overall structure of Slt2

More than 30 years ago and based on sequence similarities of various dozens of protein kinases, a landmark study identified several motifs embedded within the catalytic domain of protein kinases that were classified into twelve subdomains (I-VIa, VIb-XI) (Hanks et al. 1988). These subdomains consisted of regions never interrupted by large amino acid insertions and containing characteristic patterns of conserved residues. According to their high conservation, these residues were supposed to play important roles in the catalytic activity of the protein kinase. Some years later, the sequence of Slt2 was also included in what could be considered a further extension of these studies (Hanks and Hunter 1995). As depicted in Fig. 1, the Slt2 protein has 484 amino acids, and its kinase domain, located at the N-terminal part of the protein, presents the twelve canonical subdomains of protein kinases (Hanks and Hunter 1995; Torres et al. 1991). The most characteristic residues and signatures within these subdomains can be readily identified

in the Slt2 amino acid sequence. Subdomain I contains the conserved glycine-rich (GXGXXG) ATP-phosphate-binding loop, which is followed by a conserved valine (V37 in Slt2) that makes a hydrophobic contact with the adenine of the ATP. In subdomain II lies an invariant lysine (K54 in Slt2), which forms a salt bridge with a conserved glutamic acid (E72 in Slt2) within subdomain III. This salt bridge is necessary for full kinase activity. Subdomain IV does not appear to be directly involved in catalysis or substrate recognition. Subdomain V bears the hinge region, which links the N-lobe and the C-lobe of the kinase domain, and it also includes the gatekeeper residue (E108 in Slt2). Subdomain VIa appears to act mainly as a support structure. In subdomain VIb lies the catalytic loop (HRDLKXXN), in which the aspartic acid (D153 in Slt2) would play an important role in catalysis. The activation segment lies in subdomains VII and VIII. It is the most important regulatory element in protein kinases because it influences both substrate binding and catalytic activity. The activation segment of nearly all protein kinases, including Slt2, begins with DFG and ends with APE. The glycine within the DFG motif (G173 in Slt2) binds Mg^{2+} ions, which coordinates the orientation of the α -, β -, and γ -phosphates of ATP. The center of the activation segment is known as the activation loop, and it contains a phosphorylatable tyrosine (Y192 in Slt2) that is two residues downstream from a phosphorylatable threonine (T190 in Slt2) (Roskoski 2012). In the MAPK family, the phosphorylation of both Thr and Tyr residues is required for full activation (Ahn et al. 1991; Anderson et al. 1990).

Furthermore, Slt2 displays two MAPK-specific domains, the MAPK insert, between subdomains X and XI, and a C-terminal tail downstream of the kinase domain, which has different lengths among MAPKs and plays a critical role in their activation and regulation. This C-terminal tail contains the common docking (CD) domain, which is involved in the binding of MAPKs to activators, inhibitors, or substrates (Tanoue et al. 2000). This domain partially overlaps with the L16 loop that is followed by the alpha L16 helix (α L16), which contributes to homodimerization in mammalian MAPKs (Khokhlatchev et al. 1998). Downstream of these MAPK conserved motifs, Slt2 possesses a long and characteristic extra C-terminal tail, bearing a glutamine-rich region and a polyglutamine tract (Fig. 1). Such long C-terminal extension is only present in Erk5 among the conventional mammalian MAPKs (Cargnello and Roux 2011).

Be essential: the ATP-binding site of Slt2 is critical for the CWI pathway functionality

The catalytic domain of protein kinases consists of a mostly β -stranded N-lobe and a larger α -helical C-lobe. These lobes form the catalytic cleft that can accommodate the ATP

molecule and the phospho-acceptor residue (Taylor et al. 2012). The essential residue first identified in protein kinases was the conserved lysine of subdomain II. The ATP analog fluorosulfonyl 50-benzoyl adenosine (FSBA) was shown to label a single lysine residue of the PKA catalytic subunit, and this led to the inhibition of kinase activity (Zoller and Taylor 1979). This residue also proved to be essential for the kinase activity in other protein kinases (Kamps et al. 1984; Weinmaster et al. 1986), and it was confirmed to be at the active site by structural studies, since it is disposed inside the catalytic cleft and participates in essential bonds with α - and β -phosphates of ATP (Knighton et al. 1991; Reikhardt and Shabanov 2020). Therefore, mutation of this lysine residue became the classical approach for interrogating the biological role of specific kinase activity. Mutation of the corresponding lysine of Slt2 (K54F) revealed that the kinase activity of this MAPK was required for its functionality in maintaining cell wall integrity at high temperature (Martín et al. 1993). Recently, it has been found that this Slt2^{K54F} (kinase-dead Slt2, Slt2^{KD}) mutant retains some capacity to preserve cell wall integrity in response to certain cell wall stresses such as SDS, tunicamycin, caffeine, or low CFW concentration (González-Rubio et al. 2021). Therefore, either this Slt2^{KD} version still has some residual kinase activity or the response in such conditions is mediated through the non-catalytic mechanism of Slt2 that activates the transcription factor SBF to promote the induction of a subset of cell wall stress-activated genes (Kim and Levin 2010; Kim et al. 2008).

In addition to the conserved lysine residue at subdomain II, the access of ATP to the protein kinase catalytic site is tightly controlled by another specific amino acid, named the “gatekeeper residue,” whose side chain governs the volume and shape of the ATP-binding site. When this residue is mutated to an amino acid with a smaller size, the resulting kinase version can be potently and specifically inhibited with ATP analogs containing a bulky substituent that is accommodated by the enlarged ATP-binding pocket. This engineered kinase is named analog-sensitive (AS) and allows its rapid, reversible, and highly specific inhibition (Lopez et al. 2014). Interestingly, AS-kinases thiophosphorylate their substrates in kinase assays when a non-inhibitory bulky ATP analog, in which the γ -phosphate is replaced with a thiophosphate moiety, is employed. Thus, this chemical-genetic approach can be also used for the identification of kinase substrates, as thiophosphorylated proteins can be specifically immunodetected (Hertz et al. 2010). A fully functional Slt2-AS version was obtained by replacing its large gatekeeper residue, a glutamic acid in position 108, by glycine (Alonso-Rodríguez et al. 2016). This version was successfully used to identify bona fide Slt2-AS substrates among putative Slt2 targets previously identified by using a phosphoproteomic approach (Mascaraque et al. 2013).

Interestingly, analysis of the mutation present in the thermosensitive *lyt2* mutant used for the initial identification of Slt2 revealed a change in the glycine at position 35 by aspartic acid (Martín et al. 1996). G35 is the third glycine of the glycine-rich loop or G-loop glycine cluster (GXGXXG), which is located in subdomain I of protein kinases and is also essential for the kinase activity as an integral part of the ATP-binding site. In particular, the third glycine of this cluster is involved in anchoring the β -phosphate of ATP. This third glycine is the least conserved among the three glycines of the G-loop of protein kinases. Substitutions of this last glycine of the triad have been shown to have the least effect on the steady-state kinetic parameters of PKA kinase (Hemmer et al. 1997), which is the prototype of the eukaryotic protein kinase family (Reikhardt and Shabanov 2020). However, in the case of Slt2, the change of this glycine by aspartic acid promotes a clear functional deficiency of the MAPK, indicating the essential role of this position for catalysis (Martín et al. 1996).

The glycine-rich-loop of protein kinases is associated with multiple disease mutations, as well as the P+1 loop, which is located at the end of the activation segment (Torkamani et al. 2008) (Fig. 1). This activation segment, which begins with DFG and ends with APE sequence, is indeed the most important regulatory region in protein kinases (Kornev and Taylor 2010). The P+1 loop acts as a docking site for the proline residue that follows the S/T phosphorylated by MAPKs and thus serves to stabilize the substrate and correctly positions the receiving hydroxyl group (Yang et al. 2005). The conserved residues among protein kinases T195 and Y198 are located within the P+1 loop of Slt2 (Fig. 1). Recently, it has been shown that mutation of T195 to valine led to a severe reduction of the kinase activity of Slt2 on different substrates and a lack of ability to complement the *slt2* sensitivity to some cell wall stresses, suggesting an essential role of this residue in the catalytic activity of the MAPK. The Y198 mutation to phenylalanine, however, did not affect Slt2 activity, but both T195V and Y198F mutations displayed a synthetic negative effect under stress conditions (González-Rubio et al. 2021). Therefore, the Slt2 P+1 loop is likely involved in both substrate binding and catalytic efficiency of this MAPK.

Get active: phosphorylation of the TEY motif

It has been well-established that phosphorylation plays a critical role in regulating the timing, duration, and intensity of protein kinase signaling. Although regulation by phosphorylation of the activation loop is a common regulatory feature among protein kinases, phosphorylated residues differ between distinct protein kinase families (Johnson et al. 1996). Specifically, conventional MAPKs share a common

mechanism of kinase activation, characterized by dual phosphorylation of the threonine and tyrosine residues within a conserved TXY motif located in the activation loop of the kinase subdomain VIII (Fig. 1). Activating phosphorylation of both residues is catalyzed by MAPKKs, which are dual-specificity protein kinases (Cargnello and Roux 2011). In contrast, the molecular mechanism underlying the activation of the so-called atypical MAPKs is different since (1) in many of them the TXY motif is absent and (2) they are not organized into the canonical three-tiered kinase cascade. For example, in Erk3/4, Thr and Tyr residues are replaced by Ser and Gly, respectively, while in NLK, Thr is conserved, but a Glu replaces Tyr. Erk7 contains the conserved TXY motif, but these residues appear to be phosphorylated by itself rather than by an upstream MAPKK (Coulombe and Meloche 2007). Slt2 is a conventional MAPK whose full activation depends on dual phosphorylation of a canonical TEY motif (T190 and Y192) within the activation loop (Levin 2011). Although two redundant genes, *MKK1* and *MKK2*, were described to encode the Slt2 activating MAPKKs (Irie et al. 1993), later studies highlighted the preeminent role of Mkk1 in signaling through the CWI pathway (González-Rubio et al. 2021; Tatjer et al. 2016).

The duration and magnitude of MAPK activity, together with its subcellular compartmentalization, generate variations in the signaling output that elicits distinct cellular outcomes (Ebisuya et al. 2005). Therefore, returning MAPK to its inactive state plays an important role in MAPK signaling. Although the regulation of the signaling flow is executed at multiple levels of the MAPK cascade, direct dephosphorylation by phosphatases acting on the TXY motif is the most efficient way to inactivate MAPKs. Particularly, MAPK phosphatases (MKPs), a type of dual-specificity phosphatases (DSPs) that eliminate the phosphate group of both Thr and Tyr residues, regulate not only the extent and amplitude of MAPK signaling, but also the subcellular localization and substrate specificity of MAPKs (Gonzalez-Rubio et al. 2019). *Msg5* and *Sdp1* are the only *S. cerevisiae* DSPs that have been shown to display MKP activity on Slt2 (Martín et al. 2005). However, while *Msg5* dephosphorylates Slt2 both in basal and cell wall stress conditions (Flández et al. 2004; Martín et al. 2000), *Sdp1* only seems to act on Slt2 under heat stress (Kuravi et al. 2011).

Despite initial studies in mammalian cells indicated that dual phosphorylation on MAPKs occurs in a distributive manner, in which the MAPKK dissociates between the Tyr and the Thr phosphorylation (Patwardhan and Miller 2007), later studies led to propose that phosphorylation of certain MAPKs is processive, which means that the same activating MAPKK would not separate from the MAPK until both residues, Tyr and Thr, are phosphorylated (Aoki et al. 2011; English et al. 2015; Nagiec et al. 2015; Vazquez et al. 2015). A recent work on Slt2 phosphorylation by using TEY mutants and Phos-tag

methodology suggested that Mkk1/2 dually phosphorylate the MAPK in an ordered and single binding event, in which the Y192 phosphorylation could be considered as a stepping-stone for Slt2 activation (González-Rubio et al. 2021). In the same study, Msg5 was shown to preferentially dephosphorylate the phosphotyrosine residue, suggesting that not only phosphorylation but also dephosphorylation of the Slt2 activation loop follows a sequential mechanism starting on Y192.

Classically, dual phosphorylation has been considered a prerequisite for MAPK activation (Ahn et al. 1991; Anderson et al. 1990). However, several studies have demonstrated that some monophosphorylated forms are partially active. Although in vitro studies of Erk2 showed that the catalytic efficiency of the two monophosphorylated species was similar and higher than that of the unphosphorylated form (Zhou and Zhang 2002), most studies in vivo agreed that only the monophosphothreonyl residue retains some biological activity in mammalian MAPKs (Askari et al. 2009; Sugden et al. 2011; Zhang et al. 2008). The same finding was observed in Slt2 and its homolog in *Schizosaccharomyces pombe*, the CWI MAPK Pmk1, as well as in other *S. cerevisiae* MAPKs, such as Hog1 and Kss1 (Bardwell et al. 1998; Bell and Engelberg 2003; González-Rubio et al. 2021; Vazquez et al. 2015).

The coexistence of dually, mono-phosphothreonine, mono-phosphotyrosyl, and non-phosphorylated forms of Slt2 could be observed in yeast extracts from cells exposed to cell wall stress by using the Phos-tag technique, which allows the simultaneous detection of all phosphorylation states of a protein (González-Rubio et al. 2021; Kinoshita et al. 2006). By using this technique, it has been shown that Hog1 is fully dually phosphorylated upon osmotic stress (English et al. 2015), whereas the amount of mono- and dually phosphorylated species of Fus3 and Kss1 is similar to that of the unphosphorylated form (Nagiec et al. 2015; Winters and Pryciak 2018). In contrast, the proportion of phosphorylated Slt2 forms is very small when compared to the non-phosphorylated state under cell wall stress conditions (González-Rubio et al. 2021). This indicates that, after stimulation, only a very low amount of Slt2 is activated, suggesting that this MAPK would be concentrated in discrete regions within the cell to exert its activity. These results highlight the value of Phos-tag analysis in identifying other stimuli that trigger higher levels of phosphorylated Slt2 in future studies.

Mind the subtle: additional phosphorylation and other post-translational regulatory modifications

In addition to the activation loop phosphorylation, kinases can be further phosphorylated at other residues, found either within the putative kinase domain or in other motifs.

These phosphorylation events, which can be conducted by other kinases or by autophosphorylation, regulate the catalytic activity, subcellular localization, or interaction with other proteins, among others. In the case of *S. cerevisiae* MAPKs, only one study reported functional phosphorylation of two residues apart from the TXY motif. Under caffeine exposure, two serines, S423 and S428, became phosphorylated in Slt2 (Fig. 1) (Truman et al. 2009). Phosphorylation at these residues was previously identified after DNA damage by proteomic approaches (Albuquerque et al. 2008), but this was the first time their regulatory role was studied. Phosphorylation at S423 displayed an inhibitory effect on Slt2 binding to the transcription factor Swi4, whereas no effect was found linked to S428 phosphorylation. DNA damage checkpoint kinases Rad53 and Mec1/Tel1 were found to be responsible for S423 and S428 phosphorylation, respectively (Truman et al. 2009). This is a clear example of how additional phosphorylation can affect a crucial MAPK function such as transcriptional activation. It is important to note that several phosphoproteomic studies have detected additional phosphorylation events in *S. cerevisiae* MAPKs (Albuquerque et al. 2008; Lanz et al. 2021; Swaney et al. 2013), suggesting the possibility that these phosphosites exert a regulatory function. Particularly in Slt2, S186 and S416 (Lanz et al. 2021; Swaney et al. 2013) have also been identified as phosphorylated. Further studies would be of interest to delve into the functional role of these residues.

In mammalian MAPKs, two phosphorylatable residues, located downstream the TEY motif within the activation loop (T207 and Y210 of Erk1) and conserved in most protein-serine/threonine kinases of diverse species, have been studied in depth. In Erk1, phosphorylation at T207 was found to occur by autophosphorylation, whereas Y210 was phosphorylated by MEK1. These two Erk1 phosphorylations seem to play a negative regulatory role, as they repressed the catalytic activity of the kinase (Lai and Pelech 2016). On the other hand, T188 phosphorylation of Erk2 (equivalent to T207 in Erk1) was also triggered by autophosphorylation but led to Erk2 nuclear localization, which appears to be critical for cardiac hypertrophy (Lorenz et al. 2009). The corresponding residue T185 of p38 α kinase was also found to be essential for TAB1-induced autoactivation of the protein, as a result of an intramolecular hydrogen bond with Asp150 (Thapa et al., 2018). When studied in Slt2, the conserved residues T195 and Y198 were not found phosphorylated in yeast cells upon stimulation by Congo red, as revealed by Phos-tag analysis. Nevertheless, the T195 residue proved to be essential for the catalytic activity of the MAPK (González-Rubio et al. 2021). Overall, these findings indicate that although highly conserved, these two phosphoresidues exhibit different regulatory functions depending on the MAPK.

Other post-translational modifications different from phosphorylation are also involved in the functional regulation of MAPKs. For example, ubiquitination is well-characterized as a marker for protein degradation, but it has been suggested to affect kinase activity and function in other ways (Ball et al. 2016). In Slt2, K155 and K263 were found to be ubiquitinated (Swaney et al. 2013), although the functional consequences have not been explored yet. SUMOylation can also impact MAPK regulation, as (SUMO)-2 modification at lysine residues was found to be important for Erk5 nuclear translocation in cancer cells (Erazo et al. 2020). An additional example is the oxidation of MAPKs when cells are exposed to oxidizing agents like hydrogen peroxide or nitric oxide. The MAPKs Sty1 and Hog1 from *S. pombe* and *Candida albicans*, respectively, were proved to be regulated by cysteine oxidation upon oxidative damage (Day and Veal 2010; Herrero-de-Dios et al. 2018). This sort of oxidative regulation was also described for human ERKs (Keyes et al. 2017). Therefore, although much less studied than phosphorylation, other post-translational modifications can be essential for Slt2 to respond to a particular stress, allowing the CWI pathway to operate accurately in a variety of environmental conditions.

Interact with partners: the CD domain

As occurs with other MAPKs, the interaction of Slt2 with its activators, negative regulators, and protein targets is essential for the appropriate modulation and functionality of the CWI pathway. To this end, MAPK regulatory proteins and substrates use linear binding motifs to anchor to the MAPKs. These sites have been referred to as the DEF motifs (docking site for ERK, FxF), also named F-motifs or F sites, and the D-motifs (Docking), also known as KIMs (kinase interaction motifs) (Akella et al. 2008; Tanoue and Nishida 2002). These two sites bind to their respective docking grooves in MAPKs. DEF motifs consist of $\Omega X \Omega$ (where Ω specifies aromatic residues) that interact with a small hydrophobic pocket proximal to the catalytic cleft of MAPKs (Lee et al. 2004; Sheridan et al. 2008). First identified and more relevant for binding to MAPKs are D-motifs, which contain a cluster of basic residues separated from hydrophobic residues by a short linker. The consensus sequence of these sites is $\psi_{1-3} X_{3-7} \phi X \phi$ (where ψ is a positively charged residue, X can be any residue, and ϕ is a hydrophobic residue) (Garai et al. 2012; Tanoue et al. 2000). This consensus motif engages the D-recruitment site (DRS) at the MAPK. The DRS is located on the opposite face from the active site and consists of two distinct regions, (1) a negatively charged CD (common docking) domain located at the L16 loop and (2) a hydrophobic docking groove (Chang et al. 2002), formed by the hydrophobic residues of the αD and

αE helices (subdomains V and VIa), which is bordered by the $\beta 7$ - $\beta 8$ reverse turn (subdomain VIB-VII) containing the negatively charged ED (for Glu Asp) domain (Zeke et al. 2015).

Slt2 displays a CD domain spanning amino acids 318–332 (Fig. 1) (Palacios et al. 2011), whose importance for binding to the distinct Slt2 interactors differs among them. Mutation of the conserved acidic residues to asparagine (D326N, D323N, E327N) within this CD motif resulted in the loss of binding of the Slt2^{274–373} fragment to Mkk1 (Palacios et al. 2011), indicating the implication of these acidic residues in such interaction. However, a full-length version of Slt2 carrying the same mutations (Slt2^{CD3}) partially bound to both Mkk1 and Mkk2 (González-Rubio et al. 2021), suggesting that Mkks interact with Slt2 not only through the CD site but in a multivalent way. Moreover, mutation of both hydrophobic residues (L20, L22) of the $\phi X \phi$ (LXL) signature of a D-motif found in Mkk2 eliminated the Mkk2-Slt2 interaction in two-hybrid experiments and reduced the functionality of Mkk2 (Jimenez-Sanchez et al. 2007), suggesting that hydrophobic interactions are likely to play also an important role in the interaction of Mkks with the Slt2 CD domain.

Interaction of Slt2 with the transcription factor Rlm1 seems to involve quite the same determinants as with Mkks. Mutation of the hydrophobic residues of the Rlm1 D-site (L324A, V326A) or (I328, P329) resulted in defectiveness for cell wall stress-induced transcriptional activation, suggesting that these mutations abolish binding to Slt2 (Jung et al. 2002). Since Slt2^{CD3} is still able to signal to Rlm1 (González-Rubio et al. 2021), hydrophobic interactions are likely to be the most relevant for binding to this transcription factor. It is important to note that these auxiliary docking surfaces are essential for MAPKs to recognize their substrates since this function is not carried out by the catalytic site. Besides, substrates can facilitate catalysis by using these MAPK docking sites to increase the effective local concentration of their phosphorylation sequences (Ser/Thr-Pro motif) near the active site of the MAPK (Rainey et al. 2005).

The CD domain of MAPKs is critical for binding of ERK to MKPs (Gonzalez-Rubio et al. 2019; Tanoue et al. 2002). In accordance, the binding of yeast mating MAPKs Fus3 and Kss1 with DSP Msg5 involves their CD domains and D-motif, respectively. In contrast, the interaction of Slt2 with Msg5 occurs in a CD domain and D-motif-independent manner (Palacios et al. 2011). A novel motif (IYT) conserved in fungal MKPs was found to mediate the binding of Msg5 and its paralog Sdp1 to Slt2, as well as of MKP Pmp1 to the CWI MAPK counterpart Pmk1 in the evolutionarily distant yeast *S. pombe* (Sacristán-Reviriego et al. 2014). An Slt2 region spanning amino acids 274–373 was revealed to mediate the interaction with Msg5 (Palacios et al. 2011), although the

precise motifs of the MAPK involved in this binding are still obscure.

How to self-control: the C-terminal tail

MAPKs differ from other protein kinases in possessing a non-catalytic C-terminal segment with key residues and motifs essential for their functionality, which are conserved across diverse MAPK subfamilies. The conserved residues are localized in two specific structures, named the L16 loop, where the CD domain resides, and the α L16 helix (Nguyen et al. 2015). Besides these two L16-conserved sections, which correspond to residues 321–341 and 342–358, respectively, Slt2 possesses a characteristic and unique extra C-terminal tail (Fig. 1). Since a truncated version of Slt2 in residue E354 was unable to rescue *slt2 Δ* growth in the presence of caffeine, while truncated proteins in residues Q364 and D394 were fully functional, the conserved regions L16 loop and α L16 seem to be necessary for the functionality of the protein (Levin-Salomon et al. 2009). In the yeast MAPK Hog1, the α L16 region was also found to be vital for the activation upon osmotic stress and autophosphorylation (Maayan et al. 2012; Tatebayashi et al. 2020), confirming the relevance of this part of the protein among different MAPKs.

The extra C-terminal tail of Slt2 is thus dispensable for MAPK biological activity. What then is its functional role? Truncated Slt2 at residue D394 has been reported to become constitutively and highly phosphorylated in yeast cells (Levin-Salomon et al. 2009). Since the removal of the equivalent but shorter extra C-terminal tail from Hog1 also resulted in Hog1 hyperphosphorylation, it seems likely that these yeast MAPK C-terminal extensions play an inhibitory role in autophosphorylation. Supporting this, mammalian MAPKs that lack these C-terminal tails, such as ERK1/2 and p38 α , also became spontaneously phosphorylated when expressed in yeast (Levin-Salomon et al. 2009). The regulatory role of the extended C-terminal region of Slt2 has recently been confirmed by showing that the truncated Slt2 ^{Δ C374} version displayed higher phosphorylation and promoted increased Rlm1-mediated transcriptional activity than full-length Slt2 both at basal and stimulating conditions. Interestingly, high basal activation seems to correspond to hyperphosphorylation on T190 but not on Y192, suggesting that the autophosphorylation of Slt2, which is regulated by the extra C-terminal tail, occurs in the threonine of the activation loop (González-Rubio et al. 2021).

Partially overlapping with α L16, the extra C-terminal tail of Slt2 includes a glutamine-rich region (7 Gln out of 27 amino acids), followed by a 16 polyglutamine tract (Fig. 1). Since polyglutamine domains were described

to have a role in transcriptional activation (Emili et al. 1994), this region was initially expected to be involved in Slt2 transcriptional activity. As predicted, an Slt2 fragment spanning from amino acid 323 to 484 (including both glutamine enriched regions) showed transcriptional activity in one-hybrid assays (Soler et al. 1995). Further analyses revealed the existence of at least two neighboring transcriptional activation domains, spanning amino acids 274–329 and 347–374, the latter including the glutamine-rich region (Fig. 1). Both domains were shown to operate independently, and the polyglutamine tract located just after the glutamine-rich region proved to be dispensable for this transcriptional activation function. Additionally, the 347–374 tract, which partially includes the α L16 structure, was suggested to be implicated in the self-association of Slt2 (Kim et al. 2007). Interestingly, several residues of the α L16 of Erk2 are necessary for the homodimerization of this mammalian MAPK (Khokhlatchev et al. 1998).

Erk5, the purported human ortholog of Slt2 (Truman et al. 2006), also contains an extended and characteristic C-terminal tail, which is involved in diverse regulatory mechanisms. The C-terminal part of Erk5 differs from the Slt2 one in the presence of proline-rich regions and the absence of glutamine-rich tracts. Similar to that of Slt2, the C-terminal extension of Erk5 was proved to contain a transcriptional activation domain (Kasler et al. 2000) and to inhibit its autophosphorylation (Buschbeck and Ullrich 2005). Beyond these two regulatory functions, the C-terminal tail of Erk5 is also essential for the nuclear-cytoplasmic shuttling of the MAPK. Accordingly, a nuclear localization signal (NLS) and a nuclear export signal (NES) were identified in this region, leading to nuclear accumulation when Erk5 is activated and cytosolic localization when dephosphorylated (Buschbeck and Ullrich 2005; Kondoh et al. 2006; Yan et al. 2001). Also, a considerable number of phosphorylated residues within this region of Erk5 that regulate its function have been identified (Díaz-Rodríguez and Pandiella 2010; Honda et al. 2015; Iñesta-Vaquera et al. 2010; Morimoto et al. 2007; Pearson et al. 2020), encouraging the search for new regulatory phosphorylation sites in the extra C-terminal tail of Slt2.

Concluding remarks

The growing knowledge of the budding yeast Slt2 MAPK in the last 30 years reflects the interest and relevance of this line of investigation not only for fungal researchers but for every scientist whose work is focused on signal transduction whatever the organism used, including humans. Conservation of MAPK pathways allows the fruitful exchange of information, techniques, innovative strategies for system and synthetic biology, as well as drug discovery among

worldwide signaling researchers. The CWI pathway has become one of the paradigmatic MAPK routes, and its essentiality for yeast integrity has made it an excellent target for antifungal development. Although many aspects of SlT2 functionality have been discovered to date, other issues remain to be addressed, such as the molecular mechanisms governing its subcellular localization, the existence of novel regulatory post-translational modifications, or the identification of proteins targeted by SlT2 to accomplish functions not directly related to cell wall maintenance. These and other new challenges must be tackled in the coming years to have a complete picture of this model MAPK.

Acknowledgements We wish to dedicate this article to the memory of Dr. Miguel Sánchez, who enthusiastically devoted his passion and effort to the identification and characterization of this protein kinase. We thank César Nombela for his support and colleagues from Unit 3 of the Departamento de Microbiología y Parasitología at UCM for their useful comments and discussions. We also thank Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Spain) (grant PID2019-105342GB-I00), and Comunidad de Madrid (Spain) and European Structural and Investment Funds (grant S2017/BMD-3691 InGEMICS-CM) for funding, and the Universidad Complutense de Madrid (Spain) and Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Spain), for supporting G.G.-R. and A.S.-M. predoctoral contracts.

Author contributions All authors, Gema González-Rubio, Ángela Sellers-Moya, Humberto Martín, and María Molina, contributed to conceiving and designing the study and writing of the paper.

Funding Grant PID2019-105342 GB-I00 from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Spain), to M.M., and grant S2017/BMD-3691 (InGEMICS-CM) from the Comunidad de Madrid (Spain) and European Structural and Investment Funds to M.M.

Data availability Not applicable.

Code availability Not applicable.

Declarations

Ethics approval and consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

References

- Ahn NG, Seger R, Bratlien RL, Diltz CD, Tonks NK, Krebs EG (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule-associated protein 2 kinase. *J Biol Chem* 266:4220–4227
- Akella R, Moon TM, Goldsmith EJ (2008) Unique MAP Kinase binding sites. *Biochim Biophys Acta* 1784:48–55. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2007.09.016>
- Albuquerque CP, Smolka MB, Payne SH, Bafna V, Eng J, Zhou H (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 7:1389–1396. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700468-MCP200>
- Alonso-Rodríguez E, Fernandez-Pinar P, Sacristan-Reviriego A, Molina M, Martín H (2016) An analog-sensitive version of the protein kinase SlT2 allows identification of novel targets of the yeast cell wall integrity pathway. *J Biol Chem* 291:5461–5472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683680>
- Anderson NG, Maller JL, Tonks NK, Sturgill TW (1990) Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* 343:651–653. <https://doi.org/10.1038/343651a0>
- Aoki K, Yamada M, Kunida K, Yasuda S, Matsuda M (2011) Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108:12675–12680. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104030108>
- Askari N, Beenstock J, Livnah O, Engelberg D (2009) p38alpha is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at threonine 180. *Biochemistry* 48:2497–2504. <https://doi.org/10.1021/bi900024v>
- Avruch J (2007) MAP kinase pathways: the first twenty years. *Biochim Biophys Acta* 1773:1150–1160. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.006>
- Ball KA, Johnson JR, Lewinski MK, Guatelli J, Verschueren E, Krogan NJ, Jacobson MP (2016) Non-degradative ubiquitination of protein kinases. *PLoS Comput Biol* 12:e1004898. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004898>
- Bardwell L, Cook JG, Voora D, Baggott DM, Martinez AR, Thorner J (1998) Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev* 12:2887–2898. <https://doi.org/10.1101/gad.12.18.2887>
- Bell M, Engelberg D (2003) Phosphorylation of Tyr-176 of the yeast MAPK Hog1/p38 is not vital for Hog1 biological activity. *J Biol Chem* 278:14603–14606. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300006200>
- Boulton TG, Yancopoulos GD, Gregory JS, Slaughter C, Moomaw C, Hsu J, Cobb MH (1990) An insulin-stimulated protein kinase similar to yeast kinases involved in cell cycle control. *Science* 249:64–67. <https://doi.org/10.1126/science.2164259>
- Buschbeck M, Ullrich A (2005) The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J Biol Chem* 280:2659–2667. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412599200>
- Cabib E, Duran A (1975) Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at nonpermissive temperatures. *J Bacteriol* 124:1604–1606. <https://doi.org/10.1128/jb.124.3.1604-1606.1975>
- Cargnello M, Roux PP (2011) Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 75:50–83. <https://doi.org/10.1128/mbr.00031-10>
- Chang CI, Xu BE, Akella R, Cobb MH, Goldsmith EJ (2002) Crystal structures of MAP kinase p38 complexed to the docking sites on its nuclear substrate MEF2A and activator MKK3b. *Mol Cell* 9:1241–1249. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00525-7](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00525-7)
- Coulombe P, Meloche S (2007) Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim Biophys Acta* 1773:1376–1387. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2006.11.001>
- Courchesne WE, Kunisawa R, Thorner J (1989) A putative protein kinase overcomes pheromone-induced arrest of cell cycling in *S. cerevisiae*. *Cell* 58:1107–1119. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90509-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90509-6)

- Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE, Gustin MC (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* 270:30157–30161. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.30157>
- Day AM, Veal EA (2010) Hydrogen peroxide-sensitive cysteines in the Sty1 MAPK regulate the transcriptional response to oxidative stress. *J Biol Chem* 285:7505–7516. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.040840>
- Díaz-Rodríguez E, Pandiella A (2010) Multisite phosphorylation of Erk5 in mitosis. *J Cell Sci* 123:3146–3156. <https://doi.org/10.1242/jcs.070516>
- Du Y, Walker L, Novick P, Ferro-Novick S (2006) Ptc1p regulates cortical ER inheritance via Slt2p. *Embo J* 25:4413–4422. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601319>
- Ebisuya M, Kondoh K, Nishida E (2005) The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J Cell Sci* 118:2997–3002. <https://doi.org/10.1242/jcs.02505>
- Elion EA, Grisafi PL, Fink GR (1990) FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* 60:649–664. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90668-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90668-5)
- Emili A, Greenblatt J, Ingles CJ (1994) Species-specific interaction of the glutamine-rich activation domains of Sp1 with the TATA box-binding protein. *Mol Cell Biol* 14:1582–1593. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.3.1582>
- English JG, Shellhammer JP, Malahe M, McCarter PC, Elston TC, Dohlman HG (2015) MAPK feedback encodes a switch and timer for tunable stress adaptation in yeast. *Sci Signal* 8:ra5. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2005774>
- Erazo T, Espinosa-Gil S, Diéguez-Martínez N, Gómez N, Lizcano JM (2020) SUMOylation is required for ERK5 nuclear translocation and ERK5-mediated cancer cell proliferation. *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21062203>
- Flández M, Cosano IC, Nombela C, Martín H, Molina M (2004) Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 279:11027–11034. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306412200>
- Garai Á, Zeke A, Gógl G, Törő I, Fördős F, Blankenburg H, Bárkai T, Varga J, Alexa A, Emig D, Albrecht M, Reményi A (2012) Specificity of linear motifs that bind to a common mitogen-activated protein kinase docking groove. *Sci Signal* 5:ra74. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2003004>
- Gonzalez-Rubio G, Fernandez-Acero T, Martín H, Molina M (2019) Mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in fungal signaling: conservation, function, and regulation. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20071709>
- González-Rubio G, Sellers-Moya Á, Martín H, Molina M (2021) Differential role of threonine and tyrosine phosphorylation in the activation and activity of the yeast MAPK Slt2. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22031110>
- Hanks SK, Hunter T (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 9:576–596
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T (1988) The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science* 241:42–52. <https://doi.org/10.1126/science.3291115>
- Hemmer W, McGlone M, Tsigelny I, Taylor SS (1997) Role of the glycine triad in the ATP-binding site of cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 272:16946–16954. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.27.16946>
- Herrero-de-Dios C, Day AM, Tillmann AT, Kastora SL, Stead D, Salgado PS, Quinn J, Brown AJP (2018) Redox regulation, rather than stress-induced phosphorylation, of a Hog1 mitogen-activated protein kinase modulates its nitrosative-stress-specific outputs. *mBio* 9. <https://doi.org/10.1128/mBio.02229-17>
- Hertz NT, Wang BT, Allen JJ, Zhang C, Dar AC, Burlingame AL, Shokat KM (2010) Chemical genetic approach for kinase-substrate mapping by covalent capture of thiophosphopeptides and analysis by mass spectrometry. *Curr Protoc Chem Biol* 2:15–36. <https://doi.org/10.1002/9780470559277.ch090201>
- Honda T, Obara Y, Yamauchi A, Couvillon AD, Mason JJ, Ishii K, Nakahata N (2015) Phosphorylation of ERK5 on Thr732 is associated with ERK5 nuclear localization and ERK5-dependent transcription. *PLoS One* 10:e0117914. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117914>
- Iñesta-Vaquera FA, Campbell DG, Tournier C, Gómez N, Lizcano JM, Cuenda A (2010) Alternative ERK5 regulation by phosphorylation during the cell cycle. *Cell Signal* 22:1829–1837. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.07.010>
- Irie K, Takase M, Lee KS, Levin DE, Araki H, Matsumoto K, Oshima Y (1993) MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 13:3076–3083. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.5.3076>
- Jacoby JJ, Nilius SM, Heinisch JJ (1998) A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Genet* 258:148–155. <https://doi.org/10.1007/s004380050717>
- Jimenez-Gutierrez E, Alegria-Carrasco E, Sellers-Moya A, Molina M, Martín H (2020) Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int Microbiol* 23:107–119. <https://doi.org/10.1007/s10123-019-00092-2>
- Jimenez-Sanchez M, Cid VJ, Molina M (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 282:31174–31185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706270200>
- Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996) Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* 85:149–158. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81092-2](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81092-2)
- Jung US, Sobering AK, Romeo MJ, Levin DE (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* 46:781–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03198.x>
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9:1559–1571. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1559>
- Kamada Y, Qadota H, Python CP, Anraku Y, Ohya Y, Levin DE (1996) Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem* 271:9193–9196. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.16.9193>
- Kamps MP, Taylor SS, Sefton BM (1984) Direct evidence that oncogenic tyrosine kinases and cyclic AMP-dependent protein kinase have homologous ATP-binding sites. *Nature* 310:589–592. <https://doi.org/10.1038/310589a0>
- Kasler HG, Victoria J, Duramad O, Winoto A (2000) ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol Cell Biol* 20:8382–8389. <https://doi.org/10.1128/mcb.20.22.8382-8389.2000>
- Ketela T, Green R, Bussey H (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* 181:3330–3340. <https://doi.org/10.1128/jb.181.11.3330-3340.1999>
- Keyes JD, Parsonage D, Yammani RD, Rogers LC, Kesty C, Furduliu CM, Nelson KJ, Poole LB (2017) Endogenous, regulatory cysteine sulfenylation of ERK kinases in response to proliferative signals. *Free Radic Biol Med* 112:534–543. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.08.018>
- Khokhlatchev AV, Canagarajah B, Wilsbacher J, Robinson M, Atkinson M, Goldsmith E, Cobb MH (1998) Phosphorylation of the

- MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell* 93:605–615. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81189-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81189-7)
- Kim KY, Levin DE (2010) Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast* 27:541–548. <https://doi.org/10.1002/yea.1782>
- Kim KY, Cosano IC, Levin DE, Molina M, Martin H (2007) Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast* 24:335–342. <https://doi.org/10.1002/yea.1475>
- Kim KY, Truman AW, Levin DE (2008) Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* 28:2579–2589. <https://doi.org/10.1128/mcb.01795-07>
- Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Takiyama K, Koike T (2006) Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol Cell Proteomics* 5:749–757. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500024-MCP200>
- Knighton DR, Zheng JH, Ten Eyck LF, Ashford VA, Xuong NH, Taylor SS, Sowadski JM (1991) Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase. *Science* 253:407–414. <https://doi.org/10.1126/science.1862342>
- Kondoh K, Terasawa K, Morimoto H, Nishida E (2006) Regulation of nuclear translocation of extracellular signal-regulated kinase 5 by active nuclear import and export mechanisms. *Mol Cell Biol* 26:1679–1690. <https://doi.org/10.1128/mcb.26.5.1679-1690.2006>
- Kornev AP, Taylor SS (2010) Defining the conserved internal architecture of a protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1804:440–444. <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2009.10.017>
- Kuravi VK, Kurischko C, Puri M, Luca FC (2011) Cbk1 kinase and Bck2 control MAP kinase activation and inactivation during heat shock. *Mol Biol Cell* 22:4892–4907. <https://doi.org/10.1091/mbc.E11-04-0371>
- Lai S, Pelech S (2016) Regulatory roles of conserved phosphorylation sites in the activation T-loop of the MAP kinase ERK1. *Mol Biol Cell* 27:1040–1050. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-07-0527>
- Lanz MC, Yugandhar K, Gupta S, Sanford EJ, Faça VM, Vega S, Joiner AMN, Fromme JC, Yu H, Smolka MB (2021) In-depth and 3-dimensional exploration of the budding yeast phosphoproteome. *EMBO Rep* 22:e51121. <https://doi.org/10.15252/embr.202051121>
- Lee KS, Levin DE (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* 12:172–182. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.1.172>
- Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol* 13:3067–3075. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.5.3067>
- Lee T, Hoofnagle AN, Kabuyama Y, Stroud J, Min X, Goldsmith EJ, Chen L, Resing KA, Ahn NG (2004) Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell* 14:43–55. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(04\)00161-3](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(04)00161-3)
- Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189:1145–1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
- Levin DE, Bartlett-Heubusch E (1992) Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol* 116:1221–1229. <https://doi.org/10.1083/jcb.116.5.1221>
- Levin-Salomon V, Maayan I, Avrahami-Moyal L, Marbach I, Livnah O, Engelberg D (2009) When expressed in yeast, mammalian mitogen-activated protein kinases lose proper regulation and become spontaneously phosphorylated. *Biochem J* 417:331–340. <https://doi.org/10.1042/BJ20081335>
- Lopez MS, Kliegman JI, Shokat KM (2014) The logic and design of analog-sensitive kinases and their small molecule inhibitors. *Methods Enzymol* 548:189–213. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-397918-6.00008-2>
- Lorenz K, Schmitt JP, Schmitteckert EM, Lohse MJ (2009) A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 15:75–83. <https://doi.org/10.1038/nm.1893>
- Maayan I, Beenstock J, Marbach I, Tabachnick S, Livnah O, Engelberg D (2012) Osmostress induces autophosphorylation of Hog1 via a C-terminal regulatory region that is conserved in p38alpha. *PLoS One* 7:e44749. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044749>
- Mao K, Klionsky DJ (2011) MAPKs regulate mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* 7:1564–1565. <https://doi.org/10.4161/auto.7.12.17971>
- Martín H, Arroyo J, Sánchez M, Molina M, Nombela C (1993) Activity of the yeast MAP kinase homologue Slr2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol Gen Genet* 241:177–184. <https://doi.org/10.1007/bf00280215>
- Martín H, Castellanos MC, Cenamor R, Sánchez M, Molina M, Nombela C (1996) Molecular and functional characterization of a mutant allele of the mitogen-activated protein-kinase gene SLR2(MPK1) rescued from yeast autolytic mutants. *Curr Genet* 29:516–522. <https://doi.org/10.1007/bf02426955>
- Martín H, Rodríguez-Pachón JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275:15111–15119. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.15111>
- Martín H, Flández M, Nombela C, Molina M (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* 58:6–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04822.x>
- Mascaraque V, Hernaez ML, Jimenez-Sanchez M, Hansen R, Gil C, Martin H, Cid VJ, Molina M (2013) Phosphoproteomic analysis of protein kinase C signaling in *Saccharomyces cerevisiae* reveals Slr2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent phosphorylation of eisosome core components. *Mol Cell Proteomics* 12:557–574. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.020438>
- Morimoto H, Kondoh K, Nishimoto S, Terasawa K, Nishida E (2007) Activation of a C-terminal transcriptional activation domain of ERK5 by autophosphorylation. *J Biol Chem* 282:35449–35456. <https://doi.org/10.1074/jbc.M704079200>
- Morrison DK (2012) MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Nagiec MJ, McCarter PC, Kelley JB, Dixit G, Elston TC, Dohlman HG (2015) Signal inhibition by a dynamically regulated pool of monophosphorylated MAPK. *Mol Biol Cell* 26:3359–3371. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-01-0037>
- Nguyen T, Ruan Z, Oruganty K, Kannan N (2015) Co-conserved MAPK features couple D-domain docking groove to distal allosteric sites via the C-terminal flanking tail. *PLoS One* 10:e0119636. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119636>
- Palacios L, Dickinson RJ, Sacristan-Reviriego A, Didmon MP, Marin MJ, Martin H, Keyse SM, Molina M (2011) Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 286:42037–42050. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.286948>
- Patwardhan P, Miller WT (2007) Processive phosphorylation: mechanism and biological importance. *Cell Signal* 19:2218–2226. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.06.006>
- Pearson AJ, Fullwood P, Toro Tapia G, Prise I, Smith MP, Xu Q, Jordan A, Giurisato E, Whitmarsh AJ, Francavilla C, Tournier C

- (2020) Discovery of a gatekeeper residue in the C-terminal tail of the extracellular signal-regulated protein kinase 5 (ERK5). *Int J Mol Sci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21030929>
- Queralt E, Igual JC (2005) Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171:1485–1498. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.045005>
- Rainey MA, Callaway K, Barnes R, Wilson B, Dalby KN (2005) Proximity-induced catalysis by the protein kinase ERK2. *J Am Chem Soc* 127:10494–10495. <https://doi.org/10.1021/ja052915p>
- Reikhardt BA, Shabanov PD (2020) Catalytic subunit of PKA as a prototype of the eukaryotic protein kinase family. *Biochemistry (mosc)* 85:409–424. <https://doi.org/10.1134/s0006297920040021>
- Roskoski R Jr (2012) ERK1/2 MAP kinases: structure, function, and regulation. *Pharmacol Res* 66:105–143. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2012.04.005>
- Rossomando AJ, Payne DM, Weber MJ, Sturgill TW (1989) Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:6940–6943. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.18.6940>
- Sacristán-Reviriego A, Madrid M, Cansado J, Martín H, Molina M (2014) A conserved non-canonical docking mechanism regulates the binding of dual specificity phosphatases to cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in budding and fission yeasts. *PLoS One* 9:e85390. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085390>
- Sanz AB, García R, Rodríguez-Peña JM, Arroyo J (2017) The CWI pathway: regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. *J Fungi (Basel)* 4. <https://doi.org/10.3390/jof4010001>
- Serrano R, Martín H, Casamayor A, Ariño J (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slr2 MAPK pathway. *J Biol Chem* 281:39785–39795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604497200>
- Sheridan DL, Kong Y, Parker SA, Dalby KN, Turk BE (2008) Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem* 283:19511–19520. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801074200>
- Soler M, Plovins A, Martín H, Molina M, Nombela C (1995) Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slr2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol* 17:833–842. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17050833.x
- Sturgill TW, Ray LB (1986) Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 134:565–571. [https://doi.org/10.1016/s0006-291x\(86\)80457-0](https://doi.org/10.1016/s0006-291x(86)80457-0)
- Sugden PH, Markou T, Fuller SJ, el Tham L, Molkentin JD, Paterson HF, Clerk A (2011) Monophosphothreonyl extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) are formed endogenously in intact cardiac myocytes and are enzymically active. *Cell Signal* 23:468–477. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2010.10.024>
- Swaney DL, Beltrao P, Starita L, Guo A, Rush J, Fields S, Krogan NJ, Villén J (2013) Global analysis of phosphorylation and ubiquitylation cross-talk in protein degradation. *Nat Methods* 10:676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2519>
- Tanoue T, Nishida E (2002) Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol Ther* 93:193–202. [https://doi.org/10.1016/s0163-7258\(02\)00188-2](https://doi.org/10.1016/s0163-7258(02)00188-2)
- Tanoue T, Adachi M, Moriguchi T, Nishida E (2000) A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat Cell Biol* 2:110–116. <https://doi.org/10.1038/35000065>
- Tanoue T, Yamamoto T, Nishida E (2002) Modular structure of a docking surface on MAPK phosphatases. *J Biol Chem* 277:22942–22949. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202096200>
- Tatebayashi K, Yamamoto K, Tomida T, Nishimura A, Takayama T, Oyama M, Kozuka-Hata H, Adachi-Akahane S, Tokunaga Y, Saito H (2020) Osmostress enhances activating phosphorylation of Hog1 MAP kinase by mono-phosphorylated Pbs2 MAP2K. *EMBO J* 39:e103444. <https://doi.org/10.15252/embj.2019103444>
- Tatjer L, Sacristán-Reviriego A, Casado C, González A, Rodríguez-Porrata B, Palacios L, Canadell D, Serra-Cardona A, Martín H, Molina M, Ariño J (2016) Wide-ranging effects of the yeast Ptc1 protein phosphatase acting through the MAPK kinase Mkk1. *Genetics* 202:141–156. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.183202>
- Taylor SS, Keshwani MM, Steichen JM, Kornev AP (2012) Evolution of the eukaryotic protein kinases as dynamic molecular switches. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 367:2517–2528. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0054>
- Thapa D, Nichols C, Bassi R, Martin ED, Verma S, Conte MR, De Santis V, De Nicola GF, Marber MS (2018) TAB1-induced auto-activation of p38 α mitogen-activated protein kinase is crucially dependent on threonine 185. *Mol Cell Biol* 38. <https://doi.org/10.1128/mcb.00409-17>
- Torkamani A, Kannan N, Taylor SS, Schork NJ (2008) Congenital disease SNPs target lineage specific structural elements in protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9011–9016. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802403105>
- Torres L, Martín H, García-Saez MI, Arroyo J, Molina M, Sánchez M, Nombela C (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol* 5:2845–2854. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1991.tb01993.x>
- Torres J, Di Como CJ, Herrero E, De La Torre-Ruiz MA (2002) Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* 277:43495–43504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205408200>
- Truman AW, Millson SH, Nuttall JM, King V, Mollapour M, Prodromou C, Pearl LH, Piper PW (2006) Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slr2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* 5:1914–1924. <https://doi.org/10.1128/ec.00263-06>
- Truman AW, Kim KY, Levin DE (2009) Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29:6449–6461. <https://doi.org/10.1128/mcb.00794-09>
- Vazquez B, Soto T, del Dedo JE, Franco A, Vicente J, Hidalgo E, Gacto M, Cansado J, Madrid M (2015) Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast. *Cell Signal* 27:2534–2542. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2015.09.017>
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13804–13809. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13804>
- Vilella F, Herrero E, Torres J, de la Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem* 280:9149–9159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411062200>
- Weinmaster G, Zoller MJ, Pawson T (1986) A lysine in the ATP-binding site of P130gag-fps is essential for protein-tyrosine kinase activity. *EMBO J* 5:69–76

- Winters MJ, Pryciak PM (2018) Analysis of the thresholds for transcriptional activation by the yeast MAP kinases Fus3 and Kss1. *Mol Biol Cell* 29:669–682. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-10-0578>
- Xu C, Liu R, Zhang Q, Chen X, Qian Y, Fang W (2017) The diversification of evolutionarily conserved MAPK cascades correlates with the evolution of fungal species and development of lifestyles. *Genome Biol Evol* 9:311–322. <https://doi.org/10.1093/gbe/evw051>
- Yan C, Luo H, Lee JD, Abe J, Berk BC (2001) Molecular cloning of mouse ERK5/BMK1 splice variants and characterization of ERK5 functional domains. *J Biol Chem* 276:10870–10878. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009286200>
- Yang J, Garrod SM, Deal MS, Anand GS, Woods VL Jr, Taylor S (2005) Allosteric network of cAMP-dependent protein kinase revealed by mutation of Tyr204 in the P+1 loop. *J Mol Biol* 346:191–201. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.11.030>
- Zeke A, Bastys T, Alexa A, Garai Á, Mészáros B, Kirsch K, Dosztányi Z, Kalinina OV, Reményi A (2015) Systematic discovery of linear binding motifs targeting an ancient protein interaction surface on MAP kinases. *Mol Syst Biol* 11:837. <https://doi.org/10.15252/msb.20156269>
- Zhang YY, Mei ZQ, Wu JW, Wang ZX (2008) Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. *J Biol Chem* 283:26591–26601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801703200>
- Zhou B, Zhang ZY (2002) The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by differential phosphorylation in the activation loop. *J Biol Chem* 277:13889–13899. <https://doi.org/10.1074/jbc.M200377200>
- Zoller MJ, Taylor SS (1979) Affinity labeling of the nucleotide binding site of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase using p-fluorosulfonyl-[14C]benzoyl 5'-adenosine. Identification of a modified lysine residue. *J Biol Chem* 254:8363–8368

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Not just the wall: the other ways to turn the yeast CWI pathway on

Elena Jiménez-Gutiérrez¹ · Estíbaliz Alegría-Carrasco¹ · Ángela Sellers-Moya¹ · María Molina¹ · Humberto Martín¹ 

Received: 14 June 2019 / Revised: 10 July 2019 / Accepted: 11 July 2019
© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

The *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity (CWI) pathway took this name when its role in the cell response to cell wall aggressions was clearly established. The receptors involved in sensing the damage, the relevant components operating in signaling to the MAPK Slt2, the transcription factors activated by this MAPK, as well as some key regulatory mechanisms have been identified and characterized along almost 30 years. However, other stimuli that do not alter specifically the yeast cell wall, including protein unfolding, low or high pH, or plasma membrane, oxidative and genotoxic stresses, have been also found to trigger the activation of this pathway. In this review, we compile almost forty non-cell wall-specific compounds or conditions, such as tunicamycin, hypo-osmotic shock, diamide, hydroxyurea, arsenate, and rapamycin, which induce these stresses. Relevant aspects of the CWI-mediated signaling in the response to these non-conventional pathway activators are discussed. The data presented here highlight the central and key position of the CWI pathway in the safeguard of yeast cells to a wide variety of external aggressions.

Keywords Yeast cell wall · CWI pathway · Slt2 · MAPK · Stress response

Introduction

Saccharomyces cerevisiae has to deal with numerous and different stress conditions in its natural environment. Signal transduction pathways mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are one of the main mechanisms used by yeast cells to adequately respond to external stimuli in order to adapt and survive (Chen and Thomer 2007). MAPK signaling pathways share a common structure in all eukaryotic cells, from yeast to human, including a central module of three protein kinases acting like a phosphorylation cascade: the MAPKKK (MAPK kinase kinase), the MAPKK (MAPK kinase), and the MAPK. This module is activated by upstream components, such as kinases of the PAK or PKC family and small and/or heterotrimeric GTPases, which receive and

transmit the external signal from a receptor/sensor located at the plasma membrane (Morrison 2012).

Among the MAPK routes existing in *S. cerevisiae*, the cell wall integrity (CWI) pathway is mainly involved in maintaining the stability of the cell wall against aggressions that threaten this essential superficial structure (Levin 2011). To detect disturbances in the cell wall, this pathway possesses a set of membrane-spanning mechanosensors, namely Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2, and Mtl1, with a nanospring-like extracellular region expanding into the wall (Jendretzki et al. 2011). These sensors activate the Rho1 GTPase, preferentially through the GDP/GTP exchange factor (GEF) Rom2 to which they interact with their cytoplasmic tails. There are two other Rho1 GEFs, Rom1 and Tus1. The former is functionally redundant to Rom2, but with Rom2 being the major isoenzyme, whereas the latter is responsible for the cell cycle-specific activation of Rho1 (Krause et al. 2012). Rho1 activity is negatively regulated by four GTPase-activating proteins (GAPs), Bem2, Sac7, Bag7, and Lrg1, being Bem2 and Sac7 the Rho1 GAPs mainly involved in downregulating the CWI pathway in response to cell wall stress (Martin et al. 2000). Activated Rho1 interacts with Pkc1 (Heinisch and Rodicio 2018), which triggers the phosphorylation cascade composed by the MAPKKK Bck1, the two MAPKKs Mkk1 and Mkk2, and the downstream MAPK Slt2 (Fig. 1). Once dually phosphorylated on the threonine and tyrosine at its activation loop, Slt2

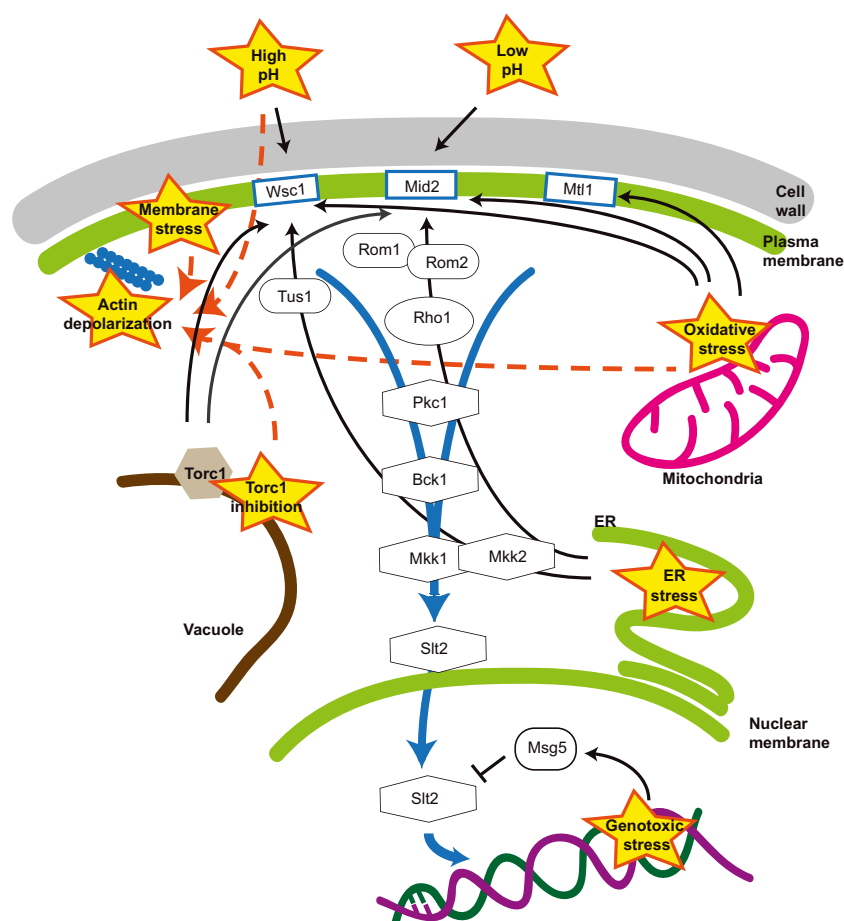
Elena Jiménez-Gutiérrez, Estíbaliz Alegría-Carrasco and Ángela Sellers-Moya contributed equally to this work.

✉ María Molina
molmifa@ucm.es

✉ Humberto Martín
humberto@ucm.es

¹ Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid (IRICIS), Pza. Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain

Fig. 1 Schematic overview of the *S. cerevisiae* CWI pathway, highlighting the distinct stresses that trigger MAPK activation and the receptors involved in the response. Black arrows indicate the primary cellular sensor/target of the stress. Broken orange arrows show interconnections between different stresses



activates transcription factors Rlm1 and SBF complex (consisting of Swi4 and Swi6), which regulate the expression of a set of genes involved in cell wall construction in order to repair the damage at the cell surface (Sanz et al. 2017).

Essentiality of *RHO1* gene and the strong phenotype of *pkc1* deletion mutants indicate that there are other targets of Rho1 and Pkc1 than those mediating CWI signaling, since the elimination of either *BCK1*, both *MKK1* and *MKK2*, or *SLT2* gives rise to viable cells that grow normally in the absence of cell wall stress. Mutants in these components of the MAPK cascade share similar conditional cell wall-defective phenotypes, such as sorbitol-remediable high sensitivity to cell wall-altering compounds or enzymes (Calcofluor white, Congo Red, Caspofungin, Zymolyase, etc) (Levin 2011). Consistent with its importance in survival under cell wall stress, the CWI pathway becomes activated under treatment with these compounds. Although most of the knowledge accumulated along the years on the CWI pathway has to do with its major role in responding to cell wall damaging conditions, induction of CWI signaling by other stresses not apparently related to the cell wall has also been reported. Rapamycin, alkaline pH, cadmium, and genotoxic or oxidative stresses are some of the diverse stimuli described for this pathway. Many aspects about the way each of them activate signaling,

the CWI components involved in sensing and transmitting the signal or the nature of the elicited response still remain unknown. Moreover, apart from Rlm1 and SBF, other Slit2 targets have been identified, such as silencing protein Sir3, PKA subunit Bcy1, cell cycle regulators Sic1 and cyclin C, mRNA-binding protein Nab2, calcineurin regulator Rcn2, translation repressor Caf20, and Golgi protein Gga1 (Alonso-Rodriguez et al. 2016). All this evidence indicates the involvement of Slit2 in multiple cellular responses other than cell wall remodeling. The aim of this article is to provide an overview of the variety of stimuli distinct from the classical cell wall stress that activate the CWI pathway (Table 1) and the current knowledge on sensing mechanisms and elicited cell responses.

The endoplasmic reticulum stress is connected with the CWI pathway

The unfolded protein response (UPR) pathway responds to an increase in the level of unfolded proteins within the endoplasmic reticulum (ER). This pathway, which connects the ER with the nucleus, is essential for checking the protein quality along the protein secretion process. In the presence of unfolded proteins, the sensor Ire1 turns on its RNase activity, which

Table 1 Non-cell wall-specific stimuli that trigger the activation of the CWI pathway

Stress type	Agent/stimulus	Involved sensors	Monitored readout	Prevention by osmotic stabilization	Actin depolarization	References
Protein unfolding	Tunicamycin	Wsc1	<i>MPK1-LacZ</i> expression P-Slt2	Sensitivity: No		(Bonilla and Cunningham 2003) (Chen et al. 2005) (Babour et al. 2010) (Rousseau and Bertolotti 2016)
	DTT		<i>PTP2p-GFP</i> expression P-Slt2			(Mizuno et al. 2018; Chen et al. 2005)
	β -mercaptoethanol		P-Slt2			(Chen et al. 2005)
	Phytosphingosine (PHS)		P-Slt2 Septin delocalization (ERSU pathway)			(Pina et al. 2018)
Low pH	Hydrochloric acid to pH 2.8	Mid2	<i>PST1p-LACZ</i> Phospho-Slt2	Sensitivity: yes Activation: no		(Claret et al. 2005)
High pH	35mM KOH pH 8.2/ 50 mM Tris pH 8.3 buffered media	Wsc1	P-Slt2	Sensitivity: yes Activation: yes (attenuation)	No	(Serrano et al. 2006) (Kwon et al. 2016)
	Pn-AMP1 (a small cationic Cys/Arg-rich antimicrobial peptide)	Wsc1	Sensitivity			(Kwon et al. 2016)
Plasma membrane stress	Compressive mechanostress (7 psi pressure)	Mid2	Pkc1-GFP translocation to the plasma membrane			(Mishra et al. 2017)
	Compressive mechanostress (0.4 MPa pressure)	Mid2	Pkc1-GFP translocation to the plasma membrane & Nuclear delocalization of Slt2			(Delarue et al. 2017)
	Hypoosmotic shock		In vitro protein kinase assays P-Tyr Slt2 P-Slt2		Yes	(Kamada et al. 1995) (Davenport et al. 1995) (Hatakeyama et al. 2017)
	SDS		P-Slt2		Yes	(Queralt and Igual 2005) (Delley and Hall 1999)
	Clorpromazine		In vitro protein kinase assays			(Kamada et al. 1995)
	Tea tree oil/ Amphotericin B/ Nystatin		<i>lexA-RLM1-lacZ</i> reporter			(Straede et al. 2007)
	Acetic acid	Wsc1	P-Slt2			(Mollapour and Piper 2006) (Mollapour et al. 2009)
	High temperature	Mid2/Wsc1	<i>In vitro</i> protein kinase assays P-Slt2	Sensitivity: Yes Activation: Yes	Yes	(Kamada et al. 1995) (Verna et al. 1997; Gray et al. 1997)

Table 1 (continued)

						(Martin et al. 2000) (Ketela et al. 1999) (Rajavel et al. 1999) (Mensonides et al. 2005)
	Low temperature	Wsc	P-Slt2	Sensitivity: Yes	No	(Corcoles-Saez et al. 2012)
Oxidative stress	13-hydroperoxylinoleic acid (LoaOOH)		P-Slt2		Yes	(Alic et al. 2003)
	L-Dopa&other catecholamines (adrenaline noradrenaline dopamine)	Wsc1	P2xRLM1-LacZ P-Slt2			(Staleva Hall and Orlow 2004)
	Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Mtl1 Mid2/Wsc 1	P2xRLM1 - LacZ P-Slt2	Phosphorylation : No	Yes	(Staleva Hall and Orlow 2004) (Vilella et al. 2005) (Jin et al. 2013)
	Diamide	Mtl1	P-Slt2 Pkc1-GFP localization	Phosphorylation : Yes	Yes	(Vilella et al. 2005)
	Chloroquine	Wsc1	P-Slt2	Sensitivity: yes (at low dosis of Cloroquine)		(Baranwal et al. 2014)
	Cadmium	Mid2	P-Slt2			(Xiong et al. 2015)
	Zinc-oxide nanoparticles	Wsc1	P-Slt2			(Babele et al. 2018)
	Valproic acid		P-Slt2	Sensitivity No		(Golla Joseph and Tomar 2016)
	Genotoxic stress	Hydroxyurea		P-Slt2	Sensitivity: No Phosphorylation : No	
Methyl methanesulfonate (MMS)			Slt2-GFP abundance and localization P-Slt2	Sensitivity: No Phosphorylation : No		(Bandyopadhyay et al. 2010) (Soriano-Carot et al. 2012) (Liu and Levin 2018)
Phleomycin			P-Slt2	Sensitivity: No Phosphorylation : No		(Soriano-Carot et al. 2012)
UV irradiation			P-Slt2	Sensitivity: No/ Yes (Bryan) Phosphorylation : No		(Bryan et al. 2004) (Soriano-Carot et al. 2012)
8-methoxypsoralen (8-MOP)/UVA			P-Slt2 Slt2 abundance	Sensitivity:Yes		(Dardalhon et al. 2009)
Metalloids	Arsenite [As(III)]		P-Slt2			(Ahmadpour et al. 2016)
	Arsenate [As(V)]		P-Slt2	Sensitivity:Yes		(Matia-Gonzalez and Rodriguez-Gabriel 2011)
TORC1 inhibition	Rapamycin	Mid2/Wsc 1	P-Slt2 Slt2-regulated gene expression <i>In vitro</i> protein kinase assays (Sic1-Thr ¹⁷³ phosphorylation)	Activation: Yes Sensitivity: Yes Actin depolarization: Yes	Yes	(Krause and Gray 2002) (Torres et al. 2002) (Soulard et al. 2010) (Moreno-Torres Jaquenoud and De Virgilio 2015)

Table 1 (continued)

	Caffeine		P-Slt2	Phosphorylation : Yes		(Martin et al. 2000) (Kuranda et al. 2006)
Actin depolymerization	Latrunculin B	No	P-Slt2 Morphogenesis-checkpoint assay	Activation: partial	Yes	(Harrison et al. 2001)
Carbonyl stress	Methyl glyoxal	Neither Wsc1 nor Mid2	P-Slt2		Yes	(Nomura and Inoue 2015)
Others	Quercetin		P-Slt2			(Vilaca et al. 2012)
	Cesium chloride		P-Slt2	Sensitivity: Yes		(Casagrande et al. 2009)
	Sodium Vanadate		P-Slt2	Phosphorylation : Yes		(Martin et al. 2000)
	Ethanol		Slt2-regulated gene expression			(Udom et al. 2019)

specifically removes the intron from the mRNA of the transcription factor gene *HAC1*. This leads to Hac1 efficient translation and translocation to the nucleus, triggering the transcriptional program of the UPR, including the expression of genes encoding chaperones and folding enzymes (Mori 2015).

More than 15 years ago was first observed that the ER stress activated *SLT2* transcription (Bonilla and Cunningham 2003). The relation of the UPR with the CWI pathway was further uncovered by Chen et al. (2005). These authors clearly showed that the lack of genes involved in the Slt2-mediated pathway caused sensitivity to tunicamycin, DTT, or β -mercaptoethanol, typical agents that induce the appearance of unfolded proteins and therefore trigger the UPR response. The participation of the CWI pathway in this response was clear as the treatment with these compounds led to Slt2 phosphorylation (Chen et al. 2005). The CWI pathway is likely activated to prevent cell wall damage originated as a consequence of ER dysfunction. Lately, Slt2 was shown to be also important in the regulation of the proteasome homeostasis in response to distinct stresses, including those activating the UPR, such as tunicamycin treatment (Rousseau and Bertolotti 2016).

Providing an illustrative example of how signaling connects cellular processes, cell wall stress was later shown to activate the UPR in an Ire1-dependent manner, highlighting the importance of a reinforced folding capacity of the secretory pathway to face a cell wall aggression. Interestingly, under cell wall stress, UPR activation was shown to be dependent on CWI pathway components, namely Slt2, Mid2, and Swi6. Furthermore, the UPR was revealed essential for cell wall maintenance (Scrimale et al. 2009). Thus, the UPR and CWI pathways were drawn as interdependent regulatory circuits that allow yeast to respond to ER and cell wall stresses. Recently, the tyrosine phosphatase Ptp2 was shown to be transcriptionally induced in response to ER stress by the CWI

pathway, in an Slt2 and Rlm1-dependent manner. The increased Ptp2 levels impact on the HOG pathway, downregulating Hog1 MAPK activity during the ER stress response (Mizuno et al. 2018). However, the functional significance of this effect is far from clear, since deletion of *PTP2* results in resistance to tunicamycin (Mizuno et al. 2018) and the Hog1 activity has an important role in ER stress survival (Bicknell et al. 2010; Torres-Quiroz et al. 2010).

In addition to the UPR pathway, set in motion by Ire1, an additional ER stress surveillance (ERSU) pathway was identified. This pathway delays ER inheritance and cytokinesis and alters septins upon ER stress (Babour et al. 2010). These authors proposed that the ERSU pathway protected cells from deleterious effects of inheriting stressed ER. By activating this pathway, the cortical ER (cER) is retained in the mother cell until it replenishes ER function. Slt2, as well as other components of the CWI pathway, is necessary to mediate the ERSU-triggered events, which are clearly distinct from the UPR pathway (Babour et al. 2010). Recently, it was proposed that ER stress elevates phytosphingosine (PHS), which in turn activates the ERSU pathway to ensure future daughter-cell viability. Consequently, treatment of ER-stressed cells with myriocin, a sphingolipid biosynthetic pathway inhibitor, reduced the levels of Slt2 phosphorylation whereas addition of PHS leads to Slt2 phosphorylation, and in general to the ERSU pathway activation (Piña et al. 2018). The targets of Slt2 under ER stress are yet unknown.

Changes in external pH are sensed by the CWI pathway

S. cerevisiae can survive in a rather wide range of ambient pH, being their optimal growth in a mild acidic environment

(pH 5.0–6.0). This acidic condition is achieved by the activity of the plasma membrane ATPase Pma1, which exports protons and therefore maintains an extracellular low pH (Serrano et al. 1986). For this reason, *S. cerevisiae* shows higher tolerance to low than high pH, being able to grow at pH values as low as 3.0. However, it is interesting to note that the CWI pathway senses and gets activated in response to low pH stress. This activation is reduced but not prevented by sorbitol, whereas the sensitivity of CWI pathway mutants to low pH is eliminated when growing on sorbitol-stabilized media (Claret et al. 2005). Therefore, some cell wall alteration could be at the origin of the CWI stimulation. Consistently, the activation of the pathway is dependent on the Mid2 mechanosensor (Claret et al. 2005).

Adaptation to pH alkalization in *S. cerevisiae* involves various responses and the participation of different signaling pathways (Serra-Cardona et al. 2015). Among them, the CWI pathway plays a key role in the adaptive response to this environmental stress. Two independent screening studies on gene-disruption mutants showed that the lack of *BCK1* and *SLT2* led to alkaline pH sensitivity (Giaever et al. 2002; Serrano et al. 2004). Moreover, when Pn-AMP1, a small cationic Cys/Arg-rich antimicrobial peptide with alkalinizing properties, was added to cultures of *bck1*Δ or *slt2*Δ strains, these mutant cells failed to grow (Kwon et al. 2016). The work conducted by Serrano et al. in 2006 showed that SlT2 was specifically activated under alkaline stress, and this activation had a fast and transient nature (5–15 min). *bck1*Δ, *slt2*Δ, *swi4*Δ, and *swi6*Δ strains showed not to be capable to grow on alkaline medium. Interestingly, lack of Wsc1 but not Wsc2, Wsc3 or Mid2 led to alkali sensitivity, pointing that Wsc1 was the CWI pathway component responsible for sensing the stress. The Wsc1 Tyr³⁰³ conserved intracellular residue and the whole extracellular domain was shown to be crucial for alkaline pH tolerance. They, therefore, proposed that the external alkaline pH might be affecting the glucan portion of the cell wall, thus activating the CWI pathway through Wsc1 and leading to SlT2 activation and induction of genes encoding cell wall proteins, such as *GSC2/FKS2*, *DFG5*, *SKT5*, or *CRH1* (Serrano et al. 2006).

The CWI pathway responds to plasma membrane stress

Although treatment of yeast cells with compounds that directly alter the plasma membrane, such as SDS, chlorpromazine, or amphotericin B/nystatin, results in a rapid CWI activation (Table 1), three physical insults that ultimately affect this structure and also led to SlT2 phosphorylation have been experimentally addressed in more detail: heat or cold treatment, hypo-osmotic shock, and compressive mechanical stress.

High and low temperatures

Growth at elevated temperatures was the first environmental condition to be related to the MAPK SlT2 (Torres et al. 1991) and the first one shown to stimulate the CWI pathway (Kamada et al. 1995). Although the molecular basis is still not clear, several mechanisms related to plasma membrane stress could contribute to CWI activation by high temperature. First, the increased membrane fluidity promoted by heat could cause a plasma membrane stretching. Second, the trehalose production in response to heat stress could be altering the turgor pressure. In fact, SlT2 is hardly activated in a *tps1* mutant that is unable to accumulate trehalose (Mensonides et al. 2005). Moreover, the involvement of the different CWI receptors in the detection of this stimulus is controversial. Although the Wsc membrane sensors were firstly implicated in sensing high temperature (Gray et al. 1997; Verna et al. 1997), later reports suggested that Mid2 also act as a CWI pathway sensor for this stress (Rajavel et al. 1999; Ketela et al. 1999; Martin et al. 2000).

The CWI pathway has also a role in cold adaptation (Corcoles-Saez et al. 2012). Mutants affected in Wsc1, Bck1, or SlT2 are unable to grow at 12 °C and catalytically active SlT2 is required to restore cold resistance. However, SlT2 activation under cold treatment does not lead to Rlm1 and Swi4/6 upregulation but seems to impinge on the TORC1–cAMP–PKA signaling network (Corcoles-Saez et al. 2012).

Hypo-osmotic shock

Changes in extracellular osmolyte concentration require the rapid modification of the intracellular abundance of solutes to maintain the osmotic equilibrium. When yeast cells face hyperosmotic stress, the HOG pathway is activated, resulting in the phosphorylation of the Hog1 MAPK. Hog1 activation leads to an increase of intracellular glycerol by both induction of genes involved in glycerol biosynthesis and uptake and inhibition of the plasma membrane aquaglyceroporin Fps1 with subsequent blockade of glycerol efflux. On the contrary, a hypo-osmotic shock is palliated through the opening of Fps1, which allows the efflux of glycerol and thus restores the osmotic equilibrium and prevents bursting (Hohmann 2015). The opening of Fps1 seems to depend on the CWI MAPK SlT2 (Ahmadpour et al. 2016).

Hypo-osmotic shock also behaves like a plasma membrane stress, since it results in a marked increase in turgor pressure and consequently provokes a plasma membrane stretching. The CWI pathway has been reported to participate in the response to a rapid drop in the external osmolarity. This stress leads to fast and transient phosphorylation of SlT2 that requires upstream kinases Mkk1/2, Bck1, and Pkc1 (Kamada et al. 1995; Davenport et al. 1995). However, it is unclear how the signal reaches the CWI pathway kinases, as well as the elicited

output. Upon hypo-osmotic shock, Ypk1 and Ypk2 kinases support Rho1 localization at the bud cortex through flippase inhibition and phosphatidylserine spatial reorganization (Hatakeyama et al. 2017). In *cho1Δ* cells, lacking the only gene encoding phosphatidylserine synthase, the cortical localization of both Rho1 and Pkc1 is lost following this stress. However, phosphorylation of Slt2 in response to hypo-osmotic shock was observed in *cho1Δ* cells, indicating that localization of these upstream CWI components at the bud cortex is not essential for the downstream MAPK cascade activation (Hatakeyama et al. 2017). It is interesting to note that, in contrast to other stimuli, such as heat shock or latrunculin treatment (see below), hypo-osmotic shock does not lead to Slt2 activation in cells containing the constitutively active *BCK1-20* allele as the only Bck1 source. This suggests that hypo-osmotic shock might lead to Bck1 activation through a mechanism different from other stresses (Harrison et al. 2004). In sum, we still have a very poor idea of how the pathway is activated by this stress.

Compressive mechanical stress

High extracellular pressure not only affects the cell wall but also the plasma membrane integrity, leading to cell lysis. Much insight on the signaling components that mediate the response to mechanical compression has been obtained by using a microfluidic platform to specifically trigger compressive stress. The Wsc1 sensor was known to act as a mechanosensor capable of sensing and responding to turgor pressure on the cell wall and plasma membrane caused by hypo-osmotic or heat shock (Dupres et al. 2009). However, lack of Wsc1 did not affect translocation to the plasma membrane of Pkc1-GFP, a reporter protein of the CWI activation, in cells subjected to compressive mechanical stress, (Mishra et al. 2017). In contrast, Rho1-GFP and Pkc1-GFP translocation to the plasma membrane was not observed upon mechanostress in the absence of Mid2, indicating that this is the sensor of this stress. High extracellular pressure also activated calcium signaling and specifically calcineurin, which suggests that the CWI and calcineurin pathways have cooperative roles. Consistently, a double mutant defective in the regulatory calcineurin component Cnb1 and the MAPK Slt2 suffered exacerbated cell lysis upon compressive stress (Mishra et al. 2017).

A parallel study carried out by Delarue et al. (2017) using a similar experimental approach also demonstrated the key role of the CWI pathway in response to compressive mechanical stress. These authors found that Slt2-GFP shifted from the nucleus to the cytoplasm and Pkc1-GFP translocated from the bud neck to the plasma membrane. Moreover, they showed that survival under mechanostress conditions not only requires the Mid2-activated CWI pathway but also the SMuSh osmosensing pathway (so-called for activation of the

MAPKKK Ste11 through Mucin Msb2/Sho1 of the HOG pathway). When both pathways are dysfunctional, cells lyse at relatively low pressure and therefore these authors name this mechanosensory system the SCWISH (survival through the CWI and SMuSh) network (Delarue et al. 2017).

The CWI pathway-mediated response to oxidative stress

Some compounds and physiological conditions increase the number of reactive oxygen species (ROS) inside the cell, causing serious damage to cellular components and threatening cell integrity. Response to this oxidative stress by yeast cells is very complex and includes the activation of the CWI.

The lipid hydroperoxides were the first described oxidants able to induce the CWI pathway activation. These compounds promote oxidative damage of membrane lipids and proteins. Slt2 phosphorylation increased after 5 min of linoleic acid hydroperoxide (13-hydroperoxylinoleic acid; LoaOOH) treatment and decreased considerably after 30 min, suggesting a rapid and transient activation of the pathway. Consequently, *SLT2* deletion rendered cells sensitive to this compound. Although little was investigated about how the stimulus is detected and transduced, it was demonstrated that Slt2 is important in regulating transcripts related to cell surface and metabolism after lipid hydroperoxide exposure (Alic et al. 2003).

L-Dopa and other catecholamines, as well as hydrogen peroxide (H_2O_2), were also shown to activate the CWI pathway (Staleva et al. 2004). The list of oxidizing agents that were able to trigger this pathway soon included the thiol oxidant compound diamide (Vilella et al. 2005). However, these agents differ in the mechanisms leading to Slt2 activation. Diamide likely alters cell wall proteins by oxidizing them, and therefore osmotic stabilization by sorbitol prevents CWI activation in response to this compound. The stress promoted by diamide through the CWI pathway is mostly detected by Mtl1 and then transduced through regular elements of the route: Rom2, Pkc1, and the MAPK module (Bck1, Mkk1/2, and Slt2), leading to the activation of the transcriptional factor Rlm1 (Vilella et al. 2005). In contrast, H_2O_2 exerts its action at the intracellular level, as sorbitol addition does not prevent MAPK activation. In this case, the signal is also transduced through Rom2, Pkc1, and the MAPK module but the oxidative stress is partially sensed by cell wall sensors Mid2 and Mtl1. Both H_2O_2 and diamide cause actin cytoskeleton depolarization (Fig. 1), but in an Mtl1-dependent manner in the case of diamide, supporting Mtl1 function as sensor for diamide-induced damage. After treatment with this agent, Pkc1 localizes to the cell periphery and cell walls become thicker due to the induction of the CWI-mediated compensatory mechanism. After H_2O_2 treatment, actin cables are rapidly restored if Pkc1 is overexpressed (Vilella et al. 2005).

Interestingly, Mtl1 is also required to inactivate both Tor1 and Ras2 functions in response to H₂O₂, and the absence of Mtl1 renders cells sensitive to this oxidative stress (Petkova et al. 2010). All this evidence indicates that Mtl1 is a key sensor for oxidative stress.

A remarkable output of the CWI pathway activation by H₂O₂ is the Slt2-mediated destruction of cyclin C. Under this oxidative stress, the MAPK Slt2 phosphorylates cyclin C, which translocates from the nucleus to the cytoplasm, allowing the expression of stress response genes that are repressed by the Cdk8 kinase module (CKM) formed by cyclin C, Cdk8, Med12, and Med13. Nuclear release of cyclin C requires the previous degradation of Med13, triggered by Slt2 and Snf1 (Jin et al. 2014, 2015; Willis et al. 2018). In the cytoplasm, before its ubiquitin-mediated proteolysis, cyclin C promotes mitochondrial fission, which facilitates survival to exogenous H₂O₂ stress. Therefore, Slt2 plays an important role in coordinating oxidative stress-induced gene induction and mitochondrial fission through cyclin C relocalization and degradation (Krasley et al. 2006; Cooper et al. 2014). Interestingly, whereas Mtl1 and either Wsc1 or Mid2 are required jointly to induce cyclin C destruction under low oxidative stress conditions (0.4 mM H₂O₂), in cells exposed to elevated reactive oxygen concentration (0.8 mM H₂O₂) either Mtl1p or Wsc1p/Mid2p group is sufficient to induce cyclin C destruction (Jin et al. 2013). In any case, the removal of all these receptors is necessary for blocking Slt2 phosphorylation in response to H₂O₂ (Jin et al. 2013).

There are other compounds whose ability to activate the CWI pathway has been also explained in terms of their oxidative nature. This is the case of (i) chloroquine, an antimalarial drug that increases intracellular ROS levels in *S. cerevisiae* and causes cell death (Islahudin et al. 2013); (ii) cadmium, an important environmental pollutant heavy metal and one of the major components of cigarette smoke that is of special interest because it has been associated with various cancers, neurological disorders, and reproductive system defects (Xiong et al. 2015); (iii) zinc-oxide nanoparticles, a class of nanomaterials broadly used nowadays for different applications such as drug delivery and food or cosmetics production, but generating health problems to consumers upon prolonged exposure (Babele et al. 2018); and (iv) valproic acid, a short-chain fatty acid that is widely prescribed to treat psycho-neurologic disorders and is considered to have potential anticancer properties (Golla et al. 2016). Treatment of yeast cells with any of these four agents was shown to induce Slt2 phosphorylation, and removal of this MAPK rendered cells sensitive to them. Interestingly, Wsc1 seems to be the sensor that triggers CWI pathway activation in response to these stimuli, except for cadmium-induced stimulation that is mediated by Mid2 (Xiong et al. 2015).

Genotoxic stress impinges in the CWI pathway at the MAPK level

DNA damage can impair the correct function of cellular processes, and even induce cell death when severe. Thus, DNA surveillance and effective repairing mechanisms are essential to maintain genome integrity. This is mediated by a set of signaling cascades included in the DNA damage response (DDR) network (Harper and Elledge 2007).

Bryan et al. (2004) reported that *slt2* mutant cells displayed decreased cell viability after UV irradiation. Soon after, strong phosphorylation of Slt2 in cells exposed to hydroxyurea (HU), a DNA replication blocking agent, as well as hypersensitivity to this compound of *slt2*Δ and *pkc1*Δ mutants, was described (Queralt and Igual 2005). The genotoxic combination 8-methoxypsoralen (8-MOP) plus ultraviolet A (UVA) induced Slt2 upregulation and phosphorylation, and the mutant defective in this MAPK showed reduced survival compared with wild-type cells after treatment with 8-MOP/UVA, 3-carbethoxypsoralen/UVA, or 1,6-dioxapyrene/UVA (Dardalhon et al. 2009).

Distinct findings further connected the CWI pathway with the response to DNA damage. In a phosphoproteomic study, in addition to the phosphorylation of conserved residues within the Slt2 activating loop, other two Slt2 residues (S423 and S428) were detected phosphorylated after incubation with the alkylating agent methyl methanesulfonate (MMS) that causes methylation of DNA bases (Albuquerque et al. 2008). Interestingly, caffeine treatment also resulted in the phosphorylation of these same residues of Slt2, which was shown to be dependent on the DNA damage checkpoint kinases, Mec1/Tel1 and Rad53 (Truman et al. 2009). Furthermore, the amount of Slt2 increased and localized in the nucleus when yeast cells are exposed to MMS, where it seemed to be required for appropriate regulation of ribonucleotide reductase genes in response to DNA damage (Bandyopadhyay et al. 2010). Moreover, both *SLT2* and *BCK1* interact genetically with different DNA damage checkpoint genes (Bandyopadhyay et al. 2010). Soriano-Carot et al. (2012) connected again the MAPK Slt2 to the maintenance of genome integrity after treatment with diverse genotoxic agents, such as HU, MMS, the double-strand break inductor phleomycin, and UV irradiation, which causes covalent cross-linking of adjacent pyrimidine bases. This study revealed that, independently of the DNA integrity checkpoint, Slt2 becomes phosphorylated and thus activated as a result of the DNA damage, and that the lack of this MAPK results in hypersensitivity to these genotoxic treatments (Soriano-Carot et al. 2012). In the same work, Slt2 was found to be essential for the Swe1 degradation necessary to restore the cell cycle after HU treatment.

On the whole, all these results suggest that a functional Slt2 is crucial to cope with DNA damage, independently of the genotoxic mechanism. Nevertheless, Soriano-Carot et al. (2014) observed that the activity of Pkc1 was necessary for

the activation of the DNA integrity checkpoint kinases Mec1 and Tel1 in a MAPK cascade-independent manner, and that Pkc1 suffered a Tel1-dependent phosphorylation in response to DNA damage, suggesting the existence of a feedback regulatory loop (Soriano-Carot et al. 2014).

Although it was reported that the lack of the Wsc receptors of the CWI pathway resulted in the hypersensitivity of cells to genotoxic agents (Zu et al. 2001; Leduc et al. 2003), Liu and Levin (2018) recently showed that genotoxic stress is sensed intracellularly at the MAPK level. These authors demonstrated that the activation of Slt2 does not rely on the stimulation of the upstream kinases in such conditions (Liu and Levin 2018). The instigator of Slt2 phosphorylation due to DNA damage by HU or MMs is the ubiquitin-mediated proteasomal degradation of Msg5, the dual-specificity protein phosphatase (DSP) that downregulates Slt2 in basal conditions. Surprisingly, proteolysis of this DSP did not require the Slt2 catalytic activity, which suggests a possible role of Slt2 as a scaffold for the ubiquitin ligase that modifies Msg5 post-translationally. Accordingly, Slt2 did not retro-phosphorylate its MAPKKs in response to HU in contrast to that occurring under cell wall stress (Jimenez-Sanchez et al. 2007).

The CWI pathway detects metalloid-induced stress

Arsenic is one of the most significant potential environmental poison and a big threat to human health. Therefore, yeast has been used in order to gain insight into the cellular responses that the two main forms of this metalloid, as trivalent arsenite [As(III)] and pentavalent arsenate [As(V)], induce in this model system. The CWI pathway activates in response to both arsenate (Matia-Gonzalez and Rodriguez-Gabriel 2011) and arsenite (Ahmadpour et al. 2016). Interestingly, Slt2 promotes arsenite expulsion via the aquaglyceroporin Fps1 (Ahmadpour et al. 2016).

The CWI route senses TORC1 inhibition

Nutrient signaling drives anabolic and growth-related processes through TORC1 activation. The inhibition of TORC1, either by rapamycin exposure or nutrient starvation, induces a quiescent state of yeast cells. In these conditions, the PKC pathway is essential for cell viability (Krause and Gray 2002; Torres et al. 2002). Rapamycin has diverse effects, including actin cytoskeleton disorganization, activation of the MAPK Slt2, and remodeling of the cell wall, making cells more resistant to cell wall stresses, such as zymolyase (Krause and Gray 2002; Torres et al. 2002). The picture depicting the outputs of rapamycin-induced Slt2 phosphorylation is far from complete, but at least includes two targets.

The first one is the phosphorylation of Bcy1, the regulatory subunit of the protein kinase A (PKA). PKA is involved in the regulation of growth-related processes, and phosphorylation of Bcy1 promotes its inhibition (Soulard et al. 2010). The second one is the Slt2-mediated phosphorylation of the CDK inhibitor Sic1, leading to its stabilization and the promotion of G1 arrest (Moreno-Torres et al. 2015). Therefore, by monitoring TORC1 activity, the CWI pathway coordinates nutrient availability with growth and cell cycle progression.

Caffeine treatment also activates the CWI pathway (Martín et al. 2000) and it seems that this compound acts through TORC1 inhibition (Kuranda et al. 2006). Neither Wsc1 nor Mid2 mediate caffeine-triggered CWI signaling. However, some kind of cell wall damage is likely to occur under treatment with this drug, since sorbitol rescued caffeine sensitivity of mutants affected in the CWI pathway. Osmotic stabilization also prevented caffeine-induced Slt2 phosphorylation (Martin et al. 2000). Interestingly, caffeine led to phosphorylation of the Slt2 C-terminal extension at Ser423 and Ser428. As indicated above, this phosphorylation was dependent on the DNA damage checkpoint kinases, Mec1/Tel1 and Rad53, and specifically prevented Slt2 association with Swi4 and therefore blocked SBF activation (Truman et al. 2009). Moreover, uncoupling between Slt2 phosphorylation and Rlm1-dependent transcriptional induction has been described in cells treated with caffeine (Kuranda et al. 2006).

Is the actin cytoskeleton alteration the signal that triggers the CWI pathway activation under some stresses?

The treatment of yeast cells with the actin-depolymerizing drug latrunculin B leads to Slt2 activation. Mutants affected in transmission through the CWI MAPK module became binucleate without forming buds when exposed to this drug since this pathway is necessary for the morphogenesis checkpoint responsible for arresting cells in G2 when they are unable to bud because of the latrunculin B treatment (Harrison et al. 2001). Moreover, the CWI pathway MAPK module is also necessary for the actin repolarization (Delley and Hall 1999) that follows the transient depolarization caused by different Slt2-activating conditions, such as heat or oxidative stress (Table 1). Whether activation of the CWI pathway under these stresses is a consequence of the actin cytoskeleton alteration or not remains to be discerned in most cases. Prevention of Slt2 activation by osmotic stabilization can be considered an indicator of a primary cell wall defect. For example, in the case of rapamycin treatment, sorbitol prevents both activation of the pathway and actin depolymerization, placing the origin of the stress at the cell wall (Krause and Gray 2002; Torres et al. 2002). In contrast, acid pH promotes actin depolarization and Slt2 activation, but these effects are not remedied by

sorbitol (Claret et al. 2005). Furthermore, latrunculin-driven Slit2 activation does not seem to depend on Wsc or Mid2 cell wall sensors (Harrison et al. 2001), leaving the question open.

Activation of the CWI pathway in non-*Saccharomyces* fungi

The CWI pathway is mostly conserved in different fungal species and it is central for them to sense and respond to stimuli that directly stress the fungal cell surface, such as Congo red or echinocandins (González-Rubio et al. 2019; Dichtl et al. 2016). However, as occurring in *S. cerevisiae*, this signaling route also responds to stresses not directly related to the cell wall, like alkaline pH, caffeine, or heat shock in other fungi (Dichtl et al. 2016). In the case of the pathogen *Candida albicans*, the MAPK of the CWI pathway, Mkc1, is phosphorylated in response to oxidative and osmotic stress, calcium ions, and low-temperature shocks. In addition to cell wall biogenesis, it regulates morphogenesis and biofilm formation (Monge et al. 2006). Importantly, the CWI pathway is crucial for virulence and for intrinsic adaptation to stress induced by antifungals, not only in *C. albicans* but also in other human pathogenic fungi, such as *Candida glabrata*, *Aspergillus fumigatus*, and *Cryptococcus neoformans* (Dichtl et al. 2016). Therefore, the research in these pathogenic fungi and the possibility of finding inhibitory drugs of this pathway would keep benefiting from findings in budding yeast.

The analogous pathway of the non-pathogenic model yeast *Schizosaccharomyces pombe*, named CIP (cell integrity pathway), is also activated in response to oxidative stress, glucose deprivation, as well as hypertonic and hypotonic stresses (Pérez and Cansado 2010). This pathway participates in ion homeostasis and vacuole fusion but its biological significance in the regulation of cell wall biosynthesis is not clearly defined yet, in spite of its activation by cell wall stress (Pérez et al. 2018). Thus, the CWI pathway seems to be a very flexible cellular tool to orchestrate the response to distinct stresses in fungi.

Concluding remarks and perspectives

The CWI pathway is best characterized in *S. cerevisiae* than in other fungi. In almost 30 years since the identification of the first core components of the CWI pathway, Pkc1 and Slit2, the involvement of this signaling pathway in the cell wall stress response has been deeply studied and characterized (Levin 2011). However, apart from cell-wall altering drugs and enzymatic complexes, many other chemical and

physical agents have been found to activate this pathway, which is essential for yeast cells to defend from these conditions. However, the nature of the stress faced by the yeast cell in these situations is frequently not well defined, hampering the analysis of the physiological role of the CWI pathway. For example, acetic acid perturbs the plasma membrane (Guerreiro et al. 2016) (Table 1), but it also induces accumulation of ROS and therefore promotes oxidative stress (Guaragnella et al. 2007). In other cases, compounds with opposite properties, such as the oxidant H₂O₂ and the antioxidant quercetin, activate the CWI pathway (Vilaça et al. 2012) (Table 1). Other drawbacks to knowing the stimulation mechanism come from the fact that sometimes osmotic stabilization prevents both the sensitivity of mutants affected in the pathway and the activation of Slit2 induced by a given compound, suggesting that it is somehow damaging the cell wall, although its effect on this structure is not evident. Plasma membrane stress is not easily distinguishable to cell wall stress since these structures are intimately related and alteration of any of these structures generally gives rise to actin depolarization. Other CWI-activating stresses are not related to cell surface disturbances neither mediated by upstream components of the pathway but generate intracellular inputs, namely the genotoxic stress (Liu and Levin 2018). Furthermore, the different timing of the activation triggered by compounds altering the same cellular target also reflects the complexity of the sensing process. For example, both hypo-osmotic shock and high temperature provoke plasma membrane stress but, while the former triggers a very fast and transient response of the CWI pathway (Kamada et al. 1995; Davenport et al. 1995), the later induces a slower and sustained activation (Martin et al. 2000).

Altogether these findings evidence that the CWI pathway responds to a diverse array of both intra and extracellular inputs (Fig. 1). Not only the numerous stimuli but also the different outputs of this pathway provide an excellent platform to study the diverse molecular mechanisms that allow signal sensing, integration, dissemination, and specificity in MAPK signaling. Future challenges include the discernment of the nature of the signals detected by the pathway, the elucidation of the different CWI pathway-related protein complexes assembled according to the signal, and the attainment of a complete map of cellular targets regulated in each response.

Funding information This research was funded by grants BIO2016-75030-P (Ministerio de Economía y Competitividad), and S2017/BMD-3691-InGEMICS-CM (Comunidad de Madrid and European Structural and Investment Funds). E.J-G was supported by a predoctoral contract from the Universidad Complutense de Madrid, E.A-C by a contract from the Community of Madrid and co-financed by the European Social Fund within the Youth Employment Operative Program and the Youth Employment Initiative (YEI), and A.S-M by a predoctoral contract from the Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades of Spain.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ahmadpour D, Maciaszczyk-Dziubinska E, Babazadeh R, Dahal S, Migocka M, Andersson M, Wysocki R, Tamas MJ, Hohmann S (2016) The mitogen-activated protein kinase Slt2 modulates arsenite transport through the aquaglyceroporin Fps1. *FEBS Lett* 590:3649–3659. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12390>
- Albuquerque CP, Smolka MB, Payne SH, Bafna V, Eng J, Zhou H (2008) A multidimensional chromatography technology for in-depth phosphoproteome analysis. *Mol Cell Proteomics* 7:1389–1396. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700468-MCP200>
- Alic N, Higgins VJ, Pichova A, Breitenbach M, Dawes IW (2003) Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 278:41849–41855. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307760200>
- Alonso-Rodriguez E, Fernandez-Pinar P, Sacristan-Reviriego A, Molina M, Martin H (2016) An analog-sensitive version of the protein kinase Slt2 allows identification of novel targets of the yeast cell wall integrity pathway. *J Biol Chem* 291:5461–5472. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.683680>
- Babele PK, Thakre PK, Kumawat R, Tomar RS (2018) Zinc oxide nanoparticles induce toxicity by affecting cell wall integrity pathway, mitochondrial function and lipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere* 213:65–75. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.09.028>
- Babour A, Bicknell AA, Tourtellotte J, Niwa M (2010) A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* 142:256–269. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.006>
- Bandyopadhyay S, Mehta M, Kuo D, Sung MK, Chuang R, Jaehnig EJ, Bodenmiller B, Licon K, Copeland W, Shales M, Fiedler D, Dutkowski J, Guenole A, van Attikum H, Shokat KM, Kolodner RD, Huh WK, Aebersold R, Keogh MC, Krogan NJ, Ideker T (2010) Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science* 330:1385–1389. <https://doi.org/10.1126/science.1195618>
- Baranwal S, Azad GK, Singh V, Tomar RS (2014) Signaling of chloroquine-induced stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* requires the Hog1 and Slt2 mitogen-activated protein kinase pathways. *Antimicrob Agents Chemother* 58:5552–5566. <https://doi.org/10.1128/AAC.02393-13>
- Bicknell AA, Tourtellotte J, Niwa M (2010) Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *J Biol Chem* 285:17545–17555. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.084681>
- Bonilla M, Cunningham KW (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* 14:4296–4305. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-02-0113>
- Bryan BA, Knapp GS, Bowen LM, Polymenis M (2004) The UV response in *Saccharomyces cerevisiae* involves the mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Curr Microbiol* 49:32–34. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4259-2>
- Casagrande V, Del V, Militti C, Mangiapelo E, Frontali L, Negri R, Bianchi MM (2009) Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: an interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor Yaf9. *FEMS Yeast Res* 9:400–410. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00486.x>
- Chen RE, Thorner J (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1773:1311–1340. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2007.05.003>
- Chen Y, Feldman DE, Deng C, Brown JA, De Giacomo AF, Gaw AF, Shi G, Le QT, Brown JM, Koong AC (2005) Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cancer Res* 3:669–677. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-05-0181>
- Claret S, Gatti X, Doignon F, Thoraval D, Crouzet M (2005) The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 4:1375–1386. <https://doi.org/10.1128/EC.4.8.1375-1386.2005>
- Cooper KF, Khakhina S, Kim SK, Strich R (2014) Stress-induced nuclear-to-cytoplasmic translocation of cyclin C promotes mitochondrial fission in yeast. *Dev Cell* 28:161–173. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.12.009>
- Corcoles-Saez I, Ballester-Tomas L, De La Torre-Ruiz MA, Prieto JA, Rande-Gil F (2012) Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* 446:477–488. <https://doi.org/10.1042/BJ20120634>
- Dardalhon M, Agoutin B, Watzinger M, Averbek D (2009) Slt2 (Mpk1) MAP kinase is involved in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxypsoralen plus UVA. *J Photochem Photobiol B* 95:148–155. <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.02.001>
- Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE, Gustin MC (1995) A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem* 270:30157–30161. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.50.30157>
- Delarue M, Poterewicz G, Hoxha O, Choi J, Yoo W, Kayser J, Holt L, Hallatschek O (2017) SCWISH network is essential for survival under mechanical pressure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:13465–13470. <https://doi.org/10.1073/pnas.1711204114>
- Delley PA, Hall MN (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* 147:163–174. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.1.163>
- Dichtl K, Samantaray S, Wagener J (2016) Cell wall integrity signalling in human pathogenic fungi. *Cell Microbiol* 18(9):1228–1238. <https://doi.org/10.1111/cmi.12612>
- Dupres V, Alsteens D, Wilk S, Hansen B, Heinisch JJ, Dufrene YF (2009) The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat Chem Biol* 5:857–862. <https://doi.org/10.1038/nchembio.220>
- Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Véronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, André B, Arkin AP, Astromoff A, el Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M, Gotte D, Güldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kötter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* 418:387–391. <https://doi.org/10.1038/nature00935>
- Golla U, Joseph D, Tomar RS (2016) Combined transcriptomics and chemical-genetics reveal molecular mode of action of valproic acid, an anticancer molecule using budding yeast model. *Sci Rep* 6:35322. <https://doi.org/10.1038/srep35322>

- González-Rubio G, Fernández-Acero T, Martín H, Molina M (2019) Mitogen-activated protein kinase phosphatases (MKPs) in fungal signaling: conservation, function, and regulation. *Int J Mol Sci* 20(7). <https://doi.org/10.3390/ijms20071709>
- Gray JV, Ogas JP, Kamada Y, Stone M, Levin DE, Herskowitz I (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* 16:4924–4937. <https://doi.org/10.1093/emboj/16.16.4924>
- Guaragnella N, Antonacci L, Passarella S, Marra E, Giannattasio S (2007) Hydrogen peroxide and superoxide anion production during acetic acid-induced yeast programmed cell death. *Folia Microbiol (Praha)* 52:237–240
- Guerreiro JF, Muir A, Ramachandran S, Thormer J, Sa-Correia I (2016) Sphingolipid biosynthesis upregulation by TOR complex 2-Ypk1 signaling during yeast adaptive response to acetic acid stress. *Biochem J* 473:4311–4325. <https://doi.org/10.1042/BCJ20160565>
- Harper JW, Elledge SJ (2007) The DNA damage response: ten years after. *Mol Cell* 28:739–745. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.015>
- Harrison JC, Bardes ES, Ohya Y, Lew DJ (2001) A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* 3:417–420. <https://doi.org/10.1038/35070104>
- Harrison JC, Zyla TR, Bardes ES, Lew DJ (2004) Stress-specific activation mechanisms for the “cell integrity” MAPK pathway. *J Biol Chem* 279:2616–2622. <https://doi.org/10.1074/jbc.M306110200>
- Hatakeyama R, Kono K, Yoshida S (2017) Ypk1 and Ypk2 kinases maintain Rho1 at the plasma membrane by flippase-dependent lipid remodeling after membrane stresses. *J Cell Sci* 130:1169–1178. <https://doi.org/10.1242/jcs.198382>
- Heinisch JJ, Rodicio R (2018) Protein kinase C in fungi—more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol Rev* 42:4562651. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux051>
- Hohmann S (2015) An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* 61:373–382. <https://doi.org/10.1007/s00294-015-0475-0>
- Islahudin F, Khozoe C, Bates S, Ting KN, Pleass RJ, Avery SV (2013) Cell wall perturbation sensitizes fungi to the antimalarial drug chloroquine. *Antimicrob Agents Chemother* 57:3889–3896. <https://doi.org/10.1128/AAC.00478-13>
- Jendretzki A, Wittland J, Wilk S, Straede A, Heinisch JJ (2011) How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol* 90:740–744. <https://doi.org/10.1016/j.ejcb.2011.04.006>
- Jimenez-Sanchez M, Cid VJ, Molina M (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* 282:31174–31185. <https://doi.org/10.1074/jbc.M706270200>
- Jin C, Parshin AV, Daly I, Strich R, Cooper KF (2013) The cell wall sensors Mtl1, Wsc1, and Mid2 are required for stress-induced nuclear to cytoplasmic translocation of cyclin C and programmed cell death in yeast. *Oxidative Med Cell Longev* 2013:320823–320815. <https://doi.org/10.1155/2013/320823>
- Jin C, Strich R, Cooper KF (2014) Slt2p phosphorylation induces cyclin C nuclear-to-cytoplasmic translocation in response to oxidative stress. *Mol Biol Cell* 25:1396–1407. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-09-0550>
- Jin C, Kim SK, Willis SD, Cooper KF (2015) The MAPKKs Ste11 and Bck1 jointly transduce the high oxidative stress signal through the cell wall integrity MAP kinase pathway. *Microb Cell* 2:329–342. <https://doi.org/10.15698/mic2015.09.226>
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* 9:1559–1571. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1559>
- Ketela T, Green R, Bussey H (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* 181:3330–3340
- Krasley E, Cooper KF, Mallory MJ, Dunbrack R, Strich R (2006) Regulation of the oxidative stress response through Slt2p-dependent destruction of cyclin C in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 172:1477–1486. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.052266>
- Krause SA, Gray JV (2002) The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* 12:588–593
- Krause SA, Cundell MJ, Poon PP, McGhie J, Johnston GC, Price C, Gray JV (2012) Functional specialisation of yeast Rho1 GTP exchange factors. *J Cell Sci* 125:2721–2731. <https://doi.org/10.1242/jcs.100685>
- Kuranda K, Leberre V, Sokol S, Palamarczyk G, François J (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* 61:1147–1166. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05300.x>
- Kwon Y, Chiang J, Tran G, Giaever G, Nislow C, Hahn BS, Kwak YS, Koo JC (2016) Signaling pathways coordinating the alkaline pH response confer resistance to the hevein-type plant antimicrobial peptide Pn-AMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Planta* 244:1229–1240. <https://doi.org/10.1007/s00425-016-2579-2>
- Leduc A, He CH, Ramotar D (2003) Disruption of the *Saccharomyces cerevisiae* cell-wall pathway gene SLG1 causes hypersensitivity to the antitumor drug bleomycin. *Mol Gen Genomics* 269:78–89. <https://doi.org/10.1007/s00438-003-0812-8>
- Levin DE (2011) Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* 189:1145–1175. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.128264>
- Liu L, Levin DE (2018) Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1. *Mol Biol Cell* 29:2898–2909
- Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275:1511–1519. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1511>
- Matia-Gonzalez AM, Rodriguez-Gabriel MA (2011) Slt2 MAPK pathway is essential for cell integrity in the presence of arsenate. *Yeast* 28:9–17. <https://doi.org/10.1002/yea.1816>
- Menonides FI, Brul S, Klis FM, Hellingwerf KJ, Teixeira de Mattos MJ (2005) Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl Environ Microbiol* 71:4531–4538. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.8.4531-4538.2005>
- Mishra R, van Drogen F, Dechant R, Oh S, Jeon NL, Lee SS, Peter M (2017) Protein kinase C and calcineurin cooperatively mediate cell survival under compressive mechanical stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:13471–13476. <https://doi.org/10.1073/pnas.1709079114>
- Mizuno T, Nakamura M, Irie K (2018) Induction of Ptp2 and Cmp2 protein phosphatases is crucial for the adaptive response to ER stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Rep* 8:13078–13143. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31413-6>
- Mollapour M, Piper PW (2006) Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:1274–1280. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00118.x>
- Mollapour M, Shepherd A, Piper PW (2009) Presence of the Fps1p aquaglyceroporin channel is essential for Hog1p activation, but suppresses Slt2(Mpk1)p activation, with acetic acid stress of yeast. *Microbiology* 155:3304–3311. <https://doi.org/10.1099/mic.0.030502-0>
- Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J (2006) The MAP kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology* 152:905–912. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28616-0>
- Moreno-Torres M, Jaquenoud M, De Virgilio C (2015) TORC1 controls G1-S cell cycle transition in yeast via Mpk1 and the greatwall kinase pathway. *Nat Commun* 6:8256. <https://doi.org/10.1038/ncomms9256>

- Mori K (2015) The unfolded protein response: the dawn of a new field. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 91:469–480. <https://doi.org/10.2183/pjab.91.469>
- Morrison DK (2012) MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4:4–11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011254>
- Nomura W, Inoue Y (2015) Methylglyoxal activates the target of rapamycin complex 2-protein kinase C signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 35:1269–1280. <https://doi.org/10.1128/MCB.01118-14>
- Pérez P, Cansado J (2010) Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci* 11:680–692
- Pérez P, Cortés J, Cansado J, Ribas JC (2018) Fission yeast cell wall biosynthesis and cell integrity signalling. *Cell Surf* 4:1–9. <https://doi.org/10.1016/j.tcs.2018.10.001>
- Petkova MI, Pujol-Carrion N, Arroyo J, Garcia-Cantalejo J, Angeles de la Torre-Ruiz M (2010) Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. *J Biol Chem* 285:19521–19531. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.085282>
- Piña F, Yagisawa F, Obara K, Gregerson JD, Kihara A, Niwa M (2018) Sphingolipids activate the endoplasmic reticulum stress surveillance pathway. *J Cell Biol* 217:495–505. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708068>
- Queralt E, Igual JC (2005) Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 171:1485–1498. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.045005>
- Rajavel M, Philip B, Buehrer BM, Errede B, Levin DE (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19:3969–3976. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.6.3969>
- Rousseau A, Bertolotti A (2016) An evolutionarily conserved pathway controls proteasome homeostasis. *Nature* 536:184–189. <https://doi.org/10.1038/nature18943>
- Sanz AB, Garcia R, Rodriguez-Pena JM, Arroyo J (2017) The CWI pathway: regulation of the transcriptional adaptive response to cell wall stress in yeast. *J Fungi (Basel)* 4:jof4010001. <https://doi.org/10.3390/jof4010001>
- Scrimalte T, Didone L, Mesy Bentley KL, Krysan DJ (2009) The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 20:164–175. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-08-0809>
- Serra-Cardona A, Canadell D, Arino J (2015) Coordinate responses to alkaline pH stress in budding yeast. *Microb Cell* 2:182–196. <https://doi.org/10.15698/mic2015.06.205>
- Serrano R, Kielland-Brandt MC, Fink GR (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319:689–693. <https://doi.org/10.1038/319689a0>
- Serrano R, Bernal D, Simon E, Arino J (2004) Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J Biol Chem* 279:19698–19704. <https://doi.org/10.1074/jbc.M313746200>
- Serrano R, Martin H, Casamayor A, Arino J (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slr2 MAPK pathway. *J Biol Chem* 281:39785–39795. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604497200>
- Soriano-Carot M, Bano MC, Igual JC (2012) The yeast mitogen-activated protein kinase Slr2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div* 7:1. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-7-1>
- Soriano-Carot M, Quilis I, Bano MC, Igual JC (2014) Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res* 42:7084–7095. <https://doi.org/10.1093/nar/gku373>
- Soulard A, Cremonesi A, Moes S, Schutz F, Jenö P, Hall MN (2010) The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell* 21:3475–3486. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0182>
- Staleva L, Hall A, Orlow SJ (2004) Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent manner. *Mol Biol Cell* 15:5574–5582. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0142>
- Straede A, Corran A, Bundy J, Heinisch JJ (2007) The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeast* 24:321–334. <https://doi.org/10.1002/yea.1478>
- Torres L, Martin H, Garcia-Saez MI, Arroyo J, Molina M, Sanchez M, Nombela C (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol* 5:2845–2854
- Torres J, Di Como CJ, Herrero E, De La Torre-Ruiz MA (2002) Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem* 277:43495–43504. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205408200>
- Torres-Quiroz F, Garcia-Marques S, Coria R, Rande-Gil F, Prieto JA (2010) The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *J Biol Chem* 285:20088–20096. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063578>
- Truman AW, Kim KY, Levin DE (2009) Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol* 29:6449–6461. <https://doi.org/10.1128/MCB.00794-09>
- Udom N, Chansongkrow P, Charoensawan V, Auesukaree C (2019) Coordination of the cell wall integrity and high osmolarity glycerol pathways in response to ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol AEM-19*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00551-19>
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13804–13809. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.25.13804>
- Vilaça R, Mendes V, Mendes MV, Carreto L, Amorim MA, de Freitas V, Moradas-Ferreira P, Mateus N, Costa V (2012) Quercetin protects *Saccharomyces cerevisiae* against oxidative stress by inducing trehalose biosynthesis and the cell wall integrity pathway. *PLoS One* 7:e45494. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0045494>
- Vilella F, Herrero E, Torres J, De La Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem* 280:9149–9159. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411062200>
- Willis SD, Stieg DC, Ong KL, Shah R, Strich AK, Grose JH, Cooper KF (2018) Snf1 cooperates with the CWI MAPK pathway to mediate the degradation of Med13 following oxidative stress. *Microb Cell* 5:357–370. <https://doi.org/10.15698/mic2018.08.641>
- Xiong B, Zhang L, Xu H, Yang Y, Jiang L (2015) Cadmium induces the activation of cell wall integrity pathway in budding yeast. *Chem Biol Interact* 240:316–323. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2015.09.007>
- Zu T, Verna J, Ballester R (2001) Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genomics* 266:142–155

