

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

**Activación de la MAPK de *Saccharomyces cerevisiae* SLT2:
mecanismo molecular e implicación en el fenotipo de
multigemación de células carentes de la fosfatasa PTC1**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Gema González Rubio

Directores

**María Molina Martín
Humberto Martín Brieva**

Madrid

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

“ACTIVACIÓN DE LA MAPK DE *Saccharomyces cerevisiae* SLT2:
MECANISMO MOLECULAR E IMPLICACIÓN EN EL FENOTIPO DE
MULTIGEMACIÓN DE CÉLULAS CARENTES DE LA FOSFATASA PTC1”

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

GEMA GONZÁLEZ RUBIO

DIRECTORES

MARÍA MOLINA MARTÍN
HUMBERTO MARTÍN BRIEVA

La realización de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

La concesión al grupo de investigación 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).

B2017/BMD-3691: "InGEMICS-CM: Ingeniería Microbiana, Salud y Calidad de Vida", subvencionado por la Comunidad Autónoma de Madrid (2018-2022).

PID2019-105342GB-I00: "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).

La concesión a la doctoranda de los siguientes contratos y ayudas:

Ayudas para Contratos Predoctorales de Formación de Personal Investigador por parte de la Universidad Complutense de Madrid. Convocatoria 2016- CT27/16-CT28/16 (01/02/2017-10/05/2021).

Ayudas en estancias breves en España y en el extranjero de los beneficiarios de las ayudas UCM para contratos predoctorales de personal investigador en formación. Convocatoria 08/02/2019 (01/06/2019-31/08/2019).

Personal de Apoyo a la Investigación con cargo al proyecto de investigación PID2019-105342GB-I00. Código de plaza PAII013/21-05/2021-01 (11/05/2021-31/12/2022).

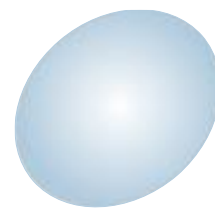
La estancia breve realizada en el laboratorio del Dr. Jeremy W. Thorner

Departamento de Biología Molecular y Celular, en la División de Bioquímica, Biofísica y Biología Estructural de la Universidad de California, Berkeley, California, Estados Unidos (01/06/2019-31/08/2019).

"We'll see what the future holds...try not to worry about that, though. Just stay focused on doing your best each and every day. That's all anyone can ask" ¹

Jeremy W. Thorner

¹ In Summer 2019, I was a guest researcher for three months in the laboratory of Professor Jeremy Thorner in the Division of Biochemistry, Biophysics and Structural Biology in the Department of Molecular and Cell Biology at the University of California, Berkeley, USA. Upon my return to Madrid, when I was facing much more experimental work to complete this doctoral dissertation and expressed how daunting that task seemed to me at the time in the midst of the world-wide Covid-19 pandemic, Professor Thorner sent me these inspiring words.



ÍNDICE

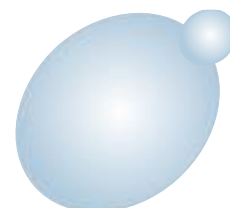
ÍNDICE	1
CLAVE DE ABREVIATURAS	9
RESUMEN.....	15
SUMMARY	21
INTRODUCCIÓN	27
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , una levadura clave para la Ciencia	29
2. El ciclo biológico de <i>S. cerevisiae</i>	29
2.1. Regulación del ciclo celular.....	30
2.1.1. Regulación del inicio y del avance del ciclo celular	31
2.1.2. Mecanismos de regulación de la salida de la mitosis	33
2.1.3. Mecanismos de separación celular.....	34
2.1.3.1. Citoquinesis y formación del septo.....	34
2.1.3.2. Disociación celular por destrucción del septo: ruta RAM.....	34
2.1.4. Puntos de control del ciclo celular.....	36
2.1.4.1. Puntos de control del ADN.....	37
2.1.4.2. Puntos de control de orgánulos y de separación celular	38
3. Septinas.....	39
3.1. Estructura y ensamblaje de las septinas.....	40
3.1.1. Regulación del ensamblaje de las septinas a lo largo del ciclo celular	40
3.2. Papel de las septinas durante el ciclo celular	42
3.3. Otras funciones celulares de las septinas.....	43
4. TORC1	43
4.1. TORC1-Tap42-fosfatasa.....	43
4.2. TORC1-Sch9.....	44
5. Autofagia.....	45
5.1. Tipos de autofagia.....	45
5.2. Macroautofagia no selectiva	46
6. Rutas de MAPKs	47
6.1. Regulación de la actividad de las MAPKs por fosforilación	48
6.1.1. Activación de las MAPKs por fosforilación del motivo TXY	48
6.1.2. Actividad de las formas monofosforiladas en el motivo de activación TXY de las MAPKs	49
6.1.3. Otros residuos implicados en la activación de las MAPKs	49
6.2. Ruta de integridad de la pared celular	49

6.2.1. Componentes de la ruta CWI	50
6.2.2. Estímulos de la ruta CWI	51
6.2.3. Respuestas de la ruta CWI	51
6.2.3.1. Respuesta transcripcional	52
6.2.3.2. Regulación del ciclo celular	54
6.2.4. Estructura de Slt2	56
6.3. Inactivación de las rutas de MAPKs por desfosforilación	58
6.3.1. Tirosín fosfatasas y fosfatasas de especificidad dual	59
6.3.2. Serín/treonín fosfatasas. Ptc1	59
6.3.2.1. Defectos fenotípicos mostrados por el mutante <i>ptc1Δ</i>	61
6.3.2.1.1. Defectos en el crecimiento	61
6.3.2.1.2. Defectos en el patrón de gemación y en la separación celular	62
6.3.2.1.3. Defectos en la herencia de orgánulos	62
6.3.2.1.4. Retraso en el avance en el ciclo celular en la fase G ₂ /M	63
6.3.2.1.5. Defectos en la señalización de TORC1	63
6.3.2.1.6. Otros defectos fenotípicos	63
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	65
MATERIALES Y MÉTODOS	69
1. Microorganismos utilizados	71
2. Procedimientos generales de biología molecular	75
2.1. Extracción y purificación del ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	75
2.2. Extracción del ADN genómico de levadura	75
2.3. Amplificación de secuencias de ADN. Reacción en cadena la polimerasa (PCR)	75
2.4. Mutagénesis dirigida por PCR	76
2.4.1. PCR solapante	76
2.4.2. Mutagénesis dirigida en dos etapas	76
2.5. Digestión, purificación y ligación de fragmentos de ADN	76
2.6. Análisis de ácidos nucleicos	77
2.7. Transferencia de ADN a la célula hospedadora	77
2.7.1. Transformación plasmídica en <i>E. coli</i> y en <i>S. cerevisiae</i>	77
2.7.2. Transformación de alta eficiencia en <i>S. cerevisiae</i>	79
3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	80
3.1. Cultivo y tratamiento de levaduras en medio líquido	80
3.2. Ensayos de crecimiento de levadura por diluciones decimales seriadas en gota	81
4. Extracción, detección y análisis de proteínas	81

4.1.	Obtención de extractos proteicos	81
4.1.1.	Obtención en condiciones desnaturalizantes: precipitación de proteínas con TCA	81
4.1.2.	Obtención en condiciones nativas: co-inmunoprecipitación de proteínas con <i>Dynabeads™</i> protein G	82
4.2.	Separación electroforética y transferencia de proteínas	83
4.2.1.	Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes.....	83
4.2.2.	Zn ²⁺ -Phos-tag SDS-PAGE	83
4.3.	Inmunodetección de proteínas mediante Western blotting	84
5.	Ensayo de la actividad β-galactosidasa y determinación de la concentración proteica mediante el método de Bradford	85
6.	Tinciones celulares.....	86
6.1.	Tinción con yoduro de propidio.....	86
6.2.	Tinción con rodamina 123	86
6.3.	Tinción con dihidroetidio	87
6.4.	Tinción con DAPI	87
6.5.	Tinción con <i>Mitotracker® Red CMXRos</i>	87
6.6.	Tinción con <i>Sytox® Green</i>	87
7.	Técnicas de microscopía	88
7.1.	Microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) y de fluorescencia	88
7.2.	Microscopía de láser confocal	88
8.	Citometría de flujo	89
9.	Soporte informático.....	89
RESULTADOS.....		91
1.	CAPÍTULO I. Caracterización de las formas monofosforiladas en T190 y en Y192 del motivo de activación TEY de Slt2: jerarquía de activación e implicaciones en su actividad...	93
1.1.	Detección diferencial de las formas monofosforiladas en T190 y en Y192 de Slt2 mediante el empleo de anticuerpos comerciales.....	93
1.2.	La imposibilidad de fosforilación de la T190 provoca un incremento en los niveles de fosforilación de la Y192.....	95
1.3.	La fosforilación de la Y192 por Mkk1 y Mkk2 es el primer paso necesario para que Slt2 alcance su estado de doble fosforilación.....	96
1.4.	La desfosforilación de la T190 de Slt2 por Msg5 depende de la desfosforilación previa de la Y192.....	98
1.5.	La T190 es esencial para la actividad catalítica y biológica de Slt2	99
1.6.	La T195 juega un papel clave en la actividad de Slt2.....	103
1.7.	Los residuos T190 y T195 y la actividad quinasa de Slt2 son esenciales para mantener bajos los niveles de fosforilación de Y192	105

2. CAPÍTULO II. Caracterización del fenotipo de multigemación de un mutante <i>ptc1Δ</i> : efecto de la hiperactivación de Slt2	109
2.1. En el mutante <i>ptc1Δ</i> a 38 °C las células hijas sufren un bloqueo en la progresión del ciclo celular que no supone su muerte	109
2.2. Cuantificación del porcentaje de células multigemadas del mutante <i>ptc1Δ</i> a 38 °C mediante el análisis por citometría de flujo de su contenido en ADN	111
2.3. La hiperactivación de la ruta de integridad celular provoca defectos en la separación celular en el mutante <i>ptc1Δ</i>	113
2.4. La delección de <i>MKK1</i> o de <i>RLM1</i> reducen los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por los mutantes <i>ptc1Δ</i> en presencia de estrés	115
2.5. Los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por el mutante <i>ptc1Δ</i> a 38 °C dependen de la actividad quinasa de Slt2	118
2.6. El mutante <i>ptc1Δ</i> a 38 °C muestra hiperpolarización mitocondrial.....	119
2.7. El mutante <i>ptc1Δ</i> a 38 °C se encuentra en un estado de estrés oxidativo	122
2.8. La inhibición de la actividad quinasa de Slt2 reduce la hiperpolarización mitocondrial y el estrés oxidativo del mutante <i>ptc1Δ</i> a 38 °C.....	123
2.9. Las células multigemadas <i>ptc1Δ</i> muestran alteraciones en la dinámica de septinas	124
2.10. Los mutantes <i>ptc1Δ</i> no muestran alteraciones en la localización de Slt2	126
2.11. Los defectos en la separación celular del mutante <i>ptc1Δ</i> no se deben a un bloqueo de la ruta RAM	129
2.12. Las células multigemadas del mutante <i>ptc1Δ</i> no muestran quitinasa Cts1 en el septo	131
2.13. El mutante <i>ptc1Δ</i> muestra un incremento en la actividad autofágica	133
2.14. La actividad quinasa de Slt2 inhibe la ruta TORC1-Sch9	135
DISCUSIÓN	139
1. CAPÍTULO I. Caracterización de las formas monofosforiladas en T190 y en Y192 del motivo de activación TEY de Slt2: jerarquía de activación e implicaciones en su actividad .	141
1.1. La fosforilación como modificación reguladora clave de la actividad de Slt2	141
1.2. La proporción de las diferentes formas de fosforilación en el motivo TEY es característica de cada MAPK.....	142
1.3. Las fosforilaciones y desfosforilaciones en el dominio TEY de Slt2 se producen de manera secuencial y contribuyen de manera diferente a la actividad de esta MAPK	143
1.4. ¿Fosforilación distributiva o procesiva?.....	144
1.5. Más allá del motivo TEY: otros residuos y dominios importantes para la activación y para la actividad de Slt2	145
2. CAPÍTULO II. Caracterización del fenotipo de multigemación de un mutante <i>ptc1Δ</i> : efecto de la hiperactivación de Slt2	147

2.1. La citometría de flujo como metodología para el análisis del fenotipo de multigemación	147
2.2. Ptc1 determina el nivel de fosforilación de las diferentes MAPKs de <i>S. cerevisiae</i> ...	148
2.3. La funcionalidad de la ruta CWI es esencial en la manifestación de numerosos fenotipos del mutante <i>ptc1Δ</i> en presencia de estrés	150
2.4. Dinámica de localización de las septinas y de Slt2 a lo largo del ciclo de las células multigemadas <i>ptc1Δ</i>	151
2.5. La falta de Cts1 en el septo como posible causa de los defectos en la separación celular de las células multigemadas <i>ptc1Δ</i>	152
2.6. Papel de Slt2 en la herencia y en la función mitocondrial	153
2.7. Slt2 y Ptc1 como reguladores de la señalización a través de la rama TORC1-Sch9 ...	154
2.8. Implicación de Slt2 y de las septinas en la regulación de la autofagia	157
2.9. Slt2 como reguladora de la progresión del ciclo celular	158
CONCLUSIONES	161
CONCLUSIONS	165
BIBLIOGRAFÍA	169
ANEXO	191



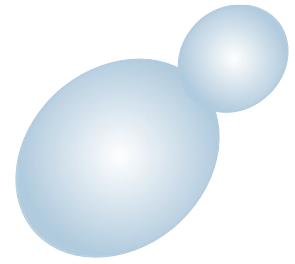
CLAVE DE ABREVIATURAS

A	
A	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNmt	ADN mitocondrial
AMP	<i>Adenosine monophosphate</i> (Adenosín monofosfato)
AMPK	<i>AMP-activated Kinase</i> (quinasa activada por AMP)
AMR	<i>actomyosin ring</i> (anillo de actomiosina)
APC	<i>Anaphase-Promoting Complex</i> (complejo promotor de anafase)
as	<i>analog sensitive</i> (sensible a análogo)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATG	<i>Autophagy-related</i> (relacionados con la autofagia)
B	
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i> (herramienta de alineamiento y búsqueda de secuencias de tipo local)
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (albúmina de suero bovina)
C	
C	Copias de ADN
CAK	<i>CDK-activating Kinase</i> (quinasa activadora de CDK)
Caf	Cafeína
CD	<i>Common Docking</i>
CDC	Ciclo de División Celular
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i> (quinasa dependiente de ciclina)
CFW	<i>Calcofluor White</i> (blanco de calcoflúor)
CHX	Cicloheximida
CKI	<i>Cyclin-dependent Kinase inhibitors</i> (inhibidores de quinasa dependientes de la ciclina)
CWI	<i>Cell Wall Integrity</i> (integridad de la pared celular)
D	
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato
DHE	Dihidroetidio
DIC	<i>Differential Interference Contrast</i> (microscopía de contraste de interferencia diferencial)
2,3-DMB-PP1	2,3-dimetilbencil-pirazol-pirimidina 1
DMSO	Dimetilsulfóxido
DSB	<i>Double-Strand Breaks</i> (roturas de doble hebra)
DSP	<i>Dual Specificity Phosphatase</i> (fosfatasa de especificidad dual)
DTT	Ditiotreitol
E	
ECO	<i>Enforcement of Cytokinesis Order</i> (cumplimiento del orden de la citoquinesis)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ERK	<i>Extracellular signal-Regulated Kinases</i> (quinasas reguladas por señales extracelulares)
ERSU	<i>Endoplasmic Reticulum Stress Surveillance</i> (supervivencia al estrés del retículo endoplasmático)

F	FEAR	<i>Cdc Fourteen Early Anaphase Release</i> (liberación de Cdc catorce al comienzo de la anafase)
G	GAP	<i>GTPase-activating protein</i> (proteína activadora de GTPasa)
	GDP	<i>Guanosine Diphosphate</i> (guanosín difosfato)
	GEF	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i> (factor intercambiador de nucleótidos de guanina)
	GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> (proteína verde fluorescente)
	GTP	<i>Guanosine Triphosphate</i> (Guanosín trifosfato)
H	h	horas
	HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i> (alta osmolaridad por glicerol)
J	JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i> (quinasa c-Jun N-terminal)
K	KD	<i>Kinase Dead</i> (catalíticamente inactivo)
M	mAb	<i>monoclonal Antibody</i> (anticuerpo monoclonal)
	MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i> (proteína quinasa activada por mitógenos)
	MAPKAPK	<i>MAPK-activated protein kinases</i> (proteínas quinasas activadas por MAPK)
	MAPKK/MAP2K/MEK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i> (MAPK quinasa)
	MAPKKK/MAPK3K/MEKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i> (MAPK quinasa quinasa)
	MBF	<i>MCB-Binding Factor</i> (factor de unión a MCB)
	MCB	<i>MBF Cell-cycle Box</i> (lugar de unión para MBF)
	mCh	<i>mCherry</i> (proteína monomérica rojo cereza fluorescente)
	MEN	<i>Mitotic Exit Network</i> (ruta de salida de mitosis)
	min	minutos
	MKP	<i>MAPK Phosphatase</i> (fosfatasa de MAPK)
	mNG	<i>mNeonGreen</i> (proteína monomérica amarillo-verde fluorescente)
	MOPS	3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico
	MP	Membrana Plasmática
N	NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> (centro nacional para la información biotecnológica)
	NCR	<i>Nitrogen-Catabolite Repression</i> (represión catabólica por nitrógeno)
	NES	<i>Nuclear Export Sequence</i> (secuencia de exportación nuclear)
	nm	nanometros
	np	no fosforilada
	ns	no significativo
O	ONPG	Orto-nitrofenil-β-D-galactopiranósido

P		
	PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida)
	PAS	<i>Pre-Autophagosomal Structure</i> (estructura preautofagósomica)
	PBS	<i>Phosphate-buffered saline</i> (tampón fosfato salino)
	PBS-T	<i>PBS-Tween 20</i>
	PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
	PI	<i>Propidium Iodide</i> (Yoduro de Propidio)
	PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3- Kinase</i> (Fosfatidilinositol 3-quinasa)
	PI3P	Fosfatidilinositol-3 fosfato
	PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
	PP2Ac	Subunidades catalíticas de la proteína fosfatasa 2A
	PP2C	<i>Protein Phosphatase 2C</i> (proteína fosfatasa 2C)
	PSA	Persulfato de amonio
	PTP	<i>Protein Tyrosine Phosphatases</i> (tirosín fosfatasa)
R		
	RAM	<i>Regulation of Ace2 activity and cellular Morphogenesis</i> (regulación de la actividad de Ace2 y de la morfogénesis celular)
	rapa	rapamicina
	RE	Retículo Endoplasmático
	REc	RE cortical
	RC	Rojo Congo
	Rh 123	Rodamina 123
	Rho	<i>Ras homologous</i> (homólogo a Ras)
	ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas de oxígeno)
	rpm	revoluciones por minuto
S		
	SAC	<i>Spindle Assembly Checkpoint</i> (punto de control del ensamblaje del huso)
	SBF	<i>SCB-Binding Factor</i> (factor de unión a SCB)
	SCB	<i>SBF Cell-cycle Box</i> (lugar de unión a SBF)
	SD	<i>Selective Synthetic Dextrose</i> (medio selectivo sintético dextrosa)
	SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecilsulfato sódico)
	seg	segundos
	SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i> (Bases de datos del genoma de <i>S. cerevisiae</i>)
	SPB	<i>Spindle Pole Body</i> (cuerpo polar del huso)
	SPOC	<i>Spindle Position Checkpoint</i> (punto de control del posicionamiento del huso)
	SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i> (pequeño modificador similar a la ubiquitina)
T		
	t	tiempo
	T	Temperatura

	TAD	<i>Transcriptional Activation Domain</i> (dominio de activación transcripcional)
	TCA	<i>Trichloroacetic acid</i> (ácido tricloroacético)
	TEMED	Tetrametiletilendiamina
	TOR	<i>Target Of Rapamycin</i> (diana de rapamicina)
	TORC	<i>TOR Complex</i> (complejo TOR)
	tuni	tunicamicina
U		
	U.A.	Unidades Arbitrarias
	UV	ultravioleta
V		
	V	voltios
W		
	Wb	<i>Western blotting</i>
	WT	<i>Wild Type</i> (Fenotipo silvestre)
Y		
	YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i> (extracto de levadura peptona dextrosa)
Z		
	zim	zimoliasa



RESUMEN

Activación de la MAPK de *Saccharomyces cerevisiae* Slt2: mecanismo molecular e implicación en el fenotipo de multigemación de células carentes de la fosfatasa Ptc1

Introducción

Las rutas de señalización mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) juegan un papel fundamental en la regulación de procesos esenciales en eucariotas. La MAPK de la ruta de integridad celular (CWI) de *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 resulta esencial para la respuesta compensatoria frente al daño sobre la pared celular. La activación total de las MAPKs depende de la fosforilación dual de los residuos de treonina y de tirosina del motivo TXY de su bucle de activación (T190-E-Y192 en Slt2). Sin embargo, en muchos casos, las fosforilaciones individuales en estas posiciones pueden tener funciones diversas que son, en su mayoría, desconocidas. La proteína fosfatasa Ptc1 regula la señalización a través de la ruta CWI, así como una amplia gama de funciones celulares, de modo que las células carentes de Ptc1 muestran hiperfosforilación de Slt2 y defectos en la separación celular, entre otras alteraciones. La separación celular está supeditada a la entrada del factor de transcripción Ace2 al núcleo de la célula hija y a la consiguiente expresión de genes como *CTS1* y *DSE1*. La delección de *MKK1*, que codifica la principal MAPKK de Slt2, atenúa muchos de los defectos mostrados por el mutante *ptc1Δ*. Sin embargo, los mecanismos reguladores subyacentes a estas alteraciones son desconocidos.

Objetivos

1. Caracterizar la dinámica de fosforilación y desfosforilación de la T190 y de la Y192 del motivo TEY de Slt2 y el efecto que tienen las fosforilaciones individuales en dichas posiciones, así como otros residuos y dominios propuestos como relevantes en la funcionalidad de otras MAPKs, sobre la actividad de Slt2.
2. Caracterizar el fenotipo de multigemación de las células *ptc1Δ* sometidas a estrés térmico y la contribución de la actividad de la ruta CWI a las alteraciones mostradas por este mutante.

Resultados

El uso combinado de anticuerpos específicos para los sitios de fosforilación del motivo TEY y el análisis de afinidad por fosfato (*Phos-tag*), reveló la existencia de cuatro estados diferentes de fosforilación de Slt2 en las células de *S. cerevisiae* (monofosforilada en T190, monofosforilada en Y192, doblemente fosforilada y no fosforilada), siendo la no fosforilada mucho más abundante en todas las condiciones

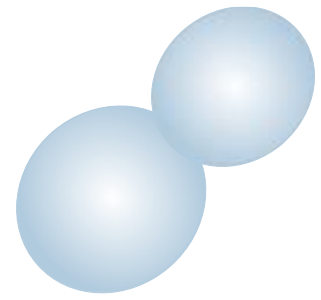
ensayadas. La Y192 resultó fundamental para la subsiguiente fosforilación y desfosforilación de la T190 de Slt2 por parte de las MAPKKs activadoras Mkk1/2 y de la fosfatasa Msg5, respectivamente. La versión monofosforilable en la T190 mostró una actividad biológica y catalítica parcial. La mutación del residuo conservado T195, cercano al motivo TEY, afectó a la funcionalidad de Slt2, pero no a su localización nuclear. Las versiones mutantes de Slt2 con una actividad reducida Slt2^{T190A}, Slt2-KD, Slt2^{T195V} y Slt2^{T195V Y198F} mostraron un incremento en la fosforilación de la Y192.

Los mutantes *ptc1Δ* en condiciones de estrés térmico manifestaron defectos en la separación celular y en la señalización a través de la ruta TORC1-Sch9, así como hiperpolarización mitocondrial y acumulación de ROS. La inhibición de la actividad quinasa de Slt2, utilizando una versión sensible a análogos de ATP (Slt2-as), redujo de manera significativa estas alteraciones fenotípicas. Asimismo, en las células *ptc1Δ* sometidas a estrés térmico, se produjo un incremento en la actividad autofágica y las septinas de las células hijas se relocalizaron en regiones corticales, donde formaron puntos y anillos no canónicos, algunos de los cuales co-localizaron con la proteína autofágica Atg9. Utilizando proteínas fusionadas a GFP, se observó que en las células multigemadas *ptc1Δ* el factor de transcripción Ace2 se translocó al núcleo de las hijas. Sin embargo, a diferencia de Dse1, la endoquitinasa Cts1, no se encontró localizada en el septo.

Conclusiones

1. La fosforilación y desfosforilación de la MAPK de la ruta CWI Slt2 en su motivo de activación TEY por sus proteínas activadoras Mkk1/2 y por la proteína fosfatasa Msg5, respectivamente, es un proceso ordenado, que comienza por la Y192, la cual actúa como punto inicial de regulación de su activación.
2. La fosforilación en la T190 es imprescindible para la actividad catalítica y biológica de Slt2, si bien la fosforilación de la Y192 es necesaria para que alcance su máxima actividad.
3. La reducción de la actividad catalítica de Slt2 conduce a un incremento en los niveles de fosforilación de la Y192 de esta MAPK, lo que refleja una mayor señalización a través de la ruta.
4. En las células de *S. cerevisiae* coexiste la forma de Slt2 doblemente fosforilada en el motivo TEY con las monofosforiladas en la T190 o en la Y192 y con la forma no fosforilada, siendo esta última mucho más abundante, incluso en condiciones de estimulación de la ruta CWI.

-
5. El dominio CD de Slt2 colabora, pero no es esencial en la interacción de esta MAPK con sus proteínas activadoras Mkk1/2 y con el factor de transcripción Rlm1.
 6. En condiciones de activación de la ruta CWI, la serín/treonín fosfatasa Ptc1 es necesaria para la correcta separación celular y para la progresión del ciclo de las células hijas en la fase G₁.
 7. La ausencia de Ptc1 sumada al estrés térmico provoca un incremento en los niveles de fosforilación de Slt2 que no se observa en el resto de las MAPKs de *S. cerevisiae*.
 8. Los defectos en el crecimiento y en la separación celular, así como la hiperpolarización mitocondrial y el incremento de ROS causados por la carencia de Ptc1 en condiciones de estrés térmico, requieren la actividad quinasa de Slt2, evidenciando la necesidad de la hiperactivación de la ruta CWI para que se manifiesten estas alteraciones.
 9. El fenómeno de multigemación que ocurre en el mutante *ptc1Δ* sometido a estrés térmico no se debe a un bloqueo en la ruta MEN de salida del ciclo mitótico, pero se acompaña de una pérdida de localización de la endoquitinasa Cts1 en los septos que explicaría, al menos en parte, el defecto en la separación celular.
 10. La alteración en la dinámica de septinas mostrada exclusivamente por las yemas de las células multigemadas *ptc1Δ* es compatible con la biogénesis de autofagosomas y con el incremento en la actividad autofágica observada.
 11. La hiperactivación de Slt2 en las células multigemadas *ptc1Δ* inhibe la señalización de la ruta TORC1 hacia Sch9, lo que podría contribuir a la parada del ciclo de las células hijas en la fase G₁.



SUMMARY

Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* MAPK Slt2: molecular mechanism and involvement in the multibudding phenotype in cells lacking Ptc1 phosphatase

Introduction

Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways plays a fundamental role in regulating essential processes in eukaryotic cells. Slt2, the MAPK of the *Saccharomyces cerevisiae* Cell Wall Integrity (CWI) pathway, is necessary for the compensatory response against cell wall damage. MAPK full activation requires dual phosphorylation at both the threonine and tyrosine of the conserved TXY motif within the activation loop (T190-E-Y192 in Slt2). However, in many cases, monophosphorylated forms have different roles that remain unknown. The protein phosphatase Ptc1 regulates signaling through the CWI pathway, as well as a wide range of cellular functions. Hence, cells lacking Ptc1 exhibit Slt2 hyperphosphorylation and cell separation defects, among others. Cell separation requires Ace2 entry to daughter cell nuclei and subsequent expression of genes such as *CTS1* and *DSE1*. Deletion of *MKK1*, encoding the main MAPKK acting on Slt2, abolishes many of the alterations displayed by *ptc1Δ* cells. Nevertheless, the regulatory mechanisms underlying these alterations are still unknown.

Objectives

1. To characterize the phosphorylation and dephosphorylation dynamics at T190 and Y192 of Slt2 in the TEY motif, and the effect on Slt2 activity of individual phosphorylations at these positions and that of other domains and residues that have been proposed to be relevant for different MAPKs.
2. To characterize the multibudding phenotype of *ptc1Δ* cells exposed to heat stress, and the contribution of the CWI pathway activity to the alterations shown by this mutant strain.

Results

The combined use of phosphospecific antibodies and phosphate-affinity (*Phos-tag*) analysis, revealed the existence of four different phosphorylation states of Slt2 in *S. cerevisiae* cells (T190- and Y192-monophosphorylated, bisphosphorylated, and non-phosphorylated species). The non-phosphorylated form was largely the most abundant for all conditions tested. The Y192 was fundamental for both subsequent T190 phosphorylation and dephosphorylation by Mkk1/Mkk2 activating MAPKKs and by Msg5 phosphatase, respectively. The T190 monophosphorylatable version showed partial

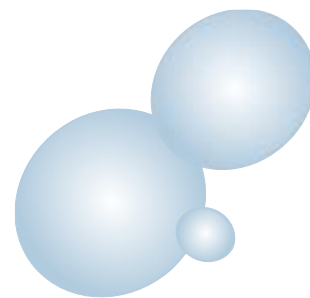
biological and catalytic activity. The mutation of the conserved residue T195, close to the TEY motif, affected the functionality of Slk2 but not its nuclear localization. Mutant versions of Slk2 with reduced catalytic activity, Slk2^{T190A}, Slk2-KD, Slk2^{T195V} y Slk2^{T195V Y198F}, exhibited increased phosphorylation at Y192.

Upon heat stress, *ptc1Δ* mutants displayed defects in cell separation and in signaling through the TORC1-Sch9 pathway, as well as mitochondrial hyperpolarization and ROS accumulation. Inhibition of Slk2 kinase activity by using an ATP analog-sensitive version (Slk2-as) significantly reduced these phenotypic traits. Furthermore, in *ptc1Δ* cells subjected to heat stress, there was an increase in autophagic activity, and the septins of daughter cells re-localized to the cortical regions, where they formed dots and non-canonical septin rings, some of which co-localized with the autophagic protein Atg9. By using GFP-fused proteins, we observed that the Ace2 transcription factor translocated to the nucleus of daughter cells in *ptc1Δ* multibudded cells. However, unlike Dse1, the endochitinase Cts1 was not found in the septum.

Conclusions

1. Phosphorylation and dephosphorylation of the TEY motif within the activation loop of Slk2, the MAPK of the CWI pathway, respectively catalyzed by activating proteins Mkk1/Mkk2 and Msg5 protein phosphatase, involves an ordered mechanism, which initiates at the Y192 residue.
2. Whereas T190 is essential for the catalytic and biological activity of Slk2, Y192 is necessary for the MAPK to reach its maximum activity.
3. Reduction of Slk2 catalytic activity leads to higher Y192 phosphorylation levels, indicating increased signaling through the CWI pathway.
4. In *S. cerevisiae* cells, T190- and Y192-monophosphorylated species coexist with bisphosphorylated Slk2, although most of the Slk2 pool remains unphosphorylated, even following cell wall stress.
5. Although the CD domain of Slk2 participates in the interaction of this MAPK with both Mkk1/2 activating proteins and Rlm1 transcription factor, it is not essential for binding.
6. Upon CWI activation, Ptc1 serine/threonine phosphatase is required for cell separation and cell cycle progression through G₁ in daughter cells.

-
7. Under heat stress, the lack of Ptc1 causes an increase in Slt2 phosphorylation levels, which is not observed in other *S. cerevisiae* MAPKs.
 8. Defects in growth and cell separation, as well as mitochondrial hyperpolarization and increase in ROS caused by the absence of Ptc1 upon heat stress, require Slt2 kinase activity, thus reflecting the involvement of CWI hyperactivation in such alterations.
 9. The multibudding phenotype developed by *ptc1Δ* mutants subjected to heat stress is not due to mitotic exit arrest exerted by the MEN pathway but involves the loss of Cts1 endochitinase localization at the septa. This would explain, at least partially, the cell separation defect.
 10. Altered septin dynamics exclusively shown by the buds in *ptc1Δ* multibudded cells is consistent with autophagosome biogenesis and the observed increase in autophagic activity.
 11. Hyperactivation of Slt2 in *ptc1Δ* multibudded cells inhibits signaling through the Sch9 branch of the TORC1 pathway, which could contribute to the cell cycle arrest in G₁ observed in daughter cells.



INTRODUCCIÓN

1. *Saccharomyces cerevisiae*, una levadura clave para la Ciencia

Desde su aislamiento, a finales del siglo XIX, *S. cerevisiae* se ha convertido en una herramienta fundamental para el avance del conocimiento científico. Inicialmente destacó como organismo modelo para el estudio de procesos biológicos en células eucarióticas y más tarde se convirtió en el organismo pionero que facilitó el establecimiento de la biología de sistemas (Botstein y Fink, 2011). El éxito de *S. cerevisiae* reside en dos aspectos fundamentales. En primer lugar, se trata de un microorganismo inocuo, de crecimiento rápido y fácil de mantener y de manipular en el laboratorio. Además, debido a que posee un pequeño genoma, fue el primer organismo eucariótico en ser secuenciado en su totalidad (Goffeau *et al.*, 1996). Todo esto contribuyó a que, a lo largo del siglo XX, se desarrollaran numerosas colecciones de cepas que siguen constituyendo potentes infraestructuras de investigación. En segundo lugar, el éxito de *S. cerevisiae* se debe al alto grado de conservación que existe entre las levaduras y las células humanas a tres niveles: (i) a nivel genético, de manera que casi la mitad de los genes esenciales en la levadura pueden ser sustituidos por su ortólogo humano, (ii) a nivel de procesos celulares clave, como el ciclo celular o la autofagia y (iii) a nivel de rutas de señalización esenciales, tales como las rutas de TOR (del inglés, *Target Of Rapamycin*), o las de MAPKs (del inglés, *Mitogen Activated Protein Kinases*) (Mohammadi *et al.*, 2015). Todo ello ha contribuido a que, en los últimos años, esta levadura de gemación haya resurgido como una potente plataforma biológica de cribado químico y genético con infinitas posibilidades (Outeiro y Giorgini, 2006; Zimmermann *et al.*, 2018).

2. El ciclo biológico de *S. cerevisiae*

S. cerevisiae muestra un ciclo biológico en el que puede alternar fases de reproducción sexual y asexual. Durante el ciclo sexual, dos células haploides de diferente tipo, a y α , se fusionan y dan lugar a una célula diploide a/α . En presencia de los nutrientes necesarios, las células diploides se dividen por mitosis, pero en condiciones limitantes de carbono y de nitrógeno éstas sufren una meiosis, formando esporas que germinarán dando lugar a células haploides cuando las condiciones ambientales sean favorables (Madhani, 2007). El ciclo de reproducción asexual, comúnmente llamado ciclo celular, tiene como finalidad la división de una célula para generar dos células con la misma dotación genética. En *S. cerevisiae* el proceso de división celular está muy conservado con respecto al del resto de los eucariotas, con la salvedad de que durante la mitosis su envuelta nuclear no se desintegra y de que la célula hija surge por gemación (Hartwell *et al.*, 1974). El ciclo celular se divide en cuatro fases secuenciales: G_1 , S, G_2 y M (Figura 1). Durante la fase G_1 , la célula hija recién separada crece hasta alcanzar un

tamaño significativamente mayor. A continuación, en la fase S (de Síntesis de ADN) se produce la duplicación cromosómica y comienza a desarrollarse la yema, que continúa creciendo durante la fase G_2 hasta la fase M (de Mitosis), momento en el que las dos cromátidas de cada uno de los 16 cromosomas son arrastradas hacia los polos opuestos del núcleo y se produce el reparto del material genético nuclear entre la célula madre y la hija. Las fases G_1 y G_2 se llaman así porque son transiciones (del inglés, *Gaps*) entre las fases S y M. La división nuclear, seguida de la celular, da lugar a dos células con la misma dotación cromosómica (Madhani, 2007) (Figura 1).

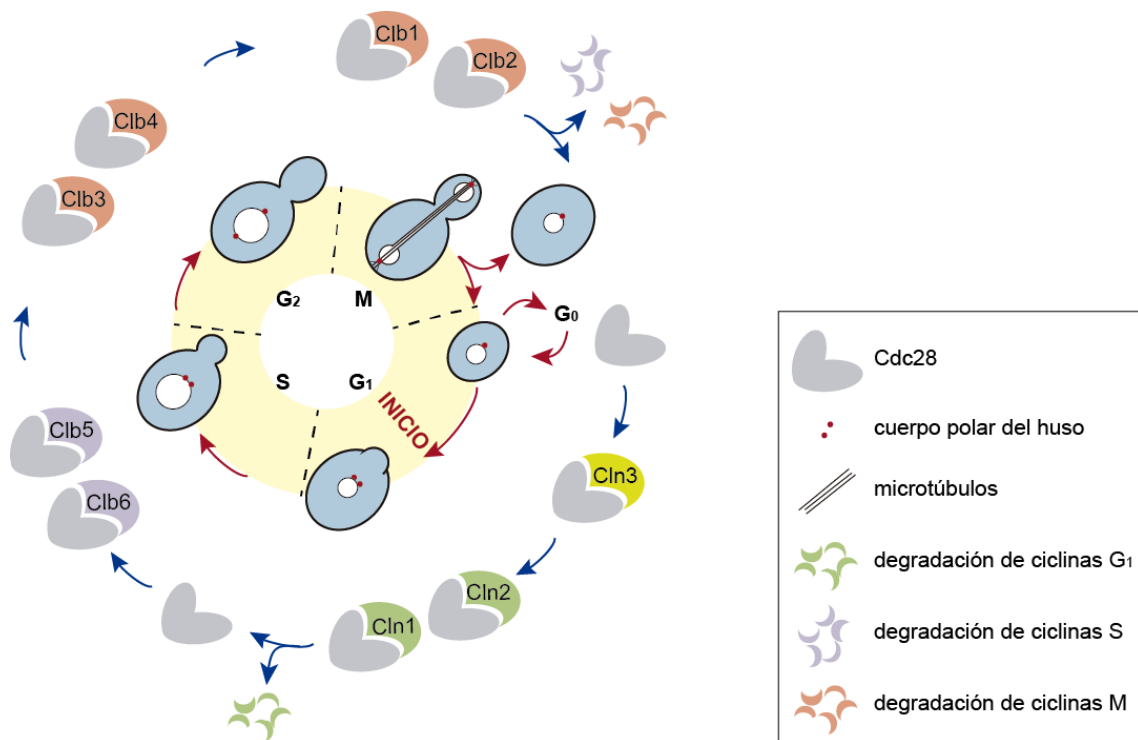


Figura 1. Esquema de la regulación del ciclo celular de *S. cerevisiae* por la formación de los diferentes complejos ciclinas-CDK.

2.1. Regulación del ciclo celular

La progresión a lo largo del ciclo celular está determinada por eventos de fosforilación proteica en los que las quinasas dependientes de ciclina o CDKs (del inglés, *Cyclin Dependent Kinases*) son las principales reguladoras. Las CDKs son serín/treonín quinasas que necesitan formar un complejo con las ciclinas para tener actividad. En *S. cerevisiae* se conocen seis CDKs: Cdc28, Pho85, Kin28, Ssn3, Ctk1 y Bur1. De todas ellas, Cdc28 es la que juega el papel principal en el control del ciclo celular (Enserink y Kolodner, 2010). A lo largo de este último y de manera periódica, Cdc28 interacciona con nueve ciclinas diferentes, formando complejos funcionales que fosforilan a otras proteínas, conduciendo así a la progresión del ciclo celular (Enserink y Kolodner, 2010).

(Figura 1). La actividad de los complejos ciclinas-CDKs se regula mediante diferentes mecanismos. En primer lugar, las CDKs sufren fosforilaciones en residuos aminoacídicos específicos que pueden incrementar o reducir su actividad. En el caso de Cdc28, la fosforilación en la T169 por parte de la quinasa activadora de CDKs o CAK (del inglés, *CDK-Activating Kinase*) Cak1, resulta necesaria para lograr una activación plena de la quinasa. Sin embargo, la fosforilación en la Y19, catalizada por Swe1, es inhibitoria. Este residuo es, a su vez, desfosforilado por la fosfatasa Mih1, la cual contribuye de esta manera a la activación de Cdc28. En segundo lugar, los inhibidores de quinasas dependientes de ciclinas o CKIs (del inglés, *Cyclin-dependent Kinase Inhibitors*) Far1 y Sic1 se unen a los complejos ciclina-CDK, impidiendo la interacción de Cdc28 con sus sustratos. Ambos CKIs son estables exclusivamente durante la fase G₁, pero mientras que Far1 inhibe los complejos Cln-Cdc28 al inicio del ciclo celular, especialmente en presencia de feromonas, Sic1 (ver apartado 2.1.1) inhibe los complejos Clb-Cdc28 (Enserink y Kolodner, 2010). Finalmente, cabe destacar el papel de las fosfatasas, cuya acción coordinada con las quinasas resulta fundamental para establecer la amplitud, localización y tiempo de las señales de fosforilación, tres factores que resultan clave en el avance del ciclo celular (Gelens *et al.*, 2018).

A diferencia de *CDC28* que es esencial, *PHO85* sólo es necesaria para la viabilidad celular cuando la actividad de Cdc28 está comprometida (Huang *et al.*, 2007). Pho85, que se asocia con diez ciclinas diferentes, regula numerosas funciones biológicas, que incluyen el metabolismo del fosfato y del glucógeno, la señalización de cambios ambientales o el control de la polaridad y del ciclo celular (Jiménez *et al.*, 2013). La mayoría de los sustratos de Pho85 que tienen un papel en la regulación del ciclo celular son también dianas de Cdc28. Esto sugiere que ambas CDKs podrían regular procesos similares pero en situaciones diferentes (Huang *et al.*, 2007), lo que contribuiría a garantizar la flexibilidad de la respuesta y, en definitiva, la supervivencia celular (Jiménez *et al.*, 2013).

2.1.1. Regulación del inicio y del avance del ciclo celular

En *S. cerevisiae* el punto de INICIO en la fase G₁ marca el momento del ciclo celular en el que la levadura comienza una nueva ronda de gemación (Cross, 1995; Hartwell *et al.*, 1974) (Figura 1). Se trata de un punto de transición de no retorno que, una vez traspasado, compromete a la célula a terminar el ciclo, independientemente de las señales ambientales que reciba a lo largo del mismo. Por eso, antes de sobrepasarlo irreversiblemente, la célula tiene que integrar las señales internas y ambientales para decantarse por comenzar un nuevo ciclo, entrar en quiescencia (G₀), o seguir un programa de desarrollo alternativo como crecer formando filamentos, aparearse con

otra célula, o esporular (Cullen y Sprague, 2012). El INICIO implica la activación de un programa transcripcional que conlleva la expresión periódica de cientos de genes, dentro de los que se incluyen los propios reguladores del ciclo celular (Haase y Wittenberg, 2014). Al comienzo del ciclo celular, *S. cerevisiae* traspasa el punto de INICIO si se produce un incremento en la concentración de la ciclina Cln3 (Litsios *et al.*, 2019; Tyers *et al.*, 1993). El complejo Cdc28-Cln3 promueve la transcripción mediada por SBF (Swi4-Swi6) y por MBF (Mbp1-Swi6) de las otras dos ciclinas de la fase G₁, Cln1 y Cln2, las cuales estimulan la emergencia de la yema, la duplicación del cuerpo polar del huso o SPB (del inglés, *Spindle Pole Body*) y la activación de las ciclinas tipo B (Clb). Las ciclinas de la fase S (Clb5 y Clb6) son necesarias para que se inicie la replicación del ADN. Por su parte, las ciclinas de fase M (Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4) promueven la formación del huso mitótico y el inicio de la mitosis e inhiben la salida de la mitosis y la citoquinesis (Bloom y Cross, 2007) (Figura 1).

Otro factor importante que participa en la regulación al comienzo del ciclo celular es Sic1. Este CKI bloquea la actividad de los complejos Clb5/6-Cdc28 de la fase S, evitando que se active la replicación del ADN (Schwob *et al.*, 1994) por lo que, para que se produzca la transición G₁/S, es necesaria su degradación (Schneider *et al.*, 1996). En la regulación de la actividad de Sic1 intervienen diferentes proteínas con efectos opuestos. Por una parte, los complejos Clb1/2-Cdc28 regulan negativamente la transcripción de Sic1 al impedir, mediante una fosforilación, la entrada al núcleo del factor de transcripción Swi5, que promueve su expresión (Moll *et al.*, 1991). Además, las ciclinas Cln1/2-Cdc28 y Clb5/6-Cdc28 fosforilan a Sic1 en múltiples residuos que lo conducen a una proteólisis por ubiquitinación mediada por SCF^{Cdc4} (Deshaies y Ferrell, 2001). Por otro lado, Cdc14 revierte estos efectos, desfosforilando tanto a Swi5 como a Sic1 en la salida de la mitosis (Baro *et al.*, 2017). Además, la fosforilación de la T173 de Sic1 también juega un papel fundamental en la estabilidad de esta proteína (Zinzalla *et al.*, 2007). Se sabe que las MAPKs de las rutas HOG (del inglés, *High Osmolarity Glycerol*) y CWI (del inglés, *Cell Wall Integrity*), fosforilan este residuo en la T173, contribuyendo de esta manera a la estabilización de Sic1 (Escoté *et al.*, 2004; Moreno-Torres *et al.*, 2015). En el lado opuesto, el complejo TORC1 (del inglés, *Target Of Rapamycin Complex 1*) (ver apartado 4), participa en la degradación de Sic1 mediante dos efectos: por una parte, promueve la transcripción y la traducción de las ciclinas de la fase G₁ (Barbet *et al.*, 1996) y por otra, antagoniza la fosforilación en la T173 inhibiendo de manera indirecta a la MAPK Slt2, que opera en la ruta CWI y garantizando la desfosforilación efectiva de este residuo por parte de la proteína fosfatasa 2A PP2A^{Cdc55} (Moreno-Torres *et al.*, 2015) (Figura 2).

2.1.2. Mecanismos de regulación de la salida de la mitosis

La salida de la mitosis abarca una serie ordenada de eventos que se inician durante la anafase y finalizan con la citoquinesis. Para que ésta tenga lugar, es necesario que los complejos Cdc28-ciclinas mitóticas dejen de actuar y que se elimine la fosforilación de los sustratos de éstos (Matellán y Monje-Casas, 2020).

La fosfatasa Cdc14 es la principal reguladora de los mecanismos de salida de la mitosis en la levadura *S. cerevisiae*. Su actividad se manifiesta a diferentes niveles: (i) promoviendo la degradación de las ciclinas mediante la activación del complejo promotor de la anafase Cdh1, APC^{Cdh1} (del inglés, *Anaphase Promoter Complex*), (ii) induciendo la acumulación del inhibidor de Cdc28 Sic1 y (iii) desfosforilando a los sustratos de los complejos ciclinas mitóticas-Cdc28 (Jaspersen *et al.*, 1999; Visintin *et al.*, 1998). Para que se produzca la salida de la mitosis, Cdc14 tiene que liberarse desde el nucleolo al citoplasma mediante un proceso que tiene lugar en dos etapas que están orquestadas por dos cascadas de señalización diferentes: la ruta FEAR (del inglés, *Cdc-Fourteen Early Anaphase Release*), que promueve la liberación de Cdc14 desde el nucleolo al núcleo y la ruta MEN (del inglés, *Mitotic Exit Network*), que permite la salida de Cdc14 desde el núcleo al citoplasma (Figura 2).

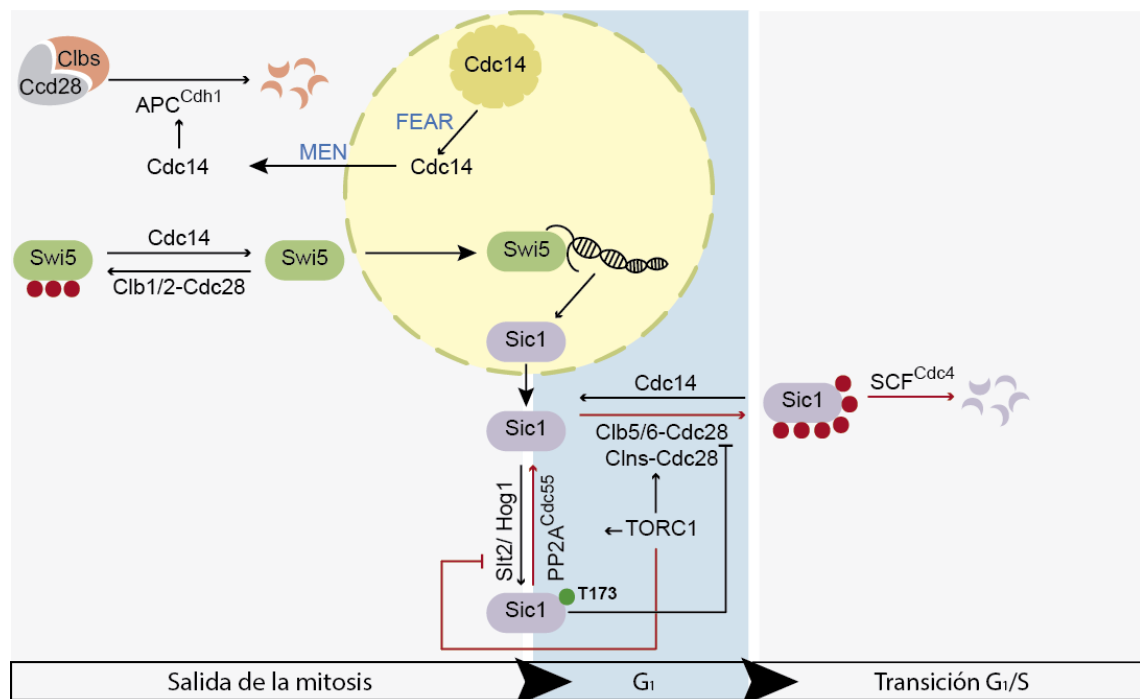


Figura 2. Papel de Cdc14, Swi5, Sic1 y de las ciclinas en la regulación de la salida de la mitosis (fondo gris), de la fase G₁ (fondo azul) y de la transición G₁/S (fondo gris). Se representa el núcleo (amarillo), el nucleolo (mostaza) y el citoplasma (gris o azul en función de la fase del ciclo). Los puntos representan fosforilaciones inhibitorias (rojo) o estabilizadoras (verde). Las medias lunas representan degradación de ciclinas mitóticas (salmón) o de Sic1 (morado).

Una vez en el citoplasma, Cdc14 promueve la salida de la mitosis y la citoquinesis, eventos fundamentales para que la célula pueda entrar posteriormente en una nueva fase G₁ (Baro *et al.*, 2017).

2.1.3. *Mecanismos de separación celular*

En *S. cerevisiae*, el proceso de separación entre la célula madre y la hija puede dividirse en dos fases: (i) citoquinesis y formación del septo y (ii) disociación celular por destrucción del septo.

2.1.3.1. *Citoquinesis y formación del septo*

La citoquinesis, que se define como el cierre completo de la membrana entre dos células que se están formando e implica la separación física del citoplasma entre ellas, se inicia con la activación de la ruta MEN. Ésta desencadena el reclutamiento de las proteínas que constituyen el anillo de actomiosina o AMR (del inglés, *Actomyosin Ring*) al cuello de la yema, donde se encuentran las septinas formando un doble anillo (ver apartado 3.1.1). A continuación, se produce la constricción del AMR, que va acompañada de la formación centrípeta del septo primario, de la incorporación localizada de membrana plasmática y, finalmente, de la abscisión de la misma (Wloka y Bi, 2012). El septo primario está compuesto por quitina, un polímero formado por residuos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces β -1,4. Su síntesis depende de la quitín sintasa Chs2, cuya secreción y transporte a través de la ruta secretora al sitio de división celular está estrechamente regulada por diferentes mecanismos que aseguran así la coordinación de la formación del septo primario con el avance del ciclo celular (Meitinger y Palani, 2016). Tras la contracción del anillo de actomiosina, se produce la incorporación, a ambos lados del septo primario, del septo secundario, cuya composición, similar a la de la pared celular, consiste principalmente en β -1,3 glucano y manoproteínas. Fks1 es la principal glucán sintasa, la cual, junto con la quitín sintasa Chs3, es reclutada al sitio de división para la formación del septo secundario (Cabib y Arroyo, 2013).

2.1.3.2. *Disociación celular por destrucción del septo: ruta RAM*

Una vez completada citoquinesis, se inicia la segunda fase de la separación celular, que consiste en la disociación de la célula madre y la hija por la destrucción del septo que las mantiene unidas. Para ello, se produce la activación, dependiente de las rutas FEAR y MEN, de un programa transcripcional denominado ruta RAM (del inglés, *Regulation of Ace2 activity and cellular Morphogenesis*). La ruta RAM se encarga de la regulación de numerosos procesos que resultan fundamentales para la viabilidad celular, tales como la expresión génica específica en la célula hija de proteínas implicadas en la separación celular. Esta ruta consta de la quinasa Kic1, que junto con

sus proteínas asociadas Sog2, Hym1 y Tao3, fosforila a Cbk1 (Figura 3). Cbk1, que es la quinasa terminal de la ruta RAM, junto con su subunidad activadora Mob2, fosforila a numerosos sustratos, siendo Ace2 uno de los mejor caracterizados (Brace *et al.*, 2011; Nelson *et al.*, 2003; Saputo *et al.*, 2012). Ace2 es un factor de transcripción parálogo a Swi5 que se encarga de la expresión de los genes implicados en la separación celular (Weiss, 2012). A pesar de expresarse durante la fase G₂ (Koch y Nasmyth, 1994), su activación se limita al periodo del ciclo celular comprendido entre las fases M y G₁ de las células hijas recién nacidas.

Al comienzo de la anafase, Cbk1-Mob2 y Ace2 se encuentran inhibidos por fosforilaciones causadas por los complejos Clb-Cdc28. La activación de la ruta FEAR promueve la fosforilación de Cbk1 por parte de los componentes superiores de la ruta RAM. Al final de la anafase y durante la telofase, la activación de MEN provoca la liberación de Cdc14 al citoplasma, donde esta fosfatasa elimina las fosforilaciones inhibitorias de Cbk1 y de Ace2, permitiéndoles la entrada al núcleo justo antes de la citokinesis, cuando las células madre e hija aún están conectadas por el citoplasma (Brace *et al.*, 2011; Mazanka *et al.*, 2008). Una vez en el interior del núcleo, Ace2 es fosforilado por Cbk1 en los residuos S122 y S137, que se encuentran dentro de su secuencia de exportación nuclear NES (del inglés *Nuclear Export Sequence*) y en la S436, promoviendo su acumulación en el núcleo de la célula hija y estabilizando su interacción con el ADN diana, respectivamente (Mazanka *et al.*, 2008) (Figura 3).

De esta manera, en ausencia de señalización por parte de la ruta RAM, Ace2 no se localiza en el núcleo de la célula hija, por lo que no se promueve la expresión de los genes implicados en la separación celular y las células, incapaces de separarse, crecen formando grupos en los que las madres y las hijas están conectadas por el septo primario (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003; Weiss *et al.*, 2002). El mecanismo que regula la inactivación de Ace2 aún se desconoce, pero se sabe que, tras la separación celular, se produce una disminución de los niveles de Ace2 presentes en el núcleo, que va acompañada de una caída en la transcripción de sus genes diana (Sbia *et al.*, 2008). Dentro de los genes cuya expresión está regulada por Ace2 se encuentran *CTS1*, *CTS13*, *PRY3*, *SCW11*, *DSE1*, *DSE2*, *DSE3* Y *DSE4* (Colman-Lerner *et al.*, 2001) (Figura 3). La función de algunos de estos genes está muy bien caracterizada. Es el caso de la endoquitinasa Cts1, que es la principal enzima encargada de la degradación de la quitina del septo primario (Kuranda y Robbins, 1991).

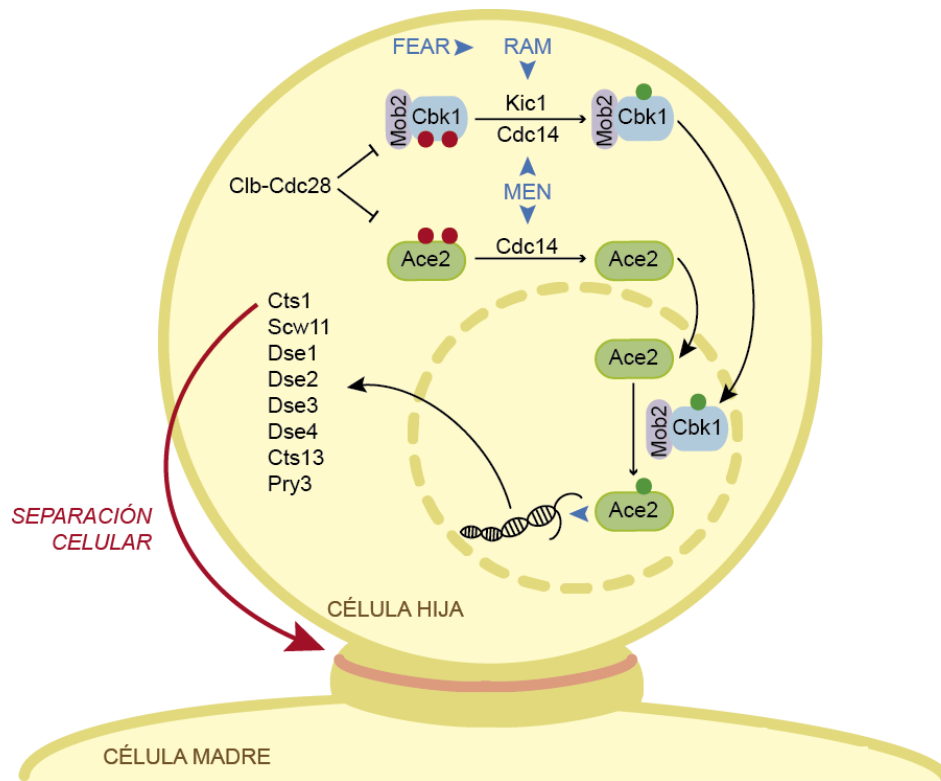


Figura 3. Regulación de la separación celular por las rutas FEAR, MEN y RAM. Los puntos representan fosforilaciones inhibitorias (rojo) o activadoras (verde) y la línea naranja el septo primario.

Otras enzimas, como Dse2, Scw11 o Dse4 actúan como glucanasas que ayudan a degradar la pared celular del lado de la célula hija (Baladrón *et al.*, 2002; Colman-Lerner *et al.*, 2001). Aunque la función precisa de Dse1 aún se desconoce, se ha sugerido que esta proteína también podría estar involucrada en la separación celular y en la selección del sitio de gemación (Doolin *et al.*, 2001; Frydlova *et al.*, 2009). Una vez separadas, las células madre e hija comienzan un nuevo ciclo celular.

2.1.4. Puntos de control del ciclo celular

El ciclo celular está estrechamente monitorizado por puntos de control (*checkpoints*), que son rutas reguladoras que detienen temporalmente la transición a la fase siguiente del ciclo en células que no han completado con éxito el paso anterior, brindándoles a éstas una oportunidad para corregir los errores (Hartwell y Weinert, 1989). Aunque el modelo inicial postulaba que estas rutas de señalización controlaban procesos independientes, cuyo objetivo era regular el ciclo celular, en la actualidad se sabe que dichas rutas controlan muchos otros aspectos del metabolismo de la célula, por lo que el término "*checkpoint*" se usa de una manera mucho más amplia de lo que se pretendía inicialmente (Rhind y Russell, 2012). Estos puntos de control, que regulan tanto el contenido genético, como la herencia de ciertos componentes citoplasmáticos (Niwa, 2020), pueden bloquear el ciclo celular en diferentes etapas del mismo,

destacando las paradas en la transición G_1/S , durante la fase S, en la transición G_2/M , antes de que se produzca la salida de la mitosis (concretamente entre la metafase y la anafase) con anterioridad a la citoquinesis o previa a la disociación celular (Figura 4).

2.1.4.1. Puntos de control del ADN

Los puntos de control del ADN pueden dividirse en dos tipos: los que tratan de garantizar una replicación completa y precisa del contenido genético (puntos de control de daño en ADN) y aquéllos cuya finalidad es que se produzca una segregación correcta del mismo. Los puntos de control de daño en ADN permiten detectar y reparar roturas de doble hebra o DSB (del inglés, *Double-Strand Breaks*) con el objetivo de garantizar la integridad genómica. En *S. cerevisiae* los puntos de control de daño en ADN operan en tres etapas diferentes a lo largo del ciclo celular: (i) en la transición G_1/S , para reparar lesiones que se hayan producido en el ADN antes de que éste comience a replicarse; (ii) dentro de la fase S, disminuyendo la tasa de replicación en respuesta al daño en ADN para coordinar los mecanismos de reparación de la horquilla y la progresión del ciclo celular, con el objetivo de asegurar la fidelidad y la finalización de la replicación antes de que las células entren en la mitosis y (iii) en la transición metafase-anafase, evitando que las células culminen la mitosis en presencia de daño en el ADN (Finn *et al.*, 2012) (Figura 4).

Dentro de los puntos de control que regulan una correcta segregación del ADN destacan tres, los cuales actúan en dos etapas distintas del ciclo celular. En primer lugar, el punto de control morfogénico retrasa la entrada en mitosis para que no se produzca la división nuclear antes de que haya emergido la yema, evitando así la formación de células binucleadas (Lew y Reed, 1995) (Figura 4). De esta manera, en presencia de estreses que afectan a la gemación, tales como las perturbaciones que alteran tanto la polarización de la actina (McMillan *et al.*, 1998) como el ensamblaje de las septinas (Barral *et al.*, 1999; Shulewitz *et al.*, 1999), se produce un incremento en la estabilidad y en la cantidad de la quinasa Swe1, que fosforila la Y19 de Cdc28, inhibiendo la transición G_2/M (Keaton y Lew, 2006). En segundo lugar, existen dos puntos de control de segregación del ADN que controlan la salida de la mitosis, tratando de prevenir que se produzca la separación celular antes de que los cromosomas se hayan distribuido de manera equitativa entre la célula madre y la hija: (i) el punto de control de ensamblaje del huso o SAC (del inglés, *Spindle Assembly Checkpoint*), que retrasa la transición metafase-anafase cuando los cinetocoros de los cromosomas no se encuentran unidos correctamente al huso mitótico y (ii) el punto de control del posicionamiento del huso o SPOC (del inglés, *Spindle POsition Checkpoint*), que pospone la salida de la mitosis hasta que el huso se encuentre correctamente posicionado y alineado, paralelo al eje de

polaridad de la célula madre-hija y perpendicular al plano de citokinesis (Matellán y Monje-Casas, 2020) (Figura 4).

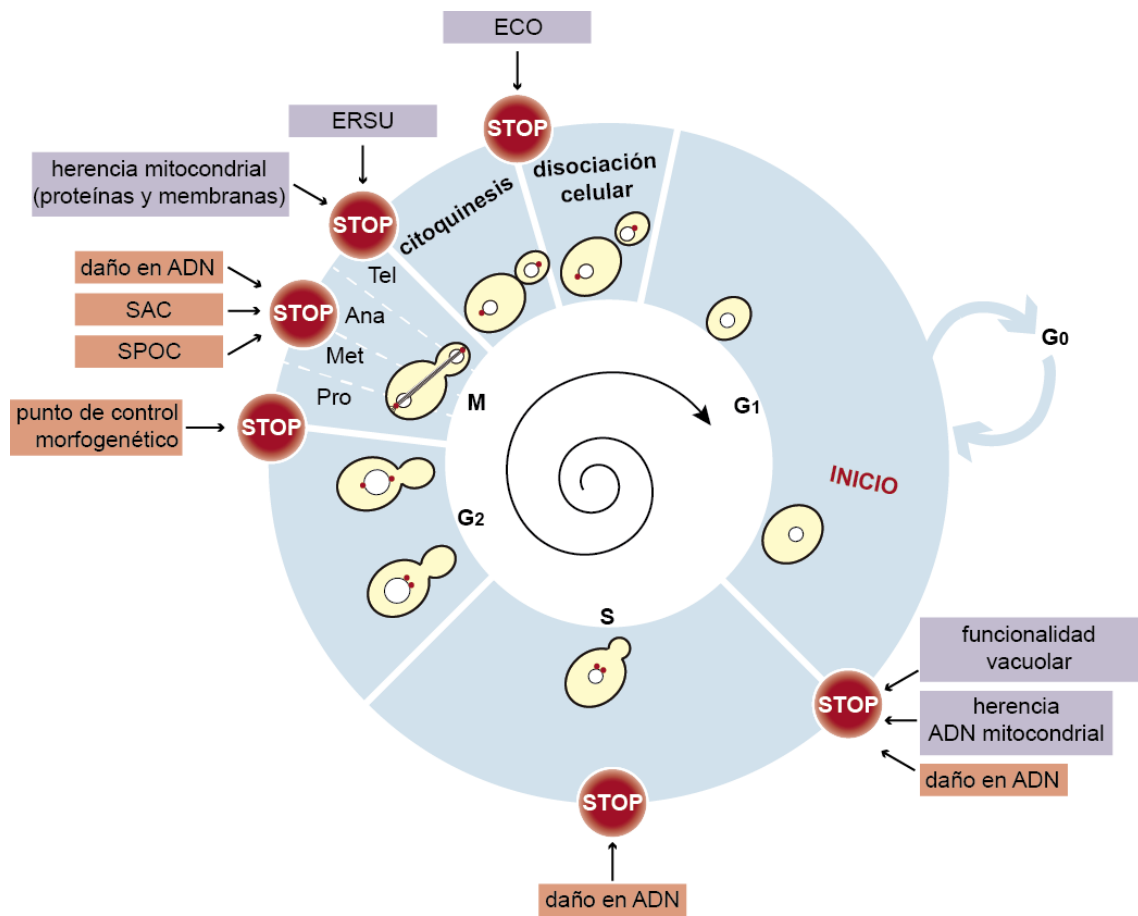


Figura 4. Puntos de control del ADN, de los orgánulos y de la separación celular a lo largo de las diferentes fases del ciclo de *S. cerevisiae*. La mitosis (M) se muestra dividida en profase (Pro), metafase (Met), anafase (Ana) y telofase (Tel). Se indican los puntos de control del ADN (salmón) y de orgánulos y de separación celular (morado), donde SAC, SPOC, ERSU y ECO son los puntos de control del ensamblaje del huso, del posicionamiento del huso de estrés del RE y del orden de la citokinesis, respectivamente.

2.1.4.2. Puntos de control de orgánulos y de separación celular

A lo largo del ciclo celular de *S. cerevisiae*, también existen puntos de control que tratan de asegurar que la célula hija presente ciertos componentes citoplasmáticos que resultan esenciales para la viabilidad de la levadura, tales como el Retículo Endoplasmático (RE), las mitocondrias o las vacuolas (Niwa, 2020).

El RE no puede sintetizarse *de novo*, es necesario que a lo largo del ciclo celular exista un punto de control que asegure la correcta transferencia de un RE funcional a la célula hija. Este punto de control se denomina ruta ERSU (del inglés, *Endoplasmic Reticulum Stress Surveillance*) y actúa bloqueando la citokinesis (Niwa, 2020) (Figura 4).

La herencia mitocondrial está monitorizada por dos puntos de control que inhiben la progresión del ciclo celular cuando se detectan defectos en la transferencia de mitocondrias desde la célula madre a la hija. El primero de ellos, asociado a la ruta MEN, inhibe la citoquinesis cuando hay fallos graves en la herencia de proteínas o de membranas mitocondriales (García-Rodríguez *et al.*, 2009). El segundo, reprime la progresión de la fase G₁ a la S en respuesta a la ausencia de ADN mitocondrial en las yemas (Crider *et al.*, 2012) (Figura 4).

Aunque en condiciones normales *S. cerevisiae* hereda la vacuola de la célula madre, cuando la transferencia vacuolar falla, la célula hija tiene la capacidad de generar una vacuola nueva antes del comienzo del nuevo ciclo. La presencia de la vacuola es necesaria para la progresión del ciclo celular desde la fase G₁, de tal manera que, en ausencia de una vacuola funcional, se produce un fallo en la señalización de la ruta TORC1-Sch9 (apartado 4.2) que provoca una parada en la transición G₁/S (Jin y Weisman, 2015) (Figura 4).

También se ha descrito en *S. cerevisiae* un punto de control en la etapa final del ciclo celular, denominado ECO (del inglés *Enforcement of Cytokinesis Order*), que afecta al proceso de la separación entre la célula madre y la célula hija (Figura 4). Dicho sistema bloquea la secreción de la principal enzima encargada de la degradación del septo primario, la endoquitinasa Cts1, hasta que los procesos previos de citoquinesis se hayan completado con éxito. Este retraso de la degradación del septo depende de la proteína Fir1 la cual, en condiciones normales, se localiza en el cuello y se degrada tras la formación del septo, pero se estabiliza cuando la septación es aberrante. Fir1 impide la disociación celular en parte inhibiendo un papel específico que tiene la quinasa Cbk1 en la secreción de Cts1 (Brace *et al.*, 2019).

3. Septinas

Las septinas constituyen una familia muy conservada de proteínas de unión a guanosín trifosfato o GTP que fueron descubiertas en *S. cerevisiae*, en un rastreo para detectar mutaciones termosensibles que afectaran al ciclo de división celular (CDC) (Hartwell, 1971). Todos los organismos eucariotas examinados hasta la fecha, con la excepción de las plantas, muestran genes que codifican septinas en un número variable (Pan *et al.*, 2007). En la levadura de gemación se han identificado siete: *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12*, *SHS1*, *SPR28* y *SPR3*, siendo la expresión de los dos últimos genes específica de la esporulación (De Virgilio *et al.*, 1996; Fares *et al.*, 1996).

3.1. Estructura y ensamblaje de las septinas

En células de *S. cerevisiae* que se dividen mitóticamente, las septinas se asocian formando dos tipos de hetero-octámeros lineales apolares en forma de varilla, que difieren sólo en su subunidad terminal: Cdc11-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Cdc11 y Shs1-Cdc12-Cdc3-Cdc10-Cdc10-Cdc3-Cdc12-Shs1 (Bertin *et al.*, 2008; Finnigan *et al.*, 2015; Garcia *et al.*, 2011). *In vitro*, en concentraciones salinas fisiológicas, los octámeros que contienen Cdc11 polimerizan por los extremos y se asocian por los laterales, formando una pareja de largos filamentos (Bertin *et al.*, 2008). En cambio, cuando es Shs1 la que está en el extremo de los octámeros, éstos, en lugar de formar filamentos, se asocian lateralmente constituyendo bandas curvadas que se cierran en forma de anillo (Garcia *et al.*, 2011). Además, existen evidencias tanto *in vivo* como *in vitro* de que los dos tipos de hetero-octámeros se pueden combinar entre ellos, ensamblándose en diferentes estructuras de orden superior cuya morfología depende de las proporciones relativas de éstos (Garcia *et al.*, 2011; Khan *et al.*, 2018). Todas estas interacciones entre las septinas se producen gracias a las interfaces NC y G que poseen estas proteínas, así como a los dominios de hélice superenrollada que muchas de ellas presentan en su extremo C-terminal (Fung *et al.*, 2014).

3.1.1. Regulación del ensamblaje de las septinas a lo largo del ciclo celular

Las estructuras de orden superior que forman los octámeros de septinas están sometidas a un proceso de remodelación constante a lo largo del ciclo celular. Al final de la fase G₁, una vez se ha sobrepasado el punto de INICIO del ciclo celular, las septinas son reclutadas por Cdc42 a la parte apical de la yema incipiente, donde forman una estructura con forma de parche. Poco después de la emergencia de la yema, el parche se convierte en un anillo, el cual adquiere una conformación de collar en forma de “reloj de arena” que se mantiene estable hasta la salida de la mitosis. Antes de la citoquinesis, el collar se escinde en dos anillos que se localizan uno al lado de la célula madre y otro de la hija (Figura 5). La citoquinesis y la separación celular se producen en la zona comprendida entre estos dos anillos. Tras la disociación celular, los antiguos anillos de septinas se desensamblan en octámeros que, junto con otros de nueva síntesis, serán utilizados por las células en el siguiente ciclo (Marquardt *et al.*, 2019).

Estos cambios conformacionales que sufren las estructuras de septinas a lo largo del ciclo celular, están sujetos a una estrecha regulación en el espacio y en el tiempo a través de dos mecanismos: las proteínas de unión a septinas y las modificaciones postraduccionales que sufren estas últimas.

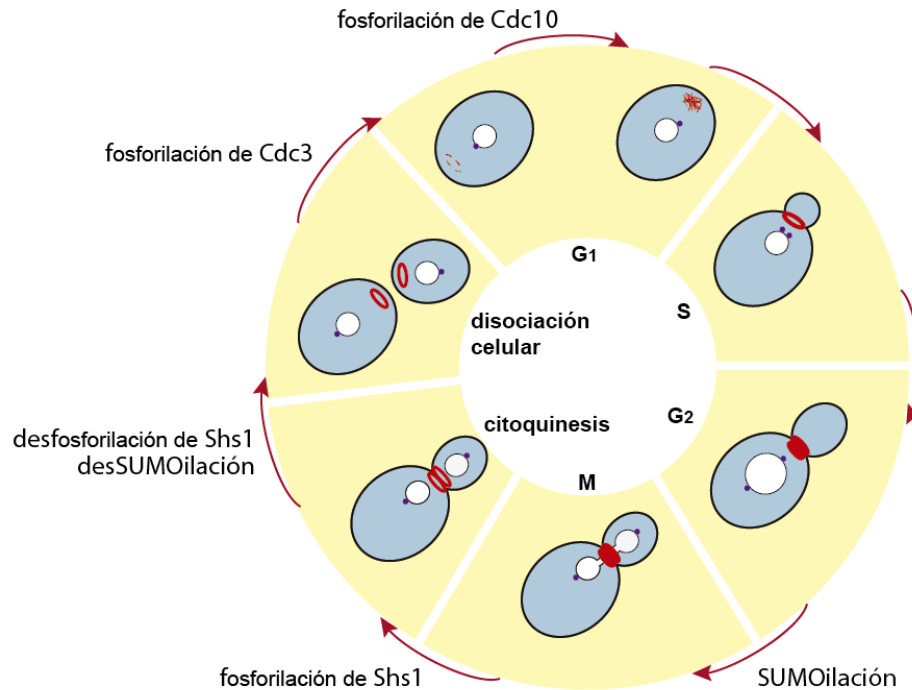


Figura 5. Remodelación de las septinas a lo largo del ciclo celular de *S. cerevisiae*. Se representan las septinas (rojo), los cuerpos polares del huso (morado) y el núcleo (blanco) como puntos de referencia de la progresión del ciclo celular. También se indican, cuando son conocidas, las etapas aproximadas en las que se producen las modificaciones postraduccionales de las septinas.

Hasta la fecha, se conocen alrededor de 100 proteínas que interactúan con las septinas en el cuello de la yema en algún momento del ciclo celular (Gladfelter *et al.*, 2001; McMurray y Thorner, 2009b; Renz *et al.*, 2016). Sin embargo, el significado biológico de muchas de estas interacciones aún está por determinar (Marquardt *et al.*, 2019). Las modificaciones postraduccionales que se han detectado en las septinas son la fosforilación, la SUMOilación y la acetilación. Dentro de ellas, la fosforilación es la más abundante y mejor caracterizada. Concretamente, en *S. cerevisiae* se han descrito 41 eventos de fosforilación, que afectan a las septinas Cdc3, Cdc10, Cdc11 y Shs1, siendo esta última la más modificada con 32 fosforilaciones (Hernández-Rodríguez y Momany, 2012). Se cree que estas fosforilaciones regulan la organización de las septinas controlando el desensamblaje del anillo antiguo (fosforilación de Cdc3), promoviendo el ensamblaje de las septinas en un conjunto de filamentos organizados en el cuello de la yema emergente (fosforilación de Cdc10) o estabilizando la conformación de reloj de arena (fosforilación de Shs1) (Tang y Reed, 2002; Versele y Thorner, 2004) (Figura 5). Teniendo en cuenta la gran cantidad de eventos de fosforilación que sufren las septinas por parte de quinasas, en muchos casos desconocidas, y la gran relevancia biológica de estas modificaciones, este es un tema muy importante de estudio en el campo de la biología de las septinas (Marquardt *et al.*, 2019). La SUMOilación consiste en la adición

de la pequeña proteína SUMO (del inglés, *Small Ubiquitin-related Modifier*). Las septinas Cdc3, Cdc11 y Shs1 de *S. cerevisiae* son SUMOiladas en la transición G₂/M y desSUMOiladas durante la citoquinesis, cuando el collar de septinas se ha dividido en dos anillos (Johnson y Blobel, 1999), lo que sugiere que estas SUMOilaciones, podrían estar contribuyendo a la escisión del collar de septinas (McMurray y Thorner, 2009a) (Figura 5). Sin embargo, el hecho de que no se hayan encontrado SUMOilaciones en las septinas de otras especies fúngicas pone en entredicho la importancia de esta modificación postraducciona en la dinámica de las septinas (Hernández-Rodríguez y Momany, 2012). Finalmente, también se han detectado modificaciones por acetilación en las septinas. En *S. cerevisiae*, las acetilaciones de Cdc3, Cdc10, Cdc12 y Shs1 parecen contribuir a la transición de anillo a collar y a la localización de las estructuras de septinas (Mitchell *et al.*, 2011).

3.2. Papel de las septinas durante el ciclo celular

Las septinas juegan un papel fundamental durante la división celular de *S. cerevisiae* por varias razones. En primer lugar, debido a las propiedades que poseen estas proteínas para unir lípidos, se cree que los filamentos de septinas intervienen en la región cortical de la célula deformando la membrana plasmática (Bridges *et al.*, 2016; Cannon *et al.*, 2017). En segundo lugar, las septinas actúan como estructuras de andamiaje, que permiten el ensamblaje del anillo de actomiosina durante la citoquinesis y el reclutamiento de otras proteínas implicadas en la regulación del ciclo celular y en el mantenimiento de la polaridad (Marquardt *et al.*, 2019; Meitinger y Palani, 2016). En tercer lugar, las septinas parecen actuar como una barrera física que, por una parte, restringe la difusión de ciertos componentes celulares y orgánulos, promoviendo la compartimentalización (Caudron y Barral, 2009), y por otra, actúa acordonando a ciertas enzimas y otros factores para que actúen localmente. Es el caso de las vesículas secretoras y de las quitín sintasas, las cuales son necesarias para que se produzca la formación de nuevas membranas y la deposición de la pared celular en el sitio de la división (Dobbelaere y Barral, 2004). En cuarto lugar, las septinas juegan un papel crucial en diversos puntos de control del ciclo celular, anclando en el cuello de la yema diversos factores involucrados en estos procesos. Así, los puntos de control en los que están involucradas las septinas son: el morfogenético, (Shulewitz *et al.*, 1999), el de posicionamiento del huso (Castillon *et al.*, 2003) y los de daño de ADN (Smolka *et al.*, 2006) (apartado 2.1.4).

3.3. Otras funciones celulares de las septinas

La capacidad que tienen las septinas para unir lípidos y actuar como proteínas de andamiaje y barreras de difusión en las membranas les permite regular funciones celulares adicionales. Así, en un estudio reciente realizado en *S. cerevisiae* se demostró la contribución de las septinas en la biogénesis de los autofagosomas, dotando a estas proteínas de un papel, hasta ahora desconocido, en el proceso de autofagia (Barve *et al.*, 2018a; Barve *et al.*, 2018b) (apartado 5).

4. TORC1

La ruta TORC1 regula el crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y al estrés, de manera que, en presencia de una elevada concentración de nutrientes y en ausencia de estrés, TORC1 se encuentra activo y promueve procesos anabólicos tales como la biogénesis de los ribosomas o la traducción proteica, e inhibe procesos catabólicos como la autofagia o programas transcripcionales de respuesta a estrés como la represión catabólica por nitrógeno o NCR (del inglés, *Nitrogen-Catabolite Repression*). Sin embargo, frente a situaciones de escasez de nutrientes, el tratamiento con rapamicina o algún otro tipo de estrés que provoque la inactivación de TORC1, se produce una reducción en la síntesis de proteínas y una inducción de la autofagia y de los programas transcripcionales de respuesta a estrés y de entrada en fase de reposo G₀ (Wei y Zheng, 2011). El complejo multiproteico TORC1, que se encuentra fundamentalmente asociado con la membrana vacuolar, está compuesto por las subunidades reguladoras Kog1, Lst8 y Tco89 y por la serín/treonín quinasa Tor1 o Tor2. A pesar las múltiples funciones que ejerce TORC1 sobre la fisiología de la levadura, se han identificado muy pocas dianas directas de las quinasas Tor1/2, de tal manera que la mayor parte de los efectos mediados por este complejo se transmiten a través de dos ramas, cuyos efectores son el complejo Tap42 y la quinasa Sch9 (Loewith y Hall, 2011) (Figura 6).

4.1. TORC1-Tap42-fosfatasa

En *S. cerevisiae*, Tap42 es el ortólogo de la proteína $\alpha 4$ de mamíferos (Di Como y Arndt, 1996). En condiciones de activación de la ruta TORC1, la proteína Tap42 interacciona con este complejo y es directamente fosforilada por el mismo (Jiang y Broach, 1999). Una vez fosforilada, Tap42 se une con las subunidades catalíticas de la fosfatasa PP2A (PP2Ac), Pph21 y Pph22, y con fosfatasas de tipo 2A como Sit4, formando un complejo en la vacuola que las mantiene inactivas. Sin embargo, en condiciones de inactivación del complejo TORC1, la proteína Tap42 desfosforilada se disocia de PP2Ac y de Sit4, aliviando la inhibición que ejercía sobre estas últimas (Di Como y Arndt, 1996;

Nanahoshi *et al.*, 1998). De esta manera, el desensamblaje del complejo Tap42-PP2Ac/Sit4 permite que estas fosfatasa puedan desfosforilar a sus efectores. Uno de los sustratos de Sit4 es Tip41, una proteína que, cuando se encuentra desfosforilada, interacciona con Tap42, inhibiendo la formación de los complejos Tap42- PP2Ac/Sit4 (Jacinto *et al.*, 2001). La rama TORC1-Tap42 participa en la regulación del metabolismo del nitrógeno y de los aminoácidos (Li *et al.*, 2017; Schmidt *et al.*, 1998), en la respuesta al estrés ambiental (Santhanam *et al.*, 2004) y en la autofagia (Yorimitsu *et al.*, 2009) (Figura 6).

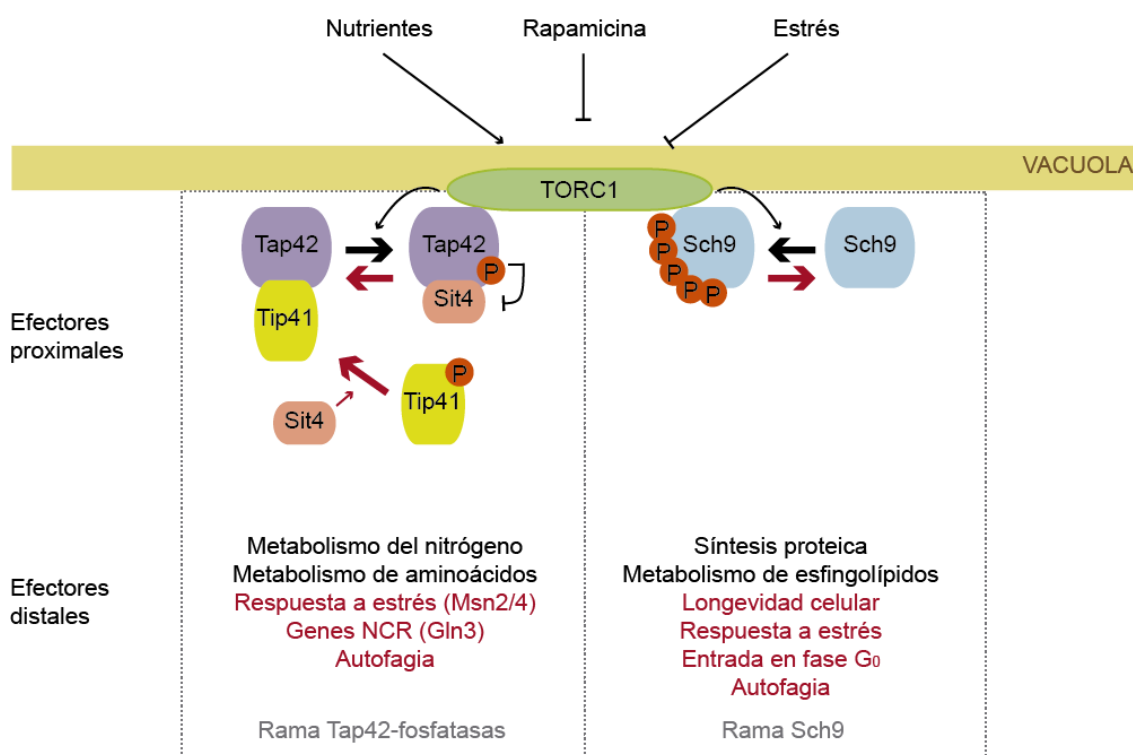


Figura 6. Ruta TORC1 junto con sus dos principales ramas efectoras, Tap42-fosfatasa y Sch9.

En la rama Tap42-fosfatasa se ha representado interaccionando con Tap42 a Sit4, pero podrían estar en su lugar las subunidades catalíticas de la PP2A, Pph21/Pph22. Se indican los principales estímulos que afectan a la actividad del complejo TORC1, así como los cambios en el estado de fosforilación y en las interacciones que sufren los efectores proximales de cada una de las ramas cuando TORC1 se encuentra activado (flecha negra) o inhibido (flecha roja). También se indican los principales efectos que tiene la activación de cada una de las ramas, provocando la activación (negro) o la inhibición (rojo) de los procesos indicados a través de su acción sobre los efectores distales. Entre paréntesis se muestran los factores de transcripción responsables de la expresión de los genes correspondientes.

4.2. TORC1-Sch9

La quinasa Sch9 de *S. cerevisiae* es ortóloga de la quinasa S6K1 de mamíferos. Sch9 se localiza parcialmente en la superficie de la vacuola, donde es fosforilada por TORC1 en al menos cinco residuos comprendidos en su extremo C terminal, siendo estas fosforilaciones necesarias para la actividad catalítica de Sch9 y para que se produzca la

transducción de la señal de TORC1 por esta rama (Novarina *et al.*, 2021; Urban *et al.*, 2007). Una vez activada, Sch9 fosforila a diferentes efectores, lo que contribuye a la regulación de aspectos muy variados del crecimiento de la levadura, tales como el control de la síntesis proteica (Huber *et al.*, 2009), la respuesta a estrés (Roosen *et al.*, 2005), la entrada en la fase G₀ del ciclo celular (Pedruzzi *et al.*, 2003), la autofagia (Yorimitsu *et al.*, 2007), la longevidad celular (Deprez *et al.*, 2018) y el metabolismo de los esfingolípidos (Swinnen *et al.*, 2014) (Figura 6).

5. Autofagia

5.1. Tipos de autofagia

La autofagia es un proceso de reciclaje celular muy conservado entre los organismos eucariotas, en cuya regulación participa, entre otros, el complejo TORC1 (De Virgilio y Loewith, 2006) (apartado 4). Consiste en la degradación de contenido citoplasmático en el interior del lisosoma o de la vacuola de las células de mamíferos o de plantas y de levaduras, respectivamente, y en la posterior liberación de los productos resultantes al citosol, con el objetivo de generar constituyentes macromoleculares y energía en condiciones de estrés, de eliminar orgánulos dañados o superfluos, de adaptarse a cambios en las condiciones nutricionales y de mantener la homeostasis celular. En las levaduras existen dos tipos principales de autofagia: la microautofagia y la macroautofagia, las cuales, a su vez, pueden ser selectivas o no selectivas. La autofagia no selectiva consiste en el reciclaje de contenido citoplasmático aleatorio en condiciones de privación de nutrientes. La autofagia selectiva, sin embargo, se dirige específicamente a ciertos orgánulos dañados o superfluos como las mitocondrias o los peroxisomas (Feng *et al.*, 2014). La diferencia fundamental entre la micro y la macroautofagia reside en que, mientras que en la primera los componentes citoplasmáticos destinados a la degradación son capturados directamente por la vacuola mediante una invaginación de su membrana, en la macroautofagia (denominada, de manera simplificada, autofagia) este contenido es englobado por unas estructuras de doble membrana en forma de copa denominadas fagóforos. Los fagóforos, que comienzan a ensamblarse en el PAS (del inglés, *Pre-Autophagosomal Structure*) se expanden sobre los sustratos a degradar y finalmente se cierran, constituyendo lo que se conoce como autofagosoma, una vesícula citosólica que transporta el contenido hasta la vacuola (Parzych y Klionsky, 2014) (Figura 7). Las autofagias selectiva y no selectiva comparten la misma maquinaria central, con la diferencia de que en la primera participan proteínas adicionales que actúan como receptores para el reconocimiento específico del contenido a degradar (Feng *et al.*, 2014).

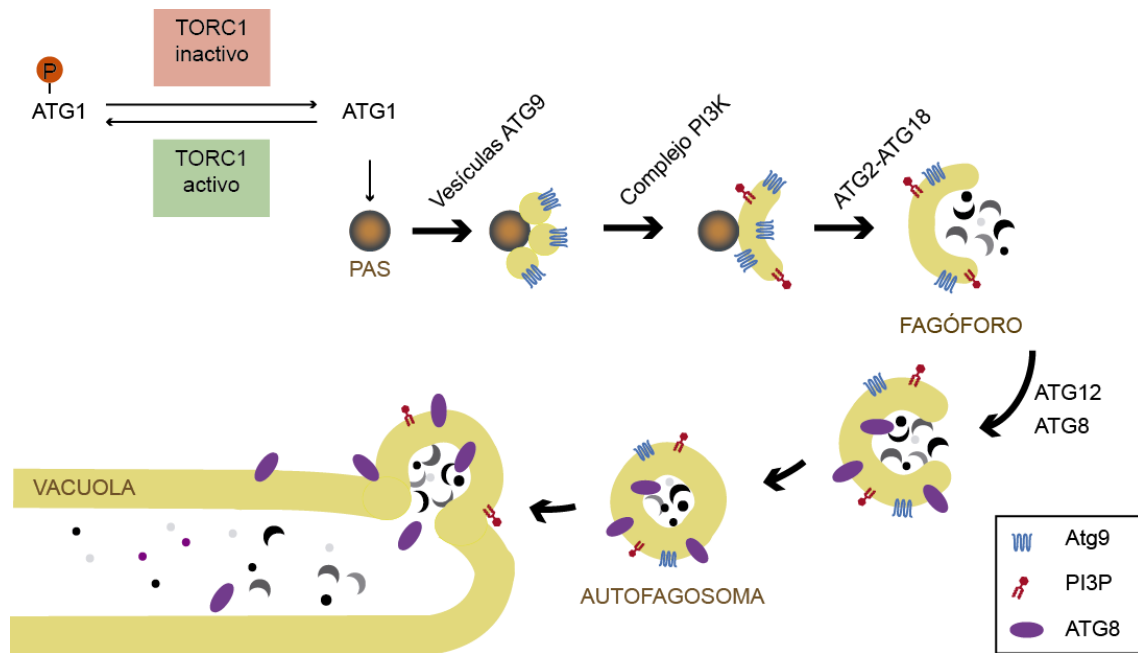


Figura 7. Esquema de la macroautofagia no selectiva

5.2. Macroautofagia no selectiva

Para la formación del autofagosoma se requieren aproximadamente 20 genes, denominados genes ATG (del inglés, *autophagy-related*). Los productos de esos genes se clasifican en 6 grupos funcionales: (1) complejo quinasa ATG1, (2) vesícula ATG9, (3) complejo PI3K (del inglés, *Phosphatidylinositol 3-Kinase*) de clase III, (4) complejo ATG2-ATG18, (5) sistema de conjugación ATG12 y (6) sistema de conjugación ATG8 (Mizushima, 2020). El complejo ATG1 es el que inicia la autofagia. En ausencia de estrés, la fosforilación por parte de TORC1 mantiene al complejo ATG1 desensamblado e inactivo. Sin embargo, la inactivación TORC1 desencadena el ensamblaje del complejo ATG1 y su actividad quinasa, induciéndose de esta manera la autofagia. Seguidamente, se produce el reclutamiento al PAS de unas vesículas citoplasmáticas en las que se encuentra la proteína transmembrana Atg9, al que le sigue la unión del complejo PI3K de clase III. Este complejo fosforila el fosfatidilinositol presente en las vesículas ATG9, produciendo fosfatidilinositol-3 fosfato (PI3P), el cual promueve el reclutamiento de numerosas proteínas de unión a PI3P que participan en la regulación de diferentes etapas durante la formación del autofagosoma. Dentro de estas proteínas, se encuentra el complejo ATG2-ATG18, que parece estar implicado en el anclaje y en la transferencia de lípidos del RE al fagóforo (Nakatogawa, 2020). Finalmente, se incorporan los sistemas de conjugación ATG12 y ATG8 que participan, en el reconocimiento del cargo, en la elongación y cierre de la membrana, en el transporte del autofagosoma, en el anclaje y fusión de la membrana externa de los autofagosomas con la vacuola y en la degradación de la membrana interna (Mizushima, 2020) (Figura 7).

6. Rutas de MAPKs

Las rutas de MAPKs son vías de transducción de señales muy conservadas entre los eucariotas, mediante las cuales las células son capaces de convertir una gran variedad de estímulos en respuestas celulares, permitiéndoles adaptarse a unas condiciones ambientales cambiantes, con el fin último de multiplicarse y sobrevivir. Las rutas de MAPKs canónicas constan de un módulo básico que está compuesto por tres quinasas que se activan secuencialmente por fosforilación, denominadas MAPK quinasa quinasa (MAPKKK, MAP3K o MEKK), MAPK quinasa (MAPKK; MAP2K o MEK) y MAPK. Tras ser activadas por otras quinasas previas de naturaleza diversa, las MAPKKKs fosforilan dos residuos de serina o treonina localizados en posiciones conservadas dentro del bucle de activación de las MAPKKs. A continuación, las MAPKKs, que son quinasas de especificidad dual (serina/treonina y tirosina), fosforilan a las MAPKs en el motivo conservado TXY dentro del bucle de activación ([apartado 6.1.1](#)). Esta fosforilación provoca cambios conformacionales en las MAPKs que conducen a la activación de su actividad serín/treonín quinasa y a la consiguiente fosforilación de una gran variedad de sustratos, que incluye factores de transcripción, reguladores de la traducción, proteínas quinasas activadas por MAPKs o MAPKAPKs (del inglés, *MAPK-activated protein kinases*), proteínas fosfatasa y otras proteínas, regulando de esta manera el metabolismo, la morfología de la célula, la progresión del ciclo celular y la expresión génica (Chen y Thorner, 2007).

En mamíferos se han descrito cuatro rutas de MAPKs convencionales, las cuales se nombran atendiendo a la MAPK correspondiente en cada caso, que son: ERK1 y 2 (del inglés, *Extracellular signal-Regulated Kinases*), JNK1-3 (del inglés, *c-Jun N-terminal Kinase*), p38 α , β , γ , δ y ERK5. Estas cascadas regulan la proliferación, la diferenciación y la respuesta frente a diferentes estreses celulares (Keshet y Seger, 2010). Por su parte, *S. cerevisiae* posee cinco rutas de MAPKs, las cuales están mediadas por los ortólogos de ERK1/2 Fus3 y Kss1, el ortólogo de p38 Hog1, el ortólogo de ERK5 Slt2 (también llamado Mpk1) y la MAPK no convencional Smk1. Dichas cascadas están involucradas en el control del apareamiento, del crecimiento invasivo y pseudofilamentoso, de la respuesta a la alta osmolaridad (HOG), de la integridad de la pared celular (CWI) y de la formación de la pared de las ascosporas, respectivamente (Chen y Thorner, 2007). En la [Figura 8](#) se describen los cuatro principales módulos de MAPKs que operan durante el crecimiento vegetativo.

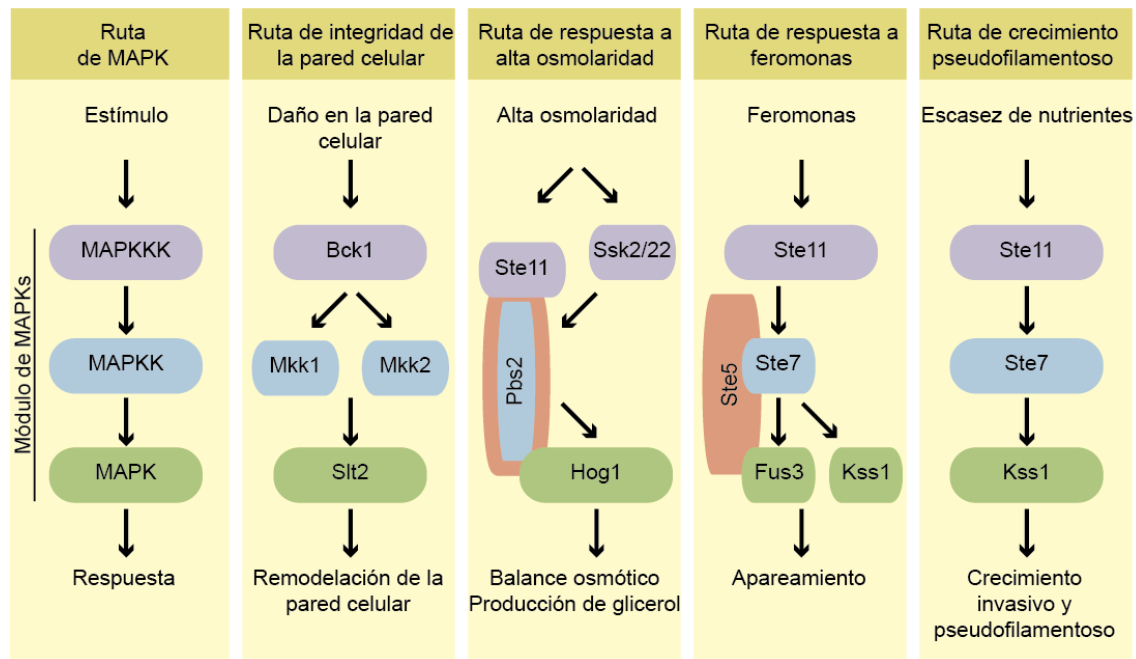


Figura 8. Módulos de MAPKs que regulan cambios celulares en respuesta a estímulos externos durante el crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*. Se representan las MAPKKKs (morado), las MAPKKs (azul), las MAPKs (verde) y las proteínas de andamiaje (naranja) de cada una de las rutas.

6.1. Regulación de la actividad de las MAPKs por fosforilación

6.1.1. Activación de las MAPKs por fosforilación del motivo TXY

La fosforilación de las MAPKs juega un papel clave en el control de su actividad, de manera que esta modificación postraducciona modula el tiempo, la duración y la intensidad de la señal a través de la ruta. Una característica inherente a todas las MAPKs es el modo en el que se activan, que consiste en una doble fosforilación en dos residuos conservados, una treonina y una tirosina, localizados en el motivo TXY de su bucle de activación. Los primeros estudios establecieron que, para mostrar actividad quinasas, las MAPKs necesitaban estar fosforiladas en ambos residuos (Ahn *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1990). Asimismo, los experimentos llevados a cabo en células de mamíferos determinaron que las MAPKs se fosforilan primero en la tirosina y después en la treonina mediante un mecanismo distributivo en el que la MAPKK se disocia entre ambos eventos de fosforilación, colisionando dos veces con la MAPK (Ferrell y Bhatt, 1997). Sin embargo, estudios posteriores indicaron que algunas MAPKs de mamíferos y de levaduras se activan de manera procesiva, es decir, que es la misma molécula de MAPKK la que cataliza las dos reacciones de fosforilación sin separarse de su sustrato (Aoki *et al.*, 2011; English *et al.*, 2015; Nagiec *et al.*, 2015; Vázquez *et al.*, 2015).

6.1.2. Actividad de las formas monofosforiladas en el motivo de activación TXY de las MAPKs

Diferentes estudios llevados a cabo tanto en células de mamíferos como de levaduras han subrayado que la fosforilación de las MAPKs en la treonina les dota de una actividad catalítica y biológica mayor que la fosforilación en la tirosina (Askari *et al.*, 2009; Sugden *et al.*, 2011; Vázquez *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008). Concretamente, en la MAPK Hog1 de *S. cerevisiae* se ha demostrado que la fosforilación de la treonina resulta fundamental para su actividad catalítica y biológica, mientras que la fosforilación en la tirosina parece incrementar su actividad, por lo que sólo resulta necesaria en condiciones extremas (Bell y Engelberg, 2003). En el caso de Kss1, la fosforilación en la treonina es suficiente para inducir cierto crecimiento invasivo en las células (Bardwell *et al.*, 1998). Sin embargo, en Fus3 es la forma monofosforilada en tirosina la que ha demostrado ser parcialmente activa y capaz de fosforilar *in vitro* a diferentes sustratos (Bhattacharyya *et al.*, 2006). Incluso se ha descrito que las especies monofosforiladas de esta MAPK tienen un papel inhibitorio, lo que indica que las formas monofosforiladas también pueden actuar limitando la transducción de la señal (Nagiec *et al.*, 2015).

6.1.3. Otros residuos implicados en la activación de las MAPKs

Junto con el motivo TXY, la actividad de las MAPKs también puede verse modulada por modificaciones postraduccionales en otros residuos. Estos residuos fosforilados de las MAPKs se han identificado experimentalmente en la mayoría de las ocasiones gracias al empleo de aproximaciones fosfoproteómicas (Daub *et al.*, 2008; Dephoure *et al.*, 2008; Oppermann *et al.*, 2009; Rikova *et al.*, 2007). Sin embargo, se desconoce cómo se regulan la mayoría de esas fosforilaciones y el efecto que tienen sobre la actividad catalítica y biológica de las MAPKs. En la MAPK de mamíferos ERK1, se ha descrito que las fosforilaciones en la T207 y en la Y210, dos residuos que se encuentran próximos a su motivo TEY, regulan negativamente su actividad catalítica. La p-T207 surge por autofosforilación, mientras que la fosforilación en la Y210 es catalizada por MEK1 (Lai y Pelech, 2016).

6.2. Ruta de integridad de la pared celular

La ruta CWI está principalmente involucrada en preservar la integridad de la pared celular de *S. cerevisiae*. Esta cascada de señalización, que se activa en condiciones de estrés que afectan a la estructura y a la función de la pared celular de la levadura, provoca, entre otras respuestas, cambios en la expresión de genes implicados en la síntesis de los principales componentes de su pared celular, tales como el glucano, el manano y la quitina, y en su entrecruzamiento (García *et al.*, 2004). Por este motivo, la

ausencia de la respuesta mediada por la ruta CWI en condiciones de activación de la misma provoca la lisis celular cuando no hay soporte osmótico (Torres *et al.*, 1991).

6.2.1. Componentes de la ruta CWI

La estimulación de la ruta CWI está mediada por cinco mecanosensores transmembranales que detectan alteraciones en la pared celular: Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1 (Jendretzki *et al.*, 2011). Estas proteínas de superficie interactúan con Rom2 (Green *et al.*, 2003; Petkova *et al.*, 2012; Philip y Levin, 2001), un factor intercambiador de nucleótidos de guanina o GEF (del inglés, *Guanine nucleotide Exchange Factor*). Rom2, al igual que las otras GEF de *S. cerevisiae* Rom1 y Tus2 (Ozaki *et al.*, 1996; Schmelzle *et al.*, 2002), estimula la activación de Rho1, al promover el intercambio de GDP por GTP. Rho1 es una proteína G pequeña perteneciente a la familia de GTPasas de tipo Rho (del inglés, *Ras homologous*) que activa, entre otros efectores a Pkc1. Por su parte, las proteínas activadoras de la actividad GTPasa o GAPs (del inglés, *GTPase-activating proteins*) Bem2, Sac7 y Lrg1 regulan negativamente la actividad de Rho1 sobre Pkc1 (Heinisch y Rodicio, 2018) (Figura 9).

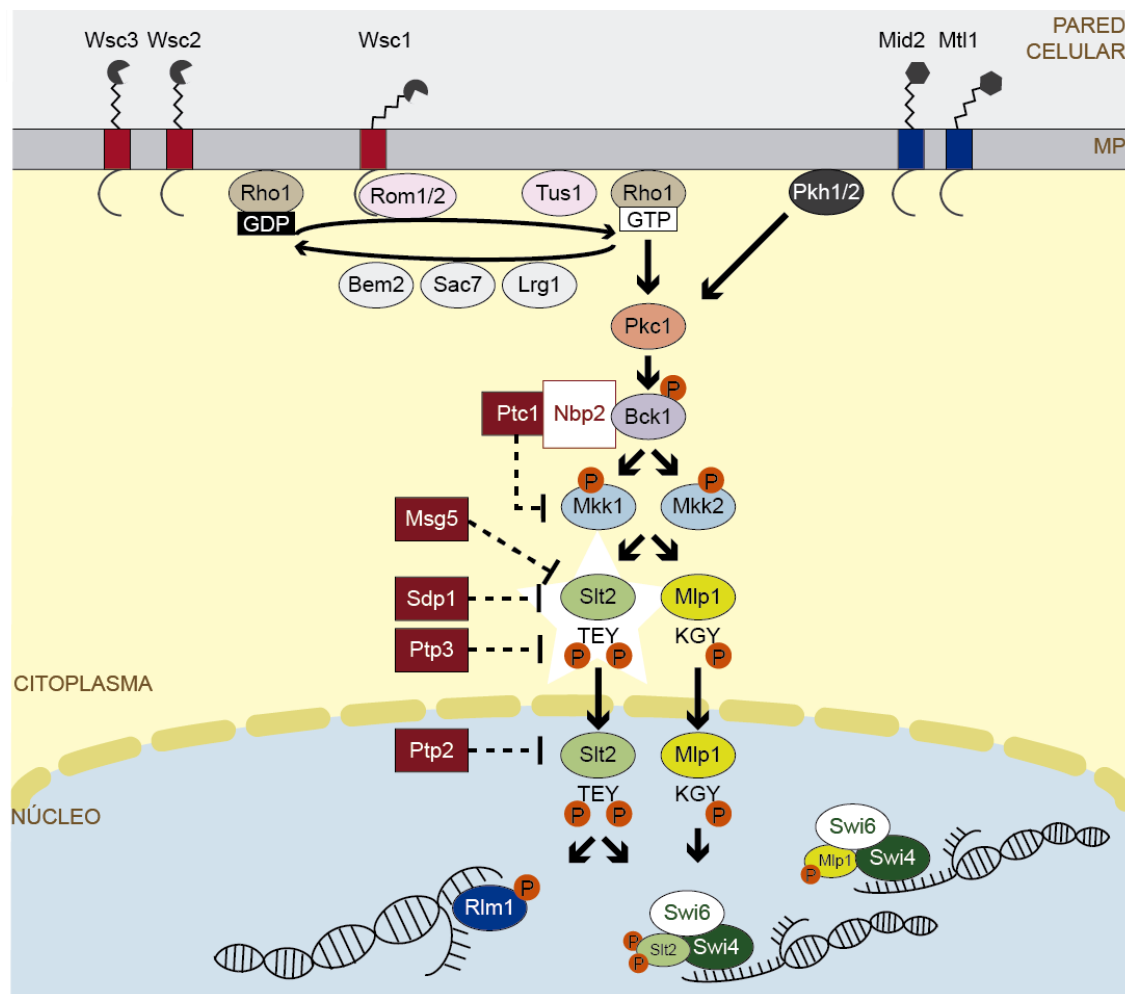


Figura 9. Principales componentes implicados en la señalización de la ruta CWI de *S. cerevisiae*

Pkc1 es una quinasa de la familia AGC, cuya activación depende, junto con Rho1, de Pkh1 y de Pkh2 (Inagaki *et al.*, 1999). Pkc1 es un activador esencial del módulo de MAPK de la ruta CWI, el cual está compuesto por Bck1 (MAPKKK), Mkk1 y Mkk2 (dos MAPKK redundantes) y Slt2 (MAPK). Pkc1 fosforila a Bck1 (Levin *et al.*, 1994), que a su vez fosforila a Mkk1 y Mkk2 (Irie *et al.*, 1993). Estas MAPKKs interaccionan con Slt2 (Soler *et al.*, 1995) promoviendo su activación mediante la fosforilación de su motivo TEY (T190-E-Y192) (Lee *et al.*, 1993). Además, *S. cerevisiae* muestra una pseudoquinasa paróloga a Slt2, denominada Mlp1 (Watanabe *et al.*, 1997) que se induce cuando se estimula la ruta CWI. Mlp1 es fosforilada por Mkk1/2 en la tirosina de su motivo KGY (Kim *et al.*, 2008) y comparte con Slt2 su función transcripcional no catalítica (Sanz *et al.*, 2017) (Figura 9). A pesar de que Mkk1 y Mkk2 son funcionalmente redundantes, Mkk1 tiene un papel preeminente en la transmisión de la señal a través de la ruta CWI (Tatjer *et al.*, 2016b). Estas MAPKKs se encuentran en el citoplasma, mientras que la localización de Slt2 es predominantemente nuclear. Sin embargo, tanto las Mkks como Slt2 se acumulan en las zonas de crecimiento polarizado de manera dependiente de Spa2, que parece actuar como proteína de andamiaje (van Drogen y Peter, 2002).

6.2.2. Estímulos de la ruta CWI

Actúan como estímulos canónicos de la ruta CWI aquéllos compuestos o enzimas que alteran la pared celular, tales como el Rojo Congo (RC), el blanco de calcoflúor (CFW), o la zimoliasa. Sin embargo, existen otros estreses, diferentes a los que actúan directamente sobre la pared celular, que también conducen a la activación de Slt2 (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020) tales como el choque térmico (Kamada *et al.*, 1995), el choque hipotónico (Davenport *et al.*, 1995), la fase estacionaria (Torres *et al.*, 2002), el estrés oxidativo (Vilella *et al.*, 2005), el estrés genotóxico (Queralt y Igual, 2005) o el elevado pH (Serrano *et al.*, 2006).

6.2.3. Respuestas de la ruta CWI

Una vez activada, Slt2 interacciona con numerosas proteínas tanto citoplasmáticas como nucleares, pudiendo ejercer su actividad mediante dos tipos de mecanismos: uno catalítico, fosforilando a sus sustratos, y otro no catalítico (Levin, 2011).

Las principales funciones que ejerce Slt2 por medio de su actividad quinasa son: (i) regular la transcripción de genes y la traducción de ARNm de respuesta a estrés (ii) controlar el avance a lo largo del ciclo celular (iii) modular la transmisión de la señal mediante la retrofosforilación de componentes que actúan previamente en la ruta CWI o mediante la fosforilación de reguladores negativos de la misma y (iv) regular otras rutas de señalización, como la de TORC2 y la de la PKA que, junto con TORC1 (apartado 4) son reguladores esenciales del crecimiento y de la homeostasis celular en

respuesta a nutrientes (De Virgilio y Loewith, 2006). Las proteínas fosforiladas por Slt2 que actúan mediando las funciones descritas con anterioridad se muestran en la Tabla 1.

6.2.3.1. Respuesta transcripcional

Al igual que sucede con otras rutas de MAPKs, una de las principales respuestas de la ruta CWI es la regulación de la transcripción. Cuando se somete a las células de *S. cerevisiae* a un estrés de pared celular, se desencadena una respuesta transcripcional que supone la inducción de entre cien y doscientos genes. Aunque el perfil transcripcional varía en función del agente que haya provocado el estrés, existe un conjunto de genes que se inducen en todas las situaciones y que constituyen lo que se denomina “huella transcripcional” del estrés de pared celular (Arroyo *et al.*, 2009). Esta firma común incluye genes relacionados con la biogénesis y con la remodelación de la pared, con el metabolismo y generación de energía, con la morfogénesis, con el estrés y con la transducción de señales (Sanz *et al.*, 2017).

La respuesta transcripcional de la ruta CWI está mediada principalmente por dos factores de transcripción: Rlm1, cuya activación por fosforilación depende de la actividad catalítica de Slt2 (Jung *et al.*, 2002) y SBF, que es activado por Slt2 mediante un mecanismo no catalítico. Rlm1 es el factor de transcripción responsable de la expresión de la mayoría de los genes inducidos en condiciones de estrés de la pared celular a través de la ruta CWI. Dentro de los genes regulados por Rlm1 se encuentran algunos del propio módulo de MAPKs: *SLT2*, *MLP1* y *RLM1* (García *et al.*, 2004). Por su parte, el complejo SBF (Swi4/Swi6), además de controlar la transcripción de las ciclinas de fase G₁/S (apartado 2.1.1), regula de manera independiente la expresión de un pequeño grupo de genes relacionados con la pared celular, dentro de los que se encuentra *FKS2*, a través de un mecanismo supeditado a la activación de Slt2 y de su parólogo Mlp1. Una vez activados, Slt2 o Mlp1 forman un complejo con Swi4, el cual se une al promotor de los genes a los que regula. A continuación, se incorpora Swi6 al complejo Slt2/Mlp1-Swi4 (Figura 9) para permitir el reclutamiento sucesivo de la ARN polimerasa II y la consiguiente activación de la transcripción en respuesta a estrés de pared celular (Kim y Levin, 2010; Kim *et al.*, 2008).

Tabla 1 Sustratos de Slt2 y efecto que tiene su fosforilación (siguiente página). Los colores de las celdas agrupan a los sustratos por funciones: regulación de la transcripción de genes y de la traducción de ARNm de respuesta a estrés (amarillo), control del ciclo celular (verde), modulación de la transmisión de la señal a través de la ruta (azul), regulación de otras rutas de señalización (morado) y otras funciones (naranja).

Tabla 1. Sustratos de Slt2 y efecto que tiene su fosforilación (continuación)

Sustrato	Función	Efecto de la fosforilación	Referencia
Rlm1	Factor transcripcional de la ruta CWI	Activación de la transcripción	(Jung <i>et al.</i> , 2002)
Swi6	Componente activador del SBF	Exportación del núcleo, e inhibición de la transcripción	(Kim <i>et al.</i> , 2010)
Sir3	Silenciador de la cromatina	Incremento de la expresión de genes de respuesta a estrés	(Ai <i>et al.</i> , 2002)
Rpo21 (Rpb1)	Subunidad de la ARN polimerasa II	Expresión de genes de respuesta a estrés	(Yurko <i>et al.</i> , 2017)
Ssn2 (Med13)	Subunidad de la ARN polimerasa II	Expresión de genes de respuesta a estrés	(Stieg <i>et al.</i> , 2018)
Ssn8 (Ciclina C)	Represor transcripcional junto con Cdk8	Expresión de genes de respuesta a estrés y fisión mitocondrial	(Jin <i>et al.</i> , 2014)
Caf20	Represor traduccional	Desconocido	(Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> , 2016)
Nab2	Proteína de unión a ARNm	Bloqueo de la exportación del ARNm durante el choque térmico	(Carmody <i>et al.</i> , 2010)
Sic1	Inhibidor de complejos Clb-Cdc28	Estabilización y bloqueo de la transición G ₁ /S	(Moreno-Torres <i>et al.</i> , 2015)
Mrc1	Mediador del punto de control de la replicación de ADN	Retraso de la replicación de ADN en presencia de estrés	(Duch <i>et al.</i> , 2018)
Rom2	GEF de la ruta CWI	Disminución de su actividad por deslocalización	(Guo <i>et al.</i> , 2009)
Mkk1, Mkk2	MAPKK de la ruta CWI	Atenuación de su función	(Jiménez-Sánchez <i>et al.</i> , 2007)
Msg5	MKP de Slt2 y de Fus2	Disminución de su afinidad por Slt2	(Flández <i>et al.</i> , 2004)
Rcn2	Regulador de la calcineurina	Desconocido	(Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> , 2016)
Avo2, Avo3	Subunidad del complejo TORC2	Regulación negativa de la función de TORC2	(Leskoske <i>et al.</i> , 2018)
Bcy1	Subunidad reguladora negativa de PKA	Inhibición de PKA	(Soulard <i>et al.</i> , 2010)
Gga1	Proteína asociada al Golgi y relacionada con el tráfico vesicular	Desconocido	(Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> , 2016)
Pil1	Componente de los eisosomas	Desconocido	(Mascaraque <i>et al.</i> , 2013)

En situaciones de estrés oxidativo se desencadena una respuesta celular compleja que incluye la activación de la ruta CWI (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020). El estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno, que es detectado por el sensor Mtl1 (Petkova *et al.*, 2010), provoca la activación de Slt2, que, a su vez, conduce a la fosforilación de Rlm1 (Staleva *et al.*, 2004) y de otros dos sustratos, la ciclina C (Jin *et al.*, 2014) y Med13 (Ssn2) (Stieg *et al.*, 2018), los cuales forman parte de un complejo que regula negativamente la actividad de la ARN polimerasa II (Strich y Cooper, 2014). La fosforilación de Med13 conduce a su degradación (Stieg *et al.*, 2018), mientras que la de la ciclina C promueve su disociación del complejo, aliviando la represión transcripcional que éste ejercía, y su translocación al citoplasma, donde es destruida tras inducir la fisión mitocondrial y la muerte celular programada (Jin *et al.*, 2014).

6.2.3.2. Regulación del ciclo celular

En las tres últimas décadas, se ha puesto de manifiesto la implicación de las rutas de MAPKs en el control del ciclo celular de las levaduras. Concretamente, se ha demostrado la participación en la regulación del mismo de la ruta de respuesta a feromonas, de la ruta HOG y de la ruta CWI (Correia *et al.*, 2010).

La activación de la ruta de respuesta a feromonas conduce a la fosforilación de Far1 (Elion *et al.*, 1993), que inhibe la función de los complejos Cln1/2-Cdc28, bloqueando la transición a la fase S (Peter *et al.*, 1993; Tyers y Fitcher, 1993). Esta respuesta prepara a las células para que se fusionen, generando células diploides.

La activación de la ruta HOG puede provocar paradas en dos puntos del ciclo celular, que son la transición G₁/S y la G₂/M. Por una parte, se ha demostrado que en condiciones de elevada osmolaridad, Hog1 regula la progresión en la fase G₁ del ciclo a través de un mecanismo dual, que incluye la estabilización de Sic1 por fosforilación de su T173 ([apartado 2.1.1](#)) y una regulación negativa de la expresión de las ciclinas Cln1 y Cln2 (Escoté *et al.*, 2004). Por otra parte, la activación de Hog1 promueve la parada en la fase G₂ a través de diferentes vías que regulan negativamente al complejo Clb2-Cdc28 (Alexander *et al.*, 2001; Clotet *et al.*, 2006).

Cuando la superficie celular está comprometida, la ruta CWI ejerce un papel regulador en diferentes momentos del ciclo celular. Al comienzo del ciclo, Slt2 inhibe la activación transcripcional del programa de INICIO a través de tres mecanismos. Por un lado, Slt2 fosforila a Swi6 restringiendo su importación al núcleo, lo que provoca una reducción en la expresión del gen *CLN2::lacZ* (Kim *et al.*, 2010). Por otro lado, en condiciones de activación de la ruta CWI, Slt2 promueve la expresión mediada por Rlm1 del represor transcripcional de SBF Whi7 que, al contrario de lo que sucede en ausencia

de estrés, donde el papel predominante lo tiene Whi5, pasa a convertirse en el principal represor transcripcional de SBF (Méndez *et al.*, 2020). Finalmente, se ha descrito la existencia de un punto de control regulado por la ruta CWI en el INICIO del ciclo celular (*Cell Wall /Start Checkpoint*). Este punto de control consiste en que, en presencia de fuentes de carbono no fermentables y en condiciones de baja osmolaridad, la fuerte activación de la ruta CWI provoca un retraso en la fase G₁ del ciclo celular mediado por Rlm1 (Piccirillo *et al.*, 2017). Aunque se desconoce el mecanismo mediante el cual Rlm1 regula el INICIO del ciclo celular en estas condiciones, se ha propuesto que éste podría estar basado en la capacidad que tiene Rlm1 para inducir la expresión de Whi7 (Quilis *et al.*, 2021).

Como ya se ha comentado en el [apartado 2.1.1](#), Slt2 contribuye a la estabilización del inhibidor de la fase S Sic1 mediante la fosforilación de su residuo T173, lo que inhibe la transición G₁/S, (Moreno-Torres *et al.*, 2015). La presencia de Sic1 es uno de mecanismos responsables de un punto de control que inhibe la replicación del ADN en respuesta a daños en la pared celular y en la membrana plasmática causados por el SDS (Kono *et al.*, 2016), por lo que recientemente se ha sugerido que el efecto estabilizador que ejerce Slt2 sobre esta proteína podría estar implicada en este punto de control (Quilis *et al.*, 2021).

Slt2 también está implicada en la parada de ciclo característica de otros puntos de control frente a diferentes estreses. Así, se sabe que Slt2 se activa en respuesta a la despolimerización de actina y a estreses en el RE, siendo esta activación necesaria para provocar las paradas en la fase G₂ y en la citocinesis, características del punto de control de la morfogénesis (Harrison *et al.*, 2001) y de la ruta ERU (Babour *et al.*, 2010; Chao *et al.*, 2019), respectivamente (apartado 2.1.4).

Además, se ha descrito la existencia de un punto de control específico de la ruta de integridad celular mediante el cual las células responden a alteraciones en la estructura de la pared celular inhibiendo la entrada en mitosis. Esta parada se asocia con una regulación transcripcional negativa del gen que codifica la ciclina mitótica Clb2, lo que provoca una parada en la fase G₂ del ciclo celular, que es posterior a la duplicación del SPB y a la replicación del ADN, pero previa a la separación del SPB y, por lo tanto, a la formación del huso bipolar (Suzuki *et al.*, 2004). La expresión de *CLB2* depende de un complejo cuya expresión está regulada por Hcm1, un factor de transcripción de la fase S cuya fosforilación por parte de la ruta CWI conduce a su degradación (Negishi *et al.*, 2016). En un cribado genético se demostró que los mutantes del módulo de MAPKs de la ruta CWI muestran defectos en la parada en G₂ promovida por este punto de control

(Sukegawa *et al.*, 2018), lo que fortalece la idea de que Slt2 podría ser la MAPK responsable de la fosforilación de Hcm1 (Quilis *et al.*, 2021).

6.2.4. Estructura de Slt2

La MAPK Slt2 presenta en la región N-terminal los doce subdominios canónicos de las quinasas eucarióticas (I-VIa, VIb-XI) (Hanks y Hunter, 1995; Torres *et al.*, 1991), mientras que en la región C-terminal muestra una cola no-catalítica reguladora (Figura 10).

Dentro del subdominio II se encuentra una lisina conservada (K54 en Slt2), que ha demostrado ser esencial para la actividad catalítica de diferentes quinasas (Kamps *et al.*, 1984; Weinmaster *et al.*, 1986). En el caso de Slt2, la mutación K54F reveló que la actividad quinasa de esta MAPK era necesaria para el mantenimiento de la integridad de la pared celular a elevadas temperaturas (Martín *et al.*, 1993).

En el subdominio V se encuentra el residuo *gatekeeper*, el cual determina el tamaño y la forma del bolsillo de unión a ATP, controlando el acceso de esta molécula al dominio catalítico de las quinasas. Cuando este residuo se muta a un aminoácido de tamaño menor, la versión resultante de la quinasa puede inhibirse de manera eficaz y específica con análogos voluminosos de ATP, que son capaces de acoplarse en el bolsillo agrandado que muestra la versión mutada de la proteína. Las quinasas que presentan esta mutación se denominan “sensibles a análogos” (as) y pueden ser inhibidas de manera rápida, reversible y muy específica (Lopez *et al.*, 2014). En el caso de Slt2, la versión sensible a análogos, Slt2-as, en la que el glutámico de la posición 108 (Figura 10) se sustituye por glicina (E108G), ha demostrado ser específicamente inhibida por análogos voluminosos de ATP como el 2,3-dimetilbencil-pirazol-pirimidina 1 (2,3-DMB-PP1) (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016).

Comprendido entre los subdominios VII y VIII de las quinasas, se encuentra el segmento de activación, en cuya parte central está el motivo de activación TXY de las mismas (Roskoski, 2012) (T190-E-Y192 en Slt2) (Figura 10). Aunque de manera general está establecido que, en la familia de MAPKs, es necesario que ambos residuos se fosforilen para lograr la activación de la quinasa (Ahn *et al.*, 1991; Anderson *et al.*, 1990), se ha descrito que la sustitución en Slt2 de la Y192 por un residuo no fosforilable da lugar a una MAPK parcialmente activa. No sucede lo mismo cuando se muta la T190, lo que sugiere que la treonina tiene mayor importancia que la tirosina en la actividad de Slt2 (Lee *et al.*, 1993). Sin embargo, antes del desarrollo de esta Tesis, se desconocía si estas formas monofosforiladas de Slt2 están presentes en la célula, así como la dinámica de activación de esta MAPK.

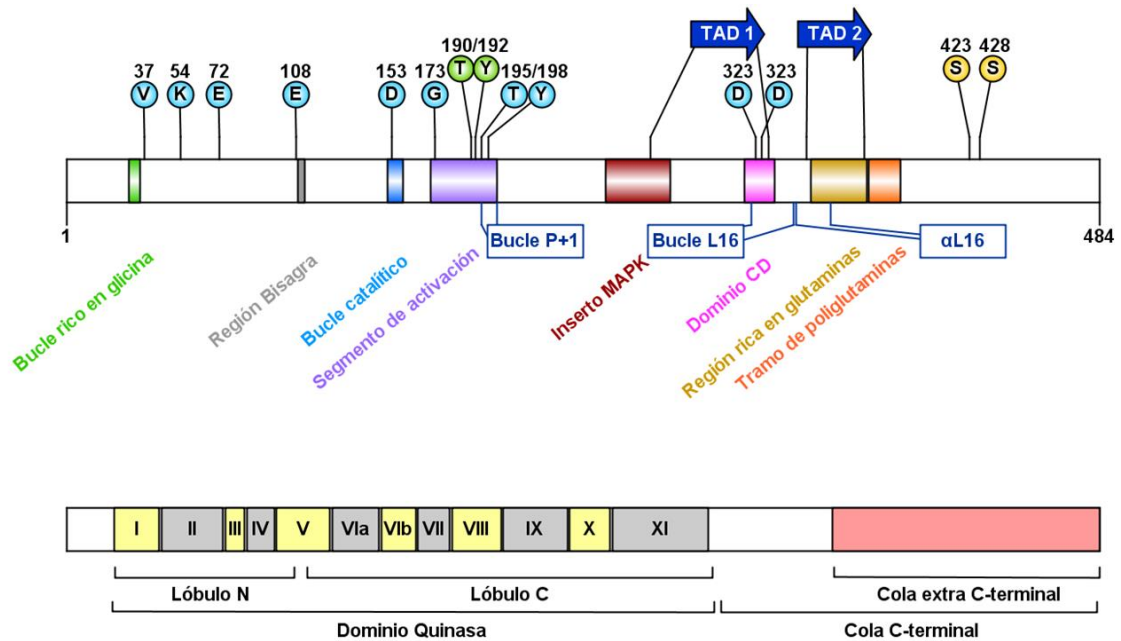


Figura 10. Representación esquematizada de la estructura global y de los dominios funcionales de la MAPK de *S. cerevisiae* Slt2. Slt2 consta de 484 aminoácidos y se divide en un dominio quinasa N-terminal y una larga cola C-terminal. El dominio quinasa se subdivide en doce subdominios conservados que contienen el bucle rico en glicinas (30-35); la región bisagra (109-112); el bucle catalítico (151-158); el segmento de activación (171-202); el bucle P+1 (195-202); el inserto MAPK (253-283) y el dominio de activación transcripcional o TAD (del inglés, *Transcriptional Activation Domain*) 1 (274-329). La cola C-terminal contiene el dominio CD (del inglés, *Common Docking*) (318-332); el bucle L16 (321-341); la α -hélice L16 (342-358), el TAD 2 (347-374); la región rica en glutaminas (349-375); el tramo de poliglutaminas (376-391) y una cola adicional C-terminal (359-484). Los números indican la posición de los aminoácidos. Los aminoácidos conservados están representados con un círculo azul, los fosforilados con un círculo amarillo y los conservados y fosforilados con un círculo verde.

Tras la región catalítica N-terminal, Slt2 también muestra una región C-terminal característica de las MAPKs, la cual juega un papel fundamental en la activación y regulación de estas proteínas. Esta cola C-terminal contiene un dominio CD (del inglés, *Common Docking*) que está involucrado en la unión de las MAPKs a sus proteínas activadoras, a sus fosfatasas inhibitoras o a sus sustratos (Tanoue *et al.*, 2000). Concretamente, el dominio CD de Slt2, que se extiende entre los aminoácidos 318-331 (Figura 10), parece ser determinante en la unión a Mkk1, puesto que la mutación en este dominio de los residuos ácidos conservados a asparagina (D323N, D326N, E327N) impide la interacción del fragmento Slt2 274-373 a dicha MAPKK activadora (Palacios *et al.*, 2011).

Finalmente, en la parte terminal de esta región no-catalítica, Slt2 posee una larga extensión adicional (cola extra C-terminal), que contiene una región rica en glutaminas y un tramo de poliglutaminas y que no está presente en otras MAPKs de levadura (Figura 10). Solo Hog1 tiene una pequeña cola adicional, pero con otra composición de

aminoácidos. Dentro de las MAPKs convencionales de mamíferos, la única que muestra una larga extensión C-terminal similar es ERK5 (Cargnello y Roux, 2011). La versión truncada de Slt2 en el residuo E354 es incapaz de recuperar el crecimiento en presencia de cafeína de una cepa *slt2Δ*, mientras que las proteínas truncadas en los residuos Q364 y D394 son funcionales. Esto sugiere que la cola extra C-terminal de Slt2, al menos desde el amino ácido 365, no es imprescindible para su actividad biológica. Asimismo, se ha observado que la versión truncada en el residuo D394 provoca una fosforilación constitutiva de Slt2. La eliminación del fragmento equivalente en Hog1 también conduce a la fosforilación espontánea de esta MAPK y lo mismo sucede cuando se expresan en levadura las MAPKs de mamíferos ERK1/2 y p38α, las cuales no poseen dicha cola C-terminal en su estructura. Teniendo en cuenta lo anterior, todo parece indicar que la extensión C-terminal juega un papel inhibitorio en la autofosforilación de las MAPKs que la poseen (Levin-Salomon *et al.*, 2009). Asimismo, la fosforilación de diferentes residuos localizados en este tramo ha demostrado tener funciones reguladoras. En el caso de Slt2, la fosforilación en la S423, inducida tras un tratamiento con cafeína, inhibe la unión de la MAPK a su sustrato Swi4. Sin embargo, no se ha encontrado este mismo efecto asociado a la fosforilación de la S428, que también se produce en presencia de cafeína (Truman *et al.*, 2009) (Figura 10). Atendiendo a ERK5, la fosforilación de diferentes residuos de su cola extra C-terminal ha demostrado estar relacionada con el papel regulador de esta MAPK en la transición G₂/M del ciclo celular, así como en su entrada al núcleo y en la consiguiente activación de su actividad transcripcional (Díaz-Rodríguez y Pandiella, 2010; Honda *et al.*, 2015; Iñesta-Vaquera *et al.*, 2010; Morimoto *et al.*, 2007; Pearson *et al.*, 2020).

6.3. Inactivación de las rutas de MAPKs por desfosforilación

Las rutas de señalización mediadas por MAPKs están reguladas negativamente por las proteínas fosfatasa, las cuales desfosforilan a las MAPKKKs, a las MAPKK o, preferentemente, a las MAPKs. Esta reacción puede ser catalizada por tres tipos diferentes de proteínas: las serín/treonín fosfatasas, las tirosín fosfatasas y las fosfatasas de especificidad dual o DSPs (del inglés, *Dual-Specificity Phosphatases*) (Martín *et al.*, 2005). De todas ellas, las principales reguladoras de las MAPKs son las DSPs, que actúan de forma específica sobre estas proteínas eliminando los dos residuos fosforilados del motivo de activación TXY. Por esta razón, a las DSPs también se las conoce como fosfatasas de MAPKs o MKPs (del inglés, *MAPK Phosphatases*) (González-Rubio *et al.*, 2019). Además de controlar la magnitud y la duración de la señalización mediada por MAPKs, las MKPs pueden regular la localización subcelular y la selectividad de sustrato de dichas MAPKs (Caunt y Keyse, 2013).

6.3.1. *Tirosín fosfatasa y fosfatasa de especificidad dual*

Tanto las PTPs como las DSPs pueden actuar directamente sobre las MAPKs, ejerciendo un papel crucial en su regulación negativa. En *S. cerevisiae*, las PTPs Ptp2 y Ptp3 regulan a las MAPKs Fus3, Hog1 y Slt2. Sin embargo, ambas PTPs muestran diferentes afinidades por las MAPKs a las que regulan, de manera que, mientras que Hog1 y Slt2 son más sensibles a Ptp2 que a Ptp3, en la regulación de Fus3 Ptp3 tiene un papel predominante sobre Ptp2 (Martín *et al.*, 2005). En un estudio más reciente se demostró que Ptp1, otro miembro de esta familia de fosfatasa, también regula negativamente las rutas de apareamiento y de integridad celular e interacciona con Fus3 y con Slt2, lo que sugiere que esta PTP también está actuando a nivel de dichas MAPKs (Sacristán-Reviriego *et al.*, 2015). Con respecto a las DSPs, solamente se han identificado dos proteínas, Msg5 y Sdp1, con actividad MKP (González-Rubio *et al.*, 2019). Msg5 desfosforila a Fus3 y a Slt2, mientras que Sdp1 parece actuar exclusivamente sobre Slt2. Sin embargo, hasta la fecha, no se han descrito DSPs que actúen sobre Hog1 (Sacristán-Reviriego *et al.*, 2016).

En la ruta CWI Msg5 parece ser la principal fosfatasa que actúa sobre Slt2, al menos en ausencia de estrés (Martín *et al.*, 2005). La actividad de Msg5 sobre Slt2 está regulada por la propia MAPK, puesto que la activación de Slt2 induce la transcripción de Msg5 (García *et al.*, 2004). Asimismo, experimentos realizados tanto *in vivo* como *in vitro* demostraron que Slt2 y Msg5 actúan la una sobre la otra, de tal manera que Msg5 se une y desfosforila a Slt2 cuando esta MAPK se encuentra activada, mientras que, como consecuencia de la activación de la ruta CWI, Slt2 fosforila a Msg5, disminuyendo la afinidad entre estas dos proteínas (Flández *et al.*, 2004). Como sucede en todas las MKPs, Msg5 presenta en su bolsillo catalítico una cisteína que resulta esencial para su actividad fosfatasa, la C319. Así, la sustitución de esta cisteína por una alanina da lugar a una versión de Msg5 catalíticamente inactiva, Msg5^{C319A}, cuya sobreexpresión, en lugar de disminuir los niveles de fosforilación de Slt2, como sucede en la versión silvestre, conduce a un incremento de p-Slt2 debido a que ejerce un efecto de captura sobre la MAPK activada (Sacristán-Reviriego *et al.*, 2014). A pesar de que el papel de las MKPs en la desfosforilación de los residuos de treonina y tirosina está muy bien establecido, no se conoce en detalle la dinámica de esta reacción.

6.3.2. *Serín/treonín fosfatasa. Ptc1*

Se han descrito cuatro familias de serín/treonín fosfatasa: tipo 1 (PP1), tipo 2A (PP2A), tipo 2B (PP2B) y tipo 2C (PP2C). De ellas, solamente las PP2C (del inglés, *Protein Phosphatase 2C*) han demostrado tener actividad sobre las rutas de MAPKs de *S. cerevisiae* (Martín *et al.*, 2005). Las PP2C constituyen un grupo muy conservado de

fosfatasas dentro de los organismos eucarióticos que está involucrado en numerosos procesos celulares, tales como la proliferación, el metabolismo y la supervivencia celular. Se diferencian de otras serín/treonín fosfatasas en que son enzimas monoméricas, que no suelen estar asociadas con subunidades reguladoras y que, mediante la expresión de diferentes isoformas, logran especificidad de acción (Ariño *et al.*, 2011). Aunque en *S. cerevisiae*, la familia de PP2C está compuesta por siete miembros, Ptc1-Ptc7, parece que sobre las rutas de MAPKs de esta levadura de gemación solamente actúan Ptc1, Ptc2 y Ptc3 y Ptc4. Mientras que estas cuatro PP2C están involucradas en la regulación de Hog1, Ptc1 parece ser la única fosfatasa de esta familia que actúa sobre las rutas CWI y de respuesta a feromonas (Ariño *et al.*, 2011).

De entre todas las serín/treonín fosfatasas de tipo PP2C de *S. cerevisiae*, Ptc1 es la mejor caracterizada. El hecho de que, en condiciones estándar de crecimiento, el mutante *ptc1Δ* muestre un perfil transcripcional muy diferente al de las células carentes de otras PP2Cs (Ptc2-Ptc5), pone de manifiesto que Ptc1 ejerce funciones específicas que no son compartidas por otros miembros de su familia (González *et al.*, 2006). Diferentes estudios han atribuido a Ptc1 una función reguladora en tres de las rutas de MAPKs de *S. cerevisiae*, que son la ruta HOG, la de respuesta a feromonas y la de CWI. Ptc1 regula negativamente la ruta HOG (Jiang *et al.*, 1995). Esta regulación, que se basa en la desfosforilación de la MAPK Hog1 (Warmka *et al.*, 2001), se logra gracias a la unión de Ptc1 al dominio N-terminal de la proteína adaptadora Nbp2, que a su vez interacciona a través del dominio SH3 con la proteína Pbs2 (Mapes y Ota, 2004). El papel de Ptc1 sobre la ruta de respuesta a feromonas es más controvertido. Aunque en un primer estudio se propuso que Ptc1 regula positivamente la respuesta mediada por Fus3 mediante la desfosforilación de cuatro residuos localizados en la región central de la proteína de andamiaje Ste5 (Malleshaiah *et al.*, 2010), un trabajo posterior concluyó que Ptc1 interacciona a través de Nbp2 con la quinasa activadora del módulo de MAPKs Ste20, regulando negativamente la respuesta a feromonas (Hruby *et al.*, 2011). Años más tarde, otro trabajo demostró que la reducción en la respuesta a feromonas que se produce en un mutante *ptc1Δ* no se debe a una hiperfosforilación de los residuos centrales previamente descritos en Ste5 y propone que la regulación positiva que ejerce Ptc1 sobre la ruta de feromonas es indirecta (Winters y Pryciak, 2019). Finalmente, se ha descrito que Ptc1 regula negativamente la ruta CWI (Du *et al.*, 2006). Concretamente, Ptc1 desfosforila e inactiva a la MAPKK Mkk1 (Tatjer *et al.*, 2016b) interaccionando a través de Nbp2 con Bck1 (Hruby *et al.*, 2011; Stanger *et al.*, 2012) (Figura 9).

6.3.2.1. Defectos fenotípicos mostrados por el mutante *ptc1Δ*

El papel regulador de la fosfatasa Ptc1 sobre las rutas de MAPKs de apareamiento, HOG y CWI de *S. cerevisiae* queda patente al analizar los efectos que provoca su ausencia. Así, la delección de *PTC1* (i) previene la formación del *shmoo* y reduce la activación de Fus3 (Malleshaiah *et al.*, 2010); (ii) provoca un defecto en la adaptación de la respuesta a estrés osmótico de la ruta HOG, de tal manera que, tras un choque hiperosmótico, tanto la activación como la inactivación de Hog1 están notablemente demoradas con respecto a una cepa silvestre (Warmka *et al.*, 2001), y (iii) provoca un incremento en los niveles de fosforilación de Slt2 (Du *et al.*, 2006). Además, los mutantes *ptc1Δ* muestran muchas otras alteraciones fenotípicas, que se exponen en la [Figura 11](#). Aunque en algunos casos se ha confirmado que el desarrollo de estos fenotipos depende de la señalización a través de la ruta CWI, en otras ocasiones el mecanismo responsable de esa alteración fenotípica aún está por esclarecer.

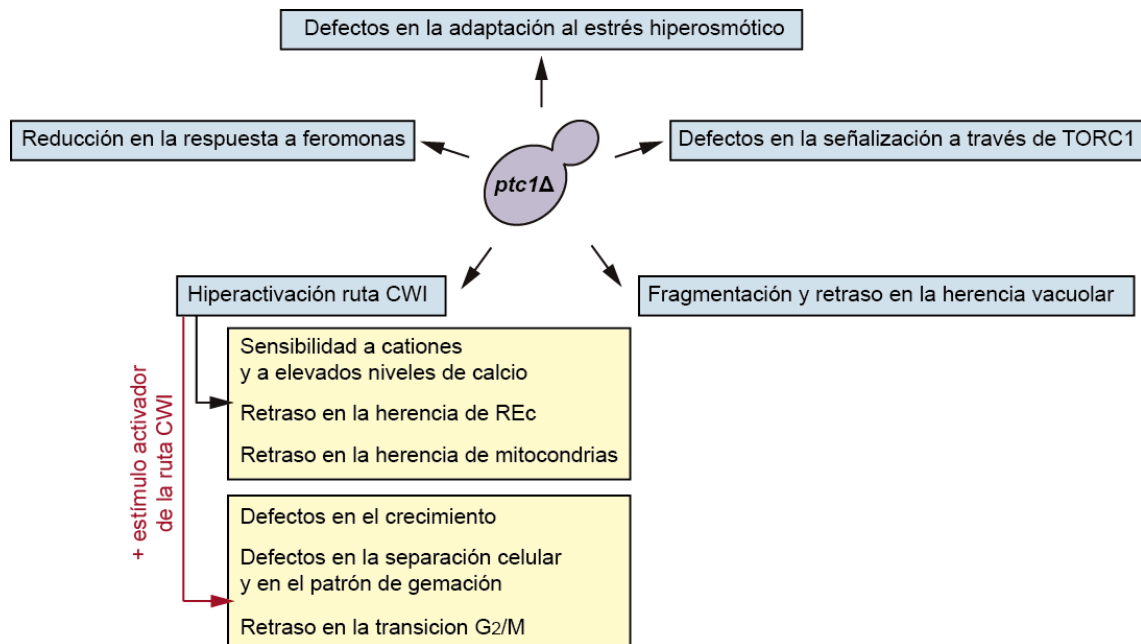


Figura 11. Principales alteraciones provocadas por la ausencia de Ptc1 en *S. cerevisiae*

6.3.2.1.1. Defectos en el crecimiento

Las células carentes de *PTC1* muestran un incremento en la expresión de genes que se inducen en condiciones de activación de Slt2, lo que indica que la ausencia de Ptc1 activa la ruta de integridad celular. Además, la mutación *ptc1Δ* es sintética letal con la mutación de genes que codifican componentes importantes de la pared celular, tales como *FKS1*, *GAS1* o *SMI1* (Ariño *et al.*, 2011). Asimismo, los mutantes *ptc1Δ* manifiestan hipersensibilidad a agentes que provocan daños en la pared celular, tales como el RC, la cafeína o el CFW. Este fenotipo es atribuible a la hiperactivación de Slt2 puesto que la

delección tanto de *RLM1* como de *MKK1* mejora el crecimiento de los mutantes *ptc1Δ* en estas situaciones de estrés (González *et al.*, 2006; Tatjer *et al.*, 2016b).

6.3.2.1.2. Defectos en el patrón de gemación y en la separación celular

Los mutantes *ptc1Δ* muestran alteraciones en el patrón de gemación axial y defectos en la separación celular cuando son cultivados a 37 °C (González *et al.*, 2006) o en presencia de CFW (Tatjer *et al.*, 2016b). Se ha demostrado que la delección de *MKK1* elimina sustancialmente estos defectos fenotípicos (Tatjer *et al.*, 2016b).

6.3.2.1.3. Defectos en la herencia de orgánulos

Diversos estudios han demostrado que Ptc1 está involucrada en la herencia de diferentes orgánulos celulares, entre los que se encuentran las mitocondrias, el RE cortical (REc), las vacuolas, los peroxisomas y las vesículas secretoras (Ariño *et al.*, 2011). Mientras que en las cepas silvestres la herencia de las mitocondrias se produce de manera simultánea a la emergencia de la yema, en el mutante *ptc1Δ* las yemas emergentes carecen inicialmente de orgánulos mitocondriales, lo cual indica que la ausencia de Ptc1 provoca un retraso en la herencia mitocondrial (Roeder *et al.*, 1998). En este mutante también se ha observado un retraso en la herencia del REc. Concretamente se ha visto que, una vez anclados a la parte apical de la yema, los túbulos del RE tardan más tiempo del habitual en expandirse por la región cortical de la célula hija (Du *et al.*, 2006). Ptc1 también es necesaria para que se produzca una correcta herencia de las vacuolas. Así las células *ptc1Δ*, además de tener las vacuolas fragmentadas, muestran defectos en el desplazamiento de las mismas desde la célula madre hasta la yema (Jin *et al.*, 2009). Las anomalías mostradas por el mutante *ptc1Δ* en la herencia de estos tres orgánulos no están relacionados con la ruta HOG (Du *et al.*, 2006; Roeder *et al.*, 1998), pero sí dependen de la hiperactivación de la ruta CWI en el caso del RE cortical (Du *et al.*, 2006) y de las mitocondrias (Li *et al.*, 2010). No sucede lo mismo con las vacuolas, puesto que la delección de *SLT2* no suprime los defectos en la herencia vacuolar mostrados por el mutante *ptc1Δ* (Du *et al.*, 2006).

El transporte polarizado de la mayoría de los orgánulos desde la célula madre a la hija requiere el citoesqueleto de actina, las proteínas motoras de la familia miosina-V, Myo2 y Myo4, y proteínas adaptadoras que conectan físicamente la miosina con los orgánulos (Pruyne *et al.*, 2004). Ptc1 promueve la asociación de la proteína motora Myo2 con las proteínas adaptadoras específicas de orgánulos Mmr1, Vac17 e Inp2, implicadas en la segregación de mitocondrias, vacuolas y peroxisomas, respectivamente (Ariño *et al.*, 2019). Se ha visto que en las células que carecen de Ptc1 hay un incremento en la cantidad de Mmr1 fosforilado (Swayne *et al.*, 2011), así como una disminución en los niveles basales de estas tres proteínas adaptadoras (Jin *et al.*, 2009). Por todo lo

descrito con anterioridad, Ptc1 es considerado un elemento clave en el control de la distribución de los orgánulos celulares.

6.3.2.1.4. *Retraso en el avance en el ciclo celular en la fase G₂/M*

Cuando las células carentes de *PTC1* se someten a condiciones de activación de la ruta CWI, muestran una hiperfosforilación de Cdc28 y una acumulación de contenido de ADN duplicado, lo cual es indicativo de una parada en la fase G₂/M. Asimismo, el mutante *ptc1Δ* muestra reducida su actividad Clb2-Cdc28. El hecho de que estas alteraciones se reduzcan cuando se muta el gen *MKK1*, atribuye a la activación de Slit2 un papel regulador del ciclo celular (Tatjer *et al.*, 2016a).

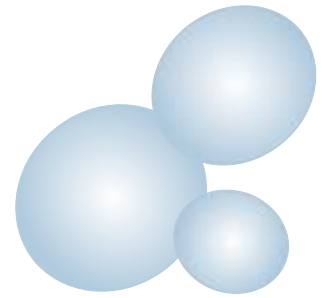
6.3.2.1.5. *Defectos en la señalización de TORC1*

Las células que carecen de *PTC1* son sensibles a la rapamicina, lo que sugiere una relación de esta fosfatasa con la ruta TORC1 (Ariño *et al.*, 2011). Tras la inducción con rapamicina, la presencia de Tip41 desfosforilada es necesaria para que esta proteína pueda interaccionar con Tap42 y se alivie la represión que esta última ejerce sobre las fosfatasas Sit4 y PP2A, permitiendo así que se desencadene la respuesta inducida por la inhibición de TORC1 (González *et al.*, 2009; Jacinto *et al.*, 2001) (apartado 4.1). El mutante *ptc1Δ* muestra una atenuación en los cambios transcripcionales inducidos por la rapamicina que no depende de la presencia de Hog1 ni de Nbp2, y que se debe, en parte, a que en el mutante *ptc1Δ* se produce una reducción en los niveles de Tip41 y una disminución en la desfosforilación de esta proteína (González *et al.*, 2009).

6.3.2.1.6. *Otros defectos fenotípicos*

Además de todas las alteraciones fenotípicas expuestas con anterioridad, se han descrito defectos en la homeostasis celular asociados con la pérdida de la función de Ptc1, como, por ejemplo, un incremento en la sensibilidad a cationes y a elevados niveles de calcio (González *et al.*, 2006). Estas alteraciones, que parecen deberse en parte a una reducción en la expresión del gen *ENA1*, que codifica la ATPasa de Na⁺ (Ruiz *et al.*, 2006) y a una hiperactivación de la calcineurina (González *et al.*, 2006), respectivamente, se atenúan en el doble mutante *ptc1Δ mkk1Δ* (Tatjer *et al.*, 2016b). Asimismo, se ha demostrado que Ptc1 es una de las fosfatasas implicadas en la desfosforilación y consiguiente inactivación de la quinasa activada por adenosín monofosfato o AMPK (del inglés, *AMP-activated Kinase*) Snf1 cuando la levadura está creciendo en medios con elevada concentración de glucosa (Ruiz *et al.*, 2013). Otros de los defectos fenotípicos mostrados por las células carentes de *PTC1* son un incremento en la sensibilidad al pH alcalino (Serrano *et al.*, 2004), defectos en el procesamiento del ARN transferente y dificultad para crecer en medios que contienen fuentes de carbono no fermentables (Robinson *et al.*, 1994). Conocer cuáles son los mecanismos responsables de estas

alteraciones fenotípicas resulta fundamental para establecer nuevas conexiones entre las diferentes rutas de señalización y procesos celulares que, en su conjunto, rigen el funcionamiento de las células eucariotas.



ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Antecedentes

El estudio de la ruta que regula la integridad de la pared celular (ruta CWI) en *S. cerevisiae* comenzó hace 30 años, cuando nuestro grupo de investigación identificó un nuevo gen capaz de complementar el fenotipo lítico de sensibilidad a temperatura mostrado por el mutante autolítico *lyt2* de esta levadura (Cabib y Duran, 1975), que fue denominado *SLT2* (Torres *et al.*, 1991). A partir de entonces, gran parte de nuestros esfuerzos se han centrado en tratar de descifrar los múltiples mecanismos que rigen la señalización a través de la ruta CWI (González-Rubio *et al.*, 2021).

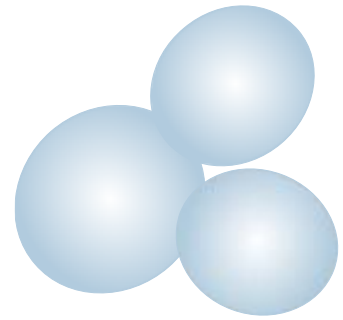
En este contexto, nuestro grupo ha desarrollado diferentes técnicas y herramientas que nos han permitido profundizar en el estudio de esta ruta de MAPKs. Dentro de ellas cabe destacar, por la relevancia que han tenido para la consecución de este trabajo, el uso de anticuerpos frente a las formas fosforiladas de las MAPKs de mamíferos p44/42 (Erk1/Erk2) para detectar la fosforilación en el motivo TEY de Slt2, que constituye una herramienta fundamental para monitorizar la activación de la ruta CWI (Martín *et al.*, 2000). Sin embargo, muy poco se conoce sobre la posible presencia y funcionalidad *in vivo* de formas monofosforiladas de esta MAPK. Asimismo, el desarrollo de una versión de Slt2 sensible a análogos voluminosos de ATP (Slt2-as), sentó las bases para realizar experimentos en los que se pudiera inhibir la actividad catalítica de esta MAPK de manera selectiva y reversible (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016).

Por otro lado, en un trabajo previo en colaboración con el Dr. Ariño, nuestro grupo de investigación determinó que la eliminación de la principal MAPKK activadora de Slt2, Mkk1, suprimía en gran medida los defectos en el crecimiento y en la separación celular asociados a la ausencia de la serín/treonin fosfatasa Ptc1. Esto sugería que la hiperfosforilación y consecuente hiperactivación de Slt2 observada en el mutante *ptc1Δ* era la responsable de estas alteraciones fenotípicas y, por tanto, que la reducción de su actividad atenuaba estos defectos (Tatjer *et al.*, 2016b). Además, en estudios preliminares, nuestro grupo de investigación observó que, en condiciones de estrés térmico, el mutante *ptc1Δ* desarrollaba un fenotipo de multigemación en el que las yemas mostraban defectos en la reabsorción del anillo de septinas.

Objetivos

Con estos antecedentes, los objetivos específicos que nos propusimos en la presente tesis doctoral para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de activación y los efectos de la hiperactividad de Slt2 fueron los siguientes:

1. Caracterizar la dinámica de fosforilación y desfosforilación de la T190 y de la Y192 del motivo TEY de Slr2 y el efecto que tienen las fosforilaciones individuales en dichas posiciones, así como otros residuos y dominios propuestos como relevantes en la funcionalidad de otras MAPKs, sobre la actividad de Slr2.
2. Caracterizar el fenotipo de multigemación de las células *ptc1Δ* sometidas a estrés térmico y la contribución de la actividad de la ruta CWI a las alteraciones mostradas por este mutante.



MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados

Para el desarrollo de este estudio se emplearon diferentes cepas de la levadura *S. cerevisiae*. Sus características genéticas, así como su procedencia y la forma en la que se construyeron las obtenidas en este trabajo, se detallan en la [Tabla 2](#). Asimismo, se utilizó la cepa DH5α de *Escherichia coli* para los experimentos de clonación molecular y como hospedador de los plásmidos utilizados. Las cepas de *S. cerevisiae* y de *E. coli* se conservaron a -80 °C en crioviales con un 50 y un 25 % (v/v) de glicerol, respectivamente.

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo ordenadas alfabética y numéricamente

Cepa	Genotipo	Fuente/ referencia
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	<i>Euroscarf</i> / (Brachmann <i>et al.</i> , 1998)
BY4741 <i>ptc1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>ptc1Δ::HIS3</i>	Dra. Sacristán- Reviriego
BY4741 <i>slt2Δ</i> -RLM1Myc	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMx4</i> ; <i>RLM1- 6MYC::HIS3</i>	(García <i>et al.</i> , 2016)
GFY-42	Isogénica BY4741; <i>cdc10Δ::CDC10::mCherry::ADH1(t)::SpHIS5</i>	(Finnigan <i>et al.</i> , 2015)
Y3656	<i>MATα can1Δ::MFA1pr-HIS3- MFA1pr-LEU2 his3Δ1 leu2Δ0 ura3Δ0 met15Δ0 lys2Δ0</i>	(Schuldiner <i>et al.</i> , 2005)
Y00993	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMx4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02112	Isogénica BY4741; <i>mkk2Δ::kanMx4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02487	Isogénica BY4741; <i>mkk1Δ::kanMx4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y02739	Isogénica BY4741; <i>rlm1Δ::kanMx4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y04131	Isogénica BY4741; <i>swi6Δ::kanMx4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y06109	Isogénica BY4741; <i>swi4Δ::kanMx4</i>	<i>Euroscarf</i>
Y07373	Isogénica BY4741; <i>msg5Δ::kanMx4</i>	<i>Euroscarf</i>
YASS-1	Isogénica Y3656; <i>slt2 323A>G, 324G>T (E108G)::natMX6</i>	Dr. Martín
YGGR9	Isogénica Y3656; <i>cdc10Δ::CDC10::mCherry::ADH1(t)::SpHIS5</i>	Este trabajo ^a
YGGR10	Isogénica YSTH14; <i>cdc10Δ::CDC10::mCherry::ADH1(t)::SpHIS5</i>	Este trabajo ^a
YGGR12	Isogénica YSTH14; <i>ace2Δ::ACE2::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR13	Isogénica Y3656; <i>slt2Δ::SLT2::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR14	Isogénica YSTH14; <i>slt2Δ::SLT2::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR16	Isogénica YGGR12; <i>cdc10Δ::CDC10::mCherry::ADH1(t)::SpHIS5</i>	Este trabajo ^a
YGGR17	Isogénica YGGR13; <i>cdc10Δ::CDC10::mCherry::ADH1(t)::SpHIS5</i>	Este trabajo ^a
YGGR18	Isogénica YGGR14; <i>cdc10Δ::CDC10::mCherry::ADH1(t)::SpHIS5</i>	Este trabajo ^a
YGGR19	Isogénica YASS-1; <i>ptc1Δ::kanMx4</i>	Este trabajo ^c

Tabla 2. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo (continuación)

Cepa	Genotipo	Referencia o fuente
YGGR32	Isogénica Y02487; <i>slt2Δ::natMx6</i>	Este trabajo ^d
YGGR33	Isogénica Y02112; <i>slt2Δ::natMx6</i>	Este trabajo ^d
YGGR34	Isogénica Y07373; <i>slt2Δ::natMx6</i>	Este trabajo ^d
YGGR35	Isogénica Y3656; <i>swi4Δ::kanMx4</i>	Este trabajo ^e
YGGR38	Isogénica Y3656; <i>swi6Δ::kanMx4</i>	Este trabajo ^e
YGGR41	Isogénica YSTH14; <i>swi4Δ::kanMx4</i>	Este trabajo ^e
YGGR43	Isogénica YGGR9; <i>atg9Δ::ATG9::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR45	Isogénica YGGR10; <i>atg9Δ::ATG9::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR47	Isogénica YSTH14; <i>swi6Δ::kanMx4</i>	Este trabajo ^e
YGGR52	Isogénica Y3656; <i>dse1Δ::DSE1::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR53	Isogénica YSTH14; <i>dse1Δ::DSE1::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR54	Isogénica YGGR52; <i>cdc3-mCherry::URA3</i>	Este trabajo ^f
YGGR55	Isogénica YGGR53; <i>cdc3-mCherry::URA3</i>	Este trabajo ^f
YGGR56	Isogénica Y3656; <i>cts1Δ::CTS1::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR57	Isogénica YSTH14; <i>cts1Δ::CTS1::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Este trabajo ^b
YGGR58	Isogénica YGGR56; <i>cdc3-mCherry::URA3</i>	Este trabajo ^f
YGGR59	Isogénica YGGR57; <i>cdc3-mCherry::URA3</i>	Este trabajo ^f
YMJ30	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMx4; MKK1::6MYC::LEU2</i>	Dra. Jiménez-Sánchez
YMJ31	Isogénica BY4741; <i>slt2Δ::kanMx4; MKK2::6MYC::LEU2</i>	Dra. Jiménez-Sánchez
YPL14	Isogénica BY4741; <i>mkk1Δ::kanMx4; ptc1Δ::HIS3</i>	(Tatjer <i>et al.</i> , 2016b)
YPL12	Isogénica BY4741; <i>rlm1Δ::kanMx4; ptc1Δ::HIS3</i>	Dra. Palacios
YSTH4	Isogénica Y3656; <i>slt2Δ::natMx6</i>	(Martín <i>et al.</i> , 2015)
YSTH14	Isogénica Y3656; <i>ptc1Δ::natMX6</i>	(Martín <i>et al.</i> , 2015)

^a Las cepas con la septina Cdc10 fusionada en el extremo C-terminal a *mCherry* (mCh) (Shaner *et al.*, 2004) se construyeron transformando la cepa indicada en cada caso con el fragmento *CDC10::mCherry::ADH1(t)::SpHIS5*, obtenido mediante la amplificación por PCR del ADN genómico de la cepa GFY-42, e integrándolo en el locus de *CDC10*.

^b Las cepas con proteínas fusionadas en el extremo C-terminal a la proteína verde fluorescente *mNeonGreen* (mNG) (Shaner *et al.*, 2013) se construyeron transformando la cepa indicada en cada caso con un fragmento obtenido mediante la amplificación por PCR del plásmido pAP67, consistente en *mNG::ADH1(t)::HygR* flanqueado por las regiones situadas en los extremos 5' y 3' del codon de terminación de cada uno de los genes de interés, e integrándolo en el extremo C-terminal de cada uno de ellos.

^c Se construyó empleando la técnica de reemplazamiento génico (Rothstein, 1991), mediante una transformación integrativa de la cepa YASS-1 con un fragmento que contiene el marcador de selección Kan^r flanqueado por las regiones no codificantes 5' y 3' de *PTC1*, obtenido mediante la amplificación por PCR del plásmido pFA6a-*kanMx4*.

^d Se construyeron transformando las cepas indicadas en cada caso con el fragmento *slt2Δ::natMx6*, obtenido mediante la amplificación por PCR del ADN genómico de la cepa YSTH4.

^e Se construyeron transformando las cepas Y3656 o YSTH14, con los fragmentos *swi4Δ::kanMx4* o *swi6Δ::kanMx4*, según se indica en cada caso, obtenidos de la amplificación mediante PCR de las cepas Y06109 y Y04131, respectivamente.

^f Se construyeron transformando la cepa indicada en cada caso, con el plásmido Ylp211-CDC3-*mCherry* (Fang *et al.*, 2010), previamente digerido con *Bgl*II, e integrándolo en el locus de *CDC3*.

En la [Tabla 3](#) se indican los oligonucleótidos empleados en las PCRs para la obtención de cada una de las cepas de *S. cerevisiae* construidas a lo largo de este trabajo.

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para la construcción de las diferentes cepas y plásmidos

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Utilidad	Cepa /Plásmido generados
oGGR1	GTGAGTTACCTCACTCATTAG	Para PCR solapante en <i>SLT2</i> Incluye el fragmento <i>Clal</i> - <i>6His-MluI</i>	pRS316-6His- <i>SLT2</i>
oGGR2	ACGCGTATGATGGTGGTGATG ATGAGACATATCGATCTCCAG AATTGTTATACAC		
oGGR3	ATCGATATGTCTCATCATCACCA CCATCATACGCGTATGGCTGAT AAGATAGAGAG		
oGGR4	ACGACGTTGTAAAACG		
oGGR22	ATTCTTACTTCATATATCATTTA GGCACTGCATTTATCTTTAAAA ATCATTATAACATGGAGGCCCA GAATACCC	Amplificar <i>KanMx4</i> con extremos colindantes al ORF de <i>PTC1</i> para integrarlo y deleccionar el gen	YGGR19
oGGR23	ATTGCATATCTCTATGTCTATGC ATAATTTTTCGCGGTTTATAAC GGATCCTTCCAGTATAGCGACC AGCATTCAC		
oGGR24	ACTCGAACCGCACCCCTTCAAAC GAAACTGATGCTCTCTCTGGTAG TTCTGGTGGTATGG	Amplificar <i>mNG::ADH1(t)::HygR</i> del plásmido pAP67 e integrar en el extremo C-terminal de <i>ACE2</i>	YGGR12
oGGR25	CTATTATTTATTATGTTAATATC ATGCATAGATAAATGTTGCGACT GGATGGCGGCGTTAG		
oGGR26	AAAAAGAGCTGGAGTTTGGATT AGATAGAAAATATTTTCTGGT AGTTCTGGTGGTATGG	Amplificar <i>mNG::ADH1(t)::HygR</i> del plásmido pAP67 e integrar en el extremo C-terminal de <i>SLT2</i>	YGGR13 YGGR14
oGGR27	ATGGTGATTCTATACTTCCCCG GTTACTTATAGTTTTTGTCACT GGATGGCGGCGTTAG		
oGGR30	AATGCGAATAGTCGTTCTCAGCT	Amplificar <i>CDC10-mCherry:SpHis5</i> de la cepa GFY-42 para integrar y expresar Cdc10-mCh desde su locus cromosómico	YGGR9 YGGR10 YGGR16 YGGR17 YGGR18
oGGR31	GGTGCTCAATTGGTGTGGGAC		
oGGR38	TTGTTAAAGAGTATTACAAGAA GTCTGACGTCGGAAGATCTGGT AGTTCTGGTGGTATGG	Amplificar <i>mNG::ADH1(t)::HygR</i> del plásmido pAP67 e integrar en el extremo C-terminal de <i>ATG9</i>	YGGR43 YGGR45
oGGR39	TATATATAGTTATATTGGATGAT GTACACGACACAGTCTGCCACT GGATGGCGGCGTTAG		

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para la construcción de las diferentes cepas y plásmidos (continuación)

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Utilidad	Cepa /Plásmido generados
oGGR46	GTACATTATTTACGTTATTTG	Amplificar <i>swi4Δ::kanMx4</i> de Y06109 para construir mutantes <i>swi4Δ::kanMx4</i>	YGGR35 YGGR41
oGGR47	GAAGTGATAGCGTGCAAAG		
oGGR49	CTTCATCTGGACCGTTTGG	Amplificar <i>swi6Δ::kanMx4</i> de Y06109 para construir mutantes <i>swi6Δ::kanMx4</i>	YGGR38 YGGR47
oGGR50	CTATATATCCCATCTGAGTAC		
OGGR51	CGAACTGTGCATTCAAGTCAG	Amplificar <i>slt2Δ::natMx6</i> desde YSTH4 para construir mutantes <i>slt2Δ::natMx6</i>	YGGR32 YGGR33 YGGR34
OGGR52	CGAGCTACAACAAGAGCAC		
oGGR73	TGCATTTAAGTGGATCTACTATT GATACTACTGTTGTCTCTGGTA GTTCTGGTGGTATGG	Amplificar <i>mNG::ADH1(t)::HygR</i> del plásmido pAP67 e integrar en el extremo C-terminal de <i>DSE1</i>	YGGR52 YGGR53
oGGR74	ATTGATATGTTATTTGTTTTAT TTGAAAGCACTCAAGGAAAAC GGATGGCGGCGTTAG		
oGGR84	CCCAATGTAATTTCTCTTATTTG GAAAGCAATTACTTTTCTGGTA GTTCTGGTGGTATGG	Amplificar <i>mNG: ADH1(t)::HygR</i> del plásmido pAP67 e integrar en el extremo C-terminal de <i>CTS1</i>	YGGR56 YGGR57
oGGR85	GCAAAAAAAAAATATTCGGACTC TATGAATCAATCTCTAATAACTA CTGGATGGCGGCGTTAG		
oGGR90	CAATTCTGGGAGATGGCTG	Para combinar con oligonucleótidos mutagénicos en PCR solapante de <i>SLT2</i>	pRS316- <i>slt2</i> T190A Y192A; pRS316- <i>slt2ΔC374</i> ; pRS316- <i>slt2CD3</i>
oGGR91	CAAACCTCCGCGGAGTACG		
oGGR92	CGAAAACAGTCAATTTTGGCA GAGGCCGTGGCCACTAGATGG	PCR solapante con oligonucleótidos mutagénicos para generar <i>SLT2</i> T190A Y192A	pRS316- <i>slt2</i> T190A Y192A
oGGR93	CCATCTAGTGGCCACGGCCTCT GCCAAAATTGACTGTTTTCG		
oGGR94	GAAGAGCAAAGGCAATTATAAT AACAGCAGCAGCAACAGC	PCR solapante con oligonucleótidos mutagénicos para generar <i>SLT2 ΔC374</i>	pRS316- <i>slt2</i> ΔC374
oGGR95	GCTGTTGCTGCTGCTGTTATTAT AATTGCCTTTGCTCTTC		
oGGR96	TACTTGCTATATGGCATAATCC AGCTAACAATCCTGTGTGTAGT GAAAAAT	PCR solapante con oligonucleótidos mutagénicos para generar <i>SLT2 CD3</i>	pRS316- <i>slt2</i> CD3
oGGR97	ATTTTTCCTACTACACAGGATTG TTAGCTGGATTATGCCATATAG ACAAGTA		
oGGR98	CGGAGTACGTGGCCGTTAGAT GGTATAGAGCTCCGG	PCR mutagénica para generar <i>SLT2</i> T195V	pRS316- <i>SLT2</i> T195V; pRS316-GFP- <i>slt2</i> T195V
oGGR99	CGGAGTACGTGGCCGTTAGAT GGTATAGAGCTCCGG		

Tabla 3. Oligonucleótidos empleados en este trabajo para la construcción de las diferentes cepas y plásmidos (continuación)

Nombre	Secuencia (5' a 3')	Utilidad	Cepa /Plásmido generados
oGGR100	CGGAGTACGTGGCCACTAGAT GGTTTAGAGCTCCGG	PCR mutagénica para generar <i>SLT2</i> Y198F	pRS316- <i>SLT2</i> Y198F
oGGR101	CCGGAGCTCTAAACCATCTAGT GGCCACGTACTCCG		
oGGR102	CGGAGTACGTGGCCGTTAGAT GGTTTAGAGCTCCGG	PCR mutagénica para generar <i>SLT2</i> T195V Y198F	pRS316- <i>slt2</i> T195V Y198F; pRS316- <i>GFP-slt2</i> T195V Y198F
oGGR103	CCGGAGCTCTAAACCATCTAAC GGCCACGTACTCCG		
oGGR104	CCATCGATATGAGTAAAGGAGA AGAAC	Para amplificar <i>GFP</i> y subclonarlo en pRS316-6His- <i>SLT2</i>	pRS316- <i>GFP-SLT2</i>
oGGR105	CGACGCGTTTTGTATAGTTCATC CATGC		

2. Procedimientos generales de biología molecular

2.1. Extracción y purificación del ADN plasmídico de *E. coli*

De manera rutinaria, para la extracción del ADN plasmídico de *E. coli* se empleó el método basado en la lisis alcalina (Sambrook y Russell, 2001). Sin embargo, para las técnicas que requerían un ADN de elevada pureza, se recurrió al kit *NZYMiniprep* (Nzytech), siguiendo las indicaciones del fabricante.

2.2. Extracción del ADN genómico de levadura

La extracción del ADN genómico de levadura, con el fin de emplearlo posteriormente como molde en una PCR, se llevó a cabo utilizando un protocolo basado en la lisis de las levaduras en presencia de acetato de litio y SDS (Looke *et al.*, 2011). A partir de una cepa de levadura aislada en una placa con medio de cultivo sólido, se tomó una colonia fresca y, tras resuspenderla en 100 µL de una solución que contenía 200 mM LiOAc y 1 % SDS, se incubó a 70 °C durante 5 min. A continuación, se añadieron 200 µL de etanol frío (-20 °C) al 96 % para precipitar el ADN. El ADN precipitado se lavó con etanol frío (-20 °C) al 70 % y se resuspendió en 100 µL de agua purificada con *Milli-Q* (Merck Millipore). Para sedimentar los restos celulares, se centrifugó a 13000 rpm durante 15 seg. Se tomó 1 µL del sobrenadante para emplearlo como molde en la PCR.

2.3. Amplificación de secuencias de ADN. Reacción en cadena la polimerasa (PCR)

La amplificación de secuencias de ADN mediante PCR se realizó en el termociclador *MiniCycler™ PTC-150* (MJ Research), empleando las polimerasas *PfuTurbo DNA polymerase* (Agilent), *Advantage HD Polymerase* (Takara) o la DNA polimerasa de

Biotoools, en función de la fidelidad y de la procesividad requeridas y siguiendo, en cada caso, las indicaciones del fabricante.

2.4. Mutagénesis dirigida por PCR

Las mutaciones puntuales se generaron mediante una PCR solapante o siguiendo el método de la mutagénesis dirigida en dos etapas (Wang y Malcolm, 1999), empleando la polimerasa *PfuTurbo DNA polymerase* (Agilent).

2.4.1. PCR solapante

En el caso de la PCR solapante, se diseñaron dos pares de oligonucleótidos, dentro de los cuales, cada pareja contenía uno mutagénico que constituía el fragmento solapante del amplicón. En primer lugar, se realizaron dos PCRs paralelas, una con cada pareja de oligonucleótidos, en las que se incluyó como molde el ADN plasmídico que se quería mutar, extraído en condiciones de elevada pureza, junto con el resto de los componentes necesarios en cualquier reacción de PCR. A continuación, se realizó una tercera PCR que incluía los oligonucleótidos no mutagénicos de cada una de las parejas y como molde los productos de las dos PCRs anteriores. El producto final de la PCR solapante se digirió con endonucleasas de restricción y se subclonó dentro del vector de interés, previamente digerido con las mismas enzimas y se empleó para transformar *E. coli*. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación.

2.4.2. Mutagénesis dirigida en dos etapas

En el caso de la mutagénesis dirigida en dos etapas, para cada una de las reacciones, se diseñaron dos oligonucleótidos mutagénicos siguiendo las instrucciones del manual del kit *QuikChange II Site-Directed Mutagenesis*. En una primera etapa, se realizaron dos reacciones paralelas de PCR. En cada una de estas reacciones se incorporó uno de los dos oligonucleótidos mutagénicos, el ADN plasmídico molde que se quería mutar, extraído en condiciones de elevada pureza, y el resto de los componentes necesarios en una reacción de PCR. Los productos resultantes de estas dos PCR se juntaron para llevar a cabo una segunda etapa de amplificación, tras la cual ya se había generado el plásmido mutagénico. Para eliminar el ADN original empleado como molde, que no contenía la mutación, el producto de la PCR mutagénica se digirió con la endonucleada *DpnI*. El producto de esta digestión se utilizó para transformar *E. coli*.

2.5. Digestión, purificación y ligación de fragmentos de ADN

En general, los procedimientos empleados para la manipulación del ADN fueron los que se encuentran recogidos en el manual de laboratorio de Sambrook y Russell (Sambrook y Russell, 2001), salvo en los casos en los que se indica que se emplearon kits comerciales, en los cuales se siguieron las indicaciones de la casa comercial. La digestión

del ADN se realizó empleando endonucleasas de restricción (*NZYTech* o *Roche*). En el caso de los plásmidos cuyos extremos habían sido generados por el corte con una misma endonucleasa de restricción, se incluyó un paso de defosfatización con la fostatasa *rAPid alkaline* (*Roche*), con el fin de evitar la recircularización del mismo. La purificación de los fragmentos de ADN procedentes de geles de agarosa, de reacciones de PCR y de otras reacciones enzimáticas como los cortes con endonucleasas de restricción, se realizó empleando el kit comercial *Geneclean™* (*MP Biomedicals*). La unión enzimática de los fragmentos de ADN se realizó utilizando una ligasa codificada por el bacteriófago T4 (*T4-DNA ligase* [*Roche*]).

2.6. Análisis de ácidos nucleicos

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR o tras el tratamiento con endonucleasas de restricción, se analizaron en base a su tamaño mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 % preparados en tampón TAE (40 mM Tris base, 20 mM ácido acético, 1 mM EDTA) a los que se les aplicó un voltaje de 5 V/cm. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se sumergieron en una solución de *GelRed®* (*Biotium*) (*GelRed* 1x, 0,1M NaCl), el cual se intercala entre los ácidos nucleicos permitiendo así la visualización del ADN con el transiluminador de luz UV *MiniLumi* (*DNR bio-imaging system*).

La concentración y pureza del ADN se determinó en el *NanoDrop™ 2000c* (*Thermo Fisher Scientific*). Cuando fue necesario, las muestras de ADN se secuenciaron mediante el método de Sanger en la Unidad de Genómica de la Universidad Complutense de Madrid, empleando para la secuenciación el kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*) y el equipo *3730xl DNA Analyzer* (96 capilares, *Applied Biosystems*).

2.7. Transferencia de ADN a la célula hospedadora

Todos los plásmidos empleados en este estudio, así como la manera en la que se construyeron los generados en este trabajo, se muestran en la [Tabla 4](#). Asimismo, los oligonucleótidos utilizados para la construcción de estos plásmidos se indicaron en la [Tabla 3](#).

2.7.1. Transformación plasmídica en *E. coli* y en *S. cerevisiae*

La transformación plasmídica en *E.coli* se realizó por choque térmico de células bacterianas competentes, cuya envuelta estaba alterada debido a un tratamiento previo con metales (Inoue *et al.*, 1990). La transformación plasmídica de *S. cerevisiae* se realizó siguiendo el método en un único paso, que se basa en el empleo de LiOAc, DTT e incubación de la levadura a 45 °C (Chen *et al.*, 1992).

Tabla 4. Plásmidos empleados en este trabajo (ordenados alfabética y numéricamente)

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia o fuente
pFA6a-KanMx4	<i>kanMx4</i>	(Oka <i>et al.</i> , 1981)
pHR3	<i>CEN4, HIS3, slt2 160A>T, 161A>T, (K54F)</i>	(Martín <i>et al.</i> , 1993)
pLA10	<i>CEN6, URA3, CDC10-GFP</i>	(Cid <i>et al.</i> , 1998)
pMLP1-lacZ	2 μ m, <i>HIS3, pMLP1-lacZ</i>	Dr. Arroyo
pRS305-MKK1-6MYC	<i>Integrative, LEU2, MKK1-6MYC</i>	(Jiménez-Sánchez <i>et al.</i> , 2007)
pRS305-MKK2-6MYC	<i>Integrative, LEU2, MKK2-6MYC</i>	(Jiménez-Sánchez <i>et al.</i> , 2007)
pRS315	<i>CEN6, LEU2</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS315-SLT2	<i>CEN6, LEU2, SLT2</i>	Este trabajo ^a
pRS315- <i>slt2</i> T190A	<i>CEN6, LEU2, slt2 568A>G (T190A)</i>	Este trabajo ^a
pRS315- <i>slt2</i> Y192F	<i>CEN6, LEU2, slt2 575A>T (Y192F)</i>	Este trabajo ^a
pRS316	<i>CEN6, URA3</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS316-SLT2	<i>CEN6, URA3, SLT2</i>	(Alonso-Rodríguez <i>et al.</i> , 2016)
pRS316- <i>slt2</i> T190A	<i>CEN6, URA3, slt2 568A>G (T190A)</i>	Este trabajo ^b
pRS316- <i>slt2</i> Y192F	<i>CEN6, URA3, slt2 575A>T (Y192F)</i>	Este trabajo ^b
pRS316- <i>slt2</i> T190A Y192A	<i>CEN6, URA3, slt2 568A>G, 570G>A, 574T>G, 575A>C (T190A Y192A)</i>	Este trabajo ^c
pRS316- <i>slt2</i> Δ C374	<i>CEN6, URA3, slt2 1114C>T, 1118T>A (Q372stop, L373stop)</i>	Este trabajo ^c
pRS316- <i>slt2</i> CD3	<i>CEN6, URA3, slt2 967G>A, 977G>A, 979G>A, 981A>T (D323N, D326N, E327N)</i>	Este trabajo ^c
pRS316- <i>slt2</i> KD	<i>CEN6, URA3, slt2 160A>T, 161A>T, 162G>C (K54F)</i>	Este trabajo ^d
pRS316- <i>slt2</i> T195V	<i>CEN6, URA3, slt2 583A>G, 584C>T (T195V)</i>	Este trabajo ^e
pRS316- <i>slt2</i> Y198F	<i>CEN6, URA3, slt2 593A>T (Y198F)</i>	Este trabajo ^e
pRS316- <i>slt2</i> T195V Y198F	<i>CEN6, URA3, slt2 583A>G, 584C>T, 593A>T (T195V Y198F)</i>	Este trabajo ^e
pRS316-6His-Slt2	<i>CEN6, URA3, Clal-6His-Mlul-SLT2</i>	Este trabajo ^f
pRS316-GFP-SLT2	<i>CEN6, URA3, Clal-GFP-Mlul-SLT2</i>	Este trabajo ^g
pRS316-GFP-SLT2 T195V	<i>CEN6, URA3, Clal-GFP-Mlul- slt2 583A>G, 584C>T (T195V)</i>	Este trabajo ^h
pRS316-GFP-SLT2 T195V Y198F	<i>CEN6, URA3, Clal-GFP-Mlul- slt2 583A>G, 584C>T, 593A>T (T195V Y198F)</i>	Este trabajo ^h
pRS316 <i>prNIS1::NIS1::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	<i>CEN6, URA3, prNIS1::NIS1::mNG::ADH1(t)::HygR</i>	Dr. Thorner
pRS316[GFP-ATG8]	<i>CEN6, URA3, GFP-ATG8</i>	(Suzuki <i>et al.</i> , 2001)

Tabla 4. Plásmidos empleados en este trabajo (ordenados alfabética y numéricamente) (continuación)

Plásmido	Genotipo relevante	Referencia o fuente
pRS416; <i>SCH9</i> - 5HA	<i>CEN6, URA3, SCH9-5HA</i>	(Urban <i>et al.</i> , 2007)
YCp50[<i>mpk1Y192F</i>]	<i>CEN4, URA3, slt2 575A>T (Y192F)</i>	(Lee <i>et al.</i> , 1993)
YCp50[<i>mpk1T190A</i>]	<i>CEN4, URA3, slt2 568A>G (T190A)</i>	(Lee <i>et al.</i> , 1993)
YEp352GST	2 μ m, <i>URA3, GST</i>	(Sacristán-Reviriego <i>et al.</i> , 2014)
YEp352- <i>MSG5-GST</i>	2 μ m, <i>URA3, MSG5-GST</i>	(Sacristán-Reviriego <i>et al.</i> , 2014)
YEp352- <i>MSG5 C319A -GST</i>	2 μ m, <i>URA3, msg5 955T>G, 956G>C (C319A)-GST</i>	(Sacristán-Reviriego <i>et al.</i> , 2014)
YIp211- <i>CDC3-mCherry</i>	<i>Integrative, URA3, mCherry (RFP)-CDC3</i>	(Fang <i>et al.</i> , 2010)

^a Se construyeron insertando los fragmentos de 2,8 kb procedentes de la digestión con *SacI*-*Bam*HI de pRS316-*SLT2*, pRS316-*slt2* T190A o pRS316-*slt2* Y192F, según corresponda, en el vector pRS315 cortado con las mismas endonucleasas.

^b Se construyeron subclonando los fragmentos de 1,3 kb procedentes de la digestión con *Hind*III-*Hind*III de YCp50[*mpk1T190A*] o de YCp50[*mpk1Y192F*], según corresponda, en el fragmento de 5,8 kb *Hind*III-*Hind*III de pRS316-*SLT2*.

^c Los plásmidos pRS316-*slt2* T190A Y192A, pRS316-*slt2* Δ C374 y pRS316-*slt2* CD3 se construyeron realizando una PCR solapante con los oligonucleótidos oGGR90 y oGGR91 en combinación con los oligonucleótidos mutagénicos oGGR92/ oGGR93, oGGR94/ oGGR95 y oGGR96/ oGGR97, respectivamente, usando como molde pRS316-*SLT2*. Los productos de PCR digeridos *Hind*III-*Hind*III se insertaron en el fragmento *Hind*III-*Hind*III de pRS316-*SLT2*.

^d Se obtuvo subclonando el fragmento *Eco*RI-*Sall* de 2,2 kb de pHR3 que contiene la versión *slt2-K54F*, en el plásmido pRS316 digerido con *Eco*RI-*Sall*.

^e Los plásmidos pRS316-*slt2* T195V, pRS316-*slt2* Y198F y pRS316-*slt2* T195V Y198F se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida por PCR, empleando los oligonucleótidos oGGR98/ oGGR99, oGGR100/ oGGR101 y oGGR102/ oGGR103, respectivamente, y el plásmido pRS316-*SLT2* como molde.

^f Se obtuvo insertando el fragmento *Clal*-6His-*Mlu*I en el extremo N-terminal de *SLT2*, mediante una PCR solapante con los oligonucleótidos oGGR1, oGGR2, oGGR3 y oGGR4, empleando como molde pRS316-*SLT2*.

^g Se obtuvo amplificando el *GFP* a partir del plásmido pLA10 con los oligonucleótidos oGGR104 y oGGR105, los cuales incluyen dianas de restricción para *Clal* y *Mlu*I, respectivamente. El producto de la PCR se digirió con estas endonucleasas y se subclonó en los sitios *Clal* y *Mlu*I de pRS316-6His-*SLT2*.

^h Los plásmidos pRS316-*GFP-SLT2* T195V y pRS316-*GFP-SLT2* T195V Y198F se obtuvieron mediante mutagénesis dirigida por PCR, empleando los oligonucleótidos oGGR98/ oGGR99 y oGGR102/ oGGR103, respectivamente, y el plásmido pRS316-*GFP-SLT2* como molde.

2.7.2. Transformación de alta eficiencia en *S. cerevisiae*

Para integrar fragmentos de ADN en el genoma de *S. cerevisiae*, se llevó a cabo una transformación de alta eficiencia (Alison *et al.*, 1997). Este protocolo, que también se basa en la utilización de LiOAc, incluye pasos adicionales para incrementar

paulatinamente la concentración de este compuesto y emplea células de levadura en fase exponencial, con el fin de optimizar la eficacia de la transformación.

3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Las cepas de *S. cerevisiae* se cultivaron en medio YPD (1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % glucosa), o en medio selectivo sintético SD (2 % glucosa; 0,17 % base nitrogenada para levaduras; 0,5% sulfato amónico; 0,19 % de mezcla de aminoácidos comercial [*Formedium*]) incluyendo en éste los aminoácidos apropiados para mantener la selección plasmídica. *E. coli* se cultivó en medio Luria Bertani (LB) (1 % bactotripton; 0,5 % extracto de levadura; 1 % NaCl) suplementado con 100 µg/mL de ampicilina para la selección de los clones de interés. Estos medios, que se prepararon con agua desionizada purificada mediante el sistema *Millipore (Milli-Ro)* y se esterilizaron en el autoclave a una atmósfera de sobrepresión (121 °C) durante 20 min, se utilizaron en forma líquida o sólida (2,4 % de agar) según los requerimientos experimentales. En los casos en los que el medio de cultivo era líquido, tanto *E. coli* como *S. cerevisiae* se cultivaron en condiciones de agitación, a 180 rpm. La temperatura de incubación de *E. coli* fue de 37 °C, mientras que *S. cerevisiae* se cultivó rutinariamente a 30 °C salvo en los casos en los que se especifica otra temperatura.

Para evaluar el crecimiento en medio líquido de la levadura, se empleó el espectrofotómetro UV-visible *Beckman DU® 640 (Beckman)*, con el que se midió la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm ($A_{600\text{ nm}}$) de cultivos celulares o de diluciones de éstos que se encontraran dentro del rango de linealidad fotométrica del aparato (0,05-0,5).

3.1. Cultivo y tratamiento de levaduras en medio líquido

De manera general, para llevar a cabo los experimentos con cultivos líquidos de levadura se siguió la metodología que se describe a continuación. Las cepas de *S. cerevisiae* se inocularon en medio SD o YPD, en función de si estaban o no transformadas con plásmidos por los que hubiera que mantener condiciones de presión selectiva, y se cultivaron durante toda la noche (30 °C, 180 rpm). Al día siguiente, los preinóculos se refrescaron a una $A_{600\text{ nm}}$ de 0,3 y se incubaron durante 2-3 h hasta la fase de crecimiento exponencial, momento en el cual se inició el tratamiento en los casos en los que éste fue necesario. De esta manera, en los experimentos en los que se analizó el estado de fosforilación de Slr2 ([capítulo 1](#)), las células se trataron con rojo Congo (RC) (*Merck*) y se incubaron durante dos horas adicionales. En el caso de los experimentos centrados en el estudio del fenotipo de multigemación del mutante *ptc1Δ* ([capítulo 2](#)), de manera rutinaria los cultivos se incubaron durante, al menos, 6 horas adicionales a

38 °C. Algunos de los ensayos con este mutante también incluyeron tratamientos con RC, ditiotreitól (DTT) (*Sigma-Aldrich*), tunicamicina (*Sigma-Aldrich*), rapamicina (*Caymal chemical*) o cicloheximida (*Sigma-Aldrich*). Cuando se realizaron experimentos que implicaban la inhibición de Slt2, el inhibidor de quinasas 2,3-dimetilbencil-pirazol-pirimidina 1 (2,3-DMB-PP1) (*Calbiochem, EMD Chemicals*) se añadió al comienzo del estímulo. Dado que el 2,3-DMB-PP1 se disuelve en dimetilsulfóxido (DMSO), este compuesto se empleó como control negativo de inhibición. Los detalles de cada experimento se especifican en los pies de figura.

Una vez finalizado el tratamiento, se procedió al análisis de las células empleando diferentes técnicas bioquímicas, de microscopía o de citometría que se describen a lo largo de los siguientes apartados.

3.2. Ensayos de crecimiento de levadura por diluciones decimales seriadas en gota

Para llevar a cabo los ensayos de crecimiento por diluciones decimales seriadas en gota, las cepas o transformantes correspondientes de *S. cerevisiae* se cultivaron durante toda la noche en medio YPD o SD hasta alcanzar la saturación del cultivo. A continuación, se ajustó su $A_{600\text{nm}}$ a 0,5 en agua y se realizaron diluciones decimales seriadas en una placa de 96 pocillos, las cuales se inocularon en la superficie de placas de Petri, que contenían medio YPD, empleando el replicador *Multi-blot VP 407AH* (*V&P Scientific, INC*). Cuando se indica, las placas de medio YPD incluían alguno de los siguientes compuestos: RC, tunicamicina, cafeína (*Sigma-Aldrich*), blanco de calcoflúor (CFW, del inglés, *Calcofluor White*) (*Sigma-Aldrich*), SDS (*Duchefa Biochemie*) o zimoliasa 100T (*Biomedicals™*). Estos compuestos se disolvieron en el solvente indicado en cada caso por la casa comercial y se añadieron al medio tras su esterilización y atemperado. La concentración a la que se empleó cada uno de los compuestos citados, varía en función del experimento y se especifica en cada uno de ellos. Las placas se escanearon tras una incubación a 30 °C durante 72 h, salvo en los casos en los que se indica otra temperatura o tiempo.

4. Extracción, detección y análisis de proteínas

4.1. Obtención de extractos proteicos

4.1.1. Obtención en condiciones desnaturalizantes: precipitación de proteínas con TCA

De manera general, los extractos proteicos se obtuvieron mediante la precipitación con ácido tricloroacético (Leskoske *et al.*, 2018). El sedimento celular procedente de 1,5 mL de cultivo celular se mantuvo a -80 °C durante al menos 25 min. A continuación, las células se lisaron en 150 μL de 1,85 M NaOH; 7,4 % β -mercaptoetanol realizando agitaciones en el vórtex cada 2-3 min durante 10 min, manteniendo siempre las

muestras en hielo. Las proteínas presentes en los lisados resultantes se precipitaron añadiendo 150 μ L de 50 % ácido tricloroacético (TCA) y se mantuvieron durante 10 min en hielo, intercalando agitaciones puntuales en el vórtex cada 2-3 min. Las proteínas precipitadas se recolectaron mediante centrifugación y se lavaron 2 veces con acetona fría (-20 °C). Los precipitados proteicos se solubilizaron en 0,1 M Tris; 5 % SDS, con un volumen de 1 μ L por cada 0,025 unidades de A_{600nm} del cultivo inicial. A continuación, se añadió tampón de carga SDS 5x (Tris-Cl 1M pH 6; 50 % glicerol; 10 % SDS y 0,5 % azul de bromofenol) suplementado con 5 % β -mercaptoetanol. Las muestras se hirvieron durante 5 min y se centrifugaron antes de cargar la cantidad correspondiente de sobrenadante en el gel.

4.1.2. *Obtención en condiciones nativas: co-inmunoprecipitación de proteínas con Dynabeads™ protein G*

En la co-inmunoprecipitación de proteínas con *Dynabeads™ protein G* (Thermo Fisher Scientific) los extractos proteicos se obtuvieron como se describe a continuación. Las células procedentes de 50 mL de cultivo se resuspendieron en 500 μ L de tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA pH 8; 150 mM NaCl; 50 mM NaF, 5 mM $Na_4P_2O_7$; 10 % glicerol; 0,1 % NP-40; 50 mM β -glicerol fosfato; 1 mM Na_3VO_4) suplementado con 1 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) y una mezcla de inhibidor de proteasas (Thermo Fisher Scientific) y se lisaron mediante agitación con microesferas de vidrio de un diámetro de 0,75-1 mm en la *FastPrep®-24* (MP Biomedicals) (dos ciclos de 30 segundos a 5,5 m/s). La concentración proteica de los extractos se igualó, midiendo y equilibrando su A_{280nm} y se procedió con el protocolo de co-inmunoprecipitación atendiendo a las indicaciones del fabricante. Brevemente, para cada una de las muestras se incubaron, con rotación en una noria, 50 μ L (1,5 mg) de las microesferas magnéticas acopladas a la proteína G *Dynabeads™* con 200 μ L de una dilución 1:200 del anticuerpo anti-Mpk1-E9 en PBS-Tween (PBS-T) 0,02 %. Tras la incubación, las microesferas magnéticas *Dynabeads™* unidas a anti-Mpk1 (E9) se lavaron 4 veces con 200 μ L de PBS-T 0,02 % y se incubaron con los extractos proteicos durante toda la noche a 4 °C con rotación en una noria. A continuación, las microesferas magnéticas se lavaron 3 veces con 200 μ L de tampón de lavado (0,05 % Tween 20; 0,5 M NaCl en PBS) y los complejos proteicos se eluyeron con 20 μ L de tampón de elución (50 mM glicina pH 2,8). Después, se añadió tampón de carga SDS 5x. En los casos de las muestras en las que el azul de bromofenol viró a amarillo, se incrementó el pH de las mismas añadiendo 0,16 M Tris pH 8. Finalmente, las muestras se hirvieron durante 5 min antes de cargarlas en el gel. Como control se incluyó una muestra con la que se había procedido de manera paralela al resto, pero en la que la incubación se había realizado, en lugar de con extracto proteico, con tampón de lisis.

4.2. Separación electroforética y transferencia de proteínas

4.2.1. Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

La electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes en presencia de SDS (SDS-PAGE) permitió lograr una separación electroforética de las proteínas, así como estimar la masa molecular de las mismas, gracias al empleo de un marcador de peso molecular conocido (*Abcam*). Para llevar a cabo esta técnica, se usó el sistema *1.0-mm Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad)* y se prepararon geles consistentes en una parte concentradora con un 5 % de la mezcla acrilamida:bis-acrilamida 37.5:1 (*PanReac AppliChem ITW Reagents*) y una parte separadora, con una concentración de acrilamida:bis-acrilamida variable, del 8, 10 o 12 %, que dependió de la masa molecular de las proteínas que se quisieran resolver. De manera general, para todos los experimentos en los que se analizó el estado de fosforilación de Slt2, se empleó un gel separador al 10 %. Para los análisis de autofagia con GFP-Atg8 se emplearon geles separadores al 12 % y los del 8 % se utilizaron en el estudio del estado de fosforilación de Sch9-5HA. En estos geles se cargaron entre 5 y 15 μ L de extracto proteico en condiciones desnaturalizantes y la electroforesis se desarrolló en el tampón de electroforesis Tris-glicina (25 mM Tris; 192,6 mM glicina y 0,1 % SDS) a un voltaje constante de 170 V durante el tiempo necesario para que el azul de bromofenol alcanzase el final del gel.

Para la realización de la técnica de *Western blotting*, finalizada la SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron desde el gel a membranas de nitrocelulosa de 0,45 μ m de diámetro de poro (*Amersham™, GE Healthcare Life Sciences*) mediante un sistema de transferencia húmeda en tanque *Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)*, empleando el tampón de transferencia (48 mM Tris; 38,6 mM glicina; 0,037 % SDS y 20 % etanol). Las transferencias se llevaron a cabo a un voltaje constante de 110 V durante 70 min.

4.2.2. Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE

El empleo de la técnica Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE permitió separar electroforéticamente las distintas formas fosforiladas de la proteína Slt2. En este método, el *Phos-tag* se combina con dos iones de zinc para formar un complejo que, en condiciones de pH neutro, ralentiza el avance electroforético de las proteínas que se encuentran fosforiladas (Kinoshita y Kinoshita-Kikuta, 2011). El protocolo optimizado en este trabajo para lograr la máxima resolución de las diferentes formas fosforiladas de Slt2 se describe a continuación. El gel separador se componía de 8 % de la mezcla acrilamida:bis-acrilamida 37.5:3; 350 mM Bis-Tris pH 6,8; 20 μ M acrilamida *Phos-tag™* (*Fujifilm Wako Chemicals*); 40 μ M $ZnCl_2$; 0,1 % tetrametiletilendiamina (TEMED); 0,05 % persulfato de amonio (PSA). Una vez introducida entre las placas de vidrio, la solución

del gel separador se cubrió con isopropanol y se mantuvo polimerizando durante 1 h a temperatura ambiente. Antes de añadir la solución del gel concentrador, la superficie del gel separador se lavó cinco veces con 350 mM Bis-Tris pH 6,8. La solución del gel concentrador (4,5 % de la mezcla acrilamida:bis-acrilamida 37.5:3; 350 mM Bis-Tris pH 6,8; 0,1 % TEMED y 0,05 % PSA) se polimerizó durante 1 h a temperatura ambiente. La electroforesis se desarrolló a un voltaje constante de 20 V/gel en el sistema *1.0-mm Mini-PROTEAN 3 (Bio-Rad)*. El tampón de electroforesis empleado contenía 0,5 M Tris; 0,5 M 3-(n-morfolino) ácido propanesulfónico (MOPS) y 0,5 % SDS y se suplementó con 5 mM NaHSO₃ antes de su uso.

Una vez finalizada la Zn²⁺-*Phos-tag* SDS-PAGE, los geles se sumergieron en tampón de transferencia (25mM Tris; 193 mM glicina; 0,1 % SDS y 10 % metanol) suplementado con 5 mM de EDTA y se mantuvieron en agitación durante 10 min. Este proceso se realizó dos veces. A continuación, el gel se sumergió en tampón de transferencia sin EDTA durante 10 min con agitación. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0,45 µm (*Amersham™, GE Healthcare Life Sciences*) mediante un sistema de transferencia húmeda en tanque *Mini Trans-Blot® Cell (Bio-Rad)*, con tampón de transferencia, a 4 °C y un voltaje constante de 20 V durante 18 h. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron 4 veces con agua *Milli-Ro* durante 5 min por lavado.

4.3. Inmunodetección de proteínas mediante Western blotting

Una vez transferidas las proteínas, tanto en el caso de la SDS-PAGE como de la Zn²⁺-*Phos-tag* SDS-PAGE, las membranas se saturaron de proteína sumergiéndolas en solución de bloqueo (leche en polvo desnatada al 5 % en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente en condiciones de agitación, con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos. Las membranas se incubaron durante toda la noche a 4 °C en condiciones de agitación con los anticuerpos primarios adecuados (Tabla 5) diluidos en leche en polvo desnatada al 1 % en PBS-T 0,1 %.

Tras lavar las membranas con PBS-T 0,1 % (cinco veces, durante 5 min cada vez) los inmunocomplejos proteína-anticuerpo primario se detectaron tras la incubación de las membranas con uno de los siguientes anticuerpos secundarios marcados con fluorocromos infrarrojos: *IRDye® 800CW Goat anti-Rabbit* (926-32211), *IRDye 800CW Goat anti-Mouse* (926-32210), *IRDye 680 Goat anti-Rabbit* (926-68021) e *IRDye 680 Goat anti-Mouse* (926-68020) (*LI-COR Biosciences*). Estos anticuerpos, que se utilizaron a una concentración 1:5000, se diluyeron en la misma solución que los primarios y se mantuvieron en incubación durante 1 hora a temperatura ambiente en oscuridad con agitación. Después de realizar un lavado de las membranas como el indicado con

anterioridad y en oscuridad, éstas se analizaron mediante el sistema de imagen basado en infrarrojos *Odyssey* (LI-COR Biosciences).

Tabla 5. Lista de anticuerpos primarios utilizados en este trabajo

Nombre	Número de catálogo	Especie ^a	Dilución ^b	Fabricante
Actin C4	69100	Mc, ratón	WB: 1:1000	MP Biomedicals
C-Myc	PLA0001	Pc, conejo	WB: 1:1000	Sigma-Aldrich
Diphosphorylated ERK-1&2	M8159	Mc, ratón	WB: 1:1000	Sigma-Aldrich
GST	sc459	Pc, conejo	WB: 1:1000	Santa Cruz, Inc.
Myc 4A6	05-724	Mc, ratón	WB: 1:1000	Merck Millipore
Mpk1 (E9)	sc-133189	Mc, ratón	WB: 1:1000, IP: 1:200	Santa Cruz, Inc.
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	4370	Mc, conejo	WB: 1:1000	Cell signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	4377	Mc, conejo	WB: 1:250	Cell signaling
Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (3D7)	9215S	Mc, conejo	WB: 1:500	Cell signaling
Hog1 (y-215)	sc-9079	Pc, conejo	WB: 1:1000	Santa Cruz, Inc.
GFP JL-8	632381	Mc, ratón	WB: 1:1000	Clontech
HA 12CA5	11666606001	Mc, ratón	WB: 1:1000	Sigma-Aldrich

^a Mc-Monoclonal y Pc-policlonal

^b Aplicaciones: WB— *Western blotting* e IP— inmunoprecipitación.

5. Ensayo de la actividad β -galactosidasa y determinación de la concentración proteica mediante el método de Bradford

El ensayo de la actividad β -galactosidasa se realizó para medir la actividad transcripcional mediada por Rlm1 de diferentes mutantes de Slt2 en condiciones de activación de la ruta de integridad celular. Para llevar a cabo esta técnica, células transformadas con el plásmido *pMLP1-lacZ* (Tabla 4) se cultivaron en medio líquido y se estimularon con rojo Congo en las condiciones ya descritas (apartado 3.1). El sedimento celular correspondiente a 5 mL de cultivo se resuspendió en 150 μ L de tampón de lisis (100 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM DTT; 20 % glicerol) suplementado con 3,25 mM PMSF y las células se lisaron mediante agitación con microesferas de vidrio de un diámetro de 0,75-1 mm en la *FastPrep*®-24 (MP Biomedicals) (dos ciclos de 35 segundos a 5,5 m/s). El lisado celular se centrifugó a 13000 rpm durante 15 min a 4 °C. A continuación, se determinó la concentración proteica presente en los extractos mediante el método de Bradford. Para ello, se empleó una placa de 96 pocillos que incluía 160 μ L de una serie

de diluciones en agua desionizada de albúmina de suero bovina (BSA) de concentración conocida (0,77/ 1,55/ 3,1/ 6,19 y 12,38 µg/mL) y 160 µL de una dilución 1:53 de cada uno de los extractos proteicos. Sobre todas estas diluciones se añadieron 40 µL de reactivo de Bradford (*Bio-Rad*) y, transcurridos 5 min, se midió la $A_{595\text{nm}}$ en el lector de placas multi-pocillo *Bio-Rad* 680 *Microplate Reader* (*Bio-Rad*). Representando los datos de la absorbancia de la BSA frente a su concentración, se dibujó una curva de calibración teórica que permitió calcular las concentraciones de los extractos proteicos problema.

El ensayo de la actividad β -galactosidasa se realizó en placas de 96 pocillos, en los cuales se incluyeron 70 µL de tampón Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM NaH_2PO_4 , 0,075 % KCl; 100 µM MgSO_4) sobre los que se añadieron 10 µL de extracto proteico y 20 µL de orto-nitrofenil- β -D-galactósido (ONPG) (*Sigma-Aldrich*) a 4 mg/mL. El ONPG es un sustrato de la β -galactosidasa, cuya escisión por parte de esta enzima da lugar al orto-nitrofenol, un producto coloreado que absorbe luz a 415nm. La reacción se desarrolló a 30 °C durante el tiempo necesario para que apareciera una coloración amarilla, momento en el cual se añadieron 50 µL de 1 M Na_2CO_3 para pararla. Finalmente, se midió la $A_{415\text{nm}}$ en el lector de placas multi-pocillo *Bio-Rad* 680 *Microplate Reader* (*Bio-Rad*). El resultado se expresó calculando la actividad específica β -galactosidasa de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\frac{A_{415\text{nm}} \times 0,17}{0,0045 \times [\text{proteína}] (\text{mg/mL}) \times \text{volumen de extracto (mL)} \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

6. Tinciones celulares

Las tinciones celulares de *S. cerevisiae* se realizaron sobre las cepas de levadura correspondientes en cada caso, cultivadas en las condiciones específicas para cada experimento. Esta información se expone en el [apartado 3.1](#) y se detalla en los pies de figura. Las tinciones celulares se analizaron mediante microscopía de fluorescencia ([apartado 7.1](#)) y/o citometría de flujo ([apartado 8](#)).

6.1. Tinción con yoduro de propidio

La tinción con yoduro de propidio (PI) (*Sigma-Aldrich*) se realizó para analizar la integridad de la membrana plasmática de las levaduras y, por ende, la viabilidad celular. Para realizar esta tinción se tomó 1 mL de cultivo celular sobre el que se añadió 0,0005 % IP y se dejó incubando en oscuridad a 30 °C durante 2 min.

6.2. Tinción con rodamina 123

La tinción con rodamina 123 (Rh 123) (*Sigma-Aldrich*) se realizó para analizar el potencial de membrana mitocondrial de las levaduras. Para ello, se incubó 1 mL de cultivo celular con 5 µg/mL de Rh 123 a 30 °C durante 30 min en oscuridad. Esta

incubación se realizó en el interior de un tubo de microcentrífuga cuya tapa se había agujereado con el objetivo de permitir la entrada de oxígeno.

6.3. Tinción con dihidroetidio

La tinción con dihidroetidio (DHE) permitió determinar la proporción de especies reactivas de oxígeno (ROS) en el interior celular. Para realizar esta tinción, se incubó 1 mL de cultivo celular con 2,5 µg/mL de DHE a 30 °C durante 5 min en oscuridad.

6.4. Tinción con DAPI

La tinción con 4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato (DAPI) (*Thermo Fisher Scientific*) se realizó para visualizar los núcleos de la levadura. Para realizar esta tinción, el sedimento correspondiente a 1 mL de cultivo se resuspendió en 1 mL de PBS, sobre el que se añadió DAPI para alcanzar una concentración final de 1 µg/mL y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min en oscuridad.

6.5. Tinción con MitoTracker® Red CMXRos

El MitoTracker® Red CMXRos (*Cell signaling*) se empleó para visualizar las mitocondrias activas de *S. cerevisiae*. Para realizar esta tinción, se incubó 1 mL de cultivo con 100 nM de MitoTracker® Red CMXRos a 37 °C durante 15 min en oscuridad.

6.6. Tinción con Sytox® Green

El Sytox® Green se empleó para teñir los núcleos y analizar mediante citometría de flujo el ciclo celular de las levaduras (Haase, 2004). Dado que el Sytox® Green es impermeable a las células vivas, antes de proceder con la tinción, se realizó una fijación de las levaduras con el objetivo de permeabilizar su membrana plasmática. Para fijar las células de levadura, a partir del cultivo celular se recogieron por centrifugación $1,5 \times 10^7$ células. El sedimento resultante se lavó con agua y se resuspendió en 4 mL de 70 % etanol frío (-20 °C). La fijación se llevó a cabo durante toda la noche a 4 °C. Las células fijadas se recogieron por centrifugación, se lavaron con 1 mL de agua desionizada y se incubaron con 0,5 mL de una solución de RNasa (2 mg/mL RNasa [*Roche*] en 50 mM Tris pH 8; 15 mM NaCl) durante 2 h a 37 °C. A continuación, las células se recogieron por centrifugación y se incubaron con 0,2 mL de solución de proteasa (5 mg/mL pepsina; 4,5 µg/mL HCl concentrado, en agua) durante 15 min a 37 °C. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 0,5 mL de 50 mM Tris pH 7,5. Finalmente, se tomaron 100 µL de la suspensión celular, sobre los que se añadió 1 mL de la solución de Sytox® Green (1 µM Sytox® Green en 50 mM Tris pH 7,5).

7. Técnicas de microscopía

7.1. Microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) y de fluorescencia

La microscopía DIC se empleó para visualizar la morfología de las células de *S. cerevisiae*.

La microscopía de fluorescencia se utilizó con dos aproximaciones fundamentales. En primer lugar, para visualizar proteínas de la levadura que habían sido marcadas con las proteínas fluorescentes *Green Fluorescent Protein* (GFP), *mNeonGreen* (mNG) y *mCherry* (mCh). En segundo lugar, la microscopía de fluorescencia permitió la observación de las tinciones celulares que se hicieron empleando los colorantes fluorescentes IP, Rh 123, DAPI y *MitoTracker® Red CMXRos* (apartado 6). Para el examen mediante microscopía de fluorescencia, se realizó un lavado con PBS previo al montaje de las células. A continuación, las células se resuspendieron en PBS y la suspensión celular se empleó para realizar una preparación microscópica en montaje húmedo.

Las células se visualizaron en el microscopio *Eclipse TE2000U* (Nikon), equipado con una lámpara de mercurio como fuente de luz. Las imágenes digitales se captaron con la cámara *Orca C4742-95-12ER* (Hamamatsu) acoplada al microscopio, y se procesaron con el software *HCIImage* (Hamamatsu) en todos los experimentos salvo en el mostrado en la Figura 29, en el que las células se observaron con el microscopio de fluorescencia BH-2 (Olympus), equipado con una fuente de luz SOLA (Lumencore). Las imágenes, en este caso, se capturaron usando la cámara acoplada *CoolSNAP MYO* (Photometrics) y el software *Micro-Manager* (Edelstein et al., 2014).

7.2. Microscopía de láser confocal

Para visualizar las células mediante microscopía de láser confocal, se realizó un protocolo que incluía los pasos de fijación celular, adhesión de las células al cubreobjetos y montaje de la preparación microscópica. Estos pasos se desarrollan brevemente a continuación. Para la fijación de las células, el sedimento correspondiente a 1,5 mL de cultivo se resuspendió en 200 μ L de solución de paraformaldehído (4 % paraformaldehído; 3,4 % sacarosa) y se incubó a temperatura ambiente y en oscuridad durante 15 min. A continuación, las células se lavaron con PBS y se resuspendieron con 200 μ L de este mismo tampón. Esta suspensión celular se mantuvo durante la noche a 4 °C. Para adherir las células al cubreobjetos, se extendieron 5 μ L de 1 mg/mL concanavalina A (*Sigma-Aldrich*) sobre este último y se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seca la concanavalina A, se extendieron sobre el cubreobjetos 7 μ L de la suspensión de células fijadas y se dejó secar a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, se añadieron 10 μ L de medio de montaje antidecoloración de fijación dura

ProLong™ Glass (invitrogen) y 10 µL de glicerol. El cubreobjetos se colocó sobre un portaobjetos, de manera que la preparación celular quedase protegida entre ambos, y se dejó secar durante la noche a temperatura ambiente en oscuridad. Finalmente, las preparaciones se sellaron con esmalte de uñas y las células se visualizaron en el equipo LSM Leica SP8 (*Leica*). Las imágenes se procesaron y se deconvolucionaron con el *software* LASX Leica (*Leica*).

8. Citometría de flujo

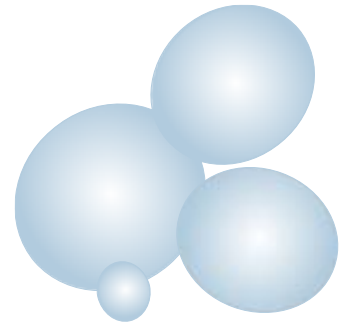
El análisis mediante citometría de flujo se realizó sobre poblaciones celulares que habían sido teñidas con colorantes fluorescentes tal y como se indica en el apartado 6. Las tinciones con IP, Rh 123 y DHE, se diluyeron 1:10 en PBS antes de ser analizadas. Las células se analizaron en el citómetro de flujo *FACScalibur* (*Becton Dickinson*), empleando, un láser de excitación de 488 nm en todos los casos y un filtro de emisión de 670 nm (FL3) para el IP, de 530/30 nm (FL1) para la Rh 123 y el *Sytox® Green*; y de 585/42 (FL2) para el DHE. Los datos se procesaron empleando el *software* *FlowJo* (*FlowJo LLC*).

9. Soporte informático

A continuación, se indican los programas informáticos, *softwares* y bases de datos empleados en este trabajo, así como una breve descripción de la utilidad de éstos a lo largo del mismo:

- *Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)* (*NCBI*): comparación mediante alineamiento entre diferentes de secuencias de ADN y de proteínas.
- *Endnote®X9* (*Clarivate*): gestión bibliográfica de referencias y citas.
- *Excel* (*Microsoft*): análisis estadístico y elaboración de gráficas.
- *FlowJo VX.0.7* (*BD Life Sciences*): procesamiento de las imágenes obtenidas con el citómetro de flujo.
- *GeneRunner*: análisis de secuencias de ADN. Análisis de oligonucleótidos.
- *HCIImage* (*Hamamatsu*): procesamiento de las imágenes obtenidas con el microscopio *Eclipse TE2000U* (*Nikon*).
- *IBS (Illustrator for Biological Sequences)*: ilustrador de secuencias biológicas (Liu *et al.*, 2015).
- *Illustrator CS6 ImageJ* (*Adobe*): procesamiento de las imágenes de microscopía. Medida de la intensidad de fluorescencia (en unidades arbitrarias) emitida por las proteínas fluorescentes en la levadura.

- *Image Studio Lite V5.2* (LI-COR Biosciences): procesamiento de las imágenes de *Western Blots* obtenidas con el *Odyssey*.
- *LASX Leica* (Leica): procesamiento de las imágenes obtenidas con el microscopio de láser confocal.
- *Micro-Manager* (Edelstein *et al.*, 2014): procesamiento de las imágenes obtenidas con el microscopio de fluorescencia BH-2 (*Olympus*).
- *Nucleic Acid Sequence "Massager"*: procesamiento de secuencias de ácidos nucleicos.
- *Photoshop CS6* (Adobe): procesamiento de imágenes de los *Western Blots* y de las placas en las que se realizaron los ensayos de crecimiento.
- *Pubmed* (NCBI): búsqueda y acceso a referencias bibliográficas.
- *Saccharomyces Genome Database (SGD)* (Universidad de Stanford): búsqueda de información sobre genes y proteínas de *S. cerevisiae*.
- *Word* (Microsoft): procesamiento del texto.
- *YeastGFP* (Universidad de California): análisis de la localización de las proteínas de *S. cerevisiae*.



RESULTADOS

1. CAPÍTULO I. Caracterización de las formas monofosforiladas en T190 y en Y192 del motivo de activación TEY de Slt2: jerarquía de activación e implicaciones en su actividad

1.1. Detección diferencial de las formas monofosforiladas en T190 y en Y192 de Slt2 mediante el empleo de anticuerpos comerciales

Para determinar el estado de activación de Slt2, se emplean anticuerpos comerciales que detectan las formas doblemente fosforiladas de las MAPKs de mamíferos p44/42 (Erk1/Erk2) debido a que estas últimas comparten con la MAPK de la ruta de integridad celular de *S. cerevisiae* el mismo motivo de activación TEY (Martín *et al.*, 2000). Sin embargo, resulta muy importante resaltar que, atendiendo a sus especificaciones, algunos de estos anticuerpos también reconocen formas monofosforiladas de estas MAPKs. Por ejemplo, el anticuerpo anti-*phospho*-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) #4370 (*Cell Signaling*) además de detectar la forma doblemente fosforilada de Erk1 y de Erk2, también reconoce la forma monofosforilada en la treonina, mientras que el anti-*phospho*-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) #4377 (*Cell Signaling*) detecta a Erk1 y a Erk2 cuando están doblemente fosforiladas o monofosforiladas en la tirosina. Sin embargo, el anticuerpo anti-MAPK *activated* (*Diphosphorylated ERK-1&2*) #M8159 (*Sigma-Aldrich*) no reconoce ninguna de las especies monofosforiladas de estas MAPKs, de manera que sólo detecta la forma doblemente fosforilada. El hecho de que algunos de estos anticuerpos reconozcan las formas monofosforiladas de las MAPKs cobra especial importancia si se tiene en cuenta que en numerosos estudios se ha descrito que actividad de determinadas MAPKs es muy dispar en función del estado de fosforilación en el que se encuentren. Así, poder establecer con exactitud cuáles son los residuos que se encuentran fosforilados en una MAPK resulta fundamental a la hora de entender la función que tiene cada uno de ellos.

Con el objetivo de determinar la especificidad real frente a las formas fosforiladas de Slt2 de los anticuerpos anti-*phospho* p44/42 MAPK 4370, anti-*phospho* p44/42 MAPK 4377 y anti-MAPK *activated* M8159, en este trabajo dichos anticuerpos se emplearon para analizar mediante *Western blotting* extractos proteicos de cultivos celulares a los que se les había añadido rojo Congo (RC) para activar la ruta CWI, en los que las células portaban la versión silvestre de Slt2, las formas monofosforilables con mutaciones a alanina en la treonina o a fenilalanina en la tirosina del motivo TEY, Slt2^{T190A} o Slt2^{Y192F}, o la no fosforilable en la que ambos residuos estaban mutados a alanina, Slt2^{T190A Y192A} (de Nobel *et al.*, 2000). Aunque los anticuerpos empleados mostraron una notable diferencia en cuanto a su sensibilidad, todos ellos reconocieron la versión silvestre de Slt2 en condiciones de activación de la ruta CWI y no detectaron la forma no fosforilable

Slt2^{T190A Y192A} (Figura 12, carriles 3 y 6). El anticuerpo M8159 no detectó ninguna de las formas monofosforilables de Slt2, el 4370 no reconoció a Slt2^{T190A} y el 4377 no generó señal sobre Slt2^{Y192F}, indicando que estos anticuerpos son capaces de reconocer exclusivamente la doble fosforilación, la doble fosforilación y la monofosforilación en la T190 y la doble fosforilación junto con la monofosforilación en la Y192, respectivamente (Figura 12). Por este motivo, de aquí en adelante los anticuerpos M8159, 4370 y 4377 se nombrarán como anti-Slt2-pTpY, anti-Slt2-pT/pTpY y anti-Slt2-pY/pTpY, respectivamente. Al comparar la intensidad de la señal emitida por un mismo anticuerpo sobre la versión silvestre en presencia de estímulo (WT+) frente a la monofosforilable, se observó que, mientras que en el mutante Slt2^{Y192F} la señal emitida por la treonina monofosforilada era inferior a la que se observaba en el WT (Figura 12, panel 2, carriles 5 y 3, respectivamente), en el mutante Slt2^{T190A} los niveles de monofosforilación en la tirosina fueron superiores a los detectados en el WT (Figura 12, panel 3, carriles 4 y 3, respectivamente). Estos resultados ponen de manifiesto la utilidad que tiene el empleo de anticuerpos complementarios que presentan especificidades diferentes para cada uno de los sitios de fosforilación en el estudio de la dinámica de fosforilación de Slt2.

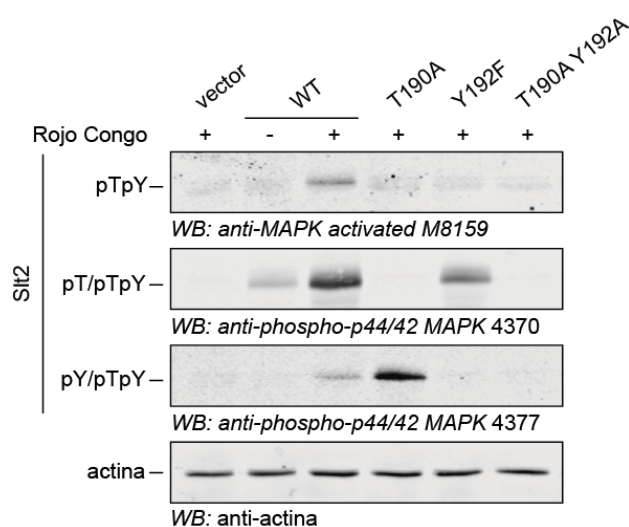


Figura 12. Detección de las formas mono- y doblemente fosforiladas de Slt2 con anticuerpos comerciales. La cepa *slt2Δ* (Y00993) transformada con el plásmido pRS316 vacío (vector) o expresando Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, Slt2^{Y192F} o Slt2^{T190A Y192A} creciendo en YPD hasta la fase exponencial se cultivó durante 2 horas adicionales en ausencia (-) o en presencia (+) de 30 µg/mL de rojo Congo. Los extractos proteicos se analizaron mediante *Western blotting* con el anticuerpo M8159 (panel 1), que detecta la forma doblemente fosforilada de la MAPK (pTpY); el anticuerpo 4370 (panel 2), que detecta la monofosforilación en la T190 y la doble fosforilación de la MAPK (pT/pTpY) y el anticuerpo 4377 (panel 3), que detecta la monofosforilación en la Y192 y la doble fosforilación de la MAPK (pY/pTpY). Como control de carga se empleó el anticuerpo anti-actina. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos que se realizaron con transformantes distintos.

1.2. La imposibilidad de fosforilación de la T190 provoca un incremento en los niveles de fosforilación de la Y192

Para profundizar en la caracterización de la dinámica de fosforilación en el dominio TEY de Slt2, se indujo la activación de la ruta CWI y se monitorizó la fosforilación de los residuos T190 y Y192 a lo largo del tiempo. Tal y como se puede observar en la **Figura 13**, en la versión silvestre de Slt2, con los tres anticuerpos empleados se observó un incremento paulatino en la señal, que alcanzó su nivel máximo entre los 60 y los 120 min, manteniéndose constante hasta los 240 min, momento en el cual disminuyó para alcanzar el nivel basal a los 480 min.

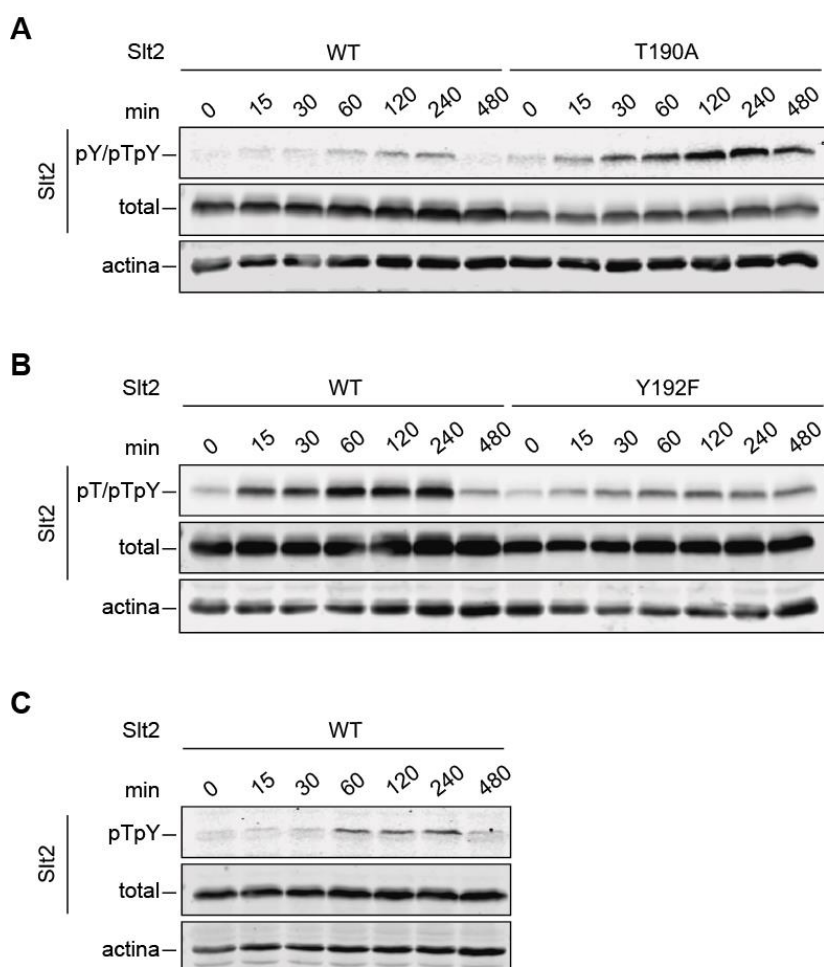


Figura 13. Análisis de la dinámica de fosforilación de Slt2. La cepa BY4741 *slt2Δ*-RLM1Myc transformada con el plásmido pRS316 expresando Slt2 (WT), Slt2^{T190A} o Slt2^{Y192F} se cultivó en YPD hasta la fase exponencial y se trató con 30 µg/mL de RC durante 8 horas. Se analizaron mediante *Western blotting* extractos celulares de cultivos estimulados durante los tiempos indicados (min). Para ello se emplearon los anticuerpos anti-Slt2-pY/pTpY (**A**), anti-Slt2-pT/pTpY (**B**) y anti-Slt2-pTpY (**C**), anti-Mpk1, que detecta la cantidad total de Slt2 (total) y anti-actina como control de carga (**A-C**). Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos que se realizaron con transformantes distintos.

Los mutantes monofosforilables en el motivo de activación TEY de Slt2 mostraron, en líneas generales, una dinámica de fosforilación similar a la observada en la versión silvestre. No obstante, se detectaron ciertas diferencias que se mencionan a continuación. En primer lugar, el mutante Slt2^{T190A} mostró unos niveles de fosforilación en la Y192 superiores a los que se observaron en la versión no mutada (Figura 13A), mientras que en el mutante Slt2^{Y192F} los niveles de fosforilación de la T190 fueron inferiores a los de la versión silvestre (Figura 13B). En segundo lugar, ambas versiones mutadas de Slt2 mostraron un descenso menos acusado de la fosforilación una vez alcanzado el pico máximo, de tal manera que, a los 480 min no se alcanzaron los niveles basales de fosforilación en ninguno de los dos mutantes. Estos resultados sugieren que los residuos T190 y Y192 tienen un papel fundamental, y posiblemente opuesto, en el mantenimiento del estado de fosforilación de Slt2 ya que, mientras que la tirosina es necesaria para que Slt2 alcance los niveles de fosforilación dual mostrados por la versión silvestre, la treonina parece estar de alguna manera implicada en la regulación negativa de la fosforilación de la Y192.

1.3. *La fosforilación de la Y192 por Mkk1 y Mkk2 es el primer paso necesario para que Slt2 alcance su estado de doble fosforilación*

El incremento en la fosforilación de la Y192 que se observa en ausencia de la T190 podría deberse a que el mutante Slt2^{T190A} presenta más afinidad para interactuar con las MAPKKs activadoras Mkk1 y Mkk2. Del mismo modo, la reducción de la fosforilación en la T190 de la versión Slt2^{Y192F} podría explicarse por una disminución en la interacción de este mutante con las quinasas activadoras. Con el fin de determinar si los mutantes monofosforilables y la versión silvestre de Slt2 interactuaban en diferente medida con Mkk1 y/o Mkk2, se realizaron experimentos de co-purificación de Slt2, Slt2^{T190A} o Slt2^{Y192F} con Mkk1-Myc y con Mkk2-Myc. Tal y como se puede observar en la Figura 14A, B, ni Mkk1 ni Mkk2 retuvieron en mayor medida a Slt2^{T190A} que a la versión WT, lo que indica que el incremento en la fosforilación en la Y192 que muestra este mutante no se debe a un efecto de captura (en inglés, *trapping effect*) por parte de las Mkks. De la misma manera, Slt2^{Y192F} se unió en una proporción similar a Mkk1 y a Mkk2 que la versión silvestre de Slt2. Estos resultados indican que los mutantes Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F} no muestran alterada su capacidad para unirse con sus MAPKKs activadoras.

Nuestro grupo de investigación ya había demostrado que la actividad de Mkk1 predomina sobre la de Mkk2 en la transmisión de la señal a través de la ruta CWI (Tatjer *et al.*, 2016b). Para averiguar si las Mkks actúan de manera diferencial sobre los residuos T190 y Y192 de Slt2, se analizó el efecto que tiene la eliminación individual de cada una de estas dos MAPKKs sobre la fosforilación de las versiones monofosforilables de Slt2.

En condiciones de estimulación con RC, la delección de *MKK1* redujo de manera drástica la fosforilación de la Y192 de Slt2, tanto en la versión silvestre como en el mutante Slt2^{T190A}. La ausencia de Mkk2 también condujo a una disminución, aunque menos acusada, de esta fosforilación (Figura 14C). En lo que respecta a la fosforilación de la T190, la eliminación de cualquiera de las dos MAPKKs provocó una reducción en la fosforilación de la versión silvestre de Slt2, pero la ausencia de ninguna ellas afectó a los niveles de fosforilación de la T190 en el mutante Slt2^{Y192} (Figura 14D, carriles 10-12). Estos resultados sugieren que la fosforilación de la Y192, llevada a cabo principalmente por Mkk1, es necesaria para que produzca la consiguiente fosforilación de la T190.

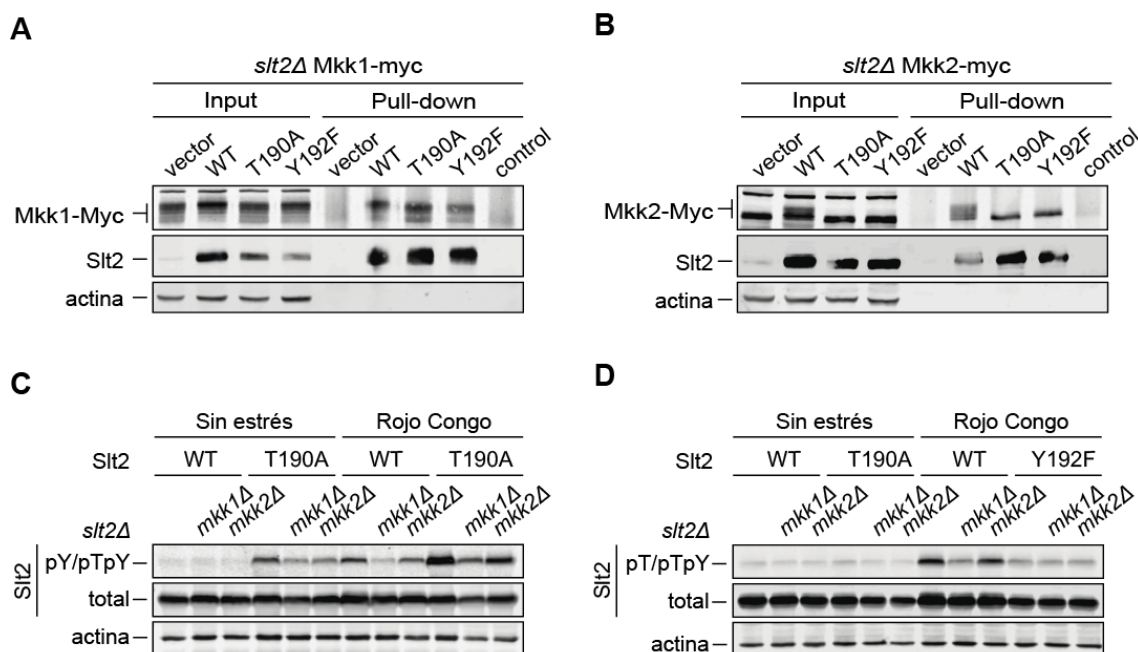


Figura 14. Análisis de la unión de Mkk1 y de Mkk2 a diferentes formas fosforilables de Slt2 y de su efecto sobre la fosforilación de esta MAPK. Las cepas *slt2Δ* *MKK1-MYC* (YMJ30) (A) y *slt2Δ* *MKK2-MYC* (YMJ31) (B) transformadas con el plásmido pRS316 vacío (vector) o expresando, tal y como se indica, Slt2 (WT), Slt2^{T190A} o Slt2^{Y192F} se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se estimularon con 30 µg/mL de RC durante 2h. Los extractos celulares (*input*) se incubaron con las microesferas magnéticas acopladas a la proteína G *Dynabeads*[™] unidas al anticuerpo anti-Mpk1 para purificar los complejos con Slt2 (*pull down*). Las muestras se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-c-Myc, anti-Mpk1 (Slt2) y anti-actina. Se incluyó como control una muestra de *Dynabeads*[™] unida al anticuerpo anti-Mpk1 sin incubar con extracto celular. (C, D) Las cepas *slt2Δ* (Y00993), *mkk1Δ* *slt2Δ* (YGGR32) y *mkk2Δ* *slt2Δ* (YGGR33) transformadas con los mismos plásmidos que en (A, B) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se estimularon con 30 µg/mL de RC durante 2h. Los extractos celulares se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-Slt2-pY/pTpY (C), anti-Slt2-pT/pTpY (D), anti-Mpk1 (total) y anti-actina como control de carga (C, D). Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos que se realizaron con transformantes distintos.

1.4. La desfosforilación de la T190 de Slt2 por Msg5 depende de la desfosforilación previa de la Y192

La desfosforilación de Slt2 está regulada por diferentes fosfatasa, dentro de las que se encuentra la fosfatasa de especificidad dual (DSP) Msg5 (González-Rubio *et al.*, 2019; Martín *et al.*, 2005). Dado que las DSPs desfosforilan tanto el residuo de treonina como el de tirosina localizados en el motivo de activación TEY de la MAPK, el incremento en la fosforilación de la Y192 observado en el mutante Slt2^{T190A} podría deberse a que la actividad de Msg5 sobre la tirosina disminuye cuando la treonina está ausente. Con el fin de comprobar esta dependencia, se analizó el efecto que tenía la eliminación de MSG5 sobre el estado de fosforilación de Slt2, Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F} en células sometidas a estrés de pared celular. En contra de lo hipotetizado, la ausencia de Msg5 en cultivos celulares estimulados con RC provocó un incremento en la fosforilación de la Y192, tanto en Slt2 WT como en Slt2^{T190A} (Figura 15A, carriles 6 y 8). Sin embargo, la falta de Msg5 no condujo a ningún cambio en el estado de fosforilación de la T190 en el mutante Slt2^{Y192F} (Figura 15B, carril 8). Estos resultados indican que Msg5 puede desfosforilar a la Y192 cuando la T190 está ausente, pero no puede actuar sobre la treonina en ausencia de la tirosina.

Nuestro grupo de investigación había demostrado previamente que la sobreexpresión de Msg5 provoca una disminución en los niveles de fosforilación de Slt2 con respecto a los que muestran las células que portan una versión silvestre de esta DSP, mientras que la sobreexpresión de un mutante catalíticamente inactivo de Msg5, Msg5^{C319A}, conduce a un incremento en los niveles de Slt2 fosforilado, debido a un efecto de captura (*trapping*) (Sacristán-Reviriego *et al.*, 2014). Con el objetivo de determinar si las mutaciones T190A y Y192F alteran el efecto que tiene la sobreexpresión de Msg5 y de Msg5^{C319A} sobre el estado de fosforilación de la versión silvestre de Slt2, se compararon los niveles de fosforilación de Slt2 en la versión WT y en los mutantes Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F}, en condiciones de expresión basal de Msg5 o de sobreexpresión de la versión silvestre o del mutante catalíticamente inactivo Msg5^{C319A}, tanto en ausencia como en presencia de estímulo. La sobreexpresión de Msg5 redujo la fosforilación en la Y192 tanto en Slt2 como en Slt2^{T190A}. Asimismo, la sobreexpresión de Msg5^{C319A} supuso un incremento en los niveles de fosforilación de Y192 en ambas versiones de la MAPK (Figura 15C). Estos resultados ponen de manifiesto la capacidad que tienen Msg5 y Msg5^{C319A} para desfosforilar y capturar, respectivamente a Slt2 cuando esta MAPK presenta la Y192 fosforilada, independientemente de la presencia o no de la T190. Por el contrario, no se observaron cambios en los niveles de fosforilación de la T190 en el mutante Slt2^{Y192F} ni en condiciones de sobreexpresión de Msg5 ni de Msg5^{C319A} (Figura 15D). Así pues, en ausencia de la Y192, Msg5 no es capaz de desfosforilar a la

T190, ni Msg5^{C319A} puede ejercer su efecto de captura sobre Slt2^{Y192F}. Esto indica que la desfosforilación de la Y192 es un requisito indispensable para que se produzca la desfosforilación de la treonina en el bucle de activación y apoya la idea de que el residuo de Slt2 monofosforilado en treonina es un sustrato pobre para esta DSP. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que, a pesar de que, por definición, la DSP Msg5 es capaz de desfosforilar tanto el residuo de treonina como el de tirosina dentro del motivo de activación TEY, esta desfosforilación es un proceso ordenado que se inicia en la Y192.

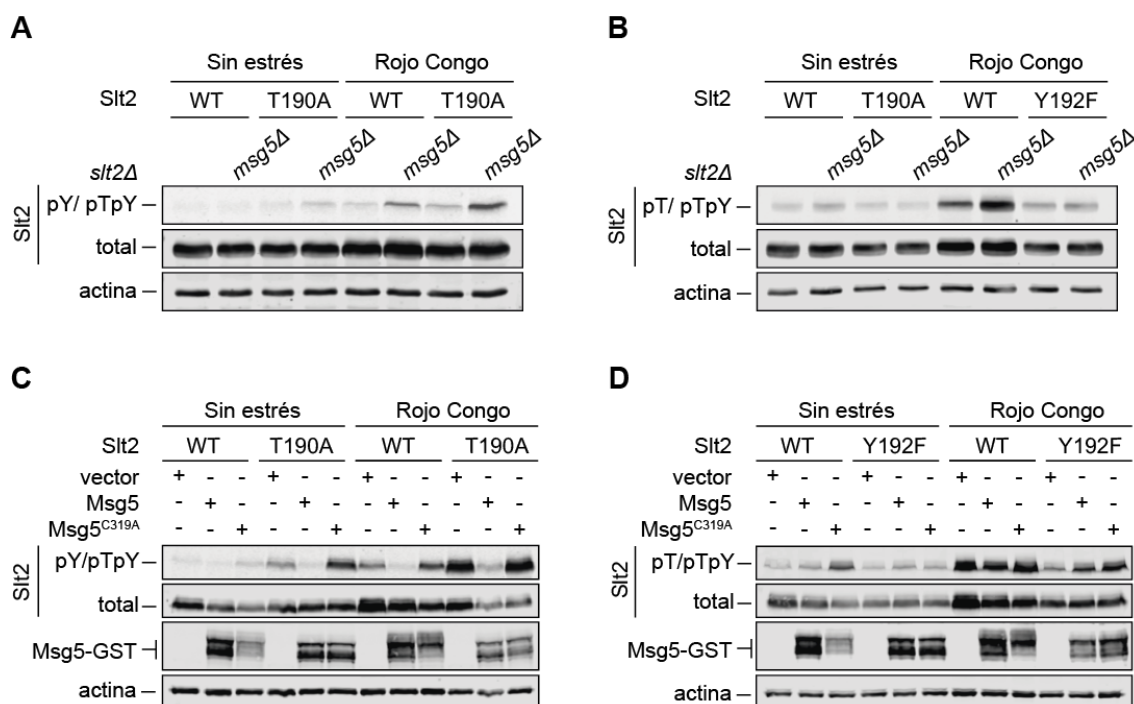


Figura 15. Análisis de la desfosforilación y de la captura (*trapping*) que ejerce Msg5 sobre diferentes versiones fosforilables de Slt2. (A, B) La cepa *msg5Δ slt2Δ* (YGGR34) transformada con el plásmido pRS316 expresando, según se indica, Slt2 (WT), Slt2^{T190A} o Slt2^{Y192F} se cultivó en YPD hasta la fase exponencial y se estimuló con 30 μ g/mL de RC durante 2h. Los extractos celulares se analizaron mediante *Western Blotting* con los anticuerpos anti- anti-Slt2-pY/pTpY (A), anti-Slt2-pT/pTpY (B), anti-Mpk1 (total) y anti-actina como control de carga (A, B). (C, D) La cepa *slt2Δ* (Y00993) co-transformada con el plásmido pRS315 portando las mismas versiones de Slt2 que en (A, B) y con YE352 expresando Msg5 o Msg5^{C319A} fusionadas a GST, se cultivó en las mismas condiciones que en (A, B). Los extractos celulares se analizaron mediante *Western blotting* con los mismos anticuerpos que en (A, B), así como con el anticuerpo anti-GST. En todos los casos se muestra un ensayo representativo de tres experimentos que se realizaron con transformantes distintos.

1.5. La T190 es esencial para la actividad catalítica y biológica de Slt2

Un primer estudio realizado por Lee y colaboradores (Lee *et al.*, 1993) demostró que la mutación de la treonina 190 a alanina (T190A) da lugar a un alelo de *SLT2* que es incapaz de complementar la sensibilidad a altas temperaturas mostrada por una cepa *slt2Δ*. Sin embargo, la mutación de la tirosina 192 a fenilalanina (Y192F) genera un alelo

parcialmente funcional que complementa, aunque de forma limitada, este fenotipo de sensibilidad. Para profundizar en la relevancia que tienen los residuos T190 y Y192 sobre la actividad de Slt2, se analizó cómo afectan las mutaciones en estos sitios de fosforilación a su actividad biológica y catalítica. Para ello, en primer lugar, se realizaron ensayos de crecimiento con el fin de determinar la capacidad que tienen los mutantes Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F} para complementar la sensibilidad mostrada por la cepa *slt2Δ* frente a diferentes tipos de estreses que conducen a la activación de la ruta CWI (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020). El mutante *slt2* Y192F complementó parcialmente la sensibilidad mostrada por *slt2Δ*, no sólo a 38 °C, sino también frente a cafeína, zimoliasa, SDS, tunicamicina y en presencia de bajas concentraciones de CFW y de RC (Figura 16A). Esto indica que la forma monofosforilada en la T190 de Slt2 conserva cierta actividad biológica. Sin embargo, tanto *slt2* T190A como el mutante no fosforilable *slt2* T190A Y192A, se comportaron igual que el alelo *slt2* KD que codifica la versión catalíticamente inactiva Slt2-KD (del inglés, *Kinase-Dead*) (Martín *et al.*, 1993), no siendo capaces de crecer en la mayoría de las condiciones ensayadas. No obstante, las células que portaban cualquiera de estos tres alelos inactivos crecieron ligeramente mejor que las células *slt2Δ* transformadas con el vector vacío en presencia de SDS, tunicamicina, cafeína y bajas concentraciones de CFW. Estos resultados sugieren que, aún inactiva o con una mínima actividad residual, la MAPK Slt2 podría tener un papel biológico mediando una respuesta suficiente para paliar estos estreses a través de mecanismos independientes de la fosforilación de su motivo de activación TEY y de su función catalítica.

En segundo lugar, se analizó la capacidad que tenían las versiones mutantes Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F} para (i) fosforilar y, por ende, promover un cambio de movilidad electroforética en el factor de transcripción Rlm1 (Marín *et al.*, 2009) (Figura 16B) y en las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007) (Figura 16C), (ii) promover un incremento en la cantidad de la propia MAPK (García *et al.*, 2016) (Figura 16B) e (iii) inducir la expresión del gen reportero *lacZ*, situado bajo el control del promotor de *MLP1*, dependiente de Rlm1 (García *et al.*, 2009) (Figura 16D). De todos los parámetros moleculares analizados, solamente se observó cierta actividad de Slt2^{Y192F} para fosforilar *in vivo* a Mkk1-Myc, reduciendo parcialmente su movilidad en SDS-PAGE (Figura 16C).

En tercer lugar, se analizó la actividad de dos versiones de Slt2 que presentan mutaciones en dominios relevantes que podrían afectar a su estado de fosforilación. La primera de las versiones analizadas mostraba mutado su dominio de interacción CD (del inglés, *Common Docking*), el cual les sirve a las MAPKs para unirse a sus quinasas activadoras y a otras proteínas como las fosfatasas o los factores de transcripción.

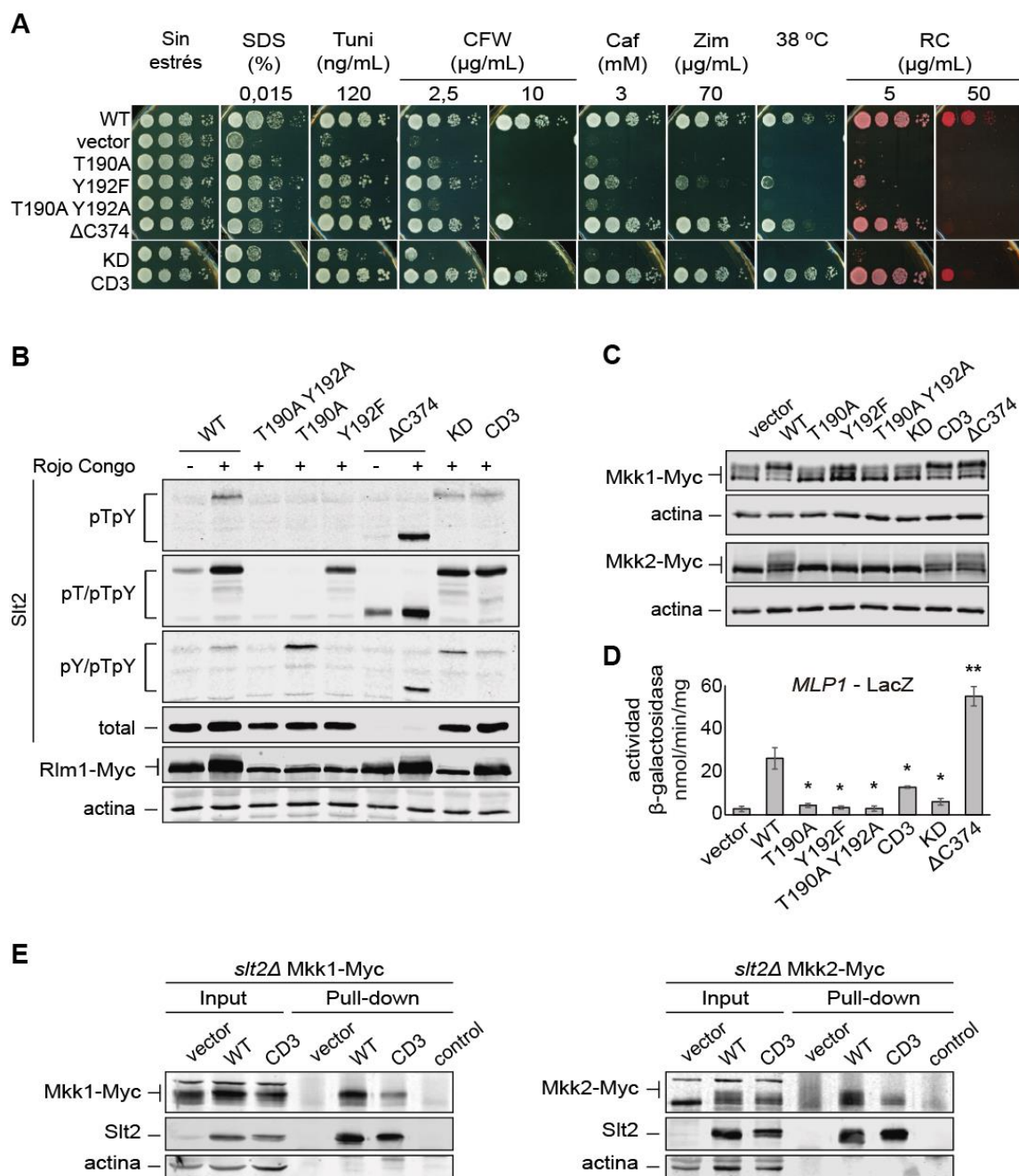


Figura 16. Análisis de la actividad de diferentes versiones mutantes de Slt2. (A) Ensayo de sensibilidad en placa a distintos estímulos de la ruta CWI de la cepa BY4741 *slt2Δ*-RLM1Myc transformada con el plásmido pRS316 vacío (vector) o expresando Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, Slt2^{T190A Y192F}, Slt2^{T190A Y192A}, Slt2-ΔC374, Slt2-KD o Slt2-CD3. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de medio YPD en ausencia de estrés o en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS), tunicamicina (Tuni), blanco de calcoflúor (CFW), cafeína (Caf), zimoliasa (Zim) o RC a las concentraciones indicadas. Las placas se incubaron a 30 °C o, cuando se indica, a 38 °C durante 72 h. (B) Los mismos transformantes que en (A) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se estimularon con 30 μg/mL de RC durante 2h. Los extractos celulares se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-Slt2-pTpY, anti-Slt2-pT/pTpY, anti-Slt2-pY/pTpY, anti-Mpk1 (total), anti-Myc 4A6 y anti-actina como control de carga. (C) Extractos celulares de las cepas *slt2Δ* *MKK1-MYC* (YMJ30) y *slt2Δ* *MKK2-MYC* (YMJ31) transformadas con los mismos plásmidos que en (A) se obtuvieron en las mismas condiciones que en (B) y se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos

anti-Myc 4A6 y anti-actina como control de carga. (D) Determinación de la actividad transcripcional de la ruta CWI mediante la medida de la actividad β -galactosidasa de los extractos celulares de la cepa *slt2 Δ* (Y00993) co-transformada con *pMLP1-lacZ* y con los mismos plásmidos que en (A). Las células se sometieron a un tratamiento con 30 μ g/mL de RC durante 2h. Los datos representan la actividad β -galactosidasa media de tres transformantes independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. Los asteriscos (* y **) indican un valor p de <0,05 y <0,01, respectivamente, calculados mediante la prueba t de *Student* y referidos a la actividad β -galactosidasa de la versión silvestre de Slt2 (WT). (E) Las mismas cepas que en (C) transformadas con el plásmido pRS316 vacío (vector) o expresando Slt2 (WT) o Slt2-CD3 se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se estimularon con 30 μ g/mL de RC durante 2h. Los extractos celulares (*input*) se incubaron con las esferas magnéticas acopladas a la proteína G *Dynabeads*[™] unidas al anticuerpo anti-Mpk1 para purificar los complejos con Slt2 (*pull down*). Las muestras se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-c-Myc, anti-Mpk1 (Slt2) y anti-actina como control de carga. Se incluyó como control una muestra de *Dynabeads*[™] unida al anticuerpo anti-Mpk1 sin incubar con extracto celular. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos que se realizaron con transformantes distintos.

Concretamente, en el mutante analizado se habían sustituido los residuos ácidos conservados D323, D326 y E327 por asparagina (Slt2-CD3) (Palacios *et al.*, 2011). Los ensayos de crecimiento revelaron que la versión Slt2-CD3 era capaz de complementar la sensibilidad del mutante *slt2 Δ* de manera similar al WT salvo en presencia de elevadas concentraciones de RC o de CFW (Figura 16B). En los experimentos de co-purificación realizados se vio que, aunque Slt2-CD3 era capaz de unirse a Mkk1 y Mkk2, la capacidad que este mutante tenía para arrastrar consigo a las MAPKKs activadoras era mucho menor que la de la versión silvestre (Figura 16E). Slt2-CD3 también mostró reducida su capacidad para fosforilar a Rlm1 (Figura 16B) y para inducir la transcripción dependiente de Rlm1 de *MLP1-lacZ* (Figura 16D). Todos estos resultados sugieren que, junto con el dominio CD, Slt2 debe de presentar otros sitios de interacción implicados en la unión de esta MAPK a Mkk1, a Mkk2 y, probablemente, a Rlm1.

La segunda de estas dos versiones analizadas consistió en un mutante de Slt2 que carecía de los 111 últimos aminoácidos de su región C-terminal (Slt2- Δ C374). Aunque ya estaba descrito que la eliminación del extremo C-terminal de Slt2 y de Hog1 da lugar a versiones de estas MAPKs que se hiperfosforilan de manera espontánea (Levin-Salomon *et al.*, 2009), en este trabajo se quiso analizar este fenómeno más detalladamente haciendo uso de los anticuerpos anti-p-Slt2 complementarios que presentan especificidades diferentes para cada uno de los sitios de fosforilación de Slt2. En condiciones de activación de la ruta de integridad celular, Slt2- Δ C374 mostró unos niveles de fosforilación superiores a los de la versión silvestre. Sin embargo, en ausencia de estímulo, la versión trunca en C-terminal de Slt2 sólo mostró una mayor fosforilación que el WT en la T190, pero no en la Y192 (Figura 16B). Asimismo, el mutante Slt2- Δ C374 mostró una actividad transcripcional superior a la de la versión silvestre (Figura 16D). La hiperactivación mostrada por Slt2- Δ C374 podría estar

repercutiendo negativamente sobre su funcionalidad *in vivo*, ya que, en los ensayos de crecimiento realizados, esta versión truncada complementó peor que el WT la sensibilidad mostrada por la cepa *slt2Δ* a elevadas concentraciones de RC, CFW o SDS (Figura 16A).

1.6. La T195 juega un papel clave en la actividad de Slt2

Se ha descrito que las fosforilaciones en Erk1 de la T207 y de la Y210, dos residuos que se encuentran muy próximos al motivo de activación T202-E-Y204 de esta MAPK, regulan negativamente su actividad catalítica (Lai y Pelech, 2016). Dado que estos dos residuos están conservados en Slt2, correspondiéndose con la T195 y con la Y198, en este trabajo se evaluó la relevancia funcional de los mismos. Para ello, se construyeron mutantes en estos dos aminoácidos, sustituyendo la T195 por valina y la Y198 por fenilalanina. En los ensayos de crecimiento realizados se observó que, mientras que Slt2^{Y198F} complementaba por completo la sensibilidad a distintos estímulos de la ruta CWI mostrada por el mutante *slt2Δ*, ni Slt2^{T195A}, ni el doble mutante Slt2^{T195A Y198F} recuperaban el crecimiento en presencia de tunicamicina, zimoliasa, RC o CFW. Sin embargo, Slt2^{T195A} sí que confirió cierta resistencia a células *slt2Δ* sometidas a altas temperaturas o tratadas con cafeína, lo que sugiere que este mutante muestra cierta funcionalidad. Curiosamente, en estas condiciones, la sustitución Y198F en el mutante Slt2^{T195V} empeoró notablemente su crecimiento (Figura 17A). Los análisis de los cambios de movilidad de Rlm1-Myc, Mkk1-Myc y Mkk2-Myc volvieron a poner de manifiesto la importancia del residuo T195 para la actividad de Slt2, ya que las versiones de esta MAPK que incluían la mutación T195V, ya fuera individualmente o en combinación con Y198F, no fueron capaces de fosforilar a ninguno de estos sustratos de Slt2. Sin embargo, Slt2^{Y198F} sí que promovió el cambio de movilidad propio de la versión silvestre de Slt2 (Figura 17B, C). De manera similar, ni Slt2^{T195V} ni Slt2^{T195V Y198F} fueron capaces de inducir la transcripción de *MLP1-lacZ* dependiente de Rlm1, mientras que Slt2^{Y198F} sí (Figura 17D). Todos estos resultados apoyan la idea de que la mutación T195V reduce la actividad de Slt2 y que, junto con la mutación Y198F, anula, casi por completo, su función.

Además de afectar a la actividad catalítica, se ha descrito que estos residuos alteran la localización de la MAPK. En concreto, la fosforilación en la T199 de Erk2 (equivalente a la T195 de Slt2) promueve su localización nuclear (Lorenz *et al.*, 2009) y la mutación Y210F (equivalente a Y198F en Slt2) inhibe de manera drástica la translocación de Erk1 al núcleo (Zhang *et al.*, 2019). Con el objetivo de comprobar si los residuos T195 y Y198 de Slt2 afectan a la localización de esta MAPK, se construyeron las versiones Slt2^{T195V} y Slt2^{T195V Y198F} fusionadas en el extremo N-terminal a la proteína verde fluorescente (GFP).

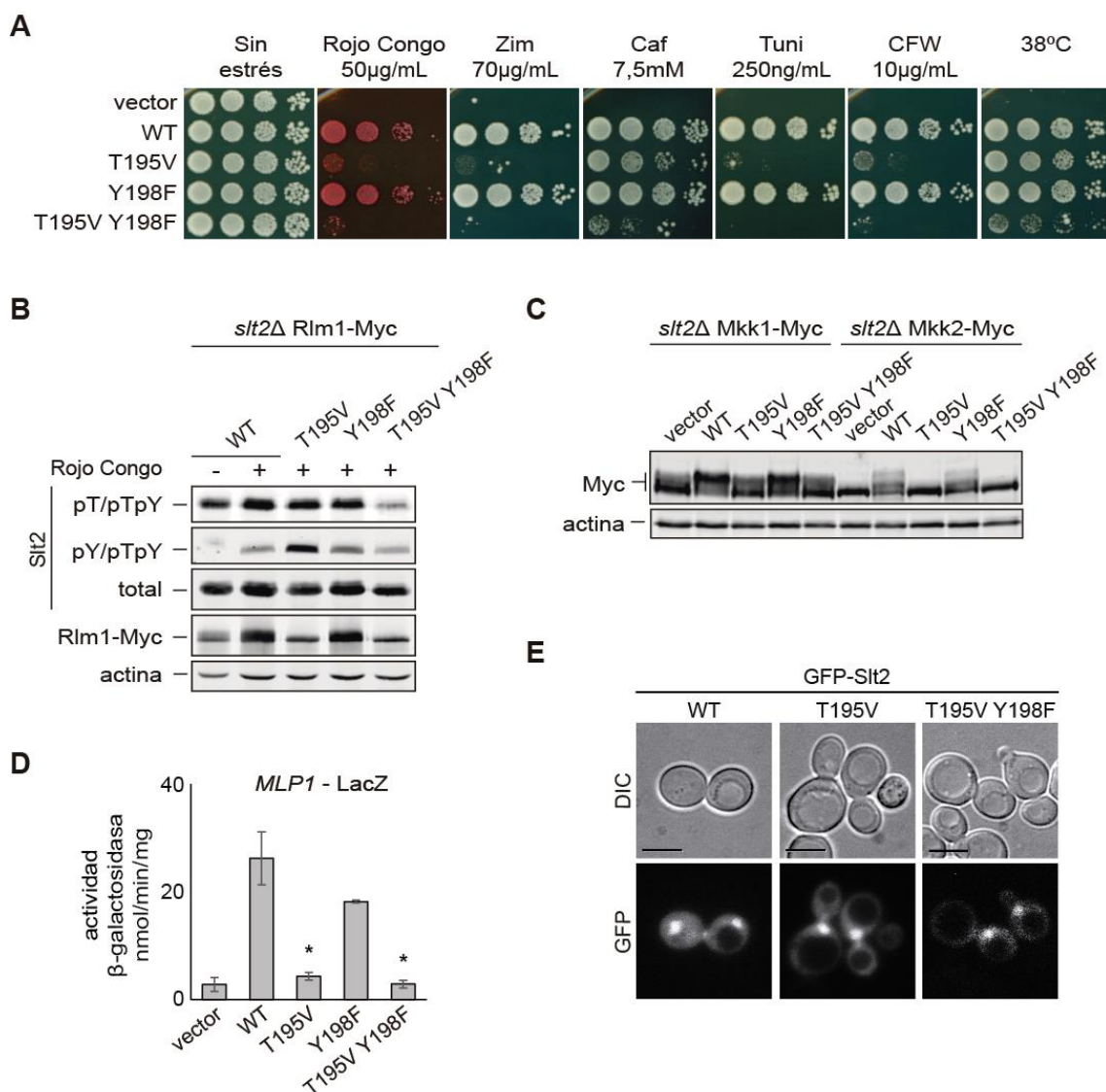


Figura 17. Análisis de la actividad y de la localización celular de los mutantes en los residuos conservados T195 y Y198 de Slt2. (A) Ensayo de sensibilidad en placa a distintos estímulos de la ruta CWI de la cepa BY4741 *slt2Δ*-RLM1Myc transformada con el plásmido pRS316 vacío (vector) o expresando Slt2 (WT), Slt2^{T195V}, Slt2^{Y198F} o Slt2^{T195V Y198F}. Las diluciones decimales seriadas de las suspensiones celulares se sembraron en placas de medio YPD en ausencia de estrés o en presencia de los estímulos indicados. Las placas se incubaron a 30 °C o, cuando se indica, a 38 °C durante 72 h. (B) Las mismas células que en (A) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se estimularon con 30 µg/mL de RC durante 2 h. Los extractos proteicos se resolvieron mediante SDS-PAGE y se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-Slt2-pT/pTpY, anti-Slt2-pY/pTpY, anti-Mpk1 (total), anti-Myc 4A6 y anti-actina como control de carga. (C) Los extractos celulares de las cepas *slt2Δ* MKK1-MYC (YMJ30) y *slt2Δ* MKK2-MYC (YMJ31) transformadas con los mismos plásmidos que en (A) se resolvieron mediante SDS-PAGE como en (B) y se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-Myc 4A6 y anti-actina como control de carga. (D) Determinación de la actividad transcripcional de la ruta CWI mediante la medida de la actividad β-galactosidasa de los extractos celulares de la cepa BY4741 *slt2Δ* (Y00993) co-transformada con *pMLP1-lacZ* y con los mismos plásmidos que en (A) tras una incubación con 30 µg/mL de RC durante 2h. Los datos representan la actividad β-galactosidasa media de tres transformantes independientes. Las barras de error indican la desviación estándar. El asterisco (*) indica valores $p < 0,05$, los cuales fueron calculados mediante la

prueba t de *Student* y referidos a la actividad de la versión silvestre de Slt2 (WT). Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos que se realizaron con transformantes distintos. (E) La cepa BY4741 *slt2Δ* (Y00993) transformada con el plásmido pRS316 expresando Slt2, Slt2^{T195V} o Slt2^{T195V Y198F} fusionadas a GFP, se cultivó en YPD hasta la fase exponencial y se incubó durante 2 horas adicionales a 30 °C. Las células se visualizaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala equivale a 5 μM.

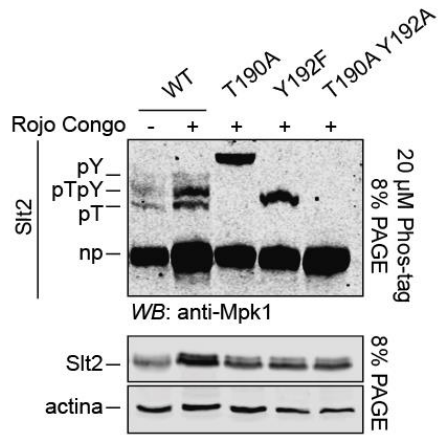
Tal y como se puede observar en la Figura 17E, tanto GFP-Slt2^{T195V} como GFP-Slt2^{T195V Y198F} mostraron la misma localización que GFP-Slt2, siendo ésta preferiblemente nuclear. Estos resultados indican que la reducción en la actividad que se observa en los mutantes Slt2^{T195V} y Slt2^{T195V Y198F} no se debe a un defecto en la entrada al núcleo de estas versiones de la MAPK de la ruta CWI.

1.7. Los residuos T190 y T195 y la actividad quinasa de Slt2 son esenciales para mantener bajos los niveles de fosforilación de Y192

A lo largo de este trabajo se ha puesto de manifiesto la gran utilidad que tiene el uso complementario de anticuerpos con especificidades diferentes para las distintas formas fosforiladas de Slt2. El empleo de estos anticuerpos permite realizar un seguimiento de las fosforilaciones individuales en las diferentes versiones mutadas en sitios de fosforilación, pero también presenta una gran limitación: cada anticuerpo muestra una sensibilidad diferente, por lo que la señal emitida por ellos no es comparable. Con el objetivo de determinar la proporción de cada uno de los estados de fosforilación dentro de una misma versión de Slt2, se realizaron electroforesis de afinidad por fosfato, comúnmente conocidas como *Phos-tag* SDS-PAGE. La herramienta *Phos-tag* se basa en una molécula funcional que, en presencia de los cationes divalentes zinc o manganeso, forma complejos con las proteínas fosforiladas, promoviendo cambios en la movilidad electroforética en las mismas que dependerán de su estado de fosforilación (Kinoshita *et al.*, 2006).

El análisis de Slt2 mediante esta técnica permitió observar tres bandas con una movilidad electroforética ralentizada con respecto a la forma no fosforilada (np), siendo esta última la más abundante. Estos resultados indican que la MAPK de la ruta CWI se puede encontrar en, al menos, tres estados diferentes de fosforilación (Figura 18A). Aunque la estimulación de las células con RC condujo a un incremento en la intensidad de estas tres bandas de menor movilidad electroforética, la proporción de éstas con respecto a la forma no fosforilada siguió siendo minoritaria (Figura 18A). En los mutantes individuales Slt2^{T190A} y Slt2^{Y192F} se observó una única banda fosforilada, con un patrón de movilidad diferente en cada caso, las cuales no se encontraron en el doble mutante Slt2^{T190A Y192F} (Figura 18A).

A



B

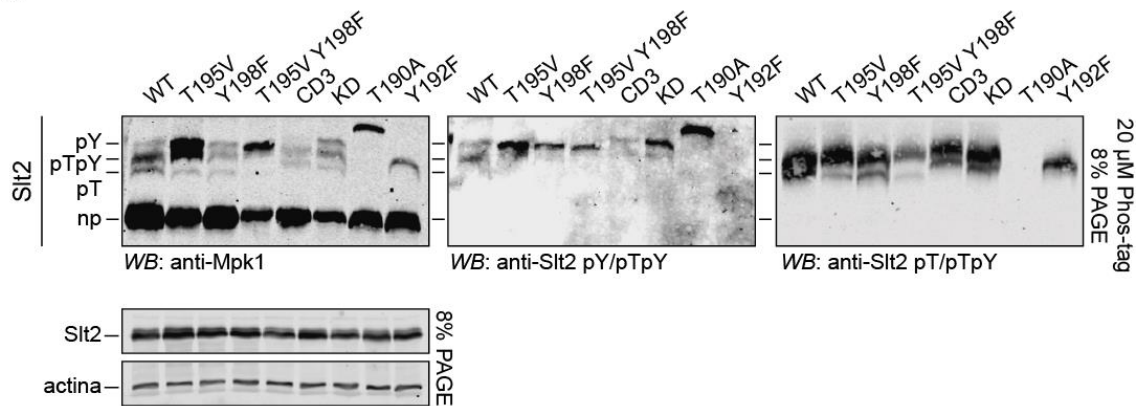


Figura 18. Detección de las diferentes formas fosforiladas de Slt2 mediante *Phos-tag* SDS-PAGE. (A) La cepa BY4741 *slt2* Δ RLM1Myc transformada con el plásmido pRS316 expresando Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, Slt2^{Y192F} o Slt2^{T190A Y192A} creciendo en YPD hasta la fase exponencial, se cultivó durante 2 horas adicionales en ausencia (-) o en presencia (+) de 30 μ g/mL de RC. Los extractos celulares se resolvieron mediante *Phos-tag* SDS-PAGE (panel superior) y mediante SDS-PAGE (panel inferior) y se inmunodetectaron con los anticuerpos anti-Mpk1 (Slt2) y anti-actina como control de carga. **(B)** Extractos celulares de la cepa BY4741 *slt2* Δ RLM1Myc transformada con el plásmido pRS316 expresando las mismas versiones de Slt2 que en (A), además de Slt2^{T195V}, Slt2^{Y198F}, Slt2^{T195V Y198F}, Slt2-CD3 y Slt2-KD obtenidos a partir de cultivos estimulados con 30 μ g/mL de RC y resueltos como en (A) se inmunodetectaron con los anticuerpos anti-Mpk1 (Slt2) y anti-actina como control de carga (paneles izquierdos), anti-Slt2-pY/pTpY (panel central) y anti-Slt2-pT/pTpY (panel derecho). Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos que se realizaron con transformantes distintos.

Estos resultados sugerían que las tres bandas de Slt2 promocionadas con el *Phos-tag* se correspondían con Slt2-pY, Slt2-pTpY y Slt2pT, nombradas de menor a mayor movilidad electroforética (Figura 18A).

El hecho de que los mutantes monofosforilables mostraran una alteración en el patrón de migración de las formas monofosforiladas de Slt2 con respecto al WT, hizo necesario combinar el uso del *Phos-tag* con los anticuerpos específicos de los diferentes sitios de fosforilación, anti-Slt2-pT/pTpY y anti-Slt2-pY/pTpY, para poder llegar a

resultados conclusivos. Mediante esta aproximación se pudo demostrar que la banda mayoritaria, la de mayor movilidad electroforética, se correspondía con la forma no fosforilada de Slt2 y, dentro de las tres bandas de menor movilidad electroforética, la que migraba más lentamente, que era a su vez la menos intensa, se correspondía con la forma monofosforilada en la Y192; la intermedia, que era la más intensa, equivalía a la forma doblemente fosforilada y la más rápida, con un nivel intermedio de intensidad, era la forma monofosforilada en la T190 de Slt2 (Figura 18B, panel izquierdo, carril 1).

Tal y como se había determinado previamente por medio de electroforesis convencionales SDS-PAGE (Figura 12 y Figura 13A), los análisis mediante *Phos-tag* confirmaron que, en ausencia de la T190 se producía un fuerte incremento en la cantidad de Y192 monofosforilada. De la misma manera, la mutación T195V promovió una acumulación de la forma monofosforilada en la Y192 de Slt2, así como una reducción en la monofosforilación de la T190 respecto a la proteína WT (Figura 18B, panel izquierdo). La mutación Y198F dio lugar a una reducción similar de la T190 monofosforilada a la observada con la mutación T195V, pero el incremento que supuso de la forma monofosforilada en Y192 fue mucho menor. La combinación de ambas mutaciones redujo la hiperfosforilación en la Y192 causada por la mutación T195V y disminuyó la monofosforilación de la T190 a niveles prácticamente indetectables. En este doble mutante, Slt2^{T195V Y198F}, también se observó una fuerte reducción en la intensidad de la banda correspondiente a Slt2 doblemente fosforilada en relación con la proteína WT (Figura 18B, panel izquierdo). La inmunodetección de estos mismos extractos con los anticuerpos anti-Slt2-pY/pTpY (Figura 18B, panel central) y con anti-Slt2-pT/pTpY (Figura 18B, panel derecho) ratificó el gran incremento en la forma monofosforilada en Y192 que se produce en el mutante Slt2^{T195V}, así como la gran disminución en la cantidad de Slt2 monofosforilado en T190 y doblemente fosforilado que se detecta en la versión Slt2^{T195V Y198F}, lo cual ya se había observado con anterioridad mediante una electroforesis convencional (Figura 17B).

El análisis mediante *Phos-tag* de los mutantes Slt2-KD y Slt2-CD3 reveló las mismas tres bandas promocionadas que se habían observado en la versión silvestre, pero éstas presentaron una movilidad electroforética ligeramente menor (Figura 18B).

Resulta interesante destacar que en el mutante Slt2-KD, el cual carece de su actividad quinasas, se observó un incremento en los niveles de fosforilación de la Y192 y una reducción de la banda correspondiente a la forma doblemente fosforilada, mientras que en Slt2-CD3 disminuyeron de manera general todas las formas fosforiladas de Slt2.

2. CAPÍTULO II. Caracterización del fenotipo de multigemación de un mutante *ptc1Δ*: efecto de la hiperactivación de Slt2

2.1. *En el mutante ptc1Δ a 38 °C las células hijas sufren un bloqueo en la progresión del ciclo celular que no supone su muerte*

Estudios previos demostraron que los mutantes *ptc1Δ* sometidos a estrés térmico muestran, entre otros, defectos en el crecimiento, así como alteraciones en la separación celular (González *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 1994). De esta manera, cuando las células carentes de *PTC1* se cultivan a 38 °C desarrollan lo que, de ahora en adelante, se llamará fenotipo de multigemación, que consiste en que, aunque la célula hija es incapaz de separarse de su madre, esta última no detiene su ciclo celular y continúa teniendo rondas de gemación sucesivas que desembocan en una acumulación de yemas. Este fenotipo ha sido el objeto de estudio en el presente capítulo de esta tesis doctoral. Establecer las condiciones experimentales óptimas para el desarrollo de este fenotipo, así como determinar si tanto la célula madre como las múltiples yemas se encuentran vivas, constituyeron el punto de partida de este estudio. En la [Figura 19A](#) se muestra la curva de crecimiento en medio YPD de la cepa silvestre y del mutante *ptc1Δ* cultivados a 30 y a 38 °C. Tal y como se puede observar, el mutante *ptc1Δ* a 38 °C presentó tanto una menor tasa de crecimiento como una concentración de biomasa final inferior a la del resto de los cultivos celulares. Asimismo, el defecto en el crecimiento mostrado por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C fue muy patente cuando se realizó un ensayo de crecimiento en medio sólido YPD a dicha temperatura ([Figura 19B](#)). Estos resultados indican que los defectos en el crecimiento mostrados por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C no son transitorios, debidos a un retraso en el ciclo celular, sino que suponen un bloqueo en la progresión del mismo.

Teniendo en cuenta que el fenotipo de multigemación consiste en una alteración asimétrica, en la que el bloqueo en el ciclo celular lo sufren exclusivamente las células hijas y que éstas pueden haber heredado de manera incorrecta orgánulos tan importantes como las mitocondrias, el retículo endoplasmático o las vacuolas (Ariño *et al.*, 2011), resultó interesante determinar si las yemas acumuladas en una célula multigemada estaban o no vivas. Para ello, se analizó mediante citometría de flujo la tinción con yoduro de propidio de un cultivo de células carentes de *PTC1* incubado a 38 °C. El yoduro de propidio es un colorante catiónico incapaz de atravesar las membranas de las células vivas.

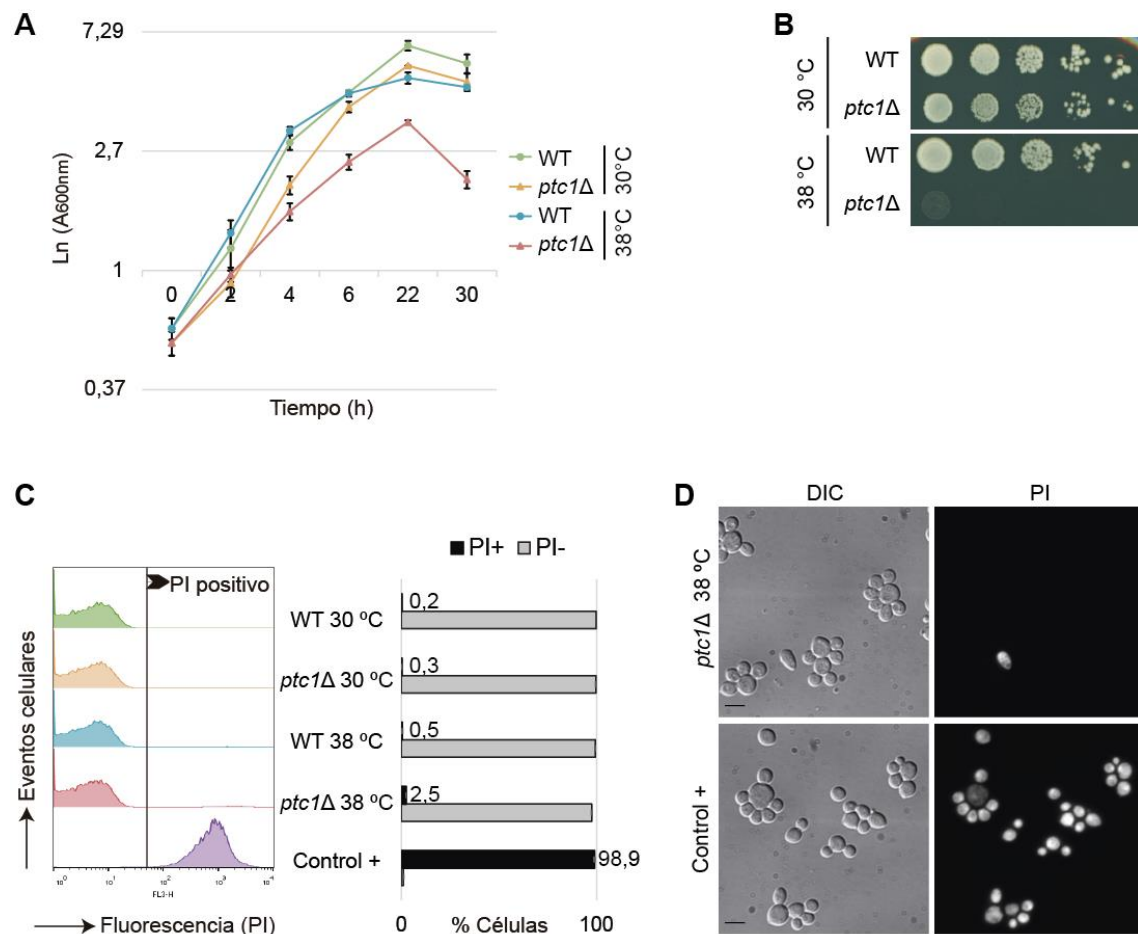


Figura 19. Análisis del crecimiento y de la muerte celular del mutante *ptc1Δ* a 38 °C. (A) Curva de crecimiento de la cepa Y3656 (WT) y del mutante isogénico YSTH14 (*ptc1Δ*), que se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se incubaron durante 30 horas adicionales a 30 °C o a 38 °C. Se realizaron medidas de absorbancia a 600 nm (A_{600nm}) en los tiempos indicados. (B) Ensayo de crecimiento en placa de medio YPD de las mismas cepas que en (A) incubadas, según se indica, a 30 o a 38 °C durante 72 h. (C) Histograma de fluorescencia (izquierda) y gráfico de barras (derecha) de un análisis mediante citometría de flujo de un total de 20000 células, de las mismas cepas cultivadas en iguales condiciones que en (A) durante 12 h y teñidas con yoduro de propidio. El control positivo (+) consiste en un cultivo celular hervido durante 5 min. En el histograma, los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada del yoduro de propidio y el número de eventos celulares, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes. En el gráfico de barras se representa el valor medio de células yoduro de propidio positivas (PI+) o negativas (PI-) y las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos diferentes. (D) Observación mediante microscopía de fluorescencia de una tinción con yoduro de propidio del mutante *ptc1Δ* cultivado en YPD hasta la fase exponencial e incubado durante 19 horas adicionales a 38 °C. El control positivo (+) es el mismo que en (C). La barra de escala equivale a 5 μ m.

Sin embargo, penetra en el interior de las células que se encuentran muertas o dañadas, uniéndose a su ADN y emitiendo fluorescencia (Zuidema y Korthuis, 2015). Esto lo convierte en una herramienta que se emplea comúnmente para distinguir dentro de una población a las células muertas de las vivas. Tal y como se puede observar en la [Figura 19C](#), mientras que en el control positivo (células hervidas) la muerte celular y la

consiguiente penetración del yoduro de propidio provocó un incremento en la intensidad de fluorescencia detectada por citometría de flujo en el 99 % de las células (PI positivo), el resto de los cultivos analizados no mostró prácticamente células fluorescentes en las que hubiera penetrado el yoduro de propidio por pérdida de permeabilidad selectiva, siendo PI positivas solo un 2,5 % de la población *ptc1Δ* a 38 °C (Figura 19C).

La observación microscópica de estos cultivos confirmó que el yoduro de propidio no había penetrado en el mutante *ptc1Δ* a 38 °C (Figura 19D). Estos resultados indican que las células carentes de *PTC1* creciendo a 38 °C sufren un bloqueo en la progresión del ciclo celular que no supone su muerte.

2.2. *Cuantificación del porcentaje de células multigemadas del mutante ptc1Δ a 38 °C mediante el análisis por citometría de flujo de su contenido en ADN*

La observación celular mediante microscopía de contraste de interferencia diferencial (DIC) permite visualizar el fenotipo de multigemación característico de los mutantes *ptc1Δ* a 38 °C (Figura 20A). Asimismo, mediante microscopía de fluorescencia se pudo constatar que cada una de las yemas presentaba su correspondiente núcleo (Figura 20B). Sin embargo, si el objetivo es la cuantificación de este fenotipo de multigemación, la observación microscópica presenta ciertas limitaciones técnicas, dentro de las que cabe mencionar (i) que las células tienen que estar lo suficientemente separadas en la preparación para evitar considerar como multigemadas células colindantes que no lo son y (ii) que, por cuestiones físicas, las células multigemadas se concentran en ciertas zonas de la preparación, lo que condiciona notablemente los resultados del recuento en función de si éste incluye o no dichas regiones.

Teniendo en cuenta que estas limitaciones podían afectar a la reproducibilidad de los resultados de cuantificación, en este trabajo se puso a punto una metodología que, además de ser rápida, elimina la variabilidad de los resultados introducida por el observador. Esta técnica emplea el colorante de ácidos nucleicos *SYTOX green* para analizar mediante citometría de flujo el contenido en ADN de cada una de las células de levadura, constituyendo una herramienta muy útil para realizar un seguimiento de la progresión del ciclo celular. Los resultados derivados de este análisis mostraron que tanto la cepa silvestre a 25 y a 38 °C como el mutante *ptc1Δ* a 25 °C presentaban mayoritariamente poblaciones celulares que contenían una o dos copias de ADN (1C y 2C, respectivamente) (Figura 20C).

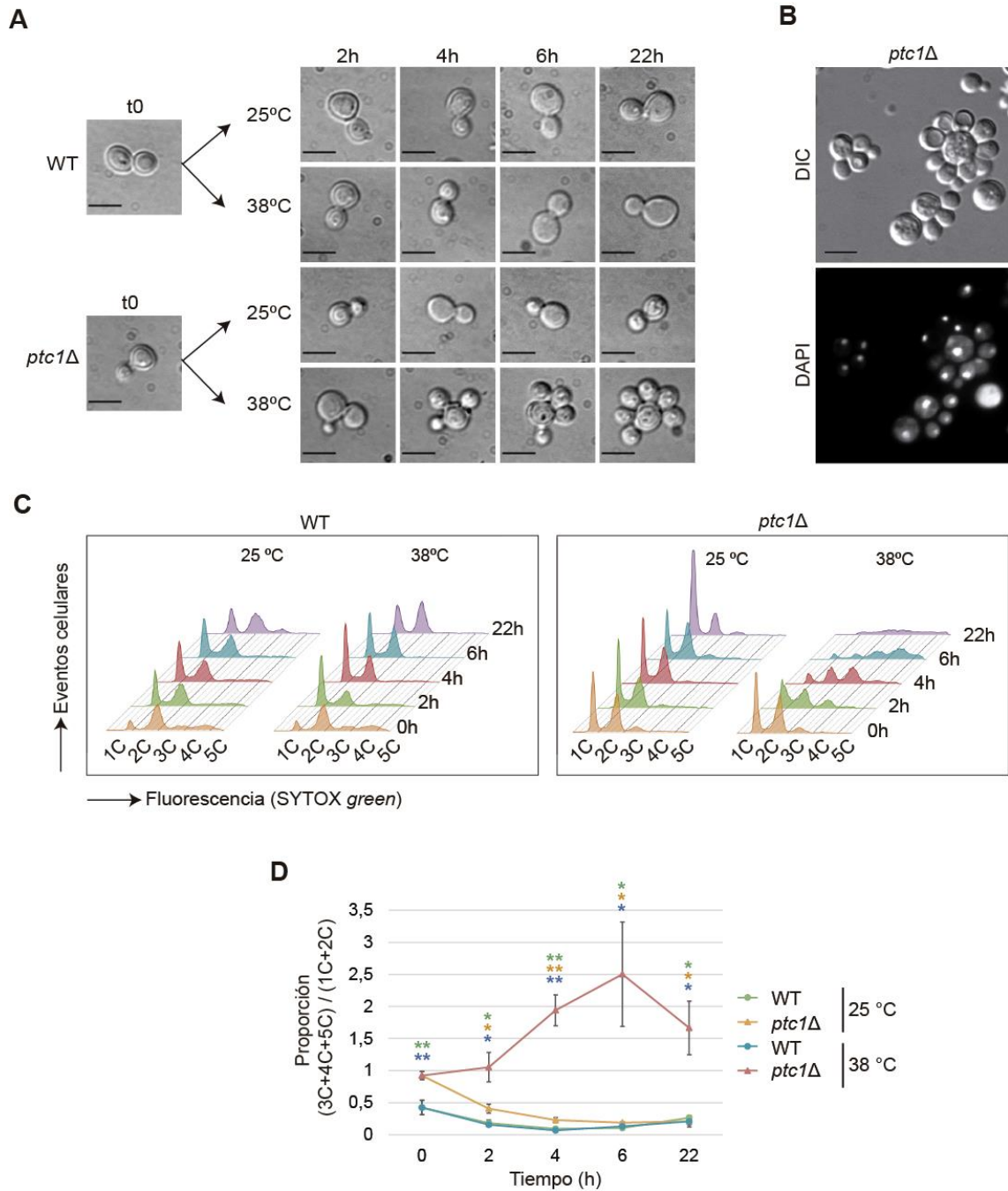


Figura 20. Determinación de la presencia y proporción de células multigemadas en cultivos celulares. (A) Observación mediante microscopía DIC de la cepa Y3656 (WT) y del mutante isogénico YSTH14 (*ptc1Δ*), que se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial (t0) y se incubaron durante 22 horas adicionales a 25 °C o a 38 °C, según se indica. Las imágenes se tomaron en los tiempos indicados. La barra de escala equivale a 5 μm. (B) Cepa YSTH14 (*ptc1Δ*) cultivada en YPD hasta la fase exponencial e incubada posteriormente a 38 °C durante 18 horas, teñida con DAPI y analizada mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala equivale a 5 μm. (C) Histograma de fluorescencia del contenido en ADN (1C, 2C, 3C, 4C o 5C) de los mismos cultivos celulares que en (A), fijados, teñidos en los tiempos indicados con SYTOX green y analizados mediante citometría de flujo. Se analizaron al menos 30000 eventos celulares de cada cultivo. Los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada del SYTOX green y el número de eventos celulares, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (D) Gráfico de líneas de la proporción de células multigemadas

(3C+4C+5C) con respecto a las células con una y con dos copias de ADN (1C+2C) de los cultivos celulares analizados en (C). Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos diferentes. Los asteriscos (* y **) indican un valor $p < 0,05$ y $< 0,01$, respectivamente, calculados mediante la prueba *t* de *Student* y en la que se compara la proporción (3C+4C+5C) / (1C+2C) de *ptc1Δ* a 38 °C frente a WT 25 °C (verde), *ptc1Δ* 25 °C (amarillo) o WT 38°C (azul).

El mutante *ptc1Δ* a 38 °C, sin embargo, mostró un histograma de fluorescencia con un perfil muy diferente, de tal manera que, transcurridas dos horas desde el comienzo del estímulo térmico, se hacía patente un tercer pico correspondiente a 3 copias de ADN (3C), mientras que a las seis horas se apreciaba un cuarto (4C) y hasta un quinto pico (5C) (Figura 20C). A partir de los datos obtenidos por citometría, se calculó la proporción de células multigemadas (3C+4C+5C) en relación con las que presentaban una o dos copias de ADN (1C+2C) (Figura 20D). El mutante *ptc1Δ* a 38 °C mostró diferencias estadísticamente significativas en la proporción de células multigemadas con respecto al resto de cultivos en todos los tiempos analizados. La mayor proporción de células multigemadas se detectó transcurridas 6 horas desde el inicio del estímulo térmico (Figura 20D). Estos resultados ponen de manifiesto que el análisis por citometría de flujo del contenido en ADN de las células constituye una herramienta fiable para cuantificar la proporción de células multigemadas presente en un cultivo de la cepa *ptc1Δ* a 38 °C.

2.3. La hiperactivación de la ruta de integridad celular provoca defectos en la separación celular en el mutante *ptc1Δ*

Está descrito que la ausencia de Ptc1 conduce a una hiperfosforilación de las MAPKs Hog1 y Slt2 (Ariño *et al.*, 2019). Éstas y otras hiperfosforilaciones derivadas de la delección de *PTC1* podrían ser las responsables de los defectos funcionales mostrados por este mutante. Con el objetivo de determinar qué rutas de MAPKs podrían estar implicadas en la acumulación de múltiples yemas en las células carentes de *PTC1*, se analizó en paralelo el estado de fosforilación de las MAPKs Slt2, Kss1, Fus3 y Hog1 en las condiciones en las que se estaba estudiando el fenotipo de multigemación. De esta manera, se incubaron con diferentes anticuerpos anti-MAPKs los mismos extractos proteicos de cultivos celulares de la cepa silvestre o del mutante *ptc1Δ* en ausencia o en presencia de estrés térmico. Los resultados mostraron que Slt2 se encontraba hiperfosforilada en el mutante *ptc1Δ* tanto a 30 como a 38 °C. Además, este incremento en la fosforilación de Slt2 iba acompañado de un aumento en los niveles totales de esta MAPK (Figura 21A). Teniendo en cuenta que es la propia actividad de Slt2 la que incrementa los niveles totales de esta proteína (García *et al.*, 2016), se deduce que en la cepa *ptc1Δ*, Slt2 se encuentra, además de hiperfosforilada, hiperactivada. Este efecto es aún más patente cuando el mutante *ptc1Δ* está sometido a estrés térmico (Figura 21A).

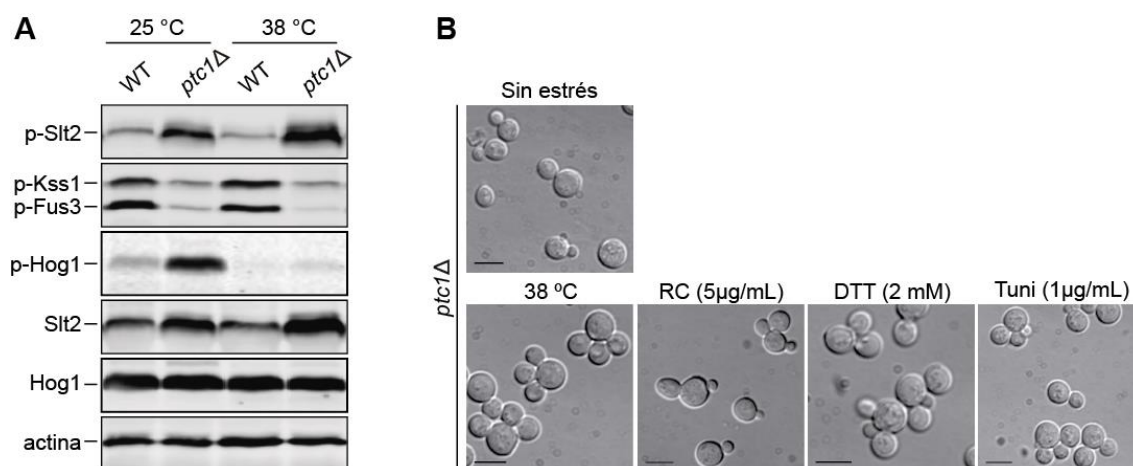


Figura 21. Análisis de la relación entre los defectos en la separación celular del mutante *ptc1Δ* y el estado de activación de las MAPKs Slt2, Kss1, Fus3 y Hog1 y. (A) La cepa Y3656 (WT) y su mutante isogénico YSTH14 (*ptc1Δ*) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se incubaron durante 6 horas adicionales a 25 o a 38 °C, según se indica. Los extractos celulares se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-phospho-p44/42 MAPK 4370, que reconoce p-Slt2, p-Kss1 y p-Fus3; anti-phospho-p38 MAPK 3D7 que reconoce p-Hog1, anti-Mpk1 para detectar Slt2 total, anti-Hog1 y-215 para detectar Hog1 total y anti-actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos distintos. (B) Cultivos celulares de la cepa YSTH14 (*ptc1Δ*) creciendo en YPD hasta la fase exponencial se cultivaron durante 7 horas adicionales a 25 °C en ausencia (sin estrés) o en presencia de 5 μg/mL RC, 2 mM DTT o 1 μg/mL tunicamicina (Tuni), o a 38 °C, según se indica. Las células se visualizaron mediante microscopía DIC. La barra de escala equivale a 5 μM.

Sin embargo, en las MAPKs Kss1 y Fus3 se observó lo contrario, de tal manera que la delección de *PTC1* supuso una reducción en los niveles de fosforilación de ambas. Esta disminución fue aún más acusada en el caso de Fus3 cuando se combinó la mutación *ptc1Δ* con el estrés térmico, siendo la señal de p-Fus3 prácticamente inapreciable en dichas circunstancias (Figura 21A). Finalmente, Hog1 se encontró hiperfosforilada cuando las células carentes de Ptc1 crecieron en ausencia de estrés térmico. Sin embargo, llama la atención que no se encontraron apenas diferencias en los niveles de fosforilación de Hog1 entre la cepa silvestre y el mutante *ptc1Δ* cuando éstas se cultivaron a 38 °C (Figura 21A), siendo estos niveles mucho menores que a 25 °C. Esta reducción en el grado de fosforilación de Hog1 no afectó a la cantidad total de la proteína, que se mantuvo constante en todas las condiciones ensayadas (Figura 21A). Estos resultados descartan la posibilidad de que el fenotipo de multigemación mostrado por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C se deba a una hiperfosforilación de la MAPK Hog1 y fortalecen la idea de que estos defectos en la separación celular se deben a una hiperactivación de Slt2.

Se sabe que la delección de *PTC1* provoca un incremento en la sensibilidad de la levadura frente a estímulos que activan su ruta de integridad celular (González *et al.*,

2006). Asimismo, el mutante *ptc1Δ* ha mostrado defectos en la separación celular cuando éste se cultiva en presencia de CFW (Tatjer *et al.*, 2016b). Con el objetivo de determinar si la activación de la ruta CWI por estímulos diferentes al estrés térmico conduce a los defectos en la separación celular observados en el mutante *ptc1Δ* a 38 °C, se analizó mediante microscopía el fenotipo que mostraba este mutante en presencia de agentes que, aunque ejercen efectos diferentes sobre la célula, convergen en la activación de la ruta CWI. Así, mientras el RC se utiliza como un agente canónico que provoca una alteración específica de la pared celular, las elevadas temperaturas afectan a la membrana plasmática, mientras que la tunicamicina y el DTT provocan alteraciones en el plegamiento de las proteínas (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020). Tal y como se puede observar en la [Figura 21B](#), el mutante *ptc1Δ* desarrolló el fenotipo de multigemación, además de a elevadas temperaturas, en presencia de RC, de tunicamina y de DTT. Estos resultados refuerzan la idea de que la hiperactivación de la ruta de integridad celular provoca defectos en la separación celular en el mutante *ptc1Δ*.

2.4. *La delección de MKK1 o de RLM1 reducen los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por los mutantes ptc1Δ en presencia de estrés*

Como se ha visto en el capítulo I, la activación de Slt2 depende fundamentalmente de la MAPKK Mkk1 y consiste en una doble fosforilación que se produce en los residuos T190 y Y192 del motivo de activación TEY. Una vez fosforilada, Slt2 puede activar a sus sustratos de manera dependiente de su actividad quinasa, como sucede con Rlm1 o, por el contrario, mediante un mecanismo no catalítico, como ocurre con el factor de transcripción SBF (Swi4/Swi6) (Levin, 2011). Los resultados de nuestro grupo de investigación en colaboración con el Dr. Ariño previos a esta Tesis sugerían que los defectos en el crecimiento y en la separación celular del mutante *ptc1Δ* a 38 °C dependían de la hiperfosforilación de Slt2, dado que la delección de *RLM1* y la de *MKK1* incrementaban la tolerancia del mutante *ptc1Δ* a diferentes estreses (González *et al.*, 2006; Tatjer *et al.*, 2016b). Más aún, se había observado que en el mutante *mkk1Δ ptc1Δ* se producía una reducción en el porcentaje de células que, en presencia de CFW, mostraban más de una yema (Tatjer *et al.*, 2016b). Sin embargo, no existía ningún trabajo en el que se analizara el efecto que tiene la delección de *SWI4* y de *SWI6* sobre los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por las células *ptc1Δ* en presencia de estrés.

Con el objetivo de determinar si la hipersensibilidad y el fenotipo de multigemación originados por la ausencia de Ptc1 en condiciones de activación de la ruta CWI estaban vinculados con un incremento en la actividad quinasa de Slt2 y/o de su mecanismo no catalítico de activación sobre los factores de transcripción Rlm1 y SBF, respectivamente,

se analizó el efecto que tenía la delección de *RLM1*, de *SWI4* y de *SWI6* sobre estos fenotipos del mutante *ptc1Δ*. Para poder hacer un estudio comparativo, en estos experimentos también se incluyó al mutante *mkk1Δ*. De esta manera, se realizaron ensayos de crecimiento en placa con medio YPD que incluía estímulos de la ruta CWI (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020) y se vio que la delección tanto de *MKK1* como de *RLM1* en la cepa *ptc1Δ* provocaba una recuperación del crecimiento en presencia de zimoliasa y de bajas concentraciones RC y de CFW (Figura 22A). Sin embargo, frente al estrés térmico, la cafeína y concentraciones elevadas de RC y de CFW, estos dobles mutantes mostraron sólo una ligera reducción de la sensibilidad mostrada por *ptc1Δ* (Figura 22A). Las mutaciones *swi4Δ* y *swi6Δ*, por su parte, no mejoraron el crecimiento de *ptc1Δ* en ninguna de las condiciones ensayadas (Figura 22A).

A continuación, se quiso cuantificar el efecto que tenían las mutaciones *mkk1Δ* y *rlm1Δ* sobre el porcentaje de células multigemadas mostrado por el mutante *ptc1Δ* en presencia de estrés térmico. Para ello, se analizó mediante citometría de flujo el contenido en copias de ADN de la cepa silvestre y de los mutantes *ptc1Δ*, *ptc1Δ mkk1Δ* y *ptc1Δ rlm1Δ* cultivados a 38 °C. Tal y como se puede observar en la Figura 22B, mientras que en el histograma de fluorescencia de la cepa WT sólo se detectaron los dos picos correspondientes a poblaciones celulares con una o dos copias de ADN, el mutante *ptc1Δ* mostró hasta cinco picos, correspondientes a células multigemadas con hasta cuatro yemas. Los dobles mutantes *ptc1Δ mkk1Δ* y *ptc1Δ rlm1Δ* mostraron un histograma de fluorescencia en el que, a diferencia del mutante *ptc1Δ*, la proporción de células con una o dos copias de ADN fue predominante sobre la de células con un número de copias de ADN superior (Figura 22B). El análisis cuantitativo reveló que, mientras que la cepa *ptc1Δ* mostraba un 63 % de células con más de dos copias de ADN, en los mutantes *ptc1Δ mkk1Δ* y *ptc1Δ rlm1Δ* este porcentaje era del 31 % y del 47 %, respectivamente, (Figura 22C). Estas diferencias con respecto a *ptc1Δ* fueron en ambos casos estadísticamente significativas, y mostraron que la delección de *RLM1* no reducía tan notablemente el porcentaje de células multigemadas como lo hacía la ausencia de *MKK1* (Figura 22C). Estos resultados ponen de manifiesto que tanto *MKK1* como *RLM1* participan en la transmisión de la señal que da lugar a los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C y sugieren que es la actividad quinasa de Slt2 la que, a través de la fosforilación de Rlm1 y posiblemente de otros sustratos, está implicada en el desarrollo de este fenotipo.

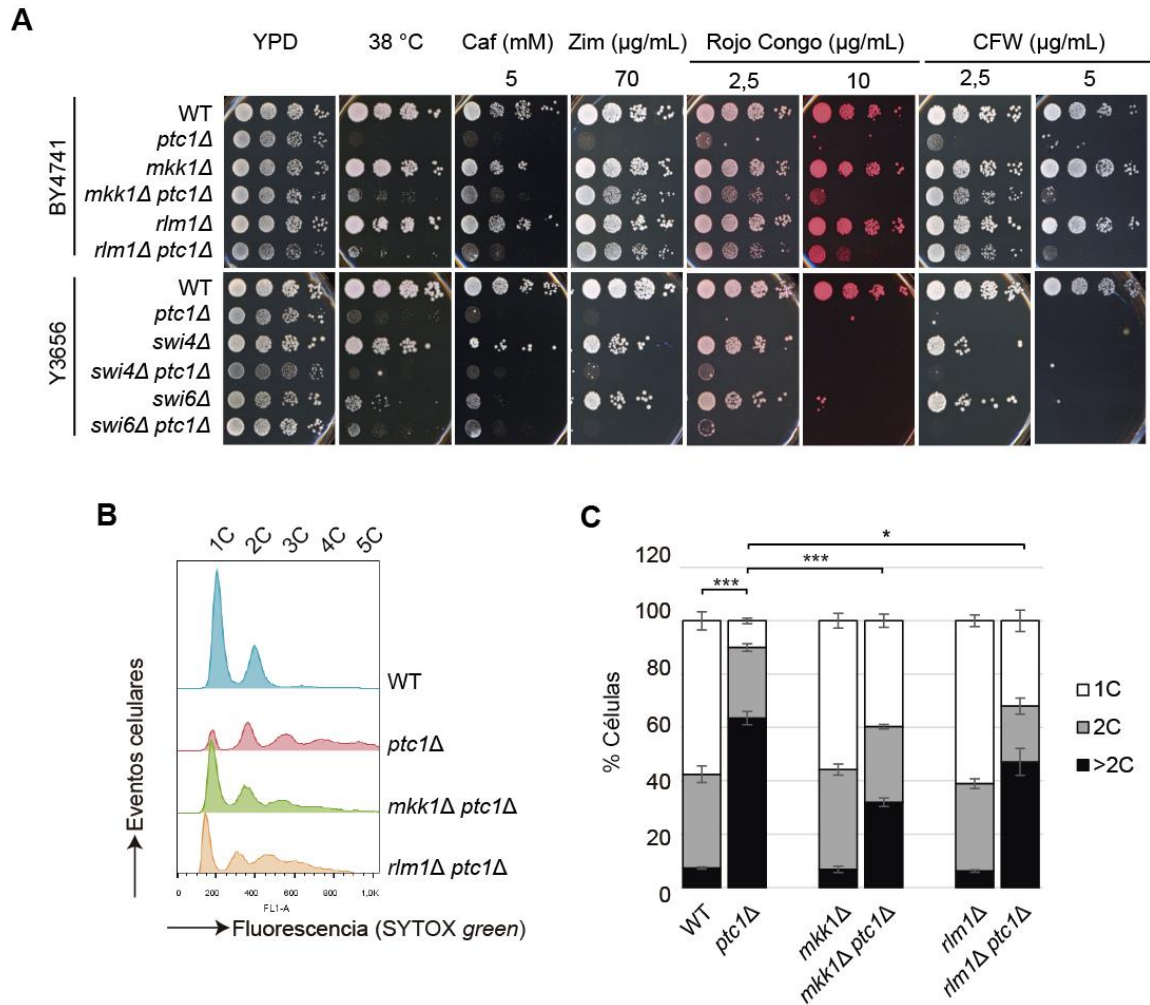


Figura 22. Análisis de la relación funcional entre Ptc1 y componentes de la ruta de integridad celular. (A) Ensayo de crecimiento en medio sólido mediante diluciones decimales seriadas de la cepa BY4741 (WT) y de los mutantes isogénicos Y02487 (*ptc1Δ::HIS3; mkk1Δ*); YPL14 (*mkk1Δ ptc1Δ*); Y02739 (*rlm1Δ*) y YPL12 (*rlm1Δ ptc1Δ*) (panel superior) y de la cepa Y3656 (WT) y de los mutantes isogénicos YSTH14 (*ptc1Δ*); YGGR35 (*swi4Δ*); YGGR41 (*swi4Δ ptc1Δ*), YGGR38 (*swi6Δ*) y YGGR47 (*swi6Δ ptc1Δ*) (panel inferior) en placas YPD suplementadas con las concentraciones indicadas de cafeína (Caf), zimoliasa (Zim), rojo Congo o CFW e incubadas a 30 °C, o, cuando se especifica, a 38 °C, durante 72 h. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos distintos. (B) Histograma de fluorescencia del contenido en ADN (1C, 2C, 3C, 4C, 5C) de la cepa BY4741 (WT) y de los mutantes isogénicos *ptc1Δ*; YPL14 (*mkk1Δ ptc1Δ*) y YPL12 (*rlm1Δ ptc1Δ*). Las células se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial, se incubaron durante 6 horas adicionales a 38 °C, se fijaron, se tiñeron con SYTOX green y se analizaron mediante citometría de flujo. Se analizaron al menos 15000 eventos celulares de cada cultivo. Los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada del SYTOX green y el número de eventos celulares, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. (C) Gráfico de barras del porcentaje de células con una (1C), dos (2C) o más de dos (>2C) copias de ADN en los cultivos celulares analizados en (B). Las barras de error muestran la desviación estándar de tres experimentos diferentes. Los asteriscos (* y ***) indican un valor $p < 0,05$ y $< 0,001$, respectivamente, calculados mediante la prueba t de Student en la que se comparó el porcentaje de células multigemadas (>2C) entre cada una de las cepas que se indica.

2.5. *Los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C dependen de la actividad quinasa de Slt2*

En trabajos anteriores, nuestro grupo de investigación desarrolló una versión de Slt2 sensible a análogos de ATP (Slt2-as) cuya actividad quinasa puede ser inhibida de manera específica por el análogo voluminoso inhibidor de quinasas 2,3-DMB-PP1 (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016). Para averiguar si los defectos en el crecimiento y en la separación celular que presenta el mutante *ptc1Δ* en condiciones de activación de la ruta de integridad celular son dependientes de la actividad quinasa de Slt2, en este trabajo se generó una cepa de *ptc1Δ* que portaba la versión Slt2-as y se analizó su sensibilidad frente a diferentes estreses de la ruta CWI y el porcentaje de células multigemadas que se desarrollaban en esta cepa a 38 °C en presencia del inhibidor 2,3-DMB-PP1 o de DMSO que, al ser el solvente del este último, se utilizó como control negativo. En los ensayos de crecimiento en placa se observó que la inhibición de Slt2-as en el mutante *ptc1Δ* reducía notablemente la sensibilidad que éste mostraba a elevadas temperaturas, RC, CFW y cafeína (Figura 23A).

Para analizar las consecuencias que tiene la inhibición de Slt2-as sobre los defectos en la separación celular del mutante *ptc1Δ*, se analizó mediante citometría de flujo el contenido en copias de ADN de cultivos celulares incubados a 38 °C en presencia o en ausencia del inhibidor de quinasas 2,3-DMB-PP1. Tal y como se puede observar en el histograma de fluorescencia (Figura 23B), tanto la cepa WT como la Slt2-as mostraron dos picos correspondientes a poblaciones celulares con una y con dos copias de ADN, independientemente de la presencia o no del inhibidor. La adición de 2,3-DMB-PP1 tampoco alteró el patrón del mutante *ptc1Δ*, el cual mostró hasta cinco picos, correspondientes con poblaciones de células con hasta cuatro yemas (Figura 23B). Sin embargo, la adición de inhibidor en la cepa *ptc1Δ slt2-as*, provocó un incremento en la proporción relativa de células con una o con 2 copias de ADN (Figura 23B). El análisis numérico de estos datos mostró que la inhibición de Slt2-as en la cepa *ptc1Δ slt2-as* reducía de manera estadísticamente significativa el porcentaje de células con más de 2 copias de ADN, que pasó del 59 % al 25 %, en ausencia y en presencia de inhibidor, respectivamente (Figura 23C). Estos resultados confirman que la sensibilidad mostrada por *ptc1Δ*, así como el fenotipo de multigemación que este mutante muestra frente a agentes activadores de la ruta de integridad celular, son una consecuencia de la elevada actividad quinasa de Slt2 debida a la hiperactivación de dicha cascada de señalización.

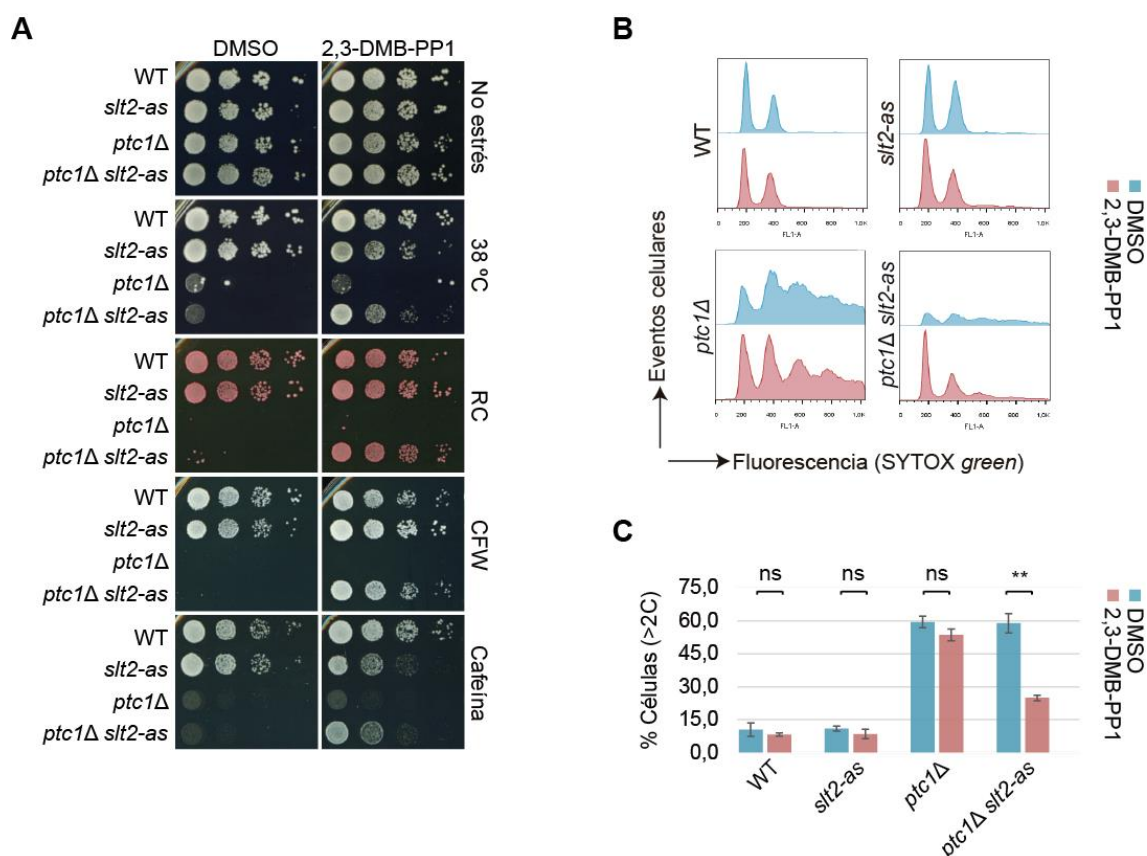


Figura 23. Análisis del efecto que tiene la inhibición de Slt2 sobre el crecimiento y la separación celular del mutante *ptc1Δ* en condiciones de activación de la ruta de integridad celular. (A) Ensayo de crecimiento en medio sólido mediante diluciones decimales seriadas de la cepa Y3656 (WT) y de los mutantes isogénicos YASS-1 (*slt2-as*), YSTH14 (*ptc1Δ*) y YGGR19 (*ptc1Δ slt2-as*) en placas YPD suplementadas con 10 µg/mL RC, 10 µg/mL CFW o 8 mM cafeína y con 20 µM 2,3-DMB-PP1 (inhibidor) o 0,06 % DMSO (control negativo de inhibición). Las placas se incubaron a 30 °C o, cuando se indica a 38 °C, durante 72 h, salvo en el caso de la cafeína, que se mantuvieron en incubación durante 120 h. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos distintos. (B) Histograma de fluorescencia del contenido en ADN de las mismas cepas que en (A). Las células se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial, se incubaron durante 6 horas adicionales a 38 °C en presencia de 5 µM 2,3-DMB-PP1 o de 0,16 % DMSO (control negativo de inhibición), se fijaron, se tiñeron con SYTOX green y se analizaron mediante citometría de flujo. Se analizaron al menos 26000 eventos celulares de cada cultivo. Los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada del SYTOX green y el número de eventos celulares, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos diferentes. (C) Gráfico de barras del porcentaje de células multigemadas (>2C) en los cultivos celulares analizados en (B). Las barras de error indican la desviación estándar de tres experimentos diferentes. ns (no significativo) y el asterisco (**) indican unos valores $p > 0,05$ y $< 0,01$, respectivamente, calculados mediante la prueba t de Student en la que se comparó el porcentaje de células multigemadas en una misma cepa con y sin inhibidor.

2.6. El mutante *ptc1Δ* a 38 °C muestra hiperpolarización mitocondrial

La presencia de Ptc1 es necesaria para que se hereden de manera correcta diferentes orgánulos, entre ellos las mitocondrias (Roeder *et al.*, 1998). Concretamente, Ptc1 controla la herencia mitocondrial inactivando a Slt2 (Li *et al.*, 2010), lo que sugiere que

es la hiperactivación de la ruta CWI la responsable de los defectos en la herencia de las mitocondrias que se producen en el mutante *ptc1Δ*. Con el objetivo de caracterizar el estado de las mitocondrias en las levaduras multigemadas del mutante *ptc1Δ*, se realizó una tinción de estas células con *MitoTracker*[®] Red CMXRos y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. El *MitoTracker* es un fluoróforo catiónico que penetra en el interior de la matriz mitocondrial de manera dependiente de la diferencia de potencial de membrana en este orgánulo. La tinción con *MitoTracker* no permitió visualizar las mitocondrias del mutante *ptc1Δ* como en la cepa WT, sino que las células multigemadas mostraron una señal fluorescente muy intensa, sobre todo de las células madre (Figura 24). Estos resultados parecían indicar que las células multigemadas del mutante *ptc1Δ* a 38 °C presentaban una alteración en el potencial de membrana mitocondrial.

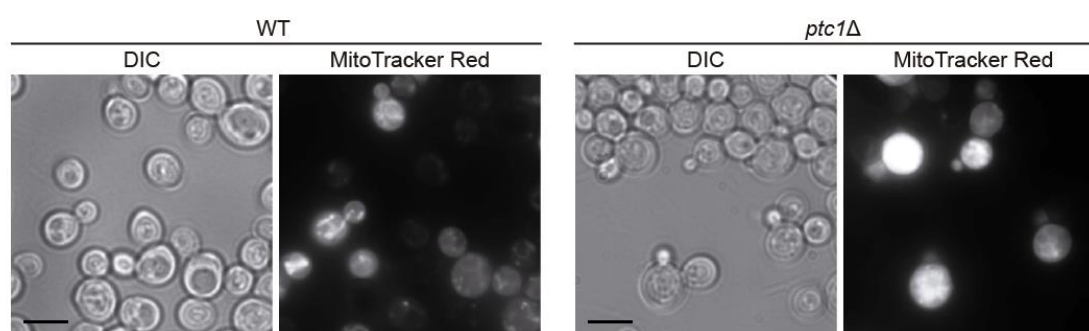


Figura 24. Análisis de la tinción con *MitoTracker* de la cepa WT y del mutante *ptc1Δ*. La cepa silvestre Y3656 (WT) y su mutante isogénico YSTH14 (*ptc1Δ*) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se incubaron durante 6 horas adicionales a 38 °C. Las células se tiñeron con *MitoTracker*[®] Red CMXRos y se visualizaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala equivale a 5 μ M.

Para analizar el potencial de membrana mitocondrial del mutante *ptc1Δ* a 38 °C se utilizó otro colorante catiónico: la rodamina 123 que, al igual que el *MitoTracker*, se acumula en el interior de las mitocondrias activas de manera proporcional a la diferencia del potencial transmembrana de ésta. Los cultivos celulares se tiñeron simultáneamente con rodamina 123 y con PI, con el objetivo de descartar que la señal emitida por el colorante catiónico se debiera a una autofluorescencia por muerte celular, y se analizaron mediante microscopía de fluorescencia y mediante citometría de flujo. La observación microscópica permitió determinar que el mutante *ptc1Δ* a 38 °C mostraba un incremento en la señal emitida por la rodamina 123, que fue especialmente notable en el caso de las células madre y que no se correspondía con un aumento de la señal emitida por el PI, como sí sucedía en el caso del control positivo de muerte (Figura 25A).

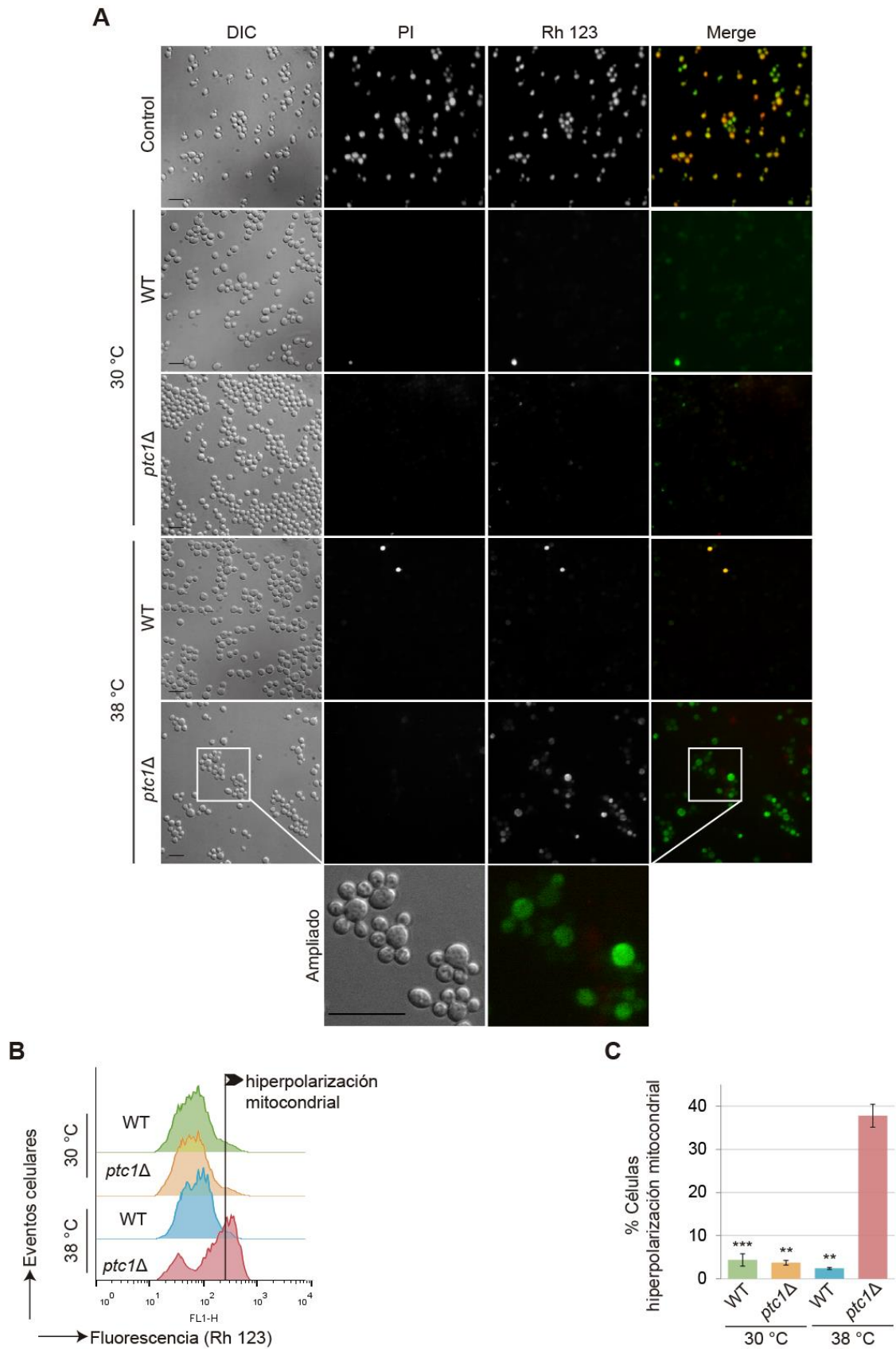


Figura 25. Análisis del potencial de membrana mitocondrial mediante la tinción con rodamina 123 (Rh 123) de la cepa WT y del mutante *ptc1Δ*. (A) La cepa silvestre Y3656 (WT) y su mutante isogénico YSTH14 (*ptc1Δ*) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se incubaron durante

12 horas adicionales a 30 o a 38 °C. Las células se tiñeron con yoduro de propidio (PI) y con rodamina 123 (Rh 123) y se visualizaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala equivale a 15 μm . **(B)** Histograma del análisis mediante citometría de flujo de las mismas tinciones celulares que en (A). El análisis de la tinción con rodamina se realizó sobre la población de células PI-. Se analizaron al menos 20000 eventos celulares de cada cultivo. Los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada de la Rh 123 y el número de eventos celulares, respectivamente. Se muestra una imagen representativa de tres experimentos independientes. **(C)** Gráfico de barras del porcentaje de células con hiperpolarización mitocondrial. Este porcentaje se calculó atendiendo a la proporción de células con una intensidad de fluorescencia derivada de la Rh 123 superior a la indicada por el umbral seleccionado en (B). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos diferentes. Los asteriscos (** y ***) indican un valor $p < 0,01$ y $< 0,001$, respectivamente, calculados mediante la prueba t de *Student* y referidos al porcentaje de células con hiperpolarización mitocondrial mostrado por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C.

El análisis mediante citometría de flujo de las células de *S. cerevisiae* teñidas con rodamina 123 ([Figura 25B](#)) confirmó que el mutante *ptc1Δ* a 38 °C mostraba un incremento significativo en el porcentaje de células con una intensidad de fluorescencia elevada. Este porcentaje de células con señal incrementada, correspondiente a aquéllas que sufren una hiperpolarización mitocondrial, fue del 38 % en el caso del mutante *ptc1Δ* a 38 °C, frente al resto de cultivos en los que este valor fue en todos los casos inferior al 5 % ([Figura 25C](#)). Estos resultados indican que el mutante *ptc1Δ* a 38 °C presenta una hiperpolarización en el potencial de membrana mitocondrial.

2.7. El mutante *ptc1Δ* a 38 °C se encuentra en un estado de estrés oxidativo

Numerosas evidencias experimentales demuestran que existe una correlación entre el potencial de membrana mitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), de tal manera que en la actualidad está aceptado que las mitocondrias producen más ROS, y por lo tanto experimentan estrés oxidativo, cuando existe un potencial de membrana mitocondrial elevado (Suski *et al.*, 2012). Con el objetivo de determinar si, en efecto, la ausencia de Ptc1 en células cultivadas a 38 °C provoca, además de una hiperpolarización mitocondrial, un incremento de ROS, se analizó mediante citometría de flujo la fluorescencia emitida por estas células teñidas con dihidroetidio (DHE). El DHE penetra en el interior de las células vivas, donde reacciona con las ROS generando etidio, el cual se intercala entre los ácidos nucleicos y emite fluorescencia (Cho y Hwang, 2011). Tal y como se puede observar en el histograma de la [Figura 26A](#), la intensidad de fluorescencia derivada del DHE emitida por la población de células *ptc1Δ* cultivadas a 38 °C fue superior a la emitida por estos mutantes cultivados a 30 °C y a la de las células silvestres a ambas temperaturas. El análisis numérico de estos datos reveló que el mutante *ptc1Δ* a 38 °C mostraba un porcentaje de células DHE positivo muy superior (29 %) al resto de los cultivos celulares ensayados que no superaban el 4 % ([Figura 26B](#)).

Estos resultados indican que la combinación de la ausencia de Ptc1 y una elevada temperatura provoca un incremento de los niveles de ROS.

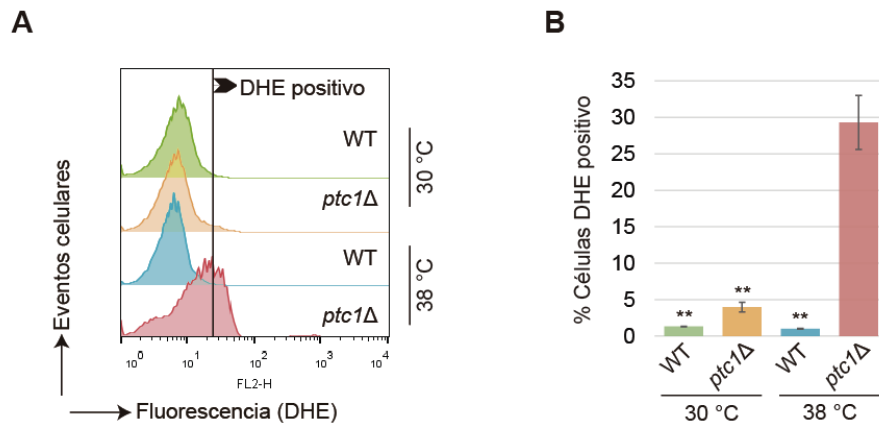


Figura 26. Detección de estrés oxidativo por la fluorescencia emitida por dihidroetidio (DHE). (A) La cepa silvestre Y3656 (WT) y su mutante isogénico YSTH14 (*ptc1Δ*) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se incubaron durante 12 horas adicionales, según se indica, a 30 o a 38 °C. Las células se tiñeron con DHE y se analizaron mediante citometría de flujo un total de 20000 eventos celulares. Se muestra un histograma representativo de tres experimentos independientes, en el que los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada del DHE y el número de eventos celulares, respectivamente. (B) Gráfico de barras del porcentaje de células DHE positivo. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos diferentes. El asterisco (**) indica un valor $p < 0,01$, calculado mediante la prueba *t* de Student y referido al porcentaje de células DHE positivo del mutante *ptc1Δ* a 38 °C.

2.8. La inhibición de la actividad quinasa de Slt2 reduce la hiperpolarización mitocondrial y el estrés oxidativo del mutante *ptc1Δ* a 38 °C

A lo largo de este trabajo se ha demostrado que la actividad quinasa de Slt2 es la responsable de los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C. Para averiguar si la hiperactivación de la ruta de integridad celular también está involucrada en la hiperpolarización mitocondrial y en el estrés oxidativo que sufre este mutante a temperaturas elevadas, se analizó mediante citometría de flujo la intensidad de fluorescencia derivada de la rodamina 123 y del DHE en células *ptc1Δ slt2-as* cultivadas en presencia del inhibidor 2,3-DMB-PP1 o en su ausencia (DMSO). La adición del inhibidor redujo de manera significativa la intensidad de fluorescencia derivada tanto de la Rh 123 (Figura 27A) como del DHE (Figura 27B) con respecto a los cultivos celulares sin inhibidor (DMSO). Concretamente, la presencia del inhibidor en el cultivo del mutante *ptc1Δ slt2-as* supuso una reducción en el porcentaje de células rodamina 123 positivo del 35 al 8 % (Figura 27A), mientras que el porcentaje de células DHE positivo pasó del 19 al 7 % (Figura 27B). Estos resultados sugieren que la hiperpolarización mitocondrial y el estrés oxidativo observados en el mutante *ptc1Δ* a 38 °C son una consecuencia de la excesiva actividad quinasa de Slt2 en estas condiciones.

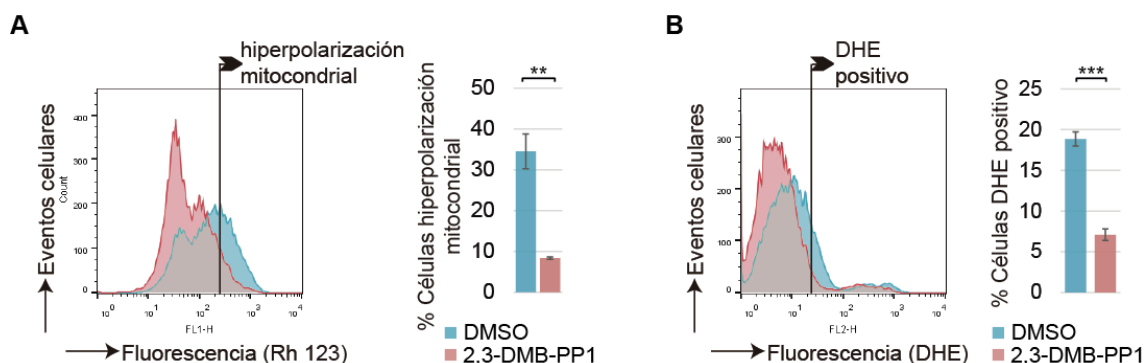


Figura 27. Análisis del efecto de la inhibición de Slt2 sobre el potencial de membrana mitocondrial y el estrés oxidativo de células *ptc1Δ*. (A) La cepa *ptc1Δ slt2-as* (YGGR19) se cultivó en YPD hasta la fase exponencial y se incubó durante 12 horas adicionales a 38 °C en presencia de 5 μM 2,3-DMB-PP1 (inhibidor) o de 0,16 % DMSO (control negativo de inhibición). Las células se tiñeron con rodamina 123 (Rh 123) y se analizaron mediante citometría de flujo al menos 11000 eventos celulares. En el panel izquierdo se muestra un histograma representativo de tres experimentos independientes en el que los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada de la Rh 123 y el número de eventos celulares, respectivamente. En el panel derecho el gráfico de barras muestra el porcentaje de células con hiperpolarización mitocondrial. Este porcentaje se calculó atendiendo a la proporción de células con una intensidad de fluorescencia derivada de la Rh123 superior a la indicada por el umbral seleccionado en (B). Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos diferentes. El asterisco (**) indica un valor $p < 0,01$, calculado mediante la prueba t de Student. (B) Los mismos cultivos celulares que en (A) se tiñeron con dihidroetidio (DHE) y se analizaron mediante citometría al menos 14000 eventos celulares. En el panel izquierdo se muestra un histograma representativo de tres experimentos independientes en el que los ejes X e Y representan la intensidad de fluorescencia derivada del DHE y el número de eventos celulares, respectivamente. En el panel derecho el gráfico de barras muestra el porcentaje de células DHE positivo. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos diferentes. El asterisco (***) indica un valor $p < 0,001$, calculado mediante la prueba t de Student.

2.9. Las células multigemadas *ptc1Δ* muestran alteraciones en la dinámica de septinas

A lo largo del ciclo celular, las septinas reorganizan sus filamentos formando diferentes estructuras de orden superior que van desde un anillo incipiente al comienzo de la gemación, pasando por un collar en forma de reloj de arena, hasta dividirse, al final de la mitosis en dos anillos que se sitúan a ambos lados del anillo de actomiosina. Una vez completada la constricción de este último, la formación del septo y la separación celular, estos anillos de septinas, que han pasado a estar uno en la célula madre y otro en la hija, se reabsorben y los filamentos de septinas que los constituían pasan a localizarse en la nueva yema incipiente, cerrándose así el ciclo (ver Figura 5).

En estudios previos preliminares, nuestro grupo de investigación observó que las células multigemadas del mutante *ptc1Δ* mostraban una anomalía en la dinámica de las septinas. Concretamente, mediante la expresión plasmídica de la septina Cdc10 fusionada a GFP, se observó que, una vez que el anillo de septinas se había dividido en dos, el del lado de la célula madre se reabsorbía, mientras que el de la célula hija

permanecía ensamblado, aunque la célula madre comenzara una nueva gemación. Con el objetivo de profundizar más en el estudio de las septinas en el mutante *ptc1Δ* y teniendo en cuenta que la GFP es termolábil y que los experimentos se estaban realizando a temperaturas elevadas, se decidió analizar la dinámica de las septinas empleando la proteína fluorescente roja *mCherry* (mCh). Para ello, se construyeron a partir del fondo WT y *ptc1Δ* cepas que expresaban Cdc10 fusionado en el extremo C-terminal a mCh desde su promotor nativo y en su propio locus cromosómico. Estas células se cultivaron a 38 °C y se observaron mediante microscopía de fluorescencia. En la cepa WT, Cdc10-mCh marcó las estructuras supramoleculares habituales (Figura 28). Sin embargo, en las células multigemadas del mutante *ptc1Δ* se detectaron dos anomalías en cuanto a la distribución de las septinas. En primer lugar, tal y como indicaron los estudios preliminares, se observaron alteraciones en el desensamblaje del anillo de septinas, de tal manera que mientras que en la célula madre, una vez finalizado el ciclo, el anillo de septinas desaparecía del septo para localizarse en el nuevo sitio de gemación, en la célula hija éste permanecía sin reabsorberse durante un largo periodo de tiempo. Cabe destacar que, transcurridas tres rondas de gemación, el anillo de la célula hija terminó por reabsorberse (Figura 28). En segundo lugar, se observó que en las células hijas que eran incapaces de separarse de la madre, las septinas aparecían formando estructuras punteadas que parecían distribuirse por toda la célula, cuya cantidad se veía incrementada conforme se reabsorbía el anillo de (Figura 28). Los resultados indican que los problemas de separación celular que muestra el mutante *ptc1Δ* sometido a estrés van acompañados de una alteración asimétrica, sufrida sólo por las células hijas, en la dinámica del anillo de septinas.

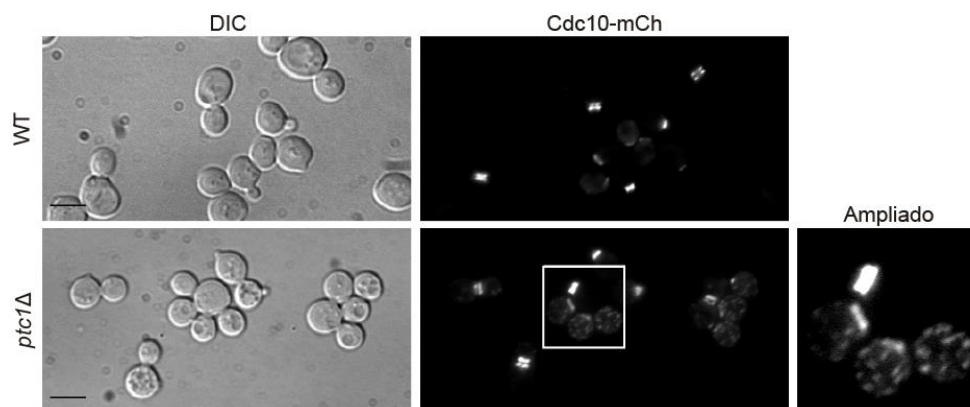


Figura 28. Análisis de la dinámica de las septinas en células WT y *ptc1Δ*. Las cepas YGGR9 (Y3656 Cdc10-mCh) y su isogénica YGGR10 (*ptc1Δ* Cdc10-mCh) se cultivaron en YPD a 30 °C hasta la fase exponencial y se incubaron durante 6 horas adicionales a 38 °C. Las células se visualizaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala equivale a 5 μ m.

En su conjunto, estos resultados sugieren que en las células multigemadas del mutante *ptc1Δ* se produce un bloqueo en el ciclo celular de las células hijas, que conlleva una redistribución anómala de las septinas que conforman su anillo, las cuales en lugar relocalizarse en un nuevo sitio de gemación, pasan a distribuirse constituyendo puntos que no forman parte de la dinámica habitual de las septinas.

2.10. Los mutantes *ptc1Δ* no muestran alteraciones en la localización de Slt2

Está descrito que la localización de Slt2 es fundamentalmente nuclear, aunque esta MAPK también se encuentra en la parte apical de las yemas emergentes y entre la célula madre y la hija al final de la mitosis (van Drogen y Peter, 2002). Teniendo en cuenta que a lo largo de este trabajo la actividad quinasa de Slt2 ha demostrado ser determinante en muchas de las alteraciones observadas en el mutante *ptc1Δ* sometido a estrés térmico y que esta MAPK se localiza en el septo en el momento previo a la separación celular, nos preguntamos si, al igual que sucede con las septinas, Slt2 podría estar sufriendo alteraciones en su localización en las células multigemadas objeto de estudio. Con el fin de profundizar en la dinámica de localización de Slt2 en células carentes de Ptc1, se construyeron cepas de fondo genético WT y *ptc1Δ* que expresaban Slt2 fusionada en el extremo C-terminal a la proteína verde fluorescente *mNeonGreen* (mNG) a partir de su promotor nativo y en su propio locus cromosómico. Estas cepas también expresaban, bajo su locus endógeno, la septina Cdc10 etiquetada de la misma manera con la proteína roja fluorescente mCh. Tal y como se puede observar en la [Figura 29A](#), en la cepa silvestre, Slt2-mNG se encontró predominantemente en el núcleo a lo largo de todo el ciclo celular. Además, se vio que durante la selección del sitio de gemación (fase G1), Slt2-mNG se localizaba de manera polarizada junto a las septinas, concretamente en el hueco que queda en el interior del anillo que estas últimas forman. Durante la fase S, Slt2-mNG se mantuvo en la parte apical de las yemas cuando éstas eran de pequeño tamaño. Sin embargo, esta localización polarizada se perdió durante las fases G2 y M, en las que Slt2-mNG se encontraba exclusivamente en el interior del núcleo. En la citoquinesis, cuando el anillo de septinas ya se había escindido en dos, Slt2-mNG se encontró concentrada entre ambos ([Figura 29A](#)). Finalmente, se vio que, durante la disociación celular, Slt2-mNG co-localizaba con el anillo de septinas del lado de la célula madre ([Figura 29A](#)).

Para determinar con mayor exactitud la localización de Slt2-mNG con respecto al anillo de septinas en el septo, se midió la intensidad de fluorescencia emitida por Cdc10-mCh (rojo) y Slt2-mNG (verde) durante la mitosis (M) y la citoquinesis en un segmento trazado de manera perpendicular al plano de división celular ([Figura 29A](#)).

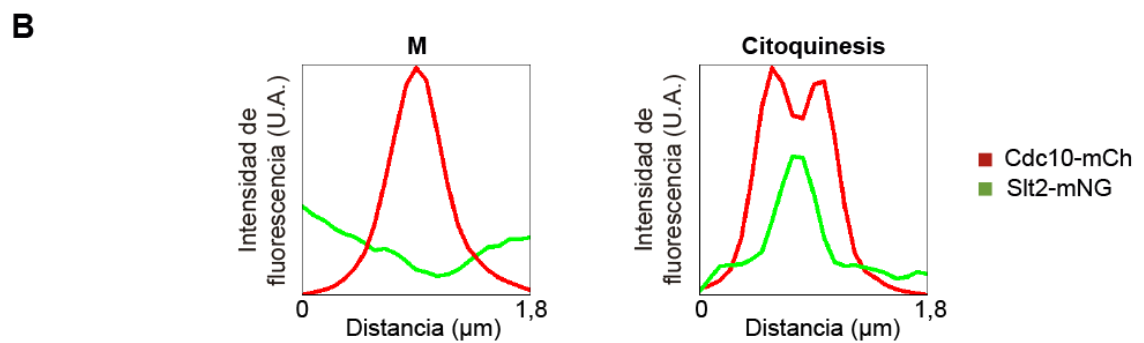
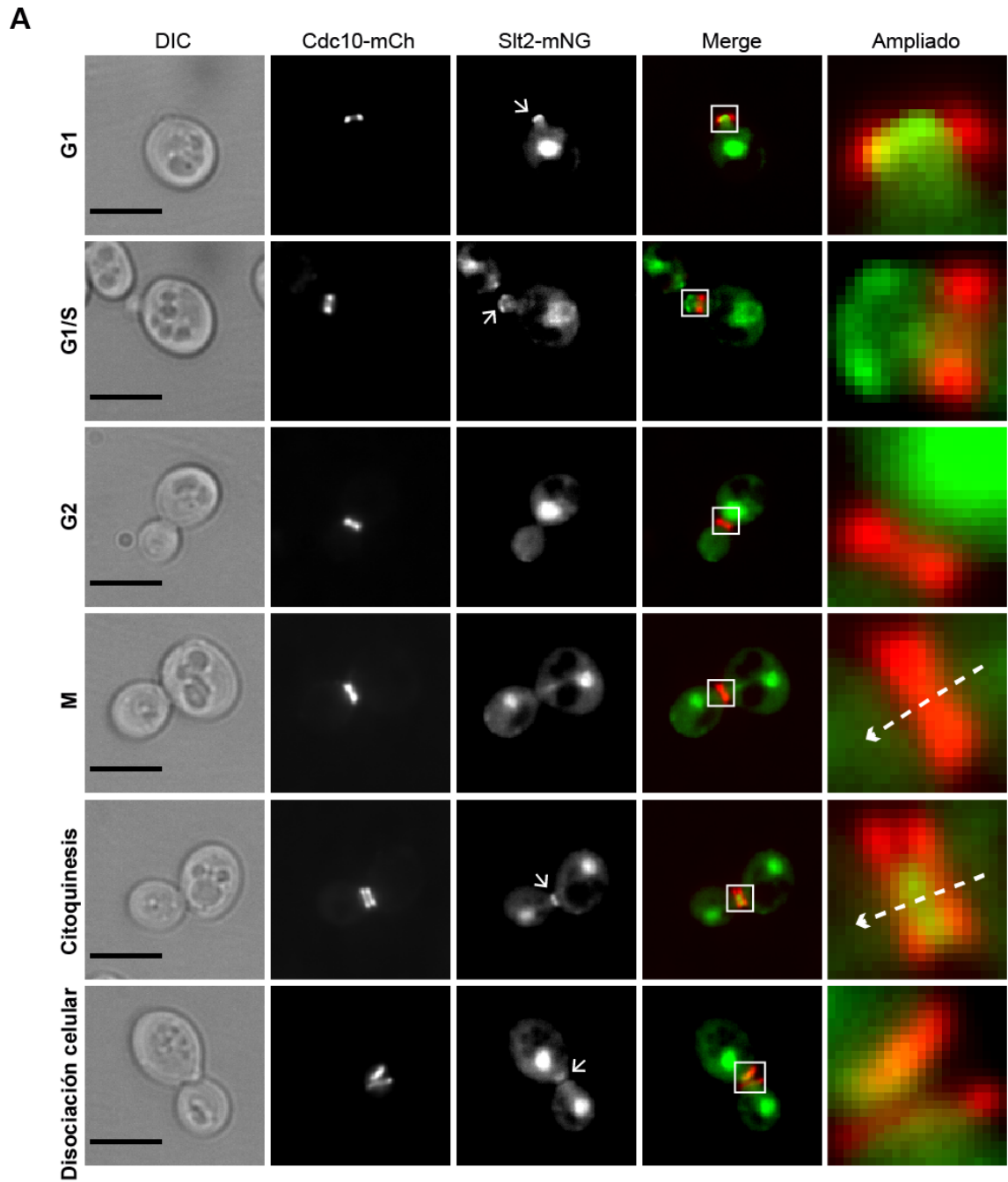


Figura 29. Análisis de la localización de Slit2-mNG y de la septina CDC10-mCh a lo largo del ciclo celular. (A) La cepa WT expresando Slit2-mNG y Cdc10-mCh (YGGR17) se cultivó en YPD hasta la

fase exponencial. Las células se visualizaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala se corresponde con 5 μm . **(B)** Representación gráfica, en las fases de mitosis (M) y de citoquinesis, de la intensidad de la fluorescencia (en unidades arbitrarias ,U.A) emitida por Cdc10-mCh (rojo) y por Slt2-mNG (verde), medida en un plano perpendicular al eje de división celular que se indica, mediante flechas blancas, en las imágenes ampliadas en (A). La flecha indica el sentido en el que se hizo la cuantificación, desde la célula madre hacia la hija.

Este análisis confirmó que, durante la mitosis, cuando las septinas se encontraban formando la estructura de reloj de arena, Slt2-mNG no estaba presente en el septo (**Figura 29B**, panel izquierdo). Sin embargo, durante la citoquinesis, se observó un incremento en la señal de fluorescencia emitida por Slt2-mNG en la zona comprendida entre los dos anillos de septinas, donde la intensidad emitida por Cdc10-mCh disminuía (**Figura 29B** panel derecho). Estos resultados, además de poner de manifiesto la implicación de Slt2 en las primeras etapas de emergencia de la yema (fases G1 y S) y en el momento de la síntesis del septo (citoquinesis), sugieren que la MAPK de la ruta de integridad celular podría estar involucrada, de alguna que aún se desconoce, en la separación celular.

Una vez estudiada la dinámica de localización de Slt2-mNG con respecto a las septinas a lo largo del ciclo celular en la cepa WT, se procedió al estudio de ésta en las células carentes de Ptc1 cultivadas en condiciones de estrés térmico. En las células multigemadas del mutante *ptc1 Δ* , Slt2-mNG se encontró fundamentalmente en el núcleo, así como en la zona de emergencia de la yema (**Figura 30A**, panel I) y entre los dos anillos de septinas (**Figura 30A**, panel II), al igual que se había observado en la cepa silvestre. Resulta interesante destacar que no se vio señal de Slt2-mNG junto al anillo de septinas que permanecía ensamblado de manera anómala en las células hijas antiguas. Slt2-mNG tampoco se localizaba entre los dos anillos de septinas cuando el del lado de la célula madre estaba ya parcialmente desensamblado (**Figura 30A**, panel III). La medida de la intensidad de fluorescencia de Cdc10-mCh con respecto a la de Slt2-mNG en el septo corroboró que, cuando el anillo de septinas se encontraba escindido en dos y la intensidad de fluorescencia procedente de los dos anillos de septinas era similar, se observaba un pico de fluorescencia de Slt2-mNG en la zona comprendida entre ambos (**Figura 30B**, panel izquierdo). Sin embargo, cuando el anillo de septinas se encontraba dividido en dos pero la intensidad de fluorescencia procedente del de la madre era menor, no se observó un incremento en la señal de Slt2-mNG entre ambos (**Figura 30B**, panel derecho). Estos resultados indican que las células multigemadas del mutante *ptc1 Δ* no muestran alteraciones patentes en la dinámica de localización de Slt2 y sugieren que, tras la citoquinesis, existe una sincronización, se desconoce si coordinada o no, entre la reabsorción del anillo de septinas y la desaparición de Slt2-mNG del septo.

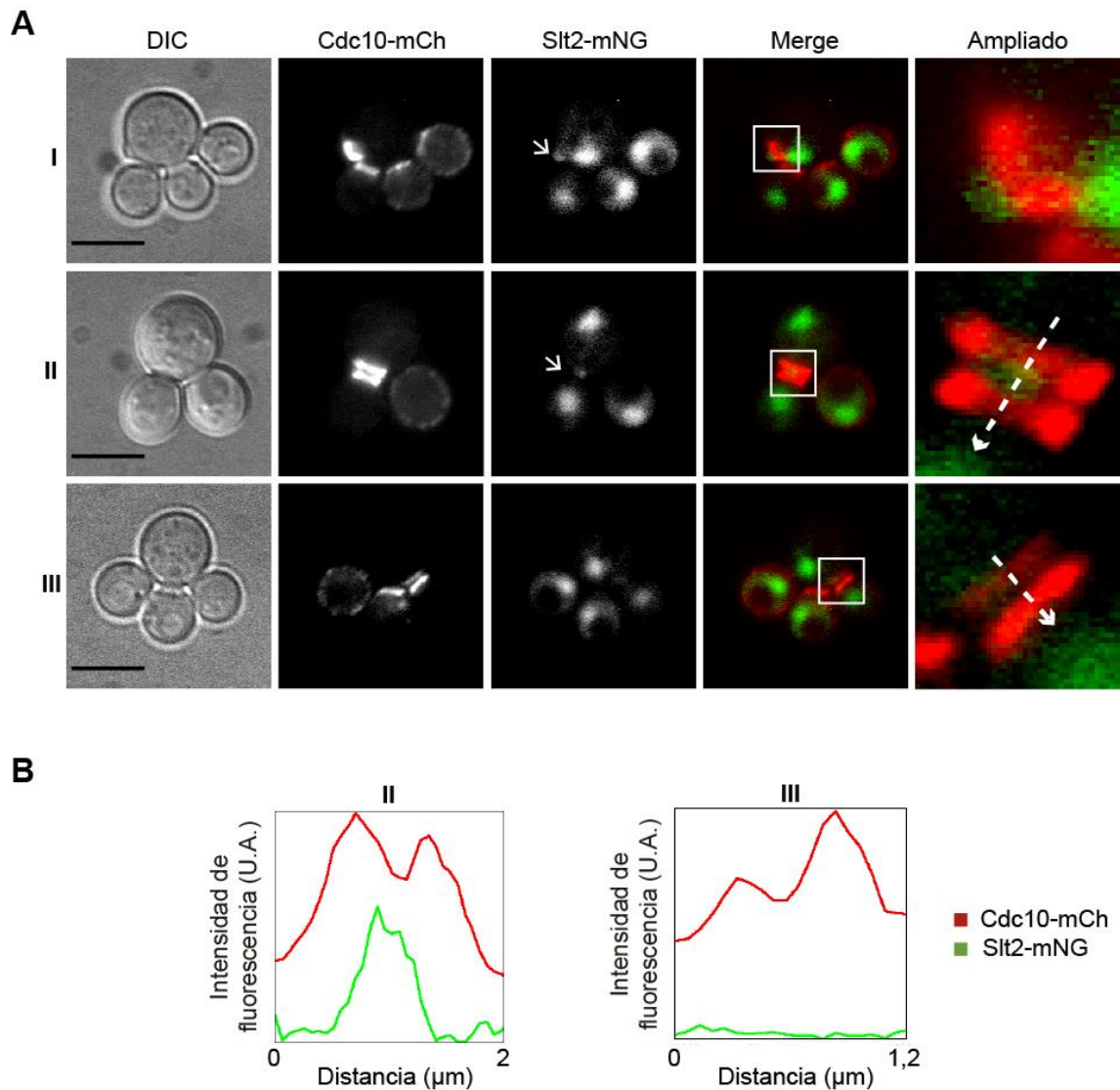


Figura 30. Análisis de la localización de Slt2-mNG y de la septina CDC10-mCh en el mutante *ptc1Δ*. (A) La cepa *ptc1Δ* expresando Slt2-mNG y Cdc10-mCh (YGGR18) se cultivó en YPD hasta la fase exponencial y se incubó durante 6 horas adicionales a 38 °C. Las células se visualizaron mediante microscopía de contraste diferencial (DIC) y de fluorescencia. La barra de escala se corresponde con 5 μm. (B) Representación gráfica de la intensidad de la fluorescencia (en unidades arbitrarias, U.A.) emitida por Cdc10-mCh (rojo) y por Slt2-mNG (verde), medida en un plano perpendicular al eje de división celular que se indica, mediante flechas blancas, en la imagen ampliada en (A) de los paneles II y III. La flecha indica el sentido en el que se hizo la cuantificación, desde la célula madre hacia la hija.

2.11. Los defectos en la separación celular del mutante *ptc1Δ* no se deben a un bloqueo de la ruta RAM

El hecho de que en las células multigemadas del mutante *ptc1Δ* sean solamente las hijas las que presentan problemas en el desensamblaje del anillo de septinas e incapacidad para iniciar un nuevo ciclo, sugería que el fenotipo de multigemación se produce por un bloqueo en el ciclo celular específico de la yema que impide su separación. Teniendo en cuenta que la separación celular es un proceso asimétrico

orquestrado desde las células hijas, se decidió analizar si el fenotipo de multigemación del mutante *ptc1Δ* se debe a la existencia de anomalías en la síntesis y/o localización de proteínas clave para este proceso. La separación celular depende de la activación de la ruta RAM, y de la consiguiente entrada del factor de transcripción Ace2 al núcleo de la célula hija (Weiss, 2012). Con el objetivo de determinar si existía un fallo en la activación de la ruta RAM, se analizó la localización de la proteína Ace2 en las células multigemadas del mutante *ptc1Δ*. Para ello, se construyó una cepa carente de *PTC1* que expresaba, bajo el control de su propio promotor, Ace2 fusionada en el extremo C-terminal a la proteína fluorescente mNG e integrada en su locus nativo. Esta cepa también expresaba, desde su locus endógeno, la septina Cdc10-mCh. Se llevó a cabo la observación microscópica, prestando especial atención a las células que se encontraban en la fase del ciclo en la que el anillo de septinas se encontraba dividido en dos, y se vio que, de acuerdo con lo descrito en la bibliografía para las células silvestres (Saputo *et al.*, 2012), en las células multigemadas *ptc1Δ*, Ace2-mNG se encontraba en el núcleo de célula hija que había surgido en último lugar, cuando ésta se encontraba en fase de citocinesis (Figura 31A).

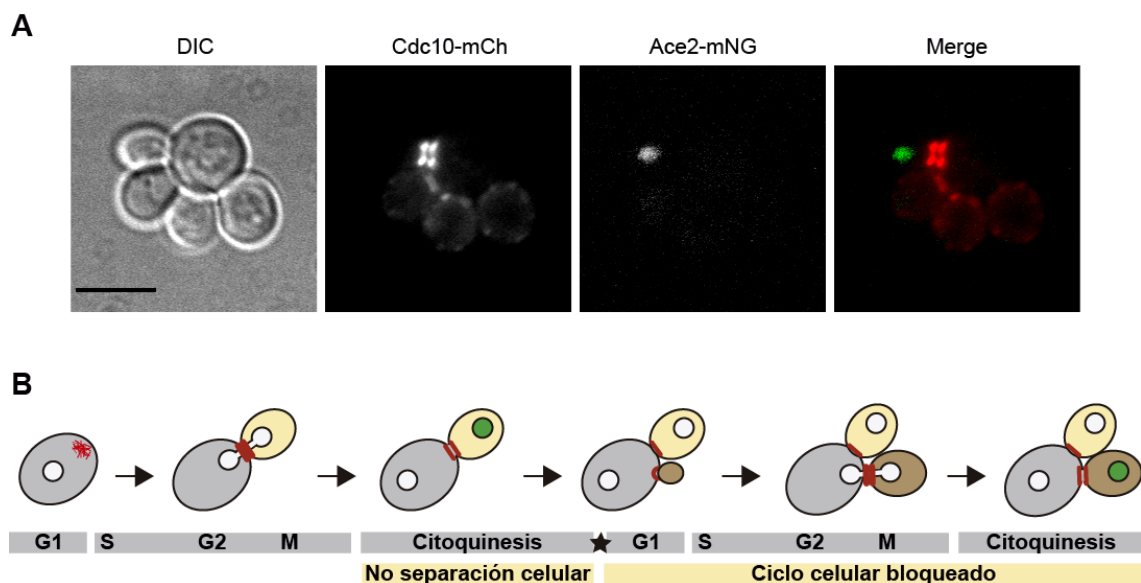


Figura 31. Análisis de la localización de Ace2-mNG y de la septina Cdc10-mCh en las células multigemadas del mutante *ptc1Δ*. (A) La cepa *ptc1Δ* expresando Ace2-mNG y Cdc10-mCh (YGGR16) se cultivó en YPD a 30 °C hasta la fase exponencial y durante 6 horas adicionales a 38 °C. Las células se visualizaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra de escala se corresponde con 5 μ m. (B) Diagrama que representa el patrón de localización de las septinas (rojo) y de Ace2 (verde) en las células multigemadas del mutante *ptc1Δ*. Se muestran las etapas de dos ciclos celulares en una célula madre (gris), en los que la estrella marca el comienzo de un nuevo ciclo. Las células hijas se representan, por orden de aparición, con los colores amarillo y marrón, respectivamente. El núcleo celular está representado en color blanco.

Sin embargo, en las células hijas más antiguas, que son aquéllas en las que el anillo de septinas del lado de la célula madre se ha reabsorbido, ya no existía señal de Ace2-mNG (Figura 31A). Esta dinámica entre Ace2 y la organización de las septinas a lo largo del ciclo celular del mutante *ptc1Δ* se muestra esquematizada en la Figura 31B. Los resultados ponen de manifiesto que la salida del núcleo de Ace2 no está supeditada a que se produzca una separación celular efectiva. Asimismo, indican que los defectos en la separación celular que muestra el mutante *ptc1Δ* a 38 °C no se deben a un bloqueo en la activación de la ruta RAM y sugieren que este fenotipo de multigemación se desarrolla como consecuencia de alteraciones en procesos que, siendo fundamentales para la separación celular, suceden con posterioridad a la entrada de Ace2 en el núcleo de la célula hija.

2.12. Las células multigemadas del mutante *ptc1Δ* no muestran quitinasa Cts1 en el septo

Tras la entrada de Ace2 en el núcleo de la célula hija, este factor de transcripción regula la expresión de los genes que codifican las principales proteínas encargadas de la degradación del septo, dentro de las que destaca la endoquitinasa Cts1, y de otros que también forman parte del programa genético específico de la célula hija, tales como *DSE1* (Weiss, 2012). Con el fin de determinar si los defectos en la separación celular del mutante *ptc1Δ* se debían a alteraciones en procesos que suceden con posterioridad a la entrada de Ace2 en el núcleo, en este trabajo se analizó la síntesis y localización de Dse1 y de Cts1 en las células multigemadas *ptc1Δ* en comparación con la cepa silvestre. Para ello, se construyeron, a partir del fondo WT o *ptc1Δ*, cepas que expresaban versiones de estas proteínas fusionadas en el extremo C-terminal a mNG desde sus loci cromosómico y bajo el control de su propio promotor. En el genoma de estas cepas también se integró en su propio locus el gen codificante de la septina Cdc3 fusionada a mCh. Estas cepas se cultivaron a 30 y a 38 °C y se analizó mediante microscopía de fluorescencia la localización de Dse1-mNG y de Cts1-mNG en células en las que el anillo de septinas se encontraba dividido en dos. El mutante *ptc1Δ* no mostró diferencias con respecto a la cepa WT en la localización de Dse1-mNG a ninguna de las dos temperaturas ensayadas. Tal y como está descrito (Frydlova *et al.*, 2009), esta proteína se encontró junto al septo en el lado de la célula hija (Figura 32A).

Con respecto a la endoquitinasa Cts1-mNG, en los cultivos incubados a 30 °C tanto de la cepa silvestre como del mutante *ptc1Δ*, ésta se encontró localizada en la vacuola de la célula hija y en el septo de las células que estaban en la fase de citoquinesis (Figura 32B).

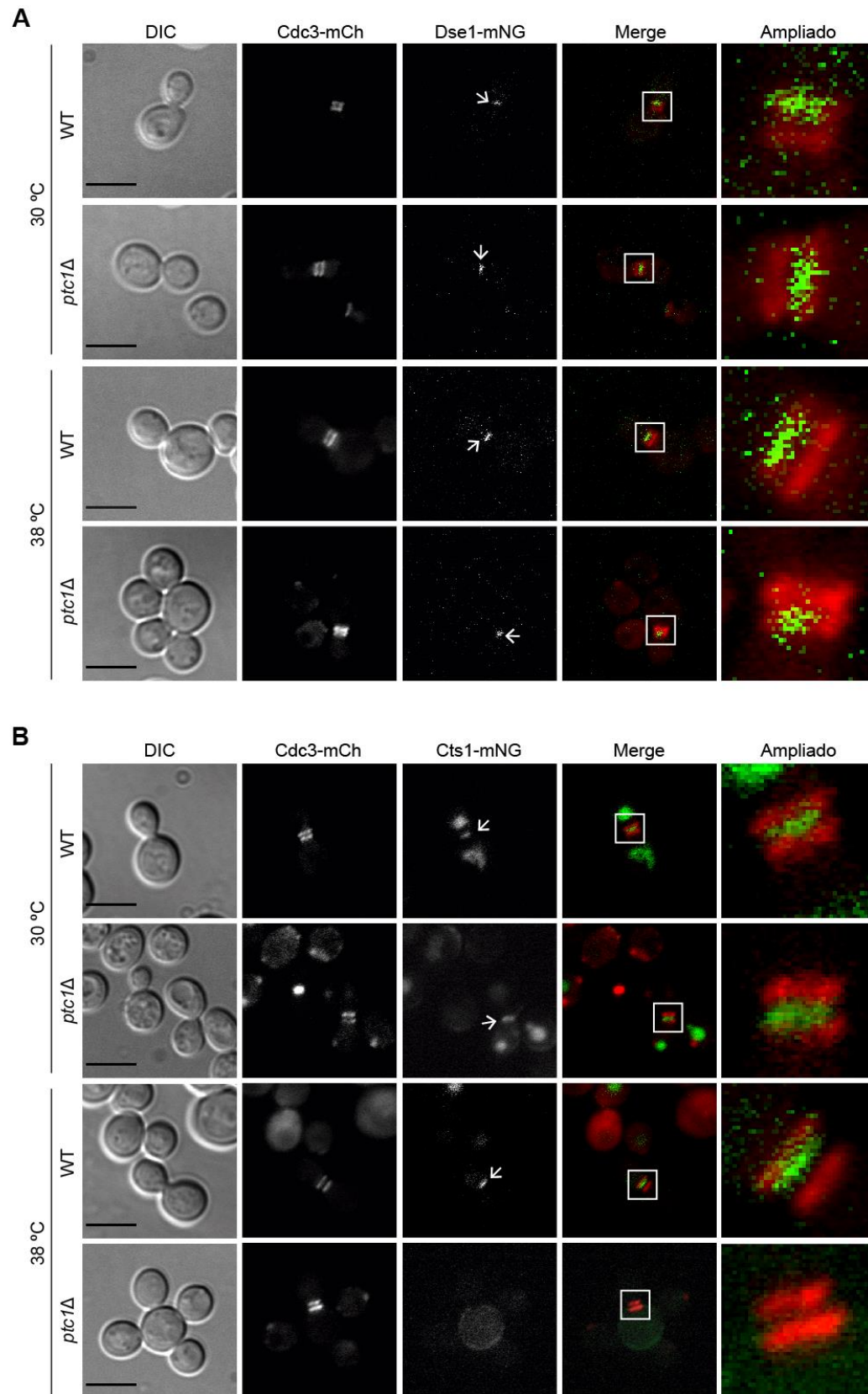


Figura 32. Análisis del efecto de la delección de *PTC1* sobre la localización de Dse1-mNG y de Cts1-mNG. (A) Las cepas YGGR54 (*DSE1-mNG CDC3-mCh*) y YGGR55 (*ptc1Δ DSE1-mNG CDC3-mCh*) se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se incubaron durante 6 horas adicionales a 30 o a 38 °C. Las células se visualizaron mediante microscopía DIC y de fluorescencia. La barra

de escala se corresponde con 5 μm . (B) Las cepas YGGR58 (*CTS1-mNG, CDC3-mCh*) y YGGR59 (*ptc1 Δ CTS1-mNG, CDC3-mCh*) se cultivaron y se analizaron mediante microscopía en las mismas condiciones que en (A). La barra de escala se corresponde con 5 μm .

Aunque en la cepa WT a 38 °C la señal de fluorescencia de Cts1-mNG fue menos intensa, ésta siguió manteniendo su locación habitual en el septo de las células que tenían el anillo de septinas dividido en dos (Figura 32B). Sin embargo, llama la atención que cuando el mutante *ptc1 Δ* se incubó a 38 °C, las hijas de las células multigemadas no mostraron señal de fluorescencia de Cts1-mNG entre los dos anillos de septinas (Figura 32B). Estos resultados sugieren que los defectos en la separación celular que sufre el mutante *ptc1 Δ* podrían deberse, al menos en parte, a la ausencia de esta endoquitinasa en el septo.

2.13. El mutante *ptc1 Δ* muestra un incremento en la actividad autofágica

Como se ha comentado en el apartado 2.9, en las células hijas del mutante *ptc1 Δ* que muestran defectos en la separación celular, las septinas que constituyen el anillo del septo se desensamblan con retraso y su reabsorción va acompañada de la aparición de unas estructuras punteadas que se distribuyen por toda la célula y que no forman parte de la dinámica habitual de las septinas (Figura 28). Recientemente se ha descrito que, en condiciones de inducción de la autofagia, en levaduras cuya división celular está bloqueada, las septinas se desplazan desde el cuello de la yema para formar puntos citosólicos y anillos no canónicos que, al interaccionar físicamente con proteínas que intervienen en la formación de los autofagosomas, tales como Atg8 y Atg9, podrían estar participando en las primeras etapas de la autofagia (Barve *et al.*, 2018a; Barve *et al.*, 2018b). Con el objetivo de determinar si en el mutante *ptc1 Δ* sometido a estrés térmico estaba inducida la autofagia, ésta se monitorizó empleando un método basado en la proteína Atg8 fusionada en el extremo N-terminal a GFP. En condiciones de inducción de la autofagia, GFP-Atg8 sufre una proteólisis y como consecuencia de ésta se libera el GFP, que se va acumulando en la vacuola (Nair *et al.*, 2011). De esta manera, para determinar la actividad autofágica, se analizó mediante *Western blotting* la liberación de GFP en extractos celulares de las cepas WT y *ptc1 Δ* transformadas con un plásmido que expresaba GFP-Atg8 (Suzuki *et al.*, 2001) e incubadas a 38 °C. Como control positivo de inducción de la autofagia se incluyó el extracto celular de un cultivo al que se le había añadido rapamicina (Yorimitsu *et al.*, 2007). Tal y como se puede observar en la Figura 33A, el extracto celular procedente del mutante *ptc1 Δ* mostró un incremento de casi cinco veces en la cantidad de GFP liberado con respecto a la cepa silvestre, si bien el nivel fue muy inferior al liberado en el cultivo tratado con rapamicina.

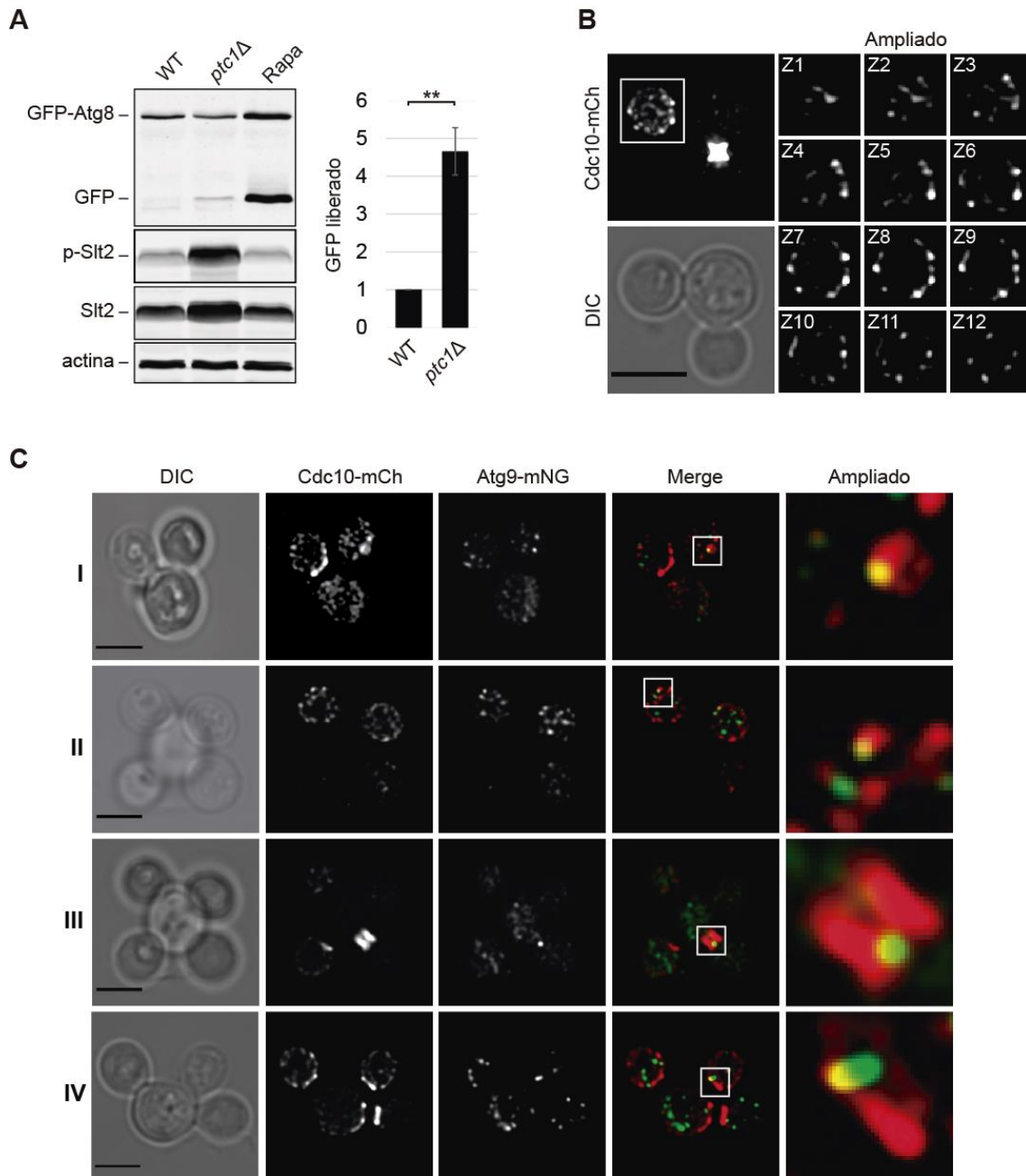


Figura 33. Análisis de la actividad autofágica y de su relación con la dinámica de septinas en el mutante *ptc1Δ*. (A) La cepa Y3656 (WT) y su mutante isogénico YSTH14 () transformadas con el plásmido pRS316 [GFP-Atg8] se cultivaron en YPD hasta la fase exponencial y se incubaron durante 6 horas adicionales a 38 °C o en presencia de 0,2 μg/mL de rapamicina (Rapa). Los extractos celulares se analizaron mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-GFP (JL8), anti-phospho-p44/42 MAPK 4370 (p-Slt2), anti Mpk1 (Slt2) y anti-actina como control de carga. Se muestra un ensayo representativo de tres experimentos distintos (izquierda) y un gráfico de barras del GFP liberado (derecha), que fue calculado dividiendo la intensidad de fluorescencia del GFP libre (GFP) entre la total de GFP (GFP-Atg8+GFP) y normalizándolo frente a la cepa WT. Las barras de error representan la desviación estándar de tres experimentos diferentes. El asterisco (**) indica un valor $p < 0,01$, calculado mediante la prueba t de *Student*. (B) La cepa YGGR45 (*ptc1Δ CDC10-mCh, ATG9-mNG*) fue cultivada en las mismas condiciones que en (A) y analizada mediante microscopía láser confocal. La imagen superior izquierda se corresponde con secciones Z1-Z12 combinadas en un *Stack*. El cuadrado blanco marca la zona ampliada, que

se muestra a la derecha como imágenes deconvolucionadas de secciones Z individuales. La barra de escala equivale a 5 μm . (C) Las cepas WT YGGR43 (*CDC10-mCh*, *ATG9-mNG*) y su mutante isogénico YGGR45 (*ptc1 Δ CDC10-mCh*, *ATG9-mNG*) fueron cultivadas en las mismas condiciones que en (A) y analizadas mediante microscopía láser confocal. La barra de escala equivale a 5 μm .

Posteriormente se analizó si estas estructuras punteadas de septinas se localizaban junto a los autofagosomas. Para ello, se construyó una cepa que expresaba, bajo el control de su promotor nativo y desde su propio locus cromosómico, la proteína autofágica Atg9 fusionada en el extremo C-terminal a mNG. Esta cepa también expresaba la septina Cdc10 fusionada de la misma manera a la proteína *mCherry*. Las células se cultivaron a 38 °C y se analizaron mediante microscopía confocal de fluorescencia. El análisis de estas imágenes permitió, en primer lugar, caracterizar con mayor precisión la arquitectura anómala de las septinas. De esta manera, se observó que las estructuras punteadas de septinas presentes en las células hijas del mutante *ptc1 Δ* se localizaban mayoritariamente en su región cortical (Figura 33B). Asimismo, se detectaron estructuras de septinas en forma de anillos deslocalizados y aparentemente más pequeños que los canónicos (Figura 33C, panel I). Cuando se analizó en paralelo la localización de la septina Cdc10-mCh y de la proteína autofágica Atg9-mNG, se encontró co-localización en algunas de las estructuras punteadas de septinas corticales y de los anillos no canónicos (Figura 33C, paneles I y II). Atg9-mNG también se encontró junto a algunos anillos de septinas canónicos, tanto cuando estos se encontraban en la conformación de reloj de arena (Figura 33C, panel III) como en los anillos de las células hijas que mostraban retraso en el desensamblaje (Figura 33C, panel IV). Estos resultados indican que en el mutante *ptc1 Δ* sometido a estrés térmico existe inducción de la autofagia, y apoyan la idea de que las septinas podrían intervenir, de alguna manera que aún se desconoce, en este proceso. Además, el hecho de que las estructuras inusuales de septinas se encuentren solamente en las células hijas sugiere que es en éstas, y no en la madre, donde existe una mayor actividad autofágica.

2.14. La actividad quinasa de Slt2 inhibe la ruta TORC1-Sch9

Numerosos estudios demuestran que en condiciones normales de crecimiento TORC1 inhibe la autofagia y que la inactivación de TORC1 contribuye al incremento de la actividad autofágica (Noda, 2017). Uno de los sustratos de TORC1 responsables de esta regulación es Sch9, que se activa por fosforilación (Urban *et al.*, 2007), de tal manera que es el estado no fosforilado e inactivo de Sch9 el que provoca la inducción de la autofagia (Yorimitsu *et al.*, 2007). Con el objetivo de determinar si el incremento en la actividad autofágica, así como el bloqueo en la progresión del ciclo celular, observados en el mutante *ptc1 Δ* podrían ser debidos a una inactivación de la ruta TORC1-Sch9, en este trabajo se analizó el estado de activación de Sch9. Para ello, las

cepas WT y *ptc1Δ* se transformaron con un plásmido que expresaba Sch9 fusionado en el extremo C-terminal a 5 copias del epítipo HA (Urban *et al.*, 2007) y se cultivaron en presencia y en ausencia de estrés térmico. Se sabe que la fosforilación de Sch9 disminuye en células tratadas con rapamicina y se incrementa en presencia de dosis subletales de cicloheximida (CHX) (Urban *et al.*, 2007), por lo que estos compuestos se utilizaron como controles de activación de Sch9, negativo y positivo, respectivamente. El análisis mediante *Western blotting* de los extractos celulares permitió determinar el estado de fosforilación y, por lo tanto, de activación de Sch9. Tal y como cabía esperar, el tratamiento de la cepa silvestre con rapamicina mantuvo a Sch9 en su estado no fosforilado, mientras que la cicloheximida dio lugar a la aparición de bandas de Sch9-5HA de menor movilidad electroforética, correspondientes a formas fosforiladas de esta proteína (Figura 34A, carriles 1 y 2). Asimismo, se observó que, aunque la cepa WT incubada a 30 °C ya mostraba cierta activación de Sch9, el cultivo a 38 °C provocó un incremento mayor en la fosforilación de esta proteína (Figura 34A, carriles 3 y 5). Estos resultados ponen de manifiesto que cuando *S. cerevisiae* se incubaba a 38 °C sufre una activación de la ruta TORC1-Sch9. Por el contrario, las células carentes de Ptc1 no mostraron un incremento en la fosforilación de Sch9 a ninguna de las dos temperaturas ensayadas (Figura 34A, carriles 4 y 6), siendo en estos casos la movilidad de la proteína muy similar a la de las células WT tratadas con rapamicina (Figura 34A, carril 2).

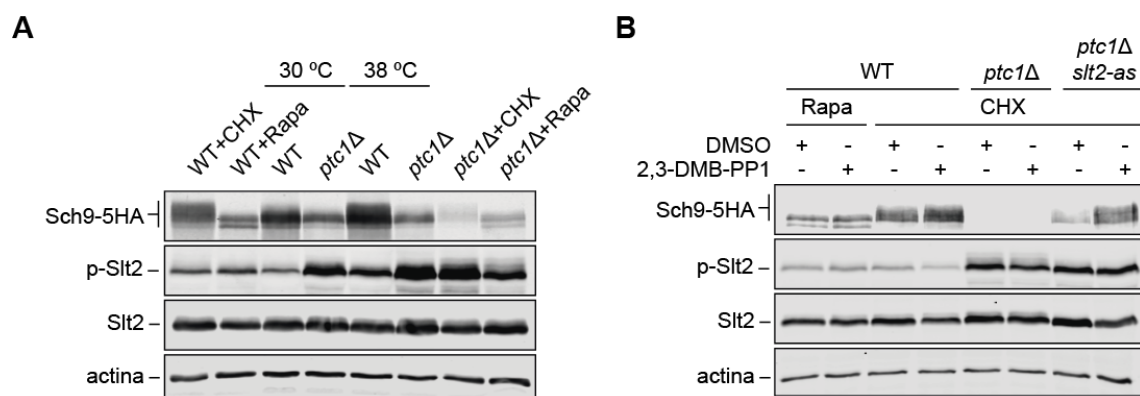
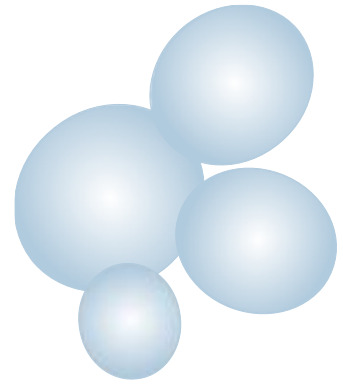


Figura 34. Análisis del estado de activación de la ruta TORC1-Sch9. (A) Extractos celulares de las cepas Y3656 (WT) y de su mutante isogénico YSTH14 (*ptc1Δ*) transformadas con el plásmido pRS416 *SCH9-5HA* fueron incubadas en YPD hasta la fase exponencial y cultivadas durante 6 horas adicionales en presencia de 25 µg/mL cicloheximida (CHX), 0,2 µg/mL rapamicina (Rapa), a 30 o a 38 °C, según se indica, y analizados mediante *Western blotting* con los anticuerpos anti-HA, anti-phospho-p44/42 MAPK 4370 (p-Slt2), anti Mpk1 (Slt2) y anti-actina como control de carga. (B) Extractos celulares de las cepas Y3656 (WT) y de sus mutantes isogénicos YSTH14 (*ptc1Δ*) y YGGR19 (*ptc1Δ slt2-as*) transformadas con el mismo plásmido que en (A) fueron incubadas en YPD hasta la fase exponencial y cultivadas durante 6 horas adicionales en presencia de 0,2 µg/mL rapamicina (Rapa) o de 25 µg/mL cicloheximida (CHX) y de 5 µM 2,3-DMB-PP1 o de 0,16 % DMSO (control negativo de inhibición), según se indica y analizados mediante *Western blotting* con los mismos anticuerpos que en (A). Tanto en (A) como en (B) se muestra un ensayo representativo de tres experimentos distintos.

Además, llamó la atención que en el mutante *ptc1Δ* sometido a cualquiera de los tratamientos ensayados, la cantidad total de proteína Sch9 fue en todos los casos inferior a los niveles mostrados por la cepa WT bajo el mismo tratamiento (Figura 34A). De especial interés resultó el tratamiento del mutante *ptc1Δ* con cicloheximida. Ésta, que actúa como inhibidor de la síntesis proteica, redujo la cantidad de Sch9 hasta niveles prácticamente inapreciables (Figura 34A). Estos resultados aportan una evidencia clara de que la ausencia de Ptc1 provoca defectos en la activación y en la estabilidad de Sch9 y sugieren la implicación de esta fosfatasa en la regulación de la ruta TORC1-Sch9.

Teniendo en cuenta que muchas de las alteraciones fenotípicas mostradas por el mutante *ptc1Δ* se deben a una hiperactivación de la MAPK Slt2, se decidió determinar el efecto que tenía la inhibición específica de Slt2-as sobre la cantidad de Sch9 y sobre su estado de fosforilación. Para ello se analizaron mediante *Western blotting* los extractos celulares de las cepas WT, *ptc1Δ* y *ptc1Δ slt2-as* transformadas con el plásmido que expresa Sch9-5HA y tratadas con CHX en presencia o no del inhibidor de quinasas 2,3-DMB-PP1. Tal y como cabía esperar, la adición del inhibidor en los cultivos de las cepas WT y *ptc1Δ* no provocó cambios con respecto a lo observado en los cultivos sin inhibidor, que fue coincidente con lo mostrado en la Figura 23A. Así, en la cepa WT la rapamicina mantuvo a Sch9-HA en un estado no fosforilado, mientras que la CHX dio lugar a la aparición de bandas fosforiladas de menor movilidad electroforética (Figura 34B, carriles 2 y 4). Asimismo, el tratamiento con CHX de la cepa *ptc1Δ* produjo una reducción en la cantidad de Sch9-HA hasta niveles indetectables, tanto en presencia como en ausencia del inhibidor de quinasas (Figura 34B, carriles 5 y 6). Sin embargo, la adición de 2,3-DMB-PP1 en la cepa *ptc1Δ slt2-as* provocó un incremento notable en los niveles de Sch9-HA, la cual se encontraba en estado fosforilado (Figura 34B, carril 8). Estos resultados indican que la inhibición específica de la actividad quinasa de Slt2 reduce los problemas de fosforilación y de estabilidad que presenta Sch9 en células carentes de Ptc11, y revelan un nuevo papel de la MAPK de la ruta de integridad celular como reguladora de la ruta TORC1-Sch9.



DISCUSIÓN

La fosforilación de proteínas es la modificación postraducciona más frecuente que tiene lugar en las células eucarióticas. Se trata de un proceso reversible, que puede alterar la estructura, la función, la localización, las interacciones moleculares y la degradación de las proteínas (Nishi *et al.*, 2014), por lo que resulta de vital importancia para la regulación de procesos esenciales, tales como la síntesis proteica, la división celular o la transducción de señales, en los que muchas de las enzimas implicadas se activan o se inhiben mediante eventos de fosforilación o desfosforilación llevados a cabo por quinasas y fosfatasas específicas (Ardito *et al.*, 2017). Las rutas de señalización en las que operan las MAPKs son extremadamente complejas, por lo que descifrar la manera en la que se regula su activación, así como las consecuencias que tiene una desregulación de estas, puede ayudar a comprender mejor su función, así como en general los mecanismos que regulan el comportamiento de las células eucariotas y, por ende, llegar a ser capaces de predecirlo.

1. CAPÍTULO I. Caracterización de las formas monofosforiladas en T190 y en Y192 del motivo de activación TEY de Slt2: jerarquía de activación e implicaciones en su actividad

En la primera parte de este trabajo, hemos avanzado en la caracterización de los mecanismos de activación a través de la ruta CWI a nivel de la MAPK Slt2, gracias al uso combinado de anticuerpos específicos para los sitios de fosforilación del motivo TEY, junto con la técnica *Phos-tag*. Además de poner a punto herramientas metodológicas que permiten monitorizar la abundancia de las diferentes formas fosforiladas de Slt2 que coexisten en la célula, hemos profundizado en el conocimiento de esta MAPK en los siguientes aspectos: (i) el impacto que tienen las fosforilaciones individuales del motivo TEY sobre la actividad de Slt2, (ii) el orden en el que suceden los eventos de fosforilación y desfosforilación dentro de su motivo TEY, (iii) el estado de fosforilación en el que se tiene que encontrar Slt2 para poder interaccionar con algunos de sus reguladores y (iv) la relevancia funcional que tienen otros dominios y residuos conservados en Slt2, diferentes al motivo de activación TEY.

1.1. La fosforilación como modificación reguladora clave de la actividad de Slt2

Está ampliamente aceptado que la activación de la ruta CWI se correlaciona con un incremento en los niveles de fosforilación de Slt2 (Martín *et al.*, 2000). Es por eso por lo que, para evaluar la actividad de esta MAPK, de manera rutinaria se emplean anticuerpos comerciales que detectan las formas doblemente fosforiladas en el motivo TEY de las ERKs de mamíferos (Bardwell y Shah, 2006). Sin embargo, algunos de esos anticuerpos también se unen a las formas monofosforiladas de las ERKs, las cuales han

demostrado contribuir de manera diferente a la actividad de estas proteínas. A pesar de que en un análisis realizado *in vitro* con ERK2 se determinó que las dos formas monofosforiladas en el motivo TEY de esta MAPK mostraban un nivel de actividad intermedio entre la forma no fosforilada y la doblemente fosforilada (Zhou y Zhang, 2002), la mayoría de los trabajos realizados con MAPKs de mamíferos han señalado que solamente la forma monofosforilada en treonina presenta cierta actividad biológica (Sugden *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2008). Sucede lo mismo con Pmk1, el ortólogo de Slt2 en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* (Vázquez *et al.*, 2015). En este trabajo, utilizando versiones mutantes de Slt2 monofosforilables en cada uno de los residuos del motivo TEY hemos observado que, mientras que la forma monofosforilada en treonina es parcialmente activa, la monofosforilada en tirosina muestra una mínima actividad biológica, similar a la detectada en la forma catalíticamente inactiva Slt2-KD. Esta limitada actividad biológica de la forma monofosforilada en Y192 podría ser consecuencia del mantenimiento de cierta actividad quinasa residual o de la función no catalítica de Slt2. Además, hemos demostrado que, al contrario de lo que sucede con la versión silvestre de Slt2, el mutante monofosforilable en treonina es capaz de retrofosforilar a Mkk1 pero no a Mkk2, lo que parece indicar que las diferentes formas monofosforiladas pueden tener especificidades de sustrato distintas, al igual que sucede con p38 α (Mittelstadt *et al.*, 2009). Curiosamente, tanto usando el anticuerpo que reconoce la monofosforilación en la Y192 como mediante el análisis con Phostag, hemos observado que las versiones de Slt2 en las que la actividad catalítica está muy reducida, tales como Slt2^{T190A}, Slt2-KD y Slt2^{T195V}, muestran una hiperfosforilación en la Y192. Este hecho demuestra que un incremento en la señal de fosforilación es indicativo de la activación de la ruta CWI, pero no siempre se corresponde con un aumento en la actividad de la MAPK y pone en evidencia la importancia que tiene el discernir entre los diferentes estados de fosforilación de una MAPK mediante el empleo de anticuerpos que detectan diferentes fosforilaciones o, idealmente, de la técnica *Phos-tag*.

1.2. La proporción de las diferentes formas de fosforilación en el motivo TEY es característica de cada MAPK

Este trabajo supone la primera caracterización del estado de fosforilación de Slt2 mediante *Phos-tag*. Dicha técnica sí que se había empleado con anterioridad para analizar las diferentes formas fosforiladas de otras MAPKs presentes en *S. cerevisiae*. Así, en condiciones de activación de las correspondientes rutas, tanto en Hog1 como en Kss1 se ha detectado exclusivamente la presencia de la forma doblemente fosforilada (English *et al.*, 2015; Winters y Pryciak, 2018), mientras que en el caso de Fus3 se han identificado dos bandas de menor movilidad electroforética, una equivalente a las formas monofosforiladas y la otra a la doblemente fosforilada (Nagiec *et al.*, 2015). Sin

embargo, nuestros análisis de Slt2 mediante *Phos-tag* reflejan la existencia de tres bandas de menor movilidad electroforética, que se corresponden con la forma monofosforilada en la T190, con la monofosforilada en la Y192 y con la doblemente fosforilada. Llama la atención que, incluso en condiciones de estimulación de la ruta CWI, la proporción de Slt2 que se encuentra fosforilada es muy pequeña en relación a todo el conjunto de Slt2 presente en la célula. En cambio, los estudios realizados con Fus3 y con Kss1 indican que la cantidad total de proteína fosforilada es similar a la de no fosforilada (Nagiec *et al.*, 2015; Winters y Pryciak, 2018) mientras que, en el caso de Hog1, la totalidad de la MAPK se encuentra fosforilada en presencia de estrés osmótico (English *et al.*, 2015). La escasa proporción de Slt2 que se encuentra fosforilada, aún en condiciones de activación de la ruta CWI, sugiere que esta MAPK está actuando de una manera muy específica y localizada en determinadas regiones o compartimentos celulares. Sería interesante realizar estudios adicionales en los que se analizara, mediante *Phos-tag*, el estado de fosforilación de Slt2 estimulando la ruta CWI con otros estreses (Jiménez-Gutiérrez *et al.*, 2020) diferentes al rojo Congo, con el objetivo de identificar aquellos que generen unos niveles superiores de Slt2 fosforilada.

1.3. *Las fosforilaciones y desfosforilaciones en el dominio TEY de Slt2 se producen de manera secuencial y contribuyen de manera diferente a la actividad de esta MAPK*

En este estudio hemos mostrado que, en condiciones de activación de la ruta CWI, cuando está impedida la fosforilación de la T190 de Slt2, se produce un incremento en la acumulación de la forma monofosforilada en la Y192 con respecto a la versión silvestre. Este mismo comportamiento se ha descrito en los ortólogos de Slt2 y de Hog1 en *S. pombe*, Pmk1 y Sty1, respectivamente (Vázquez *et al.*, 2015). Sin embargo, al contrario de lo que sucede con estas MAPKs de la levadura de fisión, en las que los mutantes monofosforilables en tirosina muestran incrementada su asociación con sus correspondientes MAPKKs (Vázquez *et al.*, 2015), nuestros resultados demuestran que la hiperfosforilación que se produce en el residuo de Y192 del mutante Slt2^{T190A} no se debe a que las MAPKKs activadoras, Mkk1 y/o Mkk2, estén ejerciendo un efecto de captura sobre el mutante Slt2^{T190A}. Esta hiperfosforilación en la tirosina tampoco se puede atribuir a que la fosfatasa Msg5 muestre una actividad limitada sobre el residuo Y192 de Slt2^{T190A}. De hecho, nuestros resultados indican que esta fosfatasa de especificidad dual tiene preferencia por desfosforilar la fosfotirosina. En su conjunto, estos resultados sugieren que la fosforilación y la desfosforilación dual en el motivo TEY de Slt2 consiste en un mecanismo ordenado en el que la fosforilación de la Y192 puede considerarse como el primer paso necesario para amplificar la señal inducida por el estímulo, mientras que la fosforilación en la T190 es la que le dota de actividad a la MAPK. El hecho de que en ausencia de treonina se produzca una hiperfosforilación de

la tirosina sugiere que la treonina resulta fundamental para controlar el flujo de señalización y permitir una adaptación adecuada al estrés. Este mismo orden de fosforilación y/o desfosforilación se ha descrito en Hog1 (Choi *et al.*, 2008), en Pmk1 y Sty1 de *S. pombe* (Vázquez *et al.*, 2015) y en las MAPKs de mamíferos Erk1/2 (Haystead *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 2019; Zhao y Zhang, 2001) y p38 α (Humphreys *et al.*, 2013). Nuestros resultados refuerzan la idea de que las MAPKs se activan por un mecanismo secuencial conservado, cuyo orden tiene un significado biológico.

1.4. ¿Fosforilación distributiva o procesiva?

Los primeros estudios indicaron que la doble fosforilación de las MAPKs por parte de las MAPKKs tiene lugar a través de un mecanismo distributivo en dos pasos (Patwardhan y Miller, 2007). Sin embargo, un estudio posterior demostró que la MAPK de mamíferos ERK2 puede fosforilarse siguiendo un mecanismo al que denominaron “quasi-procesivo” en el cual, a pesar de que la MEK se disocia de la MAPK entre los dos eventos de fosforilación, la saturación molecular existente en las células en condiciones fisiológicas dificulta la difusión de ambas proteínas, por lo que las probabilidades que tiene la MEK de unirse a la misma molécula de ERK son muy elevadas (Aoki *et al.*, 2011). En el caso de las MAPKs de *S. pombe* Pmk1 y Sty1 (Vázquez *et al.*, 2015) y de Fus3 y Hog1 en *S. cerevisiae* (English *et al.*, 2015; Nagiec *et al.*, 2015) se ha sugerido que la fosforilación es procesiva. Considerando que, aún en condiciones de activación de la ruta CWI, la cantidad de Slt2 que se encuentra desfosforilada es muy superior a la fosforilada, asumimos que, en este caso, no hay una saturación de moléculas monofosforiladas en el interior celular. Bajo esta premisa, en el escenario de un mecanismo distributivo, la probabilidad de que las MAPKKs se unieran y fosforilaran a una molécula de Slt2 sin fosforilar sería muy superior a que lo hicieran sobre una molécula monofosforilada en tirosina, por lo que la proporción de la forma monofosforilada en tirosina sería mayor a la de la doblemente fosforilada. Sin embargo, si la fosforilación fuera procesiva, la cantidad de la forma doblemente fosforilada debería ser superior a la de la forma monofosforilada en tirosina, puesto que se asume que la segunda fosforilación, en la treonina, ocurre de manera más rápida que la primera (Nagiec *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que, en la cepa WT sometida a estrés, la cantidad de Slt2 doblemente fosforilada es superior a la de la forma monofosforilada en tirosina y que con los diferentes anticuerpos empleados se observa la misma dinámica de fosforilación en los residuos T190 y Y192, sugerimos que la activación de Slt2 por parte de Mkk1 y Mkk2 sigue un mecanismo procesivo.

1.5. Más allá del motivo TEY: otros residuos y dominios importantes para la activación y para la actividad de Slt2

En este trabajo también hemos obtenido información nueva acerca de cómo afectan determinados residuos y dominios de Slt2, diferentes al motivo TEY, a su activación y a su actividad, poniendo de manifiesto la complejidad de la regulación de esta MAPK. A pesar de que está descrito que el dominio CD de las ERKs es crucial para su unión con los dominios D de las MKPs (Caunt y Keyse, 2013), en estudios previos, nuestro grupo de investigación demostró que el dominio CD de Slt2 no media la interacción con Msg5, pero sí contribuye a la unión de esta MAPK con Mkk1 (Palacios *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en nuestro estudio indican que la unión de Slt2 a Mkk1 y a Mkk2 no sólo depende de su dominio CD, sino de interacciones multivalentes, tal y como sucede en el caso de MEK-ERK1/2 (Caunt y McArdle, 2010; Tárrega *et al.*, 2005). De manera similar, aunque está descrito que las mutaciones en el dominio D de Rlm1 bloquean la activación transcripcional en respuesta a agentes que inducen estrés sobre la pared celular (Jung *et al.*, 2002), nosotros hemos visto que la versión con el dominio CD mutado sigue manteniendo su capacidad para transmitir la señal a través de Rlm1, lo que sugiere que Slt2 posee residuos adicionales que le permiten interactuar con el dominio D de Rlm1.

También hemos observado que, mientras que la ausencia de un dominio CD funcional reduce la actividad de Slt2, la eliminación de la región C-terminal posterior al mismo convierte a esta MAPK en hiperactiva. En un trabajo anterior al nuestro en el que se analizó el estado de fosforilación de diferentes versiones truncadas en el extremo C-terminal de Slt2 utilizando anticuerpos anti fosfo-ERK recomendados para detectar la fosforilación en la tirosina del motivo TEY, los autores observaron que Slt2^{D394} se hiperfosforila de manera espontánea, mientras que los niveles de fosforilación de Slt2^{Q364} son similares a los de la versión WT (Levin-Salomon *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en nuestro estudio, y lo comentado en el [apartado 1.1](#) de esta discusión, la hiperfosforilación en la tirosina es indicativa de una reducción de la actividad de Slt2. En nuestro trabajo hemos empleado una versión de una longitud intermedia a las anteriores (Slt2-ΔC374) y anticuerpos complementarios que nos han permitido discernir la proporción de los diferentes estados de fosforilación de Slt2. Nuestros resultados han mostrado que, en ausencia de estímulo, Slt2-ΔC374 muestra hiperfosforilada la treonina, mientras que los niveles de la monofosforilación en la tirosina y de la doble fosforilación son similares a los del WT. Estos resultados, sumados al hecho de dicha versión truncada muestra una actividad transcripcional superior a la silvestre, apoyan la idea de que la extensión C-terminal de Slt2 regula negativamente su autofosforilación en la T190 y, consecuentemente, su actividad quinasas.

Además de la fosforilación en el motivo TEY, en la mayoría de las MAPKs tienen lugar otras modificaciones que resultan esenciales en la regulación de su actividad quinasa. La T195 y la Y198 de Slt2 son las posiciones equivalentes a los sitios de fosforilación T207 y Y210 de la MAPK de mamíferos ERK1. Estos residuos de fosforilación están muy conservados no sólo en las MAPKs, sino en la mayoría de las proteínas quinasas en humanos (Lai y Pelech, 2016). Sin embargo, en el análisis mediante *Phos-tag* realizado en este trabajo no hemos detectado que Slt2 se fosforile en otras posiciones adicionales a las del motivo TEY, al menos en condiciones de estrés por rojo Congo. Mientras que la Y210 de ERK1 es esencial para el reconocimiento de esta MAPK por parte de MEK1, nosotros hemos visto que en Slt2 la mutación Y198F reduce de manera muy leve la fosforilación y la actividad de esta MAPK, lo que sugiere que el residuo Y198 no resulta imprescindible para la regulación de Slt2. Sin embargo, la T195 sí que parece ser importante en la regulación de la actividad de Slt2, al igual que sucede en ERK1, donde la mutación T207A provoca una reducción en su actividad quinasa (Lai y Pelech, 2016). Como ya se ha comentado, la versión Slt2^{T195V} está hiperfosforilada en la Y192, al igual que les sucede a los mutantes inactivos Slt2^{T190A} o Slt2-KD. Este fenómeno podría deberse a una mayor señalización provocada por la ausencia de una ruta CWI funcional capaz de reparar los defectos en la pared celular, y a un incremento en la actividad de los componentes superiores de la cascada de señalización al eliminarse los mecanismos de retroalimentación negativa, como el derivado de la retrofosforilación de Mkk1 y de Mkk2 por Slt2 (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007).

Todas las MAPKs, desde las levaduras hasta los humanos, comparten el motivo TXY, el cual tiene que sufrir una fosforilación doble para que estas proteínas estén completamente activas. No obstante, resultados como los que se exponen en este trabajo ponen de manifiesto que las formas monofosforiladas pueden desempeñar diferentes funciones biológicas y que existen otros residuos conservados, complementarios al motivo TEY, que afectan a la actividad de la proteína y que incluso tienen efectos opuestos en las diferentes MAPKs. Todo ello destaca la importancia de profundizar en el estudio de cada una de las MAPKs, con el objetivo de generar una visión global que refleje la complejidad de esta familia de quinasas, las cuales, a pesar de estar muy conservadas, muestran una gran variedad de mecanismos reguladores

2. CAPÍTULO II. Caracterización del fenotipo de multigemación de un mutante *ptc1Δ*: efecto de la hiperactivación de Slt2

En la segunda parte de este trabajo, hemos profundizado en los efectos que tiene la hiperfosforilación de Slt2 en ausencia de la proteína fosfatasa Ptc1 sobre el control de distintos procesos celulares. Mostramos que las células carentes de Ptc1 sometidas a estímulos de la ruta CWI, muestran defectos en el crecimiento y en la separación celular, hiperpolarización mitocondrial y estrés oxidativo, alteraciones en la dinámica de septinas, un incremento en la actividad autofágica y una inhibición de la señalización a través de la ruta TORC1-Sch9. Asimismo, demostramos que muchas de estas alteraciones son consecuencia de una excesiva actividad quinasa de Slt2, poniendo de manifiesto la interconexión existente entre la ruta CWI con dichos procesos celulares y la relevancia que ésta tiene en la regulación de los mismos, así como la importancia de la proteína fosfatasa Ptc1 para mantener un nivel idóneo de activación de la MAPK.

2.1. La citometría de flujo como metodología para el análisis del fenotipo de multigemación

El análisis mediante citometría de flujo del contenido en ADN de la levadura se ha convertido en un protocolo estándar para estudiar su progresión a lo largo del ciclo celular. A pesar de que inicialmente la tinción más utilizada era la que empleaba el yoduro de propidio como compuesto de unión al ADN, trabajos posteriores demostraron que el uso del Sytox® Green introduce numerosas mejoras en los resultados obtenidos, que incluyen un menor coeficiente de variación, una mayor linealidad entre el contenido en ADN y la fluorescencia, y una mayor resolución de los picos resultantes del análisis. Sin embargo, esta tinción parece ser menos sensible a los cambios asociados con paradas de ciclo celular (Haase y Reed, 2002). Por lo tanto, las ventajas del empleo del Sytox® Green resultan especialmente interesantes en los casos en los que se quieren analizar células que poseen más de dos copias de ADN, como es el caso de las células multigemadas del mutante *ptc1Δ*.

La acumulación de múltiples yemas en células carentes de Ptc1 sometidas a estrés térmico es un fenómeno que ya se había descrito mediante observación microscópica, tanto en células diploides como en haploides (González *et al.*, 2006; Robinson *et al.*, 1994). Sin embargo, la cuantificación de este fenotipo mediante dicha técnica visual resulta difícil y laboriosa, y los resultados son muy dependientes de los criterios, a veces subjetivos, elegidos por el investigador. En este trabajo hemos empleado la microscopía óptica para visualizar las células multigemadas del mutante *ptc1Δ* y para demostrar, mediante una tinción con DAPI que en ellas, tanto la madre como las hijas poseen un

núcleo. Ésta fue la base para poner a punto una metodología basada en el análisis del contenido en ADN mediante citometría de flujo y tinción con *Sytox[®] Green*, gracias a la cual hemos sido capaces de distinguir hasta 5 picos, correspondientes con poblaciones celulares que tienen entre 1 y 5 copias de ADN. No obstante, hay que tener en cuenta que cuando las células multigemadas tienen más de 4 yemas (5 copias de ADN), debido a su gran tamaño, quedan fuera de los límites fiables para el análisis. Este hecho supone una ligera subestimación de los porcentajes de multigemación indicados para el mutante *ptc1Δ*, sobre todo a tiempos largos de cultivo, en los que la acumulación de yemas es cada vez mayor. Los datos obtenidos en nuestro trabajo ponen de manifiesto la reproducibilidad de los resultados y el gran potencial que tiene el análisis mediante citometría de flujo y tinción con *Sytox[®] Green* para determinar con precisión cambios en el contenido de ADN de las levaduras y, concretamente, el efecto que tienen diferentes estreses, mutaciones o tratamientos en la intensidad de un fenotipo de difícil cuantificación por técnicas microscópicas, como es el de multigemación.

En estudios anteriores ya se había empleado la citometría de flujo para hacer un seguimiento del contenido de copias de ADN de mutantes *ptc1Δ* en condiciones de activación de la ruta CWI (Tatjer *et al.*, 2016a; Tatjer *et al.*, 2016b). Sin embargo, en estos trabajos el agente intercalante empleado para marcar el ADN fue el yoduro de propidio y las levaduras analizadas procedían de cultivos incubados durante dos horas, un periodo de tiempo mucho más corto a los ensayos en el presente estudio. Esto explica que en los resultados obtenidos en dichos trabajos no se observen poblaciones celulares con más de dos copias de ADN. Asimismo, en ellos se detecta que, en presencia de estrés, se produce una acumulación de células *ptc1Δ* con contenido genético duplicado (2C), lo cual llevó a indicar que, en dichas condiciones, estos mutantes muestran un retraso en la transición G₂/M (Tatjer *et al.*, 2016a; Tatjer *et al.*, 2016b). Teniendo en cuenta que, en condiciones de estrés, la ausencia de Ptc1 provoca fallos en la separación celular, resulta lógico que a las dos horas estos cultivos muestren una acumulación de células con 2C, que, tal y como hemos comprobado en nuestros resultados, deriva en la aparición de un tercer, un cuarto y hasta un quinto pico de ADN transcurridas 6 horas de incubación.

2.2. *Ptc1 determina el nivel de fosforilación de las diferentes MAPKs de S. cerevisiae*

Ptc1 regula negativamente a las rutas de MAPKs HOG y CWI (Du *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 1995), mientras que la función que ejerce sobre la ruta de apareamiento es más controvertida: si bien algunos trabajos concluyen que Ptc1 regula positivamente la ruta de respuesta a feromonas (Malleshaiah *et al.*, 2010; Winters y Pryciak, 2019), otros autores le atribuyen un papel regulador negativo (Hruby *et al.*, 2011). En este trabajo

mostramos que, en ausencia de estrés térmico, en el mutante *ptc1Δ* se produce una hiperactivación de Slt2 y de Hog1, así como una reducción en la cantidad de fosfo-Fus3 con respecto a la cepa silvestre. Además, se observa también una disminución en los niveles de fosforilación de la MAPK de la ruta de crecimiento filamentoso, Kss1. Por tanto, nuestros resultados confirman el papel inhibidor de Ptc1 sobre las rutas HOG y CWI y apoyan la idea de que esta fosfatasa regula positivamente la ruta de respuesta a feromonas. Hasta donde se sabe, es la primera vez que se muestra que la delección de *PTC1* tiene un efecto negativo sobre la fosforilación de Kss1, tanto en condiciones basales como en presencia de estrés térmico. Estos resultados plantean la posibilidad de que Ptc1 también pueda desempeñar una función reguladora positiva sobre la ruta de crecimiento invasivo.

Por otro lado, se ha demostrado que el estrés térmico activa las rutas HOG (Winkler *et al.*, 2002) y CWI (Kamada *et al.*, 1995), conduciendo a una fosforilación transitoria de las MAPKs, que alcanza su nivel más elevado a los 5 y a los 30 minutos en el caso de Hog1 y de Slt2, respectivamente, momento en el cual ambas señales de fosforilación comienzan a disminuir (Dunayevich *et al.*, 2018). Esta fosforilación temporal de las MAPKs en presencia de estrés térmico explica que, en nuestros experimentos, en la cepa WT no se observe una mayor fosforilación a 38 °C que a 25 °C, puesto que las incubaciones se realizaron durante 6 horas. El hecho de que en el mutante *ptc1Δ* sí que se observe una mayor cantidad de p-Slt2 a 38 °C, incluso tras este prolongado periodo de tiempo, indica que la fosfatasa Ptc1 es importante en la regulación de la dinámica de inactivación de Slt2 en células sometidas a alta temperatura. Esto mismo se ha descrito en el caso del ortólogo de Hog1 de *S. pombe*, Sty1, en el que Ptc1 ha demostrado tener un papel importante en la atenuación de su actividad inducida por tratamiento térmico (Nguyen y Shiozaki, 1999). Teniendo en cuenta que la fosforilación de Hog1 por el estrés térmico depende de la activación de Slt2 (Dunayevich *et al.*, 2018), llama la atención que en el mutante *ptc1Δ* a 38 °C, no sólo no se observe un incremento de la fosforilación de Hog1, sino que ésta se reduzca drásticamente, a diferencia de lo que ocurre con Slt2. Se ha descrito que las fosfatasas Ptp2 y Ptp3 son esenciales para reducir los niveles de p-Hog1 en presencia de estrés térmico y garantizar así la supervivencia celular (Winkler *et al.*, 2002). Dado que nuestros resultados indican que en la cepa WT los niveles de p-Hog1 también son inferiores a 38 °C que a 25 °C, es posible que, en presencia de estrés térmico se esté produciendo un incremento en la actividad de las fosfatasas Ptp2 y Ptp3 frente a p-Hog1 con el objetivo de controlar la hiperfosforilación de esta MAPK. De hecho, se ha demostrado que, en condiciones de estrés osmótico, se produce un incremento en la transcripción de *PTP2* y de *PTP3* que es dependiente de la actividad de Hog1, creándose, de esta manera, un bucle de retroalimentación negativa para inactivar

a Hog1 (Jacoby *et al.*, 1997). En base a todo lo comentado con anterioridad, hipotetizamos que, a pesar de que Slt2 y Hog1 comparten las fosfatasa Ptc1, Ptp2 y Ptp3, la actividad de Slt2 y de Hog1 frente al estrés térmico sería atenuada por fosfatasas diferentes, Ptc1 y Ptp2/Ptp3, respectivamente. El empleo de diferentes mecanismos reguladores frente a un mismo estímulo podría servirle a la célula para incrementar sus posibilidades de supervivencia en el caso de que alguno de esos sistemas de control fallase.

*2.3. La funcionalidad de la ruta CWI es esencial en la manifestación de numerosos fenotipos del mutante *ptc1Δ* en presencia de estrés*

Se ha descrito que el mutante *ptc1Δ* (*tpd1Δ*) muestra un crecimiento moderado a 30 °C, mientras que es sensible a 37 °C (Robinson *et al.*, 1994). Estos defectos en el crecimiento que manifiestan las células carentes de Ptc1, tanto a elevadas temperaturas como en presencia de otros estreses, se han atribuido a la hiperactivación de la ruta CWI, puesto que la delección de *MKK1*, la principal MAPKK de Slt2 (Tatjer *et al.*, 2016b) así como de *RLM1*, el factor de transcripción que asume el grueso de la respuesta transcripcional mediada por la ruta CWI a estreses de pared (Jung y Levin, 1999), suprimen de manera sustancial dicho fenotipo (González *et al.*, 2006; Tatjer *et al.*, 2016b). Por el contrario, la ruta HOG se ha desvinculado del fenotipo de sensibilidad a elevadas temperaturas mostrado por *ptc1Δ* ya que la cepa *ptc1Δ hog1Δ* sigue presentando este defecto fenotípico (Warmka *et al.*, 2001). Sin embargo, resulta interesante destacar que el doble mutante *ptc1Δ slt2Δ* no muestra una mayor tolerancia que la cepa *ptc1Δ* a diferentes agentes alterantes de la pared celular, sino que es aún más sensible (González *et al.*, 2006), llegando a ser estos dobles mutantes inviables en algunos fondos genéticos. Este fenómeno se debe a que la presencia de Slt2 es necesaria para mediar el mecanismo compensatorio que asegura la viabilidad celular en condiciones de daño en la pared.

La utilización en este trabajo de la versión de Slt2 sensible a análogos de ATP, Slt2-as, nos ha permitido superar esta limitación y conocer la repercusión que tiene la inhibición directa de la actividad quinasa de Slt2 sobre los defectos en el crecimiento y en la separación celular mostrados por el mutante *ptc1Δ* en condiciones de activación de la ruta CWI. Esta aproximación ha sido posible gracias a que la adición del inhibidor análogo a ATP reduce de manera significativa la actividad de Slt2-as sin eliminarla por completo (Alonso-Rodríguez *et al.*, 2016). Alcanzar el equilibrio entre la intensidad de estímulo de la ruta CWI y la concentración del inhibidor para conseguir una inhibición controlada de la actividad quinasa de Slt2-as nos ha permitido demostrar que la hiperactivación de Slt2 es necesaria para que se desarrollen los defectos en el

crecimiento y la ausencia de separación celular mostrados por el mutante *ptc1Δ* en presencia de estrés de pared. Nuestros resultados confirman que la interrupción de la señalización a diferentes niveles de la ruta CWI reduce estos defectos, pero en diferente medida. De esta manera, la reducción más drástica del porcentaje de multigemación se produce al inhibir directamente Slt2-as, seguido de la delección de Mkk1 y, finalmente, de la de Rlm1. Asimismo, mostramos que ni la delección de *SWI4* ni la de *SWI6* tienen un efecto positivo sobre el crecimiento del mutante *ptc1Δ* en condiciones de activación de la ruta CWI. En su conjunto, nuestros resultados indican que la hiperactivación de Slt2 mostrada por un mutante *ptc1Δ* en condiciones de estrés de la ruta CWI, promueve que esta MAPK, a través de su actividad catalítica, hiperfosforile a Rlm1 y a otros sustratos que aún están por determinar, conduciendo, entre otros, a alteraciones en el crecimiento y en la separación de las células hijas.

2.4. Dinámica de localización de las septinas y de Slt2 a lo largo del ciclo de las células multigemadas *ptc1Δ*

Durante el ciclo celular, los complejos de septinas sufren cambios en su arquitectura que están perfectamente sincronizados con el avance a lo largo de las diferentes etapas del mismo (Marquardt *et al.*, 2019). En este trabajo, hemos descrito la dinámica de localización de diferentes proteínas a lo largo del ciclo celular mediante la visualización simultánea de éstas junto con las septinas, que han servido para determinar la fase del ciclo en la que se encontraban las células.

Esta aproximación nos ha permitido profundizar en el conocimiento de la localización de Slt2 a lo largo del ciclo celular y, además de confirmar que esta MAPK se localiza en el núcleo y en las zonas de crecimiento polarizado (van Drogen y Peter, 2002), hemos podido precisar que Slt2 se ubica concretamente entre los dos anillos de septinas que separan a la célula madre de la hija durante la citoquinesis. También hemos comprobado que, en las células multigemadas *ptc1Δ*, el anillo de septinas del lado de la célula hija se reabsorbe con retraso en comparación con el de la célula madre. Teniendo en cuenta que se han descrito sustratos de Slt2 cuya localización es citoplasmática, tales como los propios componentes de la ruta CWI Rom2, Mkk1/2 o Msg5 (Flández *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2009; Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007), nos planteamos la posibilidad de que en las células multigemadas *ptc1Δ*, Slt2 se estuviera quedando retenido en el cuello entre la célula madre y la hija, donde estaría hiperfosforilando a sustratos localizados en esa zona e impidiendo, de esta manera, la separación celular. Sin embargo, los análisis de la ubicación de Slt2 que hemos realizado, no muestran una alteración en la dinámica de la localización de esta MAPK. Estos resultados sugieren que la fosforilación por parte de Slt2 de uno o de varios sustratos localizados en el cuello entre la célula madre y la

hija colabora en el proceso de citoquinesis, mientras que es posible que se requiera una posterior desfosforilación de éstas y/o de otras proteínas para que la separación celular sea efectiva. Dicha explicación justifica la localización de Slt2 entre los dos anillos de septinas durante la citoquinesis y los defectos en la separación celular dependientes de la actividad quinasa de Slt2 que muestra el mutante *ptc1Δ* en condiciones de activación de la ruta CWI. Teniendo en cuenta que la fosforilación es la principal modificación que determina los cambios conformacionales que sufren las septinas a lo largo del ciclo celular y que se han descrito eventos de fosforilación en Cdc3, Cdc10, Cdc11 y, mayoritariamente en Shs1 (Hernández-Rodríguez y Momany, 2012), sería interesante en un futuro analizar si Slt2 es capaz de fosforilar a estas septinas, así como a otras proteínas que también se encuentren en el cuello entre la célula madre y la hija durante la citoquinesis.

2.5. La falta de Cts1 en el septo como posible causa de los defectos en la separación celular de las células multigemadas ptc1Δ

La separación entre una célula madre y su hija se produce gracias a la degradación del septo que las mantiene unidas. Este evento depende de la activación de la ruta RAM y de la consiguiente entrada del factor de transcripción Ace2 al núcleo de la célula hija (Weiss, 2012). En este trabajo demostramos que los defectos en la separación celular mostrados por el mutante *ptc1Δ* en condiciones de estrés, no se deben a una inactivación de la ruta RAM ni a una alteración en la dinámica de la localización de Ace2, puesto que, en las células multigemadas objeto de estudio, este factor de transcripción está correctamente ubicado en el núcleo de la célula hija a partir de la citoquinesis, momento en el cual el anillo de septinas ya se encuentra escindido en dos.

Está descrito que, una vez en el interior del núcleo, Ace2 interacciona con el ADN diana para inducir la expresión de un programa génico específico de la célula hija del que forman parte ocho genes, dentro de los que se encuentran *CTS1* y *DSE1*, los cuales están implicados en la degradación del septo primario y en la selección del sitio de gemación, respectivamente (Weiss, 2012). La entrada de Ace2 al núcleo es independiente de su capacidad para unirse al ADN de los genes a los que regula. De esta manera, se ha visto que las células que portan un alelo mutante de *ACE2* que genera una proteína incapaz de unirse al ADN, muestran defectos en la expresión de los genes *CTS1* y *DSE1* y en la separación celular, a pesar de que Ace2 se encuentra localizado en el núcleo las células hijas (Mazanka *et al.*, 2008). Tanto Cts1 como Dse1 se localizan en el cuello de la yema, con una distribución sesgada hacia la célula hija (Colman-Lerner *et al.*, 2001; Frydlova *et al.*, 2009). En este trabajo hemos comprobado que Dse1 se encuentra en su ubicación habitual junto al septo en el lado de la célula hija en las células

multigemadas *ptc1Δ*, lo que indica que esta proteína se localiza correctamente y, a su vez, que Ace2 es funcional. Sin embargo, no se observa endoquitinasa Cts1 en el septo, lo que sugiere que los defectos de separación de este mutante podrían deberse, al menos en parte, a la ausencia de esta enzima en su lugar de acción.

La secreción de la endoquitinasa Cts1 tiene lugar una vez que el proceso de septación ha concluido de manera correcta y se ha producido la consiguiente desaparición en el septo de la proteína Fir1, la cual está implicada en el punto de control de separación celular ECO (Brace *et al.*, 2019). La señal que comunica el estado del septo a Fir1 se desconoce, pero estos autores sugieren que la célula podría estar monitorizando un estrés de pared celular que activaría la ruta CWI, o detectando alteraciones en la membrana plasmática. Teniendo en cuenta que en condiciones de activación de la ruta CWI se promueve la expresión de genes que codifican proteínas responsables de la remodelación de la pared celular (Sanz *et al.*, 2017), es posible que la hiperactivación de Slt2 en los mutantes *ptc1Δ* sometidos a alta temperatura, dé lugar a la generación de un septo anómalo que esté bloqueando, a través de la estabilización de Fir1, la disociación celular posterior. Otra posibilidad es que Fir1 fuera un sustrato de Slt2 y que su hiperfosforilación en estas condiciones estabilizara a esta proteína de una manera impropia, conduciendo a un bloqueo de la separación celular.

2.6. Papel de Slt2 en la herencia y en la función mitocondrial

La ausencia de Ptc1 provoca fallos en la herencia de diferentes orgánulos, dentro de los que se incluyen las mitocondrias (Ariño *et al.*, 2011). Esta alteración consiste en un retraso y no en un bloqueo de la herencia mitocondrial (Roeder *et al.*, 1998). Sin embargo, el hecho de que los mutantes *ptc1Δ* muestren un elevado porcentaje de colonias *petite* (Roeder *et al.*, 1998) parece indicar que estas células podrían haber heredado un ADNmt defectuoso que podría estar afectando negativamente a la funcionalidad de las mitocondrias. Los mutantes *petite*, que reciben este nombre porque crecen formando colonias pequeñas debido a un bloqueo en su cadena respiratoria, muestran una mayor sensibilidad a las especies reactivas de oxígeno y a metales como el cobre o el cadmio, los cuales promueven la producción de ROS (Day, 2013). Los mutantes *ptc1Δ*, en efecto, son más sensibles al cobre, entre otros metales (González *et al.*, 2006). El daño en las mitocondrias y en el ADNmt conduce a una menor producción de ATP y a un estrés oxidativo (Deprez *et al.*, 2018). A su vez, fallos en la herencia de proteínas y de membranas mitocondriales, así como de ADNmt provocan la activación de dos puntos de control, que ocasionan la parada del ciclo celular en las transiciones metafase/anafase y G₁/S del ciclo celular, respectivamente (Crider *et al.*, 2012; García-Rodríguez *et al.*, 2009). Nuestros resultados indican que las células *ptc1Δ*

cultivadas a 38 °C muestran una hiperpolarización de la membrana mitocondrial y un incremento en la acumulación de ROS. Dado que los defectos en la herencia mitocondrial mostrados por las células carentes de Ptc1 se deben a una hiperactivación de la MAPK Slt2 (Li *et al.*, 2010), proponemos que la ausencia de Ptc1, sumada a un estrés que activa aún más la ruta CWI conduce a unos niveles muy elevados de fosforilación de Slt2 que afectan a la herencia y a la función mitocondrial y que podrían estar contribuyendo a la parada en el ciclo celular observada en las hijas de las células multigemadas *ptc1Δ*.

El hecho de que la inhibición de la actividad quinasa de Slt2 elimine el estrés oxidativo mostrado por el mutante *ptc1Δ* a 38 °C fortalece el papel de Slt2 como reguladora de la función mitocondrial. Teniendo en cuenta que ya se había descrito con anterioridad que el estrés oxidativo provoca la activación de la ruta CWI (Cooper *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2014; Petkova *et al.*, 2010) proponemos que la interacción entre la ruta CWI y ROS puede ser bidireccional. Esta interacción permitiría la amplificación de la señal al generar un bucle de retroalimentación positiva en el que el incremento de especies reactivas de oxígeno que se produce como consecuencia de la actividad quinasa de Slt2 constituye a su vez un estímulo de la ruta CWI.

Las mitocondrias son orgánulos dinámicos que están en constante fisión y fusión a lo largo del ciclo celular. En condiciones normales de crecimiento existe un equilibrio entre la fusión y la fisión mitocondrial, pero en respuesta a estrés la balanza se inclina drásticamente hacia la fisión (Cooper *et al.*, 2014). En presencia de estrés oxidativo, la actividad quinasa de Slt2 promueve la fisión mitocondrial a través de la fosforilación de la ciclina C (Cooper *et al.*, 2014; Jin *et al.*, 2014). Teniendo en cuenta que en la levadura *S. pombe* se ha demostrado que el equilibrio entre la fusión y la fisión mitocondrial juega un papel fundamental en la regulación de la función de este orgánulo y en el control del ciclo celular (Dong *et al.*, 2021), proponemos que la fosforilación de la ciclina C por parte de Slt2 podría estar contribuyendo a las alteraciones en la progresión del ciclo celular observadas en los mutantes *ptc1Δ* sometidos a estrés.

2.7. Slt2 y Ptc1 como reguladores de la señalización a través de la rama TORC1-Sch9

En *S. cerevisiae* la mayor parte de los efectos mediados por TORC1 se transmiten a través de dos ramas principales cuyos efectores son Tap42 y Sch9 (Loewith y Hall, 2011). En este trabajo mostramos que las células carentes de Ptc1 experimentan una reducción notable en la cantidad total de Sch9 con respecto a la cepa silvestre, que va acompañada de una disminución de los niveles de fosforilación de esta proteína. Estos resultados suponen la primera evidencia de la implicación de la fosfatasa Ptc1 en la señalización a través de la rama TORC1-Sch9. Además, la inhibición de la síntesis proteica mediante el

tratamiento con cicloheximida nos ha permitido precisar que la ausencia de Ptc1 afecta concretamente a la estabilidad de Sch9. Se ha descrito que Sch9 tiene un papel muy importante en la regulación de la ubiquitinación intracelular, de tal manera que el mutante *sch9Δ* muestra una reducción notable en los niveles globales de proteínas ubiquitinadas (Qie *et al.*, 2015). Teniendo en cuenta que Wip1, el homólogo más cercano a Ptc1 en humanos (Fiscella *et al.*, 1997), cataliza la desfosforilación de la ubiquitina ligasa Mdm2, favoreciendo la interacción de ésta con la proteína supresora de tumores p53 y su consiguiente degradación (Lu *et al.*, 2007), proponemos que Ptc1, podría estar ejerciendo un papel paralelo en la levadura, promoviendo la ubiquitinación de diferentes proteínas a través de la estabilización de Sch9.

La conexión funcional entre Ptc1 y TORC1 ya se había descrito con anterioridad en un trabajo que demuestra que esta fosfatasa es necesaria para la correcta señalización a través de la rama TORC1-Tap42 (González *et al.*, 2009). Al igual que hemos indicado que sucede con Sch9, los autores de ese trabajo demuestran que la ausencia de Ptc1 afecta negativamente a la estabilidad de Tip41, provocando una disminución en la cantidad de esta proteína y concluyen que, aunque la reducción de Tip41 contribuye a los fenotipos mostrados por las células carentes de Ptc1, esta fosfatasa debe ejercer funciones adicionales en la ruta TORC1 (González *et al.*, 2009). La relación entre Ptc1 y el efector de TORC1 Sch9 descrita en este trabajo confirma la teoría de estos autores y sienta las bases para la realización de futuros experimentos que puedan justificar al menos parte de los fenotipos relacionados con la ruta TORC1 mostrados por mutante *ptc1Δ* para los cuales todavía no se había encontrado explicación.

Además, los resultados presentados en este trabajo demuestran que los defectos en la señalización a través de la ruta TORC1-Sch9 que presenta el mutante *ptc1Δ* se deben a la hiperactivación de Slt2. Se ha descrito que los mutantes *ptc1Δ* muestran fragmentación vacuolar (González *et al.*, 2006; Seeley *et al.*, 2002). Estos defectos en la morfología vacuolar se reducen notablemente al reducir la señalización a través de la ruta CWI mediante la delección de *MKK1* (Tatjer *et al.*, 2016b). Por otra parte, se ha descrito que en condiciones de estrés oxidativo se produce una inhibición en la señalización de la rama Sch9 de TORC1 debida a una pérdida de la integridad vacuolar (Takeda *et al.*, 2018), lo cual no es de extrañar si se tiene en cuenta que el complejo TORC1 se encuentra mayoritariamente asociado a la membrana vacuolar (Loewith y Hall, 2011) y que la fosforilación y la consiguiente transmisión de la señal a través de Sch9 depende de esta localización (Novarina *et al.*, 2021). Por ello, sería posible que el mecanismo mediante el cual Slt2 inhibe la señalización hacia Sch9 fuera consecuencia de una pérdida de la integridad vacuolar provocada por un incremento de ROS. Sin

embargo, esta inhibición de la ruta TORC1-Sch9 se produce en las células carentes de Ptc1 tanto en ausencia como en presencia de estrés térmico, mientras que el incremento de ROS se observa sólo en condiciones de estrés. Esto indica, por un lado, que la inhibición de TORC1-Sch9 no es un efecto colateral del estrés oxidativo provocado por la hiperactivación de Slt2 y, por otro, que Ptc1 parece ejercer un papel independiente en la modulación de esta ruta.

No es la primera vez que se describe el papel regulador de una MAPK de levaduras sobre la ruta TORC1. Se ha visto que, en condiciones de estrés osmótico, Hog1 es necesaria para regular negativamente la actividad de la rama de TORC1-Sch9 (Hughes Hallett *et al.*, 2014). También se ha descrito la implicación de Rho1 y de otros componentes de la ruta CWI en la regulación negativa de TORC1. Así, mediante ensayos de co-purificación *in vitro* se ha determinado que Rho1 se asocia con Kog1, una proteína que forma parte del complejo TORC1, provocando por un lado la liberación de Tap42 y la consiguiente inhibición de la señalización a través de esta rama, y, por otro lado, inhibiendo la actividad quinasa de TORC1 según indican los ensayos quinasa *vitro* realizados (Yan *et al.*, 2012). En ese mismo trabajo, los autores demuestran que determinados componentes de la ruta CWI, concretamente Rho1, Rom2, Wsc1 y Mid2 son necesarios para mediar la desfosforilación de Sch9 inducida por rapamicina, cafeína y CFW (Yan *et al.*, 2012). En un estudio reciente realizado en *S. cerevisiae* se ha demostrado que Slt2 puede inhibir a TORC2 mediante la fosforilación directa de Avo2, una de las subunidades que conforman este complejo (Leskoske *et al.*, 2018). Asimismo, en condiciones de estrés, el ortólogo de Slt2 en *S. pombe*, Pmk1 regula negativamente a la GTPasa activadora de TORC2 a través de un mecanismo que también podría depender de su activada quinasa (Madrid *et al.*, 2016). Sin embargo, hasta la fecha, no había evidencias de una implicación funcional de Slt2 en la señalización a través de la ruta TORC1.

Los resultados presentados en nuestro trabajo, unidos a evidencias que demuestran que TORC1 ejerce un efecto inhibitorio sobre la ruta CWI (Soulard *et al.*, 2010; Torres *et al.*, 2002) revelan la existencia de una regulación bidireccional entre la ruta CWI y TORC1 y ponen de manifiesto la elevada complejidad de las conexiones que modulan la actividad de estas vías de señalización. Determinar si la inhibición de la actividad quinasa de Slt2 también conduce a una recuperación en los niveles de Tip41 en el mutante *ptc1Δ*, ayudaría a definir el nivel al que actúa Slt2 sobre la ruta de señalización de TORC1, con el fin último de conocer el mecanismo que rige esta regulación y los posibles sustratos de Slt2 implicados en la misma.

2.8. Implicación de Slt2 y de las septinas en la regulación de la autofagia

Se ha descrito que TORC1 inhibe la autofagia a través de sus dos principales efectores, Tap42-PP2A (Yorimitsu *et al.*, 2009) y Sch9 (Yorimitsu *et al.*, 2007). Asimismo, se ha demostrado que, en condiciones de estrés por etanol, las células de *S. cerevisiae* experimentan una acumulación de ROS intracelular que provoca la inducción de la autofagia (Jing *et al.*, 2018). Los resultados mostrados en este trabajo concuerdan con las interrelaciones descritas con anterioridad, puesto que, en las células carentes de Ptc1 sometidas a estrés térmico, la inhibición de TORC1-Sch9 observada va acompañada de un incremento de ROS y de una mayor actividad autofágica. Teniendo en cuenta que en el mutante *ptc1Δ* es la excesiva actividad quinasa de Slt2 la que promueve el efecto sobre ROS y TORC1-Sch9, cabe esperar que el incremento en la actividad autofágica observado en dicho mutante también dependa de la función catalítica de Slt2. Estudios realizados en *S. cerevisiae* en los que se ha analizado la implicación de las rutas de MAPKs en la autofagia, han demostrado que Slt2 es necesaria para la autofagia selectiva de peroxisomas y de mitocondrias, mientras que Hog1 sólo afecta a la mitofagia (Manjithaya *et al.*, 2010; Mao *et al.*, 2011). Sin embargo, estas MAPKs no parecen afectar a la autofagia general, que es la que se ha evaluado en el presente trabajo. El hecho de que sea necesaria la presencia de una forma fosforilada y catalíticamente activa de Slt2 para que se produzca la pexofagia (Manjithaya *et al.*, 2010), así como que durante la mitofagia tanto Hog1 como Slt2 permanezcan en el citosol (Mao *et al.*, 2011) sugiere que la fosforilación de sustratos citoplasmáticos por parte de estas MAPKs podría ser un requisito para que se produjera la señalización a través de estas rutas de degradación. Conocer cuáles son estos sustratos ayudaría a determinar la implicación de Slt2 y de Hog1 en la regulación de la autofagia.

En condiciones de inducción de la autofagia, las septinas se relocalizan en los PAS, donde constituyen puntos y anillos no canónicos que parecen contribuir a la formación de los autofagosomas (Barve *et al.*, 2018b). Nuestros resultados muestran que en las células multigemadas *ptc1Δ*, las septinas de las células hijas, tras reabsorberse con retraso del anillo, se relocalizan formando múltiples estructuras asociadas a la región cortical que ocasionalmente colocalizan con la proteína autofágica Atg9. Teniendo en cuenta que los mutantes *ptc1Δ* sometidos a estrés térmico también muestran una inducción de la actividad autofágica, es posible que esta arquitectura anómala que muestran las septinas en las células multigemadas objeto de estudio esté relacionada con la regulación de procesos autofágicos. Asimismo, el hecho de que estas estructuras anómalas de septinas se encuentren exclusivamente en las hijas de las células multigemadas podría ser indicativo de que es en éstas, y no en la madre, donde se está produciendo una inducción de la actividad autofágica.

2.9. *Slt2 como reguladora de la progresión del ciclo celular*

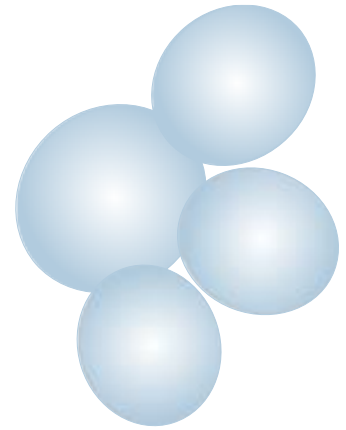
A lo largo de este trabajo se ha constatado que la hiperactivación de Slt2 mostrada por el mutante *ptc1Δ* en condiciones de estrés de la ruta CWI da lugar a un fenotipo de multigemación que se desarrolla como consecuencia de que las células hijas no son capaces ni de separarse de la célula madre ni de comenzar un nuevo ciclo. El modelo más simple que puede explicar este fenotipo es que la alteración del nivel y de la dinámica de activación fisiológica de Slt2 provoque que esta MAPK fosforile de manera descontrolada ciertos sustratos de cuya desfosforilación depende la separación celular y el comienzo de un nuevo ciclo. El mecanismo propuesto sería similar al de los puntos de control del ciclo celular en los que la activación de una quinasa bloquea, al menos temporalmente, la progresión a lo largo del mismo.

Los defectos en la herencia de diferentes orgánulos, entre los que se incluyen el RE y las mitocondrias, debidos a la hiperactivación de Slt2, podrían estar comprometiendo la viabilidad de las células hijas y desencadenando, exclusivamente en ellas y no en la madre, una situación de estrés que a su vez conduce a (i) una inducción de la autofagia, que provoca la deslocalización de las septinas hacia el córtex de las células hijas y (ii) una inhibición de la ruta TORC1-Sch9. Esta inhibición de la ruta TORC1, unida a la hiperfosforilación de Slt2, provocaría una estabilización de Sic1 que podría ser la responsable de que las células hijas quedaran retenidas en la fase G₁ del ciclo celular. En condiciones de inhibición de la ruta TORC1 mediante el tratamiento con rapamicina, se induce la actividad quinasa de Slt2 sobre Sic1 Ser¹⁷³. Además, la fosfatasa PP2A^{Cdc55}, encargada de desfosforilar este residuo, se encuentra inhibida de manera dependiente de TORC1, lo que provoca una estabilización de la proteína y una parada en la fase G₁ (Moreno-Torres *et al.*, 2015). Aunque la inactivación de Slt2 en ausencia de estrés no parece afectar al inicio de la replicación, el hecho de que los mutantes *slt2Δ* muestren defectos en la parada en la fase G₁ del ciclo inducida por la rapamicina apoya el papel de esta MAPK en el control de la transición G₁/S en condiciones de inactivación de TORC1 (Quilis *et al.*, 2021).

Recientemente se ha descrito una nueva conexión entre la ruta CWI y el control en la transición G₁/S del ciclo celular, denominado punto de control pared celular/INICIO (CW/START) (Piccirillo *et al.*, 2017). En dicho trabajo se muestra que, cuando los mutantes *rlm1Δ* crecen en una fuente de carbono no fermentable y en condiciones de baja osmolaridad, las células desarrollan un fenotipo de acumulación de yemas que recuerda al estudiado en nuestro trabajo. Estas células hijas heredan de manera correcta el núcleo y completan la citoquinesis; sin embargo, se vuelven permeables al azul de tripán (Piccirillo *et al.*, 2017), a diferencia de lo que hemos observado en las hijas

de las células multigemadas *ptc1Δ*, que no son permeables al yoduro de propidio. Los autores de dicho trabajo proponen que Rlm1 regula negativamente el INICIO cuando las células están creciendo en las condiciones anteriormente descritas. Sin embargo, observan que la delección de *SLT2* suprime este fenotipo, lo que les lleva proponer que Slt2 puede tener efectos opuestos en la regulación del INICIO, retrasándolo mediante su actuación sobre Rlm1 o promoviendo esta transición mediante la activación de Swi4 (Piccirillo *et al.*, 2017). A pesar de las semejanzas aparentes en el fenotipo mostrado por *S. cerevisiae* en éste y en nuestro trabajo, los resultados obtenidos en ambos parecen indicar que los mecanismos subyacentes a las alteraciones observadas son diferentes puesto que, en el caso de las células multigemadas *ptc1Δ* la delección de *RLM1* alivia el fenotipo, mientras que Swi4 no parece tener un papel directo sobre el mismo. A pesar de las discrepancias observadas, este punto de control pared celular/INICIO constituye una evidencia más de la implicación de la ruta CWI en la regulación del ciclo celular al comienzo del mismo.

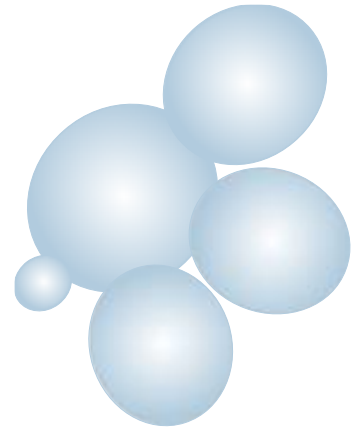
Tomados en su conjunto, los resultados expuestos en este trabajo reflejan lo extremadamente sofisticadas que son las rutas de transducción de señales en *S. cerevisiae*. Basándonos en el estudio de la ruta CWI hemos demostrado que el orden en el que se producen los eventos de fosforilación que conducen a la activación de la MAPK de esta ruta, Slt2, tienen consecuencias importantes sobre la regulación y la funcionalidad biológica de esta proteína. Asimismo, hemos reflejado que, a pesar de que esta MAPK tiene dominios muy bien conservados y caracterizados, existen residuos y regiones cuya implicación en la dinámica de activación de la misma aún está por elucidar. También hemos mostrado que la desregulación de la ruta CWI puede afectar a muchos otros aspectos de la fisiología de la levadura que no están directamente relacionados con la integridad de su pared, evidenciando la necesidad de la identificación de nuevos sustratos de Slt2. Finalmente, hemos puesto de manifiesto la importancia que tiene la actividad de la fosfatasa de Ptc1 en la regulación negativa de esta ruta y como enzima potencialmente esencial para la desfosforilación de sustratos de Slt2, con el fin último de lograr un funcionamiento celular correcto.



CONCLUSIONES

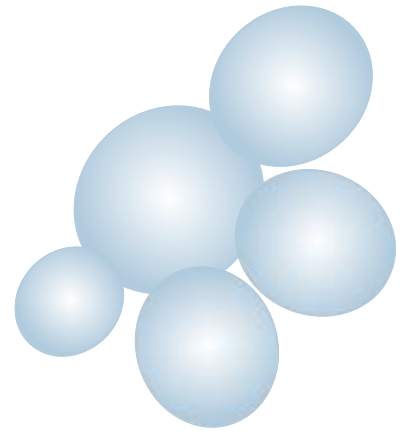
1. La fosforilación y desfosforilación de la MAPK de la ruta CWI Slt2 en su motivo de activación TEY por sus proteínas activadoras Mkk1/2 y por la proteína fosfatasa Msg5, respectivamente, es un proceso ordenado, que comienza por la Y192, la cual actúa como punto inicial de regulación de su activación.
2. La fosforilación en la T190 es imprescindible para la actividad catalítica y biológica de Slt2, si bien la fosforilación de la Y192 es necesaria para que alcance su máxima actividad.
3. La reducción de la actividad catalítica de Slt2 conduce a un incremento en los niveles de fosforilación de la Y192 de esta MAPK, lo que refleja una mayor señalización a través de la ruta.
4. En las células de *S. cerevisiae* coexiste la forma de Slt2 doblemente fosforilada en el motivo TEY con las monofosforiladas en la T190 o en la Y192 y con la forma no fosforilada, siendo esta última mucho más abundante, incluso en condiciones de estimulación de la ruta CWI.
5. El dominio CD de Slt2 colabora, pero no es esencial en la interacción de esta MAPK con sus proteínas activadoras Mkk1/2 y con el factor de transcripción Rlm1.
6. En condiciones de activación de la ruta CWI, la serín/treonín fosfatasa Ptc1 es necesaria para la correcta separación celular y para la progresión del ciclo de las células hijas en la fase G₁.
7. La ausencia de Ptc1 sumada al estrés térmico provoca un incremento en los niveles de fosforilación de Slt2 que no se observa en el resto de las MAPKs de *S. cerevisiae*.
8. Los defectos en el crecimiento y en la separación celular, así como la hiperpolarización mitocondrial y el incremento de ROS causados por la carencia de Ptc1 en condiciones de estrés térmico, requieren la actividad quinasa de Slt2, evidenciando la necesidad de la hiperactivación de la ruta CWI para que se manifiesten estas alteraciones.
9. El fenómeno de multigemación que ocurre en el mutante *ptc1Δ* sometido a estrés térmico no se debe a un bloqueo en la ruta MEN de salida del ciclo mitótico, pero se acompaña de una pérdida de localización de la endoquitinasa Cts1 en los septos que explicaría, al menos en parte, el defecto en la separación celular.

10. La alteración en la dinámica de septinas mostrada exclusivamente por las yemas de las células multigemadas *ptc1Δ* es compatible con la biogénesis de autofagosomas y con el incremento en la actividad autofágica observada.
11. La hiperactivación de Slt2 en las células multigemadas *ptc1Δ* inhibe la señalización de la ruta TORC1 hacia Sch9, lo que podría contribuir a la parada del ciclo de las células hijas en la fase G₁.



CONCLUSIONS

1. Phosphorylation and dephosphorylation of the TEY motif within the activation loop of Slt2, the MAPK of the CWI pathway, respectively catalyzed by activating proteins Mkk1/Mkk2 and Msg5 protein phosphatase, involves an ordered mechanism, which initiates at the Y192 residue.
2. Whereas T190 is essential for the catalytic and biological activity of Slt2, Y192 is necessary for the MAPK to reach its maximum activity.
3. Reduction of Slt2 catalytic activity leads to higher Y192 phosphorylation levels, indicating increased signaling through the CWI pathway.
4. In *S. cerevisiae* cells, T190- and Y192-monophosphorylated species coexist with bisphosphorylated Slt2, although most of the Slt2 pool remains unphosphorylated, even following cell wall stress.
5. Although the CD domain of Slt2 participates in the interaction of this MAPK with both Mkk1/2 activating proteins and Rlm1 transcription factor, it is not essential for binding.
6. Upon CWI activation, Ptc1 serine/threonine phosphatase is required for cell separation and cell cycle progression through G₁ in daughter cells.
7. Under heat stress, the lack of Ptc1 causes an increase in Slt2 phosphorylation levels, which is not observed in other *S. cerevisiae* MAPKs.
8. Defects in growth and cell separation, as well as mitochondrial hyperpolarization and increase in ROS caused by the absence of Ptc1 upon heat stress, require Slt2 kinase activity, thus reflecting the involvement of CWI hyperactivation in such alterations.
9. The multibudding phenotype developed by *ptc1Δ* mutants subjected to heat stress is not due to mitotic exit arrest exerted by the MEN pathway but involves the loss of Cts1 endochitinase localization at the septa. This would explain, at least partially, the cell separation defect.
10. Altered septin dynamics exclusively shown by the buds in *ptc1Δ* multibudded cells is consistent with autophagosome biogenesis and the observed increase in autophagic activity.
11. Hyperactivation of Slt2 in *ptc1Δ* multibudded cells inhibits signaling through the Sch9 branch of the TORC1 pathway, which could contribute to the cell cycle arrest in G₁ observed in daughter cells.



BIBLIOGRAFÍA

- Ahn N. G., Seger R., Bratlien R. L., Diltz C. D., Tonks N. K., Krebs E. G. (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.
- Ai W., Bertram P. G., Tsang C. K., Chan T. F., Zheng X. F. (2002) Regulation of subtelomeric silencing during stress response. *Mol Cell* 10: 1295-1305. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(02\)00695-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00695-0).
- Alexander M. R., Tyers M., Perret M., Craig B. M., Fang K. S., Gustin M. C. (2001) Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. *Mol Biol Cell* 12: 53-62. <https://doi.org/10.1091/mbc.12.1.53>.
- Alison A., Gottschling D. E., Kaiser C. A., Stearns T. (1997) *Methods in yeast genetics : a Cold Spring Harbor Laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Alonso-Rodríguez E., Fernández-Pinar P., Sacristán-Reviriego A., Molina M., Martín H. (2016) An Analog-sensitive Version of the Protein Kinase Slr2 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 N. G., Maller J. L., Tonks N. K., Sturgill T. W. (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>.
- Ardito F., Giuliani M., Perrone D., Troiano G., 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. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2017.3036>.
- Ariño J., Casamayor A., González A. (2011) Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryot Cell* 10: 21-33. <https://doi.org/10.1128/ec.00249-10>.
- Ariño J., Velázquez D., Casamayor A. (2019) Ser/Thr protein phosphatases in fungi: structure, regulation and function. *Microb Cell* 6: 217-256. <https://doi.org/10.15698/mic2019.05.677>.
- Arroyo J., Bermejo C., García R., Rodríguez-Peña J. M. (2009) Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin Microbiol Infect* 15 Suppl 1: 44-46. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2008.02676.x>.
- 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>.
- Babour A., Bicknell A. A., 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>.
- Baladrón V., Ufano S., Dueñas E., Martín-Cuadrado A. B., del Rey F., Vázquez de Aldana C. R. (2002) Eng1p, an endo-1,3-beta-glucanase localized at the daughter side of the septum, is involved in cell separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 1: 774-786. <https://doi.org/10.1128/ec.1.5.774-786.2002>.
- Barbet N. C., Schneider U., Helliwell S. B., Stansfield I., Tuite M. F., Hall M. N. (1996) TOR controls translation initiation and early G1 progression in yeast. *Mol Biol Cell* 7: 25-42. <https://doi.org/10.1091/mbc.7.1.25>.
- Bardwell L., Cook J. G., Voora D., Baggott D. M., Martinez A. R., 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>.

- Bardwell L., Shah K. (2006) Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates. *Methods* 40: 213-223. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2006.06.008>.
- Baro B., Queralt E., Monje-Casas F. (2017) Regulation of Mitotic Exit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Mol Biol* 1505: 3-17. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6502-1_1.
- Barral Y., Parra M., Bidlingmaier S., Snyder M. (1999) Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* 13: 176-187. <https://doi.org/10.1101/gad.13.2.176>.
- Barve G., Sanyal P., Manjithaya R. (2018a) Septin localization and function during autophagy. *Curr Genet* 64: 1037-1041. <https://doi.org/10.1007/s00294-018-0834-8>.
- Barve G., Sridhar S., Aher A., Sahani M. H., Chinchwadkar S., Singh S., K N. L., McMurray M. A., Manjithaya R. (2018b) Septins are involved at the early stages of macroautophagy in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.209098>.
- 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>.
- Bertin A., McMurray M. A., Grob P., Park S. S., Garcia G., 3rd, Patanwala I., Ng H. L., Alber T., Thorner J., Nogales E. (2008) *Saccharomyces cerevisiae* septins: supramolecular organization of heterooligomers and the mechanism of filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 8274-8279. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803330105>.
- Bhattacharyya R. P., Reményi A., Good M. C., Bashor C. J., Falick A. M., Lim W. A. (2006) The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science* 311: 822-826. <https://doi.org/10.1126/science.1120941>.
- Bloom J., Cross F. R. (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 149-160. <https://doi.org/10.1038/nrm2105>.
- Botstein D., Fink G. R. (2011) Yeast: an experimental organism for 21st Century biology. *Genetics* 189: 695-704. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.130765>.
- Brace J., Hsu J., Weiss E. L. (2011) Mitotic exit control of the *Saccharomyces cerevisiae* Ndr/LATS kinase Cbk1 regulates daughter cell separation after cytokinesis. *Mol Cell Biol* 31: 721-735. <https://doi.org/10.1128/mcb.00403-10>.
- Brace J. L., Doerfler M. D., Weiss E. L. (2019) A cell separation checkpoint that enforces the proper order of late cytokinetic events. *J Cell Biol* 218: 150-170. <https://doi.org/10.1083/jcb.201805100>.
- Brachmann C. B., Davies A., Cost G. J., Caputo E., Li J., Hieter P., Boeke J. D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* 14: 115-132. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-0061\(19980130\)14:2<115::Aid-yea204>3.0.Co;2-2](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-0061(19980130)14:2<115::Aid-yea204>3.0.Co;2-2).
- Bridges A. A., Jentzsch M. S., Oakes P. W., Occhipinti P., Gladfelter A. S. (2016) Micron-scale plasma membrane curvature is recognized by the septin cytoskeleton. *J Cell Biol* 213: 23-32. <https://doi.org/10.1083/jcb.201512029>.
- Cabib E., Arroyo J. (2013) How carbohydrates sculpt cells: chemical control of morphogenesis in the yeast cell wall. *Nat Rev Microbiol* 11: 648-655. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3090>.
- 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>.
- Cannon K. S., Woods B. L., Gladfelter A. S. (2017) The Unsolved Problem of How Cells Sense Micron-Scale Curvature. *Trends Biochem Sci* 42: 961-976. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.001>.

- Cargnello M., 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. <https://doi.org/10.1128/membr.00031-10>.
- Carmody S. R., Tran E. J., Apponi L. H., Corbett A. H., Wente 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. <https://doi.org/10.1128/MCB.00735-10>.
- Castillon G. A., Adames N. R., Rosello C. H., Seidel H. S., Longtine M. S., Cooper J. A., Heil-Chapdelaine R. A. (2003) Septins have a dual role in controlling mitotic exit in budding yeast. *Curr Biol* 13: 654-658. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(03\)00247-1](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(03)00247-1).
- Caudron F., Barral Y. (2009) Septins and the lateral compartmentalization of eukaryotic membranes. *Dev Cell* 16: 493-506. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.04.003>.
- Caunt C. J., Keyse S. M. (2013) Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *Febs j* 280: 489-504. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08716.x>.
- Caunt C. J., McArdle C. A. (2010) Stimulus-induced uncoupling of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation from nuclear localization is dependent on docking domain interactions. *J Cell Sci* 123: 4310-4320. <https://doi.org/10.1242/jcs.076349>.
- Chao J. T., Piña F., Onishi M., Cohen Y., Lai Y. S., Schuldiner M., Niwa M. (2019) Transfer of the Septin Ring to Cytokinetic Remnants in ER Stress Directs Age-Sensitive Cell-Cycle Re-entry. *Dev Cell* 51: 173-191.e175. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.08.017>.
- Chen D. C., Yang B. C., Kuo T. T. (1992) One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet* 21: 83-84. <https://doi.org/10.1007/bf00318659>.
- Chen R. E., 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>.
- Cho S., Hwang E. S. (2011) Fluorescence-based detection and quantification of features of cellular senescence. *Methods Cell Biol* 103: 149-188. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-385493-3.00007-3>.
- Choi M. Y., Kang G. Y., Hur J. Y., Jung J. W., Kim K. P., Park S. H. (2008) Analysis of dual phosphorylation of Hog1 MAP kinase in *Saccharomyces cerevisiae* using quantitative mass spectrometry. *Mol Cells* 26: 200-205.
- Cid V. J., Adamíková L., Cenamor R., Molina M., Sánchez M., Nombela C. (1998) Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. *Microbiology (Reading)* 144 (Pt 12): 3463-3474. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-12-3463>.
- Clotet J., Escoté X., Adrover M. A., Yaakov G., Garí E., Aldea M., de Nadal E., Posas F. (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *Embo j* 25: 2338-2346. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601095>.
- Colman-Lerner A., Chin T. E., Brent R. (2001) Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* 107: 739-750. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00596-7](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00596-7).
- Cooper K. F., Khakhina S., Kim S. K., 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>.
- Correia I., Alonso-Monge R., Pla J. (2010) MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Future Microbiol* 5: 1125-1141. <https://doi.org/10.2217/fmb.10.72>.
- Crider D. G., García-Rodríguez L. J., Srivastava P., Peraza-Reyes L., Upadhyaya K., Boldogh I. R., Pon L. A. (2012) Rad53 is essential for a mitochondrial DNA inheritance checkpoint regulating G1 to S progression. *J Cell Biol* 198: 793-798. <https://doi.org/10.1083/jcb.201205193>.

- Cross F. R. (1995) Starting the cell cycle: what's the point? *Curr Opin Cell Biol* 7: 790-797. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(95\)80062-x](https://doi.org/10.1016/0955-0674(95)80062-x).
- Cullen P. J., Sprague G. F., Jr. (2012) The regulation of filamentous growth in yeast. *Genetics* 190: 23-49. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.127456>.
- Daub H., Olsen J. V., Bairlein M., Gnad F., Oppermann F. S., Körner R., Greff Z., Kéri G., Stemmann O., Mann M. (2008) Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol Cell* 31: 438-448. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.007>.
- Davenport K. R., Sohaskey M., Kamada Y., Levin D. E., Gustin M. C. (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 M. (2013) Yeast petites and small colony variants: for everything there is a season. *Adv Appl Microbiol* 85: 1-41. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-407672-3.00001-0>.
- de Nobel H., Ruiz C., Martin H., Morris W., Brul S., Molina M., Klis F. M. (2000) Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology (Reading)* 146 (Pt 9): 2121-2132. <https://doi.org/10.1099/00221287-146-9-2121>.
- De Virgilio C., DeMarini D. J., Pringle J. R. (1996) SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology (Reading)* 142 (Pt 10): 2897-2905. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-10-2897>.
- De Virgilio C., Loewith R. (2006) Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene* 25: 6392-6415. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209884>.
- Dephoure N., Zhou C., Villén J., Beausoleil S. A., Bakalarski C. E., Elledge S. J., Gygi S. P. (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 10762-10767. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805139105>.
- Deprez M. A., Eskes E., Winderickx J., Wilms T. (2018) The TORC1-Sch9 pathway as a crucial mediator of chronological lifespan in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy048>.
- Deshaies R. J., Ferrell J. E., Jr. (2001) Multisite phosphorylation and the countdown to S phase. *Cell* 107: 819-822. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00620-1](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00620-1).
- Di Como C. J., Arndt K. T. (1996) Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev* 10: 1904-1916. <https://doi.org/10.1101/gad.10.15.1904>.
- 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>.
- Dobbelaere J., Barral Y. (2004) Spatial coordination of cytokinetic events by compartmentalization of the cell cortex. *Science* 305: 393-396. <https://doi.org/10.1126/science.1099892>.
- Dong F., Zhu M., Zheng F., Fu C. (2021) Mitochondrial fusion and fission are required for proper mitochondrial function and cell proliferation in fission yeast. *Febs j.* <https://doi.org/10.1111/febs.16138>.
- Doolin M. T., Johnson A. L., Johnston L. H., Butler G. (2001) Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol* 40: 422-432. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02388.x>.
- 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>.
- Duch A., Canal B., Barroso S. I., García-Rubio M., Seisenbacher G., Aguilera A., de Nadal E., Posas F. (2018) Multiple signaling kinases target Mrc1 to prevent genomic instability triggered

- by transcription-replication conflicts. *Nat Commun* 9: 379. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02756-x>.
- Dunayevich P., Baltanás R., Clemente J. A., Couto A., Sapochnik D., Vasen G., Colman-Lerner A. (2018) Heat-stress triggers MAPK crosstalk to turn on the hyperosmotic response pathway. *Sci Rep* 8: 15168. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-33203-6>.
- Edelstein A. D., Tsuchida M. A., Amodaj N., Pinkard H., Vale R. D., Stuurman N. (2014) Advanced methods of microscope control using μ Manager software. *J Biol Methods* 1. <https://doi.org/10.14440/jbm.2014.36>.
- Elion E. A., Satterberg B., 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.4.5.495>.
- English J. G., Shellhammer J. P., Malahe M., McCarter P. C., Elston T. C., Dohlman H. G. (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>.
- Enserink J. M., Kolodner R. D. (2010) An overview of Cdk1-controlled targets and processes. *Cell Div* 5: 11. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-5-11>.
- Escoté X., Zapater M., Clotet J., Posas F. (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* 6: 997-1002. <https://doi.org/10.1038/ncb1174>.
- Fang X., Luo J., Nishihama R., Wloka C., Dravis C., Travaglia M., Iwase M., Vallen E. A., Bi E. (2010) Biphasic targeting and cleavage furrow ingression directed by the tail of a myosin II. *J Cell Biol* 191: 1333-1350. <https://doi.org/10.1083/jcb.201005134>.
- Fares H., Goetsch L., Pringle J. R. (1996) Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 132: 399-411. <https://doi.org/10.1083/jcb.132.3.399>.
- Feng Y., He D., Yao Z., Klionsky D. J. (2014) The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 24: 24-41. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.168>.
- Ferrell J. E., Jr., Bhatt R. R. (1997) Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* 272: 19008-19016. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.30.19008>.
- Finn K., Lowndes N. F., Grenon M. (2012) Eukaryotic DNA damage checkpoint activation in response to double-strand breaks. *Cell Mol Life Sci* 69: 1447-1473. <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0875-3>.
- Finnigan G. C., Takagi J., Cho C., Thorner J. (2015) Comprehensive Genetic Analysis of Paralogous Terminal Septin Subunits Shs1 and Cdc11 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 200: 821-841. <https://doi.org/10.1534/genetics.115.176495>.
- Fiscella M., Zhang H., Fan S., Sakaguchi K., Shen S., Mercer W. E., Vande Woude G. F., O'Connor P. M., Appella E. (1997) Wip1, a novel human protein phosphatase that is induced in response to ionizing radiation in a p53-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 6048-6053. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.12.6048>.
- Flández M., Cosano I. C., 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>.
- Frydlova I., Malcova I., Vasicova P., Hasek J. (2009) Deregulation of DSE1 gene expression results in aberrant budding within the birth scar and cell wall integrity pathway activation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 8: 586-594. <https://doi.org/10.1128/EC.00376-08>.
- Fung K. Y., Dai L., Trimble W. S. (2014) Cell and molecular biology of septins. *Int Rev Cell Mol Biol* 310: 289-339. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-800180-6.00007-4>.

- García-Rodríguez L. J., Crider D. G., Gay A. C., Salanueva I. J., Boldogh I. R., Pon L. A. (2009) Mitochondrial inheritance is required for MEN-regulated cytokinesis in budding yeast. *Curr Biol* 19: 1730-1735. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2009.08.041>.
- García G., Ill., Bertin A., Li Z., Song Y., McMurray M. A., Thorner J., Nogales E. (2011) Subunit-dependent modulation of septin assembly: budding yeast septin Shs1 promotes ring and gauze formation. *J Cell Biol* 195: 993-1004. <https://doi.org/10.1083/jcb.201107123>.
- García R., Bermejo C., Grau C., Pérez R., Rodríguez-Peña J. M., Francois J., Nombela C., Arroyo J. (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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M312954200>.
- García R., Rodríguez-Peña J. M., Bermejo C., Nombela C., Arroyo J. (2009) 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* 284: 10901-10911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808693200>.
- García R., Sanz A. B., Rodríguez-Peña J. M., Nombela C., Arroyo J. (2016) Rlm1 mediates positive autoregulatory transcriptional feedback that is essential for Slt2-dependent gene expression. *J Cell Sci* 129: 1649-1660. <https://doi.org/10.1242/jcs.180190>.
- Gelens L., Qian J., Bollen M., Saurin A. T. (2018) The Importance of Kinase-Phosphatase Integration: Lessons from Mitosis. *Trends Cell Biol* 28: 6-21. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.09.005>.
- Gladfelter A. S., Pringle J. R., Lew D. J. (2001) The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr Opin Microbiol* 4: 681-689. [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(01\)00269-7](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(01)00269-7).
- Goffeau A., Barrell B. G., Bussey H., Davis R. W., Dujon B., Feldmann H., Galibert F., Hoheisel J. D., Jacq C., Johnston M., Louis E. J., Mewes H. W., Murakami Y., Philippsen P., Tettelin H., Oliver S. G. (1996) Life with 6000 genes. *Science* 274: 546, 563-547. <https://doi.org/10.1126/science.274.5287.546>.
- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20071709>.
- González-Rubio G., Sellers-Moya Á., Martín H., Molina M. (2021) A walk-through MAPK structure and functionality with the 30-year-old yeast MAPK Slt2. *Int Microbiol*. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00183-z>.
- González A., Ruiz A., Casamayor A., Ariño J. (2009) Normal function of the yeast TOR pathway requires the type 2C protein phosphatase Ptc1. *Mol Cell Biol* 29: 2876-2888. <https://doi.org/10.1128/mcb.01740-08>.
- González A., Ruiz A., Serrano R., Ariño J., Casamayor A. (2006) Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *J Biol Chem* 281: 35057-35069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M607919200>.
- Green R., Lesage G., Sdicu A. M., Ménard P., Bussey H. (2003) A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology (Reading)* 149: 2487-2499. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26471-0>.
- Guo S., Shen X., Yan G., Ma D., Bai X., Li S., Jiang Y. (2009) A MAP kinase dependent feedback mechanism controls Rho1 GTPase and actin distribution in yeast. *PLoS One* 4: e6089. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006089>.
- Haase S. B. (2004) Cell cycle analysis of budding yeast using SYTOX Green. *Curr Protoc Cytom* Chapter 7: Unit 7.23. <https://doi.org/10.1002/0471142956.cy0723s26>.
- Haase S. B., Reed S. I. (2002) Improved flow cytometric analysis of the budding yeast cell cycle. *Cell Cycle* 1: 132-136.
- Haase S. B., Wittenberg C. (2014) Topology and control of the cell-cycle-regulated transcriptional circuitry. *Genetics* 196: 65-90. <https://doi.org/10.1534/genetics.113.152595>.

- Hanks S. K., Hunter T. (1995) Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *Faseb j* 9: 576-596.
- Harrison J. C., Bardes E. S., Ohya Y., Lew D. J. (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>.
- Hartwell L. H., Culotti J., Pringle J. R., Reid B. J. (1974) Genetic control of the cell division cycle in yeast. *Science* 183: 46-51. <https://doi.org/10.1126/science.183.4120.46>.
- Hartwell L. H., Weinert T. A. (1989) Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. *Science* 246: 629-634. <https://doi.org/10.1126/science.2683079>.
- Haystead T. A., Dent P., Wu J., Haystead C. M., Sturgill T. W. (1992) Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett* 306: 17-22. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(92\)80828-5](https://doi.org/10.1016/0014-5793(92)80828-5).
- Heinisch J. J., Rodicio R. (2018) Protein kinase C in fungi-more than just cell wall integrity. *FEMS Microbiol Rev* 42. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux051>.
- Hernández-Rodríguez Y., Momany M. (2012) Posttranslational modifications and assembly of septin heteropolymers and higher-order structures. *Curr Opin Microbiol* 15: 660-668. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2012.09.007>.
- Honda T., Obara Y., Yamauchi A., Couvillon A. D., Mason J. J., 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>.
- Hruby A., Zapatka M., Heucke S., Rieger L., Wu Y., Nussbaumer U., Timmermann S., Dünkler A., Johnsson N. (2011) A constraint network of interactions: protein-protein interaction analysis of the yeast type II phosphatase Ptc1p and its adaptor protein Nbp2p. *J Cell Sci* 124: 35-46. <https://doi.org/10.1242/jcs.077065>.
- Huang D., Friesen H., Andrews B. (2007) Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol* 66: 303-314. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05914.x>.
- Huber A., Bodenmiller B., Uotila A., Stahl M., Wanka S., Gerrits B., Aebersold R., Loewith R. (2009) Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev* 23: 1929-1943. <https://doi.org/10.1101/gad.532109>.
- Hughes Hallett J. E., Luo X., Capaldi A. P. (2014) State transitions in the TORC1 signaling pathway and information processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 198: 773-786. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.168369>.
- Humphreys J. M., Piala A. T., Akella R., He H., Goldsmith E. J. (2013) Precisely ordered phosphorylation reactions in the p38 mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. *J Biol Chem* 288: 23322-23330. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462101>.
- Inagaki M., Schmelzle T., Yamaguchi K., Irie K., Hall M. N., Matsumoto K. (1999) PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol Cell Biol* 19: 8344-8352. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.12.8344>.
- Inoue H., Nojima H., Okayama H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96: 23-28. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90336-p](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90336-p).
- Iñesta-Vaquera F. A., Campbell D. G., Tournier C., Gómez N., Lizcano J. M., 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 K. S., Levin D. E., 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.13.5.3076-3083.1993>.

- Jacinto E., Guo B., Arndt K. T., Schmelzle T., Hall M. N. (2001) TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell* 8: 1017-1026. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(01\)00386-0](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(01)00386-0).
- Jacoby T., Flanagan H., Faykin A., Seto A. G., Mattison C., Ota I. (1997) Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J Biol Chem* 272: 17749-17755. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17749>.
- Jaspersen S. L., Charles J. F., Morgan D. O. (1999) Inhibitory phosphorylation of the APC regulator Hct1 is controlled by the kinase Cdc28 and the phosphatase Cdc14. *Curr Biol* 9: 227-236. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(99\)80111-0](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(99)80111-0).
- Jendretzki A., Wittland J., Wilk S., Straede A., Heinisch J. J. (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>.
- Jiang B., Ram A. F., Sheraton J., Klis F. M., Bussey H. (1995) Regulation of cell wall beta-glucan assembly: PTC1 negatively affects PBS2 action in a pathway that includes modulation of EXG1 transcription. *Mol Gen Genet* 248: 260-269. <https://doi.org/10.1007/bf02191592>.
- Jiang Y., Broach J. R. (1999) Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *Embo j* 18: 2782-2792. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.10.2782>.
- Jiménez-Gutiérrez E., Alegría-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>.
- Jiménez-Sánchez M., Cid V. J., 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>.
- Jiménez J., Ricco N., Grijota-Martínez C., Fadó R., Clotet J. (2013) Redundancy or specificity? The role of the CDK Pho85 in cell cycle control. *Int J Biochem Mol Biol* 4: 140-149.
- Jin C., Strich R., Cooper K. F. (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 Y., Taylor Eves P., Tang F., Weisman L. S. (2009) PTC1 is required for vacuole inheritance and promotes the association of the myosin-V vacuole-specific receptor complex. *Mol Biol Cell* 20: 1312-1323. <https://doi.org/10.1091/mbc.E08-09-0954>.
- Jin Y., Weisman L. S. (2015) The vacuole/lysosome is required for cell-cycle progression. *Elife* 4. <https://doi.org/10.7554/eLife.08160>.
- Jing H., Liu H., Zhang L., Gao J., Song H., Tan X. (2018) Ethanol Induces Autophagy Regulated by Mitochondrial ROS in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Microbiol Biotechnol* 28: 1982-1991. <https://doi.org/10.4014/jmb.1806.06014>.
- Johnson E. S., Blobel G. (1999) Cell cycle-regulated attachment of the ubiquitin-related protein SUMO to the yeast septins. *J Cell Biol* 147: 981-994. <https://doi.org/10.1083/jcb.147.5.981>.
- Jung U. S., Levin D. E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* 34: 1049-1057. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1999.01667.x>.
- Jung U. S., Sobering A. K., Romeo M. J., Levin D. E. (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 U. S., Piotrowski J., 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. <https://doi.org/10.1101/gad.9.13.1559>.

- Kamps M. P., Taylor S. S., Sefton B. M. (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>.
- Keaton M. A., Lew D. J. (2006) Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in the yeast morphogenesis checkpoint. *Curr Opin Microbiol* 9: 540-546. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2006.10.004>.
- Keshet Y., Seger R. (2010) The MAP kinase signaling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol Biol* 661: 3-38. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-795-2_1.
- Khan A., Newby J., Gladfelter A. S. (2018) Control of septin filament flexibility and bundling by subunit composition and nucleotide interactions. *Mol Biol Cell* 29: 702-712. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-10-0608>.
- Kim K. Y., Levin D. E. (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 K. Y., Truman A. W., Caesar S., Schlenstedt G., 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-11-0923>.
- Kim K. Y., Truman A. W., 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. <https://doi.org/10.1128/mcb.01795-07>.
- Kinoshita E., Kinoshita-Kikuta E. (2011) Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* 11: 319-323. <https://doi.org/10.1002/pmic.201000472>.
- 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>.
- Koch C., Nasmyth K. (1994) Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 6: 451-459. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(94\)90039-6](https://doi.org/10.1016/0955-0674(94)90039-6).
- Kono K., Al-Zain A., Schroeder L., Nakanishi M., Ikui A. E. (2016) Plasma membrane/cell wall perturbation activates a novel cell cycle checkpoint during G1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113: 6910-6915. <https://doi.org/10.1073/pnas.1523824113>.
- Kuranda M. J., Robbins P. W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 266: 19758-19767.
- 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>.
- Lee K. S., Irie K., Gotoh Y., Watanabe Y., Araki H., Nishida E., Matsumoto K., Levin D. E. (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 N., Lee J. W., Kang G. Y., Park S. H., Kim K. P. (2019) Quantification of the Dynamic Phosphorylation Process of ERK Using Stable Isotope Dilution Selective Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Proteomics* 19: e1900086. <https://doi.org/10.1002/pmic.201900086>.
- Leskoske K. L., Roelants F. M., Emmerstorfer-Augustin A., Augustin C. M., Si E. P., Hill J. M., Thorner J. (2018) Phosphorylation by the stress-activated MAPK Slt2 down-regulates the yeast TOR complex 2. *Genes Dev* 32: 1576-1590. <https://doi.org/10.1101/gad.318709.118>.

- 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>.
- Levin D. E. (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 D. E., Bowers B., Chen C. Y., Kamada Y., Watanabe M. (1994) Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 40: 229-239.
- Lew D. J., Reed S. I. (1995) A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in budding yeast. *J Cell Biol* 129: 739-749. <https://doi.org/10.1083/jcb.129.3.739>.
- Li J., Yan G., Liu S., Jiang T., Zhong M., Yuan W., Chen S., Zheng Y., Jiang Y., Jiang Y. (2017) Target of rapamycin complex 1 and Tap42-associated phosphatases are required for sensing changes in nitrogen conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 106: 938-948. <https://doi.org/10.1111/mmi.13858>.
- Li X., Du Y., Siegel S., Ferro-Novick S., Novick P. (2010) Activation of the mitogen-activated protein kinase, Slt2p, at bud tips blocks a late stage of endoplasmic reticulum inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 21: 1772-1782. <https://doi.org/10.1091/mbc.e09-06-0532>.
- Litsios A., Huberts D., Terpstra H. M., Guerra P., Schmidt A., Buczak K., Papagiannakis A., Rovetta M., Hekelaar J., Hubmann G., Exterkate M., Miliadis-Argeitis A., Heinemann M. (2019) Differential scaling between G1 protein production and cell size dynamics promotes commitment to the cell division cycle in budding yeast. *Nat Cell Biol* 21: 1382-1392. <https://doi.org/10.1038/s41556-019-0413-3>.
- Liu W., Xie Y., Ma J., Luo X., Nie P., Zuo Z., Lahrman U., Zhao Q., Zheng Y., Zhao Y., Xue Y., Ren J. (2015) IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. *Bioinformatics* 31: 3359-3361. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv362>.
- Loewith R., Hall M. N. (2011) Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics* 189: 1177-1201. <https://doi.org/10.1534/genetics.111.133363>.
- Looke M., Kristjuhan K., Kristjuhan A. (2011) Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. *Biotechniques* 50: 325-328. <https://doi.org/10.2144/000113672>.
- Lopez M. S., Kliegman J. I., Shokat K. M. (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 J. P., Schmitteckert E. M., Lohse M. J. (2009) A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat Med* 15: 75-83. <https://doi.org/10.1038/nm.1893>.
- Lu X., Ma O., Nguyen T. A., Jones S. N., Oren M., Donehower L. A. (2007) The Wip1 Phosphatase acts as a gatekeeper in the p53-Mdm2 autoregulatory loop. *Cancer Cell* 12: 342-354. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2007.08.033>.
- Madhani H. D. (2007) From a to α . *Yeast as a Model for Cellular Differentiation*. Cold Spring Harbor. Laboratory Press, New York. pp. 108.
- Madrid M., Vázquez-Marín B., Franco A., Soto T., Vicente-Soler J., Gacto M., Cansado J. (2016) Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. *Sci Rep* 6: 37515. <https://doi.org/10.1038/srep37515>.
- Malleshaiah M. K., Shahrezaei V., Swain P. S., Michnick S. W. (2010) The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast. *Nature* 465: 101-105. <https://doi.org/10.1038/nature08946>.

- Manjithaya R., Jain S., Farré J. C., Subramani S. (2010) A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways. *J Cell Biol* 189: 303-310. <https://doi.org/10.1083/jcb.200909154>.
- Mao K., Wang K., Zhao M., Xu T., Klionsky D. J. (2011) Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 193: 755-767. <https://doi.org/10.1083/jcb.201102092>.
- Mapes J., Ota I. M. (2004) Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *Embo j* 23: 302-311. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600036>.
- Marín M. J., Flández M., Bermejo C., Arroyo J., Martín H., Molina M. (2009) Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Mol Genet Genomics* 281: 345-359. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0415-5>.
- Marquardt J., Chen X., Bi E. (2019) Architecture, remodeling, and functions of the septin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 76: 7-14. <https://doi.org/10.1002/cm.21475>.
- Martín H., Arroyo J., Sánchez M., Molina M., 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. <https://doi.org/10.1007/bf00280215>.
- Martín H., Flandez 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>.
- Martín H., Rodríguez-Pachón J. M., 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>.
- Martín H., Shales M., Fernández-Piñar P., Wei P., Molina M., Fiedler D., Shokat K. M., Beltrao P., Lim W., Krogan N. J. (2015) Differential genetic interactions of yeast stress response MAPK pathways. *Mol Syst Biol* 11: 800. <https://doi.org/10.15252/msb.20145606>.
- Mascaraque V., Hernaez M. L., Jimenez-Sanchez M., Hansen R., Gil C., Martin H., Cid V. J., Molina M. (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. <https://doi.org/10.1074/mcp.M112.020438>.
- Matellán L., Monje-Casas F. (2020) Regulation of Mitotic Exit by Cell Cycle Checkpoints: Lessons From *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes (Basel)* 11. <https://doi.org/10.3390/genes11020195>.
- Mazanka E., Alexander J., Yeh B. J., Charoenpong P., Lowery D. M., Yaffe M., Weiss E. L. (2008) The NDR/LATS family kinase Cbk1 directly controls transcriptional asymmetry. *PLoS Biol* 6: e203. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060203>.
- McMillan J. N., Sia R. A., Lew D. J. (1998) A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. *J Cell Biol* 142: 1487-1499. <https://doi.org/10.1083/jcb.142.6.1487>.
- McMurray M. A., Thorner J. (2009a) Reuse, replace, recycle. Specificity in subunit inheritance and assembly of higher-order septin structures during mitotic and meiotic division in budding yeast. *Cell Cycle* 8: 195-203. <https://doi.org/10.4161/cc.8.2.7381>.
- McMurray M. A., Thorner J. (2009b) Septins: molecular partitioning and the generation of cellular asymmetry. *Cell Div* 4: 18. <https://doi.org/10.1186/1747-1028-4-18>.
- Meitinger F., Palani S. (2016) Actomyosin ring driven cytokinesis in budding yeast. *Semin Cell Dev Biol* 53: 19-27. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.01.043>.
- Méndez E., Gomar-Alba M., Bañó M. C., Mendoza M., Quilis I., Igual J. C. (2020) The budding yeast Start repressor Whi7 differs in regulation from Whi5, emerging as a major cell cycle brake in response to stress. *J Cell Sci* 133. <https://doi.org/10.1242/jcs.251413>.

- Mitchell L., Lau A., Lambert J. P., Zhou H., Fong Y., Couture J. F., Figeys D., Baetz K. (2011) Regulation of septin dynamics by the *Saccharomyces cerevisiae* lysine acetyltransferase NuA4. *PLoS One* 6: e25336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025336>.
- Mittelstadt P. R., Yamaguchi H., Appella E., Ashwell J. D. (2009) T cell receptor-mediated activation of p38 $\{\alpha\}$ by mono-phosphorylation of the activation loop results in altered substrate specificity. *J Biol Chem* 284: 15469-15474. <https://doi.org/10.1074/jbc.M901004200>.
- Mizushima N. (2020) The ATG conjugation systems in autophagy. *Curr Opin Cell Biol* 63: 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.12.001>.
- Mohammadi S., Saberidokht B., Subramaniam S., Grama A. (2015) Scope and limitations of yeast as a model organism for studying human tissue-specific pathways. *BMC Syst Biol* 9: 96. <https://doi.org/10.1186/s12918-015-0253-0>.
- Moll T., Tebb G., Surana U., Robitsch H., Nasmyth K. (1991) The role of phosphorylation and the CDC28 protein kinase in cell cycle-regulated nuclear import of the *S. cerevisiae* transcription factor SWI5. *Cell* 66: 743-758. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90118-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90118-i).
- 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>.
- 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>.
- Nagiec M. J., McCarter P. C., Kelley J. B., Dixit G., Elston T. C., Dohlman H. G. (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>.
- Nair U., Thumm M., Klionsky D. J., Krick R. (2011) GFP-Atg8 protease protection as a tool to monitor autophagosome biogenesis. *Autophagy* 7: 1546-1550. <https://doi.org/10.4161/auto.7.12.18424>.
- Nakatogawa H. (2020) Mechanisms governing autophagosome biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 21: 439-458. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0241-0>.
- Nanahoshi M., Nishiuma T., Tsujishita Y., Hara K., Inui S., Sakaguchi N., Yonezawa K. (1998) Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein and its yeast homolog Tap42. *Biochem Biophys Res Commun* 251: 520-526. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9493>.
- Negishi T., Veis J., Hollenstein D., Sekiya M., Ammerer G., Ohya Y. (2016) The Late S-Phase Transcription Factor Hcm1 Is Regulated through Phosphorylation by the Cell Wall Integrity Checkpoint. *Mol Cell Biol* 36: 941-953. <https://doi.org/10.1128/mcb.00952-15>.
- Nelson B., Kurischko C., Horecka J., Mody M., Nair P., Pratt L., Zougman A., McBroom L. D., Hughes T. R., Boone C., Luca F. C. (2003) RAM: a conserved signaling network that regulates Ace2p transcriptional activity and polarized morphogenesis. *Mol Biol Cell* 14: 3782-3803. <https://doi.org/10.1091/mbc.e03-01-0018>.
- Nguyen A. N., Shiozaki K. (1999) Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev* 13: 1653-1663. <https://doi.org/10.1101/gad.13.13.1653>.
- Nishi H., Shaytan A., Panchenko A. R. (2014) Physicochemical mechanisms of protein regulation by phosphorylation. *Front Genet* 5: 270. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00270>.
- Niwa M. (2020) A cell cycle checkpoint for the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1867: 118825. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2020.118825>.
- Noda T. (2017) Regulation of Autophagy through TORC1 and mTORC1. *Biomolecules* 7. <https://doi.org/10.3390/biom7030052>.

- Novarina D., Guerra P., Miliás-Argeitis A. (2021) Vacuolar Localization via the N-terminal Domain of Sch9 is Required for TORC1-dependent Phosphorylation and Downstream Signal Transduction. *J Mol Biol* 433: 167326. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2021.167326>.
- Oka A., Sugisaki H., Takanami M. (1981) Nucleotide sequence of the kanamycin resistance transposon Tn903. *J Mol Biol* 147: 217-226. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90438-1](https://doi.org/10.1016/0022-2836(81)90438-1).
- Oppermann F. S., Gnad F., Olsen J. V., Hornberger R., Greff Z., Kéri G., Mann M., Daub H. (2009) Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol Cell Proteomics* 8: 1751-1764. <https://doi.org/10.1074/mcp.M800588-MCP200>.
- Outeiro T. F., Giorgini F. (2006) Yeast as a drug discovery platform in Huntington's and Parkinson's diseases. *Biotechnol J* 1: 258-269. <https://doi.org/10.1002/biot.200500043>.
- Ozaki K., Tanaka K., Imamura H., Hihara T., Kameyama T., Nonaka H., Hirano H., Matsuura Y., Takai Y. (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.
- Palacios L., Dickinson R. J., Sacristán-Reviriego A., Didmon M. P., Marín M. J., Martín H., Keyse S. M., 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>.
- Pan F., Malmberg R. L., Momany M. (2007) Analysis of septins across kingdoms reveals orthology and new motifs. *BMC Evol Biol* 7: 103. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-103>.
- Parzych K. R., Klionsky D. J. (2014) An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxid Redox Signal* 20: 460-473. <https://doi.org/10.1089/ars.2013.5371>.
- Patwardhan P., Miller W. T. (2007) Processive phosphorylation: mechanism and biological importance. *Cell Signal* 19: 2218-2226. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2007.06.006>.
- Pearson A. J., Fullwood P., Toro Tapia G., Prise I., Smith M. P., Xu Q., Jordan A., Giurisato E., Whitmarsh A. J., 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>.
- Pedruzzi I., Dubouloz F., Cameroni E., Wanke V., Roosen J., Winderickx J., De Virgilio C. (2003) TOR and PKA signaling pathways converge on the protein kinase Rim15 to control entry into G0. *Mol Cell* 12: 1607-1613. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(03\)00485-4](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(03)00485-4).
- Peter M., Gartner A., Horecka J., Ammerer G., Herskowitz I. (1993) FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* 73: 747-760. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90254-n](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90254-n).
- Petkova M. I., Pujol-Carrion N., Arroyo J., García-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>.
- Petkova M. I., Pujol-Carrion N., de la Torre-Ruiz M. A. (2012) Mtl1 O-mannosylation mediated by both Pmt1 and Pmt2 is important for cell survival under oxidative conditions and TOR blockade. *Fungal Genet Biol* 49: 903-914. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2012.08.005>.
- Philip B., 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. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.271-280.2001>.
- Piccirillo S., Neog D., Spade D., Van Horn J. D., Tiede-Lewis L. M., Dallas S. L., Kapros T., Honigberg S. M. (2017) Shrinking Daughters: Rlm1-Dependent G1/S Checkpoint Maintains *Saccharomyces cerevisiae* Daughter Cell Size and Viability. *Genetics* 206: 1923-1938. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.204206>.

- Pruyne D., Legesse-Miller A., Gao L., Dong Y., Bretscher A. (2004) Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20: 559-591. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.20.010403.103108>.
- Qie B., Lyu Z., Lyu L., Liu J., Gao X., Liu Y., Duan W., Zhang N., Du L., Liu K. (2015) Sch9 regulates intracellular protein ubiquitination by controlling stress responses. *Redox Biol* 5: 290-300. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.06.002>.
- Queralt E., 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. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.045005>.
- Quilis I., Gomar-Alba M., Igual J. C. (2021) The CWI Pathway: A Versatile Toolbox to Arrest Cell-Cycle Progression. *Journal of Fungi* 7: 1041.
- Renz C., Oeljeklaus S., Grinhagens S., Warscheid B., Johnsson N., Gronemeyer T. (2016) Identification of Cell Cycle Dependent Interaction Partners of the Septins by Quantitative Mass Spectrometry. *PLoS One* 11: e0148340. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148340>.
- Rhind N., Russell P. (2012) Signaling pathways that regulate cell division. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a005942>.
- Rikova K., Guo A., Zeng Q., Possemato A., Yu J., Haack H., Nardone J., Lee K., Reeves C., Li Y., Hu Y., Tan Z., Stokes M., Sullivan L., Mitchell J., Wetzel R., Macneill J., Ren J. M., Yuan J., Bakalarski C. E., Villen J., Kornhauser J. M., Smith B., Li D., Zhou X., Gygi S. P., Gu T. L., Polakiewicz R. D., Rush J., Comb M. J. (2007) Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* 131: 1190-1203. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.025>.
- Robinson M. K., van Zyl W. H., Phizicky E. M., Broach J. R. (1994) TPD1 of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a protein phosphatase 2C-like activity implicated in tRNA splicing and cell separation. *Mol Cell Biol* 14: 3634-3645. <https://doi.org/10.1128/mcb.14.6.3634-3645.1994>.
- Roeder A. D., Hermann G. J., Keegan B. R., Thatcher S. A., Shaw J. M. (1998) Mitochondrial inheritance is delayed in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the serine/threonine phosphatase PTC1. *Mol Biol Cell* 9: 917-930. <https://doi.org/10.1091/mbc.9.4.917>.
- Roosen J., Engelen K., Marchal K., Mathys J., Griffioen G., Camerini E., Thevelein J. M., De Virgilio C., De Moor B., Winderickx J. (2005) PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability. *Mol Microbiol* 55: 862-880. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04429.x>.
- 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>.
- Rothstein R. (1991) Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. *Methods Enzymol* 194: 281-301. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)94022-5](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)94022-5).
- Ruiz A., González A., García-Salcedo R., Ramos J., Ariño J. (2006) Role of protein phosphatases 2C on tolerance to lithium toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 62: 263-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05370.x>.
- Ruiz A., Xu X., Carlson M. (2013) Ptc1 protein phosphatase 2C contributes to glucose regulation of SNF1/AMP-activated protein kinase (AMPK) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 288: 31052-31058. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.503763>.
- 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>.
- Sacristán-Reviriego A., Martín H., Molina M. (2015) Identification of putative negative regulators of yeast signaling through a screening for protein phosphatases acting on cell wall

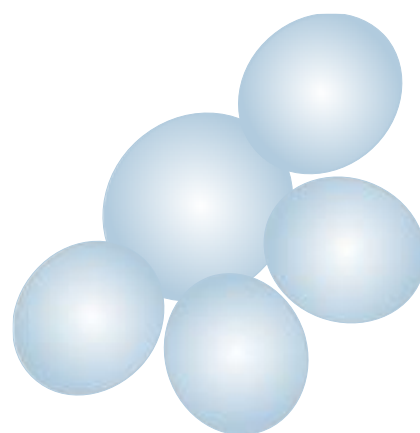
- integrity and mating MAPK pathways. *Fungal Genet Biol* 77: 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2015.02.011>.
- Sacristán-Reviriego A., Molina M., Martín H. (2016) Methods to Study Protein Tyrosine Phosphatases Acting on Yeast MAPKs. *Methods Mol Biol* 1447: 385-398. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3746-2_21.
- Sambrook J., Russell D. W. (2001) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Santhanam A., Hartley A., Düvel K., Broach J. R., Garrett S. (2004) PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryot Cell* 3: 1261-1271. <https://doi.org/10.1128/ec.3.5.1261-1271.2004>.
- Sanz A. B., García R., Rodríguez-Peña J. M., 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>.
- Saputo S., Chabrier-Rosello Y., Luca F. C., Kumar A., Krysan D. J. (2012) The RAM network in pathogenic fungi. *Eukaryot Cell* 11: 708-717. <https://doi.org/10.1128/ec.00044-12>.
- Sbia M., Parnell E. J., Yu Y., Olsen A. E., Kretschmann K. L., Voth W. P., Stillman D. J. (2008) Regulation of the yeast Ace2 transcription factor during the cell cycle. *J Biol Chem* 283: 11135-11145. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800196200>.
- Schmelzle T., Helliwell S. B., Hall M. N. (2002) Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol* 22: 1329-1339. <https://doi.org/10.1128/mcb.22.5.1329-1339.2002>.
- Schmidt A., Beck T., Koller A., Kunz J., Hall M. N. (1998) The TOR nutrient signalling pathway phosphorylates NPR1 and inhibits turnover of the tryptophan permease. *Embo j* 17: 6924-6931. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.23.6924>.
- Schneider B. L., Yang Q. H., Futcher A. B. (1996) Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* 272: 560-562. <https://doi.org/10.1126/science.272.5261.560>.
- Schuldiner M., Collins S. R., Thompson N. J., Denic V., Bhamidipati A., Punna T., Ihmels J., Andrews B., Boone C., Greenblatt J. F., Weissman J. S., Krogan N. J. (2005) Exploration of the function and organization of the yeast early secretory pathway through an epistatic miniarray profile. *Cell* 123: 507-519. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.031>.
- Schwob E., Böhm T., Mendenhall M. D., Nasmyth K. (1994) The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* 79: 233-244. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90193-7](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90193-7).
- Seeley E. S., Kato M., Margolis N., Wickner W., Eitzen G. (2002) Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell* 13: 782-794. <https://doi.org/10.1091/mbc.01-10-0512>.
- Serrano R., Bernal D., Simón E., Ariño 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., Martín H., Casamayor A., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604497200>.
- Shaner N. C., Campbell R. E., Steinbach P. A., Giepmans B. N., Palmer A. E., Tsien R. Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22: 1567-1572. <https://doi.org/10.1038/nbt1037>.
- Shaner N. C., Lambert G. G., Chammas A., Ni Y., Cranfill P. J., Baird M. A., Sell B. R., Allen J. R., Day R. N., Israelsson M., Davidson M. W., Wang J. (2013) A bright monomeric green fluorescent protein derived from *Branchiostoma lanceolatum*. *Nat Methods* 10: 407-409. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2413>.

- Shulewitz M. J., Inouye C. J., Thorner J. (1999) Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19: 7123-7137. <https://doi.org/10.1128/mcb.19.10.7123>.
- Sikorski R. S., 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. <https://doi.org/10.1093/genetics/122.1.19>.
- Smolka M. B., Chen S. H., Maddox P. S., Enserink J. M., Albuquerque C. P., Wei X. X., Desai A., Kolodner R. D., Zhou H. (2006) An FHA domain-mediated protein interaction network of Rad53 reveals its role in polarized cell growth. *J Cell Biol* 175: 743-753. <https://doi.org/10.1083/jcb.200605081>.
- Soler M., Plovins A., Martín H., Molina M., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi.17050833.x>.
- Soulard A., Cremonesi A., Moes S., Schütz F., Jenö P., 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-03-0182>.
- Staleva L., Hall A., Orlov 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. <https://doi.org/10.1091/mbc.e04-02-0142>.
- Stanger K., Gorelik M., Davidson A. R. (2012) Yeast adaptor protein, Nbp2p, is conserved regulator of fungal Ptc1p phosphatases and is involved in multiple signaling pathways. *J Biol Chem* 287: 22133-22141. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.348052>.
- Stieg D. C., Willis S. D., Ganesan V., Ong K. L., Scuorzo J., Song M., Grose J., Strich R., Cooper K. F. (2018) A complex molecular switch directs stress-induced cyclin C nuclear release through SCF(Grr1)-mediated degradation of Med13. *Mol Biol Cell* 29: 363-375. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-08-0493>.
- Strich R., Cooper K. F. (2014) The dual role of cyclin C connects stress regulated gene expression to mitochondrial dynamics. *Microb Cell* 1: 318-324. <https://doi.org/10.15698/mic2014.10.169>.
- Sugden P. H., Markou T., Fuller S. J., Tham el L., Molkentin J. D., Paterson H. F., 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>.
- Sukegawa Y., Negishi T., Kikuchi Y., Ishii K., Imanari M., Ghanegolmohammadi F., Nogami S., Ohya Y. (2018) Genetic dissection of the signaling pathway required for the cell wall integrity checkpoint. *J Cell Sci* 131. <https://doi.org/10.1242/jcs.219063>.
- Suski J. M., Lebedzinska M., Bonora M., Pinton P., Duszynski J., Wieckowski M. R. (2012) Relation between mitochondrial membrane potential and ROS formation. *Methods Mol Biol* 810: 183-205. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-382-0_12.
- Suzuki K., Kirisako T., Kamada Y., Mizushima N., Noda T., Ohsumi Y. (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *Embo j* 20: 5971-5981. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.21.5971>.
- Suzuki M., Igarashi R., Sekiya M., Utsugi T., Morishita S., Yukawa M., Ohya Y. (2004) Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* 6: 861-871. <https://doi.org/10.1038/ncb1162>.
- Swayne T. C., Zhou C., Boldogh I. R., Charalel J. K., McFaline-Figueroa J. R., Thoms S., Yang C., Leung G., McInnes J., Erdmann R., Pon L. A. (2011) Role for cER and Mmr1p in anchorage

- of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Curr Biol* 21: 1994-1999. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.10.019>.
- Swinnen E., Wilms T., Idkowiak-Baldys J., Smets B., De Snijder P., Accardo S., Ghillebert R., Thevissen K., Cammue B., De Vos D., Bielawski J., Hannun Y. A., Winderickx J. (2014) The protein kinase Sch9 is a key regulator of sphingolipid metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 25: 196-211. <https://doi.org/10.1091/mbc.E13-06-0340>.
- Takeda E., Jin N., Itakura E., Kira S., Kamada Y., Weisman L. S., Noda T., Matsuura A. (2018) Vacuole-mediated selective regulation of TORC1-Sch9 signaling following oxidative stress. *Mol Biol Cell* 29: 510-522. <https://doi.org/10.1091/mbc.E17-09-0553>.
- Tang C. S., Reed S. I. (2002) Phosphorylation of the septin cdc3 in g1 by the cdc28 kinase is essential for efficient septin ring disassembly. *Cell Cycle* 1: 42-49.
- 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>.
- Tárrega C., Ríos P., Cejudo-Marín R., Blanco-Aparicio C., van den Berk L., Schepens J., Hendriks W., Tabernero L., Pulido R. (2005) ERK2 shows a restrictive and locally selective mechanism of recognition by its tyrosine phosphatase inactivators not shared by its activator MEK1. *J Biol Chem* 280: 37885-37894. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504366200>.
- Tatjer L., González A., Serra-Cardona A., Barceló A., Casamayor A., Ariño J. (2016a) The *Saccharomyces cerevisiae* Ptc1 protein phosphatase attenuates G2-M cell cycle blockage caused by activation of the cell wall integrity pathway. *Mol Microbiol* 101: 671-687. <https://doi.org/10.1111/mmi.13416>.
- 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. (2016b) 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>.
- Torres J., Di Como C. J., Herrero E., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205408200>.
- Torres L., Martín H., García-Saez M. I., 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>.
- Truman A. W., Kim K. Y., 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. <https://doi.org/10.1128/MCB.00794-09>.
- Tyers M., Futcher B. (1993) Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes. *Mol Cell Biol* 13: 5659-5669. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.9.5659-5669.1993>.
- Tyers M., Tokiwa G., Futcher B. (1993) Comparison of the *Saccharomyces cerevisiae* G1 cyclins: Cln3 may be an upstream activator of Cln1, Cln2 and other cyclins. *Embo j* 12: 1955-1968.
- Urban J., Soulard A., Huber A., Lippman S., Mukhopadhyay D., Deloche O., Wanke V., Anrather D., Ammerer G., Riezman H., Broach J. R., De Virgilio C., Hall M. N., Loewith R. (2007) Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 26: 663-674. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.04.020>.
- van Drogen F., 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. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(02\)01186-7](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(02)01186-7).

- Vázquez B., Soto T., del Dedo J. E., 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>.
- Versele M., Thorner J. (2004) Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol* 164: 701-715. <https://doi.org/10.1083/jcb.200312070>.
- Vilella F., Herrero E., Torres J., 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. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411062200>.
- Visintin R., Craig K., Hwang E. S., Prinz S., Tyers M., Amon A. (1998) The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* 2: 709-718. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80286-5](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80286-5).
- Wang W., Malcolm B. A. (1999) Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques* 26: 680-682. <https://doi.org/10.2144/99264st03>.
- Warmka J., Hanneman J., Lee J., Amin D., Ota I. (2001) Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol* 21: 51-60. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.1.51-60.2001>.
- Watanabe Y., Takaesu G., Hagiwara M., Irie K., Matsumoto K. (1997) Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* 17: 2615-2623. <https://doi.org/10.1128/mcb.17.5.2615>.
- Wei Y., Zheng X. F. (2011) Nutritional control of cell growth via TOR signaling in budding yeast. *Methods Mol Biol* 759: 307-319. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-173-4_18.
- Weinmaster G., Zoller M. J., 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.
- Weiss E. L. (2012) Mitotic exit and separation of mother and daughter cells. *Genetics* 192: 1165-1202. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.145516>.
- Weiss E. L., Kurischko C., Zhang C., Shokat K., Drubin D. G., Luca F. C. (2002) The *Saccharomyces cerevisiae* Mob2p-Cbk1p kinase complex promotes polarized growth and acts with the mitotic exit network to facilitate daughter cell-specific localization of Ace2p transcription factor. *J Cell Biol* 158: 885-900. <https://doi.org/10.1083/jcb.200203094>.
- Winkler A., Arkind C., Mattison C. P., Burkholder A., Knoche K., 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. <https://doi.org/10.1128/ec.1.2.163-173.2002>.
- Winters M. J., Pryciak P. M. (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>.
- Winters M. J., Pryciak P. M. (2019) MAPK modulation of yeast pheromone signaling output and the role of phosphorylation sites in the scaffold protein Ste5. *Mol Biol Cell* 30: 1037-1049. <https://doi.org/10.1091/mbc.E18-12-0793>.
- Wloka C., Bi E. (2012) Mechanisms of cytokinesis in budding yeast. *Cytoskeleton (Hoboken)* 69: 710-726. <https://doi.org/10.1002/cm.21046>.
- Yan G., Lai Y., Jiang Y. (2012) The TOR complex 1 is a direct target of Rho1 GTPase. *Mol Cell* 45: 743-753. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.01.028>.
- Yorimitsu T., He C., Wang K., Klionsky D. J. (2009) Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy. *Autophagy* 5: 616-624. <https://doi.org/10.4161/auto.5.5.8091>.

- Yorimitsu T., Zaman S., Broach J. R., Klionsky D. J. (2007) Protein kinase A and Sch9 cooperatively regulate induction of autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 18: 4180-4189. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-05-0485>.
- Yurko N., Liu X., Yamazaki T., Hoque M., Tian B., 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 e913. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.11.020>.
- Zhang Y., Huang X., Wang J., Wang X., Liu X., Chen Y., Xu W., Wang Y. (2019) Nitration-induced ubiquitination and degradation control quality of ERK1. *Biochem J* 476: 1911-1926. <https://doi.org/10.1042/bcj20190240>.
- Zhang Y. Y., Mei Z. Q., Wu J. W., Wang Z. X. (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>.
- Zhao Y., Zhang Z. Y. (2001) The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. *J Biol Chem* 276: 32382-32391. <https://doi.org/10.1074/jbc.M103369200>.
- Zhou B., Zhang Z. Y. (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>.
- Zimmermann A., Hofer S., Pendl T., Kainz K., Madeo F., Carmona-Gutierrez D. (2018) Yeast as a tool to identify anti-aging compounds. *FEMS Yeast Res* 18. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy020>.
- Zinzalla V., Graziola M., Mastriani A., Vanoni M., Alberghina L. (2007) Rapamycin-mediated G1 arrest involves regulation of the Cdk inhibitor Sic1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 63: 1482-1494. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05599.x>.
- Zuidema M. Y., Korthuis R. J. (2015) Intravital microscopic methods to evaluate anti-inflammatory effects and signaling mechanisms evoked by hydrogen sulfide. *Methods Enzymol* 555: 93-125. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2014.11.022>.



ANEXO

A lo largo de esta tesis doctoral, se han publicado los siguientes trabajos científicos:

- 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. <https://doi.org/10.3390/ijms20071709>.
- González-Rubio G, Sellers-Moya Á, Martín H, Molina M (2021a) 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>.
- González-Rubio G, Sellers-Moya Á, Martín H, Molina M (2021b) A walk-through MAPK structure and functionality with the 30-year-old yeast MAPK Slt2. Int Microbiol. <https://doi.org/10.1007/s10123-021-00183-z>.



Review

Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases (MKPs) in Fungal Signaling: Conservation, Function, and Regulation

Gema González-Rubio [†], Teresa Fernández-Acero [†], Humberto Martín ^{*} and María Molina ^{*}

Departamento de Microbiología y Parasitología. Facultad de Farmacia. Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; gemagonzalezrubio@ucm.es (G.G.-R.); teresafe@farm.ucm.es (T.F.-A.)

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

[†] These authors contributed equally to this work.

Received: 28 February 2019; Accepted: 3 April 2019; Published: 5 April 2019



Abstract: Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are key mediators of signaling in fungi, participating in the response to diverse stresses and in developmental processes. Since the precise regulation of MAPKs is fundamental for cell physiology, fungi bear dual specificity phosphatases (DUSPs) that act as MAP kinase phosphatases (MKPs). Whereas fungal MKPs share characteristic domains of this phosphatase subfamily, they also have specific interaction motifs and particular activation mechanisms, which, for example, allow some yeast MKPs, such as *Saccharomyces cerevisiae* Sdp1, to couple oxidative stress with substrate recognition. Model yeasts show that MKPs play a key role in the modulation of MAPK signaling flow. Mutants affected in *S. cerevisiae* Msg5 or in *Schizosaccharomyces pombe* Pmp1 display MAPK hyperactivation and specific phenotypes. MKPs from virulent fungi, such as *Candida albicans* Cpp1, *Fusarium graminearum* Msg5, and *Pyricularia oryzae* Pmp1, are relevant for pathogenicity. Apart from transcriptional regulation, MKPs can be post-transcriptionally regulated by RNA-binding proteins such as Rnc1, which stabilizes the *S. pombe* PMP1 mRNA. *P. oryzae* Pmp1 activity and *S. cerevisiae* Msg5 stability are regulated by phosphorylation and ubiquitination, respectively. Therefore, fungi offer a platform to gain insight into the regulatory mechanisms that control MKPs.

Keywords: fungal MKPs; MAPKs; signaling; Msg5; Sdp1; Pmp1; Cpp1

1. Fungi Respond to Distinct Stimuli Through MAPK Pathways

Cells communicate with the environment using an evolved machinery that allows them to interpret an external cue and translate it into an input message that permits the execution of cellular responses. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways are one of the main molecular systems involved in this process in eukaryotic organisms. Cells perceive extracellular stimuli, such as hormones, mitogens, and growth factors, through surface receptors attached to the plasma membrane, which transduce the external signal to intracellular proteins. This signal converges in the activation of a MAPK module that is conserved in eukaryotic cells and whose function is the amplification of such signal by sequential events of phosphorylation, making this system sensitive to subtle changes in the cell environment. MAPK pathways regulate a wide variety of cellular processes such as cell growth and division, metabolism, differentiation, and survival [1–3] (Figure 1).

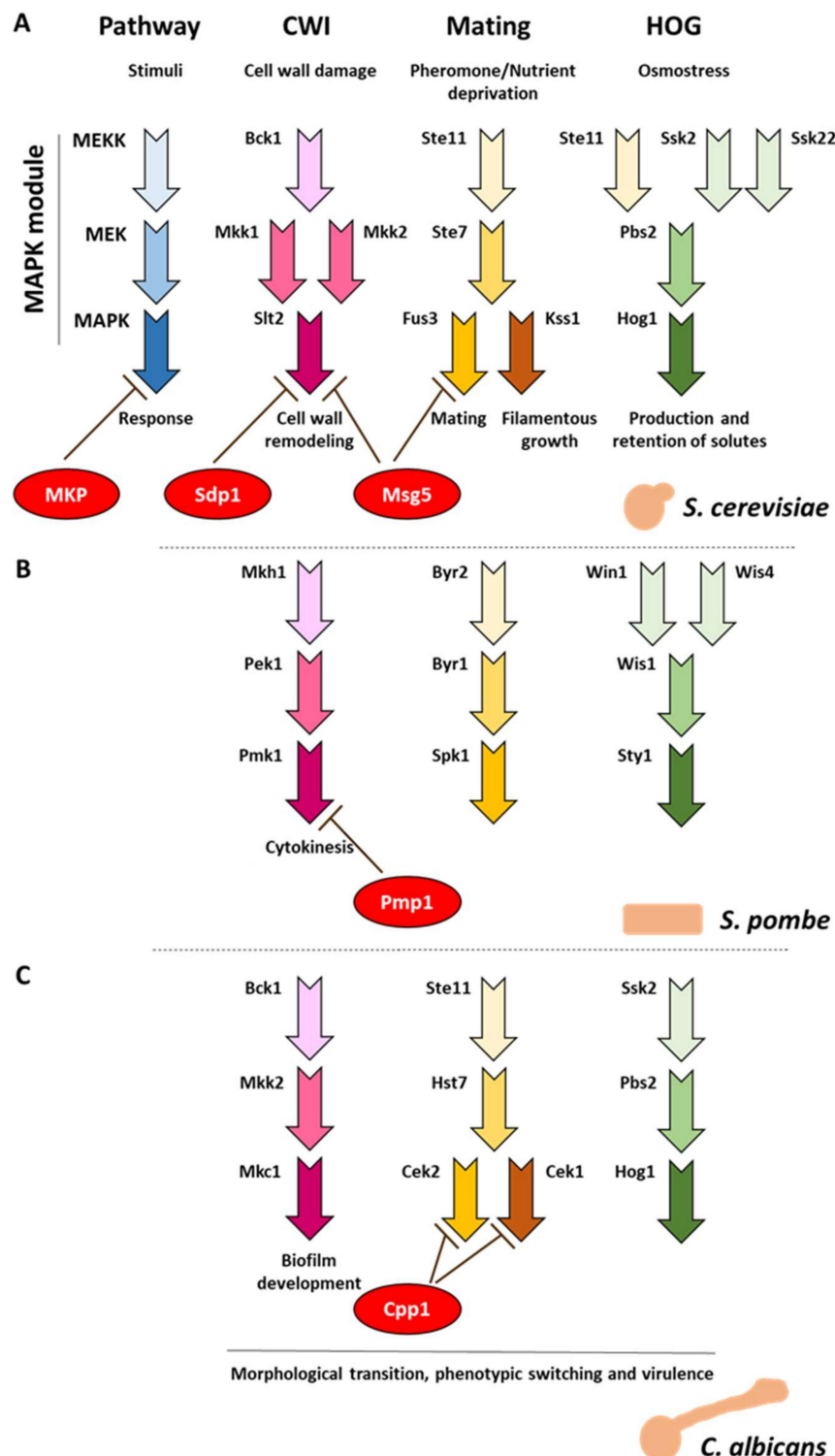


Figure 1. Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways in model fungi. At the uppermost left side, a schematic view of a MAPK pathway with the components of the MAPK module in blue and the MAP kinase phosphatase (MKP) in red. On the right side (head level), the major MAPK pathways described in fungi, Cell Wall Integrity (CWI), mating/filamentous growth and High Osmolarity Glycerol (HOG), and the stimuli that trigger their activation. The equivalent MAPK pathways are shown for the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* (A), the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* (B), and the dimorphic yeast *Candida albicans* (C). The same code of colors is shown in all cases, as indicated above.

MAPK modules are composed of three protein kinases acting in cascade. At the head level, the serine/threonine (Ser/Thr) kinase MAPKKK (MAP kinase kinase kinase), also known as MAP3K (mitogen-activated protein 3 kinase) or MEKK (MEK kinase), phosphorylates and activates its downstream effector, the MAPKK/MAP2K/MEK. The MEK, in turn, dually phosphorylates both the tyrosine and the threonine residues at the activation loop (Thr-X-Tyr) of the MAPK, which undergoes a conformational change that results in the full activation of the protein [3]. In higher eukaryotes, MAPKs are clustered into five classes: p38, ERK1/2, JNK, ERK5, and atypical MAPKs. The activated MAPK is the final component of the cascade and phosphorylates its substrates in a serine or threonine residue followed by a proline (Ser/Thr-Pro). Many of the MAPK substrates are transcription factors which, upon phosphorylation, adjust the transcriptional pattern of the cell to the particular condition determined by the stimulus. The activity of the MAPK is precisely regulated in the cell, and inappropriate modulation of these pathways is linked to several pathologies such as cancer, Parkinson's disease, inflammation, diabetes, memory dysfunction, and cardiac hypertrophy [4–6].

As eukaryotic organisms, fungi also process extracellular signals through MAPK cascades that conserve the architecture described above (Figure 1). These signaling pathways are specialized to face the different conditions that a fungus might encounter, such as high osmolarity concentrations, cell wall aggressions, mating pheromones, and, in certain cases, the presence of host factors or signals that trigger morphological transitions. Understanding the functioning of MAPK cascades in these organisms is particularly important since they are involved in the virulence of several human (e.g., *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*) and plant pathogens (e.g., *Ustilago maydis*, *Pyricularia oryzae*-sexual morph: *Magnaporthe oryzae*-, and *Ashbya gossypii*) [7,8]. The budding yeast model organism *Saccharomyces cerevisiae* has been the staple in the study of fungal MAPK signaling for its simplicity, easy handling, and genetic tractability. Many of the discoveries from research on the budding yeast have been translated not only to filamentous or dimorphic fungi, but also to higher eukaryotes. In *S. cerevisiae*, four different MAPKs were identified that regulate the high osmolarity response (Hog1), the pheromone response (Fus3), the pseudohyphal and invasive growth upon nutrient deprivation (Kss1), and the cell wall repair and integrity (Slr2). There is a fifth MAPK in *S. cerevisiae*, Smk1, which participates in spore wall formation, but no other elements of the MAPK module have been discovered yet [8–10]. In general, the main elements of the mating, high osmolarity (HOG), and cell wall integrity (CWI) MAPK pathways in fungi are conserved. These pathways are mediated by MAPKs Spk1, Sty1 and Pmk1 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, and by Cek1/2, Hog1, and Mkk1 in the dimorphic model yeast *C. albicans* (Figure 1) [11,12]. The few compositional differences of the MAPK pathways between yeast and filamentous fungi were described in previous reviews [13,14].

2. General Structure and Essential Motifs of *S. cerevisiae* MKPs

The regulation of the signaling flow is executed on multiple levels of a MAPK cascade. Rapid downregulation of the stimulation generally occurs by receptor desensitization or direct dephosphorylation by phosphatases acting on the MAPKKK, the MAPKK, or predominantly the MAPK itself. Ser/Thr or Tyr phosphatases can dephosphorylate the Thr or Tyr, respectively, at the activation loop to inactivate the MAPK. Despite the general assumption that dephosphorylation of either of these two residues is sufficient for MAPK inactivation, recent evidence suggests that some monophosphorylated MAPKs retain some activity [15–17]. However, the main negative regulation is attributed to a particular type of phosphatases belonging to the family of dual specificity phosphatases (DSPs), the MAPK phosphatases (MKPs), which eliminate the phosphate group of both Thr and Tyr residues. MKPs regulate not only the magnitude and duration of MAPK signaling, but also the subcellular localization and substrate selectivity of MAPKs [18].

The general structure of MKPs includes a non-catalytic N-terminal domain and a C-terminal catalytic domain that contains a wide pocket with the critical Cys and Arg catalytic residues within the conserved signature HCXXGXXR. An aspartic residue upstream of this signature is also essential

for catalysis. Within the N-terminal domain, a MAP kinase interaction motif (KIM), also called docking-domain or D-domain, is characteristic and defined by the presence of a cluster of basic residues followed by a hydrophobic sub-motif containing Leu, Ile, or Val separated by one residue: [K/R](1-3)-X(2-6)-[L/I/V]-X-[L/I/V] [19–21]. This domain is also found in other MAPK interactors, such as MAPKKs and MAPK substrates. The positive charge of the D-domain interacts with a negatively charged region at the MAPK called the common docking domain (CD).

Though mammalian cells contain at least 10 different MKPs, fungal cells only contain one or two. Among the putative or defined DSPs in *S. cerevisiae* (Yvh1, Cdc14, Pps1, Tep1, Msg5, Siw14/Oca3, Oca1, Oca2, Oca4, Oca6, and Sdp1), only Msg5 and Sdp1 have been shown to display MKP activity [22]. These two MKPs are encoded by paralogue genes likely originated from the ancient whole genome duplication that occurred in *S. cerevisiae* [23]. Msg5 is a 489 aa protein that negatively regulates Fus3 [24] and Slt2 [25] and presents the prototypical structure of MKPs, with a regulatory N-terminal domain and a catalytic phosphatase C-terminal domain (Figure 2). As an MKP, the cysteine 319 in its catalytic pocket is essential for its phosphatase activity. Msg5 possesses two different motifs that define its binding with the MAPKs. Msg5 bears a typical D-domain N-terminally located that mediates a canonical interaction with the CD domains of MAPKs Fus3 and Kss1. On the other hand, an unusual motif composed of Ile, Tyr, and Thr (IYT) located at positions 102–104 mediates the interaction with both Slt2 and the Slt2 pseudokinase paralogue Mlp1 through a CD-independent mechanism [26].

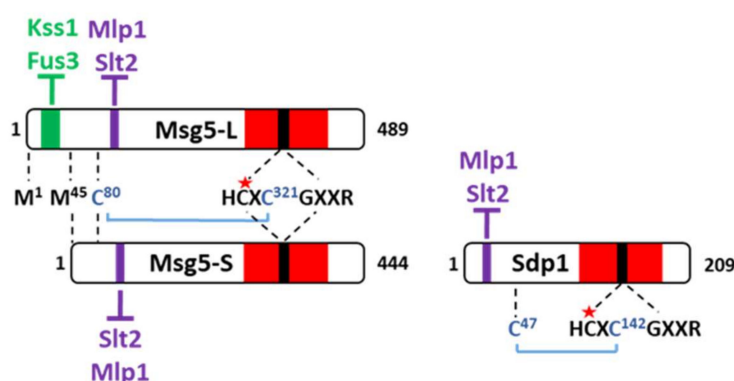


Figure 2. Diagram of the domain composition of *S. cerevisiae* MKPs Msg5, and Sdp1. Msg5-L corresponds to the long translational isoform of Msg5 and Msg5-S to the shorter one. The docking (D)-domain, IYT-motif, and phosphatase domain are drawn in green, purple, and red, respectively. The active site is represented in black and, inside this signature, the essential catalytic cysteine residue is labelled with a red star. The disulfide bond between the non-catalytic cysteine residue within the active site and its upstream cysteine partner is illustrated in blue. The target MAPKs are represented in green or purple, depending on the docking site involved in the binding.

Notably, Msg5 is not a single species, but is produced as two forms due to alternative translational initiation sites [25]. The short form lacks the first 44 amino acids and therefore does not contain the N-terminal D-domain, implying that full-length Msg5 would be able to act on both mating and CWI MAPKs, whereas the short form only would act on Slt2 (Figure 2). The physiological significance of the existence of these two forms of Msg5 remains to be established but it is tempting to speculate that it could constitute a mechanism for differential regulation of distinct MAPKs by the same MKP.

Sdp1 is only 209 amino acids long and its very short N-terminal domain presents an IYT motif that mediates interaction with Slt2 and Mlp1, but lacks the Msg5 D-domain counterpart [27]. The absence of this D-domain prevents the interaction of Sdp1 with Fus3 and Kss1, which explains why this MKP acts exclusively on the CWI pathway. The catalytic activity of both Msg5 and Sdp1 resides in the C-terminal part of the protein and, as in all MKPs, a cysteine residue at the active site is essential for its function (Figure 2).

Finally, both Msg5 and Sdp1 display enhanced catalytic activity under oxidative conditions. These phosphatases use an intramolecular disulfide bridge to recognize tyrosine-phosphorylated MAPK substrates. The bridge (Cys47–Cys142 in Sdp1 and Cys80–Cys321 in Msg5) involves a cysteine located two residues downstream of the conserved catalytic cysteine within the active site and an upstream cysteine partner out of the catalytic domain (Figure 2). This disulfide bond is critical for optimal activity of these MKPs and participates in a molecular mechanism that couples oxidative stress with substrate recognition [28].

3. Structural Conservation of Fungal MKPs

As mentioned above regarding MAPKs, orthologues of *S. cerevisiae* Msg5 are found across the fungal kingdom (Figure 3). We conducted a comparative analysis of 61 Msg5 orthologous protein sequences from a wide variety of fungi, selected from the genome databases National Center for Biotechnology Information (NCBI), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), *Saccharomyces* Genome Database (SGD), *S. pombe* database (PomBase), *Candida* Genome Database (CGD), and *Aspergillus* Genome Database (AspGD) (Table S1). Twenty-eight representative proteins from four subphyla (Saccharomycotina, Pezizomycotina, and Taphrinomycotina from phylum Ascomycota, and Ustilaginomycotina from Basidiomycota) were chosen for a deeper analysis of structural diversity. Although the structure, function, and/or regulation of some of these fungal MKPs are already known, e.g. *S. cerevisiae* Msg5 and Sdp1, *U. maydis* Rok1, *C. albicans* Cpp1, *S. pombe* Pmp1, and *P. oryzae* Pmp1, most of these proteins have not yet been characterized.

As shown in Figure 3, the phylogram resulting from the multiple protein sequence alignment of these fungal MKPs indicates that proteins from species belonging to the same subphylum cluster together, with the exception of *N. crassa* NCU05049, which is distant from the other Pezizomycotina MKPs. This phylogram reflects the evolutionary branching of fungal MKPs. An important issue to highlight is that only one MKP has been found in most species, except in *S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *U. maydis*, and *N. crassa*, which present two MKPs. In these cases, one of them is similar to ScMsg5 (*S. mikatae* smik406-g1.1, *S. paradoxus* spar252-g2.1, *U. maydis* Rok1, and *N. crassa* NCU06252), whereas the other one is closer to ScSdp1 (*S. mikatae* smik390-g11.1, *S. paradoxus* spar440-g11.1, *U. maydis* UMAG_02303, and *N. crassa* NCU05049) (Figure 3).

The size of fungal MKPs ranges from 177 (*S. mikatae* smik390-g11.1) to 1069 amino acids (*U. maydis* Rok1). In general, the larger fungal MKPs belong to Pezizomycotina, whereas the smaller ones are present in Saccharomycotina. All of them contain the distinctive active site signature motif HCXXGXXR within the typical dual specificity phosphatase catalytic region (DSPc), which is similar in size except for *U. maydis* Rok1, which displays a notably short DSPc (Figure 3). In agreement with previous observations [28], we found that the regulatory cysteine within the active site implicated in the formation of an intramolecular disulfide bridge required for full activity is conserved in all Saccharomycotina MKPs analyzed, but not in other subphyla excepting *U. maydis* Rok1 (Figure 3).

The scanning of sequences matching the consensus D-domain yielded several hits within each fungal MKP (Table S2). In the case of ScMsg5, only the one included between amino acids 29 and 38 has been proven to be responsible for its interaction with MAPKs Fus3 and Kss1 [26]. An equivalent D-domain was found in most Msg5-like MKPs of different subphyla, except in Taphrinomycotina (Figure 3), suggesting that a similar interaction mechanism with the corresponding MAPKs could be widely occurring in fungi. However, the presence of the IYT motif, known to mediate the non-canonical binding of ScMsg5 and ScSdp1 to the CWI MAPK Slt2 [27], seems to be restricted to yeast species of Saccharomycotina and Taphrinomycotina. Notably, some yeast MKPs only contain the IYT domain but not the D-domain, namely ScSdp1, SpPmp1, and SjPmp1. This could reflect their specialization in downregulating the CWI pathway.

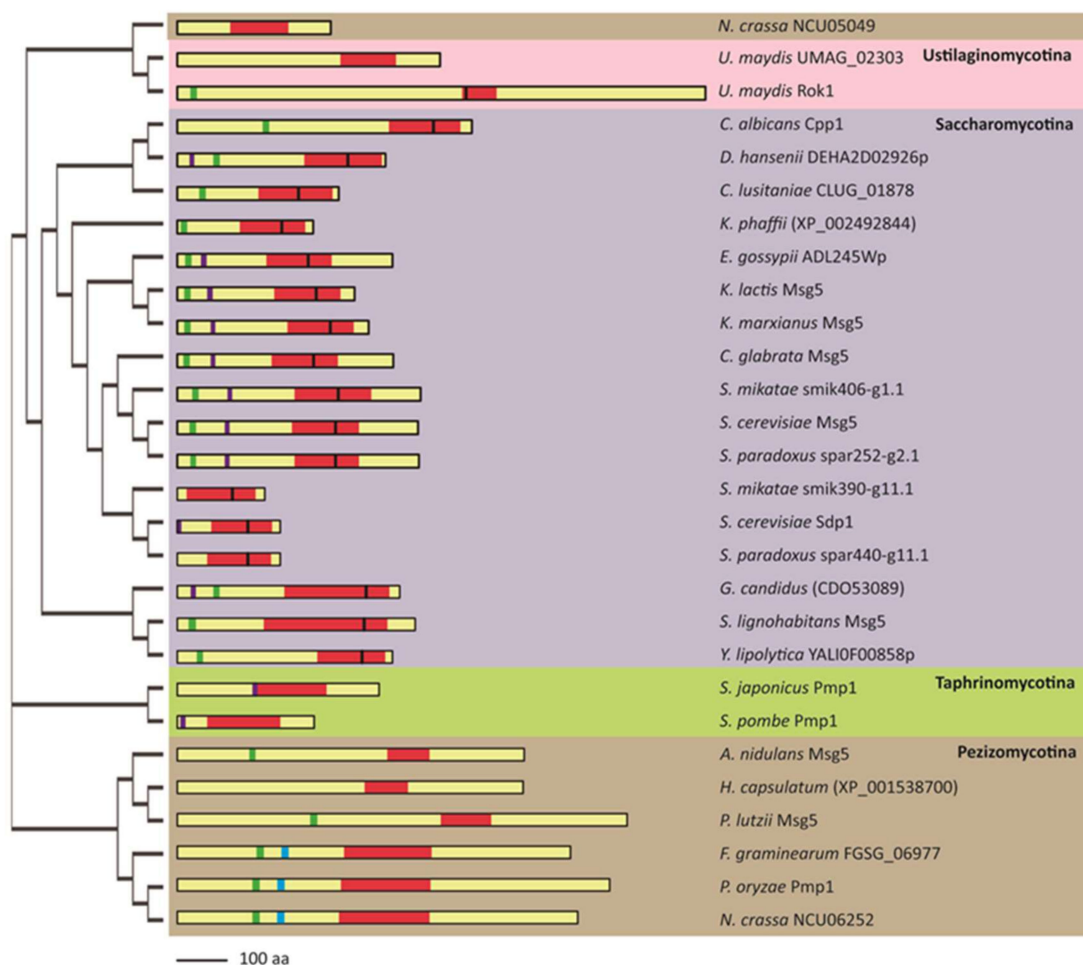


Figure 3. Phylogram and scaled scheme of the domain composition and taxonomic classification of the ScMsg5 orthologues from different fungal species. The phylogram was obtained by multiple protein sequence alignment, using Clustal Omega program (European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI), Hinxton, UK) at default settings, of ScMsg5 orthologues selected from National Center for Biotechnology Information (NCBI), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), or fungal genome databases [*Saccharomyces* Genome Database (SGD), *S. pombe* database (PomBase), *Candida* Genome Database (CGD), and *Aspergillus* Genome Database (AspGD)]. Proteins included are *Neurospora crassa* NCU05049 (XP_956423), *Ustilago maydis* UMAG_02303 (XP_011388628), *Ustilago maydis* UMAG_03701/Rok1 (XP_011390174), *Candida albicans* Cpp1 (XP_723551), *Debaryomyces hansenii* DEHA2D02926p (XP_458594), *Clavispora lusitaniae* CLUG_01878 (XP_002618419), *Komagataella phaffii* (formerly called *Pichia pastoris*) (XP_002492844), *Eremothecium gossypii* (also known as *Ashbya gossypii*) ADL245Wp (NP_983851), *Kluyveromyces lactis* KLLA0_F03597g/Msg5 (XP_455243), *Kluyveromyces marxianus* Msg5 (XP_022678215), *Candida glabrata* CAGL0G01320g/Msg5 (XP_446419), *Saccharomyces mikatae* (smik406-g1.1), *Saccharomyces cerevisiae* Msg5 (NP_014345), *Saccharomyces paradoxus* (spar252-g2.1), *Saccharomyces mikatae* (smik390-g11.1), *Saccharomyces cerevisiae* Sdp1 (NP_012153), *Saccharomyces paradoxus* (spar440-g11.1), *Galactomyces candidus* (CDO53089), *Sugiyamaella lignohabitans* Msg5 (XP_018733395), *Yarrowia lipolytica* YALIOF00858p (XP_504838), *Schizosaccharomyces japonicus* Pmp1 (XP_002174422), *Schizosaccharomyces pombe* Pmp1 (NP_595205), *Aspergillus nidulans* AN4544.2/Msg5 (XP_662148), *Histoplasma capsulatum* (XP_001538700), *Paracoccidioides lutzii* Msg5 (XP_002791021), *Fusarium graminearum* FGSG_06977 (XP_011326656), *Pyricularia oryzae* Pmp1 (XP_003712767), and *Neurospora crassa* NCU06252 (XP_962856). The ScanProsite tool (Swiss Institute of Bioinformatics, Lausanne, Switzerland) was used to search for dual specificity phosphatase catalytic (DSPc) domains (red), IYT/S motifs (purple), and D-domains (green for ScMsg5-like D-domain and blue for PoPmp1-like D-domain). All the sequences contain a DSPc domain

in the C-terminal region, including the active site signature motif HCXXGXXR. When a second cysteine that could be involved in a regulatory disulfide bridge is present at the fourth position within the active site, a black line is drawn. Several putative D-domains, characterized by the [K/R](1-3)-X(2-6)-[L/I/V]-X-[L/I/V] signature, were found for each protein (Table S2), but only those that aligned with the described ScMsg5 D-domain or the PoPmp1-like D-domain are shown. Different background colors indicate the subphylum to which the species belong: Pezizomycotina (brown), Ustilaginomycotina (pink), Saccharomycotina (blue), and Taphrinomycotina (green).

Within Saccharomycotina, the only MKPs lacking both interaction domains are *S. mikatae* smik390-g11.1 and *S. paradoxus* spar440-g11.1, even though they contain other hypothetical D-domains (Table S2), suggesting the probable use of alternative motifs for binding to the corresponding MAPKs.

P. oryzae Pmp1 has been shown to directly downregulate CWI MAPK Mps1. The region responsible for the interaction with Mps1 is highly conserved in other filamentous fungi [29] (Figure 3). This region does not include the ScMsg5-like D-domain, but another putative D-domain (Table S2) that could mediate the interaction with MAPK.

In conclusion, this analysis evidences the wide variety of interaction strategies and regulatory mechanisms that fungal MKPs possess and suggests several points to be further explored and extended to the putative fungal MKPs not yet characterized.

4. Function of Fungal MKPs

4.1. Msg5 Regulates the *S. cerevisiae* Mating Pathway by Targeting Fus3

MSG5 was initially identified as a multicopy suppressor gene of the cell cycle arrest of haploid *gpa1* mutants [24], which bear a mutation that leads to the constitutive activation of the mating pathway. MSG5 overexpression causes cells to overcome pheromone-induced arrest and reduces the expression of a typical transcriptional readout of the mating pathway. In this seminal work, Msg5 was also proven to act as a phosphatase that was able to inactivate Fus3 in vitro (Figure 1a). Since MSG5 was observed to be transcriptionally induced in response to pheromone exposure and the loss of this phosphatase increased the sensitivity of cells to pheromones, Msg5 was proposed to promote adaptation to this stimulus [24]. A negative effect on the mating pathway was soon defined for the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3, which dephosphorylate the same target, the MAPK Fus3. However, whereas Ptp2 and Ptp3 are critical in maintaining the mating pathway at a low basal activity in the absence of pheromone, Msg5 primarily participates in the inactivation of Fus3 following stimulation [30]. By employing both mathematical models and experimental data, the feedback inhibition of Fus3 by Msg5 has been proposed to be the most significant in the mid-to-late time points after pheromone-induced activation of this pathway. In contrast, the feedback inhibition of Fus3 by Ptp3 is most impactful in the early time points after the pheromone exposure [31].

Msg5 also seems to promote adaptation by regulating the subcellular distribution of Fus3. Pheromone recovery is correlated with a decrease in nuclear Fus3 [32] and, although Msg5 is distributed evenly in both the nucleus and the cytoplasm in a pheromone-independent manner, it counteracts the nuclear accumulation of Fus3 by dephosphorylating this MAPK in both cellular compartments [33]. The mechanisms underlying the downregulation of Fus3 by Msg5 also includes the involvement of monophosphorylated forms of the MAPK. A substantial pool of Fus3, which is only phosphorylated in Tyr182—the conserved Tyr residue of the MAPK activation motif—was shown to be generated in pheromone-stimulated cells. This pool of Tyr-phosphorylated kinase shows an inhibitory effect on signaling and acts in opposition to the fully phosphorylated Fus3. Importantly, cells lacking Msg5 not only show an increase in dual-phosphorylated Fus3, but also a decrease in monophosphorylated Fus3, indicating that Msg5 is involved in maintaining a pool of this inhibitory MAPK form [16].

Although overexpression of Msg5 reduces the amount of phosphorylated Kss1, this MAPK does not seem to be directly regulated by the MKP [34]. Removal of Msg5 does not result in increased

Kss1 phosphorylation but in decreased Kss1-driven FRE(Tec1)-*lacZ* expression, probably due to a Fus3-mediated effect [35].

4.2. CWI MAPK Slt2 is Regulated by the MKPs Msg5 and Sdp1 in *S. cerevisiae*

The ability of Msg5 to suppress the lethality promoted by the overexpression of *MKK1P396*, coding a hyperactive version of the MAPKK Mkk1, suggests the possibility that this DSP also acts on the CWI pathway [36]. It was later clarified that Msg5 downregulates this route since overexpression of *MSG5* eliminates the high Slt2 phosphorylation of cells lacking the Rho1 GAP Sac7, whereas disruption of *MSG5* in wild-type cells resulted in increased phospho-Slt2 levels, both at basal conditions and under cell wall stress [37]. When Msg5 was shown to bind and dephosphorylate Slt2 in vitro, this MAPK was formally identified as the target of Msg5 within the CWI pathway [25] (Figure 1a).

As occurs with other negative regulators, *msg5Δ* cells display sensitivity to cell wall stress [25], a phenotype that is likely derived from an increased CWI signaling, similar to that occurring in cells lacking the serine/threonine phosphatase Ptc1 [38]. This is also likely the mechanism underlying the vacuolar fragmentation observed in double *ptp2 msg5* mutants [39], a phenotype displayed by *ptc1* mutants and dependent on an exacerbated Slt2-mediated signaling [38]. However, although Msg5 is involved in the activation of Slt2 in the response to genotoxic stress, *msg5* mutant cells do not show sensitivity but tolerance to this stress. This could be explained by the fact that, under this particular insult, the signal enters the CWI pathway at the Slt2 level due to the degradation of Msg5 (see below), without the participation of upstream components and likely involved different outputs [40].

In contrast to Msg5, Sdp1 does not seem to regulate Slt2 in basal conditions. This phosphatase has been shown to act only under heat stress [41] and to be required for efficient Slt2 dephosphorylation during heat shock adaptation [42]. Whereas Sdp1 localizes both in nucleus and cytoplasm in basal conditions, it becomes localized in punctate spots throughout the cells upon heat shock. Many of these puncta colocalize with mitochondria, and Sdp1 reappears in the nucleus after prolonged heat stress, concurrent with Slt2 dephosphorylation [41].

4.3. *C. albicans* MKP Cpp1 Participates in Phenotypic Transition, Mating, and Virulence

Further knowledge about the functional relevance of MKPs within the subphylum Saccharomycotina was provided by studies on the dimorphic fungus and opportunistic pathogen *C. albicans*. The importance of fungal MKPs in morphogenesis is also illustrated in the case of *C. albicans* Cpp1 protein. This MKP is a negative regulator of filamentous growth and its removal derepresses hyphal formation under non-inducing conditions. This phenotype is eliminated if the MAPK Cek1 (the ScKss1 orthologue) is removed [43]. As expected, soon after this work, the Cek1 MAPK pathway was shown to be negatively regulated by Cpp1 [44] (Figure 1c). Surprisingly, Cpp1 represses hyphal gene expression by acting through a Cek1p-independent mechanism [45]. Cpp1 has been proposed to act as a key element in the crosstalk between MAPKs Hog1 and Cek1, since *hog1* and *cpp1* deletion mutants share hyperfilamentation and opaque cell formation phenotypes and display increased Cek1 activation. Moreover, *CPP1* expression is positively regulated by Hog1 [46].

Loss of Cpp1 was reported to activate the pheromone response pathway in a Cek1-dependent manner, indicating an additional role of this MKP in the mating pathway. These authors also found that basal Cek2 phosphorylation is increased in *cpp1* mutants, suggesting that Cpp1 could be downregulating Cek2 as well (Figure 1c) [47].

Pathogenicity of a homozygotic *cpp1* mutant strain is reduced in murine models of candidiasis, clarifying that Cpp1 is a virulence determinant [43]. Accordingly, it is transcriptionally induced within the human host during thrush [48]. The role of Cpp1 as a virulence factor has been connected with its activity on the target MAPK. The constitutive activation of Cek1 by deletion of its phosphatase Cpp1 increases susceptibility of cells to the protein Hst5, a salivary fungicidal histidine-rich protein constitutively produced by human salivary gland cells. Cek1 activation likely enhances Hst5-mediated killing in part through exposure of cell wall β -1,3-glucans [49].

4.4. *S. pombe* Pmp1: The Only Characterized MKP Within the Subphylum Taphrinomycotina

The MKP Pmp1 is the main phosphatase acting on the fission yeast MAPK Pmk1, which is orthologous to the MAPK Slt2 [50]. Pmp1 is a cytoplasmic protein, suggesting that Pmk1 inactivation by this phosphatase most likely occurs in the cytoplasm [51]. Removal of Pmp1 promotes an increase in signaling through the mating pathway [52], although the MAPK Spk1 has not been formally proven to be regulated by this MKP.

Pmp1 plays an important role in Cl^- homeostasis. It was originally identified as a multicopy suppressor of the chloride hypersensitivity of a calcineurin mutant, since calcineurin and Pmk1 MAPK pathways play antagonistic roles in the regulation of the Cl^- homeostasis [50]. Thus, cells lacking Pmp1 display a strong sensitivity to this anion [50]. Pmp1 also plays a critical role in morphogenesis. Mutant cells lacking this MKP present an aberrant morphology, frequently round or pear-shaped cells [50], and multiseptated and defective cell separation phenotypes [53]. Tight regulation of Pmk1 activity through Pmp1 is thus important in *S. pombe* cytokinesis (Figure 1b).

4.5. Filamentous Fungi MKPs are Involved in Mycelial Growth and Virulence

MKPs have been identified in other fungi, including some belonging to the subphylum Pezizomycotina, such as *Neurospora crassa*, *Fusarium oxysporum*, *Madurella mycetomatis*, *Gaeumannomyces graminis*, *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum graminicola*, and *Ustilaginoidea virens* [29] (Table S1). However, only functional characterization of Msg5 homologues from filamentous fungi *F. graminearum* and *P. oryzae* has been completed to date.

In the wheat scab fungus *F. graminearum*, the Mgv1 MAPK pathway is homologous to the cell wall integrity (CWI) pathway in budding yeast and is important for plant infection [54]. The Msg5 orthologue, FgMsg5, was shown to dephosphorylate Mgv1 [55], and its elimination led to mycelial growth defects [56].

A functional study with the rice blast fungus *P. oryzae* Pmp1 not only identified this MKP as a negative regulator of the MAPK Pmk1 (Fus3 orthologue) but also of the CWI MAPK Mps1 (Slt2 orthologue), both essential for pathogenesis. In contrast to that observed for Mps1, yeast two-hybrid analysis revealed the absence of direct interaction of Pmp1 with Pmk1, opening up the possibility of the existence of some adaptor between both proteins. $\Delta pmp1$ mutants presented a reduced mycelial growth and conidiation and, more importantly, reduced virulence in both rice and barley [29]. However, further research is needed to provide more information about additional substrates of Pmp1, since both $\Delta pmk1$ and $\Delta mps1$ mutants develop a normal mycelial growth [57,58].

4.6. Choose the Right Host: A Role for MKPs Within Basidiomycota

MKP activity has also been proven to play a role in morphogenetic programs and disease development in Basidiomycota. This is the case of the causative agent of corn smut, *Ustilago maydis*. In this fungus, the partially redundant MAPKs Kpp2 and Kpp6 are regulated by the MKP Rok1. The lack of Rok1 activity promotes increased filamentation and enhanced virulence, whereas overexpression of *rok1* induces the opposite effect. The reason for this fungus not losing Rok1 through evolution could be that *rok1* mutants can no longer differentiate whether they are on the correct plant host [59]. Albeit the apparent dispensability of this fungal MKP in phenotypic assays, the precise control of MAPK phosphorylation is likely an advantage for *U. maydis* cells in nature.

5. Regulatory Mechanisms of Fungal MKPs

Like in mammalian MKPs, different regulatory mechanisms operating on fungal MPKs provide distinct layers of control on MAPK pathways (Figure 4). One of these mechanisms relies on the MAPK-dependent transcriptional induction of MKPs under stimulating conditions. This generates a negative feedback loop that maintains an adequate MAPK activation level and/or promotes adaptation [60]. In *S. cerevisiae*, transcription of *MSG5* is regulated by both Msg5-regulated pathways:

mating and CWI [24,61]. Whereas Msg5 is primarily involved in adaptation to pheromone exposure in the mating pathway, its main role in the CWI pathway is the control of the maximum intensity of signaling flow through the pathway [22]. *U. maydis* Rok1 is induced in response to the activation of its specific MAPK pathway [59]. In contrast, the *S. cerevisiae* Slt2-selective MKP Sdp1 is transcriptionally induced by heat stress, but in a CWI-independent manner. This induction is partially mediated by the transcription factors Msn2/4 of the cAMP-PKA pathway [41], which suggests a linkage between these two pathways through Sdp1. Therefore, the transcriptional regulation of MKPs can be exerted not only by their substrate MAPKs but also by other signaling pathways not targeted by the MKP, allowing signaling cross-inhibition. This is also the case for Cpp1, the Cek1-specific MKP from *C. albicans* that has been reported to mediate the crosstalk between Hog1 and Cek1 MAPK pathways involved in both yeast-hyphae transition and white-opaque switching [46]. In that work, Hog1 was shown to downregulate Cek1 signaling by inducing the expression of Cpp1.

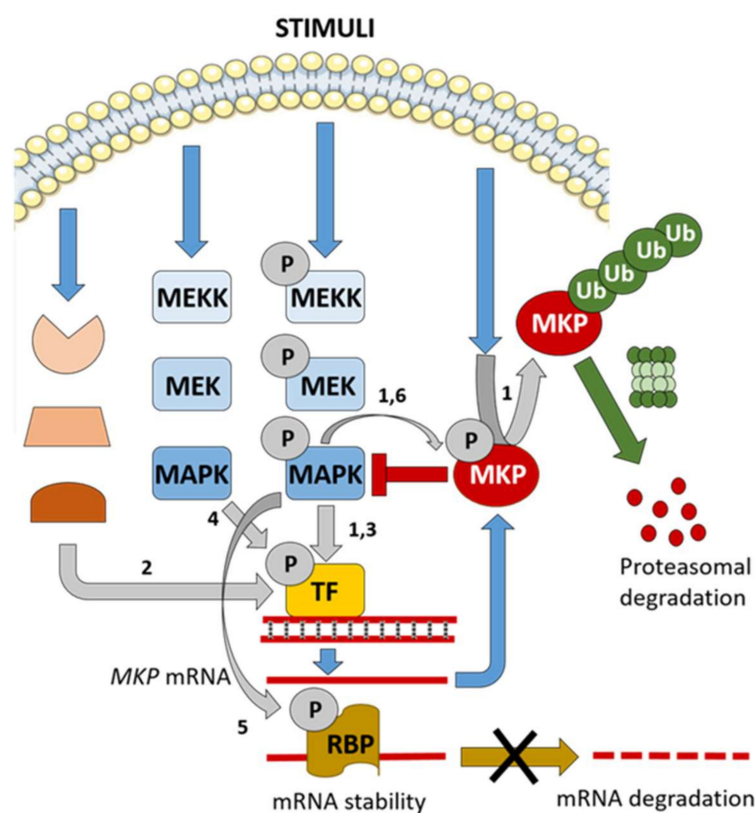


Figure 4. Multiple levels of MKP regulation in fungi. In response to stress, MKP gene expression can be transcriptionally induced by a transcription factor (TF) activated by either the MAPK target of the MKP, another related MAPK pathway, or another route. The stability of the MKP mRNA can be post-transcriptionally regulated by an RNA-binding protein (RBP), which increases the mRNA half-life and thereby the amount of MKP protein. The activity of the RBP can be in turn modulated by phosphorylation by the target MAPK. After translation, the MKP can be further regulated by different post-translational modifications, such as phosphorylation or ubiquitination. MKP phosphorylation is usually exerted by its target MAPK and ubiquitination generally leads to MKP degradation by the proteasome. Numbers designate the fungal MKPs known to be under the regulatory mechanisms indicated by grey arrows: (1) *S. cerevisiae* Msg5, (2) *S. cerevisiae* Sdp1, (3) *U. maydis* Rok1, (4) *C. albicans* Cpp1, (5) *S. pombe* Pmp1, and (6) *P. oryzae* Pmp1.

The increase in mRNA levels can be achieved not only by transcriptional upregulation but also by post-transcriptional mechanisms, including control of mRNA stability [62]. Such regulation has been reported for Pmp1, the MKP of the CWI MAPK Pmk1 in *S. pombe*. The RNA-binding

protein (RBP) Rnc1 was shown to bind and stabilize an otherwise unstable Pmp1 mRNA [63]. A similar RBP-mediated post-transcriptional mRNA stabilization mechanism has also been reported for mammalian MKPs, such as MKP-1 [64]. *S. pombe* Rnc1 is phosphorylated at Thr⁵⁰ by the MAPK Pmk1, mediating a novel type of negative-feedback regulatory loop in MAPK signaling pathways. This phosphorylation positively regulates the RNA-binding activity of Rnc1, resulting in stabilization of the Pmp1 mRNA and the subsequent increase in Pmk1 dephosphorylation [63].

Transcriptional and post-transcriptional regulation is often combined with post-translational mechanisms to ensure tight control of MKPs. Specific protein modifications, such as phosphorylation or ubiquitination, can alter the subcellular localization, stability, affinity, or catalytic activity of MKPs, resulting in either a reinforcement or a weakening of their action on MAPK signaling [60]. Phosphorylation of fungal MPKs was first described in *S. cerevisiae* Msg5, which is modified by its target MAPKs, Fus3 and Slt2. Phosphorylation of Msg5 by Fus3 was observed *in vitro* but its occurrence and functional significance *in vivo* remain to be established [24]. Slt2 was shown to phosphorylate Msg5 in yeast cells under cell wall stress conditions, alongside a decreased interaction between both proteins [25]. These results point to the existence of a positive feedback regulatory loop to reduce the activity of the phosphatase on the MAPK, allowing maximum activation of the CWI pathway. Subsequent *in vitro* kinase assays showed that both the N-terminal regulatory and the C-terminal catalytic domains of Msg5 are susceptible to phosphorylation by Slt2 [65]. However, the elimination of all the Ser/Thr-Pro putative MAPK target sites in Msg5 did not seem to alter its ability to dephosphorylate Slt2 *in vivo*, suggesting that this regulatory mechanism must be more subtle or complex than expected [65]. Regulatory phosphorylation has been revealed in the *P. oryzae* MKP Pmp1 by phosphoproteomic analysis [29]. Pmp1 was found phosphorylated at Ser²⁴⁰, a position that is conserved only in filamentous fungi and lies just downstream of its region of interaction with the CWI MAPK Mps1. Pmp1 phosphorylation at this site was shown to be important for regulating MAPK phosphorylation of both Pmk1 (Fus3 orthologue) and Mps1 (Slt2 orthologue), but the involvement of such regulation in fungal virulence is not yet clear. The kinase responsible for Pmp1 phosphorylation is still unknown, but, curiously, Ser²⁴⁰ does not exactly match a canonical Ser/Thr-Pro MAPK target motif, although it is immediately followed by a Ser-Pro sequence [29].

Ubiquitination is another post-translational regulatory mechanism that allows cells to modulate signaling. Although ubiquitination can affect proteins in different ways, this modification usually results in the proteasomal degradation of the protein [60]. MAPKs can trigger proteolysis of their specific MKPs via the ubiquitin-proteasome pathway to enable long-term activation. This positive feedback loop is operating, for example, in the mammalian ERK1/2 pathway. MKP-1 stability has been reported to be regulated by ERK-mediated phosphorylation, which facilitates subsequent ubiquitination and degradation [66]. In *S. cerevisiae*, ubiquitin-mediated proteolysis of Msg5 has been proposed as the mechanism responsible for Slt2 activation in response to genotoxic stress [40]. In contrast to cell wall stress, which involves the stimulation of the whole CWI pathway, the phosphorylation of Slt2 by DNA damage does not require the activation of upstream protein kinases of the MAPK module. The degradation of Msg5 triggered by genotoxic stress depends on the presence of Slt2 but is independent of its kinase activity. Therefore, this mechanism does not seem to fit with the classical MAPK-mediated positive feedback loop described above. Slt2 activation by DNA damage does not lead to the general transcriptional pattern associated with the CWI pathway, suggesting the existence of unknown genotoxic stress-specific targets.

In summary, fungi display a similar complexity in the regulation of MPKs as other eukaryotic organisms. The regulation of MPKs can be exerted at multiple steps: Transcriptional, post-transcriptional, and post-translational, allowing a fine-tuning multifaceted modulation of MPK levels, thereby determining the duration and strength of MAPK signaling.

6. Concluding Remarks

So far, most studies on fungal MKPs focused on model yeast species, namely, *S. cerevisiae*, *S. pombe*, and *C. albicans*. However, orthologues of MKPs are found in all fungal proteomes examined, indicating broad conservation of this type of protein phosphatases in both pathogenic and environmental fungi. Although MKPs are very important in fungal biology as key negative regulators of MAPKs, most of them are yet uncharacterized. Hence their study will be crucial in future research. MKPs exert wide and complex functions on cellular signaling due to their ability not only to modulate but also to be regulated by several MAPK pathways. Therefore, they play an essential role in coordinating different routes and providing response plasticity to diverse environmental stimuli.

Fungal MKPs share structural and regulatory features with mammalian MKPs, such as typical docking and catalytic domains, and common transcriptional, post-transcriptional, and post-translational mechanisms that control MKP protein abundance and activity. Due to this conservation across evolution, knowledge generated in model yeasts is very helpful to mammalian MKPs researchers and vice versa. For example, the finding in yeast of a mechanism of MAPK activation through degradation of its MKP, triggered by a specific stress that does not stimulate the MAPK cascade, could inspire the search for similar cases in higher eukaryotic organisms. Nevertheless, fungal MKPs also display unique characteristics, such as disulfide bridge-mediated catalytic activation and distinctive MAPK interaction domains, which are even specific to particular fungal subphyla. These peculiarities likely reflect the different environments that fungal species have faced throughout evolution. Involvement of MKPs in fungal virulence leads us to speculate that differences between fungi and mammalian MKPs might be exploited for developing antifungal drugs with high selective toxicity.

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <http://www.mdpi.com/1422-0067/20/7/1709/s1>.

Author Contributions: G.G.-R., T.F.-A., H.M., and M.M. wrote and edited the manuscript.

Funding: This research was supported by grant BIO2016-75030-P, funded by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad, and by grant S2017/BMD-3691-InGEMICS-CM, funded by Comunidad de Madrid and European Structural and Investment Funds. T.F.-A. was supported by a contract from BIO2016-75030-P, and G.G.-R. by a predoctoral contract from Universidad Complutense de Madrid.

Acknowledgments: We thank people from U3 for constructive comments.

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

Abbreviations

MAPK Mitogen Activated Protein Kinase
MKP MAP Kinase phosphatase
DUSP Dual Specificity Phosphatase

References

1. Papa, S.; Choy, P.M.; Bubici, C. The ERK and JNK pathways in the regulation of metabolic reprogramming. *Oncogene* **2018**, *10*, 0582. [CrossRef]
2. Sun, Y.; Liu, W.Z.; Liu, T.; Feng, X.; Yang, N.; Zhou, H.F. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.* **2015**, *35*, 600–604. [CrossRef] [PubMed]
3. 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]
4. Low, H.B.; Zhang, Y. Regulatory Roles of MAPK Phosphatases in Cancer. *Immune. Netw.* **2016**, *16*, 85–98. [CrossRef] [PubMed]
5. Bohush, A.; Niewiadomska, G.; Filipek, A. Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 2973. [CrossRef] [PubMed]
6. Kim, E.K.; Choi, E.J. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **2010**, *1802*, 396–405. [CrossRef]

7. Perez-Nadales, E.; Nogueira, M.F.; Baldin, C.; Castanheira, S.; El Ghalid, M.; Grund, E.; Lengeler, K.; Marchegiani, E.; Mehrotra, P.V.; Moretti, M.; et al. Fungal model systems and the elucidation of pathogenicity determinants. *Fungal. Genet. Biol.* **2014**, *70*, 42–67. [[CrossRef](#)]
8. Hamel, L.P.; Nicole, M.C.; Duplessis, S.; Ellis, B.E. Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: Distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell.* **2012**, *24*, 1327–1351. [[CrossRef](#)]
9. Chen, R.E.; Thorner, J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1311–1340. [[CrossRef](#)]
10. Engelberg, D.; Perlman, R.; Levitzki, A. Transmembrane signaling in *Saccharomyces cerevisiae* as a model for signaling in metazoans: State of the art after 25 years. *Cell Signal.* **2014**, *26*, 2865–2878. [[CrossRef](#)]
11. Perez, P.; Cansado, J. Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2010**, *11*, 680–692. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Roman, E.; Arana, D.M.; Nombela, C.; Alonso-Monge, R.; Pla, J. MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends Microbiol.* **2007**, *15*, 181–190. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Tong, S.M.; Feng, M.G. Insights into regulatory roles of MAPK-cascaded pathways in multiple stress responses and life cycles of insect and nematode mycopathogens. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2019**, *103*, 577–587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Rispail, N.; Soanes, D.M.; Ant, C.; Czajkowski, R.; Grünler, A.; Huguet, R.; Perez-Nadales, E.; Poli, A.; Sartorel, E.; Valiante, V.; et al. Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calcieneurin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal. Genet. Biol.* **2009**, *46*, 287–298. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Vazquez, B.; Soto, T.; del Dedo, J.E.; Franco, A.; Vicente, J.; Hidalgo, E.; Gacto, M.; Cansado, J.; Madrid, M. Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast. *Cell Signal.* **2015**, *27*, 2534–2542. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Nagiec, M.J.; McCarter, P.C.; Kelley, J.B.; Dixit, G.; Elston, T.C.; Dohlman, H.G. Signal inhibition by a dynamically regulated pool of monophosphorylated MAPK. *Mol. Biol. Cell.* **2015**, *26*, 3359–3371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Askari, N.; Beenstock, J.; Livnah, O.; Engelberg, D. p38alpha is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at threonine 180. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2497–2504. [[CrossRef](#)]
18. Caunt, C.J.; Keyse, S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* **2013**, *280*, 489–504. [[CrossRef](#)]
19. Pulido, R.; Zúñiga, A.; Ullrich, A. PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J.* **1998**, *17*, 7337–7350. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Tanoue, T.; Nishida, E. Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.* **2003**, *15*, 455–462. [[CrossRef](#)]
21. Peti, W.; Page, R. Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci.* **2013**, *22*, 1698–1710. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Martin, H.; Flandez, M.; Nombela, C.; Molina, M. Protein phosphatases in MAPK signalling: We keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 6–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Kellis, M.; Birren, B.W.; Lander, E.S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **2004**, *428*, 617–624. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Doi, K.; Gartner, A.; Ammerer, G.; Errede, B.; Shinkawa, H.; Sugimoto, K.; Matsumoto, K. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **1994**, *13*, 61–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Flandez, M.; Cosano, I.C.; Nombela, C.; Martin, 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](#)]
26. Palacios, L.; Dickinson, R.J.; Sacristan-Reviriego, A.; Didmon, M.P.; Marín, M.J.; Martín, H.; Keyse, S.M.; Molina, M. 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.* **2011**, *286*, 42037–42050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Sacristan-Reviriego, A.; Madrid, M.; Cansado, J.; Martin, H.; Molina, M. 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* **2014**, *9*, e85390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Fox, G.C.; Shafiq, M.; Briggs, D.C.; Knowles, P.P.; Collister, M.; Didmon, M.J.; Makranton, V.; Dickinson, R.J.; Hanrahan, S.; Totty, N.; et al. Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases. *Nature* **2007**, *447*, 487–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Wang, R.J.; Peng, J.; Li, Q.X.; Peng, Y.L. Phosphorylation-mediated Regulatory Networks in Mycelia of *Pyricularia oryzae* Revealed by Phosphoproteomic Analyses. *Mol. Cell Proteomics* **2017**, *16*, 1669–1682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Zhan, X.L.; Deschenes, R.J.; Guan, K.L. Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **1997**, *11*, 1690–1702. [[CrossRef](#)]
31. Dyjack, N.; Azeredo-Tseng, C.; Yildirim, N. Mathematical modeling reveals differential regulation of MAPK activity by phosphatase proteins in the yeast pheromone response pathway. *Mol. Biosyst.* **2017**, *13*, 1323–1335. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Blackwell, E.; Halatek, I.M.; Kim, H.J.; Ellicott, A.T.; Obukhov, A.A.; Stone, D.E. Effect of the pheromone-responsive G(alpha) and phosphatase proteins of *Saccharomyces cerevisiae* on the subcellular localization of the Fus3 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.* **2003**, *23*, 1135–1150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Blackwell, E.; Kim, H.J.; Stone, D.E. The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *BMC Cell Biol.* **2007**, *8*, 44–48. [[CrossRef](#)]
34. Marin, M.J.; Flandez, M.; Bermejo, C.; Arroyo, J.; Martin, 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](#)] [[PubMed](#)]
35. Andersson, J.; Simpson, D.M.; Qi, M.; Wang, Y.; Elion, E.A. Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes. *EMBO J.* **2004**, *23*, 2564–2576. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Watanabe, Y.; Irie, K.; Matsumoto, K. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.* **1995**, *15*, 5740–5749. [[CrossRef](#)]
37. Martin, H.; Rodriguez-Pachon, J.M.; Ruiz, C.; Nombela, C.; Molina, M. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1511–1519. [[CrossRef](#)]
38. Tatjer, L.; Sacristan-Reviriego, A.; Casado, C.; González, A.; Rodríguez-Porrata, B.; Palacios, L.; Canadell, D.; Serra-Cardona, A.; Martín, H.; Molina, M.; et al. Wide-Ranging Effects of the Yeast Ptc1 Protein Phosphatase Acting Through the MAPK Kinase Mkk1. *Genetics* **2016**, *202*, 141–156. [[CrossRef](#)]
39. Hermansyah; Sugiyama, M.; Kaneko, Y.; Harashima, S. Yeast protein phosphatases Ptp2p and Msg5p are involved in G1-S transition, CLN2 transcription, and vacuole morphogenesis. *Arch. Microbiol.* **2009**, *191*, 721–733. [[CrossRef](#)]
40. Liu, L.; Levin, D.E. Intracellular mechanism by which genotoxic stress activates yeast SAPK Mpk1. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 2898–2909. [[CrossRef](#)]
41. Hahn, J.S.; Thiele, D.J. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 21278–21284. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Kuravi, V.K.; Kurischko, C.; Puri, M.; Luca, F.C. Cbk1 kinase and Bck2 control MAP kinase activation and inactivation during heat shock. *Mol. Biol. Cell* **2011**, *22*, 4892–4907. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Csank, C.; Makris, C.; Meloche, S.; Schroppel, K.; Röllinghoff, M.; Dignard, D.; Meloche, S.; Thomas, D.Y.; Whiteway, M. Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. *Mol. Biol. Cell* **1997**, *8*, 2539–2551. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Csank, C.; Schroppel, K.; Leberer, E.; H Marcus, D.; Mohamed, O.; Meloche, S.; Thomas, D.Y.; Whiteway, M. Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog, Cek1p, in hyphal development and systemic candidiasis. *Infect. Immun.* **1998**, *66*, 2713–2721. [[PubMed](#)]

45. Schroppel, K.; Sprosser, K.; Whiteway, M.; Thomas, D.Y.; Rollinghoff, M.; Csank, C. Repression of hyphal proteinase expression by the mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase Cpp1p of *Candida albicans* is independent of the MAP kinase Cek1p. *Infect. Immun.* **2000**, *68*, 7159–7161. [[CrossRef](#)]
46. Deng, F.S.; Lin, C.H. Cpp1 phosphatase mediated signaling crosstalk between Hog1 and Cek1 mitogen-activated protein kinases is involved in the phenotypic transition in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* **2018**, *56*, 242–252. [[CrossRef](#)]
47. Rastghalam, G.; Omran, R.P.; Alizadeh, M.; Fulton, D.; Mallick, J.; Whiteway, M. MAP Kinase Regulation of the *Candida albicans* Pheromone Pathway. *mSphere* **2019**, *4*, e00598-18. [[CrossRef](#)]
48. Cheng, S.; Clancy, C.J.; Checkley, M.A.; Handfield, M.; Hillman, J.D.; Progulske-Fox, A.; Lewin, A.S.; Fidel, P.L.; Nguyen, M.H. Identification of *Candida albicans* genes induced during thrush offers insight into pathogenesis. *Mol. Microbiol.* **2003**, *48*, 1275–1288. [[CrossRef](#)]
49. Li, R.; Puri, S.; Tati, S.; Cullen, P.J.; Edgerton, M. *Candida albicans* Cek1 mitogen-activated protein kinase signaling enhances fungicidal activity of salivary histatin 5. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 3460–3468. [[CrossRef](#)]
50. Sugiura, R.; Toda, T.; Shuntoh, H.; Yanagida, M.; Kuno, T. pmp1+, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.* **1998**, *17*, 140–148. [[CrossRef](#)]
51. Madrid, M.; Soto, T.; Khong, H.K.; Franco, A.; Vicente, J.; Pérez, P.; Gacto, M.; Cansado, J. Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 2033–2043. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Didmon, M.; Davis, K.; Watson, P.; Ladds, G.; Broad, P.; Davey, J. Identifying regulators of pheromone signalling in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* **2002**, *41*, 241–253. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Madrid, M.; Nunez, A.; Soto, T.; Vicente-Soler, J.; Gacto, M.; Cansado, J. Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 4405–4419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Wang, C.; Zhang, S.; Hou, R.; Zhao, Z.; Zheng, Q.; Xu, Q.; Zheng, D.; Wang, G.; Liu, H.; Gao, X.; et al. Functional analysis of the kinome of the wheat scab fungus *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*, e1002460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Yu, F.; Gu, Q.; Yun, Y.; Yin, Y.; Xu, J.R.; Shim, W.B.; Ma, Z. The TOR signaling pathway regulates vegetative development and virulence in *Fusarium graminearum*. *New Phytol.* **2014**, *203*, 219–232. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yun, Y.; Liu, Z.; Yin, Y.; Jiang, J.; Chen, Y.; Xu, J.R.; Ma, Z. Functional analysis of the *Fusarium graminearum* phosphatome. *New Phytol.* **2015**, *207*, 119–134. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Xu, J.R.; Hamer, J.E. MAP kinase and cAMP signaling regulate infection structure formation and pathogenic growth in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Genes Dev.* **1996**, *10*, 2696–2706. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Xu, J.R.; Staiger, C.J.; Hamer, J.E. Inactivation of the mitogen-activated protein kinase Mps1 from the rice blast fungus prevents penetration of host cells but allows activation of plant defense responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 12713–12718. [[CrossRef](#)]
59. Di Stasio, M.; Brefort, T.; Mendoza-Mendoza, A.; Munch, K.; Kahmann, R. The dual specificity phosphatase Rok1 negatively regulates mating and pathogenicity in *Ustilago maydis*. *Mol. Microbiol.* **2009**, *73*, 73–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Molina, M.; Cid, V.J.; Martin, H. Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast* **2010**, *27*, 503–511. [[CrossRef](#)]
61. Garcia, 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](#)] [[PubMed](#)]
62. Sugiura, R.; Satoh, R.; Ishiwata, S.; Umeda, N.; Kita, A. Role of RNA-Binding Proteins in MAPK Signal Transduction Pathway. *J. Signal. Transduct.* **2011**, *2011*, 109746. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Sugiura, R.; Kita, A.; Shimizu, Y.; Shuntoh, H.; Sio, S.O.; Kuno, T. Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* **2003**, *424*, 961–965. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Kuwano, Y.; Gorospe, M. Protecting the stress response, guarding the MKP-1 mRNA. *Cell Cycle* **2008**, *7*, 2640–2642. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

65. Alonso-Rodriguez, E.; Fernandez-Pinar, P.; Sacristan-Reviriego, A.; Molina, M.; Martin, 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](#)]
66. Lin, Y.W.; Chuang, S.M.; Yang, J.L. ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 21534–21541. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 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 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



Article

Differential Role of Threonine and Tyrosine Phosphorylation in the Activation and Activity of the Yeast MAPK Slt2

Gema González-Rubio, Ángela Sellers-Moya, Humberto Martín *  and María Molina * 

Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia, Instituto Ramón y Cajal de Investigaciones Sanitarias (IRYCIS), Universidad Complutense de Madrid, Plaza de Ramón y Cajal s/n, 28040 Madrid, Spain; gemagonzalezrubio@ucm.es (G.G.-R.); angstelle@ucm.es (Á.S.-M.)

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

Abstract: The Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Slt2 is central to signaling through the yeast Cell Wall Integrity (CWI) pathway. MAPKs are regulated by phosphorylation at both the threonine and tyrosine of the conserved TXY motif within the activation loop (T190/Y192 in Slt2). Since phosphorylation at both sites results in the full activation of MAPKs, signaling through MAPK pathways is monitored with antibodies that detect dually phosphorylated forms. However, most of these antibodies also recognize monophosphorylated species, whose relative abundance and functionality are diverse. By using different phosphospecific antibodies and phosphate-affinity (Phos-tag) analysis on distinct Slt2 mutants, we determined that Y192- and T190-monophosphorylated species coexist with biphosphorylated Slt2, although most of the Slt2 pool remains unphosphorylated following stress. Among the monophosphorylated forms, only T190 exhibited biological activity. Upon stimulation, Slt2 is first phosphorylated at Y192, mainly by the MAPKK Mkk1, and this phosphorylation is important for the subsequent T190 phosphorylation. Similarly, dephosphorylation of Slt2 by the Dual Specificity Phosphatase (DSP) Msg5 is ordered, with dephosphorylation of T190 depending on previous Y192 dephosphorylation. Whereas Y192 phosphorylation enhances the Slt2 catalytic activity, T190 is essential for this activity. The conserved T195 residue is also critical for Slt2 functionality. Mutations that abolish the activity of Slt2 result in a high increase in inactive Y192-monophosphorylated Slt2. The coexistence of different Slt2 phosphoforms with diverse biological significance highlights the importance of the precise detection of the Slt2 phosphorylation status.

Keywords: cell wall integrity; MAPKs; signaling; Slt2; Msg5; phosphorylation; monophosphorylation; Phos-tag



Citation: González-Rubio, G.; Sellers-Moya, Á.; Martín, H.; Molina, M. Differential Role of Threonine and Tyrosine Phosphorylation in the Activation and Activity of the Yeast MAPK Slt2. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1110. <https://doi.org/10.3390/ijms22031110>

Academic Editor: Atsushi Matsuzawa

Received: 31 December 2020

Accepted: 20 January 2021

Published: 23 January 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

Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathways are evolutionarily conserved transduction modules in eukaryotes that convert a variety of disparate signals into cellular responses, allowing cells to quickly adapt to changing environmental conditions and promoting cell growth and survival. The canonical MAPK cascade consists of a core module of three protein kinases that are sequentially activated by phosphorylation, termed MAPK kinase kinase (MAPKKK, MAP3K, or MEKK), MAPK kinase (MAPKK, MAP2K, or MEK), and MAPK [1]. Four conventional MAPK cascades have been defined in mammalian cells and named according to their corresponding MAPK component. These are extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK 1/2), c-Jun N-terminal kinase 1–3 (JNK 1–3), p38 α , β , γ , δ , and ERK5 cascades, which regulate proliferation, differentiation, and several cellular stresses [2]. The budding yeast *Saccharomyces cerevisiae* possesses five MAPK pathways, which are mediated by the ERK1/2 orthologs Fus3 and Kss1, the p38 ortholog Hog1, the Erk5 ortholog Slt2 (also named Mpk1), and the non-conventional Smk1 MAPK. These MAPK pathways are involved in the control of mating, invasive and pseudohyphal growth, the osmolarity response, the cell wall integrity (CWI), and ascospore formation, respectively [3]. *S. cerevisiae* has been successfully employed as a eukaryotic model, providing

very valuable information over the years about the regulation of MAPK cascades and how these pathways propagate signals and modulate cellular responses.

It has long been established that phosphorylation plays a critical role in regulating the timing, duration, and intensity of MAPK signaling. MAPKs share a common post-translational mechanism of kinase stimulation, characterized by dual phosphorylation of the threonine and tyrosine residues located at their conserved TXY motif within the activation loop. Initial studies showed that MAPKs are only active when both threonyl and tyrosyl residues are phosphorylated [4,5]. Studies performed in mammalian cells revealed that MAPKs are firstly phosphorylated on tyrosine and secondly on threonine by a two-collision distributive mechanism, in which the MAPKK dissociates from the MAPK between both phosphorylation events [6]. Later, a processive manner, meaning that sequential reactions are operated by the same enzyme, was proposed to operate for some mammals and yeast MAPKs [7–10]. Phosphorylated MAPKs are dephosphorylated in the Thr and/or Tyr residues within the activation loop by protein phosphatases of three different types, including serine–threonine, tyrosine, and Dual-Specificity Phosphatases (DSPs) [11]. Among them, DSPs, also known as MAPK Phosphatases (MKPs), are the main negative regulators [12]. Although it is well-established that MKPs eliminate the phosphate group from both Thr and Tyr residues, the dephosphorylation kinetics have been poorly studied.

Interestingly, reports on several mammalian and yeast MAPKs have highlighted that threonine phosphorylation confers higher catalytic and biological activity than tyrosine phosphorylation [10,13–15]. Specifically, the threonine phosphorylation of *S. cerevisiae* Hog1 was found to be essential for its catalytic and biological activity, whereas tyrosine phosphorylation seems to be required to obtain a further increase in activity, only being necessary in extreme conditions [16]. In the case of Kss1, threonine phosphorylation renders the cells capable of inducing invasive growth to some extent [17]. In contrast, the tyrosine monophosphorylated form of Fus3 has been shown to be partially active and competent in the phosphorylation of a variety of substrates in vitro [18]. Moreover, an inhibitory role for the monophosphorylated forms of this yeast MAPK has been reported, indicating that incompletely phosphorylated forms could also act to limit signal transduction [8].

In addition to TXY, MAPK activity is also affected by post-translational modifications (PTMs) in other residues. Thereby, several phosphosites within MAPKs have been experimentally identified, mainly by phosphoproteomic approaches [19–22]. However, the regulation of most of these phosphorylations, as well as the effect that they have on catalytic and biological activity, remain obscure. In mammalian Erk1, two phosphosites flanking the TEY motif—T207 and Y210—have been reported to negatively regulate its catalytic activity. p-T207 arose from autophosphorylation, whereas the phosphorylation of Y210 was catalyzed by MEK1 [23].

Among the budding yeast MAPK pathways, the CWI pathway is mainly involved in sensing and responding to cell wall stress that arises during morphogenetic processes or under cell wall-threatening conditions. The core module consists of a MAPKK Kinase, Bck1, a pair of redundant MAPK Kinases, Mkk1 and Mkk2, and the MAPK Slt2. Phosphorylation of Slt2 in the TEY motif (T190-E-Y192) makes the MAPK active [24]. Dually phosphorylated Slt2 is mainly located in the nucleus, where it activates transcription factors, among which Rlm1 stands out, and controls the majority of genes that have been shown to be upregulated in response to CWI activation [3,24]. A mutation in Y192, but not in T190, seems to render Slt2 partially functional [25], suggesting the importance of threonine over tyrosine phosphorylation. However, whether Slt2 monophosphorylated forms are present in yeast cells and display a functional role is still unknown.

The aim of this study is to deepen the existing knowledge on the mechanisms regulating the phosphorylation state of the MAPK Slt2. Here, we show the existence and biological relevance of Slt2 monophosphorylated forms, and that both phosphorylation and dephosphorylation of this MAPK are highly ordered, with action on Y192 occurring

first. We uncover additional residues within Slt2 that are involved in its activation and biological function.

2. Results

2.1. Detection of Slt2 Monophosphorylation at the Activation Loop with Commercial Antibodies

The activation status of Slt2 has traditionally been monitored by using commercial antibodies that detect the dually phosphorylated forms of mammalian p42/44 (Erk1/Erk2), which share the same activation motif (TEY) [26]. These antibodies have been used for routinely studying signaling through the CWI pathway, but, according to their specifications, we noticed that some of them could also recognize monophosphorylated forms of MAPKs. For example, the anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (T202/Y204) (D13.14.4E) XP[®] rabbit mAb (#4370 Cell Signaling, Danvers, MA, USA) detects endogenous levels of Erk1 and Erk2 when dually phosphorylated and singly phosphorylated at threonine. In turn, the anti-phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (T202/Y204) (197G2) rabbit mAb (#4377 Cell Signaling) detects Erk1 and Erk2 when dually phosphorylated and individually phosphorylated at tyrosine. In contrast, the anti-MAPK activated (Diphosphorylated ERK-1&2) mouse mAb (#M8159 Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) reacts specifically with the dually phosphorylated form and it does not recognize the monophosphorylated species of these MAPKs. Because some monophosphorylated MAPKs have been found to display functional roles, we wanted to explore the actual specificity of these antibodies on Slt2. To this end, extracts from *slt2Δ* cells expressing either the dually phosphorylatable wild type Slt2, the monophosphorylatable mutants Slt2^{T190A} and Slt2^{Y192F}, or the unphosphorylatable double mutant Slt2^{T190A Y192A}, treated with cell wall-altering agent Congo Red (CR) [27], were analyzed by Western blotting using the above-mentioned antibodies. As observed in Figure 1, the three antibodies detected wild type Slt2 and did not recognize unphosphorylatable Slt2^{T190A Y192A}. However, #M8159 did not detect any of the monophosphorylatable versions of Slt2, #4370 did not give any signal on Slt2^{T190A}, and #4377 did not recognize Slt2^{Y192F}, indicating that these reagents are only able to detect dual phosphorylation, dual and T190 monophosphorylation, and dual and Y192 monophosphorylation, respectively. The #M8159, #4370, and #4377 antibodies mentioned above are hereafter referred to in this work as anti-Slt2-pTpY, anti-Slt2-pT/pTpY, and anti-Slt2-pY/pTpY, respectively. Interestingly, a comparison of the signals provided by the distinct antibodies on each of the Slt2 versions revealed that, compared with the wild type, the Slt2^{T190A} mutant displayed higher tyrosine monophosphorylation, whereas Slt2^{Y192F} showed lower monophosphothreonine levels. These results indicate that the use of complementary antibodies with distinct phosphosite specificities allowed the study of the different Slt2 phosphoforms.

2.2. The Lack of T190 Phosphorylation Results in Increased Phosphorylation of Y192 in Slt2

To deepen the characterization of dual phosphorylation dynamics at the TEY motif of Slt2, time-course monitoring of Slt2 T190 and Y192 phosphorylation following Congo Red treatment of yeast cells was performed. As observed in Figure 2, the wild type Slt2 signal provided by the three antibodies increased over time, reaching a plateau between 60 and 120 min, which remained until 240 min, when it then decreased to basal levels at 480 min. Although the individual phosphosite Slt2 mutants displayed similar phosphorylation dynamics to the wild type form, several differences were also visible. Changing T190 to alanine resulted in an increase in Y192 phosphorylation (Figure 2A), whereas a lack of Y192 led to a diminished phosphorylation of T190 (Figure 2B) when compared to wild type Slt2 phosphorylation levels. Moreover, both Slt2 mutant versions exhibited a less pronounced decrease in the phosphorylation signal after the plateau than the wild type protein, without reaching basal levels at 480 min. Altogether, these results suggest that threonine and tyrosine residues have a fundamental and likely opposite role in the maintenance of the MAPK phosphorylation status. The tyrosine is needed for Slt2 to reach its wild type dual phosphorylation level, while the threonine residue is somehow involved in the negative regulation of Slt2 tyrosine phosphorylation.

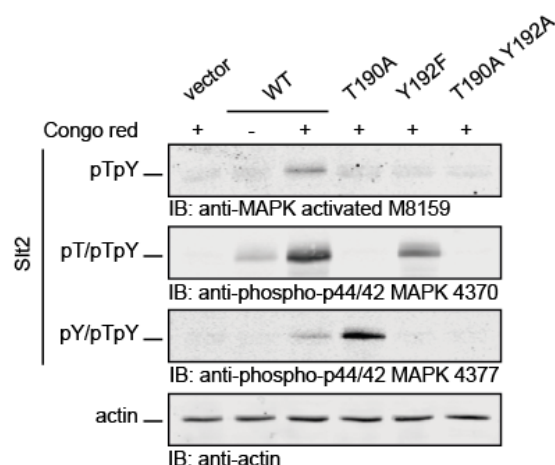


Figure 1. Detection of mono and dually phosphorylated Slt2 species with commercial antibodies. *slt2Δ* (Y00993 strain) cells containing plasmid pRS316 expressing Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, Slt2^{Y192F}, or Slt2^{T190A Y192A} were grown to the mid-exponential phase in yeast extract–bacto-peptone–dextrose (YPD) and then stimulated with 30 µg/mL of Congo Red for 2 h (+). Cell extracts were resolved by SDS–PAGE, and analyzed by immunoblotting with the M8159 antibody (upper panel), which detects dually phosphorylated Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) (pTpY); the 4370 antibody (middle panel), which detects T190 and dually phosphorylated MAPK (pT/pTpY); and the 4377 antibody (lower panel), which detects Y192 and dually phosphorylated MAPK (pY/pTpY). An anti-actin antibody was used for the loading control. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

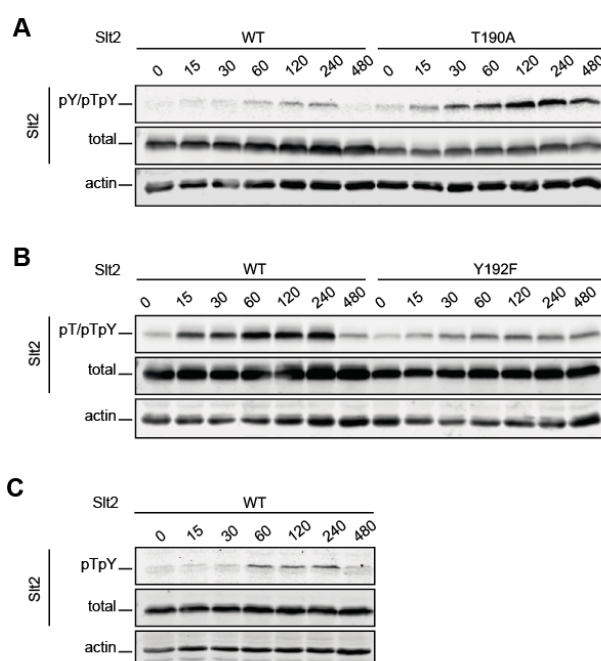


Figure 2. Analysis of Slt2 phosphorylation dynamics. BY4741 *slt2Δ*-RLM1Myc cells containing the plasmid pRS316 expressing, as indicated, Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, or Slt2^{Y192F}, were grown to the mid-exponential phase in YPD and then stimulated with 30 µg/mL of Congo Red for the indicated times (min). Cell extracts were resolved by SDS–PAGE, and analyzed by immunoblotting with anti-Slt2-pY/pTpY (A), anti-Slt2-pT/pTpY (B), and anti-Slt2-pTpY (C), as in Figure 1; anti-Mpk1, which detects the total Slt2; and anti-actin antibodies (A–C). A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

2.3. Y192 Phosphorylation by Mkk1 and Mkk2 Is a Stepping-Stone to the Dual Phosphorylation of Slt2

The increased Y192 phosphorylation in the absence of T190 could be due to an intensification of Slt2^{T190A}'s interaction with its activating MAPKKs, Mkk1, and/or Mkk2. Similarly, the slight reduction in T190 phosphorylation in the Y192F version could be because of a diminished interaction with the activator kinases. To check this, we carried out copurification experiments of wild type, T190A, and Y192F versions of Slt2 with Mkk1-myc and Mkk2-myc expressed from genomic-tagged *MKK1* and *MKK2*, respectively. As observed in Figure 3A,B, neither Mkk1 nor Mkk2 showed higher retention by Slt2^{T190A} when compared to Slt2, indicating that the increased Y192 phosphorylation of this mutant protein was not caused by a trapping effect by either Mkk1 or Mkk2. Similarly, Slt2^{Y192F} bound the same amount of Mkk1 and Mkk2 as Slt2^{T190A} and Slt2, revealing that these mutations do not result in differences in binding to their activators.

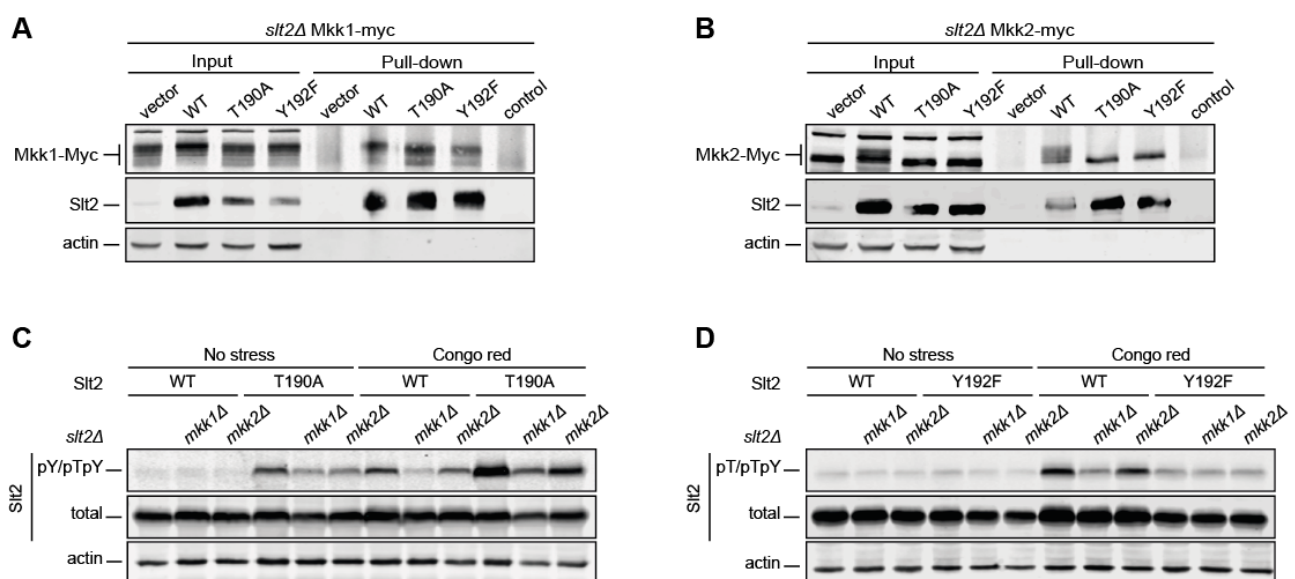


Figure 3. Analysis of Mkk1 and Mkk2 binding to differentially phosphorylatable forms of Slt2 and their effect on Slt2 phosphorylation. The strains *slt2Δ* *MKK1-myc* (YMJ30) (A) and *slt2Δ* *MKK2-myc* (YMJ31) (B) were transformed with the plasmid pRS316 alone (vector) or expressing, as indicated, Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, or Slt2^{Y192F}. Cells were grown to the mid-exponential phase in YPD and then stimulated with 30 µg/mL of Congo Red (CR) for 2 h. Cell extracts (input) were incubated with the Mpk1 antibody attached to Dynabeads™ Protein G to purify Slt2 complexes (pull-down) and resolved by SDS-PAGE. Proteins were detected with anti-c-Myc, anti-Mpk1 (Slt2), and anti-actin antibodies by immunoblotting. The control of a Dynabeads-Mpk1 antibody non-incubated with cell extracts is included. (C,D) *slt2Δ* (Y00993 strain), *mkk1Δ* *slt2Δ* (YGGR32 strain), and *mkk2Δ* *slt2Δ* (YGGR33 strain) cells containing the same plasmids as in (A,B) were grown to the mid-exponential phase in YPD and then stimulated with 30 µg/mL of CR for 2 h. Cell extracts were resolved by SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting with anti-Slt2-pY/pTpY, anti-Slt2-pT/pTpY (as in Figure 1), anti-Mpk1 (total), and anti-actin antibodies. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

We have shown that Mkk1 plays a preeminent role over Mkk2 in signaling through the CWI pathway [28]. To assess whether these Mkks act differentially on T190 and Y192 Slt2 phosphosites, we analyzed the impact of eliminating individual MAPKKs on monophosphorylatable Slt2 mutant versions. *MKK1* deletion severely reduced the CR-induced Y192 phosphorylation of both wild type and T190A Slt2 versions. The lack of Mkk2 also resulted in a similar, although less intense, decrease (Figure 3C). The same effect was observed for the T190 phosphorylation of wild type Slt2 when any of these MAPKKs was eliminated. In contrast, the lack of either Mkk1 or Mkk2 did not lead to any change in the T190 phosphorylation of Slt2^{Y192F} (Figure 3D, lanes 10–12). These findings suggest that

priming phosphorylation at Y192 is mainly carried out by Mkk1, and that this modification is necessary for subsequent phosphorylation at T190.

2.4. Dephosphorylation of T190 on Slt2 by Msg5 Depends on the Previous Dephosphorylation of Y192

Slt2 phosphorylation is regulated by different protein phosphatases, including the Dual-Specificity Phosphatase (DSP) Msg5 [11,12]. Since DSPs dephosphorylate both tyrosine and threonine residues, we reasoned that the increased Y192 phosphorylation observed in Slt2^{T190A} could be due to the reduced activity of Msg5 on phosphorylated tyrosine in the absence of phosphorylated threonine. However, the lack of Msg5 in cell wall-stressed cells resulted in increased Y192 phosphorylation of both Slt2 and Slt2^{T190A} (Figure 4A), whereas no effect was observed on the T190 phosphorylation of Slt2^{Y192F} (Figure 4B). This indicates that Msg5 can act on Y192-monophosphorylated Slt2, but not on T190-monophosphorylated Slt2.

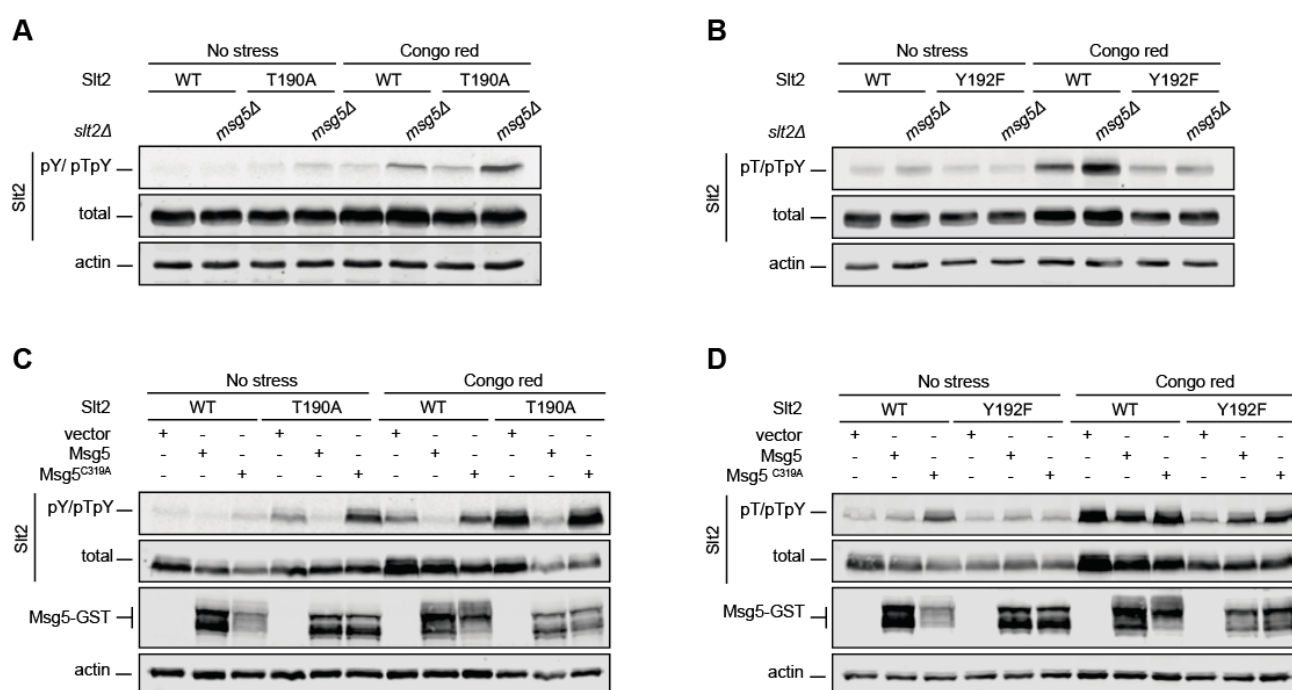


Figure 4. Analysis of the dephosphorylation and trapping of differentially phosphorylatable forms of Slt2 by Msg5. (A,B) *msg5Δ slt2Δ* (YGGR34 strain) cells containing the plasmid pRS316 expressing, as indicated, Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, or Slt2^{Y192F}, were grown to the mid-exponential phase in YPD and then stimulated with 30 µg/mL of CR for 2 h. Cell extracts were resolved by SDS–PAGE, and analyzed by immunoblotting with anti-Slt2-pY/pTpY and anti-Slt2-pT/pTpY, as in Figure 1; anti-Mpk1 (total); and anti-actin antibodies. (C,D) Yeast extracts from *slt2Δ* (Y0093 strain) cells co-transformed with the plasmid pRS315 bearing the same Slt2 versions as in (A,B), and with YEp352 expressing Msg5 or Msg5^{C319A} fused to Glutathione S-transferase (GST), were resolved by SDS–PAGE and analyzed by immunoblotting with the same antibodies as in (A,B), as well as with an anti-GST antibody. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

We have previously shown that Msg5 overexpression leads to Slt2 dephosphorylation [29], while the overexpression of catalytically inactive Msg5^{C319A} results in an increase in the amount of phosphorylated Slt2 due to a trapping effect [30]. As observed in Figure 4C, Msg5 overexpression reduced the phosphorylation level of Y192 in both Slt2 and Slt2^{T190A}, and Msg5^{C319A} overexpression led to an increase in Y192 phosphorylation in both species, indicating the ability of Msg5 and Msg5^{C319A} to dephosphorylate and trap Y192-phosphorylated Slt2, respectively, independent of T190 phosphorylation. In contrast, no changes in the phosphorylation status of T190 in Slt2^{Y192F} following the overexpression

of either Msg5 or Msg5^{C319A} were observed (Figure 4D). Consequently, neither Msg5 nor Msg5^{C319A} can dephosphorylate or trap T190-phosphorylated Slt2, respectively, in the absence of phosphorylated Y192. This indicates that the dephosphorylation of tyrosine is needed for effective threonine dephosphorylation at the activation loop of Slt2 and reinforces the idea that the Slt2 threonyl-phosphorylated residue is a poor substrate for this DSP.

Taken together, these findings suggest that, despite being able to dephosphorylate both threonine and tyrosine residues within the TEY motif, the DSP Msg5 carries out an ordered dephosphorylation of Slt2, which is initiated at Y192.

2.5. T190 Is Essential for the Catalytic Activity and Biological Role of Slt2

Initial work by Lee et al. in 1993 [25] showed that the mutation of threonine 190 to alanine (T190A) resulted in an *SLT2* allele that was incapable of complementing the thermosensitivity of an *SLT2*-deleted strain. In contrast, the mutation of tyrosine 192 to phenylalanine (Y192F) resulted in a partially functional allele that poorly complemented this phenotype. To further ascertain the biological relevance of each of these phosphorylation sites, we first analyzed the ability of these mutants to complement the sensitivity of *slt2Δ* cells to distinct stresses that trigger activation of the CWI pathway [31] in drop growth assays. As shown in Figure 5A, *slt2Y192F* showed partial complementation of the sensitivity of *slt2Δ* cells not only to 38 °C, but also to caffeine, zymolyase, sodium dodecyl sulfate (SDS), tunicamycin, and low concentrations of Calcofluor White (CFW) and CR, which indicates that T190-monophosphorylated Slt2 retains some activity in the absence of Y192 phosphorylation. In contrast, both *slt2T190A* and the non-phosphorylatable *slt2T190A Y192A* behaved like the kinase-dead version *slt2K54F* (*slt2KD*) [32], not allowing growth of *slt2Δ* cells in most of the assayed conditions, and thus evidencing the loss of activity caused by these mutations. Curiously, transformants bearing any of these inactive alleles were able to grow slightly more than *slt2Δ* cells carrying the empty vector in the presence of SDS, tunicamycin, caffeine, and a low CFW concentration. These results suggest that inactive Slt2 could still play a biological role by mediating a response that is strong enough to partially cope with these stresses through a mechanism independent of the phosphorylation of the TEY motif within its activation loop.

We also tested other readouts of Slt2 activity on the phosphosite mutant versions, namely, the in vivo competence to (i) phosphorylate and consequently promote an SDS–PAGE shift in the transcription factor Rlm1 [33] (Figure 5B) and the MAPKKs Mkk1 and Mkk2 [34] (Figure 5C), (ii) increase its own protein level [35] (Figure 5B), and (iii) transcriptionally induce the Rlm1-dependent *MLP1* promoter by using a reporter transcriptional assay with *lacZ* [36] (Figure 5D). Only Slt2^{Y192F} showed any activity in one of the analyzed molecular readouts, as revealed by the partial mobility upshift observed for Mkk1-myc (Figure 5C).

We next extended these activity studies to additional Slt2 mutant versions affected at relevant sites or domains that could lead to changes in their phosphorylation status. MAPKs bind activating kinases and other interacting proteins such as phosphatases or transcription factors via a major docking site named “Common Docking” (CD). An Slt2 mutant version carrying substitutions of the conserved acidic residues D326, D323, and E327 for asparagine within the CD of Slt2 (Slt2^{CD3}) [37] was analyzed. Slt2^{CD3}-expressing cells displayed a wild type phenotype, except when exposed to high concentrations of CR and CFW, in which their ability to grow was slightly reduced. T190 and Y192 phosphorylation of Slt2^{CD3} was similar to that of wild type Slt2 (Figure 5B). Copurification experiments indicated that Slt2^{CD3} was able to bind to both Mkk1 and Mkk2, although the amount of these proteins pulled down by wild type Slt2 was much higher (Figure 5E). Furthermore, Rlm1 phosphorylation (Figure 5B) and *MLP1*-*LacZ*-driven β-galactosidase levels (Figure 5D) were also decreased in Slt2^{CD3}-expressing cells. All these results suggest that there must be other interaction sites in Slt2, in addition to the CD domain, to bind Mkk1 and Mkk2 and probably Rlm1.

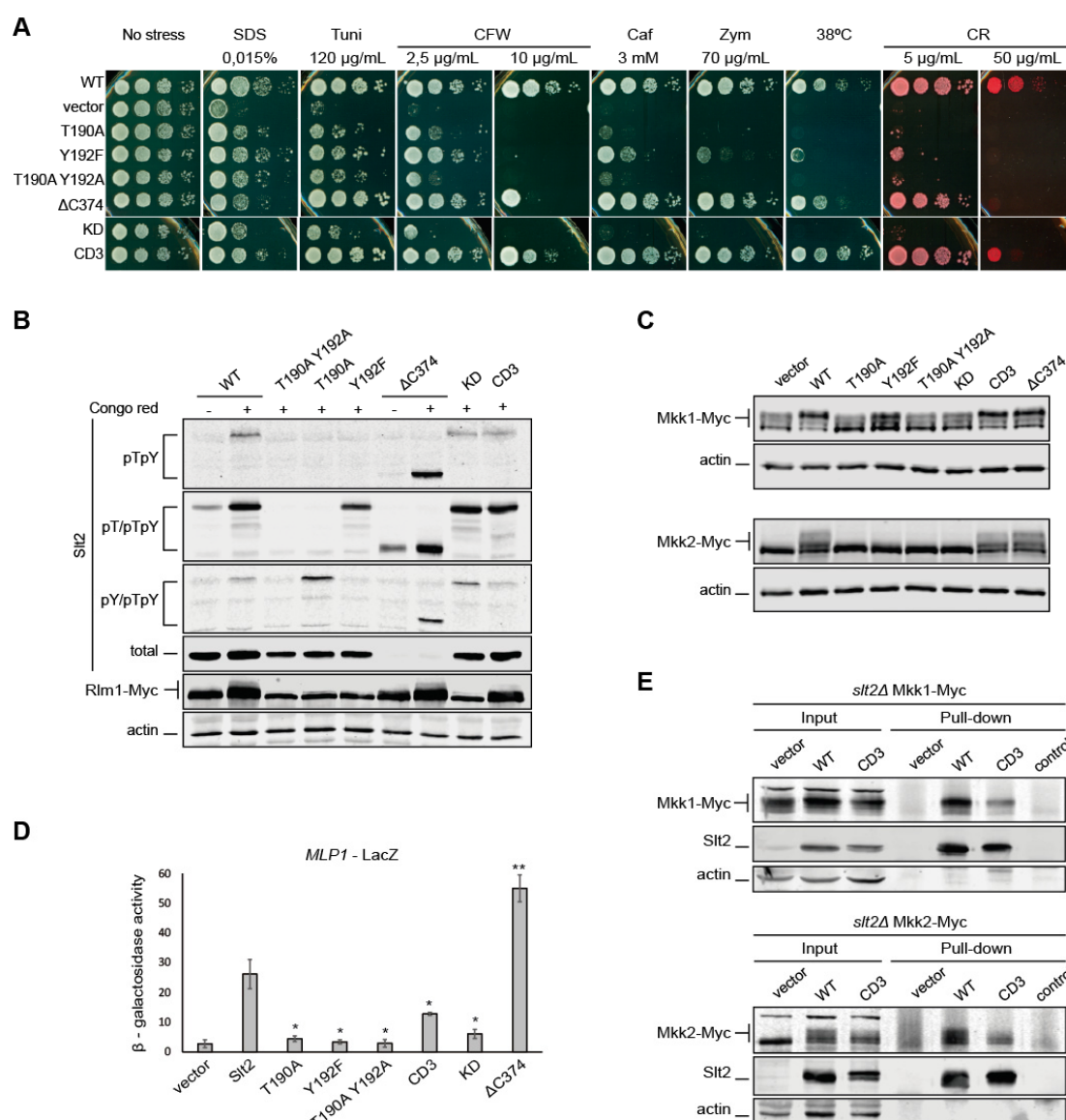


Figure 5. Analysis of the activity of different mutant versions of Slt2. **(A)** Ten-fold serial dilutions of BY4741 *slt2Δ*-RLM1Myc cells bearing the pRS316 plasmid alone (vector) or expressing Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, Slt2^{Y192F}, Slt2^{T190A Y192A}, Slt2^{ΔC374}, Slt2^{KD}, or Slt2^{CD3}. Cells were spotted onto YPD plates in the absence (no stress) or presence of Sodium Dodecyl Sulfate (SDS), tunicamycin (Tuni), Calcofluor White (CFW), caffeine (Caf), zymolyase (Zym), and Congo Red (CR) at the indicated concentrations. **(B)** The same cells as in **(A)** were grown to the mid-exponential phase in YPD and then stimulated with 30 µg/mL of CR for 2 h. Cell extracts were resolved by SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting with anti-Slt2-pTpY, anti-Slt2-pT/pTpY, and anti-Slt2-pY/pTpY, as in Figure 1; anti-Mpk1 (total); anti-Myc 4A6; and anti-actin antibodies. **(C)** Extracts from *slt2Δ* MKK1-myc (YMJ30 strain) or *slt2Δ* MKK2-myc (YMJ31 strain) cells transformed with the same plasmids as in **(A)** were resolved by SDS-PAGE, as in **(B)**, and analyzed by immunoblotting with anti-Myc 4A6 and anti-actin antibodies. **(D)** β-galactosidase activity of cell extracts from *slt2Δ* (Y00993) cells co-transformed with pMLP1-LacZ and the same plasmids as in **(A)** after incubation with 30 µg/mL of CR for 2 h. Data represent the average of the activity of three independent transformants. Error bars indicate the standard deviation. Asterisks (*) and ** indicate *p*-values of <0.05 and <0.01, respectively, assessed by Student's *t*-test, and refer to the Slt2 wild type (WT) activity. **(E)** The same strains as in **(C)**, transformed with the pRS316 plasmid expressing Slt2 (WT) or Slt2^{CD3}. Cells were grown to the mid-exponential phase in YPD and stimulated with 30 µg/mL of CR for 2 h. Cell extracts (input) were incubated with the anti-Mpk1 antibody attached to Dynabeads™ Protein G to purify Slt2 complexes (pull-down) and resolved by SDS-PAGE. Proteins were detected with anti-c-Myc, anti-Mpk1 (Slt2), and anti-actin antibodies by immunoblotting. A control of the Dynabeads-Mpk1 antibody non-incubated with cell extracts is included. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

Removal of the C-terminal region of MAPKs Slt2 and Hog1 has been proven to render them spontaneously and highly phosphorylated [38]. To analyze this phenomenon in more detail, we constructed an Slt2 version lacking their 111 C-terminal amino acids (Slt2 Δ C374). As observed in Figure 5B, Slt2 Δ C374 displayed higher phosphorylation than Slt2 under stress. However, in basal conditions, the C-terminal truncated form only showed higher phosphorylation than wild type Slt2 on T190, and not on Y192 (Figure 5B). According to the increased phosphorylation, Slt2 Δ C374 displayed higher activity than wild type Slt2, as determined by the *MLP1-LacZ* expression (Figure 5D). This could affect the functionality of Slt2 Δ C374 in vivo, since this truncated kinase did not totally restore growth of the *slt2* Δ strain under CR and CFW at high concentrations and SDS treatment (Figure 5A).

2.6. T195 Plays a Key Role in Slt2 Activity

The phosphorylation of two Erk1 phosphosites—T207 and Y210—flanking the TEY motif, has been reported to negatively regulate the catalytic activity of this MAPK [23]. Since these two residues are conserved in Slt2, we sought to evaluate the functional relevance of their Slt2 counterparts T195 and Y198. To this end, Slt2 mutants affected at these sites were created by substitution of the T195 residue with valine and the Y198 residue with phenylalanine. Drop growth assays revealed that whereas Slt2^{Y198F} fully complemented the sensitivity to typical CWI pathway stress agents of an *slt2* Δ mutant, Slt2^{T195V} and Slt2^{T195V Y198F} did not restore cell growth in the presence of tunicamycin, zymolyase, CR, and CFW. However, Slt2^{T195V} provided resistance to *slt2* Δ cells under high temperature or caffeine stress, suggesting some functionality for this mutant protein. Interestingly, the substitution Y198F displayed a synthetic effect with T195V under all these stresses (Figure 6A). Rlm1-Myc, Mkk1-Myc, and Mkk2-Myc mobility shift assays revealed that Slt2 versions bearing the T195V mutation, either individually or combined with Y198F, were not able to phosphorylate any of these Slt2 substrates. In contrast, Slt2^{Y198F} clearly promoted their characteristic mobility upshift (Figure 6B,C). In agreement, both Slt2^{T195V} and Slt2^{T195V Y198F}, but not Slt2^{Y198F}, were unable to induce Rlm1-dependent *MLP1* transcription (Figure 6D). All these results support the conclusion that T195V mutation severely reduces Slt2 activity and, together with Y198F mutation, abrogates the Slt2 function. The autophosphorylation of Erk2 at T188 (equivalent to T195 in Slt2) was reported to promote its nuclear localization [39], and Y210F mutation (equivalent to Y198F in Slt2) was recently found to drastically inhibit Erk1 nuclear translocation [40]. Therefore, we also evaluated the possibility of T195 or Y198 playing a role in Slt2 localization by constructing N-terminally green fluorescent protein (GFP)-tagged versions of Slt2, Slt2^{T195V}, and Slt2^{T195V Y198F}. Fluorescent microscopy analysis determined that both GFP-Slt2^{T195V} and GFP-Slt2^{T195V Y198F} showed the same localization pattern as GFP-Slt2, displaying predominantly nuclear localization, either at basal conditions or under heat treatment (Supplementary Figure S1).

2.7. T190 and T195 Are Essential for Maintaining a Low Level of Y192 Phosphorylation

The use of antibodies with different specificities for each phosphorylated Slt2 form has proved useful for tracking the phosphorylation of the individual phosphosite mutants analyzed in this work. Nevertheless, each antibody has a different sensitivity, so the signals are not comparative. In order to monitor the abundance of each of the phosphorylation states of wild type Slt2, we used phosphate-affinity SDS-PAGE (Phos-tag SDS-PAGE). Phos-tag is a tool based in a functional molecule, which, in the presence of Zn²⁺, forms complexes with phosphorylated serine, threonine, and tyrosine, inducing mobility shifts in phosphorylated proteins, depending on their phosphorylation status [41]. When Slt2 was analyzed by this method, three upshifting bands were observed after immunoblotting with an antibody that recognizes total Slt2, indicating the existence of three different phosphorylation species, in addition to the most abundant and fastest migrating band corresponding to non-phosphorylated Slt2 (Figure 7A). The stimulation of cells with CR led to an increase in the intensity of these three bands, but they still represented a very low proportion of the whole pool of Slt2. Individual phosphosite mutants Slt2^{T190A} and Slt2^{Y192F} yielded just one

upshifting band with different mobility patterns, corresponding to monophosphorylated species. Accordingly, none of the phosphorylated species were detected in the double $\text{Slt2}^{\text{T190A Y192A}}$ mutant. As shown in Figure 7B, immunodetection with anti-Slt2-pY/pTpY and anti-Slt2-pT/pTpY antibodies revealed that, among the three upshifting species, the slowest and least intense band corresponded to Slt2 monophosphorylated at Y192; the middle and most intense band to dually phosphorylated Slt2; and the fastest, with an intermediate level of intensity, to T190-monophosphorylated Slt2. Strikingly, the Y192-monophosphorylated form of the $\text{Slt2}^{\text{T190A}}$ mutant migrated more slowly than that of wild type Slt2. Remarkably, the analysis by Phos-tag SDS-PAGE confirmed the strong increase in the amount of the Y192-monophosphorylated form caused by the lack of T190 observed by conventional SDS-PAGE (Figures 1 and 2A).

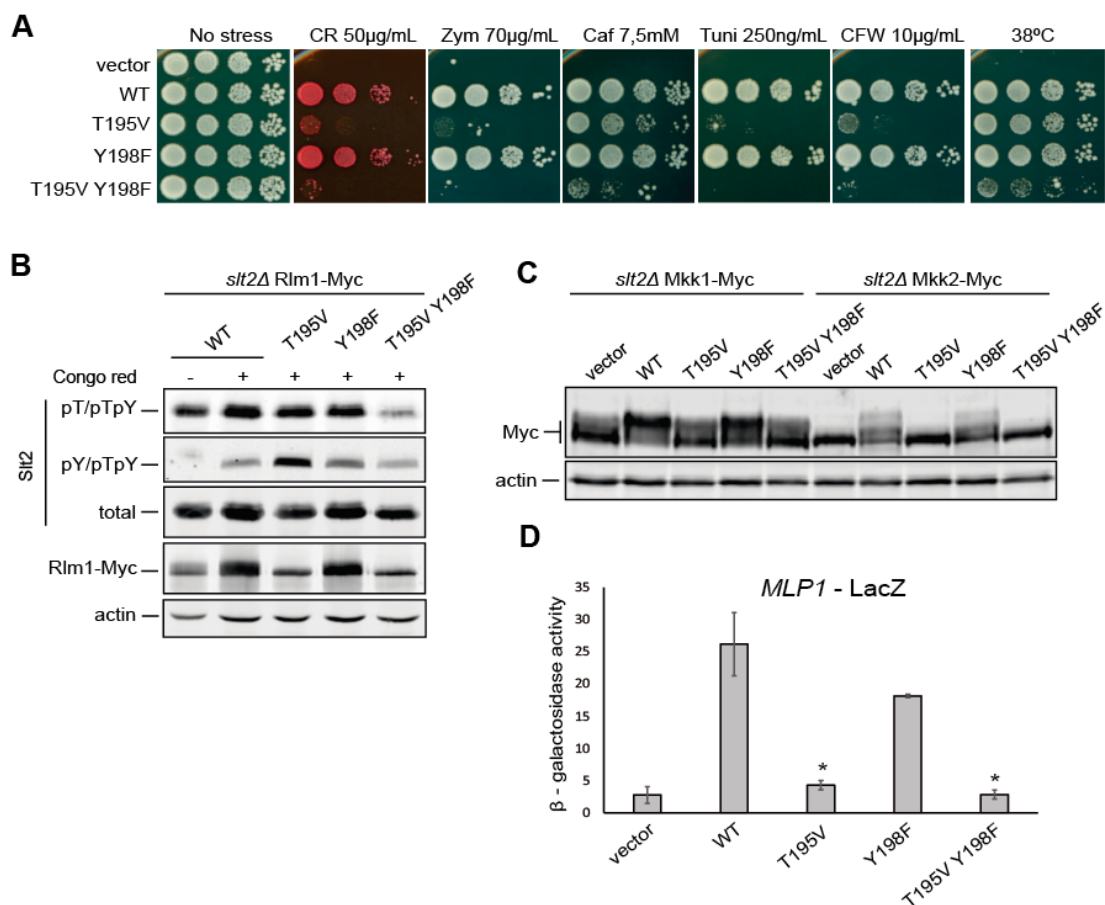


Figure 6. Analysis of the activity of Slt2 mutated in the conserved residues T195 and Y198. **(A)** Ten-fold serial dilutions of BY4741 *slt2Δ*-RLM1Myc cells bearing the pRS316 plasmid alone (vector) or expressing Slt2 (WT), $\text{Slt2}^{\text{T195V}}$, $\text{Slt2}^{\text{Y198F}}$, or $\text{Slt2}^{\text{T195V Y198F}}$. Cells were spotted onto YPD plates in the absence (no stress) or presence of the indicated stimuli. **(B)** The same cells as in **(A)** were grown to the mid-exponential phase in YPD and stimulated with 30 µg/mL of CR for 2 h. Cell extracts were resolved by SDS-PAGE, and analyzed by immunoblotting with anti-Slt2-pT/pTpY and anti-Slt2-pY/pTpY, as in Figure 1; anti-Mpk1 (total); anti-MYC 4A6; and anti-actin antibodies. **(C)** Yeast extracts from *slt2Δ* *MKK1-myc* (YMJ30 strain) and *slt2Δ* *MKK2-myc* (YMJ31 strain) cells transformed with the same plasmids as in **(A)** were resolved by SDS-PAGE as in **(B)** and analyzed by immunoblotting with anti-Myc 4A6 and anti-actin antibodies. **(D)** β-galactosidase activity of cell extracts from *slt2Δ* (Y00993 strain) co-transformed with pMLP1-LacZ and the same plasmids as in **(A)** after incubation with 30 µg/mL of CR for 2 h. Data represent the average of the activity of three independent transformants. Error bars indicate the standard deviation. One asterisk (*) indicates a *p*-value of <0.05, assessed by Student's *t*-test, and refers to wild type Slt2 (WT) activity. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

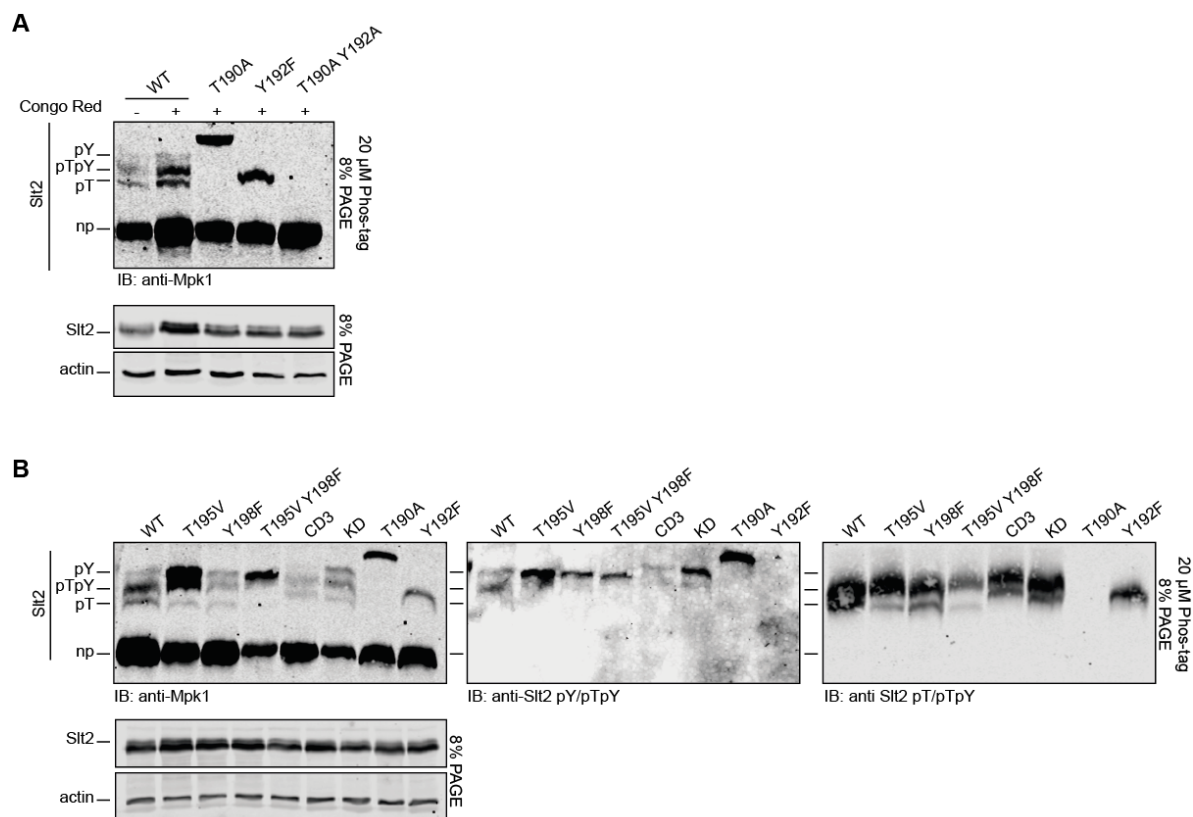


Figure 7. Detection by phosphate-affinity (Phos-tag) of the differentially phosphorylated forms of Slt2. **(A)** BY4741 *slt2 Δ* -RLM1Myc cells containing the same plasmid pRS316 expressing Slt2 (WT), Slt2^{T190A}, Slt2^{Y192F}, or Slt2^{T190A Y192A} were grown to the mid-exponential phase in YPD and then stimulated with 30 μ g/mL of CR for 2 h. Cell extracts were resolved by Phos-tag SDS-PAGE (top panel) and SDS-PAGE (bottom panel), and immunoblotted with anti-Mpk1 (Slt2) and anti-actin antibodies. **(B)** Cell extracts of *slt2 Δ* -RLM1Myc cells containing plasmid pRS316 expressing the same proteins as in **(A)**, as well as Slt2^{T195V}, Slt2^{Y198F}, Slt2^{T195V Y198F}, Slt2^{CD3}, and Slt2^{KD}, resolved as in **(A)** and immunoblotted with anti-Mpk1 (Slt2) and anti-actin (left panels), anti-Slt2-pY/pTpY (middle panel), and anti-Slt2-pT/pTpY (right panel) antibodies. A representative assay from three different experiments with distinct transformants is shown.

The T195V mutation promoted a strong accumulation of the Y192-monophosphorylated Slt2 form, and a reduction in T190 monophosphorylation (Figure 7B, left panel). The Y198F mutation yielded a similar decrease in T190-monophosphorylated Slt2, but only a slight increase in Y192-monophosphorylated Slt2. The combination of both mutations diminished the hyperphosphorylation at Y192 caused by T195V mutation and further reduced monophosphorylation at T190 to almost negligible levels. A strong reduction in the dually phosphorylated form was also observed for the double mutant Slt2^{T195V Y198F}. Immunodetection with anti-Slt2-pY/pTpY (Figure 7B, middle panel) and anti-Slt2-pT/pTpY (Figure 7B, right panel) of the same extracts confirmed the clogging of the Y192-monophosphorylated form of Slt2^{T195V} and the strong reduction in T190-monophosphorylation and dual phosphorylation of Slt2^{T195V Y198F}; effects that were also observed by conventional SDS-PAGE (Figure 6B).

An analysis of Slt2^{KD} and Slt2^{CD3} by the Phos-tag method revealed the same three phosphorylated bands, but with a slightly lower mobility than those of the wild type Slt2 (Figure 7B). Interestingly, the Slt2^{KD} mutant lacking kinase activity displayed an increased level of Y192 monophosphorylation, whereas Slt2^{CD3} showed an overall decrease in the amount of all phosphorylated forms, in agreement with the reduced binding to the activating kinases Mkk1 and Mkk2.

3. Discussion

By combining the use of phosphosite-specific antibodies with the Phos-tag methodology in Western blotting analysis, we have taken a step forward in the characterization of signaling through the CWI pathway at the MAPK Slt2 level. In addition to setting up methodological tools for monitoring the abundance of the distinct co-existing Slt2 phosphoforms, we have deepened the knowledge on this yeast MAPK in terms of (i) the impact of individual phosphorylation events on functionality, (ii) the order of phosphorylation and dephosphorylation reactions within the TEY motif, (iii) the Slt2 phosphorylation requirements for key activators and down regulators to act on this MAPK, and (iv) the molecular and functional relevance of several key motifs of Slt2.

Activation of the CWI pathway has long been known to correlate with an increased phosphorylation of Slt2 [26]. Therefore, to evaluate the activity of this MAPK, ours and other research groups studying fungal CWI pathways have traditionally used commercial antibodies that detect the dually phosphorylated species of mammalian ERKs [42]. However, some of these antibodies are also able to detect ERK monophosphorylated forms, which have been shown to display disparate signaling roles. Although in vitro analysis of Erk2 revealed that the two monophosphorylated forms produced an intermediate activity state of this MAPK [43], most studies in mammalian MAPKs have reported that only the monophosphothreonyl residue displayed some biological activity [13,15]. This is also the case for Pmk1, which is the Slt2 homolog in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* [10]. Here, we found that threonine-monophosphorylated Slt2^{Y192F} is partially active, whereas Slt2^{T190A} only retained very residual activity, similar to that of catalytically inactive Slt2^{KD}, suggesting that a non-catalytic mechanism underlies the limited effect of the Y192-monophosphorylated form. Furthermore, we have shown that, in contrast to Slt2, the threonine monophosphorylatable Slt2^{Y192F} mutant was able to retrophosphorylate Mkk1, but not Mkk2, suggesting that the different phosphoforms may have distinct substrate specificities, as observed for p38α [44]. Intriguingly, by using the antibody that recognizes monophosphorylation at Y192, as well as Phos-tag analysis, we observed that changes in specific Slt2 residues that render an activity-deficient MAPK, such as Slt2^{T190A}, Slt2^{KD}, and Slt2^{T195V}, correlate with hyperphosphorylation of the Y192. This demonstrates that an increase in the phosphorylation signal does not always correlate with an increase in the activity of the MAPK and shows the importance of discerning the different phosphorylation states of an MAPK by using complementary antibodies, and ideally, the Phos-tag methodology.

In this study, we characterized, for the first time, the Slt2 phosphorylation state by using Phos-tag analysis. In other yeast MAPKs, such as Hog1 and Kss1, only dual-phosphorylated forms have been detected [9,45]. In the case of Fus3, two upshifting bands—one corresponding to monophosphorylated and the other to dual-phosphorylated forms—were observed [8]. However, here, we have shown that three upshifting bands, corresponding to threonine-monophosphorylated, tyrosine-monophosphorylated, and dually-phosphorylated Slt2, can be detected by using Phos-tag. Strikingly, even upon stimulation, phosphorylated Slt2 levels are very low relative to the whole pool of Slt2 present in the yeast cell. In contrast, in Fus3 and Kss1, the total amount of phosphorylated forms is quite similar to the non-phosphorylated MAPKs [8,45], while the entire pool of cellular Hog1 is dually phosphorylated in response to osmotic stress [9]. Although the role that this high level of unphosphorylated Slt2 plays in shaping the response of this pathway to cell wall stresses remains to be established, this finding suggests that activated Slt2 is likely to exist only in discrete pools at specific cellular localizations or compartments. Future studies on Slt2 phosphorylation triggered by different CWI stimuli [31] using Phos-tag analysis would be very useful for identifying stress conditions that render higher levels of phosphorylated Slt2.

Here, we have shown that, following stress, when phosphorylation on Y192 is constrained, T190 is rarely phosphorylated and, in clear contrast, when the phosphorylation of T190 is inhibited, Y192 phosphorylation accumulates, leading to the “clogging” of

Y192-monophosphorylated Slt2. Similar behavior has also been described for *S. pombe* Pmk1 [10]. Our results prove that this hyperphosphorylation on the Y192 residue is neither caused by a trapping mechanism of the Slt2^{T190A} mutant version by any of the MKKs, nor by a lack of Msg5 phosphatase activity on the Y192 residue. On the contrary, Msg5 preferentially dephosphorylates the phosphotyrosine residue. Together, these results suggest that dual phosphorylation and dephosphorylation is a highly ordered mechanism in which Y192 phosphorylation can be considered as a stepping-stone for full Slt2 activation/inactivation, while T190 phosphorylation is responsible for providing activity to the MAPK. The same phosphorylation and desphosphorylation order was described in the mammalian Erk1 [46–48]. Although initial studies indicated that the dual phosphorylation of MAPKs by MAPK kinases occurred in a two-step, distributive manner [49], a later study showed that mammalian MAPK Erk could be phosphorylated in a processive manner due to molecular crowding [7]. This was also suggested for Pmk1 and Sty1 in the rod-shaped yeast *S. pombe* [10], and for Fus3 and Hog1 in *S. cerevisiae* [8,9]. Considering the lower level of tyrosine-monophosphorylation and dual phosphorylation compared to unphosphorylated Slt2, and the similar phosphorylation dynamics monitored with the different antibodies, Slt2 phosphorylation by Mkk1 and Mkk2 seems to occur via a processive mechanism.

Our results also allowed us to gain an insight into the impact of residues and domains of Slt2 other than TEY on its activation by phosphorylation and/or activity, reflecting the complexity of its regulation. Although it has been described that the interaction of the Erk CD domain is crucial for binding to D domains of MKPs [50], in previous studies, we demonstrated that, rather than mediating the interaction with Msg5, the CD domain was involved in Slt2 binding to Mkk1 [37]. Here, we have shown that both Mkks bind Slt2 not only through the CD site, but also in a multivalent way, as occurs with the MEK–Erk interaction [51,52]. Similarly, although D domain mutations in Rlm1 blocked transcriptional activation [53], we found that the Slt2^{CD3} mutant protein is still able to signal to Rlm1, suggesting that alternative sites also exist in Slt2 for Rlm1 D domain interaction. Whereas the lack of a functional CD domain reduced Slt2 activity, removal of the C-terminal part of Slt2 rendered it hyperactive. A similar truncated Slt2 version was previously observed to be hyperphosphorylated by using an anti-phospho-ERK antibody that detects Tyr 204 phosphorylation within the TEY motif [38]. These authors suggested that Slt2 has an inherent autophosphorylation capability that is suppressed via the C-terminal domain. We observed that Slt2^{ΔC374} also displays hyperphosphorylation at the T190 residue, supporting the idea that the Slt2 tail negatively regulates autophosphorylation on T190 and, ultimately, the activity of the kinase.

In most MAPKs, modifications other than TEY phosphorylation at the activation loop are essential for regulating kinase activity. T195 and Y198 of Slt2 are equivalent positions to phosphosites T207 and Y210 in mammalian Erk1, which are two highly conserved amino acids found not only in MAPKs, but also in most human protein kinases [23]. However, in our Phos-tag analysis, no Slt2 phosphorylation in addition to that found at the TEY motif was detected, at least under CR stress. Whereas Y210 in Erk1 is essential for its recognition by MEK1, we found that the Y198F mutation only had a minor effect on Slt2 phosphorylation and activity, suggesting that Y198 is not an essential regulatory site in Slt2. In contrast, T195 seems to be important for Slt2 activity and functionality, as reported for Erk1, in which T207A mutation resulted in a reduction in its kinase activity [23]. Slt2^{T195V} is highly phosphorylated on Y192, as mentioned above for non-active Slt2 proteins, such as Slt2^{T190A} or Slt2^{KD}. This phenomenon could be due to a compensatory increase in the activity of upstream elements along the route, caused by cell wall defects provoked by the absence of a functional CWI pathway. Additionally, inactive Slt2 mutants would be unable to trigger negative feedback loops, such as retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 [34].

MAPKs from yeast to humans have the TXY motif in common, whose dual phosphorylation is required for them to be fully active. Nevertheless, results such as those presented in this study show that monophosphorylated forms can play different biological roles

and that conserved residues other than those in the TEY motif influence the activity, even having opposite effects among MAPKs. This underscores the importance of deepening the study of each MAPK in order to provide a broad view of the complexity of this family of kinases, which, although highly conserved, also shows a great variety of regulatory mechanisms.

4. Materials and Methods

4.1. Plasmids and DNA Manipulation

Plasmids used in this study (Table 1) were generated using standard DNA techniques, with *Escherichia coli* strain DH5 α as the host. All employed oligonucleotides are listed in Supplementary Table S1. The fidelity of all constructs was verified by nucleotide sequence analysis.

Table 1. Plasmids used in this study.

Plasmid	Source
pRS316	[54]
pRS316-SLT2	[55]
YCp50[<i>mpk1</i> Y192F]	[25]
YCp50[<i>mpk1</i> T190A]	[25]
pRS315	[54]
pRS315-SLT2	This study
pRS315- <i>slt2</i> ^{T190A}	This study
pRS315- <i>slt2</i> ^{Y192F}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{T190A}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{Y192F}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{T190A Y192A}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{ΔC374}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{CD3}	This study
pHR3	[32]
pRS316- <i>slt2</i> ^{KD}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{T195V}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{Y198F}	This study
pRS316- <i>slt2</i> ^{T195V Y198F}	This study
YEp352GST	[30]
YEp352MSG5GST	[30]
Yp352MSG5 ^{C319A} GST	[30]
pMLP1-LacZ	Dr. Javier Arroyo
pLA10	[56]
pRS316-6 $\times$ His-Slt2	This study
pRS316-GFP-SLT2	This study
pRS316-GFP- <i>slt2</i> ^{T195V}	This study
pRS316-GFP- <i>slt2</i> ^{T195V Y198F}	This study
pRS305-MKK1-6MYC	[34]
pRS305-MKK2-6MYC	[34]

To obtain pRS316-*slt2*^{T190A} and pRS316-*slt2*^{Y192F}, the 1.3 kb *Hind*III–*Hind*III fragments from YCp50-*slt2*^{T190A}, and YCp50-*slt2*^{Y192F} plasmids were cloned into the 5.8 kb *Hind*III–*Hind*III fragment of pRS316-SLT2. The pRS315-SLT2, pRS315-*slt2*^{T190A}, and pRS315-*slt2*^{Y192F} plasmids were constructed by inserting the 2.8 kb *Sac*I–*Bam*HI fragment from pRS316-SLT2, pRS316-*slt2*^{T190A}, or pRS316-*slt2*^{Y192F} into the pRS315 vector cleaved with the same endonucleases.

An overlapping PCR with SLT2-5 and SLT2-3 primers, in combination with mutagenic primers SLT2-MNP5/SLT2-MNP3, SLT2-MSTOP5/SLT2-MSTOP3, and SLT2-CD5/SLT2-CD3, was carried out to construct pRS316-*slt2*^{T190A Y192A}, pRS316-*slt2* ^{Δ C374}, and pRS316-*slt2*^{CD3}, respectively, by using pRS316-SLT2 as the template. The *Hind*III–*Hind*III digested PCR products were inserted into the 5.8 kb *Hind*III–*Hind*III fragment from pRS316-SLT2.

The kinase-dead version of *SLT2* (pRS316-*slt2*^{KD}) was obtained by subcloning the *EcoRI*–*SalI* 2.2-kb fragment bearing *slt2-K54F* from pHR3 into *EcoRI*–*SalI* sites of pRS316.

pRS316-*slt2*^{T195V}, pRS316-*slt2*^{Y198F}, and pRS316-*slt2*^{T195V Y198F} were obtained by site-directed mutagenesis with primers *SLT2*-T195V5/*SLT2*-T195V3, *SLT2*-Y198F5/*SLT2*-Y198F3, and *SLT2*-T195VY198F5/*SLT2*-T195VY198F3, respectively, using the plasmid pRS316-*SLT2* as the template, and followed by *DpnI* digestion.

The plasmid pRS316-*GFP-SLT2* was constructed via a two-step process. First, the fragment *ClaI*-6xHis-*MluI* was introduced into the N-terminal region of *SLT2* by an overlapping PCR with primers *SLT2*-Pre*SalI*.5, *SLT2*-Post*EcoRI*.3, *SLT2*-*ClaI*6xHis*MluI*.5, and *SLT2*-*ClaI*6xHis*MluI*.3, using pRS316-*SLT2* as the template to generate pRS316-6xHis-*SLT2*. Second, *GFP* was amplified from the pLA10 plasmid with primers *GFP*-5 and *GFP*-3, which include *ClaI* and *MluI* restriction sites, respectively. The PCR product was then digested and subcloned into *ClaI*–*MluI* sites of pRS316-6xHis-*SLT2*, producing pRS316-*GFP-SLT2*. Plasmids pRS316-*GFP-slt2*^{T195V} and pRS316-*GFP-slt2*^{T195V Y198F} were obtained with the same strategy and primers as pRS316-*slt2*^{T195V} and pRS316-*slt2*^{T195V Y198F}, respectively, using pRS316-*GFP-SLT2* as the template.

4.2. Yeast Strains and Culture Conditions

All yeast strains used in this study are described in Table 2. The strains YMJ30 and YMJ31 were obtained by integrating the fragments *MKK1*-6MYC and *MKK2*-6MYC (from digestion of the plasmids pRS305-*MKK1*-6MYC and pRS305-*MKK2*-6MYC with *CellIII* and *Eco81I*, respectively) into the *MKK1* and *MKK2* loci of BY4741 *slt2Δ* (Y00993 strain). The strains YGGR32, YGGR33, and YGGR34 were constructed by amplification of the *slt2::NatMx4* cassette from the YSTH4 strain with the primers *SLT2*-pre121.5 and *SLT2*-post165.3, and subsequent integration into the BY4741 isogenic *kanMx4* deletion mutants *mkk1Δ*, *mkk2Δ*, and *msg5Δ* (Y02487, Y02212, and Y07373 strains, respectively).

Table 2. Yeast strains used in this study.

Strain	Genotype	Reference
Y00993	BY4741; <i>slt2Δ::KanMx4</i>	Euroscarf
Y02487	BY4741; <i>mkk1Δ::KanMx4</i>	Euroscarf
Y02112	BY4741; <i>mkk2Δ::KanMx4</i>	Euroscarf
Y07373	BY4741; <i>msg5Δ::KanMx4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>slt2Δ</i> -RLM1Myc	BY4741; <i>slt2Δ::KanMx4</i> ; RLM1-6MYC::HIS3	[35]
YMJ30	BY4741, <i>slt2Δ::KanMx4</i> , <i>MKK1::6MYC::LEU2</i>	Dr. Jiménez-Sánchez
YMJ31	BY4741, <i>slt2Δ::KanMx4</i> , <i>MKK2::6MYC::LEU2</i>	Dr. Jiménez-Sánchez
YSTH4	Y3656; <i>slt2::NatMx4</i>	[57]
YGGR32	BY4741, <i>mkk1Δ::KanMx4</i> , <i>slt2::NatMx4</i>	This study
YGGR33	BY4741, <i>mkk2Δ::KanMx4</i> , <i>slt2::NatMx4</i>	This study
YGGR34	BY4741, <i>msg5Δ::KanMx4</i> , <i>slt2::NatMx4</i>	This study

Yeast cultures were grown in yeast extract–bacto-peptone–dextrose (YPD) medium or in selective synthetic dextrose media (SD) containing 2% glucose and the appropriate amino acids for plasmid selection. All strains were cultured at 30 °C unless stated otherwise. Experiments for analyzing *SlT2* phosphorylation under stress were carried out by incubating cells overnight in synthetic dextrose (SD) media and refreshing them to an optical density (OD₆₀₀) of 0.3 in YPD to achieve the mid-log phase. Cell cultures were then treated with 30 µg/mL of Congo Red (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated for an additional 2 h. After that time, cells were collected and frozen immediately in liquid nitrogen for subsequent processing.

4.3. Preparation of Yeast Extracts and Immunoblotting Analysis

Yeast extracts were obtained by trichloroacetic acid precipitation as previously described [58]. Once solubilized, samples were boiled for 5 min and allowed to cool before loading. Samples to be analyzed by SDS–PAGE 10% 37.5:1 acrylamide:Bis–acrylamide

gels (PanReac AppliChem ITW Reagents, Barcelona, Spain) were run at a constant voltage of 170 V until the bromophenol blue reached the bottom of the gel, and transferred to nitrocellulose membranes for immunoblotting (110 V for 70 min). Analysis of protein phosphorylation by Phos-tag was performed using Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE in conjunction with a Bis-tris-buffered neutral-pH gel system, as described in [59]. We optimized several formulations and adapted several protocol steps to properly resolve different phosphorylation states, as indicated below. The resolving gel solution was composed of 8% 37.5:1 acrylamide:bis-acrylamide mixture, 350 mM Bis-Tris pH 6.8, 20 μM Phos-tagTM Acrylamide (Fujifilm Wako Chemicals Europe GmbH, Neuss, Germany), 40 μM ZnCl_2 , 0.1% tetramethylethylenediamine (TEMED), and 0.05% ammonium peroxydisulfate (PSA). The resolving gel was poured into the cassette, overlaid with isopropanol, and polymerized at room temperature for 1 h. Before adding the stacking gel solution to the cassette, the resolving layer was rinsed five times with 350 mM Bis-Tris (pH 6.8). The stacking gel solution (4.5% 37.5:1 acrylamide:Bis-acrylamide, 350 mM Bis-Tris pH 6.8; 0.1% TEMED, and 0.05% PSA) was polymerized at room temperature for 1 h. Samples to be analyzed by Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE were run at a constant current of 20 mA per gel for 150 min. Prior to transfer, the gel was immersed in transfer buffer containing 5 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (twice, for 10 min each). Next, the gel was immersed in blotting buffer without EDTA for 10 min. Proteins were then transferred to the membrane using the tank method in buffer containing 0.1% SDS overnight (18 h), at 20 V and 4 °C. After protein transfer, the membrane was washed in deionized water (four times, for 5 min each).

Both SDS-PAGE and Zn^{2+} -Phos-tag SDS-PAGE gels were cast, run, and transferred using the 1.0-mm Bio-Rad Mini-PROTEAN gel system and a 0.45 μm nitrocellulose blotting membrane (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA). The resulting membranes were blocked by incubation in 5% non-fat dry milk diluted in phosphate-buffered saline (PBS) Tween 0.1% for 1 h at room temperature.

Membranes were probed with an appropriate primary antibody, all of which are listed in Table 3, and diluted in 1% non-fat dry milk in PBS Tween 0.1%.

Table 3. Primary antibodies used in this study.

Name	Catalog Number	Species	Dilution Factor ^a	Manufacturer
Mpk1 (E9)	sc-133189	Mouse mC	WB: 1:1000, IP: 1:20	Santa Cruz, Inc
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	4370	Rabbit mC	WB: 1:1000	Cell signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204)	4377	Rabbit mC	WB: 1:250	Cell signaling
Diphosphorylated ERK-1&2	M8159	Mouse mC	WB: 1:1000	SIGMA
GST	sc459	Rabbit pC	WB: 1:1000	Santa Cruz, Inc.
Myc 4A6	05-724	Mouse mC	WB: 1:1000	Merck Millipore
C-Myc	PLA0001	Rabbit pC	WB: 1:1000	Sigma-Aldrich
Actin C4	69100	Mouse mC	WB: 1:1000	MP Biomedicals

^a Applications: WB—Western blotting and IP—immunoprecipitation.

After washing samples with PBS Tween 0.1% (five times, for 5 min each), membrane-bound immune complexes were detected by incubation with a 1:5000 dilution of an appropriate infrared dye-labeled secondary antibody—800 CW Goat anti-Rabbit IgG (926-32211), 680LT Goat anti-Rabbit IgG (926-68021), 800 CW Goat anti-Mouse IgG (926-32210), or 680LT Goat anti-Mouse IgG (926-68020) (LI-COR Biosciences, Lincoln, NE, USA). After washing as described above, immunoblots were analyzed with an infrared imaging system (Odyssey, LI-COR Biosciences).

4.4. Yeast Drop Dilution Growth Assays

To perform the growth assays, cultures were grown to saturation overnight in SD media, and adjusted to an OD₆₀₀ of 0.5 in water. Tenfold serial dilutions of the cell

suspensions were spotted onto agar plates containing YPD medium. When indicated, YPD plates were supplemented with a corresponding concentration of any of the following compounds: Congo Red (Merck); caffeine (Sigma-Aldrich); SDS (PanReac Applichem ITW Reagents); tunicamycin (Sigma-Aldrich); Calcofluor White (Sigma-Aldrich); or zymolyase 100T (MP Biomedicals™, Santa Ana, CA, USA). The plates were imaged after incubation at 30 °C (or 38 °C, when indicated) for 72 h.

4.5. Co-Purification Experiment with Dynabeads™ Protein G

For protein extraction, cells were resuspended in cold lysis buffer (50 mM Tris/HCl (pH 7.5), 5 mM EDTA (pH 8), 150 mM NaCl, 50 mM NaF, 5 mM sodium pyrophosphate, 10% glycerol, 0.1% NP-40, 50 mM β -glycerol phosphate, and 1 mM sodium orthovanadate) supplemented with 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) and protease inhibitor mixture (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and lysed using 0.75–1 mm diameter glass beads. The extracts were then adjusted to the same protein concentration and incubated with Dynabeads™ Protein G (Thermo Fisher Scientific) coupled to the Mpk1-E9 antibody overnight at 4 °C. Beads were extensively washed with washing buffer (0.05% Tween 20 and 0.5 M NaCl in PBS) and protein complexes were eluted with elution buffer (50 mM glycine pH 2.8). Then, 5x SDS loading buffer was added; samples were boiled for 5 min, analyzed by SDS–PAGE, and immunoblotted as indicated above (4.3).

4.6. β -galactosidase Activity Assay

β -galactosidase activity was determined as described previously [36]. Briefly, extracts were obtained after breaking cells with 0.75–1 mm diameter glass beads; protein concentrations were determined by the Bradford method; and β -galactosidase activity was spectrophotometrically determined at 415 nm by using o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside (ONPG) as the substrate, expressed as nanomoles of o-nitrophenol/min/mg of total protein.

4.7. Microscopy Techniques

For GFP in vivo fluorescence microscopy, cells were collected by centrifugation at 2500 rpm and prepared for visualization. The microscope used was an Eclipse TE2000U (Nikon, Tokyo, Japan) with an appropriate set of filters. Digital images were acquired with an Orca C4742-95-12ER charge-coupled device camera (Hamamatsu, Hamamatsu city, Japan) and processed with the HCLImage software (Hamamatsu).

Supplementary Materials: Supplementary Materials can be found at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1110/s1>.

Author Contributions: G.G.-R. conceived and performed most of the experiments, analyzed the results, and wrote the manuscript. Á.S.-M. performed several experiments, analyzed the results, and revised the writing. H.M. and M.M. conceived the idea of the project, analyzed the results, wrote the manuscript, and were responsible for funding acquisition. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (Spain), grant number BIO2016-75030-P; Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), grant number PID2019-105342GB-I00; and Comunidad de Madrid (Spain) and European Structural and Investment Funds, grant number S2017/BMD-3691 (InGEMICS-CM). G.G.-R. is recipient of a predoctoral contract from Universidad Complutense de Madrid (Spain). Á.S.-M. is 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 that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Acknowledgments: We thank David Levin, María Jiménez-Sánchez, and Javier Arroyo for providing some of the materials used in this study. We also thank Françoise Roelants for technical advice, 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.

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

Abbreviations

Caf	Caffeine
CD	Common docking
CFW	Calcofluor White
CR	Congo Red
CWI	Cell wall integrity
DSP	Dual-specificity phosphatases
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
GFP	Green fluorescent protein
GST	Glutathione S-transferase
IB	Immunoblotting
IP	Immunoprecipitation
JNK	c-Jun N-terminal kinase
KD	Kinase dead
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKKK/MAP3K	MAPK kinase kinase
MAPKK/MAP2K/MEK	MAPK kinase
MKP	MAPK phosphatase
mC	Monoclonal
OD	Optical density
ONPG	o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside
PAGE	Polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate-buffered saline
pC	Policlonal
PMSF	Phenylmethylsulfonyl fluoride
Pro	Proline
PSA	Ammonium peroxydisulfate
PTMs	Post-translational modifications
SD	Synthetic dextrose
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Ser	Serine
TEMED	tetramethylethylenediamine
Thr	Threonine
Tuni	Tunicamycin
Tyr	Tyrosine
WB	Western blotting
WT	Wild type
Zym	Zymolyase

References

1. Marshall, C.J. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **1994**, *4*, 82–89. [[CrossRef](#)]
2. Keshet, Y.; Seger, R. The MAP kinase signaling cascades: A system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods Mol. Biol.* **2010**, *661*, 3–38. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Chen, R.E.; Thorner, J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Et Biophys. Acta* **2007**, *1773*, 1311–1340. [[CrossRef](#)]
4. Anderson, N.G.; Maller, J.L.; Tonks, N.K.; Sturgill, T.W. Requirement for integration of signals from two distinct phosphorylation pathways for activation of MAP kinase. *Nature* **1990**, *343*, 651–653. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Ahn, N.G.; Seger, R.; Bratlien, R.L.; Diltz, C.D.; Tonks, N.K.; Krebs, E.G. 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.* **1991**, *266*, 4220–4227. [[CrossRef](#)]
6. Ferrell, J.E., Jr.; Bhatt, R.R. Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 19008–19016. [[CrossRef](#)]
7. Aoki, K.; Yamada, M.; Kunida, K.; Yasuda, S.; Matsuda, M. Processive phosphorylation of ERK MAP kinase in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 12675–12680. [[CrossRef](#)]
8. Nagiec, M.J.; McCarter, P.C.; Kelley, J.B.; Dixit, G.; Elston, T.C.; Dohlman, H.G. Signal inhibition by a dynamically regulated pool of monophosphorylated MAPK. *Mol. Biol. Cell* **2015**, *26*, 3359–3371. [[CrossRef](#)]
9. English, J.G.; Shellhammer, J.P.; Malahe, M.; McCarter, P.C.; Elston, T.C.; Dohlman, H.G. MAPK feedback encodes a switch and timer for tunable stress adaptation in yeast. *Sci. Signal* **2015**, *8*, ra5. [[CrossRef](#)]
10. Vazquez, B.; Soto, T.; del Dedo, J.E.; Franco, A.; Vicente, J.; Hidalgo, E.; Gacto, M.; Cansado, J.; Madrid, M. Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast. *Cell. Signal* **2015**, *27*, 2534–2542. [[CrossRef](#)]
11. Martín, H.; Flández, M.; Nombela, C.; Molina, M. Protein phosphatases in MAPK signalling: We keep learning from yeast. *Mol. Microbiol.* **2005**, *58*, 6–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Gonzalez-Rubio, G.; Fernandez-Acero, T.; Martin, H.; Molina, M. Mitogen-Activated Protein Kinase Phosphatases (MKPs) in Fungal Signaling: Conservation, Function, and Regulation. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1790. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Sugden, P.H.; Markou, T.; Fuller, S.J.; Tham el, L.; Molkentin, J.D.; Paterson, H.F.; Clerk, A. Monophosphothreonyl extracellular signal-regulated kinases 1 and 2 (ERK1/2) are formed endogenously in intact cardiac myocytes and are enzymically active. *Cell. Signal* **2011**, *23*, 468–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Askari, N.; Beenstock, J.; Livnah, O.; Engelberg, D. p38alpha is active in vitro and in vivo when monophosphorylated at threonine 180. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2497–2504. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Zhang, Y.Y.; Mei, Z.Q.; Wu, J.W.; Wang, Z.X. Enzymatic activity and substrate specificity of mitogen-activated protein kinase p38alpha in different phosphorylation states. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 26591–26601. [[CrossRef](#)]
16. Bell, M.; Engelberg, D. Phosphorylation of Tyr-176 of the yeast MAPK Hog1/p38 is not vital for Hog1 biological activity. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 14603–14606. [[CrossRef](#)]
17. Bardwell, L.; Cook, J.G.; Voora, D.; Baggott, D.M.; Martinez, A.R.; Thorner, J. Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev.* **1998**, *12*, 2887–2898. [[CrossRef](#)]
18. Bhattacharyya, R.P.; Reményi, A.; Good, M.C.; Bashor, C.J.; Falick, A.M.; Lim, W.A. The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science* **2006**, *311*, 822–826. [[CrossRef](#)]
19. Oppermann, F.S.; Gnad, F.; Olsen, J.V.; Hornberger, R.; Greff, Z.; Kéri, G.; Mann, M.; Daub, H. Large-scale proteomics analysis of the human kinome. *Mol. Cell. Proteom. MCP* **2009**, *8*, 1751–1764. [[CrossRef](#)]
20. Daub, H.; Olsen, J.V.; Bairlein, M.; Gnad, F.; Oppermann, F.S.; Körner, R.; Greff, Z.; Kéri, G.; Stemmann, O.; Mann, M. Kinase-selective enrichment enables quantitative phosphoproteomics of the kinome across the cell cycle. *Mol. Cell* **2008**, *31*, 438–448. [[CrossRef](#)]
21. Dephoure, N.; Zhou, C.; Villén, J.; Beausoleil, S.A.; Bakalarski, C.E.; Elledge, S.J.; Gygi, S.P. A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 10762–10767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rikova, K.; Guo, A.; Zeng, Q.; Possemato, A.; Yu, J.; Haack, H.; Nardone, J.; Lee, K.; Reeves, C.; Li, Y.; et al. Global survey of phosphotyrosine signaling identifies oncogenic kinases in lung cancer. *Cell* **2007**, *131*, 1190–1203. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lai, S.; Pelech, S. Regulatory roles of conserved phosphorylation sites in the activation T-loop of the MAP kinase ERK1. *Mol. Biol. Cell* **2016**, *27*, 1040–1050. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Levin, D.E. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: The cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **2011**, *189*, 1145–1175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Lee, K.S.; Irie, K.; Gotoh, Y.; Watanabe, Y.; Araki, H.; Nishida, E.; Matsumoto, K.; Levin, D.E. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* **1993**, *13*, 3067–3075. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Martín, H.; Rodríguez-Pachón, J.M.; Ruiz, C.; Nombela, C.; Molina, M. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 1511–1519. [[CrossRef](#)]
27. De Nobel, H.; Ruiz, C.; Martin, H.; Morris, W.; Brul, S.; Molina, M.; Klis, F.M. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **2000**, *146*(pt 9), 2121–2132. [[CrossRef](#)]
28. Tatjer, L.; Sacristán-Reviriego, A.; Casado, C.; González, A.; Rodríguez-Porrata, B.; Palacios, L.; Canadell, D.; Serra-Cardona, A.; Martín, H.; Molina, M.; et al. Wide-Ranging Effects of the Yeast Ptc1 Protein Phosphatase Acting Through the MAPK Kinase Mkk1. *Genetics* **2016**, *202*, 141–156. [[CrossRef](#)]
29. 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](#)]
30. Sacristán-Reviriego, A.; Madrid, M.; Cansado, J.; Martín, H.; Molina, M. 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* **2014**, *9*, e85390. [[CrossRef](#)]

31. Jimenez-Gutierrez, E.; Alegria-Carrasco, E.; Sellers-Moya, A.; Molina, M.; Martin, H. Not just the wall: The other ways to turn the yeast CWI pathway on. *Int. Microbiol.* **2020**, *23*, 107–119. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Martín, H.; Arroyo, J.; Sánchez, M.; Molina, M.; Nombela, C. Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol. Gen. Genet.* **1993**, *241*, 177–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. 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](#)] [[PubMed](#)]
34. 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](#)]
35. 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](#)]
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](#)]
37. Palacios, L.; Dickinson, R.J.; Sacristan-Reviriego, A.; Didmon, M.P.; Marin, M.J.; Martin, H.; Keyse, S.M.; Molina, M. 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.* **2011**, *286*, 42037–42050. [[CrossRef](#)]
38. Levin-Salomon, V.; Maayan, I.; Avrahami-Moyal, L.; Marbach, I.; Livnah, O.; Engelberg, D. When expressed in yeast, mammalian mitogen-activated protein kinases lose proper regulation and become spontaneously phosphorylated. *Biochem. J.* **2009**, *417*, 331–340. [[CrossRef](#)]
39. Lorenz, K.; Schmitt, J.P.; Schmitteckert, E.M.; Lohse, M.J. A new type of ERK1/2 autophosphorylation causes cardiac hypertrophy. *Nat. Med.* **2009**, *15*, 75–83. [[CrossRef](#)]
40. Zhang, Y.; Huang, X.; Wang, J.; Wang, X.; Liu, X.; Chen, Y.; Xu, W.; Wang, Y. Nitration-induced ubiquitination and degradation control quality of ERK1. *Biochem. J.* **2019**, *476*, 1911–1926. [[CrossRef](#)]
41. Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E.; Takiyama, K.; Koike, T. Phosphate-binding tag, a new tool to visualize phosphorylated proteins. *Mol. Cell. Proteom. MCP* **2006**, *5*, 749–757. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Bardwell, L.; Shah, K. Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates. *Methods* **2006**, *40*, 213–223. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Zhou, B.; Zhang, Z.Y. The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by differential phosphorylation in the activation loop. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 13889–13899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Mittelstadt, P.R.; Yamaguchi, H.; Appella, E.; Ashwell, J.D. T cell receptor-mediated activation of p38 α by mono-phosphorylation of the activation loop results in altered substrate specificity. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 15469–15474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Winters, M.J.; Pryciak, P.M. Analysis of the thresholds for transcriptional activation by the yeast MAP kinases Fus3 and Kss1. *Mol. Biol. Cell* **2018**, *29*, 669–682. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Denu, J.M.; Zhou, G.; Wu, L.; Zhao, R.; Yuwaniyama, J.; Saper, M.A.; Dixon, J.E. The purification and characterization of a human dual-specific protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 3796–3803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Zhao, Y.; Zhang, Z.Y. The mechanism of dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 2 by mitogen-activated protein kinase phosphatase 3. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 32382–32391. [[CrossRef](#)]
48. Lee, N.; Lee, J.W.; Kang, G.Y.; Park, S.H.; Kim, K.P. Quantification of the Dynamic Phosphorylation Process of ERK Using Stable Isotope Dilution Selective Reaction Monitoring Mass Spectrometry. *Proteomics* **2019**, *19*, e1900086. [[CrossRef](#)]
49. Patwardhan, P.; Miller, W.T. Processive phosphorylation: Mechanism and biological importance. *Cell. Signal.* **2007**, *19*, 2218–2226. [[CrossRef](#)]
50. Caunt, C.J.; Keyse, S.M. Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): Shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.* **2013**, *280*, 489–504. [[CrossRef](#)]
51. Tárrega, C.; Ríos, P.; Cejudo-Marín, R.; Blanco-Aparicio, C.; van den Berk, L.; Schepens, J.; Hendriks, W.; Tabernero, L.; Pulido, R. ERK2 shows a restrictive and locally selective mechanism of recognition by its tyrosine phosphatase inactivators not shared by its activator MEK1. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 37885–37894. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Caunt, C.J.; McArdle, C.A. Stimulus-induced uncoupling of extracellular signal-regulated kinase phosphorylation from nuclear localization is dependent on docking domain interactions. *J. Cell Sci.* **2010**, *123*, 4310–4320. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. 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](#)]
54. 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](#)]
55. Alonso-Rodriguez, E.; Fernandez-Pinar, P.; Sacristan-Reviriego, A.; Molina, M.; Martin, 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](#)]
56. Cid, V.J.; Adamíková, L.; Cenamor, R.; Molina, M.; Sánchez, M.; Nombela, C. Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. *Microbiology* **1998**, *144 Pt 12*, 3463–3474. [[CrossRef](#)]

-
57. Martin, H.; Shales, M.; Fernandez-Piñar, P.; Wei, P.; Molina, M.; Fiedler, D.; Shokat, K.M.; Beltrao, P.; Lim, W.; Krogan, N.J. Differential genetic interactions of yeast stress response MAPK pathways. *Mol. Syst. Biol.* **2015**, *11*, 800. [[CrossRef](#)]
 58. Leskoske, K.L.; Roelants, F.M.; Emmerstorfer-Augustin, A.; Augustin, C.M.; Si, E.P.; Hill, J.M.; Thorner, J. Phosphorylation by the stress-activated MAPK Slt2 down-regulates the yeast TOR complex 2. *Genes Dev.* **2018**, *32*, 1576–1590. [[CrossRef](#)]
 59. Kinoshita, E.; Kinoshita-Kikuta, E. Improved Phos-tag SDS-PAGE under neutral pH conditions for advanced protein phosphorylation profiling. *Proteomics* **2011**, *11*, 319–323. [[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

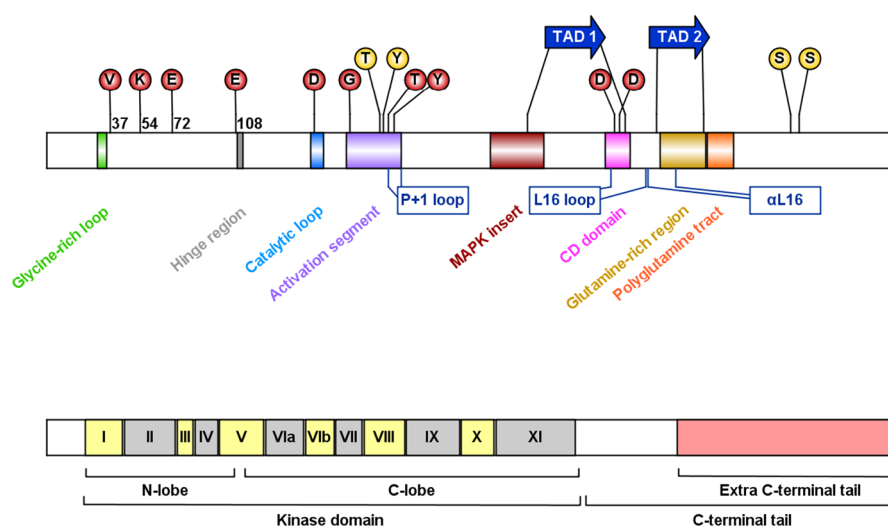
Gema González-Rubio and Ángela Sellers-Moya contributed equally to this work.

✉ 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

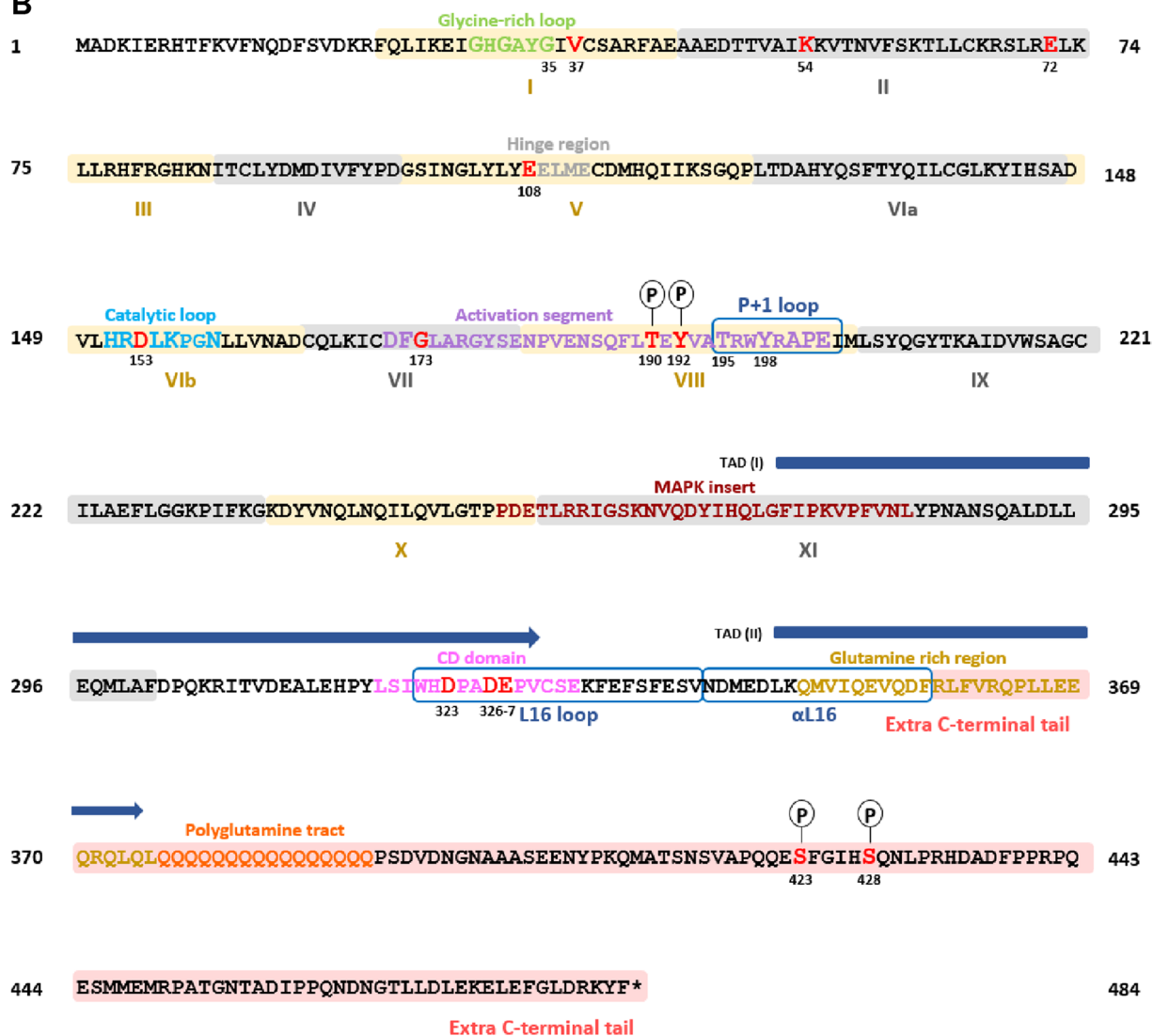


Fig. 1 **A** Schematic representation of the overall structure and functional domains of the *Saccharomyces cerevisiae* MAPK Slt2. Slt2 consists of 484 amino acids and presents an N-terminal kinase domain and a large C-terminal tail. The kinase domain is subdivided into 12 conserved subdomains that contain 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 α 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-Rodriguez 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 *slt2* 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/Tell1 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 $^{\Delta C374}$ 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 Slr2 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 Slr2 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, Fernández-Pinar P, Sacristán-Reviriego A, Molina M, Martín H (2016) An analog-sensitive version of the protein kinase Slr2 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/mmr.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, Fördös 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, Martin 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, Nilus 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 Gen 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, Furdul 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 Slt2 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 SLT2(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 Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275:1511–1519. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.2.1511>
- 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 Slt2 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, Giuriso 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 Slt2 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 Slt2 (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.mmj_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 Slt2p (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 life-styles. *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 p38 α 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.

