

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



TESIS DOCTORAL

Análisis genómico de la integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Patricia Arias López

Directores

José Manuel Rodríguez Peña
Javier Arroyo Nombela

Madrid, 2012

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



ANÁLISIS GENÓMICO DE LA INTEGRIDAD CELULAR
EN *Saccharomyces cerevisiae*

TESIS DOCTORAL

PATRICIA ARIAS LÓPEZ

MADRID, 2011

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Microbiología II



**ANÁLISIS GENÓMICO DE LA INTEGRIDAD CELULAR
EN *Saccharomyces cerevisiae***

Memoria presentada para optar al grado de Doctor por

Dña. PATRICIA ARIAS LÓPEZ

Directores:

JOSE MANUEL RODRÍGUEZ PEÑA

JAVIER ARROYO NOMBELA

D^a. CONCEPCIÓN GIL GARCÍA, Directora del Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICA: Que D^a **PATRICIA ARIAS LÓPEZ** ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid bajo la dirección de los doctores **JOSE MANUEL RODRÍGUEZ PEÑA Y JAVIER ARROYO NOMBELA**, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

“ANÁLISIS GENÓMICO DE LA INTEGRIDAD CELULAR EN *Saccharomyces cerevisiae*”

Y para que así conste firmo la presente certificación en Madrid, 2011.

Fdo. Prof. Dra. D^a Concepción Gil García

El desarrollo de esta Tesis Doctoral ha sido posible gracias a:

- Un contrato de personal investigador de apoyo de la Comunidad de Madrid durante el periodo 2007- 2011.
- El proyecto de investigación “Biogénesis de la pared fúngica como base del mantenimiento de la integridad celular: una aproximación genómica global en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*”. BIO2007-67821 subvencionado por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología (CICYT) (2008-2010).
- El proyecto de investigación “Genómica Funcional de Levaduras y Hongos”. Proyecto GR58/08. Ref. 920640. Entidad financiadora UCM/BSCH (2009-2010).

AGRADECIMIENTOS

Es difícil resumir en pocas líneas todos los años que he pasado en el Departamento de Microbiología II y expresar con palabras todo lo que se siente después de tanto tiempo. Me gustaría agradecer a todos mis compañeros, los presentes y los que ya se han marchado, el apoyo recibido y los buenos momentos que hemos pasado tanto dentro como fuera del laboratorio.

En especial me gustaría agradecer a mis directores, los Dres. Jose Manuel Rodríguez Peña y Javier Arroyo Nombela, sin los cuales esta Tesis no hubiese sido posible. Gracias por sus consejos, sus minuciosas correcciones, la ilusión en este trabajo y la oportunidad brindada para formar parte de su grupo de investigación.

También quiero dar las gracias al Prof. César Nombela por su apoyo en los inicios de mi etapa investigadora y por su disposición siempre que he necesitado su ayuda. A los Dres. María Molina, Humberto Martín y Víctor Cid, por las ideas aportadas a este trabajo, siempre encantados de resolver cualquier duda.

A mis compañeros de laboratorio que día tras día han estado animándome, os voy a echar mucho de menos. A los nuevos, Pilar y Quique, que nunca deja de sorprenderme, les deseo mucha suerte. A Noe, por todo su apoyo y consejos, mucho ánimo y espero que todo salga como esperas. A Raúl, por todos los buenos ratos compartidos, por nuestras caminatas, por todo lo que me has ayudado con mis problemas informáticos sin ninguna queja. A Belén, mi compañera de penurias y buenos momentos, con la que me he desahogado en situaciones difíciles y he compartido muchas alegrías y espero pronto compartir la de ser Doctoras. A Sonia, que se emociona ante las buenas noticias y en los momentos de agobio me ayuda a ver las cosas más objetivamente, esta Tesis también es parte de tu trabajo. A Lorena, por su vitalidad y alegría, sin su ayuda los experimentos finales hubiesen sido más duros. Y por supuesto a Pablo, que aunque no sea de nuestra unidad parece que forma parte de ella, muchas gracias también por tu apoyo.

A los miembros de la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid-UCM y a Amalia Vázquez del Centro de Citometría y Microscopía de Florescencia (UCM) por su experiencia en citometría de flujo.

A mis amigos que desde fuera del laboratorio han estado apoyándome durante todo este tiempo.

A mi familia, por su confianza en mí y por la ilusión que tienen en todo lo que hago, y gracias a ti, César, que estas siempre a mi lado y me apoyas en los momentos de desesperanza, por tus consejos, paciencia y comprensión.

INTRODUCCIÓN	13
1. LA LEVADURA <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	15
2. CICLO BIOLÓGICO DE <i>S. cerevisiae</i>	16
2.1. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.....	18
2.2. MECANISMOS DE CONTROL DEL CICLO CELULAR.....	19
3. LA PARED CELULAR DE <i>S. cerevisiae</i>	23
3.1. ESTRUCTURA Y COMPOSICIÓN MOLECULAR DE LA PARED CELULAR.....	24
3.1.1. β -1,3-glucano.....	25
3.1.2. β -1,6-glucano.....	26
3.1.3. Quitina	27
3.1.4. Manoproteínas	29
4. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES EN <i>S. cerevisiae</i>	31
5. RUTA DE INTEGRIDAD DE LA PARED CELULAR (CWI)	33
5.1. SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DE LA RUTA CWI.....	33
5.1.1. Sensores de la ruta CWI.....	33
5.1.2. Las proteínas Rho1 y Pkc1	35
5.1.3. El módulo de MAP quinasas: Bck1, Mkk1/Mkk2 y Slr2	38
5.1.4. Los factores de transcripción de la ruta CWI: Rlm1 y el complejo SBF (Swi4/ Swi6).....	41
5.2. ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI.....	43
5.2.1. Regulación por el ciclo celular	43
5.2.2. Activación por estrés térmico.....	44
5.2.3. Activación por estrés osmótico	45
5.2.4. Activación por estrés oxidativo.....	46
5.2.5. Activación por estrés sobre retículo endoplásmico.....	46
5.2.6. Activación por pH.....	47
5.2.7. Activación por despolarización del citoesqueleto de actina.....	47
5.2.8. Activación por feromonas.....	48
5.2.9. Activación por daños sobre la pared celular.....	48
5.3. Adaptación a daños sobre la pared celular: respuesta transcripcional.....	49
6. OTRAS RUTAS DE SEÑALIZACIÓN IMPLICADAS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS SOBRE LA PARED CELULAR	33
ANTECEDENTES	55

OBJETIVOS	61
MATERIALES Y MÉTODOS	65
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	67
1.1. CEPAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO.....	67
1.2. CEPAS DE <i>Escherichia coli</i> UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO	67
2. MEDIOS DE CULTIVO	69
2.1. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO DE <i>S. cerevisiae</i>	69
2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>E.coli</i>	70
3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	70
3.1. CONDICIONES GENERALES DE CRECIMIENTO	70
3.2. DETERMINACIÓN DEL CRECIMIENTO.....	70
4. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	70
4.1. EXTRACCIÓN Y VISUALIZACIÓN DE DNA.....	70
4.3. PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.....	71
4.4. OLIGONUCLEÓTIDOS	73
4.5. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA	73
4.6. TRANSFORMACIÓN EN LEVADURA	73
4.6.1. Transformación en placa multipocillo.....	73
5. MÉTODO DE RASTREO GENÓMICO PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MUTANTES DE <i>S. cerevisiae</i> CON NIVELES DE EXPRESIÓN DEL GEN <i>MLP1</i> INCREMENTADOS	74
5.1. PREPARACIÓN DE PREINÓCULOS	75
5.2. SELECCIÓN DE MUTANTES QUE PRESENTAN SOBREENPRESIÓN DE <i>MLP1</i>	75
5.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE CRECIMIENTO.....	75
6. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA (CMI) A Nourseotricina	75
7. ENSAYOS DE SENSIBILIDAD	76
8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS POR WESTERN-BLOT	77
8.1. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS PROTEICOS Y PREPARACIÓN DE MUESTRAS	77
8.2. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS	77
8.3. TRANSFERENCIA DE PROTEÍNAS A LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA	78
8.4. INMUNODETECCIÓN	78
8.5. CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES DE ACTIVACIÓN DE Sit2	79
9. ENSAYOS DE ACTIVIDAD B-GALACTOSIDASA	79
10. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA	80
10.1. MICROSCOPIA DE CONTRASTE DE FASES Y DE FLUORESCENCIA.....	80

10.2. MICROSCOPIA CONFOCAL	81
10.3. MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION	81
11. ELUTRIACION.....	82
11. CITOMETRIA DE FLUJO.....	83
12. SOPORTE BIOINFORMATICO	83
5. RESULTADOS	87
BLOQUE I: DESARROLLO DE UN RASTREO GENOMICO PARA LA IDENTIFICACION DE GENES RELACIONADOS CON LA HOMEOSTASIS DE LA PARED CELULAR DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.....	89
1. RASTREO GENOMICO PARA LA IDENTIFICACION DE GENES CUYA DELECCION ACTIVA LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR EN <i>S. cerevisiae</i>	89
2. DETERMINACION DE LOS NIVELES DE FOSFORILACION DE LA MAPK Sit2 EN LOS MUTANTES RESISTENTES A NOURSEOTRICINA IDENTIFICADOS EN EL RASTREO GENOMICO	91
3. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN QUITINA DE LOS MUTANTES CON ACTIVACION BASAL DE LA MAPK Sit2	100
4. ESTUDIOS DE EXPRESION GENICA EN LOS MUTANTES SELECCIONADOS EN EL RASTREO GENOMICO	104
BLOQUE II: CARACTERIZACION FUNCIONAL DEL GEN <i>YPL158C</i>.....	111
1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS ASOCIADOS A LA ACTIVACION DE LA RUTA EN EL MUTANTE <i>yp158cΔ</i>.....	114
1.1. CONSTRUCCION DE CEPAS DELECCIONADAS EN EL GEN <i>YPL158C</i> EN COMBINACION CON ELEMENTOS DE A RUTA CWI. ESTUDIOS DE VIABILIDAD	115
1.2. LA AUSENCIA DE LA PROTEINA Ypl158c CONDUCE A UNA ACTIVACION DE LA MAPK Sit2 DEPENDIENTE DEL SENSOR Wsc1 Y DE LA GTPASA Rho1	116
1.3. ANALISIS DE LA ACTIVACION TRANSCRIPCIONAL DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A DAÑOS SOBRE LA PARED CELULAR DEPENDIENTES DE LA RUTA CWI.....	118
1.4. DETERMINACION DEL CONTENIDO EN QUITINA EN AUSENCIA DE ELEMENTOS DE LA RUTA EN EL MUTANTE <i>yp158cΔ</i>	119
1.5. LA AUSENCIA DE ELEMENTOS DE LA RUTA EN EL MUTANTE <i>yp158cΔ</i> CONDUCE A FENOTIPOS DE SENSIBILIDAD EXACERBADOS EN PRESENCIA DE COMPUESTOS QUE AFECTAN A LA INTEGRIDAD CELULAR	121
2. RELACION DE LA PROTEINA Ypl158c CON PROCESOS MORFOGENETICOS EN <i>S. cerevisiae</i>	122
2.1. LA DELECCION DEL GEN <i>YPL158C</i> DA LUGAR A UN FENOTIPO DE MULTIGEMACION	122
2.2. LOCALIZACION DEL ANILLO DE SEPTINAS EN EL MUTANTE <i>yp158cΔ</i>	126
2.3. ESTUDIO DE EPISTASIS GENETICA ENTRE EL FACTOR DE TRANSCRIPCION <i>SWI5</i> Y EL GEN <i>YPL158C</i>	128
2.4. ANALISIS DE LA INTERACCION GENETICA ENTRE EL GEN <i>YPL158C</i> Y GENES IMPLICADOS EN LA	

CONSTRUCCIÓN DE LA PARED CELULAR Y EN PROCESOS DE SEPARACIÓN CELULAR.....	130
2.5. LA SOBREENPRESIÓN DEL GEN <i>YPL158C</i> PRODUCE ALTERACIONES MORFOLÓGICAS.....	132
2.5.1. La sobreexpresión del gen <i>YPL158C</i> conduce a perturbaciones en el anillo de septinas dependientes de Swe1	133
2.6. EL MUTANTE <i>yp1158cΔ</i> PRESENTA UN RETRASO EN LA FASE G ₁ DEL CICLO CELULAR	135
6. DISCUSIÓN	139
1. IDENTIFICACIÓN DE GENES RELACIONADOS CON LA HOMEOSTASIS DE LA PARED CELULAR DE <i>S. cerevisiae</i>.....	141
1.1. ANÁLISIS DEL GRUPO DE MUTANTES CON ACTIVACIÓN TRANSCRIPCIONAL CONSTITUTIVA DEL GEN <i>MLP1</i> E HIPERFOSFORILACIÓN BASAL DE LA MAPK Sit2	142
1.2. ANÁLISIS DE LA RELACIÓN ENTRE ACTIVACIÓN DE LA RUTA CWI Y LA INDUCCIÓN TRANSCRIPCIONAL.....	148
2. RELACIÓN DEL GEN <i>YPL158C</i> CON EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD CELULAR Y PROCESOS MORFOGENÉTICOS EN <i>S. cerevisiae</i>	150
7. CONCLUSIONES.....	157
8. BIBLIOGRAFÍA.....	163
9. ANEXO	191

Abreviaturas

Δ	Delección
λ	Longitud de onda
μm	Micra
μm	Microgramo
μl	Microlitro
μM	Micromolar
aa	Aminoácido
$^{\circ}\text{C}$	Grados centígrados
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>Cyclin-dependent kinase</i>)
CMI	Concentración mínima inhibitoria
CS	Quitina sintasa (<i>Chitin Synthase</i>)
CWI	Integridad de la pared celular (<i>Cell Wall Integrity pathway</i>)
CWPs	Proteínas de pared celular (<i>Cell Wall Proteins</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
ER	Retículo endoplásmico
ERSU	Supervivencia a estrés sobre el retículo endoplásmico (<i>ER stress surveillance</i>)
g	Gramos
GAP	Proteína activadora de GTPasa (<i>GTPase activating protein</i>)
GDP	Guanosín difosfato
GEF	Factor intercambiador de GTP (<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>)
GFP	Proteína fluorescente verde (<i>Green fluorescent protein</i>)
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosina trifosfatasa
h	Horas
HOG	Elevada Osmolaridad Glicerol (<i>High Osmolarity Glycerol</i>)
kb	Kilobase
kDa	Kilodaltons
l	Litro
M	Molar
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MADS	<i>Mcm1-Agamous-Deficiens-serum response factor</i>
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
min	Minutos
mg	Miligramos
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NAcGlc	N-acetilglucosamina

nm	Nanómetros
O/N	Durante la noche (<i>overnight</i>)
ONPG	orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
ORF	Marco abierto de lectura (<i>Open Reading Frame</i>)
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>Polyacrilamide Gel Electrophoresis</i>)
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PIR	Proteínas con repeticiones internas (<i>Proteins with Internal Repeats</i>)
pH	Potencial de Hidrógeno
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PSA	Persulfato amónico
RNA	Acido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
SBF	Complejo heterodimérico formado por Swi4 y Swi6 (<i>Swi Binding Factors</i>)
SC	Medio mínimo de crecimiento de levaduras
SDS	Dodecil sulfato sódico
TAE	Solución Tris-acetato EDTA
TEMED	Tetrametiletilenodiamina
U	Unidades de actividad enzimática
UDP	Uridina difosfato
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen en volumen
YPD	Medio rico de crecimiento de levaduras (<i>Yeast extract peptone dextrose</i>)
WT	Cepa silvestre (<i>Wild type</i>)

1. INTRODUCCIÓN

1. La levadura *Saccharomyces cerevisiae*

El término levadura es un nombre genérico que agrupa a una variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad en diferentes campos como por ejemplo, en la industria alimentaria o en investigación básica. De hecho, las levaduras constituyen el grupo de microorganismos más íntimamente relacionados con el progreso y el bienestar de la humanidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* y en concreto, *Saccharomyces cerevisiae*, conocida como levadura de cerveza o levadura del pan debido a su empleo como fermento, se han utilizado a lo largo de la historia.

La levadura *S. cerevisiae* es un hongo unicelular perteneciente a la clase de los hemiascomicetos. A pesar de su simplicidad, las células de esta levadura tienen las características fundamentales de las células eucariotas: poseen un núcleo diferenciado y separado del citoplasma por una membrana nuclear y su citoplasma tiene un espectro completo de orgánulos intracelulares y de estructuras citoesqueléticas.

Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye el microorganismo eucariota más estudiado. Algunas de las ventajas que ofrece esta levadura como modelo biológico en la investigación son la facilidad de crecimiento y manejo en el laboratorio, y el hecho de que *S. cerevisiae* posea un ciclo de vida que incluye una fase sexual, lo que permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética clásica. Todo esto, unido a que dicha levadura consta de un genoma pequeño (12 Mb), solamente unas cuantas veces mayor que el de *Escherichia coli* y 200 veces menor que el de células de mamífero, hace que se simplifique de manera importante el análisis genético y molecular del mismo, siendo además una ventaja el hecho de que se disponga de la secuencia completa de su genoma desde el año 1996 (Goffeau *et al.*, 1996).

2. Ciclo biológico de *S. cerevisiae*

El ciclo de vida de la levadura *S. cerevisiae* alterna dos fases, una haploide y otra diploide (Figura 1). Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide para dar dos células iguales, y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo.

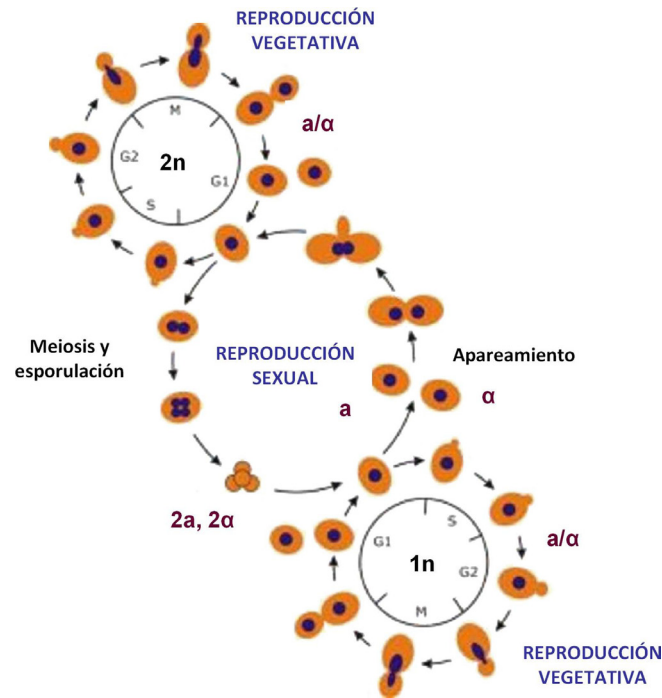


Figura 1. Esquema del ciclo biológico de *S. cerevisiae*.

Durante el ciclo de vida vegetativo, la levadura se divide por gemación. La célula hija inicia su crecimiento formando una yema en la célula madre hasta que alcanza un tamaño similar a ésta, teniendo lugar en este momento la citoquinesis, septación y separación de las dos células. Este ciclo está organizado en periodos de división celular bien definidos, coordinados e irreversibles (mitosis), separados por periodos de gran actividad metabólica (interfase). La mitosis es el proceso celular que asegura el reparto equitativo del material hereditario, duplicado durante la interfase, y culmina con la citoquinesis, responsable de la división de los orgánulos y otros componentes citoplasmáticos entre las dos células. La separación se inicia por contracción del anillo de actomiosina, dividiéndose así el citoplasma y dando lugar a dos células idénticas, cada una de ellas con su propio núcleo. El resto de procesos que tienen lugar entre dos mitosis sucesivas y que constituyen la interfase, se

pueden dividir en varias etapas Gap1 (G_1), síntesis (S) y Gap2 (G_2). La fase G_1 se caracteriza por el crecimiento celular y la síntesis de proteínas. Éste es el momento en el que emerge la yema de la célula madre y se duplica el cuerpo polar del huso (SPB), que es el centro de organización de los microtúbulos, funcionalmente equivalente al centrosoma en las células eucariotas superiores (Bloom y Cross, 2007). A continuación, tiene lugar la fase S, donde se replica el DNA. Al final de esta fase cada cromosoma tiene dos cromátidas y el núcleo tiene el doble de contenido en proteína nuclear y DNA. Después de esta etapa, las cromátidas empiezan a condensarse comenzando la fase G_2 , que permite la preparación para la mitosis. En determinadas circunstancias como la falta de factores de crecimiento o sustancias nutritivas, se ha descrito la existencia de una fase llamada G_0 (fase de latencia o quiescencia), que es reversible pero de duración indefinida, en la cual las células detienen su maquinaria de replicación y permanecen inalterados su masa y volumen hasta que las condiciones son adecuadas para reanudar el ciclo (Gray *et al.*, 2004).

En cuanto al ciclo sexual, en *S. cerevisiae* existen dos tipos celulares sexualmente opuestos, **a** y **α** , determinados por un par de alelos heterocigóticos: *MATa* y *MAT α* . Tanto las células haploides **a** como las **α** expresan de forma constitutiva una feromona del mismo nombre. Estas feromonas permiten detener el ciclo celular de las células de tipo sexual opuesto en G_1 , sincronizándolas así en la misma etapa del ciclo celular, y originando unas proyecciones en ambas células (conocidas como *shmoos*) que se fusionarán formando el cigoto, que será diploide y sufrirá sucesivas mitosis, entrando de esta manera en el ciclo mitótico diploide.

Las células diploides pueden reproducirse vegetativamente por gemación si el medio en el que se encuentran tiene los nutrientes apropiados para ello o pueden esporular en condiciones ambientales de limitación de nutrientes, como pueden ser la falta de nitrógeno y la ausencia de una fuente de carbono fermentable en el medio. Durante la esporulación, la célula diploide se divide por meiosis, dando lugar a cuatro células hijas haploides con una dotación cromosómica que será la mitad de la célula madre, las cuales quedan contenidas dentro de un saco denominado asca. Las ascas poseen una pared gruesa capaz de proteger a las células de las adversidades del medio ambiente durante largos periodos de tiempo. Si las condiciones del medio lo permiten, la pared del asca se degrada y se liberan los productos haploides (ascosporas), que germinarían y comenzaría un ciclo mitótico haploide, dividiéndose por gemación.

Además de lo citado anteriormente, se ha demostrado que la levadura puede presentar otros tipos de crecimiento: un crecimiento pseudohifal y un crecimiento agar-invasivo. Durante muchos años se consideró que, a diferencia de los hongos denominados filamentosos, *S. cerevisiae* era incapaz de formar hifas o filamentos y que su crecimiento vegetativo, a través de la gemación, únicamente resultaba en la formación de células individuales denominadas levaduras. Hace algunos años se descubrió que determinadas cepas diploides en ausencia de nitrógeno eran capaces de formar pseudohifas, originándose cadenas unipolares de células (Gimeno *et al.*, 1992). En contraste con la reproducción vegetativa por gemación, la división celular en el crecimiento pseudohifal es simétrica y, además, la célula madre y la hija comienzan la próxima división a la vez. Una situación análoga a ésta, sucede en cepas haploides con determinados fondos genéticos como el $\Sigma 1278b$ cuando crecen en medio sólido rico, formándose filamentos invasivos que son capaces de penetrar en el agar (Roberts y Fink, 1994).

2.1. Regulación del ciclo celular

El avance a través del ciclo celular en los organismos eucariotas está regulado por la formación secuencial y activación e inactivación de un conjunto de moléculas que implican principalmente a dos grandes familias de proteínas: las quinasas dependientes de ciclina (CDKs) y las ciclinas. Estas últimas son proteínas de expresión cíclica que interactúan con las CDKs activando su función quinasa.

En *S. cerevisiae*, la progresión a través del ciclo celular es regulada principalmente por la proteína Cdc28 (equivalente a CDK1 en otros organismos). La transcripción de Cdc28 sucede de forma constante durante el ciclo de división celular (Mendenhall y Hodge, 1998) y cuando se une a las diferentes ciclinas es capaz de fosforilar determinados sustratos, según la etapa del ciclo (Reed, 1992), consiguiendo el avance del mismo y un control más flexible del proceso de división (Figura 2).

Las ciclinas se dividen en varios grupos dependiendo de la fase del ciclo en la que se expresan: ciclinas G_1 (Cln1, Cln2, Cln3), ciclinas de la fase S (Clb5 y Clb6) y ciclinas G_2 (Clb1-4) (Figura 2). La unión de Cdc28 a las ciclinas de la fase G_1 determina la polarización del citoesqueleto de actina hacia el lugar de emergencia de la yema en el momento previo a su surgimiento, la duplicación del cuerpo polar del huso y la activación de Pkc1 (Gray *et al.*, 1997), necesaria para el crecimiento polarizado. Adicionalmente, estas ciclinas activan la expresión de las ciclinas de tipo B requeridas para la entrada de la célula en la fase S (Epstein y Cross, 1992; Schwob y Nasmyth, 1993). Se ha descrito que la delección de los

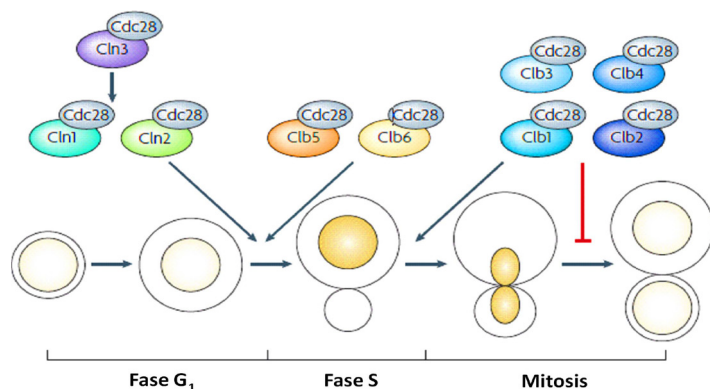


Figura 2. Regulación de Cdc28 por ciclinas en las diferentes fases del ciclo celular. Imagen tomada de Bloom y Cross (2007)

genes *CLN1-3*, da lugar a una parada del ciclo celular en fase G₁ (Moffat y Andrews, 2004). A continuación, las ciclinas Clb5 y Clb6 se encargan de la progresión en la fase S, promoviendo la iniciación en la síntesis de DNA. De hecho, en su ausencia, las ciclinas de la fase G₂ (Clb1-4) conducen a un retraso en la iniciación de la replicación del DNA (Bloom y Cross, 2007). Finalmente, la activación de Cdc28 por estas últimas ciclinas es la responsable de promover la formación del huso y la iniciación de la mitosis. Además, estas últimas ciclinas inhiben la salida de mitosis y la citoquinesis; por tanto, su actividad debe ser regulada negativamente para que la división celular sea completada y su degradación conlleva la relocalización del citoesqueleto de actina hacia la zona del futuro septo (Lew y Reed, 1993).

Adicionalmente al papel crucial desempeñado por la proteína Cdc28 en la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae*, se ha descrito la presencia en esta levadura de otra Cdk, Pho85, implicada en múltiples funciones (Carroll y O'Shea, 2002). Pho85 regula, al igual que Cdc28, la progresión a través de la fase G₁ del ciclo celular tras su asociación con ciclinas pertenecientes a la familia de las Pcls. Tres de ellas (Pcl1, Pcl2 y Pcl9) tienen funciones específicas en la etapa G₁ del ciclo celular, tanto en la regulación de la expresión de genes específicos de esta fase como en el control de crecimiento polarizado (Measday *et al.*, 1997; Moffat *et al.*, 2000).

2.2. Mecanismos de control del ciclo celular

A lo largo del ciclo celular existen diferentes *checkpoints* o puntos de control del ciclo celular que aseguran que los acontecimientos celulares suceden de forma coordinada y en el orden correcto. En caso contrario, se detiene la progresión del ciclo celular hasta que el daño o error sea reparado.

En *S. cerevisiae* el primer *checkpoint*, denominado punto *START* (Cross, 1995), se sitúa al final de la fase G₁, justo antes de entrar en la fase S. En este punto, se controla el tamaño

de la célula y su adecuación con las condiciones ambientales tales como la concentración de nutrientes y sales o la temperatura (Rupes, 2002). Además, es necesario que todos los procesos celulares estén preparados para que ocurra la replicación del DNA (Boye *et al.*, 2009). De no ser así, se detendría la progresión celular, entrando las células en fase G_0 .

Otro punto de control importante se encuentra antes de la entrada en mitosis (checkpoint G_2/M) y su función es regular, por un lado, que la célula madre tenga el tamaño suficiente para dividirse en dos células hijas (Rupes, 2002), y por otro, que el DNA haya sido duplicado correctamente, de forma completa y sólo una vez (Stark and Taylor, 2006). La replicación del DNA es un proceso muy importante para la célula y cualquier error en su estructura, produce un retraso en la progresión del ciclo celular, y al mismo tiempo induce la transcripción de genes que promueven la reparación de los daños en dicha estructura (de Bruin y Wittenberg, 2009). Adicionalmente, en la fase de mitosis se ha descrito otro *checkpoint*, el cual permite la progresión del ciclo celular si los cromosomas están bien alineados en el huso mitótico.

Por otro lado, también se ha descrito la existencia de otro punto de control en la transición de las fases G_2/M , denominado *checkpoint* morfológico que mantiene una coordinación entre los procesos de formación de la yema y los procesos mitóticos del ciclo celular (Figura 3) (Lew, 2003). Este punto de control es regulado por Swe1, un homólogo de la quinasa Wee1, que induce la parada o retraso en la fase G_2 del ciclo celular ante la presencia de alteraciones en los procesos de gemación (Lew y Reed, 1995; McMillan *et al.*, 1998). Diversos estudios han sugerido que este *checkpoint* puede monitorizar la organización de septinas, del citoesqueleto de actina, la formación de la yema e incluso su tamaño (Lew, 2000; Cid *et al.*, 2002). Swe1 bloquea la entrada en mitosis a través de la

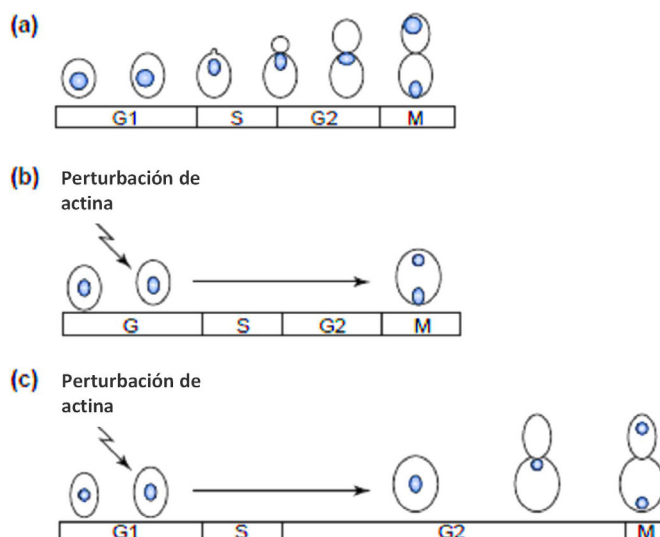


Figura 3. El *checkpoint* morfológico retrasa la entrada en mitosis en respuesta a perturbaciones que retrasan la formación de la yema. **(a)** Durante un ciclo celular normal, la formación de la yema coincide con la replicación de DNA, por lo que en el momento de la división nuclear la célula hija está preparada para recibir su núcleo. **(b)** Si el ciclo continúa a pesar de que la gemación sea retrasada ante una perturbación del citoesqueleto de actina, las células se convertirán en binucleadas. **(c)** El retraso en la formación de la yema desencadena un retraso en la fase G_2 mediante el *checkpoint* morfológico hasta compensar la perturbación originada. Imagen tomada de Lew (2003).

fosforilación de la Cdk Cdc28 en un residuo conservado de tirosina (Y19) (Booher *et al.*, 1993). Esta fosforilación alcanza niveles basales en las células no sometidas a estrés, pero se incrementa considerablemente en respuesta a perturbaciones en el citoesqueleto de actina (Harrison *et al.*, 2001). El efecto sobre Cdc28 de Swe1 es contrarrestado por una proteína fosfatasa, Mih1, que desfosforila a Cdc28 conduciendo a la entrada en el proceso de mitosis. Además del papel que se ha propuesto para Swe1 en el control del *checkpoint* morfogénico, se ha descrito que esta proteína está implicada en la entrada en un nuevo ciclo celular, tras un bloqueo en la división celular ocasionado por perturbaciones en la biogénesis de los ribosomas o en la síntesis de proteínas (Saracino *et al.*, 2004).

Además, en situaciones de estrés sobre la célula se ha descrito la implicación de rutas de transducción de señales como la ruta de integridad celular (CWI) o la ruta de elevada osmolaridad (HOG) en la regulación del ciclo celular (Harrison *et al.*, 2001; Alexander *et al.*, 2001, Correia *et al.*, 2010). En *S. cerevisiae*, la emergencia de la yema durante la fase G₁ del ciclo celular requiere un citoesqueleto de actina polarizado, por lo que durante la exposición a determinados tipos de estrés que causan una despolarización del mismo, como la exposición a elevada temperatura u osmolaridad, el proceso de formación de la yema es retrasado mientras las células se adaptan a las condiciones del medio externo (Delley y Hall, 1999; Chowdhury *et al.*, 1992). Además, la delección de genes que codifican proteínas reguladoras de actina como la tropomiosina (Liu y Bretscher, 1992) también retrasa el proceso de gemación. Durante este retraso, el *checkpoint* morfogénico desencadena una parada en la fase G₂ hasta que la actina pueda repolarizarse y completar la construcción de la yema, evitando así la formación de células binucleadas (Lew, 2000), gracias al balance entre la actuación de la proteína quinasa Swe1 y la proteína fosfatasa Mih1 sobre Cdc28. Se ha descrito que Slt2, la MAPK (proteína quinasa activada por mitógenos) de la ruta de integridad celular, es activada en respuesta a la despolarización del citoesqueleto de actina y es requerida para desencadenar la parada en G₂ inducida por el *checkpoint* morfogénico.

La ruta HOG en *S. cerevisiae*, que se activa en respuesta a elevada osmolaridad, modula la progresión del ciclo celular a dos niveles. Por un lado en la fase G₁, donde actúa por un mecanismo dual que implica la regulación negativa de la expresión de cilinas y, además, la fosforilación directa de la proteína Sic1, un inhibidor de los complejos Cdc28-Clb (Schwob y Nasmyth, 1993). Hog1 bajo condiciones de osmoestrés interacciona con Sic1 (Escote *et al.*, 2004), fosforilando a dicha proteína en el residuo Thr173 e impidiendo su ubiquitinación y su consecuente degradación. Dicha estabilización de Sic1 conduce a la inhibición de la progresión del ciclo celular, impidiendo la entrada prematura en la fase S sin la correcta

adaptación celular. Además, la MAPK Hog1 en condiciones de hiperosmolaridad conduce a un retraso en la salida de G_2 debido a una desregulación del *checkpoint* morfogenético. Hog1 regula directamente mediante fosforilación a la proteína kinasa Hsl1 (Clotet y Posas, 2007), impidiendo su unión a la metiltransferasa Hsl7 y el reclutamiento por esta última de Swe1 y Cdc5 en el cuello de la yema (Asano *et al.*, 2005). De esta forma, se evita la fosforilación de Swe1 por Cdc5 necesaria para su consecuente degradación y progresión del ciclo celular hacia la fase de mitosis, lo que conduce a una acumulación de Swe1 evitando la activación del complejo Cdc28-Clb2 (Clotet *et al.*, 2006).

Recientemente, se ha descrito otra función de la MAPK Hog1 en la regulación del ciclo celular, concretamente en la fase S, que es independiente del *checkpoint* de daño de DNA de la fase S y del efecto de Hog1 sobre Sic y Hsl1 mencionado anteriormente. En condiciones de estrés osmótico, Hog1 retrasa la expresión y acumulación de las ciclinas Clb5 y Clb6 con el consecuente retraso a la salida de la fase S. Además, actúa sobre componentes de la maquinaria de replicación, prolongando este proceso, e induciendo los genes necesarios para responder a estrés osmótico antes de la replicación (Yaakov *et al.*, 2009).

Finalmente, se ha descrito también la existencia de un *checkpoint* relacionado con la integridad de la pared celular (*cell wall integrity checkpoint*) que asocia la fase de mitosis con procesos de remodelación de la pared celular (Suzuki *et al.*, 2004). Su función reside en modular la progresión del ciclo celular en respuesta a alteraciones en la síntesis del β -1,3-glucano, aunque el hecho de que mutaciones en componentes de la pared celular como *DCW1* y *DFG5* (codifican para proteínas ancladas en la pared celular aparentemente no relacionadas con la síntesis de glucano) y *MNN10* (codifica para una manosiltransferasa) conduzcan al mismo fenotipo, células paradas en la fase G_2 -M del ciclo celular con yemas pequeñas, sugiere que este proceso no es específico de la síntesis de este polisacárido (Negishi y Ohya, 2010). Se diferencia de otros puntos de control de ciclo en que sucede tras la completa replicación del DNA y no requiere de la actuación de proteínas como Swe1. La represión transcripcional de la ciclina de fase M, *CLB2*, parece ser crítica para este *checkpoint*, ya que el complejo Cdc28-Clb2 es esencial para conducir el ciclo celular a través de la fase M (Surana *et al.*, 1991; Suzuki *et al.*, 2004).

3. La pared celular de *S. cerevisiae*

La pared celular fúngica es una envoltura rígida, situada entre la membrana plasmática y el medio externo, esencial para proteger a la célula de las condiciones ambientales, no siempre favorables, preservando así la integridad celular. Esta estructura tiene como una de sus principales funciones evitar la lisis celular debido a las diferencias de presión osmótica extra e intracelular. También, es el sitio de anclaje de glicoproteínas que, entre otras funciones, participan en los procesos de biogénesis y remodelación de la pared celular, limitan la permeabilidad de esta estructura al paso de macromoléculas (de Nobel *et al.*, 1990; Zlotnik *et al.*, 1984), evita la salida al medio extracelular de compuestos solubles en los procesos de biogénesis de la pared y contribuye, junto con la presencia de grupos fosfato cargados negativamente, a la retención de agua.

La pared celular, a pesar de su rigidez, no es una estructura estática sino dinámica, ya que necesita adaptarse a los diferentes procesos morfogénicos paralelos al ciclo vital de la levadura tales como la división, esporulación o crecimiento pseudohifal (Cid *et al.*, 1995). Además, cuando se somete a las células a un determinado estrés sobre la pared celular, se ha demostrado la existencia de una respuesta de adaptación denominada “mecanismo compensatorio”, que se describe en detalle más adelante en esta memoria, cuyo objetivo final es lograr la supervivencia celular frente a condiciones adversas en el medio externo y que conlleva una remodelación de la pared celular (Valdivieso *et al.*, 2000).

En general, los procesos de biosíntesis y ensamblaje de la pared celular han sido estudiados con detalle en *S. cerevisiae*, así como en hongos patógenos como *Candida albicans* y *Aspergillus fumigatus* (Klis *et al.*, 2006; Lesage y Bussey, 2006; Lambou *et al.*, 2010). Dado el carácter esencial de esta estructura para la célula fúngica y el hecho de que no esté presente en las células eucariotas superiores, hace que su estudio pueda contribuir a la identificación de dianas potenciales para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos. En este contexto, los primeros antifúngicos utilizados en clínica con un mecanismo de acción que afecta a la construcción de la pared, concretamente a la inhibición de la síntesis del β -1,3 glucano, son las equinocandinas (Deresinski y Stevens, 2003). Estos compuestos han demostrado un amplio espectro de actividad y una ausencia de resistencias cruzadas con otros antifúngicos. Es, por tanto, previsible que en el futuro se diseñen nuevos fármacos de la misma familia que mejoren la actividad de los actuales (Ponton, 2008).

3.1. Estructura y composición molecular de la pared celular

La pared celular de *S. cerevisiae* representa el 30% del peso seco de la célula y está constituida principalmente por polisacáridos (85%) y proteínas (15%). Entre los polisacáridos destacan la quitina y el glucano. Las proteínas generalmente están asociadas a polisacáridos formando glicoproteínas (Figura 4). Desde un punto de vista bioquímico, los polisacáridos están constituidos por residuos de glucosa que representa un 80-90% del total, un 1-2% de N-actetilglucosamina (NAcGlc) y un 10-20% de residuos de manosa (Lesage y Bussey, 2006). La red de polímeros de glucano se compone de cadenas lineales de monómeros de glucosa unidos por enlaces β -1,3-glicosídicos formando el β -1,3-glucano que se conectan entre sí mediante módulos de β -1,6-glucano. En cuanto a la quitina, es un polímero formado por monómeros de NAcGlc unidos por enlaces β -1,4. Las manoproteínas se pueden unir a las cadenas de β -1,3 o β -1,6-glucano mediante distintos tipos de enlaces que se comentarán más adelante. Según estos análisis, se ha propuesto una estructura para la pared celular en la que las cadenas de β -1,3-glucano con ramificaciones β -1,6 forman una matriz a la que se unen covalentemente la quitina y las manoproteínas, pudiéndose unir estas últimas directamente o a través del β -1,6-glucano (Kollar *et al.*, 1997).

El análisis de la pared celular mediante microscopía electrónica evidencia su estructuración en varias capas (Osumi, 1998). La capa externa, electrodensa, está formada fundamentalmente por manoproteínas altamente glicosiladas que, entre otras funciones, limitan la accesibilidad de moléculas extrañas a la capa más interna de la pared y a la membrana plasmática. La capa interna (70-100 nm de grosor), transparente al paso de electrones, es la responsable de la rigidez de la pared y está constituida por glucano y quitina.

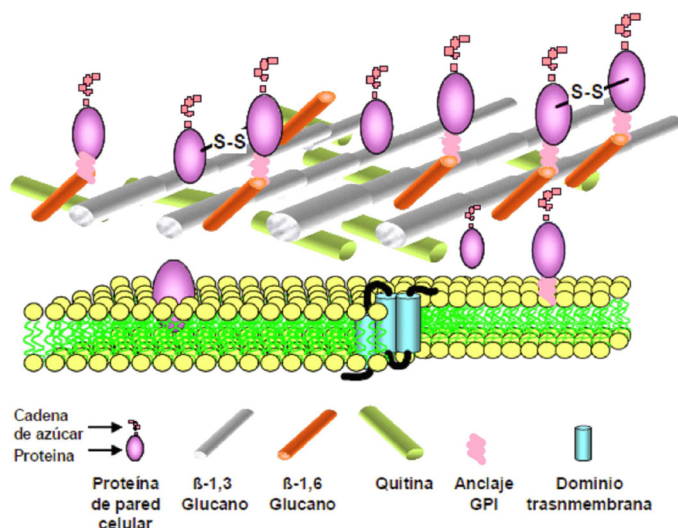


Figura 4. Representación esquemática de la estructura de la pared celular de *S. cerevisiae*. Imagen tomada de Molina *et al.*, 2000.

3.1.1. β -1,3-glucano

El β -1,3-glucano es un polímero lineal formado por más de 1500 residuos de glucosa unidos por enlace β -1,3-O-glicosídicos (Cabib *et al.*, 1998) que adquiere una estructura helicoidal, confiriendo elasticidad y resistencia a la tracción a la pared celular. Representa aproximadamente entre el 30-45% del peso seco de la pared celular uniéndose al β -1,6-glucano mediante enlaces β -1,6 y a la quitina mediante enlaces β -1,4 (Kollar *et al.*, 1995; Kollar *et al.*, 1997).

Las enzimas encargadas de la síntesis de β -1,3-glucano son las glucan sintasas que catalizan la transferencia de residuos de glucosa a cadenas de glucosa unidas mediante enlace β -1,3, utilizando como donador la UDP-glucosa (Orlean, 1997). La actividad β -1,3-glucan sintasa se localiza en la membrana plasmática y está determinada por un complejo enzimático formado por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora. Las subunidades catalíticas están codificadas por dos genes que presentan alta homología entre ellos, *FKS1* y *FKS2/GSC2*. Ambas proteínas presentan múltiples dominios transmembrana que son esenciales para la síntesis del β -1,3-glucano (Cabib *et al.*, 1998) y se localizan en sitios de crecimiento polarizado (Dijkgraaf *et al.*, 2002; Utsugi *et al.*, 2002).

El mutante *fks1 Δ* muestra una disminución en la actividad β -1,3-glucan sintasa y una alteración en la composición de la pared con un descenso del contenido en β -1,3 y β -1,6-glucano y un incremento en quitina y manano. Sin embargo, el doble mutante *fks1 Δ fks2 Δ* no es viable (Inoue *et al.*, 1995; Mazur *et al.*, 1995).

FKS1 y *FKS2* muestran diferentes patrones de expresión. *FKS1* se expresa durante el crecimiento vegetativo principalmente, aumentando su transcripción al final de la fase G1 y comienzo de la fase S (Mazur *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1995). Durante el ciclo celular, su expresión es regulada por la ruta CWI y el factor de transcripción SBF (Iyer *et al.*, 2001). En condiciones de hiperactivación de la ruta CWI, y en consecuencia de la MAPK Slt2, la expresión de *FKS1* es regulada de forma dependiente del factor de transcripción Rlm1 (Jung y Levin, 1999).

Por otro lado, la expresión de *FKS2* en condiciones de crecimiento en glucosa se reduce hasta parámetros indetectables, incrementándose cuando los niveles de glucosa son muy bajos o durante el crecimiento en galactosa, glicerol o acetato. Este aumento en los niveles de expresión coincide con una disminución en la transcripción de *FKS1* (Mazur *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998). *FKS2* se induce por un gran número de estímulos del medio externo

como choque térmico o agentes que dañan la pared celular como el Blanco de Calcofluor, zimoliasa, caspofungina, o por la delección de genes requeridos para la construcción de la pared (Agarwal *et al.*, 2003; Lagorce *et al.*, 2003; Mazur *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1998), regulándose dicha respuesta por la ruta de integridad celular, en coordinación con la ruta de Calcineurina y su factor de transcripción Crz1.

En *S. cerevisiae* se ha identificado un tercer miembro de la familia *FKS*, *FKS3*, que codifica una proteína que presenta un 55% de similitud con Fks1 y Fks2. La función de Fks3 no se conoce bien, pero se sabe que es requerido durante el proceso de esporulación (Deutschbauer *et al.*, 2002), y se cree que tiene un posible papel en la ruta de apareamiento.

En cuanto a la subunidad reguladora de las glucan sintasas, la GTPasa Rho1, a la que se hará referencia más adelante, juega también un papel crítico en la coordinación de la organización de la pared celular y la polarización del citoesqueleto de actina a través de la ruta de integridad celular. Rho1 se asocia a la membrana plasmática por un grupo isoprenilo del extremo C-terminal, que es requerido también para regular la actividad β -1,3-glucan sintasa (Inoue *et al.*, 1999).

3.1.2. β -1,6-glucano

En contraste con la estructura microfibrilar del β -1,3-glucano, el β -1,6-glucano es un polímero más corto y de estructura amorfa que actúa como “cemento flexible” formando enlaces covalentes con el β -1,3-glucano, la quitina y las manoproteínas (Klis *et al.*, 2006; Lesage y Bussey, 2006; Cabib *et al.*, 2007; Cabib, 2009). Representa aproximadamente entre el 5-10% del peso seco de la pared celular y está formado aproximadamente por 350 residuos de glucosa que se unen mediante enlaces β -1,6.

En cuanto a la síntesis de este polímero, más de 20 genes, incluyendo la familia *KRE* (14 miembros) y sus homólogos, *SKN1* y *KNH1*, han sido identificados por su posible implicación en la síntesis de β -1,6-glucano en *S. cerevisiae*, *C. albicans* y *C. glabrata* (Mio *et al.*, 1997; Shahinian y Bussey, 2000; Herrero *et al.*, 2004; Lussier *et al.*, 1998; Nagahashi *et al.*, 1998). Entre todos estos genes, *KRE5*, *KRE6* y *KRE9* codifican proteínas que, hasta el momento, parecen estar implicadas en la catálisis de la síntesis del β -1,6-glucano (no hay evidencia bioquímica de que alguna de estas proteínas constituya la subunidad catalítica de la β -1,6-glucan sintasa), aunque su delección resulta en una disminución de los niveles de este polímero en la pared celular (Aimanianda *et al.*, 2009). En todo caso, Kre9 parece ser el candidato más probable para estar implicado directamente en la síntesis del β -1,6-glucano

ya que se localiza en la pared celular y en *C. glabrata* y *S. cerevisiae* la doble delección de *KRE9* y su homólogo, *KNH1*, es letal (Nagahashi *et al.*, 1998; Dijkgraaf *et al.*, 1996).

Las rutas de biosíntesis del β -1,3 y β -1,6-glucano son reguladas de forma diferente, aunque los datos obtenidos de diferentes estudios sugieren que la síntesis de ambos polímeros se realiza de una manera coordinada (Aimanianda *et al.*, 2009). La reducción de los niveles de β -1,3-glucano *per se* en algunos mutantes, o tras la adición de inhibidores de la β -1,3-glucan sintasa, se ha asociado con una disminución en el contenido de β -1,6-glucano en la pared celular (Roemer y Bussey, 1991; Stevens *et al.*, 2006; Feldmesser *et al.*, 2000).

3.1.3. Quitina

La quitina es un polímero lineal constituido por residuos de N-acetil glucosamina que se une mediante enlaces β -1,4 formando microfibrillas, que son estabilizadas mediante puentes de hidrógeno. Esta estructura cristalina confiere resistencia a la tracción a la pared celular. La quitina es el componente minoritario de la pared celular (1-2% de su peso seco) de *S. cerevisiae*, concentrándose principalmente en el cuello durante la gemación y en el septo. Se han descrito diferentes formas de quitina en la pared celular: quitina libre (43%), quitina unida al β -1,3-glucano (41%) y quitina unida al β -1,6-glucano (16%) (Cabib y Durán, 2005; Cabib, 2009).

La síntesis de quitina tiene lugar de forma regulada, tanto espacial como temporalmente (Orlean, 1997). Al final de la fase G1 se deposita como un anillo en el lugar de emergencia de la yema y la deposición de quitina en este punto continúa hasta que la célula hija adquiere el tamaño de la célula madre. A continuación, se contrae el anillo de actomiosina y la membrana plasmática se invagina para iniciar la separación entre las dos células, extendiéndose la quitina en forma de disco (septo primario) hacia el interior (Schmidt *et al.*, 2002b; Roh *et al.*, 2002; Tolliday *et al.*, 2003; Cabib, 2004). En este punto la citoquinesis ha sido completada, pero el proceso de septación no ha terminado (Cabib *et al.*, 2001). La deposición de material adicional (glucano y manoproteínas), secretado a través de las membranas de la célula madre y la hija, constituye el septo secundario. Finalmente, las dos células deben separarse, un proceso que necesita la actuación de, al menos, dos enzimas, ambas formadas exclusivamente en la célula hija: una quitinasa (Kuranda y Robbins, 1991), la cual digiere parte del septo primario y una β -1,3-glucanasa (Baladron *et al.*, 2002), que probablemente degrada parte de la pared celular que rodea el septo. Debido a que la quitinasa degrada el septo primario por el lado de la célula hija (Colman-Lerner *et al.*, 2001)

sólo lo suficiente para la separación celular, la mayor parte del septo primario permanece en la célula madre, constituyendo la cicatriz de gemación (Roberts *et al.*, 1983).

Las enzimas responsables de realizar la síntesis de quitina son las quitin sintasas, que utilizan como donador la UDP-GlcNAc. Se han descrito tres actividades enzimáticas implicadas en este proceso: CSI (*Chitin Synthase I*), CSII y CSIII. Dichas actividades enzimáticas son codificadas por los genes *CHS1*, *CHS2* y *CHS3*, respectivamente (Valdivieso *et al.*, 1991). La actividad CSI, al igual que CSIII, se localiza en la membrana plasmática y en los quitosomas, que son vesículas intracelulares que regulan la síntesis de quitina movilizando a las quitin sintasas (Chs1 y Chs3, respectivamente) a la membrana plasmática, a través de rutas de secreción (Ziman *et al.*, 1996; Chuang y Schekman, 1996; Valdivia y Schekman, 2003). Los mutantes *chs1* Δ son hipersensibles a polioxina D (inhibidor de la actividad quitin sintasa) y, en medio ácido, pueden formar pequeñas yemas aberrantes que tienen tendencia a la lisis (Bulawa *et al.*, 1986). Este fenotipo de lisis es suprimido al deletar el gen codificante de la quitinasa *CTS1*, requerido para la separación celular, conduciendo a la hipótesis de que Chs1 está implicado en la reparación de la pared celular tras la citoquinesis (Cabib *et al.*, 1992).

En cuanto a Chs2, mediadora de la actividad CSII, es la responsable de la síntesis de la quitina del septo primario durante la citoquinesis, siendo *CHS2* esencial en muchos fondos genéticos (Shaw *et al.*, 1991). Los niveles de expresión de *CHS2* fluctúan a lo largo del ciclo celular (Spellman *et al.*, 1998). Además, Chs2 es transportado por la ruta de secreción a la membrana plasmática, concretamente al cuello, donde es responsable, junto con el anillo de actomiosina, del proceso de septación. Posteriormente, es internalizado por endocitosis y conducido a la vacuola para su degradación (Chuang y Schekman, 1996). Finalmente, la actividad CSIII, cuya subunidad catalítica es Chs3, es responsable de la síntesis de quitina en toda la pared celular, incluyendo tanto la quitina de pared lateral como la formación de un anillo de este mismo polímero en la base de la yema emergente. El mutante *chs3* Δ es viable, pero carece de quitina en el sitio de yema incipiente y en la pared lateral, siendo detectable únicamente el contenido en quitina en el septo (Shaw *et al.*, 1991).

La localización y la regulación de Chs3 requiere la actuación de varios genes: *BNI4*, *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* y *CHS7*. Chs7 está implicada en la salida de Chs3 del retículo endoplasmático evitando su agregación (Kota y Ljungdahl, 2005; Trilla *et al.*, 1999), mientras que Chs5 y Chs6 son requeridos para el transporte de Chs3 desde el quitosoma a la membrana plasmática (Santos y Snyder, 1997; Ziman *et al.*, 1998). Chs3 forma un complejo con Chs4, una proteína

que es requerida para la actividad de Chs3 durante el crecimiento vegetativo, y Bni4 dirige este complejo al anillo de septinas del cuello (DeMarini *et al.*, 1997). El hecho de que todos estos genes estén implicados en la actividad CSIII indica que se encuentra altamente regulada a nivel post-traducciona (Choi *et al.*, 1994; Chuang y Schekman, 1996). De hecho, alteraciones significativas en los niveles de Chs3 tienen muy poco efecto en la regulación de su actividad y, por tanto, en la regulación de la síntesis de quitina (Cos *et al.*, 1998). Aún así, la expresión de *CHS3* es inducida durante la esporulación, ya que está implicada en la síntesis de quitina (Valdivieso *et al.*, 1991), que será posteriormente desacetilada a quitosán durante el proceso de maduración de las ascosporas. Al contrario que Chs2, Chs3 no es degradada en la vacuola (Chuang y Schekman, 1996), sino que sufre un proceso de reciclaje.

A pesar de ser la quitina el componente minoritario de la pared celular su presencia es indispensable para la viabilidad celular, como lo demuestra el hecho de que el doble mutante *chs2Δ chs3Δ* es inviable (Bulawa y Osmond, 1990). Además, la importancia funcional de este polímero queda patente al observarse que en condiciones de estrés sobre la pared, como defectos en la síntesis de β -1,3-glucano o la exposición a agentes que causan daños en esta estructura, los niveles de quitina aumentan considerablemente de forma dependiente de Chs3 (Osmond *et al.*, 1999; Popolo *et al.*, 1997)

3.1.4. Manoproteínas

Denominadas también CWP (*Cell Wall Proteins*), constituyen entre el 30-50% del peso seco de la pared celular. Son polipéptidos unidos a un elevado número de hidratos de carbono, en su mayoría manosas, que se disponen a lo largo de la superficie celular formando una estructura fibrilar, densa a los electrones cuando se observa esta estructura al microscopio electrónico de transmisión.

Estas proteínas son transportadas al exterior celular a través de la ruta de secreción, proceso durante el cual se incorporan cadenas de azúcares por medio de procesos de O- y/o N-glicosilación (Dean, 1999; Dempski, Jr. y Imperiali, 2002; Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). En el caso de algunas proteínas, se une además una molécula de GPI (glicosilfosfatidilinositol) en su extremo C-terminal (Orlean, 1997).

Se distinguen dos grandes grupos de proteínas de pared según el tipo de unión a ésta: las proteínas con dominio de unión a GPI denominadas GPI-CWPs y las denominadas ASL-CWPs, que presentan un tipo de enlace sensible al alcali, donde se incluye la familia PIR (proteínas con repeticiones internas) (Kapteyn *et al.*, 1999). Además, existe una fracción de

proteínas que se une no covalentemente a componentes estructurales de la pared como la endoglucanasa Bgl2, o mediante puentes disulfuro a otras proteínas como la subunidad Aga2 de una α -aglutinina en células MATa (Klebl y Tanner, 1989; Cappellaro *et al.*, 1994).

3.1.4.1. Proteínas unidas covalentemente a la pared celular

Este tipo de proteínas pueden ser liberadas de la pared celular mediante el tratamiento con β -1,3-glucanasas o β -1,6-glucanasas (Orlean, 1997; van, V *et al.*, 1995; van, V *et al.*, 1996).

Proteínas PIR

Las proteínas PIR reciben este nombre porque poseen una o más repeticiones internas en su secuencia (*Proteins with Internal Repeats*), son ricas en los aminoácidos serina y treonina y suelen estar altamente O-manosiladas (Gentzsch y Tanner, 1997; Mrsa *et al.*, 1997). Presentan un péptido señal en el extremo N-terminal, un sitio de reconocimiento para la proteasa Kex2 y un extremo C-terminal altamente conservado, que contiene cuatro residuos de cisteína. Se unen directamente al β -1,3-glucano por un enlace sensible al alcali, sugiriéndose que ésta unión se establece mediante un enlace glicosídico entre las manosas de las cadenas O-glicosiladas de las proteínas PIR y el β -1,3-glucano (Klis *et al.*, 2002), aunque se ha propuesto también una unión tipo éster entre el grupo carboxilo de un residuo de ácido glutámico de las proteínas y un grupo hidroxilo de una molécula de glucosa del β -1,3-glucano (Ecker *et al.*, 2006).

La expresión génica de varios genes que codifican para estas proteínas se incrementa masivamente durante la citoquinesis, lo que sugiere que estas proteínas, entre otras funciones, son especialmente requeridas para estabilizar las nuevas paredes celulares sintetizadas en el proceso de separación de la célula madre de la hija; prueba de ello son las proteínas Pir1 y Pir2, que se localizan en la cicatriz de la yema (Sumita *et al.*, 2005).

Proteínas GPI

Las proteínas GPI, en general, contienen regiones ricas en serinas y treoninas, y poseen un péptido señal en el extremo N-terminal. En el extremo C-terminal presentan un dominio hidrofóbico separado del sitio de unión a GPI (ω) por una cadena de aminoácidos polares (Moran y Caras, 1991; Gerber *et al.*, 1992; Nuoffer *et al.*, 1993). La unión de GPI a las proteínas se realiza post-traduccionalmente después de haber sido translocadas al retículo endoplásmico. A través de este grupo se unen al β -1,6 glucano (Kollar *et al.*, 1997).

Estas proteínas pueden ser agrupadas en diferentes clases dependiendo de sus funciones. Muchas de ellas parecen tener un papel estructural y proporcionar resistencia a la pared mediante la interacción con glucano y otros componentes de la pared. De hecho, la delección simultánea de varios genes codificantes de estas proteínas (*CCW12*, *CCW13*, *CCW14*, *TIP1* y *CWP1*) puede dar lugar a una disminución de la estabilidad osmótica de la célula (Teparic *et al.*, 2004). Otras proteínas GPI actúan como enzimas requeridas para la homeostasis de la pared celular y su remodelación durante la emergencia de la yema, separación celular, apareamiento o entrada en fase estacionaria. Así, por ejemplo, destacan las proteínas Gas1, que actúa como una transglicosidasa de β -1,3-glucano (Mouyna *et al.*, 2000; Carotti *et al.*, 2004); Egt2, endoglucanasa requerida para una correcta separación tras la citoquinesis (Kovacech *et al.*, 1996; Pan and Heitman, 2000; Terashima *et al.*, 2003) así, como Crh1 y Crh2, dos proteínas pertenecientes a la familia Crh (Rodríguez-Peña *et al.*, 2002) que son responsables de la unión de la quitina al β -1,3 y al β -1,6-glucano (Cabib *et al.*, 2007; Cabib *et al.*, 2008). Otras proteínas están implicadas en la adhesión celular o la formación de biofilms. Dentro de esta categoría se encuentran algunas floculinas y aglutininas (Verstrepen *et al.*, 2003; Lipke y Kurjan, 1992).

Otro grupo importante de proteínas de unión a GPI son cinco miembros de la familia de aspartil proteasas Yps (*YPS1*, *YPS2*, *YPS3*, *YPS6*, *YPS7*). Estas proteínas son requeridas para la integridad celular y posiblemente para el mantenimiento de la homeostasis del glucano en la pared celular. De hecho, la expresión de *YPS1* es inducida bajo condiciones de estrés sobre la pared celular y bajo situaciones que incrementan la expresión de *FKS2*, subunidad de la β -1,3-glucan sintasa. En base a estas observaciones, se ha propuesto un modelo en el que *YPS1* promovería la incorporación o retención de glucano en respuesta a situaciones que incrementen su síntesis como estrés sobre la pared celular o procesos de construcción y morfogénesis de la misma. Esta hipótesis se apoya en el hecho de que la sobreexpresión de *YPS1* suprime los defectos ocasionados por el uso de inhibidores o mutaciones que afecten a la síntesis del β -1,3-glucano (Krysan *et al.*, 2005).

4. Rutas de transducción de señales en *S. cerevisiae*

Las células eucariotas, incluyendo las levaduras, poseen rutas de transducción de señales que les permiten percibir cambios en el medio externo y adaptarse a ellos. Por medio de receptores anclados a la membrana plasmática las levaduras pueden responder a una serie de estímulos extracelulares generando señales intracelulares específicas. En este tipo de señalización celular participan las rutas denominadas de MAPKs, “proteín quinasas

activadas por mitógenos”, que activan eventualmente reguladores transcripcionales específicos, modulando de esta manera la expresión de los genes necesarios según el caso y cuya traducción resultará en la síntesis de los productos que permitan a la célula adaptarse y responder de manera eficiente a los diversos tipos de estímulos extracelulares (Qi y Elion, 2005).

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco rutas de MAPKs (Figura 5) que regulan, respectivamente, los procesos de apareamiento, crecimiento filamentos o pseudofilamentación, respuesta a la elevada osmolaridad, mantenimiento de la integridad celular y formación de la ascospora (esporulación) (revisado en Chen y Thorner, 2007).

Las rutas de respuesta a feromonas y la de filamentación, ambas muy relacionadas entre sí por incluir varios elementos comunes están controladas por las MAP quinasas Fus3 y Kss1, respectivamente. Respecto a la ruta de elevada osmolaridad, denominada también ruta HOG, está controlada por la MAPK Hog1, que es la encargada de activar la transcripción de diversos tipos de genes responsables de la respuesta adaptativa frente a un aumento de la osmolaridad del medio externo (Saito y Tatebayashi, 2004; Hohmann *et al.*, 2007). La MAPK de la ruta de esporulación es Smk1, que se activa cuando las células diploides de *S. cerevisiae* crecen en medio pobre en nitrógeno y carente de una fuente de carbono fermentable, situaciones que inducen el proceso de esporulación en esta levadura.

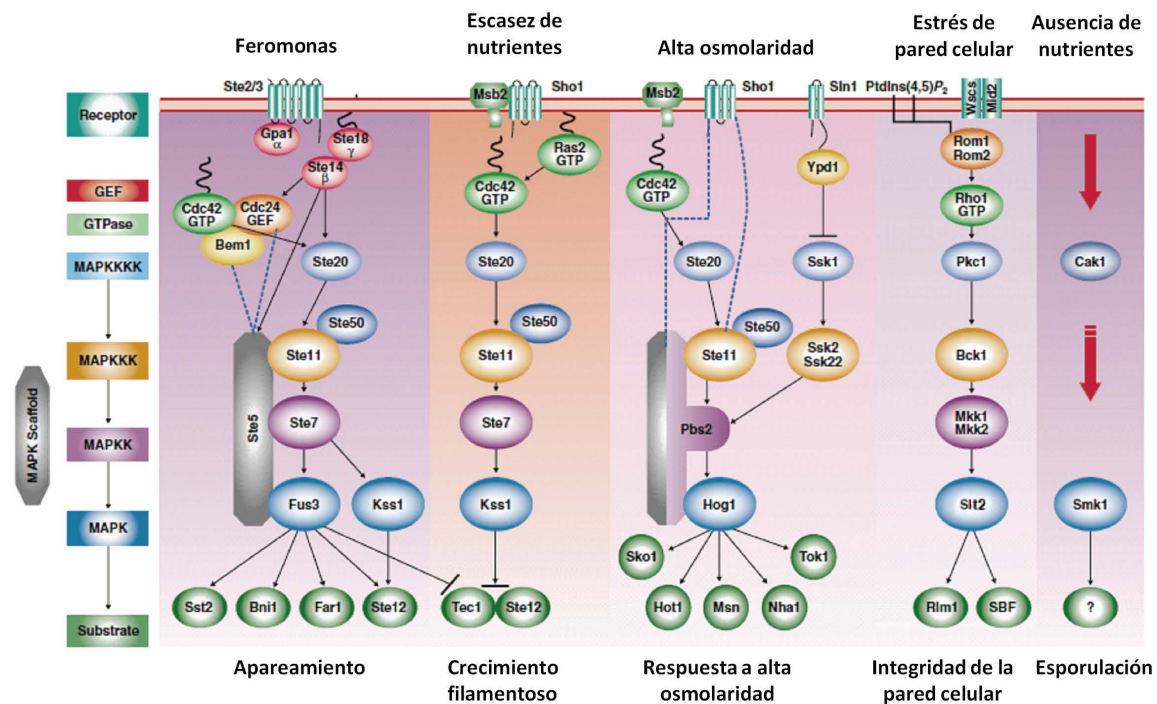


Figura 5. Esquema de las rutas de MAPKs en *S. cerevisiae*. Imagen reproducida de Qi y Elion (2005).

Finalmente, la ruta de integridad celular o ruta CWI (descrita posteriormente con más detalle) es la principal responsable de regular la integridad de la pared celular (ampliamente revisado en Levin, 2005 y Heinisch, 2005).

En *S. cerevisiae*, todas las rutas citadas anteriormente están formadas por un módulo de tres MAPKs que se activan por fosforilación en cascada. Este módulo de MAPKs se encuentra altamente conservado en la escala evolutiva, lo cual indica la gran importancia de estas rutas en el funcionamiento celular. El dominio quinasa situado en el extremo C-terminal de la primera proteína del módulo, una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK o MEKK), es capaz de fosforilar los residuos conservados de serinas y treoninas del extremo N-terminal del eslabón siguiente, una MAP quinasa quinasa (MAPKK o MEK), que se activa y es capaz de fosforilar un residuo de treonina y otro de tirosina del motivo conservado Thr-X-Tyr, separados por un aminoácido distinto según la ruta a la que pertenezcan, de una MAP quinasa (MAPK) que se transloca al núcleo, y ésta, también mediante fosforilación, activa factores de transcripción que modulan la expresión de genes específicos (Chen y Thorner, 2007).

5. Ruta de integridad de la pared celular (CWI)

La composición y organización de la pared celular varía en diversas situaciones fisiológicas como el crecimiento celular, o el proceso de conjugación, así como consecuencia de la necesidad que tiene la célula de adaptarse a un medio externo cambiante, incluyendo condiciones que puedan comprometer su integridad. Aunque varias rutas de señalización participan en la regulación de los procesos de remodelación de la pared celular consecuencia de todos estos estímulos, la ruta de integridad celular juega un papel esencial.

5.1. Señalización a través de la ruta CWI

En la Figura 6 se muestra un esquema de esta ruta, incluyendo sus principales elementos (Levin, 2005).

5.1.1. Sensores de la ruta CWI

A nivel de la membrana plasmática existen varias proteínas implicadas en la señalización de la ruta que funcionan como sensores de la misma (Jendretzki *et al.*, 2011). Todas ellas son proteínas transmembrana tipo I que poseen un pequeño dominio C-terminal citoplasmático, un solo dominio transmembrana y una región N-terminal extracitoplasmática rica en serinas y treoninas altamente O-manosiladas. Estas proteínas se

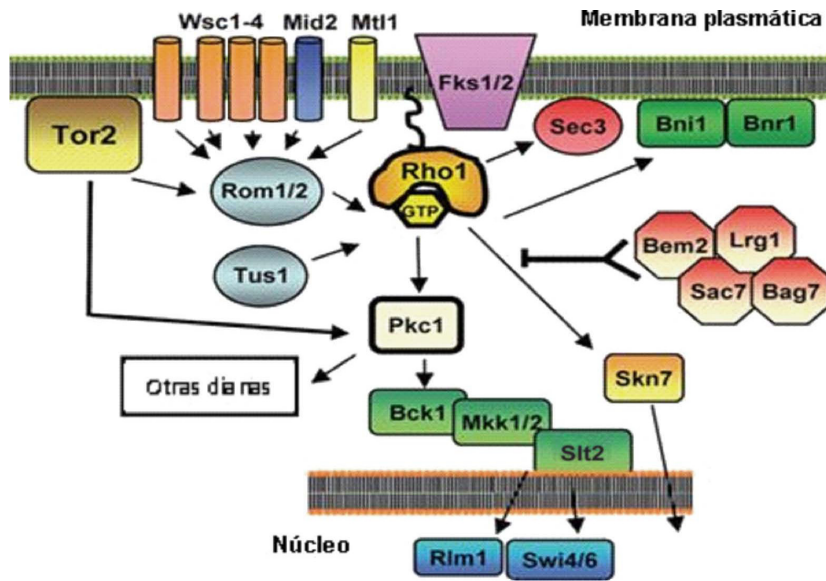


Figura 6. Componentes de la ruta de integridad de la pared celular (CWI) de *S. cerevisiae*. Esquema tomado de Pérez y Rincón (2010).

dividen en dos grupos: Wsc1, Wsc2, Wsc3 y Wsc4 (Verna *et al.*, 1997; Lodder *et al.*, 1999), las cuales presentan una elevada similitud entre sí, y Mid2 y Mtl1 (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999), que aunque son similares estructuralmente al primer grupo, no presentan similitud a nivel de secuencia con la familia Wsc, además de carecer de una región rica en cisternas en el extremo N-terminal. La abundante O-manosilación del dominio periplásmico de, al menos, Mid2 y Wsc1 es también importante para su función (Lommel *et al.*, 2004; Philip y Levin, 2001). Ambas proteínas son manosiladas por Pmt2 y Pmt4, miembros de una familia de siete isoformas que catalizan el primer paso en el proceso de manosilación (Strahl-Bolsinger *et al.*, 1999). Aunque se ha identificado un considerable solapamiento en cuanto a la especificidad de sustrato dentro de la familia Pmt de manosiltransferasas, sólo Pmt2 y Pmt4 son capaces de modificar Mid2 y Wsc1. Consecuentemente, un doble mutante *pmt2Δ pmt4Δ* experimenta un fenotipo de lisis en ausencia de soporte osmótico, típico de mutantes afectados en la señalización a través de la ruta CWI (Lommel *et al.*, 2004).

Desde un punto de vista funcional, entre todos los anteriores, Wsc1 y Mid2, parecen ser los más importantes en la activación de la ruta de integridad celular, de hecho, el doble mutante *wsc1Δ mid2Δ* requiere soporte osmótico para sobrevivir (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Además, los mutantes delecionados en cada uno de los genes que codifican el resto de los sensores citados previamente no presentan ningún fenotipo característico. Se ha sugerido que Mid2 y Wsc1 se comportan como mecanosensores, capaces de detectar cambios en la rigidez de la pared celular o en la membrana plasmática tras exposición a diferentes estreses del medio externo (Levin, 2005; Philip y Levin, 2001). Recientemente se

han mostrado evidencias que apoyan este mecanismo. Así, la mutación del residuo Asn35 de Mid2 impide su N-glicosilación y da lugar a una proteína incapaz de detectar los daños en la pared, sugiriendo que la interacción de este N-glicano con la matriz extracelular podría estar directamente implicada en la capacidad del sensor para detectar el daño producido (Hutzler *et al.*, 2008). En el caso de Wsc1, se ha descrito que este sensor actúa como un “muelle” capaz de soportar cambios en la presión del medio externo y de responder a diferentes estreses sobre la superficie celular (Dupres *et al.*, 2009). Este comportamiento se debe exclusivamente a la región O-manosilada de serinas y treoninas y no al dominio rico en cisteínas (Heinisch *et al.*, 2010).

Un aspecto de especial relevancia es la especificidad de respuesta que muestran estos sensores respecto a diferentes estímulos. Por un lado, Wsc1 media la activación frente a pH alcalino (Serrano *et al.*, 2006), choque térmico -de hecho en el mutante *wsc1Δ* la activación de la MAPK de la ruta, Slt2, por alta temperatura se encuentra bloqueada (Verna *et al.*, 1997)- y frente a compuestos que afectan a la síntesis de la pared celular como la caspofungina (Reinoso-Martin *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2010). Estudios recientes han demostrado que el dominio extracelular del sensor Wsc1 determina la especificidad de este sensor para detectar el estrés inducido por caspofungina (Bermejo *et al.*, 2010). Por otro lado, la proteína Mid2 ha sido descrita como sensor de la ruta de integridad celular en respuesta a pH ácido (Claret *et al.*, 2005), feromonas, elevada temperatura y daños en la pared celular como el causado por el Blanco de Calcofluor (Ketela *et al.*, 1999; de Nobel *et al.*, 2000) y el Rojo Congo (Bermejo *et al.*, 2010). A pesar de sus diferencias, estos dos sensores presentan cierto grado de solapamiento en cuanto al papel que desempeñan en la activación de la ruta CWI. Así, la sobreexpresión de Wsc1 suprime la muerte inducida por feromonas en un mutante *mid2Δ*, y por otro lado, la sobreexpresión de Mid2 suprime la sensibilidad a la temperatura en un mutante *wsc1Δ* (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). El dominio C-terminal de estos dos sensores, Wsc1 y Mid2, interacciona con el dominio N-terminal del siguiente elemento de la ruta CWI, Rom2 (y posiblemente de Rom1) (Philip y Levin, 2001), dos factores de intercambio de GDP/GTP que controlan la activación de la GTPasa Rho1.

5.1.2. Las proteínas Rho1 y Pkc1

La proteína Rho1 es esencial y pertenece a una familia de GTPasas denominada RHO (*Ras HOMolog*) de la que en *S. cerevisiae*, se encuentran seis miembros Rho1-5 y Cdc42 (Perez y Rincon, 2010). Todas ellas residen en la membrana plasmática y juegan,

entre otros, papeles relacionados en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular. Son proteínas que se unen a GTP (guanosín trifosfato) con similitud, desde un punto bioquímico, a la subunidad α de las proteínas heterotriméricas G, cuya conformación molecular cambia dependiendo del nucleótido al que estén unidas (Wennerberg *et al.*, 2000). Las Rho GTPasas tienen una alta afinidad tanto por GDP (guanosín difosfato) como GTP, aunque como la concentración citoplasmática de GTP es más alta que la de GDP, es más probable que la GTPasa se una con más facilidad al primero que al segundo. Sólo cuando se unen a GTP son capaces de interactuar con gran variedad de proteínas efectoras para desarrollar sus funciones moleculares (Bishop y Hall, 2000). Por otro lado, las proteínas Rho tienen una actividad GTPasa intrínseca, la cual permite la hidrólisis de GTP a GDP dando lugar a un cambio conformacional e inactivando la proteína. Debido a esto son conocidas como “interruptores moleculares” (Vetter y Wittinghofer, 2001); sin embargo, las proteínas Rho no necesitan necesariamente el paso de GTP a GDP. Por ejemplo, la capacidad de Rho1 para activar la enzima β -1,3-glucan sintasa no requiere la hidrólisis de GTP (Cabib *et al.*, 1998). La transición del estado de unión a GDP al de unión a GTP de las proteínas Rho es controlado por factores intercambiadores de nucleótidos de guanosina denominados GEFs (*GTP Exchange Factors*), que interactúan con las proteínas Rho y alteran el sitio de unión de nucleótidos, promoviendo la liberación de GDP y facilitando la unión a GTP (Bos *et al.*, 2007). Alternativamente, las proteínas con actividad GTPasa denominadas GAPs (*GTPasa Activating Proteins*) promueven la hidrólisis de GTP unido a proteínas Rho, orientando correctamente la molécula de agua necesaria para la hidrólisis y estabilizando el estado intermedio de la reacción (Bos *et al.*, 2007). El número de GEFs y de GAPs sobrepasa al de proteínas Rho. Así, una proteína Rho puede ser regulada por más de una GAP o GEF y al mismo tiempo, éstas pueden regular más de una proteína Rho. En general, estos reguladores son proteínas con múltiples dominios que tienen la capacidad de unirse a otras proteínas o a membranas, no sólo para cambiar el estado de activación de la GTPasa, sino también para servir de anclaje de proteínas para transmitir la señal y para localizar directamente la Rho GTPasa (Bos *et al.*, 2007).

Rho1 es considerada como el principal regulador de la ruta de integridad celular, no sólo porque controla la actividad de la proteína quinasa Pkc1 (Philip and Levin, 2001), con la cual interactúa, sino porque está implicada directamente en procesos relacionados con la biogénesis de la pared celular como la regulación de la β -1,3-glucansintasa, organización de actina, secreción polarizada y exocitosis. Además de la participación de Rho1 en estos procesos, esta proteína, es capaz de activar al factor de transcripción Skn7, un factor

de transcripción multifuncional cuya implicación se ha descrito en procesos celulares diversos como en el control del ciclo celular, respuesta a estrés oxidativo y choque térmico, metabolismo de la pared celular y crecimiento invasivo (Hohmann *et al.*, 2002; Levin, 2005).

En cuanto a la regulación de Rho1, entre las once Rho-GAPs identificadas en *S. cerevisiae*, cuatro de ellas, Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1, actúan sobre Rho1 tanto *in vivo* como *in vitro* (Perez y Rincon, 2010). Estas proteínas regulan funciones específicas de Rho1. Por ejemplo, Lrg1 regula la actividad de Rho1 en la síntesis del β -1,3-glucano (Watanabe *et al.*, 2001). Bag7 y Sac7, las cuales guardan más similitud entre ellas que con cualquiera de las otras GAPs, participan en la organización del citoesqueleto de actina (Schmidt *et al.*, 2002). Sac7 y Bem2 son las únicas GAPs descritas hasta el momento que regulan negativamente la actividad de Rho1 sobre Pkc1, y por lo tanto, sobre la ruta de integridad celular (Martin *et al.*, 2000; Schmidt *et al.*, 2002). En cuanto a las GEFs más importantes de Rho1 se encuentran Rom1, Rom2 y Tus1. Las dos primeras tienen funciones redundantes en la activación de Rho1 (Ozaki *et al.*, 1996) y la delección de ambas GEFs de forma simultánea es letal para la célula. En cuanto a Tus1, parece tener un papel importante en la activación de la ruta de integridad celular en condiciones de estrés relacionadas con los esfingolípidos de la membrana plasmática (Schmelzle *et al.*, 2002) y además participa en la regulación del ciclo celular mediando la activación de Cdc28 hacia Rho1 (Kono *et al.*, 2008). Además, Tus1 y Rom2 participan en la localización y activación de Rho1 durante la citoquinesis (Yoshida *et al.*, 2006; Yoshida *et al.*, 2009).

Entre las dianas sobre las que actúa Rho1, la proteína Pkc1, homóloga a la proteína quinasa C de mamíferos (Levin *et al.*, 1990) es una de las más importantes. Fue el primer componente de la ruta de integridad descubierto y, aunque esta proteína quinasa tiene probablemente varios sustratos intracelulares, sólo se conoce la regulación que ejerce sobre el módulo de MAP quinasas de esta ruta. La delección de *PKC1* es letal bajo condiciones normales de crecimiento, pero la viabilidad de un mutante *pkc1* Δ se mantiene en presencia de soporte osmótico (Levin y Bartlett-Heubusch, 1992; Levin *et al.*, 1990; Paravicini *et al.*, 1992). De hecho, la pérdida de esta proteína conduce a problemas en el crecimiento más severos que la ocasionada por la delección de cualquiera de los miembros de la cascada de MAP quinasas que están bajo su regulación, lo cual sugiere que Pkc1 controla múltiples rutas celulares (Lee y Levin, 1992). Adicionalmente, el mutante *pkc1* Δ presenta una reducción del contenido en glucano y manano de la pared celular del 30% y 20%, respectivamente (Roemer *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994) y la membrana plasmática aparece separada de la pared celular en algunos puntos (Paravicini *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1994).

En cuanto a la localización de la proteína Pkc1, los estudios realizados han revelado que reside en sitios de crecimiento polarizado (Andrews y Stark, 2000). Específicamente en fases tempranas del ciclo celular, Pkc1 se ha localizado en sitios de gemación incipiente en la punta de la yema, un patrón muy similar al de Rho1 (Qadota *et al.*, 1996; Yan y Lennarz, 2002). En estadios posteriores del ciclo se deslocaliza y, finalmente, se relocaliza en el cuello, entre la célula madre y la hija, siendo ésta última localización dependiente del anillo de septinas (Denis y Cyert, 2005).

5.1.3. El módulo de MAP quinasas: Bck1, Mkk1/Mkk2 y Slt2

Pkc1, activada por Rho1, transmite la señal al módulo de MAPKs mediante fosforilación, comenzando por Bck1 (MAPKKK), ésta a su vez señala a las MAPKKs redundantes, Mkk1 y Mkk2, activando finalmente la MAPK Slt2 (Levin, 2005; Heinisch, 2005). Por tanto, Pkc1 fosforila a Bck1 *in vitro* en varios sitios (Ser939, Thr1119, y Ser1134) que se localizan entre su dominio regulador N-terminal y catalítico C-terminal de serín treonín proteín quinasa (Levin *et al.*, 1994) y que parecen estar implicados en su activación (Lee y Levin, 1992). De hecho, la mutación de la Thr1119 por Ala, Cys o Tyr resulta en una activación constitutiva de la ruta, sugiriendo que el bloqueo de una interacción que implique a Thr1119 es la clave para la activación de esta MAPKKK. En condiciones de activación, Bck1 fosforila a las MAPKK, Mkk1 y Mkk2, en los residuos conservados de serina y treonina de su dominio de activación.

Los genes *MKK1* y *MKK2* fueron aislados como supresores multicopia del efecto lítico de la temperatura sobre el mutante *pkc1Δ* y defectos en el crecimiento del mutante *bck1Δ* (Irie *et al.*, 1993). La mutación de estas proteínas por separado no causa ningún fenotipo aparente, pero en combinación provocan defectos en el crecimiento suprimibles en presencia de estabilización osmótica. Estas MAPKK son funcionalmente redundantes y necesarias para la activación de la MAPK Slt2 (Irie *et al.*, 1993; Kamada *et al.*, 1995; Paravicini y Friedli, 1996). Estudios posteriores han atribuido a Mkk1 un papel más importante en la transmisión de la señal a través de la ruta CWI (Martin *et al.*, 2000). Mkk1 y Mkk2 presentan un dominio quinasa C-terminal similar, pero divergen en la región N-terminal, por lo que se ha propuesto que este último dominio desempeñe un papel regulatorio como mediador de la interacción con otras proteínas como Slt2 (Soler *et al.*, 1995) o el componente del polarisoma Spa2 (Sheu *et al.*, 1998). Finalmente, Mkk1/Mkk2 fosforilan y activan a la MAPK Slt2, en los residuos de treonina y tirosina del motivo característico de las MAPKs, Thr-X-Tyr, dentro del dominio de activación. Recientemente, se ha descrito

un papel de retrofosforilación de Slt2 sobre sus MAPKKs, que podría tener cierto papel en la retroalimentación positiva de la ruta (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007). De hecho, dicha retrofosforilación es consecuencia de la actividad catalítica de Slt2 pero independiente de la respuesta transcripcional desencadenada por esta MAPK.

Slt2 es homólogo funcional de la MAPK Erk5 en humanos (Truman *et al.*, 2006). Fue descrito como supresor de fenotipo de lisis temperatura dependiente del mutante *lyt2Δ* (Torres *et al.*, 1991) y del mutante *bck1Δ* (Lee *et al.*, 1993). Slt2 se localiza tanto en el núcleo como en el citoplasma (Kamada *et al.*, 1995). Además, una pequeña proporción de Slt2, así como Mkk1 y Mkk2, se localizan de manera dependiente del ciclo celular en la punta de emergencia de la yema y en el plano de constricción de la citoquinesis entre la célula madre y la hija, siendo necesaria para dicha localización la presencia de Spa2 que interacciona con las tres quinasas. Por ello, se ha propuesto a Spa2 como proteína de anclaje de la ruta en condiciones de crecimiento polarizado (van y Peter, 2002). Adicionalmente, Slt2 se localiza en la punta del *shmoo* durante los cambios morfogenéticos que sufre la levadura bajo la acción de feromonas (Baetz *et al.*, 2001; van y Peter, 2002).

Se ha descrito la existencia de un parólogo a Slt2, codificado por el gen *MLP1* (*Mpk1-like protein kinase*) (Watanabe *et al.*, 1997). Mlp1 es una pseudoquinasa que presenta un elevado grado de homología (53% de su secuencia) con Slt2. Al igual que esta MAPK, Mlp1 interacciona con el factor de transcripción de la ruta CWI, Rlm1, mediante el sistema de dos híbridos. Sin embargo, Mlp1 no posee varios dominios conservados en MAPKs críticos para la actividad proteín quinasa. En primer lugar, el residuo de treonina en el lugar de doble fosforilación, es sustituido por una lisina, indicando que Mlp1 no es una verdadera MAPK. En segundo lugar, un residuo de lisina en el sitio de unión al ATP (Hanks y Hunter, 1995), que es universalmente conservado en todas las MAPKs es reemplazado por un residuo de arginina. Esta mutación se genera habitualmente cuando se quiere crear una proteína quinasa catalíticamente inactiva. En tercer lugar, un residuo universalmente conservado de aspártico dentro del triplete DFG en el subdominio VII es sustituido por una asparagina, sugiriendo que Mlp1 no tiene capacidad para unir ATP de forma catalítica (Hanks y Hunter, 1995). Sin embargo, debido a que la fosforilación por las MAPKKs del residuo de tirosina del lugar de activación de las MAPKs precede a la fosforilación del residuo de treonina (Ferrell, Jr. y Bhatt, 1997; Haystead *et al.*, 1992), es posible que Mlp1 sea fosforilado en la tirosina 192 por Mkk1/Mkk2.

La MAPK Slt2 media la respuesta transcripcional a través de dos factores de transcripción, Rlm1 y el complejo SBF (Swi4/Swi6). Se ha descrito que la mayor parte de la respuesta transcripcional a través de la ruta CWI está regulada por Rlm1 (Garcia *et al.*, 2004; Jung *et al.*, 2002; Jung y Levin, 1999; Roberts *et al.*, 2000). Recientemente, se ha observado un nuevo mecanismo en condiciones de activación de la ruta, en el que Slt2 y Mlp1 tras ser fosforilados, inducen de forma no catalítica y a través del complejo SBF, la transcripción genes como *FKS2* (codifica para la β -1,3 glucan sintasa), *CHA1* (implicado en el catabolismo de hidroxiaminoácidos), *YLR042C* e *YKR013W*, ambos de función desconocida. Slt2, o Mlp1, forman un complejo con Swi4 que se asocia al promotor de estos genes independientemente de Swi6 (Kim *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010).

Un punto clave en la regulación de estas rutas es el nivel de activación de la MAPK con el fin de permitir una adecuada intensidad y duración de la respuesta generada, especialmente mediante la modulación de su estado de fosforilación. Este papel es desempeñado por los diferentes familias de proteín fosfatasas (revisado en Martin *et al.*, 2005), que, además de mantener un adecuado nivel de fosforilación de la MAPK en condiciones basales o en presencia de estímulo, en algunos casos regulan su correcta localización y son capaces de integrar las señales de diferentes rutas y controlar el *crossstalk* entre ellas. Varios estudios han demostrado que una MAPK puede ser regulada por más de un tipo de proteín fosfatasa (Martin *et al.*, 2005). En referencia a la ruta CWI, hasta el momento se ha descrito que la MAPK Slt2 es regulada negativamente por cuatro proteín fosfatasas Msg5, Ptp2, Ptp3 y Sdp1.

El gen *MSG5* codifica una proteín fosfatasa de especificidad dual (capaz de defosforilar tanto residuos de tirosina como de treonina de sus substratos), que fue identificada por su capacidad de bloquear la activación de Fus3 tras tratamiento con feromonas (Doi *et al.*, 1994). Posteriormente, se determinó que también contribuía a mantener bajos niveles de fosforilación de esta MAPK en condiciones basales (Andersson *et al.*, 2004). Adicionalmente, se determinó su relación con la ruta de integridad celular, ya que la sobreexpresión de *MSG5* suprimía la inhibición del crecimiento asociada a la sobreexpresión de un alelo hiperactivo de la MAPKK, *MKK1^{P386}* (Watanabe *et al.*, 1995). Posteriormente, se observó que Msg5 modula la señalización a través de la ruta de integridad celular actuando sobre la MAPK Slt2 (Martin *et al.*, 2000; Flandez *et al.*, 2004); de hecho, Msg5 parece ser la fosfatasa más importante que actúa sobre Slt2, al menos en condiciones basales (Harrison *et al.*, 2004), resultando su delección en un incremento en la fosforilación basal de Slt2 (Martin *et al.*, 2000). Por otro lado, Slt2 fosforila a Msg5 en condiciones que activan la ruta de integridad

celular (Flandez *et al.*, 2004). En consonancia con la regulación de las MAPKs Fus3 y Slk2 por Msg5, la delección de *MSG5* conduce a un incremento de los niveles de expresión de genes controlados por ambas rutas (Marin *et al.*, 2009)

Las proteín tirosín fosfatasas, Ptp2 y Ptp3, que defosforilan a las MAPK Fus3 y Hog1, también actúan sobre la MAPK Slk2 (Mattison *et al.*, 1999), teniendo Ptp2 un papel más importante en la defosforilación de esta MAPK. Adicionalmente, la expresión de *PTP2*, pero no de *PTP3*, es inducida en respuesta a choque térmico y zimoliasa (Hahn y Thiele, 2002; Garcia *et al.*, 2009) de una manera Slk2 dependiente, sugiriendo que la activación de Slk2 establece un mecanismo de retroalimentación negativo para su inactivación por Ptp2. Se ha demostrado que las proteín tirosín fosfatasas son importantes para el mantenimiento de la especificidad de la señalización, evitando el *crossstalk* inapropiado entre las rutas de MAPKs. En concreto, Ptp2 y Ptp3 evitan la hiperactivación letal de la MAPK Hog1 bajo condiciones que conducen a la activación de la ruta de integridad celular (Winkler *et al.*, 2002). Estos autores proponen que Ptp2 y Ptp3 podrían impedir la activación de Hog1 por las MAPKKs de la ruta de integridad.

En cuanto a la fosfatasa Sdp1, se trata de una proteín fosfatasa de especificidad dual, similar a Msg5, que controla la cantidad de Slk2 fosforilado tras un choque osmótico, pero no en condiciones basales (Hahn y Thiele, 2002). Sdp1 interacciona con Slk2 (Collister *et al.*, 2002) pero no se han descrito interacciones con las MAPK Fus3, Hog1 o Kss1, lo que sugiere que, en contraste con las fosfatasas descritas anteriormente, Sdp1 presenta una alta selectividad por Slk2. Así, *SDP1* es inducido transcripcionalmente bajo diferentes condiciones que activan la MAPK Slk2, tales como estrés térmico y estrés oxidativo. Sin embargo, esta inducción no es mediada por Slk2 sino por los factores de transcripción Msn2/4, los cuales responden a la activación de otras rutas de señalización, entre ellas, la ruta AMPc-PKA (Hahn y Thiele, 2002). Este hecho establece un punto de unión entre esta ruta y la de integridad celular a través de Sdp1.

5.1.4. Los factores de transcripción de la ruta CWI: Rlm1 y el complejo SBF (Swi4/Swi6)

El factor de transcripción Rlm1, fue relacionado con la ruta CWI al identificarse como un gen cuya sobreexpresión suprimía la letalidad causada por la sobreexpresión del alelo hiperactivo *MKK1^{P386}* (Watanabe *et al.*, 1995). Rlm1 regula la expresión de genes que, en su mayoría, codifican proteínas funcionalmente relacionadas con la pared celular (Jung y Levin, 1999; Garcia *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2009). Rlm1 presenta un dominio de unión a

DNA (CTA(T/A)₄TAG) en su extremo N-terminal de tipo MADS (*MCM1*, *Agamous Deficiens*, *Serum response factor*), un dominio de activación transcripcional en el extremo C-terminal y dos residuos principales para la fosforilación por Slt2 (Ser427 y Thr439) presentes en su dominio de activación que promueven su actividad transcripcional (Jung *et al.*, 2002).

A diferencia de lo que ocurre en mutantes de la ruta CWI, la delección de *RLM1* no conduce a fenotipos de sensibilidad a sustancias que interfieren con la construcción de la pared celular como el Blanco de Calcoflúor y la zimoliasa (cóctel enzimático con actividad β -1,3-glucanasa) (Dodou y Treisman, 1997), alta temperatura, carencia de nitrógeno o presencia de glicerol en el medio; únicamente provoca un leve fenotipo de sensibilidad a cafeína (Watanabe *et al.*, 1995), típico de mutantes en elementos de la ruta CWI asociado a defectos en la transducción de señal. Por otro lado, en contra de lo esperable en función del fenotipo del mutante *rlm1* Δ , la activación transcripcional de la mayoría de los genes inducidos en respuesta a altas temperaturas (39°C) ó daños en la pared producidos por el Rojo Congo (sustancia con actividad semejante al Blanco de Calcofluor que interfiere en el correcto ensamblaje de los componentes de la pared celular) o la zimoliasa, dependen de Rlm1 (Jung y Levin, 1999; Garcia *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2009).

En cuanto al complejo SBF (*Swi Binding Factors* o factores de unión a la caja Swi) (Madden *et al.*, 1997), está formado por los factores de transcripción Swi4 y Swi6. Dicho complejo está compuesto por una subunidad de unión al DNA, la proteína Swi4, y por una subunidad reguladora, la proteína Swi6 (Primig *et al.*, 1992), siendo ambas necesarias para la activación de la expresión de genes regulados por el ciclo celular durante la transición G₁/S (Baetz *et al.*, 2001; Madden *et al.*, 1997).

Se ha sugerido que el complejo SBF también tiene una segunda función, relacionada con la señalización de la ruta de integridad de la pared celular, por varias razones. En primer lugar, el fenotipo de lisis celular de un mutante *slt2* Δ es suprimido por sobreexpresión de *SWI4* (Madden *et al.*, 1997). En segundo lugar, los mutantes *swi4* Δ y *swi6* Δ son hipersensibles al Blanco de Calcofluor, lo que sugiere la participación del complejo SBF en la homeostasis de la pared celular (Iguar *et al.*, 1996). Además, como se ha comentado anteriormente, en condiciones de activación de la ruta CWI la transcripción de determinados genes (*FKS2*, *CHA1*, *YKR031W*, *YLR042C*) es inducida por un mecanismo no catalítico dependiente del complejo SBF. Slt2, o Mlp1, una vez fosforilados interaccionan con Swi4 formando un complejo que se une a los promotores de dichos genes, siendo requerida la posterior unión de Swi6 a este complejo para activar la transcripción. Recientemente se ha observado, que

la fosforilación de Swi6 por Slt2 interfiere con la entrada de Swi6 al núcleo (Kim *et al.*, 2010). Así, el transporte núcleo-citoplásmico de Swi6 en respuesta a activación de la ruta CWI es un proceso bifásico. En primer lugar, en condiciones de activación de Slt2, Swi6 es reclutado al núcleo una vez formado el complejo Swi4-Slt2 para iniciar la transcripción, siendo independiente este hecho de la actividad catalítica de Slt2. Posteriormente, Slt2 fosforila a Swi6 en el residuo Ser238, interfiriendo esta fosforilación con la función de una señal adyacente de localización nuclear reconocida por la β -importina, Kap120, con la consecuente salida de Swi6 del núcleo (Kim *et al.*, 2010).

5.2. Activación de la ruta CWI

La ruta de integridad de la pared celular de *S. cerevisiae* es regulada a través del ciclo celular, pero es también activada en respuesta estímulos externos y sucesos morfológicos que causan estrés sobre la pared como la elevada temperatura, situaciones de hipoosmolaridad (Davenport *et al.*, 1995), presencia de feromonas (Buehrer y Errede, 1997), estrés oxidativo (Vilella *et al.*, 2005), despolimerización del citoesqueleto de actina (Delley y Hall, 1999 ; Harrison *et al.*, 2001), mutaciones en componentes de la pared celular (de Nobel *et al.*, 2000), compuestos que causan daños sobre la pared de forma directa o indirecta (de Nobel *et al.*, 2000; Ketela *et al.*, 1999; Garcia *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2000), pH alcalino (Serrano *et al.*, 2006), radiación UV (Bryan *et al.*, 2004) y estrés sobre el retículo endoplásmico (Bonilla y Cunningham, 2003; Chen *et al.*, 2005). A continuación se presenta una descripción detallada de las condiciones mejor caracterizadas que activan la ruta CWI.

5.2.1. Regulación por el ciclo celular

Durante el ciclo celular, la expresión de genes relacionados con la construcción de la pared varía, presentando muchos de ellos un pico de inducción en la fase G_1 , justo antes del comienzo de la gemación de la célula hija (Spellman *et al.*, 1998). La expresión de algunos genes, como *CRH1*, *GAS1* ó *FKS1*, que codifican para proteínas implicadas en la construcción de la pared, está regulada a lo largo del ciclo celular por la ruta CWI a través del complejo SBF, descrito anteriormente (Igal *et al.*, 1996; Iyer *et al.*, 2001).

La primera evidencia de la implicación de la MAPK Slt2 en la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae* surgió al observar que cepas portando variantes mutantes del gen *SLT2* aumentaban los defectos en la división celular de cepas que contenían un alelo de Cdc28 incapaz de realizar las funciones de esta proteína en la fase G_1 del ciclo celular (Mazzoni *et al.*, 1993). La activación de Cdc28 en el punto Start en la fase G_1 promueve la

emergencia de la yema. Los alelos mutantes del gen *SLT2* presentaban fenotipos similares a mutantes en proteínas implicadas en la organización del citoesqueleto de actina, incluyendo la deslocalización de los *patches* de actina y la deposición de quitina así como la acumulación de vesículas secretoras (Mazzoni *et al.*, 1993). De esta forma, se propuso que Slt2 actúa por debajo, o en paralelo, con Cdc28 para promover la emergencia de la yema. Sin embargo, aunque la actividad de Slt2 es regulada a través del ciclo celular, esta activación no es estrictamente dependiente de Cdc28 (Zarzov *et al.*, 1996). La actividad cíclica de Slt2 probablemente refleja los niveles de estrés sobre la pared celular que tienen lugar durante las diferentes etapas del ciclo. De acuerdo con esta interpretación, la mayoría de los elementos de la ruta CWI presenta un patrón de localización, en los lugares de crecimiento polarizado, dependiente del ciclo celular (Levin, 2005).

5.2.2. Activación por estrés térmico

El aumento de temperatura de 23°C a 39°C da lugar a la activación de la ruta CWI. De hecho, esta ruta es activada persistentemente en respuesta a crecimiento a elevadas temperaturas (37°C- 39°C), siendo esto consecuente con el hecho de que mutantes en muchos componentes de la ruta manifiesten un fenotipo de lisis celular sólo cuando son cultivados a alta temperatura. Sin embargo, Slt2 no es activado inmediatamente después de someterse las células a un choque térmico, sino que la activación es detectable tras aproximadamente 20 minutos y el pico de activación se alcanza a los 30 minutos (Kamada *et al.*, 1995). Esto sugiere que la ruta no detecta directamente el cambio de temperatura, sino que el efecto observado se debe a un efecto secundario consecuencia del estrés sobre la pared.

La proteína Wsc1 juega un papel relevante como sensor de la ruta de integridad celular responsable de la señalización en respuesta a choque térmico (Verna *et al.*, 1997), mientras que la activación a tiempos más largos por alta temperatura parece depender de Mid2 (Ketela *et al.*, 1999).

Varios elementos de la ruta de integridad celular son requeridos para la tolerancia a este tipo de estrés, incluyendo *BCK1*, *MKK1/MKK2* y *SLT2* (Irie *et al.*, 1993; Lee y Levin, 1992; Torres *et al.*, 1991) sin embargo, el incremento en la activación basal de Slt2 por choque térmico en un mutante *bck1Δ* que expresa un alelo hiperactivo *MKK1*, sugiere que esta proteína no es necesaria para la activación de la ruta CWI en presencia de choque térmico (Harrison *et al.*, 2004). A partir de estos datos, se ha sugerido que los elementos de la cascada de MAPKs no son indispensables para la activación de la ruta CWI mientras que la

señal se transmita correctamente desde Mkk1/Mkk2 a Slt2, lo cual posibilita la implicación de otros elementos que, de forma lateral, podrían activar Slt2 directamente o a través de Mkk1/Mkk2 (Fuchs y Mylonakis, 2009).

5.2.3. Activación por estrés osmótico

En *S. cerevisiae*, la disminución de solutos en el medio externo, provoca un aumento de la turgencia de la célula que conduce a una rápida activación de la ruta CWI (tras 15 segundos) (Davenport *et al.*, 1995). Dicha activación no depende específicamente de determinados solutos osmóticos y es observada con soluciones hipotónicas de sorbitol, NaCl o glucosa (Davenport *et al.*, 1995). La delección de componentes del módulo de MAPKs evita la fosforilación de Slt2 bajo condiciones hipoosmóticas, siendo por tanto requeridos para la respuesta a este tipo de estrés a través de la ruta CWI (Davenport *et al.*, 1995). De hecho, los mutantes *pkc1Δ*, *bck1Δ* y *mkk1Δ mkk2Δ* presentan un fenotipo de lisis en ausencia de estabilizadores osmóticos (Irie *et al.*, 1993; Lee y Levin, 1992; Levin y Bartlett-Heubusch, 1992).

Además, se ha descrito que en condiciones de estrés hipoosmótico, el sensor Sln1 de la ruta HOG activa al factor de transcripción Skn7 que induce la expresión de al menos un gen, *OCH1*, que codifica para una manosiltransferasa implicada en la síntesis de glicoproteínas de la pared celular (Li *et al.*, 2002). Como ya se comentó anteriormente, Skn7 es una proteína multifuncional relacionada también con la ruta de integridad celular, ya que se ha descrito una interacción directa entre este factor de transcripción y la proteína Rho1 (Alberts *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1994). Este hecho podría sugerir una conexión entre la ruta HOG y la ruta CWI a través de Skn7.

En condiciones de estrés hiperosmótico se produce una pérdida de la turgencia celular y una disminución del volumen de la célula. En estas circunstancias, la activación de la MAPK Hog1 conduce a un incremento de la turgencia y recuperación del volumen celular (Brewster *et al.*, 1993; Hohmann, 2002; Hohmann, 2009). Sin embargo, la MAPK Slt2 es activada transitoriamente bajo estas condiciones a través del sensor Mid2, siendo esta activación dependiente de la presencia de Hog1 y de una exposición a este estrés de 45-60 minutos (García-Rodríguez *et al.*, 2005). Este hecho sugiere que la activación de la MAPK Slt2 no es una consecuencia de la pérdida inicial de la turgencia celular sino del proceso de recuperación del equilibrio osmótico. Así, el significado biológico de la activación de Slt2 por estrés hiperosmótico podría estar relacionado con la necesidad de la célula de fortalecer la pared celular.

5.2.4. Activación por estrés oxidativo

La presencia de compuestos oxidantes en el medio externo provoca estrés oxidativo en la célula y causa daños en diferentes macromoléculas. El estrés oxidativo activa la ruta CWI pero se ha propuesto que la cinética de activación es diferente según el tipo de agente oxidante pudiendo actuar cada uno de estos compuestos sobre diferentes dianas de esta ruta. Así, se ha descrito que la exposición a hidroperóxido de ácido linoleico (actúa sobre los lípidos insaturados de la membrana plasmática) induce una corta y rápida activación de la MAPK Slt2 (Alic *et al.*, 2003). Otros compuestos como la diamida (oxida los grupos sulfhidrilo libres presentes en la capa externa de la pared celular dando lugar a la formación de enlaces disulfuro) y el peróxido de hidrógeno (ejerce su acción a nivel intracelular) producen una despolarización del citoesqueleto de actina y activan la ruta CWI, siendo el principal sensor en el caso de la diamida, Mtl1 y en el peróxido de hidrógeno, Mid2 (Vilella *et al.*, 2005). Existen varios factores de transcripción implicados en la respuesta a estrés oxidativo, entre ellos, Yap1, Skn7, Msn2/4 y Rlm1, hecho que sugiere que varias rutas estén implicadas en la respuesta a este tipo de estrés (Chen *et al.*, 2009; Staleva *et al.*, 2004).

5.2.5. Activación por estrés sobre retículo endoplásmico

El retículo endoplásmico (ER) desempeña un papel esencial en la producción de lípidos y proteínas secretoras. Ocasionalmente, la carga de proteínas en el ER excede su capacidad de plegamiento y se acumulan proteínas mal plegadas ocasionando estrés sobre el retículo endoplásmico, siendo la ruta UPR (*Unfolded Protein Response*) una de las principales implicadas en la respuesta a este tipo de estrés (Ron y Walter, 2007). En levaduras la ruta UPR es controlada por la proteína Ire1 que permite mediante su actividad endonucleasa la eficiente translocalización al núcleo del factor de transcripción Hac1 para inducir la transcripción de genes en respuesta a estrés sobre ER (Cox *et al.*, 1993). Se ha sugerido que el estrés sobre el retículo endoplásmico activa la ruta CWI de forma paralela a la ruta UPR. Chen y colaboradores (2005) observaron que un mutante doble *ire1Δ slt2Δ* mostraba mayor sensibilidad a estrés sobre ER que los respectivos mutantes sencillos. Estudios adicionales mostraron que el doble mutante era más sensible a daños sobre la pared celular que el mutante *slt2Δ* (Scrimale *et al.*, 2009). Recientemente, se ha descrito que el complejo deacetilador de histonas (Hos2/Set3) media la transmisión de la señal de estrés sobre ER a la MAPK Slt2 existiendo varias posibilidades para este mecanismo: a) acción directa sobre la MAPK Slt2 y b) acción indirecta regulando la expresión de elementos que actúan sobre Slt2 (Cohen *et al.*, 2008).

Por otro lado, el estrés sobre la pared celular activa la ruta UPR a través de la ruta CWI. En células tratadas con el Blanco de Calcofluor se activa la ruta UPR a través del sensor de la ruta CWI, Mid2; la MAPK Slit2 y el factor de transcripción Swi6. Hasta el momento se desconoce si Swi6 media una respuesta transcripcional que indirectamente activa la ruta UPR o si esta activación sucede por un mecanismo no transcripcional que conecte Swi6 con Ire1.

Recientemente, se ha descrito la existencia de la ruta de supervivencia a estrés sobre ER (ERSU) implicada en el control de la funcionalidad del ER antes de la división celular (Babour *et al.*, 2010). Cuando se produce estrés sobre el ER, la ruta ERSU conduce a perturbaciones en la localización y morfología del anillo de septinas dando lugar a un retraso en citoquinesis y a la retención del retículo endoplásmico cortical en la célula madre hasta que se restaura la funcionalidad del ER. Se ha observado que el control del ciclo celular en respuesta a estrés sobre el ER de la ruta ERSU depende de la MAPK Slit2 y del sensor Wsc1 y es independiente de la ruta UPR, aunque el mecanismo molecular es todavía desconocido.

5.2.6. Activación por pH

El pH óptimo para el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* es ligeramente ácido. La alcalinización del medio provoca cambios en la presencia de distintos nutrientes (fosfato y otros cationes) y modifica las cargas negativas de las proteínas. Esta alcalinización activa la ruta CWI de una forma rápida y transitoria a través del sensor Wsc1 (Serrano *et al.*, 2006). Adicionalmente la tolerancia a este pH es dependiente del factor de transcripción SBF e independiente de Rlm1 (Serrano *et al.*, 2006).

Por otro lado, se ha observado que el pH excesivamente ácido originado por ácidos inorgánicos activa la ruta CWI y consecuentemente induce la transcripción de genes como *SLT2* y *PST1* de forma dependiente del factor de transcripción Rlm1 y del sensor Mid2 (Claret *et al.*, 2005).

5.2.7. Activación por despolarización del citoesqueleto de actina

Determinadas condiciones en el medio externo como cambios en temperatura y osmolaridad provocan en las células despolarización transitoria del citoesqueleto de actina, retrasándose el proceso de gemación mientras que las células se adaptan a las nuevas condiciones. Durante este retraso, el *checkpoint* morfogenético detiene el ciclo celular en la fase G₂ hasta la repolarización de la actina y la completa formación de la yema, evitando

así la formación de células binucleadas (Lew, 2000). Un retraso similar en G_2 puede ser desencadenado por mutaciones o compuestos que alteren la organización del citoesqueleto de actina como la latrunculina-B (Harrison *et al.*, 2004) y la rapamicina (Krause y Gray, 2002). La despolarización en el citoesqueleto de actina induce la fosforilación de Slr2, siendo requerida la MAPK para desencadenar la parada en la fase G_2 inducida por el *checkpoint* morfogenético (Harrison *et al.*, 2004).

5.2.8. Activación por feromonas

La detección de la presencia de feromonas de células de tipo sexual opuesto desencadena un programa desarrollado a través de la ruta de respuesta a feromonas controlada por la MAPK Fus3 que conduce al proceso de apareamiento (fusión de dos células de tipo sexual opuesto para formar un cigoto $2n$) (Elion, 2000). Este proceso comienza con la parada del ciclo celular en la fase G_1 , seguida por la formación de una proyección (*shmoo*) hacia la célula de tipo sexual opuesto y fusión de las dos células. Durante el desarrollo de este proceso celular, la ruta CWI se activa con el inicio de la formación de la proyección (Buehrer and Errede, 1997; Errede *et al.*, 1995; Zarzov *et al.*, 1996) sugiriendo la necesidad de remodelación de la pared celular asociada con este proceso celular. De hecho, mutantes que tienen bloqueada la ruta de integridad sufren la lisis celular durante el cambio morfológico inducido por feromonas (Errede *et al.*, 1995).

5.2.9. Activación por daños sobre la pared celular

La pared celular, como se ha mencionado anteriormente, no es una estructura rígida sino dinámica y por tanto adaptable a las situaciones cambiantes que la célula sufre durante los diferentes eventos morfogenéticos que se suceden en su ciclo vital, además de a las diversas condiciones del medio externo. Por ello, con el objetivo de conservar su integridad y funcionalidad, cuando se produce un daño o alteración sobre la pared celular, la célula desarrolla un complejo mecanismo de respuesta, fundamentalmente dependiente de la ruta CWI, para conseguir remodelar la pared y compensar, de esta manera, los daños existentes. Esto es lo que se ha denominado “mecanismo compensatorio” (Popolo *et al.*, 2001).

Desde un punto de vista funcional, la activación del mecanismo compensatorio (revisado en Smits *et al.*, 2001) conlleva: 1) un incremento de la síntesis de β 1,3-glucano vía Fks2, 2) un incremento drástico en el contenido de quitina, llegando hasta un 20% del peso seco de la pared celular, 3) un incremento en la expresión e incorporación de proteínas de

pared celular (CWPs) y 4) cambios en la asociación entre los polímeros constituyentes de la pared celular (con un aumento destacable de CWPs unidas directamente a quitina) y 5) redistribución celular transitoria de complejo β -1,3-glucansintasa (Fks1 y su subunidad reguladora Rho1).

Dentro de los compuestos que causan estrés sobre la pared celular y desencadenan el mecanismo compensatorio destacan el Blanco de Calcofluor o el Rojo Congo, que se unen a la quitina e interfieren en el correcto ensamblaje de la pared celular (Roncero y Duran, 1985), la zimoliasa, con actividad principalmente β -1,3-glucanasa, que degrada la red de β -1,3-glucano (Kitamura y Yamamoto, 1972) y la caspofungina que bloquea la síntesis de la pared celular inhibiendo la síntesis del β -1,3-glucano (Stone *et al.*, 2002). Así, el crecimiento de *S. cerevisiae* en presencia de Rojo Congo, calcofluor, zimoliasa, caspofungina da lugar a la activación de la MAPK Slt2 (de Nobel *et al.*, 2000; Ketela *et al.*, 1999; Reinoso-Martin *et al.*, 2003).

Por otro lado, las alteraciones en la pared celular que presentan mutantes afectados en genes implicados en su construcción y/o organización, como por ejemplo en el caso de los mutantes *fks1 Δ* o *gas1 Δ* , conducen también a la activación de la ruta CWI, lo que indica que alteraciones estructurales en la pared celular son suficientes, al menos en ciertos casos, para activar esta ruta con la finalidad de preservar la viabilidad celular (de Nobel *et al.*, 2000).

5.3. Adaptación a daños sobre la pared celular: respuesta transcripcional

En los últimos años, el desarrollo de la tecnología de los microarrays de DNA que permite conocer los niveles de expresión de todos los genes presentes en el genoma de forma simultánea en diferentes circunstancias, ha sido clave en la caracterización de las respuestas transcripcionales en la levadura como consecuencia de daños constitutivos (mutantes delecionados en genes importantes para la biogénesis de la pared celular) y transitorios (tratamiento con agentes que perturban la pared celular), contribuyendo a entender las bases moleculares y los mecanismos de regulación de las respuestas de adaptación a estrés. De esta forma, se han descrito por ejemplo el transcriptoma de mutantes delecionados en *FKS1*, *GAS1*, *KRE6*, *KNR4*, *MNN9* ó *CCW12* (Lagorce *et al.*, 2003; Ragni *et al.*, 2011). De la misma forma, se han establecido los perfiles transcripcionales generados en respuesta a diferentes tipos de daños sobre la pared celular como caspofungina, el Blanco de Calcofluor, Rojo Congo o zimoliasa (Reinoso-Martin *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2003); (Boorsma *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004; Rodriguez-Peña *et al.*, 2005; Garcia *et al.*, 2009;

Bermejo *et al.*, 2010).

Con objeto de establecer el grado de especificidad de la respuesta transcripcional frente a diferentes tipos de daños sobre la pared en nuestro laboratorio se ha realizado un estudio comparativo de la respuesta frente a Rojo Congo, zimoliasa y caspofungina (Arroyo *et al.*, 2009 y datos no publicados). Los resultados obtenidos revelan que los principales grupos funcionales de genes inducidos en respuesta a estos compuestos son aquellos implicados en la biogénesis de la pared celular, metabolismo y generación de energía, señalización y genes de función desconocida. La comparación de los diferentes perfiles transcripcionales muestra no sólo la existencia de un perfil transcripcional específico para cada tipo de daño, sino la presencia de un grupo común de 72 genes inducidos en todas estas situaciones de estrés. Es importante destacar que el 15% de esta respuesta incluye genes implicados directamente en el remodelamiento de la pared celular (*SED1*, *CWP1*, *GFA1*, *YLR194C*, *PST1*, *PIR3*, *CRH1*) y el 17% corresponde a genes relacionados con rutas de transducción de señales como *SLT2*, *RLM1* y *MLP1*, siendo destacable el caso del gen *MLP1*, cuya expresión aparece significativamente incrementada en todas las condiciones analizadas.

Se han descrito diferencias en cuanto a la regulación de la respuesta transcripcional a cada tipo de daño. Así, a diferencia de la respuesta a Rojo Congo, la cual depende casi completamente de la MAPK Slt2 y del factor de transcripción Rlm1 (García *et al.*, 2004), la adaptación al daño inducido por zimoliasa requiere la participación tanto de la ruta CWI como de la ruta HOG (Bermejo *et al.*, 2008; García *et al.*, 2009). Así, la zimoliasa activa ambas MAPKs : Hog1 y Slt2, siendo la activación de Slt2 en estas condiciones dependiente de los elementos de la rama Sho1 de la ruta HOG y además de la presencia de componentes esenciales de la ruta de integridad como Mkk1/Mkk2, Bck1, Pkc1 y Rho1, pero no de los sensores ni de las GEFs de dicha ruta (Bermejo *et al.*, 2008; Bermejo, 2008; García *et al.*, 2009). Según estos resultados, se ha propuesto que el daño causado sobre la pared celular por la zimoliasa se señala a través del sensor Hkr1 de la rama Sho1 de la ruta HOG (Rodríguez-Peña *et al.*, 2010; Bermejo *et al.*, 2008) dando lugar a una activación secuencial de ambas rutas (HOG-CWI), aunque como tiene lugar dicha conexión desde un punto de vista molecular todavía es desconocido. Desde un punto de vista de la respuesta transcripcional global frente a zimoliasa, esta incluye dos grupos de genes regulados de forma diferente. Un grupo consiste básicamente en genes Hog1, Slt2 y Rlm1 dependientes, inducidos en otras condiciones de estrés sobre la pared celular, y un segundo grupo de genes cuya expresión depende de Hog1 y en un alto porcentaje de los factores de transcripción

Msn2/Msn4 (Garcia *et al.*, 2009), pero no de Slt2 ni de Rlm1 siendo la mayoría de estos últimos también inducidos en condiciones de estrés hiperosmótico.

Finalmente, el agente inhibidor de la actividad β -1,3-glucan sintasa, caspofungina, da lugar a una activación de Slt2 dependiente del sensor Wsc1 (Agarwal *et al.*, 2003; Bermejo *et al.*, 2010), incluyendo en la correspondiente respuesta transcripcional un grupo de genes Slt2 dependiente y otro independiente (datos no publicados de nuestro laboratorio).

Todos estos datos apoyan la idea de que la activación de la ruta CWI por diferentes tipos de daño parece estar regulada por diferentes sensores (Bermejo *et al.*, 2010) y no sólo sucede de forma lineal sino también como consecuencia de diferentes estímulos que pueden actuar sobre la ruta CWI a diferentes niveles (Bermejo *et al.*, 2008; Harrison *et al.*, 2004). De ahí, la importancia de la caracterización de los perfiles transcripcionales frente a los distintos compuestos en mutantes de las distintas rutas de señalización para determinar el impacto de la conexión entre éstas en la regulación de la respuesta transcripcional bajo condiciones específicas de estrés.

6. Otras rutas de señalización implicadas en la regulación de la respuesta a estrés sobre la pared celular

La ruta de integridad celular se ha descrito como la principal responsable en la regulación de la biogénesis de la pared celular; sin embargo, cada vez se hace más evidente la colaboración de diferentes rutas de señalización en el mantenimiento de la homeostasis de la pared celular de la levadura en diferentes circunstancias. De hecho, en las regiones promotoras de genes implicados en el mecanismo compensatorio, además de los sitios de regulación del factor de transcripción Rlm1 (y por tanto bajo el control de Slt2), también se ha observado la presencia de grupos de genes potencialmente regulados por el factor de transcripción Crz1 de la ruta de la Calcineurina y el factor de transcripción Msn2/4 de la ruta HOG (Lagorce *et al.*, 2003; Boorsma *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2004). Esta hipótesis se apoya en diferentes estudios como los que han descrito que, i) mutaciones en componentes de la ruta HOG1 muestran resistencia al Blanco de Calcofluor (Garcia-Rodriguez *et al.*, 2000) lo que sugiere alteraciones en la pared ii) el crecimiento de la levadura a pH ácido conduce a la adquisición de resistencia a zimoliasa dependiente de Hog1 (Kapteyn *et al.*, 2001), iii) la posible conexión de la ruta HOG y Rho1 sobre la proteína reguladora Skn7 (Levin, 2005; Rodriguez-Peña *et al.*, 2010), iv) el hecho de que la respuesta transcripcional frente al tratamiento con zimoliasa, comentada en el apartado anterior, depende tanto de la ruta de integridad como de la ruta HOG (Garcia *et al.*, 2009), v) la inhibición de la rutas TOR

y RAS por Rho1 a través del sensor Mtl1 de la ruta CWI en respuesta a estrés oxidativo y ausencia de glucosa en el medio de cultivo (Petkova *et al.*, 2010) y vi) el hecho de que Wsc1 y Wsc2 sean supresores multicopia del fenotipo de sensibilidad a choque térmico de un mutante *ira1Δ*, donde la producción de AMPc se encuentra incrementada debido a la hiperactivación de RAS, sugiere una posible conexión entre la MAPK Slt2 y las rutas AMPc-PKA (Verna *et al.*, 1997).

Los estudios realizados hasta el momento muestran la complejidad de la respuesta transcripcional ante diferentes situaciones que causan daño en la pared celular siendo necesaria la implicación de distintas rutas de señalización para preservar la integridad y funcionalidad de esta estructura.

2. ANTECEDENTES

Estudios recientes han puesto de manifiesto la existencia de grupos de genes cuyos perfiles de expresión se modifican en respuesta a situaciones de estrés sobre la pared, siendo esta activación principalmente dependiente de la MAPK Slt2. Nuestro grupo, ha realizado en los últimos años diversas aportaciones en este campo, caracterizando, a escala genómica, las diferentes respuestas transcripcionales a diferentes tipos de daño o alteración, ya sean transitorios o constitutivos (Arroyo *et al.*, 2009). Además, se ha caracterizado el papel de la ruta de integridad en la regulación de estas respuestas, así como la posible participación de otras rutas de transducción de señales de la levadura en la homeostasis de esta estructura esencial (Rodríguez-Peña *et al.*, 2005; Rodríguez- Burgos *et al.*, 2006; Bermejo *et al.*, 2008; Garcia *et al.*, 2009; Bermejo *et al.*, 2010; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010). Teniendo en cuenta que estas respuestas de adaptación se producen también cuando la célula crece en presencia de antifúngicos que interfieren con la estructura de pared celular, estandarizar bien como se desarrollan estas respuestas y cómo se regulan resulta esencial para el desarrollo de nuevos antifúngicos que interfieren con la integridad celular.

Previamente a la realización del trabajo presentado en esta memoria, en nuestro laboratorio se procedió a la construcción de un *reporter* transcripcional que sirviese de testigo de la activación de la ruta de integridad (Rodríguez-Peña *et al.*, 2008). El gen utilizado en el sistema descrito fue *MLP1*, y fue seleccionado para este propósito tras el análisis de los datos publicados en las diferentes bases de datos, incluidos los aportados por nuestro propio grupo, en relación a los genes cuya transcripción se induce como respuesta a diferentes tipos de daños sobre la pared celular. Este gen presenta niveles de expresión muy bajos en condiciones basales de crecimiento; sin embargo, resulta ser uno de los que presentan mayor grado de inducción en respuesta a la mayoría de estímulos analizados hasta el momento. De esta forma, se garantiza la posibilidad de utilizar los niveles de expresión de este gen como marcador seguro de la presencia de una pared fúngica alterada, mediante la construcción de fusiones transcripcionales a un gen reportero. El plásmido que contiene el sistema reportero se ha denominado pJS05 y presenta el ORF del gen *NAT1*, codificante de resistencia al antibiótico aminoglucósido nourseotricina, bajo el control de la región promotora del gen *MLP1*, además de incluir un marcador de selección *HIS3* que permite seleccionar, cuando sea requerido, cepas con la construcción descrita integrada por recombinación homóloga en el locus genómico de *MLP1* en *S. cerevisiae*. De hecho, tanto el plásmido pJS05 como la cepa que lleva integrado el sistema reportero en su genoma (AT-1) han sido patentados como herramienta de utilidad para la identificación

de genes asociados a la construcción de la pared o de sustancias con actividad frente a esta estructura.

En este contexto, la disponibilidad en nuestro laboratorio de la colección completa de mutantes de *S. cerevisiae* delecionados individualmente en cada uno de los genes no esenciales de este organismo, ha sido el complemento ideal para poder desarrollar la primera parte del trabajo que se presenta en esta memoria, utilizando el plásmido pJS05 como herramienta para la identificación de genes relacionados con la integridad de la pared celular, así como de los mecanismos de regulación implicados.

3. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este trabajo ha consistido en la identificación y caracterización de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en el mantenimiento de la integridad celular. Este objetivo general se ha desarrollado a través de los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de un rastreo genómico diseñado para identificar genes de *S. cerevisiae* con activación transcripcional constitutiva del gen reportero *MLP1*, utilizando como herramienta la colección completa de cepas mutantes delecionadas en cada uno de los ORF no esenciales identificados en esta levadura.
2. Caracterización del mecanismo compensatorio en los mutantes identificados mediante: a) determinación de los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2, b) análisis de la expresión génica de genes regulados por la ruta CWI, c) estudios fenotípicos y d) determinación del contenido en quitina.
3. Caracterización funcional del gen *YPL158C*, seleccionado en el rastreo genómico, que codifica una proteína de función desconocida

4. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo

En este trabajo se utilizó la colección completa de cepas mutantes de *S. cerevisiae* en el fondo genético BY4741 (*MATa*; *his3Δ1*; *leu2Δ0*; *met15Δ0*; *ura3Δ0*) delecionadas individualmente en cada uno de los ORFs (*Open Reading Frames*) no esenciales identificados en este organismo (4840) con la *cassette* KanMX4 codificante de resistencia al antibiótico genético. La colección de mutantes está distribuida en 75 placas multipocillo y ha sido proporcionada por Euroscarf (Alemania).

En la Tabla 1 se muestran otras cepas utilizadas en este trabajo, así como su genotipo y procedencia. Además, se han incluido las cepas mutantes procedentes de Euroscarf empleadas para construir los dobles mutantes generados en este trabajo. Dichos dobles mutantes se obtuvieron directamente, mediante recombinación homóloga reemplazando en los mutantes sencillos los genes de interés por fragmentos de DNA obtenidos por PCR que contenían la *cassette* de *HIS3* o en algún caso de *KanMX4* flanqueada por 40 pb homólogas (técnica *Short Flanking Homology*, SFH) a la región inmediatamente anterior y posterior del ORF del gen que se desease deleccionar (Wach *et al.*, 1997). Alternativamente, cepas mutantes de tipo sexual opuesto se cruzaron para obtener diploides. Una vez inducida la esporulación (ver apartado 2.1), se procedió a la rotura de las ascas y al aislamiento de las esporas mediante micromanipulación (Micromanipulador de Singer Instruments). La placa conteniendo las esporas separadas se incubó a 30°C durante tres días con el fin de inducir el proceso de germinación. Una vez que las esporas dieron lugar a colonias, se caracterizó su genotipo mediante réplicas a los distintos medios selectivos para seleccionar aquellas cepas que reunían las deleciones de interés en cada caso. Finalmente, las deleciones génicas fueron verificadas por PCR.

1.2. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo

En las técnicas básicas de Biología Molecular se utilizó la cepa *E. coli* DH5α (*supE44 ΔlacU169(Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1*) (Hanahan, 1983).

Cepa	Genotipo	Procedencia
BY4741	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4742	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i>	Euroscarf
Y00385	Isogénica BY4741; <i>pmt2::KanMX4</i>	Euroscarf
Y00897	Isogénica BY4741; <i>gas1::KanMX4</i>	Euroscarf
Y00993	Isogénica BY4741; <i>slt2::KanMX4</i>	Euroscarf
Y01079	Isogénica BY4741; <i>lea1::KanMX4</i>	Euroscarf
Y01146	Isogénica BY4741; <i>cla4::KanMX4</i>	Euroscarf
Y01784	Isogénica BY4741; <i>wsc1::KanMX4</i>	Euroscarf
Y03160	Isogénica BY4741; <i>chs3::KanMX4</i>	Euroscarf
Y03482	Isogénica BY4741; <i>cdc10::KanMX4</i>	Euroscarf
Y03652	Isogénica BY4741; <i>ssd1::KanMX4</i>	Euroscarf
Y04080	Isogénica BY4741; <i>swi5::KanMX4</i>	Euroscarf
Y05241	Isogénica BY4741; <i>mid2::KanMX4</i>	Euroscarf
Y05251	Isogénica BY4741; <i>fsk1::KanMX4</i>	Euroscarf
Y05280	Isogénica BY4741; <i>rom2::KanMX4</i>	Euroscarf
Y05574	Isogénica BY4741; <i>kre6::KanMX4</i>	Euroscarf
Y05934	Isogénica BY4741; <i>bgl2::KanMX4</i>	Euroscarf
Y06094	Isogénica BY4741; <i>eng1::KanMX4</i>	Euroscarf
Y06956	Isogénica BY4741; <i>gat2::KanMX4</i>	Euroscarf
Y07394	Isogénica BY4741; <i>ypl158c::KanMX4</i>	Euroscarf
GRA007	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; crh2::HIS3; crh1::hpMX4</i>	Cabib <i>et al.</i> , 2007
YSJ100	Isogénica BY4742, <i>rlm1::HIS3</i>	Nuestro laboratorio
YSJ101	Isogénica BY4742, <i>slt2::HIS3</i>	Nuestro laboratorio
YPA001	Isogénica BY4742, <i>bck1::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA002	Isogénica BY4742, <i>ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA003	Y03652; <i>rlm1::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA004	<i>MATa; his3Δ1, leu2Δ0; ura3Δ0; pmt2::KanMX4; rlm1::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA005	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; pmt2::KanMX4; slt2::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA006	<i>MATa; his3Δ1, leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0; ssd1::KanMX4; slt2::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA007	Y06956; <i>rom2::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA008	Y06956; <i>bck1::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA009	Y01784; <i>gat2::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA010	Y05241; <i>gat2::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA011	Y01079; <i>rom2::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA012	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0; lea1::KanMX4; bck1::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA013	Isogénica Y01784; <i>lea1::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA014	Isogénica Y05241; <i>lea1::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA015	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0; met15Δ0; rom2::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA016	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0; mid2::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA017	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; wsc1::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA018	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0; slt2::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA019	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0; met15Δ0; cla4::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA020	GRA007; <i>ypl158c::KanMX4</i>	Este trabajo (SFH)
YPA021	Y05574; <i>ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA022	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; gas1::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA023	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; fks1::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA024	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ0; met15Δ0; bgl2::KanMX4; ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (DT)
YPA025	Y03160; <i>ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA026	Y03482; <i>ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA027	Y06094; <i>ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)
YPA028	Y04080; <i>ypl158c::HIS3</i>	Este trabajo (SFH)

Tabla 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. En la columna de procedencia se hace referencia al método utilizado para obtener las cepas mutantes: disección de ascas a partir de la esporulación de cepas diploides heterocigóticas (DA) o integración mediante recombinación homóloga de la *cassette HIS3* o *KanMX4* en el lugar del gen que se desea delecionar (SFH) en la correspondiente cepa haploide.

2. Medios de cultivo

Para la preparación de todos los medios de cultivo se utilizó agua desionizada purificada mediante el sistema Millipore. La esterilización de dichos medios se realizó por autoclavado a una temperatura de 121°C y 1 atm de presión. Para la obtención de medios sólidos, se añadieron 20 g/l de agar a su composición antes de ser esterilizados.

2.1. Medios y condiciones de cultivo de *S. cerevisiae*

Las células de levadura se crecieron habitualmente en medio rico YPD (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, glucosa 20 g/l). En ocasiones, se utilizó medio sintético completo SC (1,7 g/l de base nitrogenada para levaduras, 5 g/l de sulfato amónico, 20 g/l de glucosa) suplementado con una mezcla comercial de aminoácidos (Formedium). Cuando fue necesario llevar a cabo la selección de un marcador auxotrófico, se utilizaron medios sintéticos selectivos (SC-aa), de igual composición que el medio SC pero suplementados con una mezcla comercial de aminoácidos que carece del aminoácido o los aminoácidos necesarios, dependiendo de las auxotrofías de las cepas. Los productos para la fabricación de los medios fueron suministrados por Panreac, Duchefa, Pronadisa, Sigma y Merck. Cuando fue necesaria la selección de cepas que portasen el marcador de *KanMX4*, el medio rico YPD fue suplementado con 200 mg/l de geneticina (Gibco).

Las cepas transformadas con plásmidos con promotor *GAL1* fueron incubadas en medio SC pero con rafinosa (1,5 g/l) en lugar de glucosa a 24°C durante una noche. Al día siguiente, las células se pasaron a medio YPG (extracto de levadura 10 g/l, peptona 20 g/l, galactosa 20 g/l) dejando el cultivo a una $D.O_{600}=0,2$ y se incubaron durante 6 h, tras las cuales fueron recogidas por centrifugación a 4°C. La presencia de galactosa en el medio de cultivo induce la expresión de genes situados bajo el control del promotor *GAL1*.

Para inducir la esporulación de cepas diploides, éstas se crecieron en medio líquido YPD durante 24 horas, transfiriéndose posteriormente a medio de preesporulación YEPA (extracto de levadura 0,5%, base nitrogenada 0,6%; peptona 0,5%, acetato potásico 1%; biftalato potásico 1,02%, pH 5,5) ajustándose la $D.O_{600}$ a 0,1. Las células fueron crecidas en medio YEPA durante al menos tres generaciones y se recogieron por centrifugación cuando su $D.O_{600}=1,3$, se lavaron dos veces con medio de esporulación (acetato potásico 1%) y se resuspendieron en este medio a una $D.O_{600}=1$. Después de 48 h a 30°C de incubación, se observó la formación de ascas mediante microscopía de contraste de fases.

2.2. Medios de cultivo para *E.coli*

Para el crecimiento de *E. coli* se utilizó el medio LB (Luria-Bertani) cuya composición es la siguiente: 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5-10 g/l de cloruro sódico. Este medio fue suplementado con ampicilina (*Britapen*, G.S.K.) a una concentración de 10 µg/ml cuando fue necesario.

3. Manipulación de microorganismos

3.1. Condiciones generales de crecimiento

Las condiciones de incubación de los microorganismos fueron las siguientes:

- *S. cerevisiae*: Se utilizaron temperaturas de 24 y 30°C según el experimento, y velocidades de agitación entre 180-220 r.p.m., para incubaciones en medios líquidos según necesidades.
- *E. coli*: Temperatura de 37°C y 200-220 r.p.m., para incubaciones en medio líquido.

3.2. Determinación del crecimiento

Turbidimetría. La determinación del crecimiento de los cultivos de *S. cerevisiae* se realizó mediante lectura de la densidad óptica (D.O) a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU640. Para *E. coli* se realizó la lectura a 550 nm. Antes de proceder a su lectura las muestras se diluyeron convenientemente para que su absorbancia se encontrase en un intervalo de valores tal que existiese linealidad entre la lectura de la densidad óptica y el número de células del cultivo.

4. Manipulación de microorganismos

4.1. Extracción y visualización de DNA

Para la extracción y purificación de DNA plasmídico se utilizaron sistemas comerciales de la casa Roche (High Pure Plasmid Insolation Kit) para la extracción a escala pequeña y de GENOMED (JETstar Plasmid Purification MIDI Kit) para la extracción a escala media. El proceso de restricción de DNA, así como la preparación de geles de agarosa en tampón TAE (0,04 Tris Acetato, 0,001M EDTA) y su posterior visualización en un transluminador de luz U.V., se realizó siguiendo los protocolos convencionales de laboratorio (Ausubel *et al.*, 1993;

Sambrook *et al.*, 1989). Las enzimas de restricción empleadas, la DNA ligasa y la fosfatasa alcalina, se han adquirido de Roche diagnostics. Para la elución del DNA en los geles de agarosa se utilizó el kit comercial *Gene Clean Turbo Kit* (MP Biomedicals).

Para determinar la cantidad de DNA presente en las muestras se midió la absorbancia a 260 nm de una dilución 1:200 de las mismas en un espectro fotómetro Beckman DV 640 (1 unidad de de densidad óptica corresponde aproximadamente a 50 µg/ml de DNA).

Cuando fue necesario, la secuenciación de DNA se realizó en la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid /UCM (campus Moncloa).

4.3. Plásmidos utilizados en este trabajo

Nombre	Características relevantes	Procedencia
pJS05	Vector centromérico pRS416 (<i>URA3</i>) que contiene la fusión transcripcional de <i>MLP1p-NAT1</i>	Rodríguez-Peña <i>et al.</i> , 2008
YEp352	Vector episómico, <i>URA3</i> , <i>Amp^r</i> , <i>lacZ</i>	Hill <i>et al.</i> , 1986
<i>MLP1-LacZ</i>	YEp352 incluyendo la fusión transcripcional de la región promotora de <i>MLP1</i> (-1000, -1) al gen <i>LACZ</i>	García <i>et al.</i> , 2009
<i>SED1-LacZ</i>	YEp352 incluyendo la fusión transcripcional de la región promotora de <i>SED1</i> (-999,-1) al gen <i>LACZ</i>	García <i>et al.</i> , 2009
<i>CWP1-LacZ</i>	YEp352 incluyendo la fusión transcripcional de la región promotora de <i>CWP1</i> (-978, -5) al gen <i>LACZ</i>	García <i>et al.</i> , 2009
pLA-10	pGFP-C-FUS que contiene la fusión <i>CDC10-GFP</i>	Cid <i>et al.</i> , 1998
pRS315	Vector centromérico, <i>LEU2</i> , <i>Amp^r</i>	Sikorski y Hieter, 1989
p2188	pRS315[<i>MPK1-3xHA</i>]	Levin <i>et al.</i> , 2008
p2190	pRS315[<i>mpk1 (T190A Y192F)-3xHA</i>]	Levin <i>et al.</i> , 2008
p2193	pRS315[<i>mpk1 (K54R)-3xHA</i>]	Levin <i>et al.</i> , 2008
YEpWJR064	pYeDP1/10 (<i>URA3</i>) incluyendo la fusión transcripcional del promotor <i>GAL1/10</i> al gen <i>CTS1</i>	Racki <i>et al.</i> , 2000
BG1805-SAC7	Vector BG1805 (<i>URA3</i>) que contiene el gen <i>SAC7</i> bajo el control del promotor <i>GAL1</i>	Open Biosystems
pCM190	Vector episómico, expresión regulable por doxiciclina desde promotor <i>tetO</i> , <i>URA3</i> , <i>Amp^r</i>	Gari <i>et al.</i> , 1997
pRS305-mCHERRY	Vector integrativo pRS305 (<i>LEU2</i>) que contiene el ORF de mCHERRY	V. Jimenez Cid
pRS305-YPL158C-mCHERRY	pRS305-mCHERRY incluyendo el extremo 3' del ORF del gen <i>YPL158C</i> (posición +1265 hasta +2274) fusionado a mCHERRY	Este trabajo (ver texto)
YEp352-YPL158C-mCHERRY	YEp352 que contiene el promotor y ORF del gen <i>YPL158C</i> fusionado al ORF de mCHERRY	Este trabajo (ver texto)
<i>TETp-YPL158C-mCHERRY</i>	YEp352-YPL158C-mCHERRY que contiene el promotor <i>tetO</i> sustituyendo a la región promotora nativa del gen	Este trabajo (ver texto)

Tabla 2. Relación de plásmidos utilizados y generados en este trabajo.

A continuación, se describen en detalle los plásmidos generados en este trabajo:

Plásmido pRS305-YPL158C-mCHERRY. Se amplificó mediante PCR el fragmento correspondiente a las posiciones 1265-2274 del ORF del *YPL158C* a partir de DNA genómico

de levadura, incorporándose los puntos de corte *HindIII/BamHI* en cada extremo, respectivamente. A continuación se clonó el producto de PCR *HindIII/BamHI* de 1 Kb en el plásmido pRS305-mCHERRY digerido con las mismas enzimas. Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR fueron: YPL158C_HIIIBI e YPL158C_BIHIII (Tabla 3). El plásmido se linearizó utilizando el punto único de corte para la enzima *SpeI* presente en la secuencia del *YPL158C*, previamente a su transformación en cepas de levadura con el objeto de su integración en el locus genómico del *YPL158C*.

Plásmido YEp352-YPL158C-mCHERRY. Se obtuvo el fragmento *HindIII/XbaI* de 1,8 Kb incluyendo el fragmento 3' del gen *YPL158C* fusionado al ORF de mCHERRY procedente del plásmido pRS305-YPL158C-mCHERRY y se ligó al vector YEp352 digerido con las mismas enzimas. A continuación, mediante subclonaciones solapantes sucesivas se introdujo el resto del ORF y de la región promotora del gen *YPL158C*. Así, se insertó a continuación el fragmento correspondiente a las posiciones 129-1539 del gen *YPL158C* previamente obtenido por PCR a partir de DNA genómico y al que se había añadido un punto de corte *HindIII* en el extremo 5', de tal manera que en la clonación se utilizó el sitio *HindIII* y un sitio de corte interno *SpeI* (posición +1534). Finalmente, se insertó en el plásmido resultante del paso anterior a el fragmento incluyendo desde -1000 a 180 obtenido por PCR y al que se le había añadido también un punto de corte *HindIII* en el extremo 5', y de nuevo utilizando adicionalmente en la clonación un punto de corte *NruI* situado en la (posición +168) . Las parejas de oligonucleótidos utilizados para amplificar estos dos últimos fragmentos fueron, respectivamente, YPL158C_HIIISI/YPL158C_SIHIII e YPL158C_HIIINI/ YPL158C_NIHIII (Tabla 3).

Plásmido TETp-YPL158C-mCHERRY. Se digirió el plásmido pCM190 con las enzimas de restricción *EcoRI/PstI*, extrayéndose el promotor *tetO*(2,6 Kb) que se clonó en el plásmido YEP352 (*EcoRI/PstI*). A continuación, se introdujo en este plásmido la fusión *YPL158C-mCHERRY* (3 Kb), excluyendo la región promotora del gen, obtenida mediante PCR utilizando como molde el plásmido YEp352-YPL158C-mCHERRY y una pareja de oligos incluyendo los puntos de corte para las enzimas *NsiI/NotI* (Tabla 3). Dicho producto se clonó en el plásmido anteriormente obtenido digerido con las enzimas (*PstI/NotI*).

4.4. Oligonucleótidos

Oligonucleótidos	Secuencia (5'→3')
YPL158C_HIIIBI	CCCAAGCTTTATTAGAAGGGCTGCATCCATC
YPL158C_BIHIII	CGGGATCCAATTTTCATACCGACAGGAAGAG
YPL158C_NIHIII	GTCTTCATCGCGAGAACTCC
YPL158C_HIIINI	CCCAAGCTTTTGGAAAGTTTCTGCTTAGAGAC
YPL158C_SIHIII	GACTAGTATCAATTACATATTCGTC
YPL158C_HIIISI	CCCAAGCTTCTTTTAAATGATGTGTTTGCAGC
ypl-not1	TAGCGGCCGCATGATCATCAGAGCTCCAA
ypl-nsi1	CCATGCATTTACTTGTACAGCTCGTCCATG

Tabla 3. Relación de oligonucleótidos utilizados.

4.5. Transformación bacteriana

La transformación de *E. coli* se realizó según el método de (Hanahan, 1983). Para ello, se descongelaron 100 µl de células competentes de *E. coli* (cepa DH5α) a las que se añadió 5-10 µl de cada ligación ó 1-2 µl de DNA plasmídico incluyendo la cantidad apropiada de DNA. Se incubaron 30 minutos en hielo, agitándose de vez en cuando, seguido de un choque térmico a 42°C de 2 minutos. Tras dejar las células un minuto en hielo, se añadieron 4 volúmenes de medio LB líquido y se incubaron durante una hora a 37°C. Dicha suspensión se plaqueó en medio sólido LB suplementado con ampicilina, incubando las placas durante 24 h a 37°C.

4.6. Transformación en levadura

Para llevar a cabo la transformación de plásmidos en *S. cerevisiae* se utilizó el método del acetato de litio (Ito, 1983) que se resume a continuación. Se partió de 10 ml de cultivo en fase exponencial en medio YPD. Se recogieron las células en esterilidad por centrifugación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron en 100 µl de una mezcla 1:5 de acetato de litio 1N y polietilenglicol 40%. A continuación se añadió a la mezcla 50 µg de ssDNA (esperma de salmón hervido previamente) y 0,1-0,5 µg de DNA a transformar en el menor volumen posible. La mezcla se incubó 15 min a temperatura ambiente y posteriormente se sometió a choque térmico de 42°C durante 15 min. Finalmente se plaquearon las células en medio selectivo y se incubaron a 30°C durante 48-72 h.

4.6.1. Transformación en placa multipocillo

Existen en la actualidad, diversos protocolos para el crecimiento, transformación y

selección de *S. cerevisiae* en escala de placa multipocillo, que ha sido necesario adecuar y optimizar a nuestro diseño experimental basado en la transformación plasmídica de la colección completa de mutantes de *S. cerevisiae*, disponible en formato de placas multipocillo. De forma general, se utilizó un protocolo de transformación adaptado a trabajar a escala de microvolúmenes (descrito por Gietz, 2002) y por tanto, utilizando placas de microtitulación de 96 pocillos (TPP, Suiza).

Se sembró en una placa multipocillo con 200 μ l de medio de cultivo YPD por pocillo cada una de las placas de glicerizados de la colección de Euroscarf con un replicador de 96 pins (V & P scientific modelo VP 407).

Se dejó incubando la placa multipocillo entre 72-96 h a 28°C a 80 r.p.m.

Una vez crecidas las células, se procedió a centrifugar la placa a 2000 r.p.m. a temperatura ambiente durante 3 min en una centrífuga de placas (Eppendorf, modelo 5810R). Se quitó el sobrenadante con la bomba de vacío y se añadió 150 μ l de la mezcla de transformación: 15 μ l de acetato de litio 1M (concentración final de 0,1M), 100 μ l de polietilenglicol 50% (concentración final 33,33%), 4 μ l de esperma de salmón (10 mg/ml, Invitrogen) utilizado como *carrier* (concentración final 0,27 mg/ml), 150 ng de DNA plasmídico. La mezcla se completó hasta un volumen de 150 μ l con agua estéril.

Tras añadir la mezcla, se resuspendió el sedimento celular y se incubaron las placas a 45°C durante 3 h. A continuación, se centrifugaron de nuevo a 2000 r.p.m. durante 3 minutos a temperatura ambiente y se eliminó de nuevo el sobrenadante.

Posteriormente, se resuspendieron las células de cada pocillo en 150 μ l de medio SC-Ura y de este volumen se transfirieron 20 μ l a otra placa multipocillo nueva con 100 μ l de medio SC-Ura. Esta placa se incubó a 30°C durante 72 h para permitir el crecimiento de los transformantes.

5. Método de rastreo genómico para la identificación de mutantes de *S. cerevisiae* con niveles de expresión del gen *MLP1* incrementados

Se realizó el rastreo de la colección completa de mutantes (75 placas) transformados con el plásmido pJS05 que contiene el gen de resistencia a nourseotricina bajo el control de la región promotora del gen *MLP1* (Tabla 2) como se ha descrito en el apartado 4.6.1.

5.1. Preparación de preinóculos

Se preparó por cada placa a ensayar una nueva donde se dispensaron 100 μ l de medio SC-Ura por pocillo. A continuación se inoculó con 5 μ l de la placa de transformación y se dejó incubando 24 h a 30°C.

5.2. Selección de mutantes que presentan sobreexpresión de *MLP1*

Tras el periodo de incubación correspondiente, a partir de las placas descritas en el punto 5.1. se preparó una dilución 1:50 del cultivo en medio YPD en un volumen final de 250 μ l, también en formato de placas multipocillo. En paralelo se prepararon placas multipocillo con 95 μ l por pocillo de YPD conteniendo 316 μ g/ml del antibiótico aminoglucósido nourseotricina (clon NAT, Wemer BioAgents, Alemania). A continuación, esta última placa se inoculó con 5 μ l de la suspensión celular indicada anteriormente, obteniendo de esta forma una concentración final de nourseotricina de 300 μ g/ml en el medio de cultivo que impide el crecimiento de la cepa silvestre transformada con el plásmido pJS05, pero selecciona aquellas cepas mutantes donde la expresión de MLP1 y por tanto la resistencia al antibiótico se encuentra incrementada. Posteriormente, se incubaron las placas durante 48-72 h a 28-30°C.

5.3. Cuantificación de los niveles de crecimiento

Como indicador de los niveles de crecimiento alcanzados por cada cepa mutante ensayada, se llevó a cabo la medición de la densidad óptica de cada pocillo en un lector de placas multipocillo (Model 680, Bio-Rad) a una longitud de onda de 550 nm.

6. Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) a nourseotricina

- a) Los mutantes seleccionados en el rastreo genómico se transformaron de forma individual mediante el método descrito en el apartado 4.6. con el plásmido pJS05. En cada ensayo de sensibilidad a nourseotricina descrito a continuación, se estudiaron dos transformantes individuales de cada cepa seleccionada con el fin de detectar posibles variaciones entre transformantes.
- b) Se sembraron los transformantes a ensayar en medio SC-Ura y se incubaron a 30°C durante 24 h.
- c) Se transfirieron los cultivos a medio YPD fresco ($D.O_{600} = 0,2$) y se incubaron durante

3 horas a 24°C con el fin de obtener células en fase exponencial de crecimiento.

- d) Se prepararon suspensiones celulares en agua estéril a una $D.O._{600} = 0,13$ (aproximadamente 10000 células/ml).
- e) En paralelo se prepararon placas multipocillo con diluciones seriadas 1:2 de nourseotricina en 95 μl de YPD desde 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ hasta 7,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ incluyendo un control sin antibiótico y un pocillo que sólo contenía YPD como control de posibles contaminaciones del medio de cultivo.
- f) Por cada cepa transformante ensayada se utilizó una fila de la placa multipocillo preparada como se ha descrito en el punto anterior, de tal forma que finalmente se añadieron 5 μl de las suspensiones celulares descritas en el apartado d correspondientes aproximadamente a un inóculo de 10000 células en cada pocillo, excepto en el correspondiente al control de esterilidad.
- g) Tras un periodo de incubación de aproximadamente 40 h a 28°C, se procedió a cuantificar el crecimiento a 550 nm en los diferentes pocillos utilizando de nuevo un lector de placas multipocillo. Los valores de crecimiento observados se compararon siempre con los de la cepa silvestre transformada con el plásmido pJS05 y presente en cada placa analizada.

7. Ensayos de sensibilidad

La sensibilidad o resistencia de cepas mutantes de *S. cerevisiae* a diferentes compuestos en el medio de cultivo se determinó mediante ensayos de sensibilidad en placa, utilizando la técnica de siembra en gota en medio sólido. Para ello, se partió de cultivos crecidos en medio YPD a 24°C durante toda la noche que se refrescaron al día siguiente en medio YPD hasta una $D.O._{600} = 0,2$, incubándose durante 4 h más a 24°C. A continuación, se diluyeron los cultivos hasta $D.O._{600} = 0,2$ ($\approx 1,5 \times 10^4$ células en 5 μl) en YPD y se realizaron 4 diluciones seriadas 1/5 en placas de 96 pocillos. Posteriormente, utilizando un replicador (V&P Scientific, San Diego, CA), se transfirieron aproximadamente 5 μl de cada dilución sobre una placa de Petri conteniendo el medio de cultivo apropiado incluyendo la droga o compuesto a ensayar: Rojo Congo 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Merck), cafeína 12mM (Sigma), SDS 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Duchefa Biochemie), Higromicina B 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Roche) y Caspofungina 40 ng/ml (Merck). Las placas así inoculadas se incubaron 2-3 días a 30°C.

8. Detección de proteínas por Western-Blot

8.1. Obtención de extractos proteicos y preparación de muestras

Las células de levadura se cultivaron durante 16-18 h en medio de cultivo YPD para utilizarse como preinóculo. A continuación, se preparó una suspensión celular a una densidad óptica a 600nm de 0,2-0,3 en medio de cultivo fresco y se dejó crecer durante 6 horas en un volumen de 30 ml. Posteriormente, 10 ml de células se recogieron en un tubo Falcon con igual volumen de hielo. Se centrifugaron a 2500 r.p.m. durante 5 minutos a 4°C. El sedimento celular libre de sobrenadante se congeló directamente con nitrógeno líquido.

Para romper las células se añadieron entre 200 y 300 μ l de tampón de lisis de proteínas (50 mM Tris HCl pH=7,5, 10% glicerol, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM NaF, 50 mM β -glicerol fosfato, 5 mM pirofosfato sódico y 1 mM de ortovanadato sódico) suplementado con inhibidores de proteasas (*Complete Mini, EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets*, de Roche) y PMSF 0,01 M. Después de resuspender las células en tampón de lisis, se pasaron a un eppendorf y se añadieron bolitas de vidrio de 1 mm de diámetro (Glasperlen ca. 1mm, Sartorius AG, Alemania) hasta el menisco del volumen total de la mezcla. Las células se sometieron a agitación en un rompedor de células Fast-Prep FP120 (Bio101/Savant) durante 30 segundos a intensidad 5,5, repitiendo esta operación dos veces. A continuación, se centrifugaron los tubos eppendorf a 13000 r.p.m. durante 15 min a 4°C y se recogieron los sobrenadantes en tubos limpios. Para determinar la cantidad de proteína presente en los extractos se midió la absorbancia a 280 nm de una dilución de los mismos en un espectrofotómetro Beckman DV 640 (1 unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 1 μ g/ml de proteína). Se prepararon soluciones de 30 μ g/ μ l de proteína de cada muestra, a los que se le añadió el volumen correspondiente de tampón de carga 5X SDS-PAGE (40 mM Tris HCl pH=6,8, 0,5% azul de bromofenol, 10% SDS, 33% glicerol, 20% β -mercaptoetanol). Por último, las muestras se hirvieron durante 3 min para su desnaturalización y se cargaron en el gel de poliacrilamida.

8.2. Electroforesis de proteínas

Para la separación de las proteínas de los extractos celulares se utilizó SDS-PAGE con geles de poliacrilamida a una concentración del 10%. La composición del gel separador al 10 % es: acrilamida 30 % (1,98 ml), bis-acrilamida 2% (0,8 ml), Tris-HCl 1 M pH=8,8 (2,25 ml), H₂O (0,87 ml), SDS 10% (60 μ l), PSA (Persulfato amónico) 10% (30 μ l) y TEMED (Tetrametiletilenediamina) (8 μ l). La composición del gel concentrador es: acrilamida 30%

(0,325 ml), bis-acrilamida 2% (0,135 ml), Tris-HCl 1 M pH=6,8 (0,25 ml), H₂O (1,25 ml), SDS 10% (20 µl), PSA 10% (20 µl) y TEMED (2 µl).

La electroforesis se realizó en cubetas Mini Protean III (Bio-Rad) a un voltaje entre 150-200 V. La composición del tampón de electroforesis 1X es de 196 mM glicina, 0,1% SDS, 50 mM Tris-HCl pH= 8,3, que se fabrica partiendo de una solución concentrada 10X. El patrón de pesos moleculares utilizado fue *Precision Plus Protein Standards* (Bio-Rad). En cada pocillo se cargaron aproximadamente 240 µg de proteína total.

8.3. Transferencia de proteínas a la membrana de nitrocelulosa

Las proteínas separadas durante la electroforesis se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 9 x 7 cm (Hybond, Amersham). Se utilizaron cubetas de transferencia en húmedo Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad). La transferencia se realizó a un voltaje constante de 100 V durante 60 min. Para fabricar el tampón de transferencia 1X se mezcló un volumen de tampón de transferencia concentrado 10X (58 g/l Tris-HCl, 29 g/l de glicina, 3,7 g/l de SDS) con dos volúmenes de metanol y siete volúmenes de agua destilada.

8.4. Inmunodetección

Tras la transferencia, la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con leche desnatada al 5% en TTBS (29,2 g/l de NaCl, 24,2 g/l de Tris pH 7,5 y 500 µl de Tween 20) entre 30 min y 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, las membranas se incubaron con el anticuerpo primario correspondiente a una concentración 1:2000 en presencia de leche al 5% en TTBS durante 90 min a temperatura ambiente u O/N a 4°C. A continuación, se llevaron a cabo al menos tres lavados con TTBS de 5-15 min cada uno y se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, conjugado con peroxidasa, a una concentración de 1:3000 en TTBS-leche 5% durante 45 min-1 h. Finalmente, se realizaron al menos tres lavados con TTBS.

Los anticuerpos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla 4.

Para el revelado de las membranas se utilizó el sistema de detección quimioluminiscente (ECL, Amersham-Biosciences) y películas Hyperfilm™ MP (Amersham-Biosciences). El revelado de las películas se realizó de forma manual.

Anticuerpo	Origen	Casa comercial
Anti-fosfo p42/p44 MAPK (Thr202/Tyr204)	Policlonal de conejo	Cell Signaling Technology
Anti-actina	Monoclonal (clon C4) de ratón	ICN Biomedicals
Anti-rabbit IgG-HRP	Policlonal de burro	Amersham Pharmacia Biotech
Anti-mouse IgG-HRP	Policlonal de oveja	Amersham Pharmacia Biotech

Tabla 4. Descripción de los anticuerpos utilizados.

8.5. Cuantificación de los niveles de activación de SlT2

Cuando fue necesario, la cuantificación de las bandas de proteínas se realizó mediante análisis densitométrico utilizando el programa Quantity One (Bio-Rad). Este procedimiento se aplicó para la cuantificación de las bandas de fosfo-Slt2 de los mutantes analizados y de la cepa silvestre BY4741, así como de la banda de actina de cada muestra, utilizada como control de carga. Con los valores obtenidos se aplicó la siguiente fórmula para el cálculo de las variaciones de los niveles de fosfo-Slt2 en los distintos mutantes respecto a los valores de la cepa silvestre, utilizando como normalizador de carga proteica la banda de actina cuantificada en la misma membrana.

$$\text{Activación relativa de SlT2} = \frac{\text{Valor de SlT2 (mutante)} / \text{Valor de SlT2 (cepa silvestre)}}{\text{Valor de actina (mutante)} / \text{Valor de actina (cepa silvestre)}}$$

9. Ensayos de actividad β -galactosidasa

Este tipo de determinación se utilizó para cuantificar los niveles de expresión de fusiones transcripcionales de diversas regiones promotoras de genes de interés, fusionadas al gen *lacZ*.

Las cepas en estudio se transformaron con el plásmido correspondiente, se incubaron en medio SC-Ura o SC-Ura-Leu a 24°C en agitación y al día siguiente los cultivos se refrescaron en YPD hasta $D.O._{600} = 0,2$ y se incubaron de nuevo 6 h a 24°C. A continuación, se recogieron las células presentes en un volumen de 5 ml de cultivo por centrifugación a temperatura ambiente. Posteriormente, las células se resuspendieron en 250 μ l de *Breaking buffer* (100 mM Tris-HCl pH=8, 1 mM DTT, 20% de glicerol) y 5 μ l de PMSF 0,1 M. Seguidamente, se añadieron bolitas de vidrio 1 mm de diámetro para romper las células en una máquina Fast-

Prep aplicando dos pulsos a una intensidad de 5,5 durante 30 s cada uno. Finalmente, los extractos fueron clarificados por centrifugación y la concentración de proteína se determinó mediante el método de Bradford.

El ensayo de actividad β -galactosidasa se realizó en formato de placa multipocillo tomando como base el método descrito por Amberg (2005). La mezcla de reacción se preparó en 90 μ l de tampón Z (16,1 g/l $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,5 g/l NaH_2PO_4 , 0,75 g/l KCl y 0,246 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) con β -mercaptoetanol (0,03%) a los que se añadieron 5-10 μ l de extracto proteico en *breaking buffer*. A continuación se añadieron 20 μ l de orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) (4 mg/ml en *buffer Z*) que al ser utilizado como sustrato por la enzima β -galactosidasa produce orto-nitrofenol, compuesto de color amarillo que se puede medir espectrofotométricamente. La placa así preparada se incubó un tiempo determinado (en general 10 min) a 30°C y se paró la reacción añadiendo a cada pocillo 50 μ l de Na_2CO_3 1M. La lectura se realizó en un lector de placas multipocillo a 415 nm. El resultado se expresó calculando la actividad específica β -galactosidasa, según se muestra a continuación:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{D.O.}_{415} \times 0,17}{0,0045 \times \text{proteína (mg/ml)} \times \text{volumen de extracto (ml)} \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

10. Técnicas de microscopía

Las células fueron incubadas durante toda la noche en medio YPD a 24°C. Al día siguiente los cultivos fueron refrescados en YPD hasta $\text{D.O.}_{600} = 0,2$ y se mantuvieron a 24°C durante 4-6 h. Posteriormente, se recogieron las células y se sometieron a diferentes tratamientos dependiendo de la técnica de microscopía utilizada.

10.1. Microscopía de contraste de fases y de fluorescencia

Las muestras de *S. cerevisiae* se observaron en un montaje húmedo, utilizando un microscopio invertido Eclipse TE2000U Nikon.

Para los estudios de localización de la proteína verde fluorescente (GFP) y la proteína fluorescente m-Cherry, se recogió un volumen de 1 ml de células en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación durante 3-5 min a 5000 r.p.m. y a 4°C. A continuación, se lavaron las células dos veces con PBS 1X y se procedió a su observación microscópica en un montaje húmedo utilizando el microscopio ya mencionado equipado con una lámpara

halógena y un cubo de filtros adecuados para microscopía de epifluorescencia. Para la observación de las proteínas GFP y m-cherry se utilizaron los filtros Nikon B-2E/C y Nikon G-2A, respectivamente.

Para la observación del patrón de localización y el contenido en quitina de cepas de *S. cerevisiae*, las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento y se lavaron con PBS 1X, del mismo modo a como se ha indicado en el párrafo anterior. Posteriormente, se tiñeron con el Blanco de Calcofluor (Fluorescent Brightener 28, Sigma-Aldrich) a una concentración final de 5 µg/ml durante 10 min en oscuridad, seguido del lavado de las células con PBS 1X. Las muestras se observaron en un montaje húmedo al microscopio utilizando un filtro Nikon UV-2A.

Para la observación de núcleos, las células se fijaron en etanol al 70% durante 15 minutos, se lavaron dos veces con PBS y se incubaron con el colorante fluorescente diclorhidrato de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) a una concentración final de 50 ng/ml durante 5 min. A continuación, las células se lavaron dos veces con PBS y se observaron en un montaje húmedo al microscopio utilizando el filtro Nikon UV-2A.

Las imágenes digitales fueron adquiridas a través de una cámara Hamamatsu Orca C4742-95-12ER acoplada al microscopio. El software empleado para la captación y procesamiento de las imágenes fue Aquacosmos Imaging Systems.

10.2. Microscopía confocal

Las muestras se prepararon del mismo modo que para la microscopía de fluorescencia y se visualizaron en un microscopio confocal modelo Leika SP2 analizándose diversas secciones de las muestras (0,3-0,5 µm).

10.3. Microscopía electrónica de transmisión

Se recogió un volumen de 1 ml de células crecidas hasta una concentración de 2×10^7 células/ml, se lavaron dos veces con PBS y se fijaron con 500 µl de una solución constituida por 0,05 M de cacodilato sódico, pH= 7,2, suplementada con p-formaldehído (2%) y glutaraldehído (1,5%) durante 24 h a 4°C. Las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS 1X y se trataron con 800 µl de permanganato potásico (1%) durante 90 min a 4°C y en agitación. Se centrifugaron, eliminándose el sobrenadante y el sedimento celular se pasó a otro tubo limpio para eliminar los restos de permanganato potásico. A continuación, las células se lavaron de nuevo tres veces con PBS. Posteriormente, se procedió a la

deshidratación de la muestra por la inmersión sucesiva y cada 10 minutos en soluciones de etanol de concentración creciente (30, 40, 50, 60, 70, 80, 90% y etanol absoluto), exceptuando la concentración de 70% de etanol en la que se deja la muestra toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente, se centrifugaron y se eliminó el etanol presente en el sobrenadante. A continuación, se realizó la inclusión en la resina EPON 850 ó EPON 812 (Electron Microscopy Sciences). Para ello, se añadió la resina al sedimento celular en cantidades crecientes, comenzando por 200 μ l de resina y 600 μ l de etanol. Tras 2 h de incubación a temperatura ambiente, se eliminaron 400 μ l de la parte superior del tubo y se añadieron 400 μ l de resina. De nuevo, tras 2 h de incubación, se eliminaron 600 μ l de la parte superior del tubo y se añadieron 600 μ l de resina, incubándose el tubo abierto durante toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se retiró la resina y se añadieron 600 μ l de resina nueva, incubándose posteriormente el tubo abierto a 70°C y en oscuridad durante 72 h. Para su observación microscópica se realizaron cortes en la resina, que se incluyeron en una rejilla (Electron Microscopy Sciences) y se contrastaron con una solución de acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo (REYNOLDS, 1963). Las muestras se observaron en un microscopio electrónico de transmisión modelo JEOL JEM-1010.

11. Elutriación

El proceso de elutriación consiste en la clasificación de tamaño de partículas presentes en una suspensión basado en sus diferentes velocidades de sedimentación. Esta técnica se ha utilizado para la separación de células de levadura en distinto estadio del ciclo celular debido a su distinto peso y tamaño (Amon, 2002), empleándose en este trabajo un elutriador Beckman Coulter TM Avanti J-26 XP Centrifuge.

Se partió de un cultivo en estado exponencial de crecimiento a una concentración aproximada de 10^7 células/ml ($D.O_{600} = 0,65$).

Tras la esterilización y calibrado del sistema, se procedió a introducir el cultivo en el elutriador ajustando la velocidad aproximadamente a 4000 r.p.m. y el flujo a 70 ml/min. En estas condiciones, la fuerza centrífuga es mayor que la fuerza del flujo que empuja las células hacia la salida, por lo que las células se sitúan al fondo de la cámara llenándola poco a poco a medida van entrando más células del cultivo. Cuanto más grandes sean las células (en fase G_2) serán más pesadas y por tanto se colocarán en el fondo de la cámara. Las células más pequeñas (en fase G_1) pesan menos y se colocan en la parte superior de la cámara, más cerca de la salida. Para empezar a recoger las células en fase G_1 , se procedió a disminuir la velocidad de centrifugación o a aumentar el flujo. Esta última opción permite

separaciones más finas evitando las turbulencias que pueden ocasionar en algunos casos los cambios de velocidad.

Las células se recogieron en frío comprobándose un enriquecimiento del cultivo de al menos un 95% de células en fase G₁ (sin yema). A continuación, un volumen de 100 ml de células se incubó a 26°C, tomándose muestras cada 30 min para su observación mediante microscopía de contraste de fases y análisis por citometría de flujo.

11. Citometría de flujo

Para la determinación del contenido en DNA de las células en los estudios de ciclo celular, las células recogidas por centrifugación durante 3-5 minutos a 5000 r.p.m. a 4°C, se lavaron dos veces con PBS 1X y se fijaron resuspendiéndolas en etanol 70% a 4°C durante 20 minutos. Se recogieron de nuevo por centrifugación a 5000 r.p.m. eliminándose los restos de etanol y se resuspendieron en 0,2 M Tris-HCl pH=7,5 conteniendo RNAsa 1 mg/ml (Sigma) incubándose a 37°C durante 3 h. Después del tratamiento con RNAsa se recogieron de nuevo las células fijadas por centrifugación a y se resuspendieron en PBS con ioduro de propidio a una concentración final de 4 µg/ml. El citómetro utilizado fue el modelo FacScan de Becton Dickinson. La fluorescencia se adquirió a través de un filtro 650 LP.

Para la determinación del contenido en quitina por citometría de flujo, las células teñidas con el Blanco de Calcofluor como se indicó previamente, fueron analizadas con un citómetro BD LSR (Becton Dickinson) adquiriéndose la fluorescencia mediante un filtro 380 LP.

Para el estudio de la viabilidad celular mediante citometría de flujo, se tiñeron las células con ioduro de propidio (0,05 mg/ml) y se analizaron con un citómetro BD LSR (Becton Dickinson) adquiriéndose la fluorescencia mediante un filtro 670 LP.

12. Soporte bioinformático

- **BIOBASE knowledge Library Proteome.** Proporciona información relacionada con la función molecular y el papel biológico de proteínas de *S. cerevisiae*, fenotipos de mutaciones en distintos genes e información sobre interacciones proteicas y genéticas (<https://portal.biobase-international.com/>).
- **Saccharomyces Genome Database (SGD).** Base de datos que proporciona

información sobre biología molecular y genética de *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>).

- **Quantity One (Bio-Rad).** Programa utilizado para cuantificar bandas de proteínas mediante densitometría.
- **GeneCodics.** Accesible en la página web: <http://genecodics.dacya.ucm.es/> (unidad de bioinformática, CNB, Madrid), es una herramienta que integra diferentes fuentes de información biológica para la búsqueda de las características biológicas (anotaciones) que aparecen simultáneamente en un conjunto de genes y clasificarlas por la significación estadística.
- **FunSpec.** Similar al anterior, es una herramienta que permite evaluar la significación estadística de grupos funcionales en una muestra de genes a analizar. Accesible en la página web: <http://funspec.med.utoronto.ca/>
- **STRING 9.0.** Base de datos que recoge las interacciones conocidas o previstas entre proteínas (<http://string-db.org>)

5. RESULTADOS

BLOQUE I: Desarrollo de un rastreo genómico para la identificación de genes relacionados con la homeostasis de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*

1. Rastreo genómico para la identificación de genes cuya delección activa la ruta de integridad celular en *S. cerevisiae*

La ruta CWI de *S. cerevisiae*, gobernada por la MAPK Slt2, se activa bajo condiciones que comprometen la integridad de la pared celular. La señalización a través de esta ruta puede ser monitorizada mediante sistemas reportero, como el utilizado en este trabajo y descrito en el apartado anterior, constituidos por promotores de genes cuya expresión es regulada por el principal factor de transcripción de la ruta CWI, Rlm1. Partiendo de esta premisa y con el propósito de la identificación de genes de *S. cerevisiae* cuya delección condujese a la activación transcripcional mediada por la activación de la MAPK Slt2, se diseñó un método de rastreo genómico que utilizó como herramienta básica la colección completa de cepas mutantes de *S. cerevisiae* delecionadas en cada uno de los ORF no esenciales identificados en esta levadura (aproximadamente 5000).

Se procedió a la transformación de la colección completa de mutantes con la construcción plasmídica pJS05 (*MLP1p-NAT1*), mediante un protocolo de transformación en placa multipocillo diseñado a partir de uno de los protocolos descritos para este tipo de técnica, introduciendo diversas modificaciones que afectaban entre otros factores al tiempo de incubación, número de células, cantidad de DNA, etc. (ver Materiales y Métodos). Posteriormente, se puso a punto el método de rastreo genómico, siendo un aspecto crítico la determinación de la concentración óptima del antibiótico nourseotricina a utilizar, que debería ser suficiente para inhibir el crecimiento sólo de los mutantes en los que no se encontrase activada la ruta de integridad celular de forma constitutiva. Como se puede deducir del protocolo de transformación utilizado para la realización del rastreo, para cada mutante se utilizó un *pool* de transformantes y no transformantes individuales. Esto es importante mencionarlo pues en algunos casos se ha podido comprobar que los valores de sensibilidad a nourseotricina se ven afectados dependiendo de si se utilizan en este tipo de ensayos transformantes individuales o en *pool*. Otro factor importante que requirió una puesta a punto específica fue la determinación de la cantidad de inóculo utilizado. Estandarizar de forma absoluta este punto para todos los mutantes ensayados fue difícil ya que son muchos los factores que pueden influir de forma significativa (eficiencia de transformación de cada mutante, capacidad/tasa de crecimiento en medio mínimo, número

de células presentes en el cultivo previo a la transformación, etc.). Con este objetivo, en las pruebas de puesta a punto del rastreo de sensibilidad a nourseotricina, se ensayaron inóculos procedentes de diferentes diluciones de la placa de transformación original.

Finalmente se observó que el procedimiento más reproducible consistía en inocular en 100 µl de medio de cultivo SC-U, 5 µl de una suspensión celular procedente a su vez de una dilución 1/5 de la placa original de transformación y, tras un periodo de incubación en estático de 20 horas a 28°C-30°C, desde esta placa se transfirieron de nuevo 5 µl de medio de cultivo a la placa multipocillo donde finalmente se procedió a realizar el ensayo de resistencia a nourseotricina. En pruebas piloto, utilizando cepas control entre las que se incluyeron tanto la cepa silvestre BY4741 como cepas mutantes en las que previamente se había descrito un aumento en la activación de la ruta CWI en condiciones basales de crecimiento (y por tanto de expresión de *MLP1*), como el mutante *gas1Δ* y mutantes no relacionados con la integridad, se ensayaron placas preparadas con 100 µl de medio YPD por pocillo y diferentes concentraciones de nourseotricina en un rango de 50 a 500 µg/ml. De esta forma, se pudo determinar que una concentración de nourseotricina de 300 µg/ml inhibía el crecimiento de la cepa silvestre (y de mutantes no relacionados con alteraciones de la pared celular), mientras que el mutante *gas1Δ* era capaz de crecer significativamente tras 48-72 horas de incubación en condiciones idénticas a las indicadas anteriormente. La cuantificación de los niveles de crecimiento para cada mutante se realizó utilizando un lector de ELISA, midiendo directamente la absorbancia de cada pocillo a 550 nm varias veces a lo largo del periodo de incubación. Un esquema del procedimiento experimental para la identificación de mutantes con niveles de expresión de *MLP1* incrementados se muestra en la Figura 7.

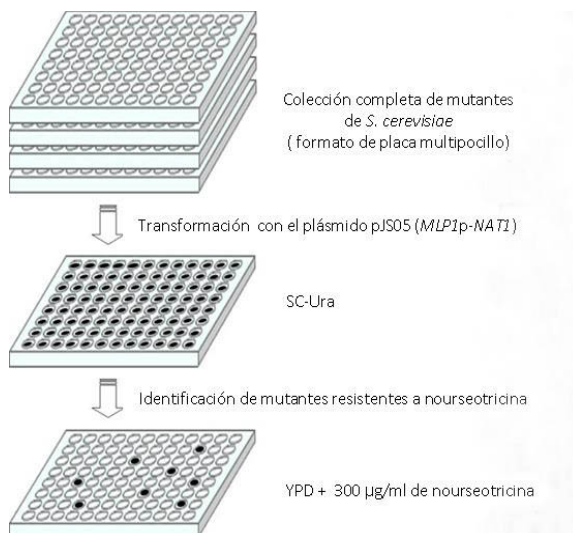


Figura 7. Procedimiento experimental para la identificación de mutantes con inducción de la expresión del gen *MLP1*.

Así, tras el ensayo de la colección completa de mutantes (4840), se seleccionaron 174 cepas capaces de crecer a concentraciones del antibiótico de 300 µg/ml.

2. Determinación de los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 en los mutantes resistentes a nourseotricina identificados en el rastreo genómico

En principio, sería esperable que los mutantes seleccionados en el rastreo genómico presentasen, en muchos casos, una activación basal de la ruta CWI y por tanto, que dicha mutación estuviera afectando directa o indirectamente a la integridad de la pared celular. De hecho, el incremento en la fosforilación de la MAPK Slt2 en mutantes que presentan defectos en la pared celular ha sido descrito previamente (de Nobel *et al.*, 2000; de Groot *et al.*, 2001).

Con el objetivo de determinar los niveles de fosforilación de Slt2 en los 174 mutantes hiperresistentes a nourseotricina seleccionados, se realizaron ensayos utilizando la técnica de Western-Blot con extractos proteicos totales obtenidos de dichos mutantes creciendo en fase exponencial en YPD a 24°C. Para determinar los niveles de la proteína Slt2 fosforilada, se utilizaron anticuerpos que reconocen los residuos fosforilados de treonina (posición 190) y tirosina (posición 192) de dicha proteína, análogos a los de las isoformas p42/p44 de la MAPK ErK en mamíferos (ver Materiales y Métodos). Posteriormente, se procedió a cuantificar los niveles de fosforilación de esta proteína mediante análisis densitométrico, empleando como control de carga los niveles de actina de cada una de las muestras analizadas. A los valores obtenidos, se les aplicó una fórmula matemática, descrita en el apartado de Materiales y Métodos, que relaciona la cantidad de Fosfo-Slt2 en cada uno de los mutantes con los presentes en la cepa silvestre. Según los resultados obtenidos, 64 mutantes presentaron al menos el doble de Fosfo-Slt2 que la cepa silvestre (Figura 8). La cantidad relativa de Slt2 fosforilado en estos mutantes se distribuyó en un amplio rango de valores (2–30 veces más que la cepa silvestre) como se observa en la Tabla 5 donde se presentan ordenados los mutantes identificados por grupos funcionales y en la Figura 8 donde se muestran Western-Blots representativos de los mutantes seleccionados ordenados alfabéticamente. Estos datos indican diferentes niveles de activación de la ruta CWI para cada mutante, sugiriendo que la levadura modula la activación de dicha ruta dependiendo del estímulo desencadenante de la misma. Notablemente, más del 20% de las mutaciones que presentan interacción sintética letal con *slt2Δ*, identificadas en un análisis a gran escala realizado previamente por Tong y colaboradores (2004), han sido también

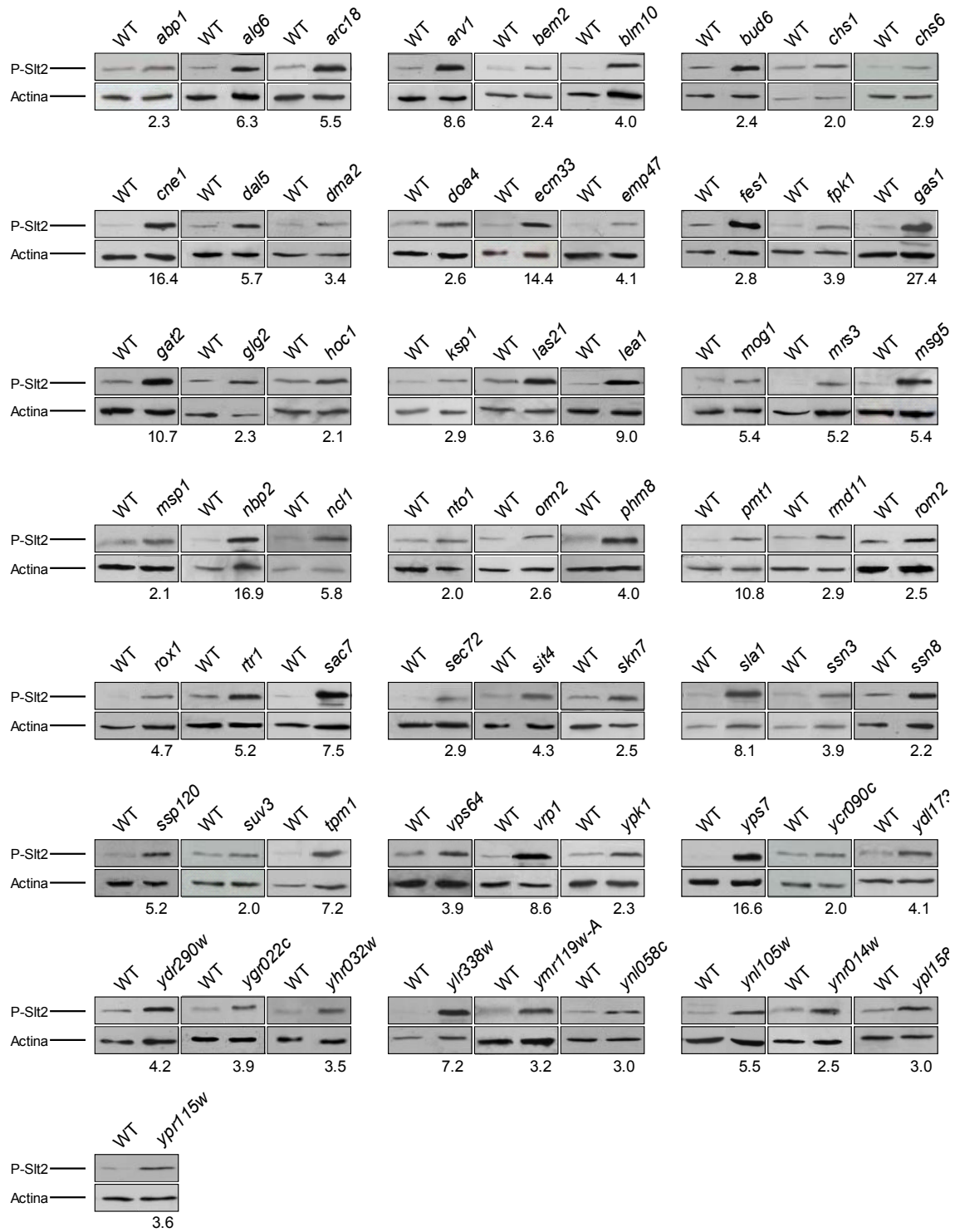


Figura 8. Grupo de mutantes con niveles incrementados de fosforilación de Slt2. Ensayos de *Western Blot* realizados con extractos proteicos totales de células procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento en YPD a 24°C. Los números que aparecen debajo de las imágenes de los *Western Blots* corresponden a la cantidad relativa de Fosfo-Slt2 (P-Slt2) de cada mutante con respecto a la cepa silvestre. Este valor fue calculado a partir de la cuantificación densitométrica de la banda de Slt2 fosforilado con respecto a la banda de actina para cada mutante, utilizando la cepa silvestre como referencia (1x).

ORF	Gen	P-Slt2	Grupo funcional	Descripción
YAL058W	CNE1	16.4	Pared celular y morfogénesis	Calnexina 1. Probablemente implicada en procesos de control de calidad de glicoproteínas
YBL007C	SLA1	8.1	Pared celular y morfogénesis	Requerido para la construcción del citoesqueleto cortical de actina
YBR078W	ECM33	14.4	• Pared celular y morfogénesis	Proteína con anclaje GPI requerida para la integridad de la pared celular y biosíntesis de manoproteínas
YCR088W	ABP1	2.3	Pared celular y morfogénesis	Proteína de unión a actina implicada en la endocitosis mediada por actina y clatrina
YDL095W	PMT1	10.8	Pared celular y morfogénesis	Manosiltransferasa, primer paso en O-glicosilación
YDR349C	YPS7	16.6	• Pared celular y morfogénesis	Aspartil proteasa de anclaje GPI implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular
YIL062W	LAS21	3.6	Pared celular y morfogénesis	Proteína requerida para la adición de una cadena lateral a la estructura del núcleo GPI
YIL099W	CHS6	2.9	Pared celular y morfogénesis	Proteína implicada en la actividad de la quitin sintasa Chs3
YJR075W	HOC1	2.1	• Pared celular y morfogénesis	Manosiltransferasa con actividad α -1,6
YLR319C	BUD6	2.4	Pared celular y morfogénesis	Requerida para la gemación bipolar e implicada en la selección del sitio de gemación
YLR337C	VRP1	8.6	Pared celular y morfogénesis	Verprolina rica en prolina, implicada en la organización del citoesqueleto de actina
YLR350W	ORM2	2.6	Pared celular y morfogénesis	Proteína transmembrana con posible papel en la ruta CWI
YLR370C	ARC18	5.5	Pared celular y morfogénesis	Componente del complejo organizador de actina ARP2/3, implicado en la organización del citoesqueleto de actina
YMR307W	GAS1	27.4	• Pared celular y morfogénesis	Proteína de anclaje a GPI con actividad β -1,3-glucanosiltransferasa
YNL079C	TPM1	7.2	• Pared celular y morfogénesis	Topomiosina, interviene en una variedad de procesos relacionados con el citoesqueleto de actina
YNL116W	DMA2	3.4	Pared celular y morfogénesis	Interviene en la posición del huso mitótico y en la organización del anillo de septinas
YNL192W	CHS1	2.0	Pared celular y morfogénesis	Quitin sintasa I, desempeña una función reparadora durante la separación celular
YOR002W	ALG6	6.3	Pared celular y morfogénesis	Proteína con actividad manosiltransferasa
YER037W	PHM8	3.9	Metabolismo	Lisofosfatidil ácido fosfatasa
YIL137C	GLG2	2.3	Metabolismo	Actividad glucogenin glucosiltransferasa
YHL023C	RMD11	2.9	Nuclear	Proteína posiblemente implicada en la división meiótica nuclear
YPR031W	NTO1	2.0	Nuclear	Posiblemente implicada en la regulación de la transcripción
YBR101C	FES1	2.8	Metabolismo de proteínas	Factor intercambiador de nucleótidos (NEF) de la chaperona citosólica Ssa1p. Respuesta a estrés oxidativo
YDR069C	DOA4	2.6	Metabolismo de proteínas	Proteasa específica de ubiquitina que actúa en el catabolismo de ubiquitina
YFL007W	BLM10	4.0	Metabolismo de proteínas	Organización del proteosoma
YBL024W	NCL1	5.8	Metabolismo de RNA	Actividad tRNA(citosina-5-)-metiltransferasa
YPL029W	SUV3	2.0	Metabolismo de RNA	Helicasa de RNA mitocondrial
YPL213W	LEA1	8.9	Metabolismo de RNA	Actividad como factor de empalme de RNA
YDL047W	SIT4	4.3	Transducción de señal	Serín/treonin fosfatasa implicada en la regulación del ciclo celular / homeostasis de iones
YDR162C	NBP2	16.9	Transducción de señal	Regulador negativo de la ruta HOG
YDR389W	SAC7	7.5	Transducción de señal	Proteína con actividad GTP-asa (GAP) que regula Rho1
YER155C	BEM2	2.4	• Transducción de señal	Proteína con actividad GTP-asa (GAP) que regula Rho1
YHR082C	KSP1	2.9	Transducción de señal	Serín/treonin quinasa implicada en el crecimiento filamentoso
YHR206W	SKN7	2.5	Transducción de señal	Factor de transcripción implicado en la respuesta a estrés oxidativo y osmótico
YJR074W	MOG1	5.4	Transducción de señal	Implicado en el transporte de proteínas al núcleo. Interviene en la osmorregulación vía SLN1-SKN7
YKL126W	YPK1	2.3	Transducción de señal	Serín/treonin proteín quinasa posiblemente relacionada con la ruta CWI y esfingolípidos
YLR371W	ROM2	2.5	Transducción de señal	Factor intercambiador de nucleótidos de guanosina GDP-GTP (GEF) de Rho1
YNL053W	MSG5	5.4	Transducción de señal	Proteín tirosin fosfatasa de especificidad dual implicada en la respuesta a feromonas
YNR047W	FPK1	3.9	Transducción de señal	Serín/treonin proteín quinasa que regula la asimetría de fosfolípidos
YLR242C	ARV1	8.6	Metabolismo de	Proteína implicada en la captación de esteroles requerida para el normal metabolismo de
YER139C	RTR1	5.2	Transcripción	Proteína requerida para el crecimiento a alta temperatura, factor de la RNA polimerasa II
YMR136W	GAT2	10.7	Transcripción	Factor de transcripción que contiene motivos de dedos de zinc de la familia GATA
YNL025C	SSN8	2.2	Transcripción	Mediador de la transcripción de la RNA polimerasa II
YPL042C	SSN3	3.8	Transcripción	Serín/treonin proteín quinasa dependiente de ciclina de la RNA polimerasa II
YPR065W	ROX1	4.7	Transcripción	Represor transcripcional de los genes de hipoxia
YPR115W		3.6	Transcripción	Unión a fosfatidilinositoles. Respuesta a estrés oxidativo
YDR200C	VPS64	3.9	Transporte	Proteína vacuolar de clase B implicada en el transporte de Prc1/secreción del factor α
YFL048C	EMP47	4.1	Transporte	Proteína del retículo endoplásmico y Golgi implicada en la secreción de glicoproteínas
YGR028W	MSP1	2.1	Transporte	Proteína intramitocondrial, miembro de la familia AAA de ATPasas
YHR032W		3.5	Transporte	Miembro de la familia MatE. Actividad transportadora
YIL133W	MRS3	5.2	Transporte	Transportador mitocondrial (MCF, familia de los transportadores de membrana). Transporte de hierro
YJR152W	DAL5	5.7	Transporte	Permeasa de alantoína
YLR292C	SEC72	2.9	Transporte	Componente del subcomplejo de traslocación de proteínas del retículo endoplásmico

ORF	Gen	P-Slt2	Grupo funcional	Descripción
YCR090C		2.0	Desconocido	Función desconocida
YDL173W		4.1	Desconocido	Función desconocida
YDR290W		4.2	Desconocido	Función desconocida
YGR022C		3.9	Desconocido	Función desconocida
YLR250W	SSP120	5.2	Desconocido	Función desconocida
YLR338W		7.2	Desconocido	Función desconocida
YMR119W-A		3.2	Desconocido	Función desconocida
YNL058C		3.0	Desconocido	Función desconocida
YNL105W		5.5	Desconocido	Función desconocida
YNR014W		2.5	Desconocido	Función desconocida
YPL158C		3.0	Desconocido	Función desconocida

Tabla 5. Niveles de activación de Slt2 (P-Slt2) correspondientes a la cantidad relativa de Slt2 fosforilado de cada mutante respecto a la cepa silvestre. Los valores se calcularon según se describe en Materiales y Métodos y son representativos de al menos dos ensayos. Las categorías funcionales y las descripciones fueron asignadas según la información presente en la base de datos *BIOBASE Knowledge Library Proteome*. Los genes cuya delección se ha descrito ser sintética letal con *slt2Δ* aparecen marcados con un punto negro.

seleccionadas en nuestro rastreo genómico (Tabla 5) lo que indica que en estos mutantes la funcionalidad de la ruta CWI es esencial para mantener la viabilidad celular.

Además, como se muestra en la Tabla 5, la distribución funcional de los genes identificados cuya delección conduce a la activación constitutiva de Slt2 reveló que los grupos más representados, de acuerdo con la clasificación de las bases de datos *BIOBASE Knowledge Library Proteome* y *Saccharomyces Genome Database (SGD)*, fueron aquellos relacionados con organización de la pared celular y morfogénesis (28%), genes de función desconocida (17%), transducción de señal (17%), transporte (11%) y transcripción (9%). El resto de categorías funcionales estaban relacionadas con metabolismo, principalmente de RNA y proteínas, y en algún caso con metabolismo de esfingolípidos y otras funciones celulares con escasa representación como las relacionadas con procesos nucleares. Estos datos indican que la distribución funcional obtenida, como era de esperar en base al diseño experimental utilizado, es coherente con estímulos que activan la ruta de integridad celular directa o indirectamente como puede ser el caso de la presencia de alteraciones en la pared celular o el efecto de proteínas reguladoras de su biogénesis.

La cantidad de información que se está generando durante la última década procedente tanto de aproximaciones genómicas (expresión a gran escala mediante microarrays de DNA, rastreos genómicos utilizando colecciones de mutantes, etc.) y proteómicas (ensayos de interacciones proteicas a gran escala, fosfoproteómica, etc.), en combinación con las metodologías clásicas de biología molecular están permitiendo el desarrollo de diferentes programas informáticos diseñados con el fin de combinar toda la información generada y facilitar de este modo la asignación funcional a los genes de la levadura o la adscripción de

nuevas funciones a genes/proteínas previamente caracterizados. En este sentido, con objeto de determinar las posibles conexiones funcionales documentadas entre los 64 genes identificados cuya ausencia en la levadura conduce a una activación constitutiva de la ruta de integridad celular, se procedió a analizar dicho grupo en la base de datos STRING. Esta herramienta es muy útil para obtener información sobre interacciones posibles o conocidas entre genes/proteínas utilizando las fuentes anteriormente indicadas (Szklarczyk *et al.*, 2011). Como se muestra en la Figura 9, un número significativo de genes (38 de 64) mostraron algún tipo de interacción funcional entre sí. Destaca el hecho de que el mayor número de interacciones se asociaron con los principales grupos funcionales (pared celular y morfogénesis, transducción de señal y transcripción) comentados anteriormente. En

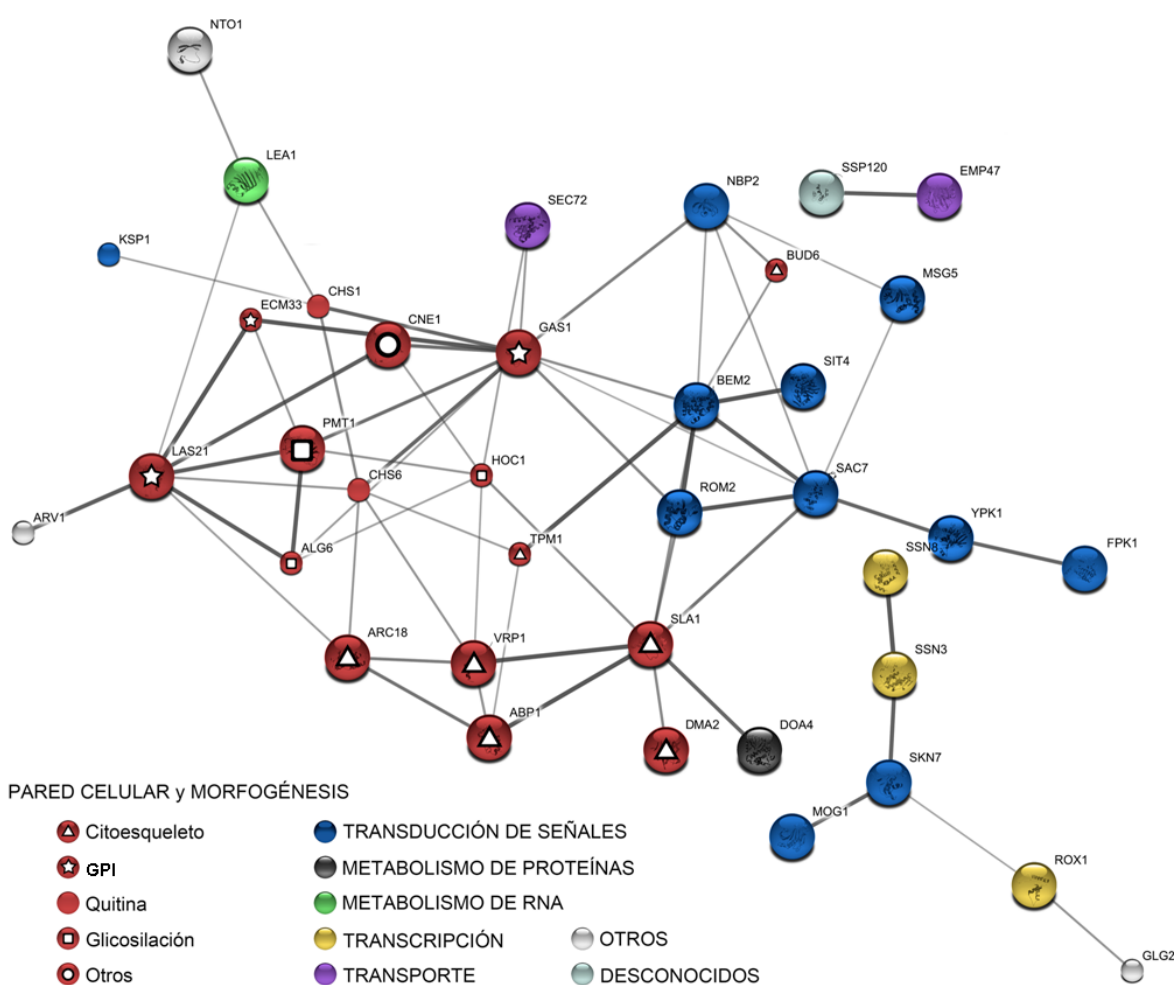


Figura 9. Red de interacciones entre las proteínas/genes cuya delección conduce a una activación de la MAPK Sit2. Las interacciones físicas (directas) y funcionales (indirectas) se han identificado utilizando la base de datos STRING (versión 8.3). Las proteínas son representadas como nodos, siendo estos círculos coloreados de acuerdo a la clasificación funcional presentada en la Tabla 5. Las interacciones se representan como líneas entre los nodos, existiendo una relación entre un mayor grosor de la línea con una interacción más fuerte. En la figura no se muestran los genes/proteínas para los que no se ha descrito interacción alguna con el grupo de genes /proteínas en estudio.

cuanto al grupo relacionado con pared celular y morfogénesis, representado por 18 genes, este a su vez apareció dividido en diferentes subgrupos como se observa en la Figura 9. El primero de ellos, relacionado con la organización del citoesqueleto de actina, constituido por 7 genes (*SLA1*, *ABP1*, *BUD6*, *VRP1*, *ARC18*, *TPM1*, *DMA2*). Se ha descrito que la desorganización del citoesqueleto de actina activa la ruta CWI (Harrison *et al.*, 2004), dato que sustenta que en los mutantes indicados la fosforilación de Slt2 pueda deberse a un fenómeno relacionado. Además, en relación con este grupo se ha identificado el mutante *doa4Δ* (Figura 9). Doa4 es una enzima con actividad desubiquitinasa, la cual ha sido asociada con alteraciones en la morfología celular y en el citoesqueleto de actina. De hecho, para el gen *DOA4* se ha descrito una interacción sintética letal con el gen *SLA1* (Fiorani *et al.*, 2004), implicado este último en el acoplamiento del citoesqueleto de actina a la maquinaria endocítica con el fin de facilitar el proceso de endocitosis. Un segundo subgrupo, formado por 6 mutantes, incluyó genes codificantes de proteínas relacionadas con la estructura de la pared celular. Tres de ellas son proteínas que presentan anclaje a GPI: Gas1, con función β -1,3-glucanosiltransferasa; Ecm33, asociada con el mantenimiento de la integridad de la pared celular y con un posible papel en crecimiento apical de la yema; e Yps7, una aspartil proteasa. Las cepas delecionadas en *GAS1*, *ECM33* y *YPS7* muestran alteraciones severas en la pared celular lo que explicaría los altos niveles de activación de Slt2 que presentan (Figura 8). Además, dentro de este segundo subgrupo, se incluyó la proteína Las21 que se localiza en la membrana del retículo endoplásmico y está implicada en la síntesis de la estructura del núcleo del GPI. La ausencia de esta proteína conduce a defectos generales en la estructura de la pared celular. Además, se ha identificado una asociación funcional entre las proteínas Las21 y Arv1 (Figura 9). Esta última proteína está implicada en el metabolismo de esfingolípidos y recientemente, ha sido relacionada con el proceso de síntesis de GPI (Kajiwara *et al.*, 2008). Adicionalmente, se han identificado dos proteínas relacionadas con el metabolismo de quitina, Chs6, implicada en el transporte de la quitin sintasa Chs3 del aparato de Golgi a la membrana plasmática, y Chs1 (quitin sintasa I) que interviene en la reposición de quitina durante la citoquinesis. Un tercer subgrupo de mutantes está relacionado con proteínas con actividad manosiltransferasa (Pmt1, Hoc1 y Alg6). Teniendo en cuenta que esta actividad enzimática es altamente redundante en *S. cerevisiae*, donde se han descrito diferentes familias de estas proteínas (Lesage y Bussey, 2006; Willer *et al.*, 2003), la identificación en el rastreo genómico de las tres citadas es indicativo de un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis de la pared celular.

En cuanto al grupo de mutantes delecionados en genes relacionados con la señalización celular, se han seleccionado varios reguladores negativos, ya descritos previamente, de la ruta CWI. Así, se han identificado mutantes en genes codificantes de proteínas con actividad GTPasa (GAPs) sobre Rho1 como Bem2 y Sac7, y proteínas fosfatasa como Sit4 y Msg5 que regulan negativamente la ruta CWI actuando sobre Pck1 y Slt2, respectivamente (Angeles de la Torre-Ruiz et al., 2002; Flandez *et al.*, 2004). Además, también se ha identificado dentro de este grupo el mutante *rom2Δ*, a pesar de que Rom2 actúa como GEF (activador) de Rho1 en la ruta de integridad celular. Este efecto paradójico sobre la activación de Slt2 ha sido previamente observado por Lorberg y colaboradores (2001) en diferentes fondos genéticos de levadura. El hecho de que se hayan aislado todos estos mutantes en nuestro rastreo avala la posibilidad de que otros genes seleccionados funcionalmente relacionados puedan actuar también como potenciales reguladores de la ruta CWI. Este es el caso de los mutantes *nbp2Δ*, *ksp1Δ*, *fpk1Δ*, *skn7Δ* y *mog1Δ*. Nbp2 actúa como un regulador negativo de la ruta HOG favoreciendo la interacción de la fosfatasa Ptc1 con Hog1 (Mapes y Ota, 2004) y, ambas proteínas intervienen en la regulación de la herencia del retículo endoplásmico a través de la ruta CWI modulando a la MAPK Slt2 (Du *et al.*, 2006). La serin-treonin proteína quinasa Ksp1 ha sido asociada, recientemente, al crecimiento filamentoso en cepas haploides de levadura (Bharucha *et al.*, 2008), y Fpk1 (flipasa quinasa 1), regula la translocación de fosfolípidos de membrana (Nakano *et al.*, 2008). Esta última proteína es fosforilada y regulada negativamente por la serin-treonin quinasa Ypk1 (Roelants *et al.*, 2010), que además afecta a la fosforilación de la MAPK Slt2 en respuesta a estrés térmico (Schemelzle et al., 2002). Es importante destacar que el mutante *ypk1Δ* ha sido también identificado en nuestro rastreo genómico. Skn7 es un factor de transcripción multifuncional, gracias a la capacidad que tiene de actuar sobre una gran variedad de reguladores transcripcionales en diferentes condiciones. Además, se ha descrito que Skn7 podría ser activado por Rho1 en respuesta a estrés sobre la pared celular (Alberts *et al.*, 1998). Finalmente, dentro de este grupo la proteína Mog1 se ha implicado en el transporte nucleocitoplásmico, y es requerida para una unión óptima del factor de transcripción Skn7 a los promotores de los genes que regula (Lu *et al.*, 2004). En resumen, el hecho de que Slt2 se encuentre hiperactivado en estos mutantes sugiere una conexión entre la ruta CWI y procesos celulares controlados por dichos elementos.

Otro grupo de mutantes seleccionados en el rastreo genómico fueron los relacionados funcionalmente con transcripción (Tabla 5 y Figura 8). Así, muchos de los genes delecionados en dichos mutantes están implicados en transcripción dependiente de la RNA polimerasa

II, controlando respuestas frente a diversos estímulos como, por ejemplo, alta temperatura (*RTR1*), estrés oxidativo (*YPR115W*) y condiciones anaeróbicas (*ROX1*). Adicionalmente, los factores de transcripción Skn7 y Rox1, han sido implicados de forma coordinada en la respuesta celular a estrés oxidativo (Kelley y Ideker, 2009). Dentro de este grupo, se han identificado también dos componentes que forman parte de un módulo de el complejo *mediator* (*SSN3* y *SSN8*), que entre otras funciones, se ha relacionado con la regulación de la actividad de Skn7 (Lenssen *et al.*, 2007). Estos datos ponen de manifiesto la relación entre la ruta CWI y otras situaciones de estrés sobre la levadura. En este sentido, es destacable que para otros mutantes identificados en el rastreo genómico se haya descrito previamente un fenotipo de sensibilidad a condiciones de estrés como el osmótico (*phm8Δ*, *glg2Δ* y *mrs3Δ*) o el choque térmico (*ncl1Δ*, *suv3Δ* y *vps64Δ*).

Recientemente se ha descrito una conexión entre la ruta CWI y la ruta UPR (*Unfolded Protein Response*), que se activa en condiciones que inducen estrés sobre el retículo endoplásmico debido a la acumulación de proteínas mal plegadas (Ron y Walter, 2007). Por un lado, la ruta CWI es activada en condiciones de estrés sobre el retículo endoplásmico (Chen *et al.*, 2005), mientras que la ruta UPR también se activa en respuesta a estrés sobre la pared celular a través de la ruta CWI (Scrimale *et al.*, 2009). De acuerdo con los resultados obtenidos en el rastreo genómico, en algunos mutantes seleccionados el mecanismo de activación de Slt2 podría ser similar. De hecho, Emp47 es requerida para una eficiente secreción de determinadas glicoproteínas desde el retículo endoplásmico (Sato y Nakano, 2002), Sec72 está implicada en la translocación de proteínas secretoras al retículo endoplásmico (Young *et al.*, 2001), y Orm2 es una proteína que se localiza en la membrana del retículo endoplásmico y desempeña un papel importante en la homeostasis de lípidos y control de calidad de proteínas, siendo requerida en presencia de agentes que inducen la ruta UPR (Han *et al.*, 2010). Adicionalmente, se ha descrito que Orm2 interacciona físicamente con Slt2, pero la importancia de este hecho desde un punto de vista biológico es todavía desconocida. Finalmente, dentro de este grupo funcional se incluye el mutante *cne1Δ*. La proteína Cne1 es una calnexina que podría estar implicada en los mecanismos de control de plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico.

Otro aspecto de especial interés en este estudio fue la identificación de cepas delecionadas en genes cuya función permanece sin caracterizar hasta el momento o no han sido relacionados previamente con la integridad de la pared celular, pues podría tratarse de nuevos genes relacionados con la construcción y/o mantenimiento de esta estructura. Con objeto de avanzar en la caracterización de este grupo de mutantes se

procedió a realizar un análisis fenotípico de las 11 cepas delecionadas en genes con función desconocida identificadas (Tabla 6) y de 15 mutantes a los cuales hasta el momento no se les ha asignado fenotipos claros de pared celular en las bases de datos consultadas. Así, mediante ensayos de siembra por dilución en gota sobre medio sólido se determinó la sensibilidad de dichos mutantes a diferentes compuestos que afectan a la integridad celular a través de distintos mecanismos de acción: Rojo Congo, sustancia que interfiere en el correcto ensamblaje de los componentes de la pared celular; caspofungina, inhibidor de la enzima β -1,3-glucan sintasa; higromicina B, antibiótico aminoglucósido asociado con defectos en glicosilación de proteínas de pared (Dean, 1995); SDS, detergente que afecta a la estabilidad de la membrana y también, indirectamente, a la construcción de la pared celular (Igual et al., 1996); y cafeína, sustancia que activa la ruta CWI vía TOR1-dependiente, estando asociado el fenotipo de sensibilidad a cafeína con defectos en la regulación/transducción de señal. De hecho, mutantes en elementos de la ruta CWI son sensibles a este compuesto (Lussier et al., 1997; Martin et al., 2000; Kuranda et al., 2006).

ORF/Gen	Rojo Congo	Caspofungina	SDS	Cafeina	Higromicina B
YCR090C	---	---	---	---	---
YDL173W	---	---	S	SS	---
YDR290W	SSSS	SSS	S	---	SS
YGR022C	---	SSS	S	---	---
YLR250W	---	---	---	---	---
YLR338W	SSSS	R	SS	SSSSS	SSSSS
YMR119W-A	---	---	---	---	---
YNL058C	---	---	---	---	---
YNL105W	---	---	---	---	---
YNR014W	---	---	---	R	---
YPL158C	---	SSS	---	SS	---
ERC1	---	---	---	---	---
FES1	SSSSS	---	SSSSS	SSSSS	---
FPK1	---	---	---	R	---
GAT2	SS	---	S	---	SSSSS
GLG2	---	---	---	---	---
KSP1	---	---	---	---	---
LEA1	SS	---	---	SSSS	SSS
MOG1	---	SS	SS	SS	SSSSS
MSP1	---	---	---	---	---
PHM8	---	---	---	---	SSS
RMD11	---	---	S	---	---
ROX1	---	---	---	---	SSSS
SEC72	---	---	---	---	---
SUV3	---	---	---	---	SSS

Tabla 6. Caracterización fenotípica del grupo de mutantes delecionados en genes de función desconocida y no relacionados hasta el momento con la integridad de la pared celular. Se estudió la capacidad de distintos mutantes de crecer en medio sólido YPD suplementado con cafeína (12mM), higromicina (50 μ g/ml), SDS (200 μ g/ml), Rojo Congo (100 μ g/ml) y caspofungina (40 ng/ml). A partir de cultivos en fase exponencial se prepararon suspensiones celulares a D.O.₆₀₀ \approx 0,2 (aproximadamente $1,5 \times 10^4$ células en 5 μ l) y adicionalmente 5 diluciones seriadas 1/5 en medio YPD. Los niveles de hipersensibilidad se muestran como el número de diluciones ("S") en las que no se ha detectado crecimiento."R" se refiere a la presencia de un fenotipo de resistencia y "---" indica que no existen diferencias significativas en el crecimiento respecto a la cepa silvestre. En la parte superior de la Tabla se agrupan los genes de función desconocida.

Como se observa en la Tabla 6, 15 de las 26 cepas analizadas presentaron fenotipos de hipersensibilidad o de resistencia respecto al comportamiento de la cepa silvestre en al menos una de las condiciones ensayadas, sugiriendo que la activación de la ruta CWI en esos mutantes podría ser debida a defectos en la pared celular que alteren la funcionalidad de esta estructura. Por otro lado, la identificación de mutantes sin defectos aparentes en la pared celular podría estar relacionada con la posibilidad de la activación de la ruta CWI por alteraciones de esta estructura no detectables mediante los análisis fenotípicos utilizados o por otros estímulos alternativos.

3. Determinación del contenido en quitina de los mutantes con activación basal de la MAPk Slt2

En condiciones normales, la quitina constituye sólo aproximadamente el 1-2% del peso seco de la pared celular de la levadura. Sin embargo, la presencia de mutaciones en componentes importantes para la estabilidad de esta estructura, conlleva un incremento en la síntesis de este polímero, hasta un 20% del peso seco, como parte de la respuesta de adaptación que se desencadena en la célula. Dicho mecanismo es dependiente de la ruta CWI y tiene como objetivo el mantenimiento de la integridad y funcionalidad de la pared celular.

Con el objetivo de evaluar la magnitud de este efecto en el grupo de 64 mutantes con niveles incrementados de Fosfo-Slt2, se procedió a determinar el contenido en quitina de dichos mutantes. Células procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento se tiñeron con Blanco de Calcofluor, compuesto que se une a la quitina, y se determinó la intensidad de fluorescencia correspondiente a esta sustancia observada en cada uno de los mutantes ensayados, mediante análisis por citometría de flujo. Según los resultados obtenidos, 19 cepas (30%) mostraron unos valores de fluorescencia (quitina) de más del doble que los observados en la cepa silvestre (Figura 10), denotando que el mecanismo compensatorio se ha desencadenado en dichos mutantes, al menos en cuanto al incremento en el contenido en quitina. Por el contrario, el resto de los mutantes con activación basal de la MAPK Slt2 (45), no presentaron un incremento significativo de emisión de fluorescencia con respecto a la cepa silvestre. De forma complementaria, se procedió a la observación mediante microscopía de fluorescencia, tras tinción de nuevo con Blanco de Calcofluor de las 19 cepas identificadas mediante citometría, con objeto de confirmar estos resultados y, a su vez, poder estudiar el patrón de localización de quitina en la célula (Figura 11). En general, se observó mayor cantidad de quitina tanto en pared lateral como en la región del

septo. De forma similar a lo anteriormente observado en cuanto a la activación de Slt2, se ha observado un amplio rango de distribución de contenido en quitina (2-16x), sugiriendo que el incremento en la deposición de este polímero está asociado a requerimientos celulares específicos. Además, es interesante destacar que aproximadamente el 50% de los mutantes con niveles elevados de quitina han sido relacionados funcionalmente con pared celular y morfogénesis (Figura 10), mientras que en el grupo de mutantes sin incremento significativo del contenido de este polímero sólo el 18% de los mutantes fueron asignados a este grupo funcional. Estos datos apoyan una asociación entre la activación de la ruta de integridad celular y el incremento de la síntesis de quitina en presencia de alteraciones en la pared celular y morfogénesis.

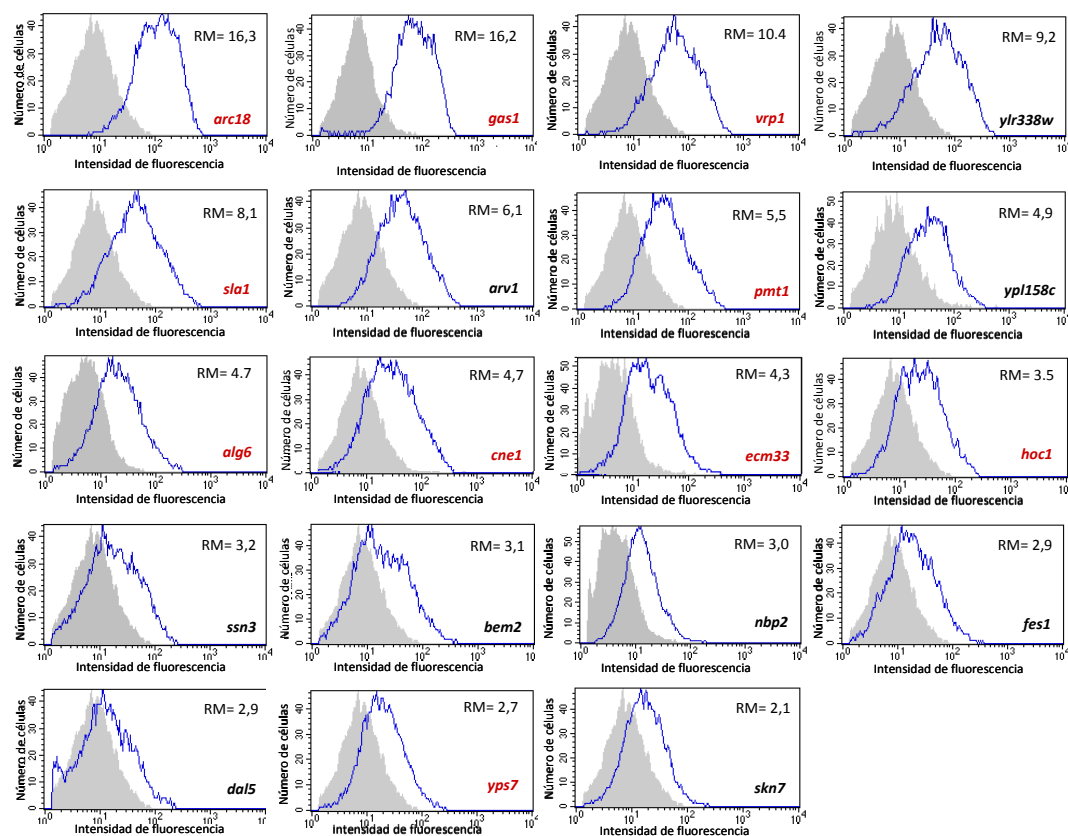


Figura 10. Mutantes seleccionados en el rastreo genómico que muestran un incremento en el contenido en quitina. Los histogramas corresponden a los perfiles de intensidad de fluorescencia analizados mediante citometría de flujo tras tinción de las células en fase exponencial de crecimiento con Blanco de Calcofluor (5 µg/ml durante 10 minutos). Los mutantes representados muestran un contenido en quitina mayor que el de la cepa silvestre (>2x). Para cada mutante (línea azul), se incluye en cada representación un histograma (área coloreada) que corresponde al perfil de la cepa silvestre (BY4741) analizada en paralelo. Las cepas delecionadas en genes funcionalmente relacionados con integridad de la pared celular y morfogénesis aparecen en color rojo. “RM” se refiere al ratio de las medias de intensidad de fluorescencia para cada población celular (mutante/cepa silvestre).

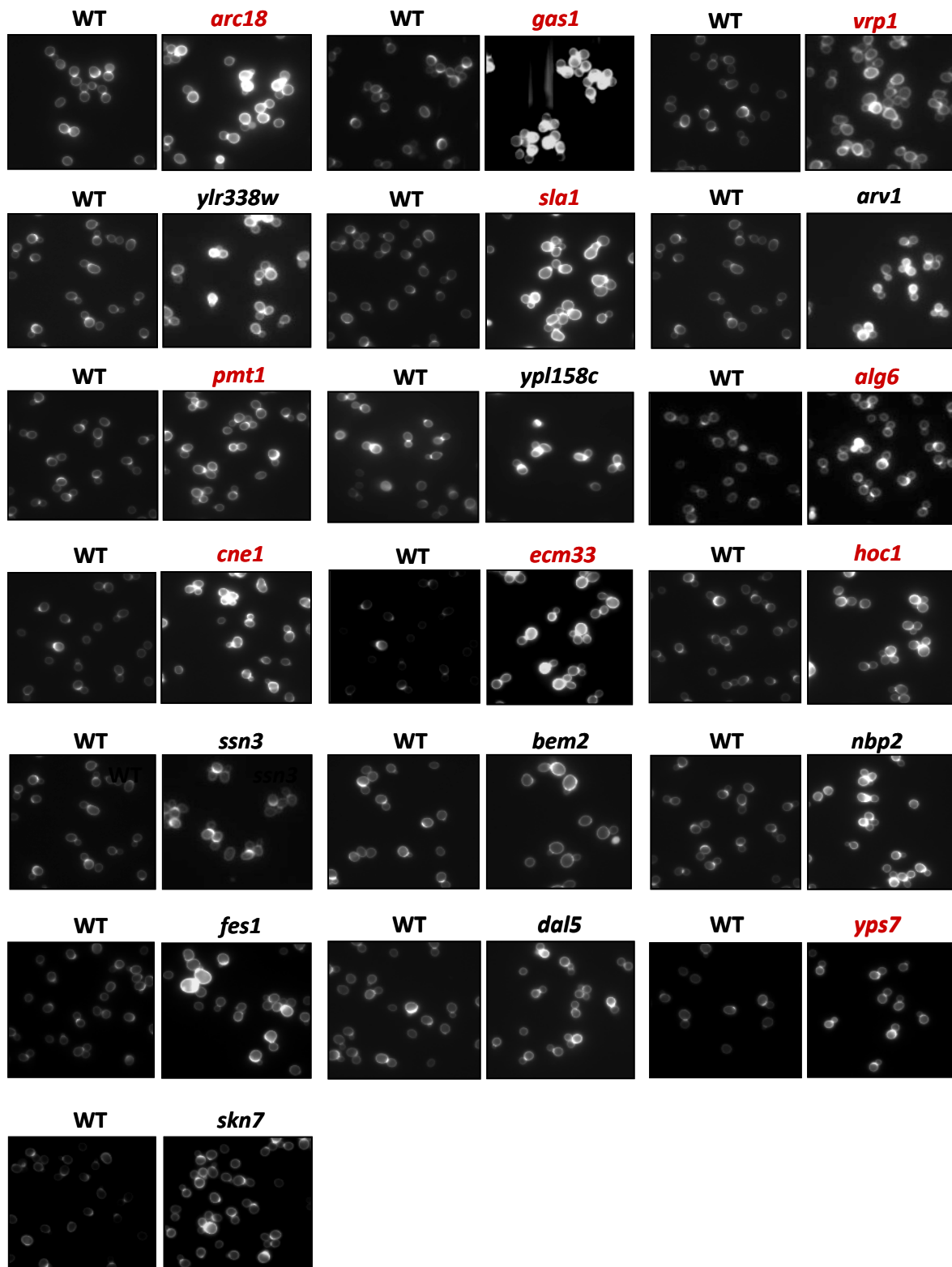


Figura 11. Patrón de localización de quitina en los mutantes que presentan mayor contenido de este polímero según análisis mediante citometría de flujo. Imágenes representativas de microscopía de fluorescencia, tras tinción con el Blanco de Calcofluor, en paralelo, de la cepa silvestre y de cada mutante. Las cepas delecionadas en genes funcionalmente relacionados con integridad de la pared celular y morfogénesis aparecen en color rojo.

En todo caso el grado de correlación, desde un punto de vista cualitativo, entre los niveles de fosforilación de Slt2 y el contenido en quitina de los 64 mutantes estudiados fue muy bajo ya que en el 70% de los mismos, los niveles de quitina no se modificaron significativamente respecto a los observados en la cepa silvestre. Sin embargo, tras analizar en detalle los datos de fosforilación de Slt2 y las medidas de intensidad de fluorescencia debidas a la tinción de quitina de cada mutante se observó que 8 de los 10 mutantes con mayor nivel de fosforilación de Slt2, la mayoría de ellos relacionados funcionalmente con el grupo de pared celular y morfogénesis (ver Tabla 5), presentaban niveles más altos de quitina, apoyando la idea de que este polímero juega un papel esencial para la supervivencia de la levadura en condiciones que comprometen la integridad celular. No obstante, no se pudo establecer una relación cuantitativa entre ambos parámetros dentro de este subgrupo de mutantes. En otros casos, niveles muy elevados de fosforilación de Slt2 no se asociaron a incrementos detectables del contenido en quitina. Este fue el caso de los mutantes *lea1Δ* y *gat2Δ* (Tabla 5, Figura 12a), a pesar de que estos mutantes mostraron fenotipos de sensibilidad a determinados compuestos asociados con alteraciones en la pared celular (Tabla 6). El gen *GAT2* codifica para un factor de transcripción con motivos de dedos de zinc que no ha sido caracterizado hasta el momento, mientras que el gen *LEA1* codifica para una proteína implicada en el proceso post-transcripcional de corte y empalme de RNA. Además, se ha descrito que el gen *LEA1* presenta interacciones genéticas con varios genes relacionados con pared celular, como *CHS1* o *CHS5* (Tong *et al.*, 2004). Con el objetivo de determinar que elementos clave de la ruta de CWI estaban implicados en la activación de Slt2 detectada en estos mutantes, se procedió a la construcción de dobles mutantes delecionando los genes *WSC1* y *MID2* (principales sensores de la ruta), *ROM2* (principal GEF de Rho1) y *BCK1* (primer elemento del módulo de MAPK de la ruta de integridad celular) en un fondo *lea1Δ* y *gat2Δ*. Utilizando esta estrategia, se pudo determinar si la fosforilación de Slt2 en estos dos mutantes era resultado de un estrés detectado en la superficie celular o sin embargo, se debía a conexiones laterales a otros niveles de la ruta. Como se observa en la Figura 12b, en el caso del mutante *lea1Δ* la activación de la ruta CWI depende del sensor Mid2 mientras que en el mutante *gat2Δ* los resultados parecen indicar que dicha activación depende de los dos sensores estudiados. En cuanto a los dobles mutantes con *BCK1* y *ROM2*, en ambos casos la activación de la MAPK Slt2 es totalmente dependiente de *BCK1* mientras que la deleción de *ROM2* no afectó a dicha activación. Esta última apreciación, en combinación con la participación de los sensores de la ruta CWI en la señalización sugiere que otras GEFs de Rho1 estarían implicadas en esta señalización. Estos resultados apoyan la idea de que determinadas alteraciones de la pared celular podrían desencadenar respuestas

adaptativas específicas a través de la ruta CWI, y como ya se presentó anteriormente, sin que sea necesario un incremento de quitina en la pared celular.

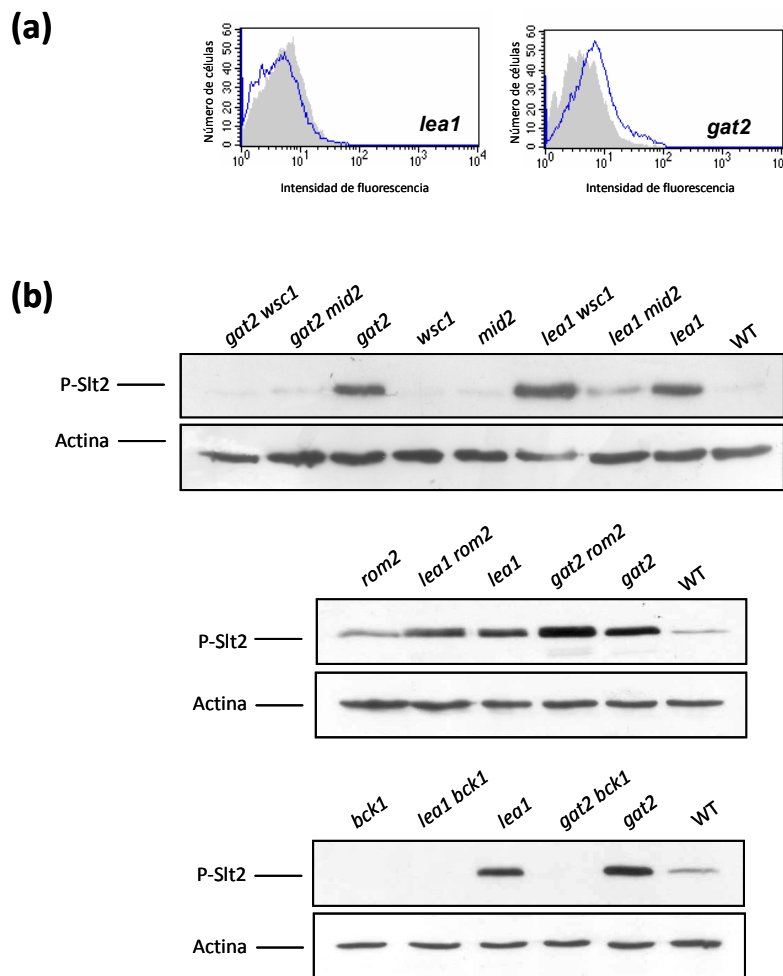


Figura 12. La activación de la MAPK Slt2 en los mutantes *lea1Δ* y *gat2Δ* depende de los sensores de la ruta CWI. (a) Análisis del contenido en quitina por citometría de flujo, de los mutantes *gat2Δ* y *lea1Δ* tras tinción de las células con el Blanco de Calcofluor. **(b)** Determinación de los niveles de Fosfo-Slt2 y actina de los extractos proteicos procedentes de cultivos en fase exponencial de los mutantes sencillos (*gat2Δ* y *lea1Δ*) y los dobles (*gat2Δ mid2Δ*, *gat2Δ wsc1Δ*, *gat2Δ rom2Δ*, *gat2Δ bck1Δ*, *lea1Δ mid2Δ*, *lea1Δ wsc1Δ*, *lea1Δ rom2Δ*, *lea1Δ bck1Δ*) mediante Western Blotting utilizando anticuerpos anti-fosfo-p42/p44 y anti-actina, respectivamente.

4. Estudios de expresión génica en los mutantes seleccionados en el rastreo genómico

Teniendo en cuenta el amplio rango en los niveles basales de fosforilación de la MAPK Slt2 detectado en el grupo de los 64 mutantes seleccionados, se planteó la cuestión de si existía una correlación entre los niveles de expresión de genes implicados en la respuesta a daños sobre la pared celular dependientes de la ruta CWI y los niveles de Fosfo-Slt2

observados. Para desarrollar este objetivo, se transformaron individualmente un grupo de 9 mutantes que presentaban distintos niveles de fosforilación de Slt2, además de la cepa silvestre como control, con los plásmidos *MLP1-lacZ* y *CWP1-lacZ* (previamente generados en nuestro laboratorio) que incluyen las regiones promotoras de ambos genes fusionados al gen *lacZ* (codificante de la enzima β -galactosidasa). A partir de los resultados obtenidos mediante ensayos de cuantificación de la actividad β -galactosidasa en extractos proteicos procedentes de cultivos en fase exponencial de los diferentes transformantes crecidos a 24°C (ver Materiales y Métodos), se observó un buen grado de correlación entre los niveles de expresión de *MLP1* y de *CWP1* y los de fosforilación de Slt2 excepto en el mutante *lea1* Δ , en el que la expresión de los genes reportero fue significativamente más baja que la esperada según los niveles de fosforilación de la MAPK en este mutante (Figura 13a y 13b).

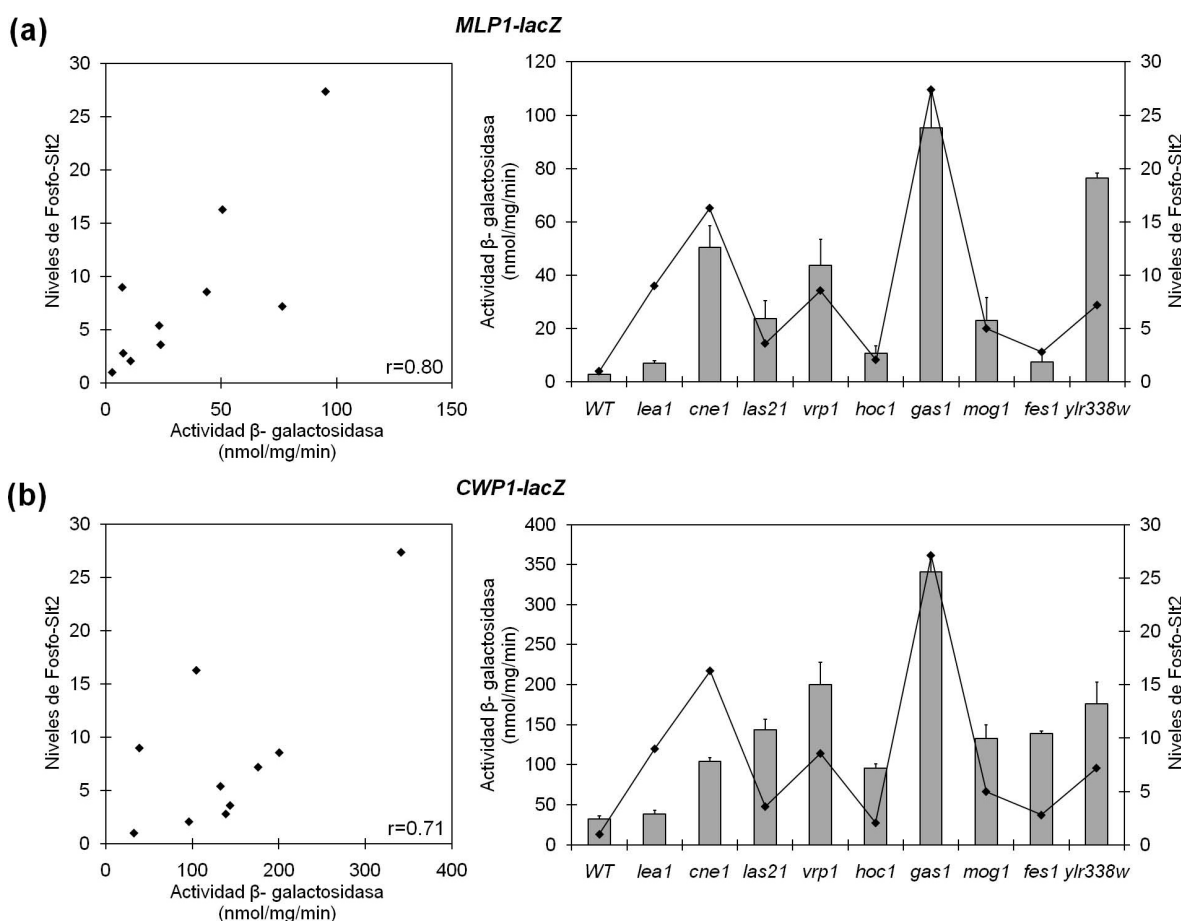


Figura 13. Estudio comparativo de la activación transcripcional y la fosforilación de Slt2 en mutantes seleccionados en el rastreo genómico. La representación en barras corresponde a los niveles de expresión de *MLP1-lacZ* (a) y *CWP1-lacZ* (b) observados en los mutantes analizados y en la cepa silvestre. Se muestran la media y la desviación estándar de la actividad β -galactosidasa procedente de tres ensayos utilizando transformantes independientes. La línea representa el ratio en fosforilación de Slt2 observado en cada mutante con respecto a la cepa silvestre (1x) como se describe en la Tabla 5. A la izquierda se muestran los gráficos de dispersión bidimensionales de niveles de Fosfo-slt2 vs activación transcripcional, incluyendo el coeficiente de correlación de Pearson (r).

En esta figura se muestra para cada uno de los genes reporteros un gráfico de dispersión bidimensional en el que se incluye el coeficiente de correlación de Pearson siendo para *MLP1*, $r=0,80$ y para *CWP1*, $r=0,71$, indicando estos valores una buena correlación entre las dos variables analizadas. El hecho de que los resultados de inducción transcripcional sean similares para los genes *MLP1* y *CWP1*, apoya la idea de que la activación de la ruta CWI mediada por la fosforilación de la MAPK Slt2 en los mutantes identificados este dando lugar a un cambio del perfil transcripcional de la célula no restringido únicamente a *MLP1*, gen utilizado originalmente para la identificación de los mutantes seleccionados.

En contraste con el grupo de mutantes que mostraron incremento de los niveles de activación basal de Slt2 descritos anteriormente, se seleccionó en el rastreo genómico otro grupo de 110 mutantes con diferencias no detectables en ensayos de *Western Blotting* en los niveles de fosforilación de Slt2 con respecto a la cepa silvestre. Con el objetivo de confirmar la resistencia a nourseotricina de estas cepas y por tanto su selección en el rastreo genómico previo, se procedió a su transformación con el plásmido pJS05 (*MLP1p-NAT1*), descrito anteriormente, y se sometieron a ensayos de sensibilidad a nourseotricina para la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) frente a este antibiótico usando la técnica de microdilución en placa multipocillo (ver Materiales y Métodos). En cada uno de estos ensayos se estudiaron, al menos, dos transformantes individuales de cada cepa incluyendo como control del ensayo transformantes de la cepa silvestre incorporados en cada placa ensayada. A partir de la medida de turbidez en medio líquido (densidad óptica), se determinó la CMI de cada cepa y se concluyó que 38 mutantes presentaban valores de CMI al antibiótico superiores (al menos 2x) a los de la cepa silvestre (Tabla 7), confirmando el fenotipo de resistencia a nourseotricina, mientras que el resto de mutantes se comportó de la misma forma que la cepa silvestre. Teniendo en cuenta que este fenotipo se confirmó también en el grupo de los 64 mutantes que presentaban activación basal de Slt2, dicho grupo de 38 mutantes (resistentes a nourseotricina y sin hiperactivación basal de Slt2) podría incluir cepas donde tengan lugar mecanismos de resistencia al antibiótico no relacionados con la ruta CWI, tales como efectos alternativos sobre la expresión de *MLP1* o resistencia intrínseca al antibiótico.

Para confirmar que la resistencia a nourseotricina detectada en los 38 mutantes, que además no presentaron valores incrementados de Fosfo-Slt2, era consecuencia de la inducción transcripcional de *MLP1* se procedió a utilizar el sistema reportero *MLP1-lacZ* en este grupo de mutantes. Como se observa en la Figura 14a, los niveles de expresión de *MLP1* fueron bajos o moderados aunque en general, más elevados que los obtenidos de la cepa

ORF	Gen	Grupo Funcional	Descripción
YAL023C	PM T2	Pared celular y morfogénesis	Manosiltransferasa implicada en la O-glicosilación
YBL061C	CHS4	Pared celular y morfogénesis	Implicado en el proceso de biosíntesis de quitina de la pared celular
YBR082C	UBC4	Metabolismo de proteínas	Responsable de la degradación de proteínas dependiente de ubiquitina
YBR171W	SEC66	Transporte	Componente del subcomplejo de translocación de proteínas de retículo endoplásmico
YCR081W	SRB8	Transcripción	Subunidad del complejo mediador de la RNA polimerasa II
YDR163W	CWC15	Nuclear	Proteína posiblemente implicada en el empalme de pre-mRNA
YDR241W	BUD26	Pared celular y morfogénesis	Implicado probablemente en gemación bipolar y selección del sitio de gemación
YDR293C	SSD1	Pared celular y morfogénesis	Supresor de la delección de SIT4, regula la formación y composición de la pared celular
YDR315C	IPK1	Metabolismo	Inositol polifosfato quinasa
YDR461W	MFA1	Transducción de señal	Feromona de apareamiento, factor a
YEL048C		Desconocido	Función desconocida
YER141W	COX15	Otros	Proteína requerida para el correcto ensamblaje de la citocrom oxidasa
YGL007W		Desconocido	Función desconocida
YGL151W	NUT1	Nuclear	Regulación negativa de URS2. A actividad histona acetil transferasa
YGL174W	BUD13	Pared celular y morfogénesis	Implicado probablemente en gemación bipolar y selección del sitio de gemación
YHL029C		Desconocido	Función desconocida
YHR006W	STP2	Transcripción	Factor de transcripción que regula genes que codifican permeasas de aminoácidos
YHR160C	PEX18	Metabolismo	Peroxina requerida para la orientación de proteínas de la matriz peroxisomal
YIR005W	IST3	Metabolismo de RNA	Implicado en la retención y en el empalme de pre-mRNA
YJR059W	PTK2	Transporte	Serina/treonina proteín quinasa requerida para el transporte de alta afinidad de poliamina
YJR127C	ZM S1	Transcripción	Factor de transcripción requerido para un crecimiento normal en glicerol
YML037C		Desconocido	Función desconocida
YML109W	ZDS2	Otros	Proteína implicada en la regulación del silenciamiento transcripcional
YMR037C	M SN2	Transcripción	Activador transcripcional de genes en respuesta a múltiples estreses
YMR095C	SNO1	Metabolismo	Glutamina probablemente implicada en el metabolismo de piridoxina
YMR311C	GLC8	Transducción de señal	Modulador de la proteína serin/treonin fosfatasa Glc7
YNL030W	HHF2	Nuclear	Proteína que se une a la cromatina implicada en procesos relacionados con la cromatina
YNL106C	INP52	Estrés	Polifosfatidilinositol fosfatasa que actúa en la organización del citoesqueleto de actina
YNL127W	FAR11	Otros	Implicado en la parada del ciclo celular en respuesta a feromonas
YNL236W	SIN4	Transcripción	Componente de la holoenzima RNA polimerasa II
YNL322C	KRE1	Pared celular y morfogénesis	Necesario para el ensamblaje del β -1,6-glucano
YNL323W	LEM3	Transducción de señal	Implicado en la captación ATP dependiente de fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina
YNR005C		Pared celular y morfogénesis	Implicado en la biogénesis de la pared celular
YNR010W	CSE2	Nuclear	Componente del subcomplejo mediador (SRB) de la RNA polimerasa II
YOL159C		Desconocido	Función desconocida
YOR115C	TRS33	Transporte	Implicado en el transporte del retículo endoplásmico al aparato de Golgi
YPL183C		Desconocido	Función desconocida
YPR070W	MED1	Transcripción	Componente del complejo mediador de la RNA polimerasa II

Tabla 7. Cepas resistentes a nourseotricina que no presentan niveles incrementados de fosforilación de Slt2 respecto a la cepa silvestre. Los mutantes indicados se transformaron con el plásmido pJS05 (*MLP1p-NAT1*) para estudiar su resistencia al antibiótico nourseotricina. Las categorías funcionales y las descripciones fueron asignadas según la información presente en la base de datos *BIOBASE Knowledge Library Proteome*.

activación transcripcional de *MLP1* fueron muy elevados a pesar de prácticamente no detectarse activación de Slt2 (Figura 14b). Desde un punto de vista funcional, Pmt2 cataliza el primer paso en la O-manosilación de proteínas (Lussier *et al.*, 1995) y Ssd1, se ha asociado con la integridad de la pared celular, de hecho, se ha descrito que se une a varios RNA mensajeros que codifican proteínas relacionadas con la pared celular (Kaeberlein y Guarente, 2002; Jansen *et al.*, 2009; Kurischko *et al.*, 2011). A continuación, se procedió a estudiar la participación de la MAPK Slt2 y de Rlm1, principal factor de transcripción de la ruta CWI, en la activación transcripcional observada en ambos mutantes. Para ello, se generaron mutantes dobles *pmt2Δ slt2Δ*, *pmt2Δ rlm1Δ*, *ssd1Δ slt2Δ*, *ssd1Δ rlm1Δ* que se

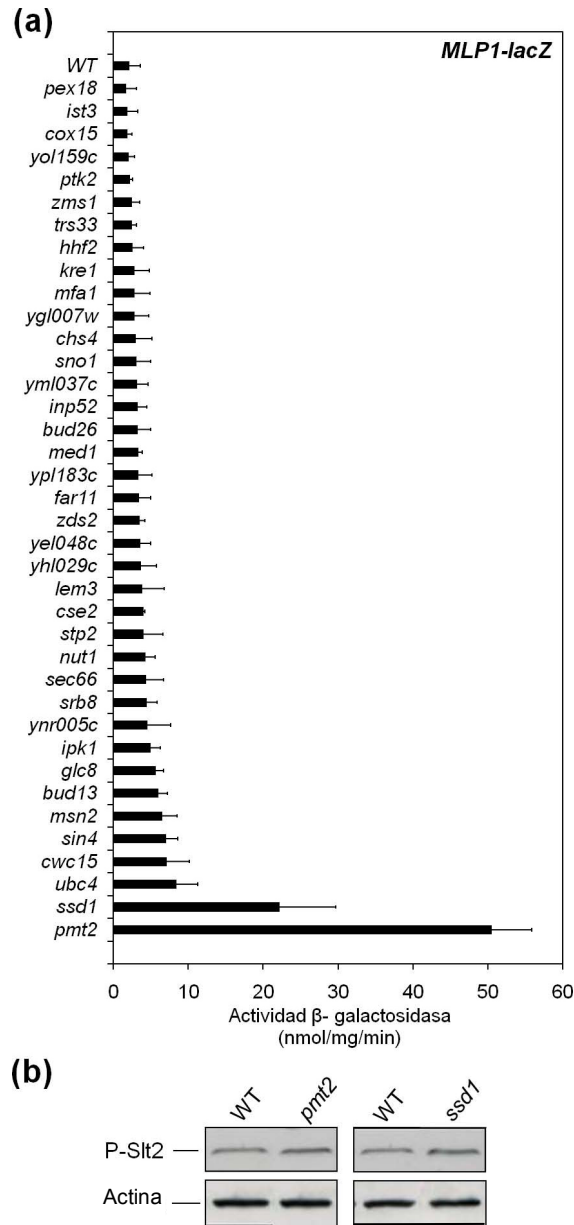


Figura 14. Niveles de expresión de *MLP1* en mutantes que no presentan activación basal de la MAPK Slt2. (a) La expresión de *MLP1-lacZ* fue determinada en la cepa silvestre y en los mutantes indicados creciendo en fase exponencial en medio YPD mediante la cuantificación de la actividad β -galactosidasa en extractos proteicos totales. Se representan los valores medios y la desviación típica del análisis de tres transformantes independientes de cada cepa mutante. (b) Fosforilación de Slt2 en la cepa silvestre y los mutantes *pmt2* Δ y *ssd1* Δ examinada mediante ensayos de *Western Blotting*, utilizando anticuerpos anti-fosfo-p42/p44 MAPK, a partir de extractos proteicos de células creciendo en fase exponencial en YPD. La carga de proteína fue monitorizada utilizando un anticuerpo anti-actina.

transformaron con los plásmidos que expresan las fusiones transcripcionales de los genes *MLP1*, *CWP1* y *SED1* al gen *lacZ* y se realizaron ensayos de actividad β -galactosidasa. Como se muestra en la Figura 15a, la activación de dichos genes en ausencia de los elementos de la ruta, Slt2 o Rlm1, quedó completamente bloqueada en comparación con los mutantes sencillos *pmt2* Δ y *ssd1* Δ . Estos resultados indican que en determinadas situaciones donde no se observan cambios detectables en la activación de la MAPK Slt2 (Figura 14b), existe un

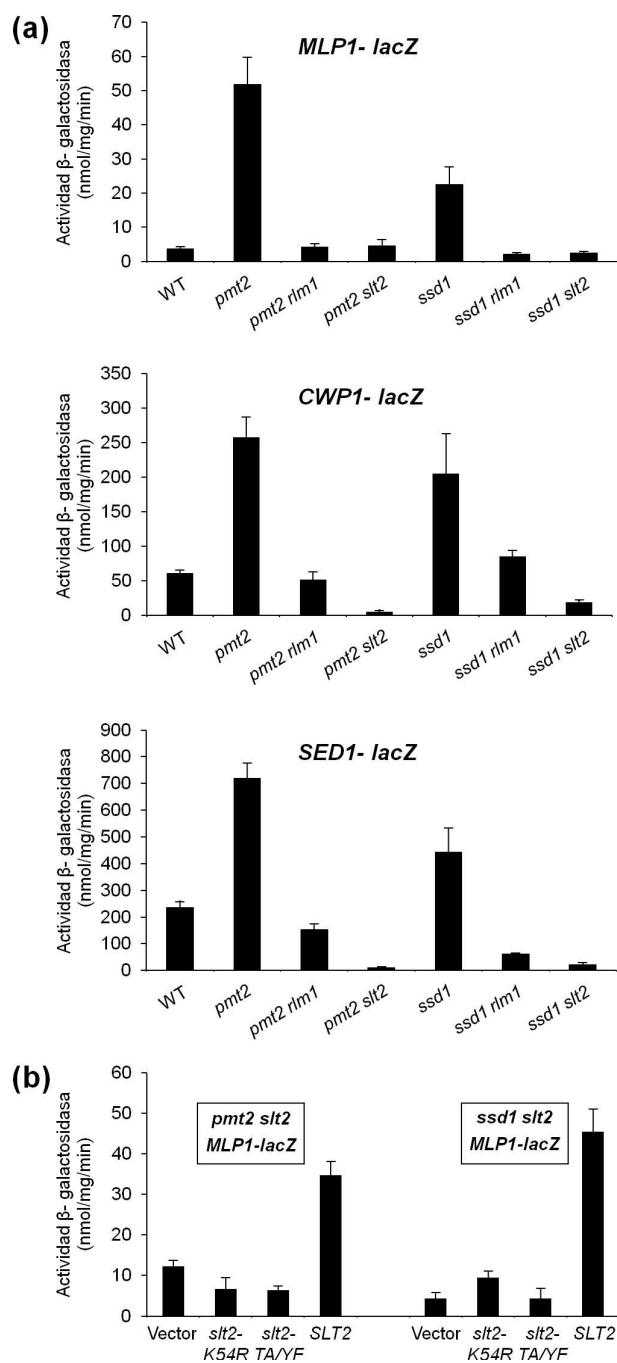


Figura 15. La actividad de la MAPK Slt2 es necesaria para la respuesta transcripcional observada en los mutantes *pmt2Δ* y *ssd1Δ*. (a) Niveles de expresión de *MLP1-lacZ*, *CWP1-lacZ* y *SED1-lacZ* determinados en la cepa silvestre y en los mutantes *pmt2Δ*, *pmt2Δ rlm1Δ*, *pmt2Δ slt2Δ*, *ssd1Δ*, *ssd1Δ rlm1Δ*, *ssd1Δ slt2Δ* mediante ensayos de actividad β-galactosidasa a partir de extractos proteicos de células creciendo en fase exponencial. (b) Expresión de *MLP1-lacZ* en los dobles mutantes *pmt2Δ slt2Δ* y *ssd1Δ slt2Δ* cotransformados con el plásmido *MLP1-lacZ* y con los plásmidos centroméricos que contienen un alelo silvestre *SLT2*, alelos mutados inactivos de *SLT2* (*slt2/mpk1-K54R* y *slt2/mpk1-TA/YF*) o el vector vacío (pRS315). Cada valor representa la media y la desviación típica de tres transformantes independientes.

efecto a nivel de expresión génica de genes regulados por la ruta CWI. Adicionalmente, con objeto de aportar más evidencias sobre la esencialidad de la actividad de Slt2 en la respuesta transcripcional observada en los mutantes *pmt2Δ* y *ssd1Δ*, se transformaron los dobles

mutantes *pmt2Δ slt2Δ* y *ssd1Δ slt2Δ*, además de con la construcción *MLP1-lacZ*, con plásmidos centroméricos que incluían alelos mutantes de Slt2. Por un lado, la variante *slt2-K54R* que presenta una mutación dentro del sitio de unión a ATP que bloquea la actividad catalítica de la proteína. Por otro lado, *slt2-TA/YF*, en el que se impide la fosforilación en el bucle de activación de Slt2 que es normalmente fosforilado por las MAPKKs Mkk1/Mkk2. Ambos alelos de Slt2 fueron incapaces de restaurar la expresión de *MLP1-lacZ* en los dobles mutantes *pmt2Δ slt2Δ* y *ssd1Δ slt2Δ* indicando la necesidad de la actividad catalítica de Slt2 para la activación transcripcional (Figura 15b).

BLOQUE II: CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DEL GEN *YPL158C*

Como se ha descrito en el bloque anterior de esta memoria, el rastreo genómico desarrollado ha permitido identificar nuevos genes potencialmente implicados en procesos de construcción y regulación de la pared celular de *S. cerevisiae*. Estos estudios genómicos, de hecho, constituyen un punto de partida para el diseño y desarrollo de estudios funcionales centrados en genes específicos. Dentro de este segundo bloque de trabajo se ha iniciado la caracterización funcional de uno de los genes de función desconocida identificado en el rastreo genómico, el gen *YPL158C*. Este gen fue seleccionado debido a la existencia de datos previos que sugerían su posible relación con la pared celular y morfogénesis.

La proteína codificada por el gen *YPL158C* está constituida por 758 aminoácidos, con un peso molecular teórico aproximado de 84,8 KDa. La secuencia aminoacídica de esta proteína es rica en serinas (15%) y en su extremo C-terminal presenta una región rica en residuos de glutámico (54%/50 últimos residuos). Según la base de datos Phosphopep (<http://www.phosphopep.org>) se han identificado seis fosfopéptidos en esta proteína en condiciones normales de crecimiento de la levadura lo que indica que se trata de una fosfoproteína.

La proteína Ypl158c no presenta homología significativa con otras proteínas de *S. cerevisiae* depositadas en las bases de datos, aunque si se observó similitud en su secuencia ($\approx 30\%$) con proteínas presentes en otros hongos como *Zygosaccharomyces rouxii*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Candida glabrata*, *Lachancea thermotolerans* y *Kluyveromyces lactis*.

Se ha descrito que la expresión del gen *YPL158C* depende del factor de transcripción *SWI5* (Doolin *et al.*, 2001), implicado en la regulación de genes específicos en la transición de las fases M/G₁ del ciclo celular (Dohrmann *et al.*, 1992). A su vez, la expresión periódica de *SWI5* durante la transición de las fases G₂/M del ciclo celular está controlada por el complejo transcripcional Mcm1- Fkh2-Ndd1 (Kumar *et al.*, 2000), siendo requerida para la migración al núcleo de Swi5 al comienzo de la fase M la desfosforilación de dicha proteína por la fosfatasa Cdc14 (Visintin *et al.*, 1998). En el núcleo, Swi5 se une a promotores de ciertos genes relacionados con procesos de apareamiento, salida de mitosis y procesos de construcción de la pared celular regulando su expresión (Doolin *et al.*, 2001).

Adicionalmente, como se ha descrito en el Bloque I de esta memoria el mutante

*ypl158c*Δ presenta niveles de activación de Slt2 significativamente superiores a los de la cepa silvestre en condiciones normales de crecimiento, un contenido de quitina incrementado y fenotipos de hipersensibilidad a caspofungina y cafeína, sugiriendo la presencia de posibles alteraciones en la pared celular.

Según datos procedentes de las bases de datos *BIOBASE Knowledge Library Proteome* y *Saccharomyces Genome Database*, la proteína Ypl158c se localiza en la región del cuello en células en división y en el núcleo de la célula. La localización en el cuello ha sido descrita en un estudio global de localización de proteínas de *Saccharomyces cerevisiae* desarrollado por Huh y colaboradores (2003) mediante fusiones proteicas en el extremo C-terminal a la proteína fluorescente GFP. En cuanto a su localización nuclear, se ha determinado mediante inmunofluorescencia indirecta a partir de la fusión del ORF del gen *YPL158C* a la secuencia que codifica el epítipo V5 (de las proteínas P y V de Paramyxovirus SV5) expresada bajo el promotor inducible *GAL1* y alternativamente, utilizando fusiones al epítipo HA bajo el control del promotor nativo del gen (Kumar *et al.*, 2002).

Con intención de determinar el patrón de localización de la proteína Ypl158c en el fondo genético BY4741, se generó una fusión del gen *YPL158C* en su extremo 3' con la secuencia codificante de la proteína fluorescente mCherry (Shaner *et al.*, 2004), para su posterior integración en el locus genómico del gen *YPL158C* mediante recombinación homóloga (ver Materiales y métodos). Como se observa en la Figura 16, la proteína Ypl158c se localizó en la región del cuello en células en división en las que la célula hija ya había alcanzado un elevado tamaño, si bien se consiguió visualizar la proteína en un número reducido de células.

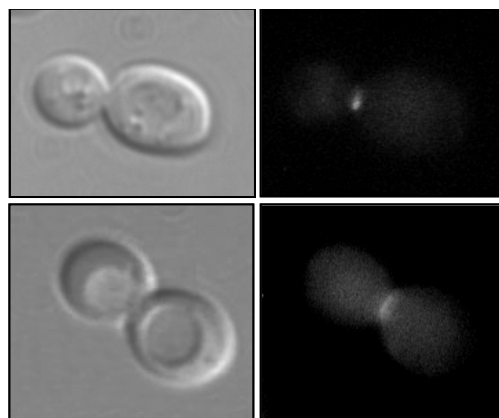


Figura 16. Localización subcelular del la proteína Ypl158c. Las imágenes de la izquierda muestran células visualizadas mediante microscopía de contraste de fases. Las imágenes de la derecha corresponden a la observación mediante microscopía de fluorescencia de la proteína m-Cherry en esas mismas células. Se muestran imágenes de microscopía de células de la cepa BY4741 expresando la versión integrada de la fusión *YPL158C-mCHERRY*, procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento (medio YPD).

Debido a que el gen YPL158C se expresa específicamente durante la transición entre las fases M/G1 del ciclo celular, y que su nivel de expresión es muy bajo según datos previamente publicados (Doolin *et al.*, 2001), se diseñó una estrategia experimental que permitiese incrementar el número de copias de la proteína con el fin de facilitar la visualización de su localización celular. Así, se construyó un plásmido multicopia incluyendo la versión YPL158C-mCHERRY bajo el control del promotor nativo. Posteriormente, se transformó el mutante *yp158cΔ* con el plásmido generado y se procedió a su observación microscópica. La proteína Ypl158c se localizó en una región perinuclear, como se deduce de la observación de las mismas células teñidas con DAPI, acumulándose en algunos puntos concretos, no apreciándose su localización en la zona del cuello como se observó en el caso de la cepa que llevaba integrada la fusión YPL158C-mCHERRY (Figura 16). De cualquier forma en algunos casos existe cierta colocalización de la señal de DAPI y la de la proteína Ypl158c (Figura 17). Aunque aparentemente el plásmido multicopia generado era capaz de revertir el fenotipo morfológico del mutante *yp158cΔ*, el hecho de observar una localización

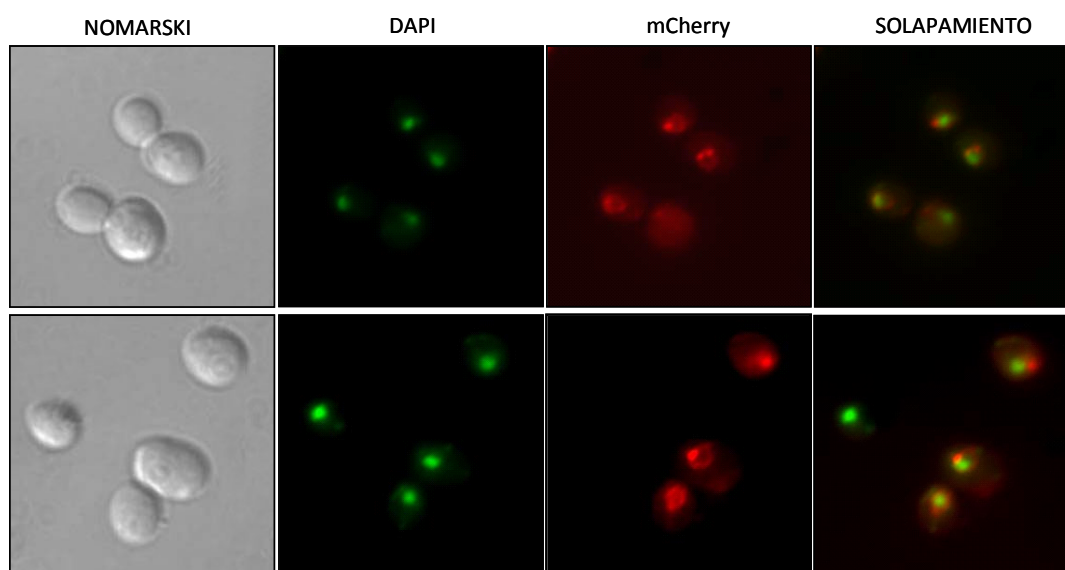


Figura 17. Localización subcelular de la fusión Ypl158c-mCherry utilizando como herramienta un plásmido multicopia. Células del mutante *yp158cΔ* transformadas con el plásmido multicopia YEp352-YPL158C-mCHERRY fueron crecidas hasta fase exponencial de crecimiento en medio líquido YPD para su posterior observación microscópica. Se muestran imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases (Nomarski) e imágenes de las mismas células tomadas mediante microscopía de fluorescencia donde se visualizan los núcleos (DAPI), la proteína de fusión m-Cherry y el solapamiento de los dos canales. Antes de su visualización las células se fijaron previamente con etanol 70% y se tiñeron con DAPI (50 ng/ml).

diferente a la esperada de la proteína nos llevó a determinar si dicha construcción era funcional y por tanto capaz de complementar no sólo el fenotipo morfológico sino el fenotipo de sensibilidad a caspofungina y cafeína del mutante, así como la activación de la

ruta de integridad celular que origina la delección del gen *YPL158C*. En la Figura 18a se muestran ensayos de sensibilidad mediante la técnica de siembra por dilución en gota del mutante *ypl158cΔ* transformado con el plásmido vacío YEp352 y con el plásmido que porta la construcción *YPL158C-mCHERRY*. Se observa que el mutante *ypl158cΔ* transformado con el plásmido *YPL158C-mCHERRY* presentó un comportamiento similar al de la cepa silvestre tanto en los niveles de crecimiento en presencia de cafeína y caspofungina (Figura 18a), como en a la fosforilación de Slt2 (Figura 18b). Estos resultados demuestran la funcionalidad de la construcción generada.

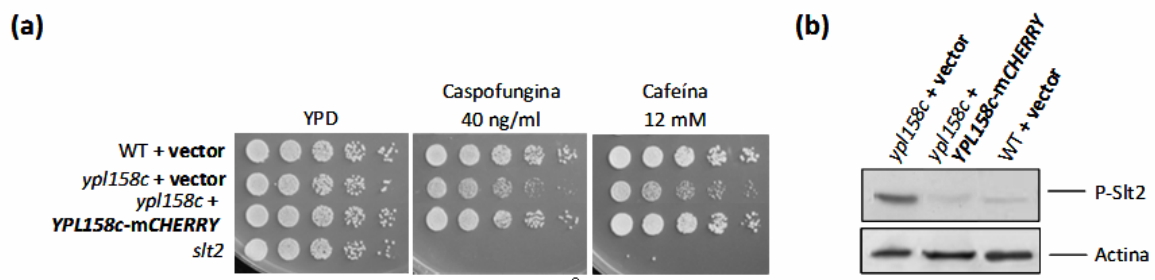


Figura 18. Estudios funcionales de la fusión *YPL158C-mCHERRY* expresada desde su promotor nativo presente en un plásmido multicopia. (a) Ensayo fenotípico mediante la técnica de siembra por dilución en gota del mutante *ypl158cΔ* transformado con el plásmido vacío YEp352, con el plásmido YEp352-*YPL158C-mCHERRY* en medio sólido suplementado con Caspofungina (40 ng/ml) y Cafeína (12mM). Se partió de cultivos con D.O.₆₀₀ ≈ 0,2 (aproximadamente $1,5 \times 10^4$ células en 5 μ l) y se hicieron 4 diluciones seriadas 1/5. La cepa silvestre transformada con el plásmido vacío y el mutante *slt2Δ* se incluyeron como control del ensayo. **(b)** Análisis mediante *Western Blotting* de los extractos proteicos de las mismas cepas crecidas en medio YPD hasta fase exponencial de crecimiento para determinar la fosforilación de Slt2 utilizando anticuerpos anti-fosfo-Slt2. La carga de proteína fue monitorizada utilizando un anticuerpo anti-actina.

1. Estudio de los efectos asociados a la activación de la ruta en el mutante *ypl158cΔ*

Dentro de este apartado se han analizado e identificado elementos de la ruta de integridad celular implicados en la señalización/activación de la misma como consecuencia de la delección del gen *YPL158C*, así como su implicación en la regulación de la respuesta transcripcional asociada a la fosforilación de la MAPK Slt2. Para lograr estos objetivos se han construido mutantes dobles deleccionando el gen *YPL158C* en combinación con diferentes genes de la ruta CWI. Además, el análisis fenotípico de dichos mutantes nos ha permitido asociar la activación de la ruta con supervivencia celular en situaciones de estrés sobre la pared celular en el mutante *ypl158cΔ*.

1.1. Construcción de cepas delecionadas en el gen *YPL158C* en combinación con elementos de a ruta CWI. Estudios de viabilidad

Como punto de partida se procedió a deleccionar elementos importantes de la ruta CWI en un fondo genético *ypl158cΔ*. Así, se obtuvieron dobles mutantes deleccionando los genes de los principales sensores de la ruta *MID2* Y *WSC1*, *ROM2* que codifica para la GEF mas caracterizada de la GTPasa Rho1 y *SLT2* (MAPK de la ruta CWI).

Un aspecto que se puso de manifiesto al cultivar los dobles mutantes indicados es que en algunos casos se apreciaron problemas de crecimiento. De hecho, en el caso del doble mutante *slt2Δ ypl158cΔ* este fenotipo (sintético enfermo) ha sido descrito previamente (Tong *et al.*, 2004).

Con el fin de valorar el efecto sobre la viabilidad celular de las dobles deleciones de los elementos elegidos de la ruta CWI con el gen *YPL158C* se procedió a recoger células de cada cepa en fase exponencial de crecimiento y tras su tinción con ioduro de propidio (IP), se analizaron los perfiles de emisión de fluorescencia debido a este compuesto mediante citometría de flujo. Como se observa en la Figura 19, en las muestras de los mutantes

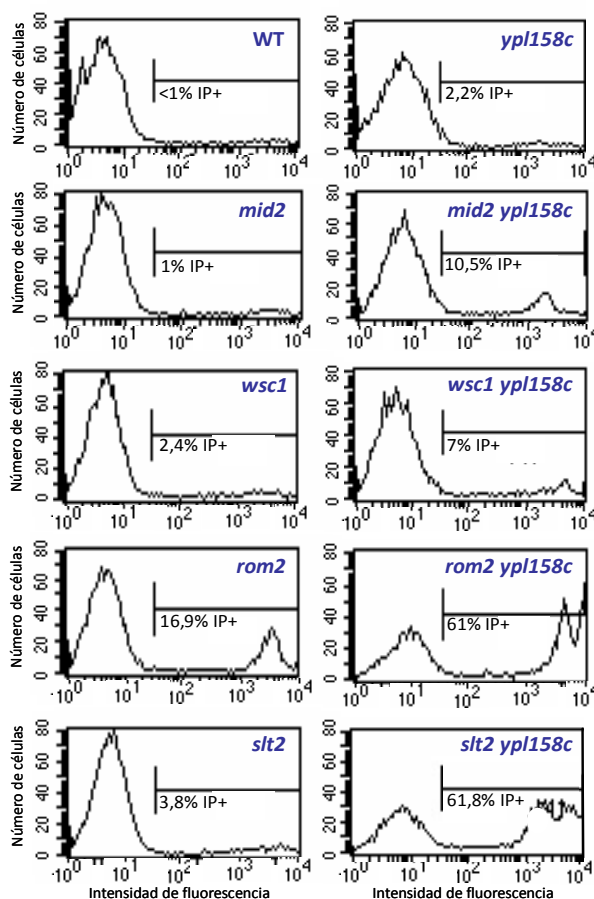


Figura 19. Estudios de viabilidad celular mediante citometría de flujo de los dobles mutantes (*mid2Δ ypl158cΔ*, *wsc1Δ ypl158cΔ*, *rom2Δ ypl158cΔ* y *slt2Δ ypl158cΔ*). Células de las cepas mutantes indicadas procedentes de cultivos en fase exponencial en medio YPD fueron recogidas por centrifugación, resuspendidas en PBS y teñidas con IP (0,05 mg/ml). Posteriormente se analizaron las muestras mediante citometría de flujo. Se incluyen histogramas correspondientes a los perfiles de fluorescencia representativos de cada mutante ensayado, llevando como control del ensayo la cepa silvestre. El porcentaje que se muestra bajo la zona acotada corresponde a la población ioduro de propidio positiva.

sencillos el porcentaje de células IP positivas (afectación de la permeabilidad selectiva) fue muy bajo (1-3%) próximos a los valores habituales de la cepa silvestre, excepto en el caso del mutante *rom2Δ* que presentó un porcentaje próximo a un 17%. Por el contrario, en el caso de los dobles mutantes (Figura 19) el porcentaje de células marcadas con IP en el caso de las cepas *wsc1Δ ypl158cΔ* y *mid2Δ ypl158cΔ* aumentó ligeramente (7 % y 11%, respectivamente) incrementándose drásticamente estos valores en el caso de los dobles mutantes *rom2Δ ypl158cΔ* y *slt2Δ ypl158cΔ* llegando a un 60%, lo cual indica que las dobles deleciones de estos genes afectan significativamente a la viabilidad celular.

1.2. La ausencia de la proteína Ypl158c conduce a una activación de la MAPK Slt2 dependiente del sensor Wsc1 y de la GTPasa Rho1

En primer lugar, con intención de determinar si la activación de Slt2 en el mutante *ypl158cΔ* era el resultado de algún tipo de estrés sobre la superficie celular o si por el contrario, se debía a conexiones laterales a otros niveles de la ruta CWI, se determinaron los niveles de fosforilación de Slt2 mediante ensayos de *Western Blotting*, en los dobles mutantes *mid2Δ ypl158cΔ* y *wsc1Δ ypl158cΔ*, así como en los mutantes sencillos *mid2Δ*, *wsc1Δ* e *ypl158cΔ*. Como se muestra en la Figura 20b, los niveles de fosforilación de Slt2 en el mutante *wsc1Δ ypl158cΔ* se encontraron bloqueados. Sin embargo, los niveles alcanzados en el doble mutante *mid2Δ ypl158cΔ* fueron similares a los de la cepa *ypl158cΔ* y muy superiores a los del mutante *mid2Δ* o la cepa silvestre. Este resultado indica que la activación de la ruta CWI en el mutante *ypl158cΔ* depende del sensor *wsc1Δ*.

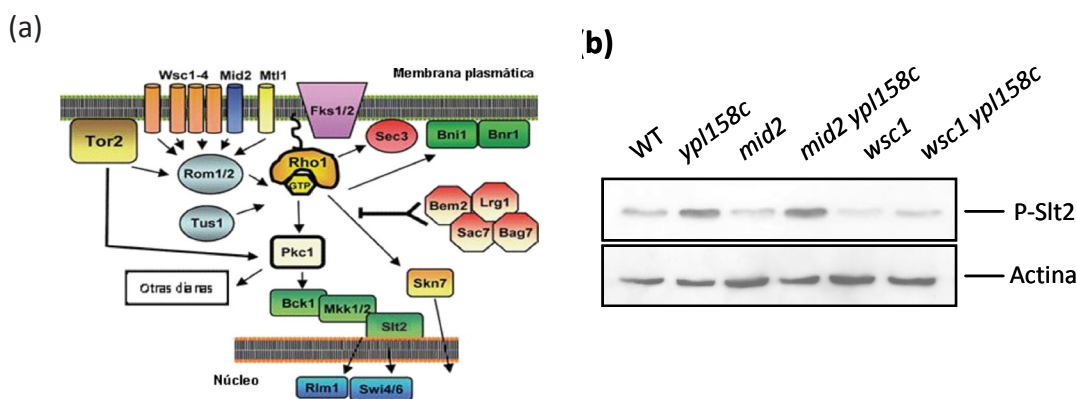


Figura 20. La fosforilación de la MAPK Slt2 en el mutante *ypl158cΔ* depende del sensor *Wsc1*. (a) Esquema de la ruta CWI donde se muestran sus principales componentes y otros elementos reguladores (tomado de Perez y Rincón, 2010). (b) Análisis de los niveles de fosfo-Slt2 y actina (como control de carga) de los extractos proteicos totales de los mutantes sencillos (*mid2Δ*, *wsc1Δ* e *ypl158cΔ*) y dobles (*mid2Δ ypl158cΔ* y *wsc1Δ ypl158cΔ*) mediante *Western Blotting* utilizando anticuerpos anti-fosfo-p42/p44 y anti-actina, respectivamente. Las células fueron cultivadas en medio YPD durante toda la noche a 24°C, posteriormente, tras el refresco del cultivo durante 6 horas en iguales condiciones desde una D.O.₆₀₀ ≈ 0,2 se recogieron las células para su procesamiento.

A continuación, se procedió a analizar si la señal vía Wsc1 era transmitida a Rho1 a través de su principal GEF, Rom2 (Figura 21a). Siguiendo la misma estrategia experimental se analizó el estatus de fosforilación de la MAPK Slt2 en el doble mutante *rom2Δ ypl158cΔ* comparándolo con el de los correspondientes mutantes sencillos y la cepa silvestre. En este caso, la ausencia de *ROM2* redujo los niveles de fosfo-Slt2 observados en el mutante *ypl158cΔ* hasta los niveles basales del mutante *rom2Δ*, que son ya de por sí elevados como se ha descrito anteriormente. De forma alternativa, se procedió a examinar directamente la dependencia de la GTPasa Rho1 mediante una estrategia experimental que permitiese inhibir su función, teniendo en cuenta que la delección del gen correspondiente es letal para la levadura (Qadota *et al.*, 1996). Sac7 es un regulador negativo de la ruta CWI que actúa directamente sobre Rho1 inhibiendo la actividad de esta proteína sobre Pkc1 (Martin *et al.*, 2000). Partiendo de esta premisa, se decidió sobreproducir Sac7 en el mutante *ypl158cΔ*. Para realizar este ensayo, se transformó la cepa silvestre BY4741 y la mutante isogénica *ypl158cΔ* con un plásmido que contenía el ORF de *SAC7* fusionado a un fragmento de la proteína A de *Staphylococcus aureus* bajo el control del promotor *GAL1* (BG1805-*SAC7*), de tal forma que en presencia de galactosa en el medio de cultivo se indujera la expresión del gen. Como se observa en la Figura 21b, cuando se sobreexpresa *SAC7* en el mutante *ypl158cΔ* se reduce significativamente la fosforilación de Slt2 que se observa en los cultivos crecidos en YPD (expresión de *SAC7* bloqueada). Por tanto, estos resultados indican que Rho1 participa en la activación de la ruta CWI en el mutante *ypl158cΔ*.

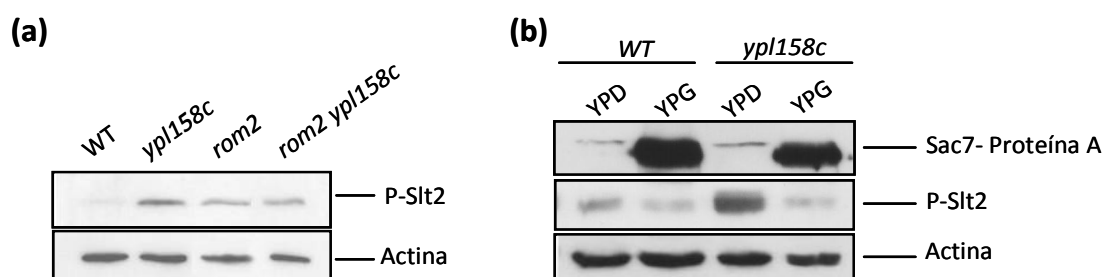


Figura 21. La actividad de la GTPasa Rho1 es necesaria para la activación de la ruta CWI en el mutante *ypl158cΔ*. (a) Análisis de los niveles de fosfo-Slt2 y actina (como control de carga) de los extractos proteicos de los mutantes sencillos *rom2Δ* y *ypl158cΔ* y del doble *rom2Δ ypl158cΔ* mediante *Western Blotting* utilizando anticuerpos anti-fosfo-p42/p44 y anti-actina, respectivamente (b) Análisis mediante *Western blotting* de los extractos proteicos procedentes de las cepas isogénicas BY4741 (*WT*) y *ypl158cΔ* transformadas con el plásmido BG1805-*SAC7* para determinar la fosforilación de Slt2, utilizando anticuerpos anti-fosfo-Slt2. Las células fueron cultivadas en medio selectivo SR-Ura utilizando rafinosa como fuente de carbono durante toda la noche a 24°C. A continuación, se transfirieron los cultivos a medios YPGal e YPD, dejando el cultivo a una D.O.₆₀₀ ≈ 0,2 y tras 6 horas de incubación a 24°C, se recogieron las células. La carga de proteína fue monitorizada utilizando un anticuerpo Anti-actina.

1.3. Análisis de la activación transcripcional de genes implicados en la respuesta a daños sobre la pared celular dependientes de la ruta CWI

En este apartado del trabajo se plantearon dos objetivos. En primer lugar, cuantificar de forma directa la activación transcripcional del gen *MLP1* en el mutante *yp158cΔ*, utilizado originalmente como herramienta para la identificación y selección de dicho mutante, extendiendo el estudio a otro gen adicional cuya expresión se incrementa en situaciones de estrés sobre la pared celular, con el fin de descartar una respuesta transcripcional específica de *MLP1*. En segundo lugar, utilizando las cepas mutantes descritas en el punto anterior, poder conocer como se relacionan en este caso la activación transcripcional y la fosforilación de la MAPK Slt2.

Con este fin, los dobles mutantes *mid2Δ yp158cΔ*, *wsc1Δ yp158cΔ*, *rom2Δ yp158cΔ* y *slt2Δ yp158cΔ* junto con los correspondientes mutantes sencillos y la cepa silvestre se transformaron con plásmidos que incluyen las regiones promotoras de los genes *MLP1* o *SED1* (cuya expresión es inducida en respuesta a múltiples estreses sobre la pared celular) fusionadas al gen *lacZ*. Como se observa en la Figura 22a, los niveles de expresión de *MLP1* en el mutante *yp158cΔ* en condiciones basales, se encuentran significativamente incrementados, $\approx 6,7x$ respecto a los observados en la cepa silvestre, siendo de nuevo este efecto dependiente totalmente de Slt2 y mayoritariamente del sensor Wsc1 (1,5x). Sin embargo, no se observó un efecto significativo en ausencia del sensor Mid2. Es destacable, que a pesar de la elevada expresión de *MLP1* en el mutante *rom2Δ*, los valores obtenidos en el mutante *rom2Δ yp158cΔ* son similares a éste, pero claramente inferiores a los observados en el mutante sencillo *yp158cΔ*, sugiriendo su participación en la respuesta transcripcional en estudio. En el caso de los ensayos realizados utilizando el promotor de gen *SED1* se han obtenido resultados similares (Figura 22b) aunque en este caso la ventana de activación transcripcional de *yp158cΔ* vs WT fue menor (3x). Estos datos apoyan de nuevo el papel destacado del sensor Wsc1 y de Slt2 en la activación de la ruta CWI y de la respuesta transcripcional asociada en el mutante *yp158cΔ*.

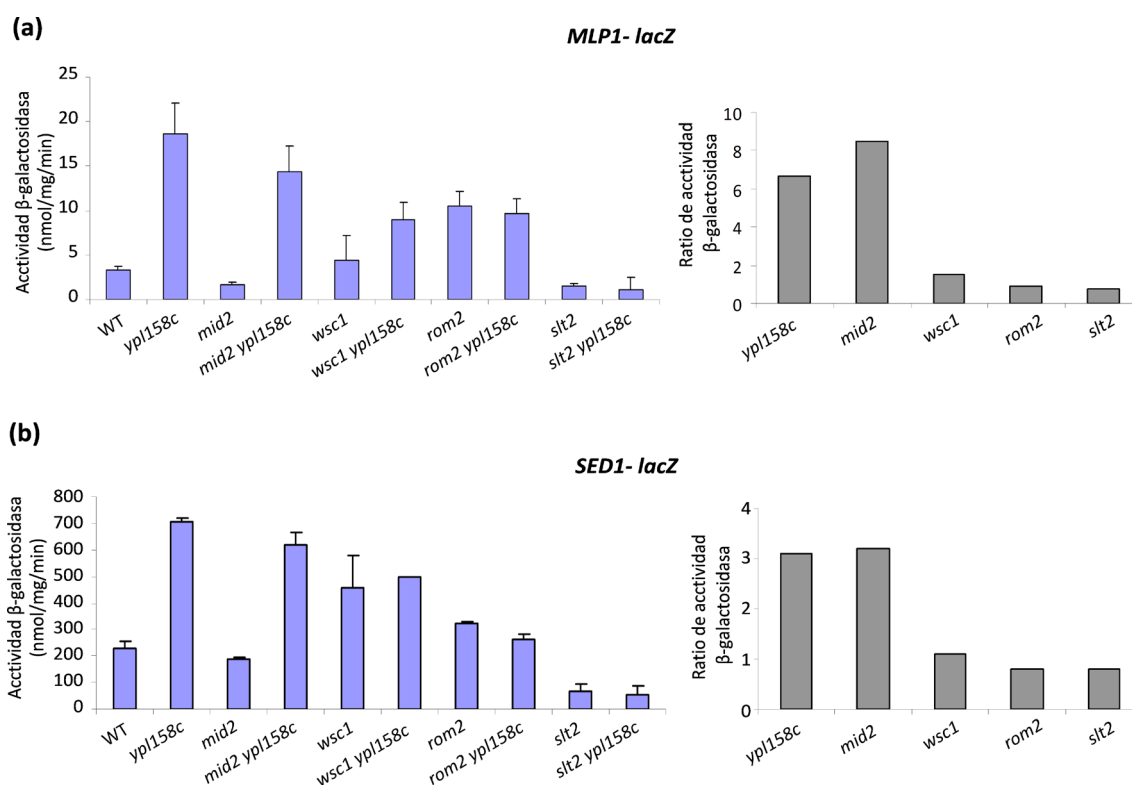


Figura 22. Análisis de la respuesta transcripcional de los dobles mutantes (*mid2Δ ypl158cΔ*, *wsc1Δ ypl158cΔ*, *rom2Δ ypl158cΔ* y *slt2Δ ypl158cΔ*) y de los mutantes sencillos (*mid2Δ*, *wsc1Δ*, *rom2Δ*, *slt2Δ* y *ypl158cΔ*). Las barras corresponden a los niveles de expresión de *MLP1-lacZ* (a) y *SED1-lacZ* (b) observados en los mutantes analizados y en la cepa silvestre. Se llevaron a cabo tres ensayos para calcular la media y la desviación estándar de la actividad β-galactosidasa utilizando transformantes diferentes. Los histogramas de la derecha hacen referencia al ratio de actividad β-galactosidasa del mutante *ypl158cΔ* respecto a la cepa silvestre y de cada mutante sencillo respecto a los dobles mutantes correspondientes (fondo *ypl158cΔ*)

1.4. Determinación del contenido en quitina en ausencia de elementos de la ruta en el mutante *ypl158cΔ*

Con el objeto de estudiar si la activación de Slt2 se podría asociar con el incremento de quitina en la pared celular que presenta el mutante *ypl158cΔ*, como ya se describió anteriormente en esta memoria, se procedió a cuantificar el contenido en quitina mediante análisis por citometría de flujo en la batería de dobles mutantes en estudio. Así, se tiñeron las células procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento con Blanco de Calcofluor y se determinó la intensidad de fluorescencia de esta sustancia en cada uno de los mutantes ensayados. El incremento en el contenido en quitina observado en el mutante *ypl158cΔ* fue totalmente dependiente de la MAPK Slt2 (Figura 23). De forma similar, el doble mutante *wsc1Δ ypl158cΔ* presentó un contenido en quitina ligeramente superior al de la cepa silvestre y al mutante *wsc1Δ*, aunque inferior al del mutante *ypl158cΔ*. Sin embargo, la cantidad de este polímero en el doble mutante *mid2Δ ypl158cΔ* fue similar a la del mutante *ypl158cΔ*, no viéndose alteración significativa en el mutante *mid2Δ*. No esperable es el resultado obtenido en el caso del doble mutante *rom2Δ ypl158cΔ* ya que

en lugar de reducirse los niveles de quitina respecto a los valores observados en el mutante sencillo *ypl158cΔ*, estos se encuentran más incrementados, no observándose alteración significativa en el mutante sencillo *rom2Δ*. Todos estos resultados se correlacionan en gran medida con los niveles de fosforilación de Slt2 observados en dichos mutantes (Figuras 20b y 21a) e indican que la activación de la ruta CWI es la responsable del incremento de quitina desencadenado como respuesta de adaptación frente a la ausencia de la proteína Ypl158c.

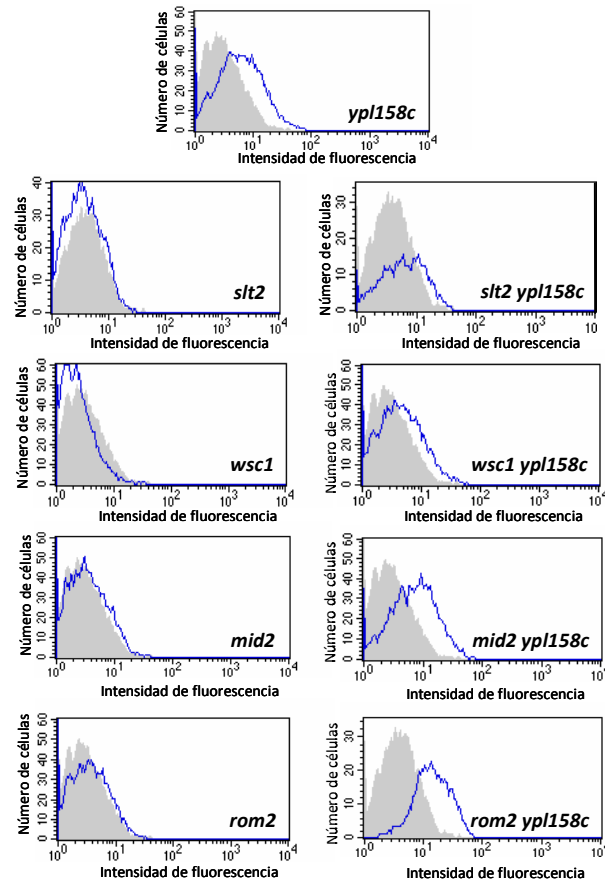


Figura 23. El incremento en el contenido en quitina del mutante *ypl158cΔ* depende del sensor *Wsc1* y de la MAPK *Slt2*. Se muestra la determinación del contenido en quitina, mediante citometría de flujo, de los mutantes sencillos (*ypl158cΔ*, *mid2Δ*, *wsc1Δ*, *rom2Δ*) y dobles (*mid2Δ ypl158cΔ*, *wsc1Δ ypl158cΔ*, *rom2Δ ypl158cΔ*) tras tinción de las células con Blanco de Calcofluor. Para cada mutante ensayado (línea azul), se incluye en cada representación el histograma (área coloreada) que corresponde al perfil de la cepa silvestre (BY4741) analizada en paralelo.

1.5. La ausencia de elementos de la ruta en el mutante *yp158cΔ* conduce a fenotipos de sensibilidad exacerbados en presencia de compuestos que afectan a la integridad celular

Con objeto de identificar posibles interacciones genéticas a nivel de integridad celular entre elementos de la ruta CWI y el gen *YPL158C*, se realizó un análisis fenotípico de los dobles mutantes generados (*mid2Δ ypl158cΔ*, *wsc1Δ ypl158cΔ*, *rom2Δ ypl158cΔ* y *slt2Δ ypl158cΔ*) y de sus respectivos mutantes sencillos (*mid2Δ*, *wsc1Δ*, *rom2Δ*, *slt2Δ* e *yp158cΔ*). Así, se determinó la sensibilidad a diferentes compuestos como Rojo Congo, Cafeína, SDS y Caspofungina mediante el método de siembra por dilución en gota en medio sólido. Como se observa en la Figura 24, la ausencia del sensor *Wsc1* o la GEF *Rom2* en el mutante *yp158cΔ* conduce a un incremento significativo de la sensibilidad frente a Rojo Congo. Del mismo modo los dobles mutantes *mid2Δ ypl158cΔ* y *wsc1Δ ypl158cΔ* presentaron mayor sensibilidad a cafeína que los correspondientes mutantes sencillos isogénicos. Es importante destacar que debido a la elevada sensibilidad a muchas de las sustancias ensayadas de los mutantes *slt2Δ* y *rom2Δ* no es descartable que la ausencia del gen *YPL158C* en estos fondos genéticos pueda agravar los fenotipos de base en estos dos mutantes.

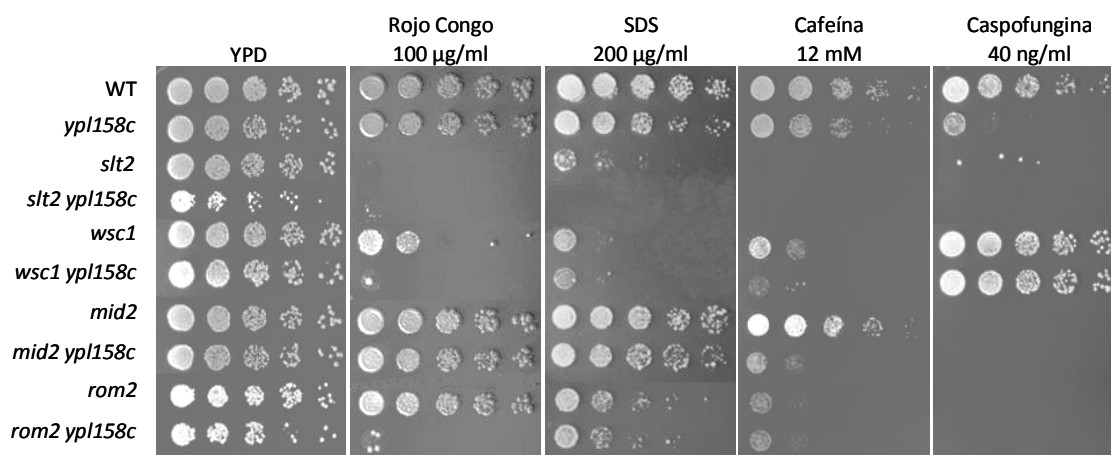


Figura 24. Análisis de sensibilidad frente a compuestos que afectan a la integridad celular de los dobles mutantes (*mid2Δ ypl158cΔ*, *wsc1Δ ypl158cΔ*, *rom2Δ ypl158cΔ* y *slt2Δ ypl158cΔ*) y de los mutantes sencillos (*mid2Δ*, *wsc1Δ*, *rom2Δ*, *slt2Δ* y *yp158cΔ*). Ensayo fenotípico mediante la técnica de siembra por dilución en gota de los distintos mutantes en medio sólido (YPD) suplementado con Rojo Congo (100 µg/ml), SDS (200 µg/ml), Cafeína (12mM) y Caspofungina (40 ng/ml). Se partió de cultivos con D.O₆₀₀ 0,2 (aproximadamente 1,5 x 10⁴ células en 5 µl) y se hicieron 4 diluciones seriadas 1/5 en YPD. A continuación, utilizando un replicador se transfirieron 5 µl de cada dilución sobre cada placa de Petri que contenía el medio de cultivo a ensayar. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 30°C. La cepa silvestre (BY4741) se incluyó como control del ensayo.

2. Relación de la proteína Ypl158c con procesos morfogenéticos en *S. cerevisiae*

Como se ha comentado en el Bloque I de resultados, la ausencia del gen *YPL158C* conduce a un incremento del contenido en quitina respecto a la cepa silvestre. Este hecho, unido a que el mutante *yp158cΔ* presenta sensibilidad a determinados compuestos que afectan a la integridad celular, podría sugerir una posible participación de la proteína Ypl158c en procesos de construcción de la pared celular y/o morfogénesis. Con objeto de estudiar en mayor profundidad su implicación en ambos procesos, se ha desarrollado la parte del trabajo que se presenta a continuación.

2.1. La delección del gen *YPL158C* da lugar a un fenotipo de multigemación

Con intención de determinar si la ausencia del gen *YPL158C* conducía a algún fenotipo morfológico en la célula que pudiese sugerir la participación de la proteína codificada por dicho gen en procesos morfogenéticos, se procedió a la observación microscópica del mutante *yp158cΔ*. Así, se visualizaron mediante microscopía de contraste de fases las células en fase exponencial de crecimiento a 24°C en medio YPD. Como se observa en la Figura 25, en algunas células del mutante se manifestó un fenotipo de multigemación, fundamentalmente una célula madre con dos células hijas, lo cual podría indicar que la célula madre inicia un nuevo ciclo celular sin haber completado el anterior.

Con el fin de determinar el porcentaje de la población celular que presentaba este fenotipo morfológico, así como la distribución porcentual de células en diferentes estadios del ciclo celular en un cultivo asincrónico del mutante, se realizó un estudio fenotípico cuantitativo utilizando como control del ensayo la cepa silvestre. Para ello, se crecieron ambas cepas en medio YPD, y se tomaron dos muestras de cada cultivo en fase exponencial de crecimiento para su posterior observación en el microscopio de contraste de fases. Una de las muestras se sometió previamente a sonicación leve con el fin de descartar que el fenotipo morfológico del mutante se debiese a la formación de posibles agregados celulares y además, determinar el efecto de este tratamiento en el porcentaje de células multigemadas. En la Tabla 8 se muestra la distribución porcentual de células en cada una de las fases del ciclo celular de ambas cepas y en las dos condiciones ensayadas (con y sin sonicación). A partir de los datos obtenidos, se observó que el porcentaje de células multigemadas presente en la cepa silvestre tanto en la muestra no sometida a sonicación previa como en la que se aplicó este tratamiento, fue prácticamente inexistente (3%). Por el contrario, la proporción de células con dicho fenotipo ascendió al 30% de la población celular total en la muestra del mutante *yp158cΔ* sin sonicar, reduciéndose este valor a un

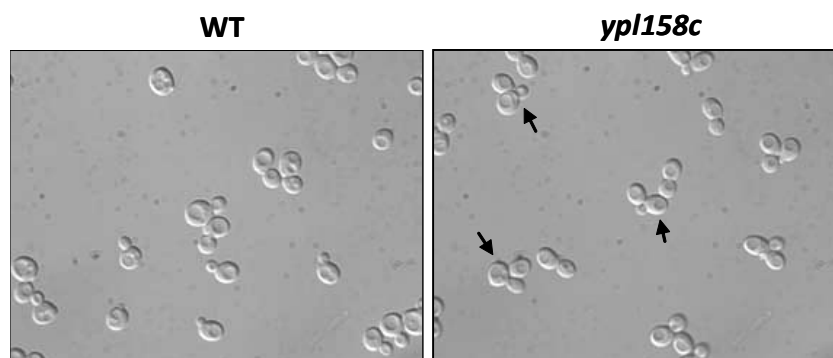


Figura 25. Análisis morfológico del mutante *ypl158cΔ*. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases de la cepa silvestre (BY4741) y del la cepa mutante isogénica *ypl158cΔ*. Las células fueron crecidas en medio YPD a 24°C hasta fase exponencial de crecimiento para su posterior visualización microscópica (objetivo 100x). En la imagen correspondiente al mutante se han señalado con una flecha las células que presentan el fenotipo de multigemación.

10% en el caso de la muestra sonicada, sugiriendo un defecto en la separación celular en el mutante *ypl158cΔ*. Además, del análisis de los resultados obtenidos, se pudo observar una disminución significativa de la población sin yema (fase G₁ del ciclo celular) presente en el mutante *ypl158cΔ* (5%) respecto a la cepa silvestre (19%), aumentando en ambos casos con el tratamiento de sonicación. Este hecho sería esperable ya que la sonicación además de separar los agregados celulares, podría contribuir a separar células hijas de la madre donde el tabique intercelular estuviese lo suficientemente formado como en el caso de los estadios finales del ciclo celular (ver d y e en Tabla 8), incrementándose así la población de células sin yema.

							<i>N</i>
		a	b	c	d	e	
WT	c	19	8	18	52	3	395
	s	31	13	14	40	2	484
<i>ypl158c</i>	c	5	6	9	49	30	540
	s	22	10	16	42	10	342

Tabla 8. Determinación del porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular en cultivos asincrónicos del mutante *ypl158cΔ* y la cepa silvestre. Las células fueron crecidas en medio YPD a 24°C hasta fase exponencial de crecimiento y posteriormente se tomaron dos muestras de cada cultivo. Una de ellas se visualizó directamente mediante microscopía de contraste de fases y la otra se sometió, previamente, a una sonicación leve durante 5 segundos. En la Tabla se muestran para cada cepa y condición ensayada (C, muestra sin sonicación; S, muestra sonicada) los porcentajes de células sin gema (a), células con gema incipiente (b), células con gema pequeña (c), células a punto de separarse (d) y células multigemadas (e).

Debido a que el tratamiento de sonicación reducía el porcentaje de células que presentaban el fenotipo multigemante, se planteó la posibilidad de que el defecto en la separación celular en estas células se debiese a una disminución de la actividad quitinasa. Como se comentó en la Introducción la proteína Cts1 es la principal responsable de esta función en la levadura por lo que se procedió a la sobreexpresión del gen *CTS1* en el mutante *yp1158cΔ*. Para ello se transformó dicho mutante con el plásmido YEpWJR064 que contenía el gen *CTS1* bajo el control del promotor *GAL* (Racki *et al.*, 2000) y se visualizaron varios transformantes en fase exponencial de crecimiento tras 6 y 18 horas de crecimiento en medio YPG a 30°C. En ambos casos no se observó una reducción significativa del porcentaje de células multigemantes, lo cual indica que una disminución de la actividad de Cts1 en el mutante *yp1158cΔ* no sea la responsable del defecto en separación celular observado. Adicionalmente, se evaluó el efecto del tratamiento a 37°C durante 6 horas sobre el fenotipo de multigemación, no observándose variación significativa en el porcentaje de células multigemadas, como si ha sido descrito previamente en algún mutante de levadura con fenotipo morfológico similar (ver discusión).

Con objeto de determinar si el proceso de septación se producía de forma adecuada en las células del mutante *yp1158cΔ* que presentaban el fenotipo de multigemación, se analizaron las células mediante microscopía electrónica de transmisión. En la Figura 26 se muestran fotografías representativas de secciones de células de la cepa silvestre (B) y de la cepa mutante *yp1158cΔ* (C y D). Como se puede observar, en células del mutante *yp1158cΔ* que presentan el fenotipo de multigemación, la formación del septo parece haber finalizado en una de las células hijas mientras que en la otra ni siquiera ha sido iniciada. Además, en las imágenes tomadas con más aumentos (Figura 26E y F), se puede apreciar que, aparentemente, la estructura de dicho septo es normal, observándose en la zona central el septo primario y ambos lados de éste, el septo secundario.

Con objeto de descartar problemas en la división nuclear en el mutante, se procedió a determinar la localización de los núcleos en células del mutante *yp1158cΔ* que mostraban el fenotipo característico. Para ello, se utilizó la tinción con DAPI, un colorante fluorescente que se une al DNA y permite, de esta manera, observar el núcleo celular mediante microscopía de fluorescencia. Así, células en fase exponencial de crecimiento se fijaron y se tiñeron con DAPI para su posterior visualización microscópica. Como se observa en la Figura 27 en las células multigemadas el ciclo celular no se ha detenido, lo que determina la aparición de un núcleo en cada una de las células hijas. Por tanto, las células han completado la mitosis, pero el hecho de que comiencen un nuevo ciclo celular sin desprenderse de la yema anterior,

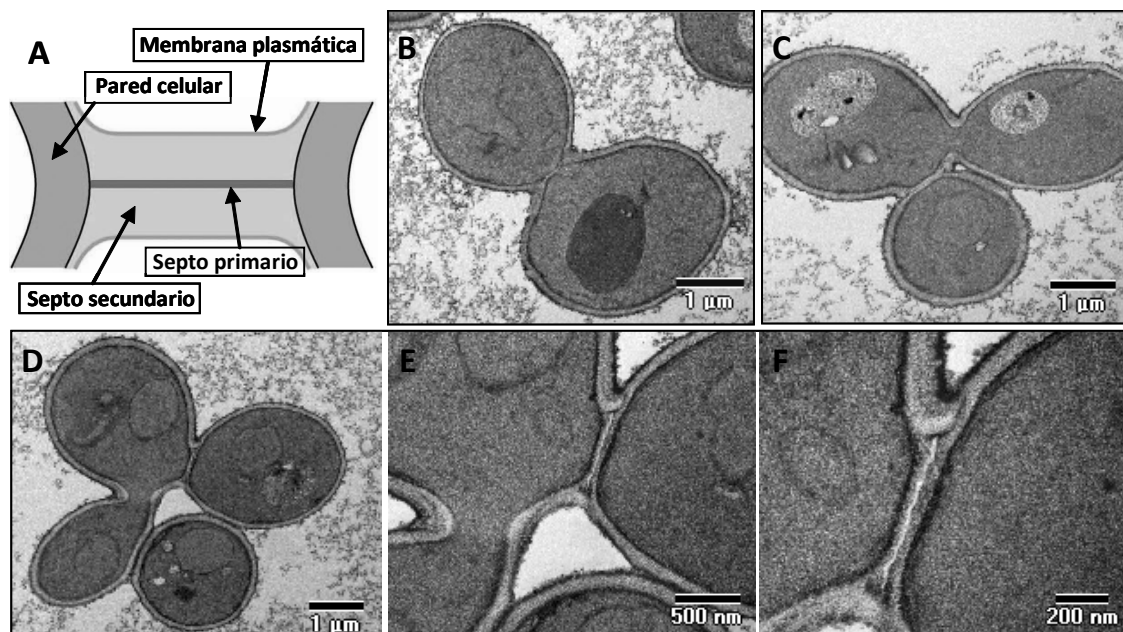


Figura 26. Análisis microscópico del septo en células multigemadas del mutante *ypl158cΔ*. Las células fueron crecidas en medio YPD a 24°C hasta fase exponencial de crecimiento y posteriormente procesadas para su observación mediante microscopía electrónica de transmisión. **(A)** Esquema de la estructura normal del septo en *S. cerevisiae*. **(B)** Célula de la cepa silvestre (BY4741). **(C y D)** Células de la cepa mutante *ypl158cΔ* que presentan el fenotipo multigemante. **(E y F)** Imágenes ampliadas de D. Se observa el septo primario (línea gris claro) y a ambos lados, el septo secundario.

sugiere que estas células estén afectadas en la separación celular o citoquinesis. De hecho, estudios realizados con el mutante *ypl158cΔ* creciendo en medio sólido YPD durante una semana a 24°C, han revelado una reducción significativa de células con el fenotipo multigemante, lo que sugiere que células del mutante que expresan el fenotipo presentan un retardo en el proceso de separación celular (Figura 28).

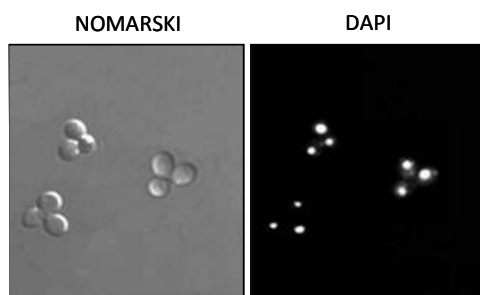


Figura 27. Tinción de núcleos de células multigemadas del mutante *ypl158cΔ*. Las células se cultivaron en medio rico YPD a 24°C hasta fase exponencial de crecimiento. La imagen de la izquierda corresponde a una observación microscópica con contraste de fases de células con el fenotipo característico del mutante. La imagen de la derecha corresponde a la observación mediante microscopía de fluorescencia de las mismas células, fijadas previamente con etanol 70% y tinción con DAPI (50 ng/ml), donde se muestra la localización de los núcleos.

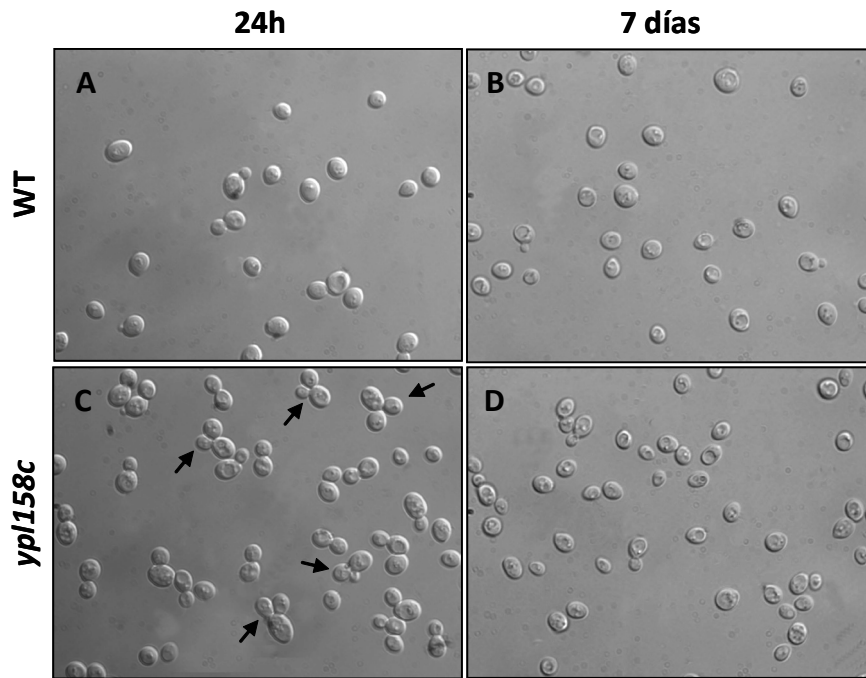


Figura 28. Estudio de fenotipo del mutante *ypl158cΔ* a tiempos largos de crecimiento. Las células se crecieron en medio sólido YPD a 24°C y se procedió a su observación microscópica, mediante microscopía de contraste de fases, cada 24h. (A y C) Células de la cepa silvestre y del mutante *ypl158cΔ*, respectivamente, tras 24h de crecimiento. (B y D)

2.2. Localización del anillo de septinas en el mutante *ypl158cΔ*

Las septinas son proteínas estructurales que se encuentran ensambladas en el cuello de la yema de las células de la levadura como un anillo de microfilamentos. Además de actuar en la selección del sitio de gemación, las septinas participan de manera directa en la citoquinesis: intervienen en el ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina y en la formación del septo. El anillo de septinas comienza a formarse antes de la gemación. Cuando la yema se está formando, dicho anillo se duplica y se separa en dos anillos independientes cuando la célula entra en mitosis. En la citoquinesis, cada uno de los anillos se localiza a un lado del septo, siendo desensamblados una vez que las células se separan y antes de que comience un nuevo ciclo de división.

Debido a que las células que presentan el fenotipo morfológico característico del mutante *ypl158cΔ* podrían presentar un defecto en la separación celular según los resultados obtenidos hasta el momento, se procedió a determinar la localización del anillo de septinas en dicho mutante. Para ello se transformó dicha cepa con el plásmido pLA-10 (Cid *et al.*, 1998) que contenía el gen que codifica para la septina Cdc10 fusionado a GFP. Los transformantes se cultivaron en medio YPD a 24°C hasta fase exponencial de crecimiento

y posteriormente, se observaron mediante microscopía de fluorescencia y confocal. Este último tipo de microscopía permite observar diferentes secciones de una muestra, favoreciendo en nuestro caso el estudio de la localización de los anillos de septinas que, en general, se encuentran en diferentes planos focales en células que expresan el fenotipo de multigemación. En la Figuras 29A y B se presenta la localización normal del anillo de septinas en una cepa silvestre. Se observa la presencia de un doble anillo en la zona de unión entre la célula madre y la célula hija. Al analizar el mutante *yp158cΔ*, en el caso de células madre que tenían unidas dos células hijas, se observó la típica presencia del anillo doble de septinas en la región del cuello de la célula madre y una de las células hijas, mientras que en el caso

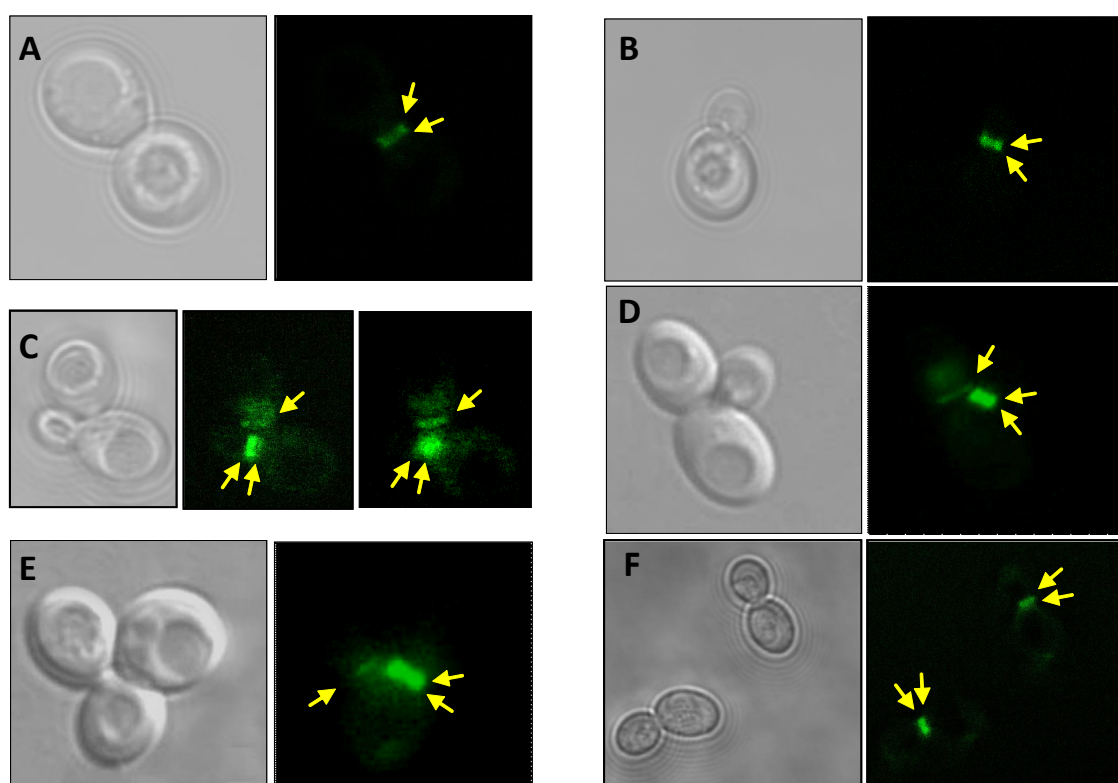


Figura 29. Localización del anillo de septinas en el mutante *yp158cΔ*. La cepa silvestre y el mutante *yp158cΔ* se transformaron con el plásmido pLA10 (*CDC10* fusionado a *GFP*). Los transformantes se cultivaron en medio YPD hasta fase exponencial de crecimiento, donde se procedió a su observación microscópica mediante microscopía confocal. (A y B) Células de la cepa silvestre. (C, D y E) Células del mutante *yp158cΔ* que presentan el fenotipo de multigemación. (F) Células del mutante *yp158cΔ* con patrón de división normal. Las flechas amarillas indican la situación del anillo de septinas.

de la región de unión con la otra célula hija sólo se visualizaba un anillo, aparentemente situado en el lado de la célula hija (Figura 29C, D y E). Estas observaciones parecen indicar que tras un primer evento de división celular no se produce el desensamblaje correcto del anillo de septinas en la célula hija previo a un nuevo proceso de gemación, de tal manera que la separación celular se ve afectada y subsiguientemente la célula madre comienza otro

ciclo celular sin haberse separado de la célula hija. En este segundo proceso de división de nuevo el doble anillo de septinas se ensambla correctamente entre ambas células. Por otro lado, en las células del mutante *yp158cΔ* que mostraron un patrón de división normal la localización y apariencia de los anillos de septinas fue similar a la observada en la cepa silvestre (Figura 29F).

2.3. Estudio de epistasis genética entre el factor de transcripción Swi5 y el gen *YPL158C*

Como se ha comentado anteriormente, la expresión del gen *YPL158C* es controlada por el factor de transcripción Swi5. Además, se ha descrito previamente que la delección de *SWI5* conduce a un fenotipo de células ligeramente agregadas (Dorhmann *et al.*, 1991). Teniendo en cuenta estas premisas, nos propusimos estudiar si existía una relación genética entre el fenotipo del mutante *swi5Δ* y el observado en el mutante *yp158cΔ*. En primer lugar, se procedió a observar en detalle el fenotipo morfológico del mutante *swi5Δ* en el fondo genético BY4741, utilizado a lo largo de este trabajo. La delección del gen *SWI5* originó un fenotipo de células multigemadas similar al identificado en el mutante *yp158cΔ* (Figura 30).

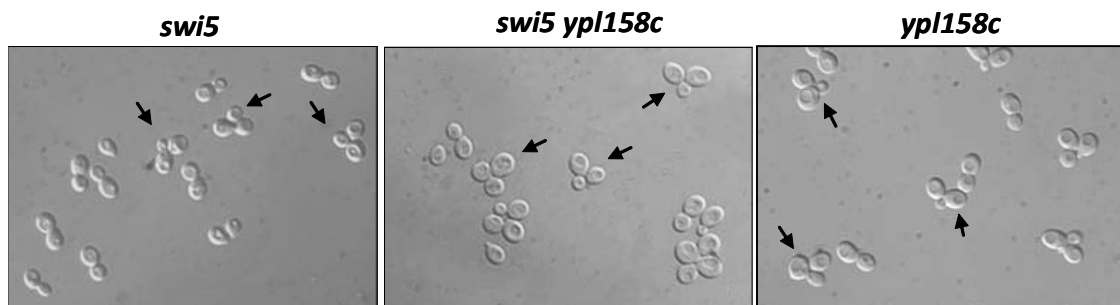


Figura 30. La ausencia de *SWI5* produce un fenotipo de células multigemadas. Imágenes obtenidas mediante microscopía de contraste de fases de las cepas mutantes *swi5Δ*, *swi5Δ ypl158cΔ* y *yp158cΔ*. Las células fueron crecidas en medio YPD a 24°C hasta fase exponencial de crecimiento para su posterior visualización microscópica. Se han señalado con una flecha células que presentan el fenotipo de multigemación.

Con el fin de poder asociar el fenotipo del mutante *swi5Δ* al bloqueo de la expresión del gen *YPL158C*, se generó el doble mutante *swi5Δ ypl158cΔ* y se procedió a su observación mediante microscopía de contraste de fases. En la Figura 30 se observa que el doble mutante presenta un fenotipo similar al de los mutantes sencillos.

Con el objetivo de obtener datos cuantitativos de igual modo a como se procedió en el caso del mutante *yp158cΔ*, se determinó la distribución porcentual de células en los

diferentes estadios celulares en cultivos asincrónicos de los mutantes *swi5Δ* y *swi5Δ ypl158cΔ*. Así, se tomaron muestras de cultivos en fase exponencial de crecimiento y se procedió al recuento de células en cada una de las fases del ciclo celular en las dos condiciones ensayadas (con y sin sonicación). A partir de los datos obtenidos (Tabla 9), se observa que el porcentaje de células multigemadas en las muestras no sometidas a sonicación fue similar en ambas cepas: 22% en el mutante *swi5Δ* y 19% en el doble mutante *swi5Δ ypl158cΔ*, reduciéndose respectivamente estos valores en la muestra sonicada a un 9% y 7%, respectivamente. Si se comparan estos resultados con los obtenidos en el mutante *ypl158cΔ* (Tabla 8) se observa que el porcentaje de células multigemadas en las muestras sometidas a ambos tratamientos fue similar aunque ligeramente superior en dicho mutante: 30% en la muestra sin sonicar y 10% en la muestra sonicada. En cuanto al porcentaje de la población celular sin gema presente en las muestras sin sonicar de los mutantes *swi5Δ* (7%) y *swi5Δ ypl158cΔ* (5%) fue también similar al del mutante *ypl158cΔ* (5%), incrementándose en ambos casos con el tratamiento de sonicación como se observó en el caso de la cepa *ypl158cΔ* (*swi5Δ*, 23% y *swi5Δ ypl158cΔ*, 19%).

Todos estos resultados sugieren la existencia de una interacción genética positiva entre los genes *SWI5* e *YPL158C*, al no observar variación en el fenotipo estudiado entre los mutantes sencillos y el doble.






							N
		a	b	c	d	e	
<i>swi5</i>	C	7	7	8	57	22	668
	S	23	7	14	47	9	410
<i>swi5 ypl158c</i>	C	5	2	16	58	19	220
	S	19	7	18	48	7	222

Tabla 9. Determinación del porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular en cultivos asincrónicos de los mutantes *swi5Δ* y *swi5Δ ypl158cΔ*. Las células fueron crecidas en medio YPD a 24°C hasta fase exponencial de crecimiento y posteriormente se tomaron dos muestras de cada cultivo. Una de ellas se visualizó directamente mediante microscopía de contraste de fases y la otra se sometió, previamente, a una sonicación leve durante 5 segundos. En la Tabla se muestran para cada cepa y condición ensayada (C, muestra sin sonicación; S, muestra sonicada), los porcentajes de células sin gema (a), células con gema incipiente (b), células con gema pequeña (c), células a punto de separarse (d) y células multigemadas (e).

2.4. Análisis de la interacción genética entre el gen *YPL158C* y genes implicados en la construcción de la pared celular y en procesos de separación celular

Para poder obtener información sobre la implicación funcional del gen *YPL158C* en procesos de construcción de la pared y separación celular, se procedió a estudiar posibles interacciones genéticas con genes relacionados con estas funciones celulares. Así, se generaron dobles mutantes delecionados en el gen *YPL158C* y en genes implicados en ambos procesos. En cuanto al grupo relacionado con construcción de la pared celular, se eligieron genes que codifican proteínas relacionadas con la síntesis y ensamblaje de diferentes polímeros presentes en la pared celular como la endo- β -1,3-glucanasa Bgl2; Kre6, proteína requerida para la síntesis del β -1,6-glucano que recientemente se ha descrito que se acumula en sitios de crecimiento polarizado (Kurita *et al.*, 2011); Crh1 y Crh2, transglucosilasas requeridas para la unión de la quitina al β -1,3 y β -1,6-glucano; Gas1, con función β -1,3-glucanosiltransferasa; Fks1, subunidad catalítica de la β -1,3-glucan sintasa y Chs3, principal proteína responsable de la síntesis de quitina en la pared celular.

En referencia al grupo de genes relacionados con procesos de separación celular, se han seleccionado los genes que codifican Cdc10, componente del anillo de septinas; Cla4, protein quinasa implicada en el ensamblaje del anillo de septinas y citoquinesis y Eng1, β -1,3-glucanasa localizada en la región del septo en el lado de la célula hija e implicada en la separación celular tras la división.

Con los dobles mutantes generados y los respectivos mutantes sencillos, se realizaron ensayos de sensibilidad a diferentes compuestos relacionados con integridad celular (Rojo Congo, SDS, Cafeína y Caspofungina) mediante el método de dilución en gota en medio sólido (Figura 31). El doble mutante *bgl2 Δ ypl158c Δ* presentó incrementada la sensibilidad a Rojo Congo, SDS y cafeína respecto a los correspondientes mutantes sencillos isogénicos. En el caso del doble mutante *fks1 Δ ypl158c Δ* la sensibilidad a Rojo Congo, SDS y especialmente a cafeína se vio incrementada, si bien el efecto del Rojo Congo se pudo observar con mayor claridad empleando concentraciones inferiores de dicho compuesto. La ausencia del gen *YPL158C* en el mutante *crh1 Δ crh2 Δ* , conduce a un incremento de sensibilidad a cafeína y a caspofungina. La cepa *chs3 Δ ypl158c Δ* mostró exacerbada la sensibilidad a SDS y cafeína. Un aspecto interesante al estudiar este último mutante fue observar su comportamiento frente a Rojo Congo, ya que el mutante *chs3 Δ* es resistente a la presencia de dicho compuesto, como ha sido descrito previamente, pero la deleción adicional del gen *YPL158C* da lugar a la desaparición de este fenotipo. Debido a que la resistencia del mutante *chs3 Δ* a Rojo Congo

o al Blanco de Calcofluor se ha postulado como asociada a la disminución de la cantidad de quitina (diana potencial de estos compuestos) presente en la pared celular, la reversión de este fenotipo en ausencia del gen *YPL158C* abre la posibilidad de que en este mutante se recuperen ciertos niveles de quitina en la pared de forma *Chs3* independiente.

Por el contrario, las deleciones de los genes *CLA4*, *ENG1*, *CDC10* y *KRE6* en el fondo *ypl158cΔ*, no afectaron significativamente al patrón de sensibilidad frente a los compuestos ensayados respecto al exhibido por los mutantes sencillos.

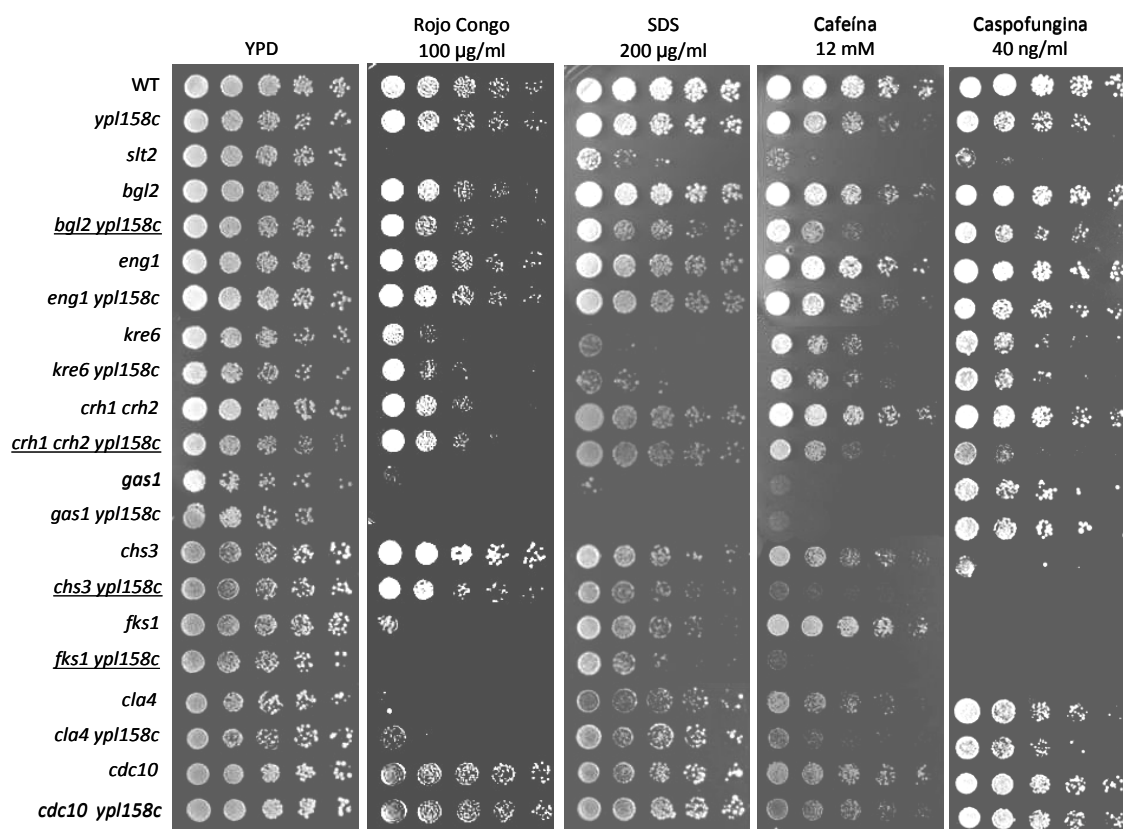


Figura 31. Test de sensibilidad frente a compuestos que afectan a la integridad celular. Ensayo fenotípico mediante la técnica de siembra por dilución en gota de las cepas mutantes indicadas en medio sólido suplementado con Rojo Congo (100 µg/ml), SDS (200 µg/ml), cafeína (12mM) y caspofungina (40 ng/ml). Se partió de cultivos con $D.O_{600}$ 0,2 (aproximadamente $1,5 \times 10^4$ células en 5 µl) y se hicieron 4 diluciones seriadas 1/5. A continuación, utilizando un replicador se transfirieron 5 µl de cada dilución sobre una placa de Petri que contenía el medio de cultivo (YPD) suplementado con el compuesto a ensayar. Las placas se incubaron durante 2-3 días a 30°C. La cepa silvestre (BY4741) y el mutante *slt2Δ* se incluyeron como control del ensayo. Los dobles mutantes donde se han detectado variaciones fenotípicas respecto a los mutantes sencillos aparecen subrayados

2.5. La sobreexpresión del gen *YPL158C* produce alteraciones morfológicas

Con el objetivo de profundizar en la caracterización funcional de la proteína Ypl158c, se planteó estudiar si la sobreexpresión del gen *YPL158C* originaba algún tipo de fenotipo característico. Para ello se generó una construcción plasmídica en la que la expresión de la fusión *YPL158C-mCHERRY* era controlada por un promotor fuerte reprimible por doxiciclina (*tetO*). Se transformó la cepa silvestre con este plásmido y se cultivó en medio líquido SC-Ura hasta fase exponencial de crecimiento (condiciones de sobreproducción de Ypl158c-Cherry), llevando en paralelo un cultivo de la misma cepa con concentraciones de 1 µg/ml de doxiciclina (condiciones que bloquean la expresión dependiente del promotor *tet*). En primer lugar, se procedió a la visualización de las células mediante microscopía de contraste de fases. Como se observa en la Figura 32B y C la sobreexpresión del gen *YPL158C* dio lugar a la aparición de células alargadas que tendían a agregarse, fenotipo que no se observó en el cultivo crecido en presencia de doxiciclina (Figura 32A). Este efecto morfológico es similar al asociado con el *checkpoint* morfogénico en *S. cerevisiae*, siendo la proteína Swe1 principal responsable del control de este *checkpoint*. Para determinar si el fenotipo morfológico observado dependía de la proteína Swe1, se procedió a sobreexpresar el gen *YPL158C* en el mutante *swe1Δ*. En este caso, en condiciones de sobreexpresión se observó que las células presentaban mayor tamaño y una forma redondeada, aspecto típico del mutante *swe1Δ* (Figura 32E y F), en contraposición a la morfología aberrante alargada anteriormente descrita. Este resultado demuestra por tanto que la morfología de células aberrantes debido a la sobreexpresión del gen *YPL158C* depende de Swe1.

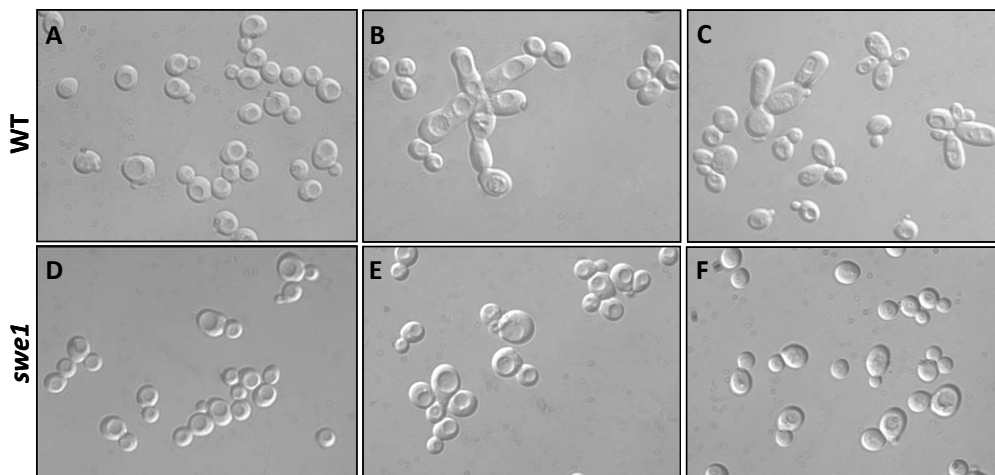


Figura 32. Análisis microscópico del efecto morfológico de la sobreexpresión del gen *YPL158C*. Se muestran imágenes de microscopía de contraste de fases de células en fase exponencial de la cepa silvestre (BY4741) y del mutante *swe1Δ* transformadas con la versión multicopia de la fusión *YPL158C-mCHERRY* bajo control del promotor *teto*, crecidas en presencia (A y D) o ausencia de 1µg/ml de doxiciclina (B-C y E-F).

2.5.1. La sobreexpresión del gen *YPL158C* conduce a perturbaciones en el anillo de septinas dependientes de Swe1

La correcta localización y función de las septinas es muy importante para todos los procesos que ocurren durante el ciclo celular. De hecho, defectos en la organización de estas proteínas promueven la acumulación y/o activación de Swe1, resultando en una disminución de la actividad de la Cdk Cdc28 y en un retraso de la progresión del ciclo celular asociado a un continuo crecimiento apical de la yema (Longtine *et al.*, 2000). Por tanto, dado que la sobreproducción de la proteína Ypl158c induce la formación de células alargadas y este efecto es dependiente de Swe1, se planteó determinar si el anillo de septinas en estas células se encontraba alterado. Para ello, se cotransformaron la cepa silvestre y el mutante *swe1Δ* con el plásmido de sobreexpresión *TETp-YPL158C-mCHERRY* y con el plásmido que contenía el gen *CDC10* fusionado a GFP (pLA10), utilizándose como control del ensayo ambas cepas transformadas sólo con el plásmido pLA10. La observación de las células mediante microscopía de fluorescencia permitió comprobar la correcta localización del anillo de septinas en la cepa silvestre y en el mutante *swe1Δ* (Figura 33A y C, respectivamente). Sin embargo, en la cepa silvestre la sobreexpresión del gen *YPL158C* (ausencia de doxiciclina en el medio de cultivo) indujo en algunas células, además del fenotipo morfológico comentado en el apartado anterior, alteraciones en la localización y en la forma y simetría del anillo de septinas (Figura 33B). Tales efectos no se observaron en ausencia de *SWE1* en condiciones de sobreproducción de la proteína (Figura 33D), lo que indica una posible implicación de Swe1 en la desorganización del anillo de septinas mediada por la sobreproducción de la proteína Ypl158c.

Adicionalmente, con intención de determinar si la sobreexpresión del gen *YPL158C* conducía a una alteración en el patrón de localización de la proteína, se visualizó microscópicamente el mutante *yp158cΔ* transformado con la construcción multicopia que lleva dicha fusión bajo el promotor tetraciclina. En la Figura 34 se muestran imágenes de microscopía de fluorescencia de células del mutante en condiciones de sobreexpresión donde se observan los núcleos y la proteína Ypl158c-mCherry, por separado y solapadas, en las mismas células. Como se deduce de las imágenes mostradas la proteína presentó de nuevo una localización principalmente perinuclear, concentrándose en algunos puntos, siendo esta localización similar a la observada con la versión multicopia de la fusión controlada por el propio promotor del gen.

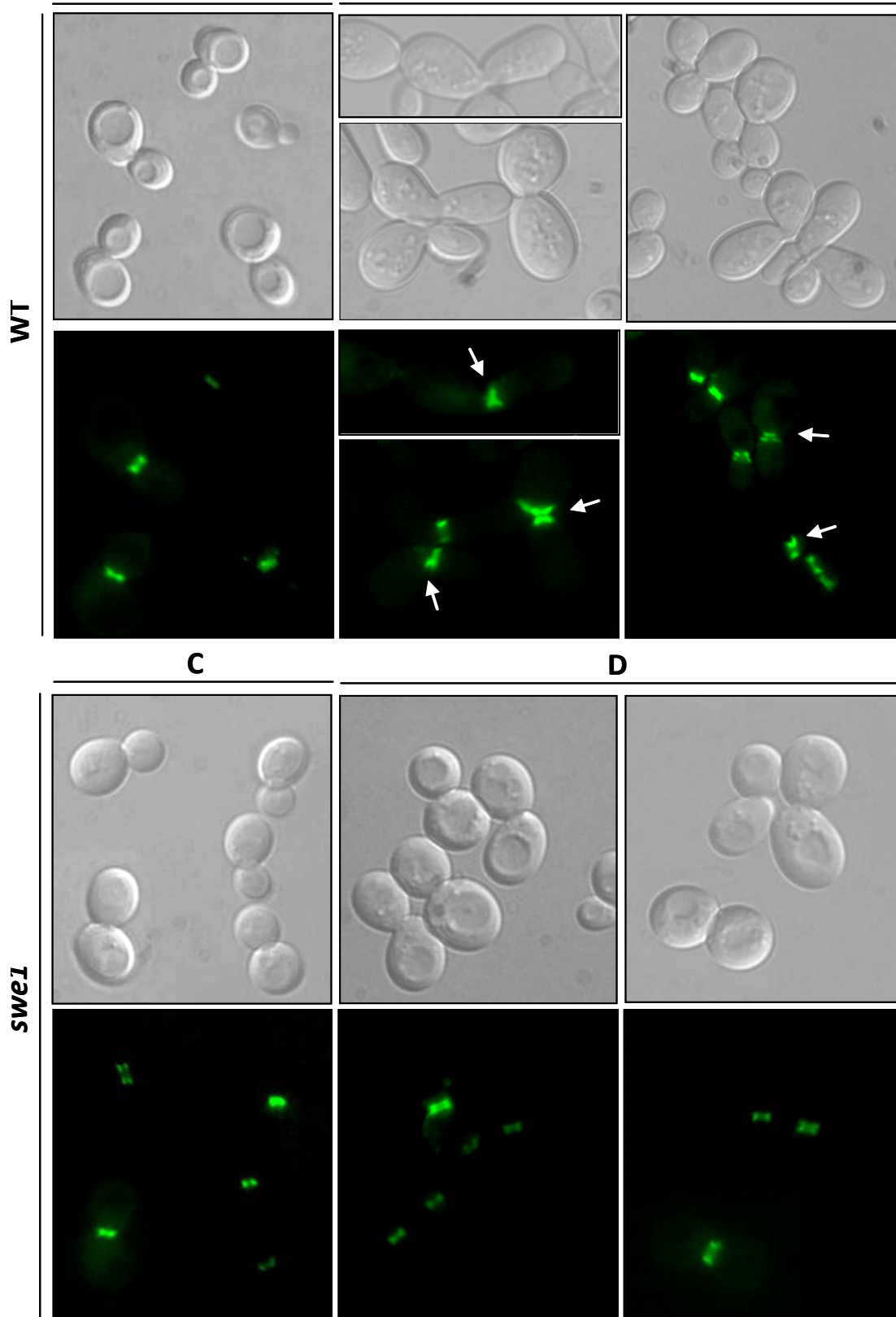


Figura 33. Efecto de la sobreexpresión del gen *YPL158C* en la localización del anillo de septinas. Se muestran imágenes de microscopía de contraste de fases y microscopía de fluorescencia de células de la cepa silvestre y del mutante *swe1Δ* (A y C), respectivamente, transformadas con el plásmido que porta la fusión *CDC10-GFP* e imágenes de las mismas cepas cotransformadas con dicho plásmido y con el vector que porta la construcción *TETp-YPL158C-mCHERRY* (B y D). Las flechas blancas indican los anillos de septinas alterados.

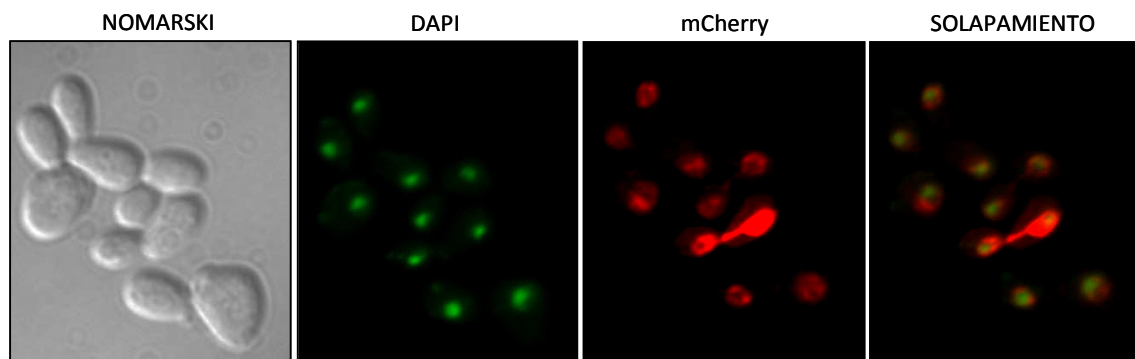


Figura 34. Localización de la proteína Ypl158c en condiciones de sobreproducción. Se muestran células del mutante *ypl158cΔ* expresando la versión multicopia de la fusión *YPL158C-mCHERRY* bajo el promotor *tetO* procedentes de cultivos en fase exponencial de crecimiento. Las imágenes fueron obtenidas mediante microscopía de contraste de fases (Nomarski) y microscopía de fluorescencia donde se visualizan los núcleos (DAPI), la proteína de fusión Ypl158c-mCherry y el solapamiento de las dos imágenes. Antes de su visualización las células se fijaron previamente con etanol 70% y se tiñeron con DAPI (50 ng/ml).

2.6. El mutante *ypl158c* presenta un retraso en la fase G_1 del ciclo celular

Según los resultados obtenidos hasta el momento, el fenotipo de células multigemadas que presenta el mutante *ypl158cΔ* podría deberse a un defecto en la citocinesis que además, podría estar asociado a un fallo en el desensamblaje del anillo de septinas. Con intención de determinar si este fenotipo está asociado adicionalmente a alteraciones en la progresión del ciclo celular, se procedió al análisis del ciclo celular en el mutante *ypl158cΔ* y en la cepa silvestre. Para ello, se crecieron las células en YPD a 26°C hasta D.O. $\approx 0,7$ y se sincronizaron en fase G_0 - G_1 del ciclo celular mediante elutriación centrífuga. Posteriormente, se incubaron en medio YPD a 26°C tomándose muestras cada 30 minutos, se tiñeron las células con ioduro de propidio y se determinó el contenido en DNA en cada muestra mediante citometría de flujo. En paralelo, se tomaron muestras de cada tiempo para su observación mediante microscopía de contraste de fases. En los histogramas incluidos en la Figura 35 se muestra el contenido en DNA de la cepa silvestre y del mutante en cada tiempo analizado, así como el porcentaje de células con yema en cada uno de estos tiempos. Este valor permite monitorizar la progresión del ciclo celular mediante un análisis morfológico de los cultivos (Zettel *et al.*, 2003). Como resultado, el mutante *ypl158cΔ* presentó un retraso de aproximadamente 90 minutos respecto a la cepa silvestre en la salida de la fase G_1 (1N). Así, mientras que en el cultivo de la cepa silvestre se hizo evidente el desplazamiento de la población celular hacia la fase G_2 del ciclo celular (2N) a los 90 minutos, en el mutante esto no sucedió hasta alrededor de los 180 minutos. Un retraso similar fue observado en el porcentaje de células gemadas, siendo del 56% en la cepa silvestre a los 90 minutos y

un 50% en el mutante a los 180 minutos, lo cual sugiere que el retraso en la progresión del ciclo celular está asociado a un retardo en la gemación. El análisis de los perfiles de citometría de tiempos aún mas largos a los mostrados en la Figura 35 (300-330 minutos) revelaron la aparición de una población celular con contenido en DNA 3N en el mutante *yp158cΔ*, resultado que concuerda con los datos presentados anteriormente del análisis microscópico de un cultivo asincrónico de dicho mutante.

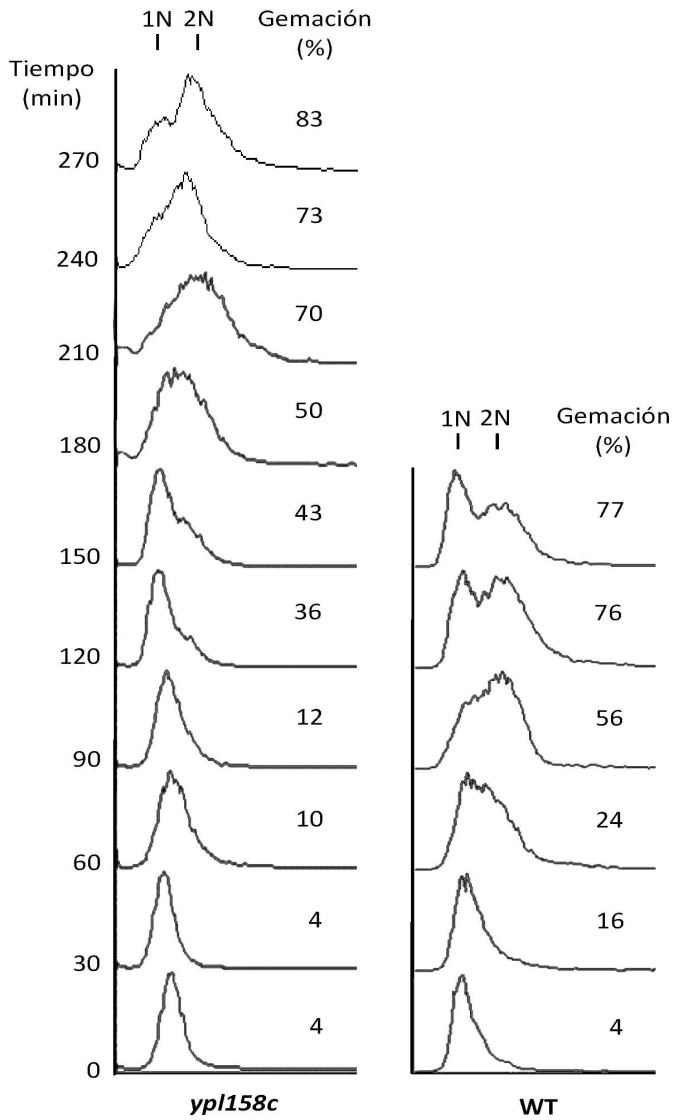


Figura 35. La ausencia del gen *YPL158C* conduce a un retraso en la salida de la fase G_1 del ciclo celular asociado a un retardo en la emergencia de la gema. Los histogramas muestran la variación del contenido en DNA a través del ciclo celular en cultivos sincronizados de la cepa silvestre y del mutante *yp158cΔ*. Las células fueron cultivadas en medio rico YPD a 24°C hasta D.O≈0.7 y posteriormente, se sincronizaron en fase G_0 - G_1 del ciclo celular mediante elutriación centrífuga. A continuación, se incubaron los cultivos a 26°C en YPD y se tomaron muestras a los tiempos indicados para determinar el contenido en DNA (1N o 2N) mediante citometría de flujo tras fijar las células y teñirlas con ioduro de propidio, y para su observación mediante microscopía de contraste de fases. El porcentaje de células con gema en cada tiempo se indica en cada histograma.

6. DISCUSIÓN

1. Identificación de genes relacionados con la homeostasis de la pared celular de *S. cerevisiae*

El mantenimiento de la morfología y la integridad celular fúngica, así como la protección ante las condiciones adversas del medio externo depende de la pared celular, una estructura esencial que ha sido extensamente caracterizada en *S. cerevisiae* (Cid *et al.*, 1995; Klis *et al.*, 2006; Lesage y Bussey, 2006). Aunque varias rutas de señalización contribuyen a la regulación de la homeostasis de la pared con objeto de preservar la integridad celular, la adaptación de la levadura a situaciones que comprometen la estabilidad de esta estructura es regulada principalmente a través de la ruta de integridad celular, CWI (Levin, 2005; Heinisch, 2005).

La ruta CWI se activa en respuesta a una gran variedad de estímulos del medio externo y procesos morfogenéticos relacionados con el ciclo vital de la levadura que causan estrés sobre la pared, así como mutaciones en genes funcionalmente relacionados con esta estructura (Martín *et al.*, 2000, de Nobel *et al.*, 2000; Levin, 2005; Bonilla *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010). La activación de esta ruta conduce a la hiperfosforilación de la MAPK Slt2, la cual activa mediante fosforilación al factor de transcripción Rlm1 que finalmente induce la respuesta transcripcional responsable de modular la adaptación a las condiciones que interfieren con la estabilidad de la pared celular. El gen *MLP1* es uno de los que presenta mayor activación transcripcional en respuesta a la mayoría de estímulos analizados hasta el momento (Lagorce *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2003; García *et al.*, 2004; García *et al.*, 2009). El objetivo de este trabajo ha sido la identificación, a escala genómica, de genes cuya ausencia condujese a una inducción transcripcional del gen *MLP1* y en consecuencia, según el sistema reportero utilizado, a una hiperresistencia al antibiótico nourseotricina. Se identificaron 174 mutantes con una hipotética activación transcripcional de *MLP1*. A priori, era esperable que esta activación transcripcional se asociase con una activación basal de la ruta CWI y por tanto, de la MAPK Slt2, confirmándose este hecho en 64 de los 174 mutantes seleccionados. En el grupo de mutantes que no presentaron activación basal de la MAPK (110 cepas), se identificaron 38 mutantes con niveles de resistencia a nourseotricina superiores a los de la cepa silvestre que, en su mayoría, presentaron una inducción transcripcional de *MLP1*. El resto de mutantes (72) se comportaron de forma similar a la cepa control. La aparición de este grupo se podría explicar debido a la existencia de falsos positivos asociados a este tipo de aproximaciones a gran escala, así como a diferencias en cuanto a sensibilidad entre el método de rastreo (transformantes en *pool* y empleo de una única concentración de antibiótico), y el empleo

para la confirmación de los mutantes seleccionados (transformantes individuales con el plásmido reportero y determinación de la CMI mediante el método de microdilución en placa).

1.1. Análisis del grupo de mutantes con activación transcripcional constitutiva del gen *MLP1* e hiperfosforilación basal de la MAPK Slt2

La cuantificación de los niveles de fosforilación de Slt2 en el grupo de 64 genes cuya delección conduce a una activación constitutiva de la ruta CWI, reveló que el rango de distribución de estos niveles era bastante amplio (entre 2 y 30 veces más que la cepa silvestre). Estas diferencias entre los distintos mutantes sugieren que los niveles de activación de la ruta CWI podrían estar asociados a la severidad del daño en pared generado por cada delección en particular o en el caso de los mutantes que no presentan fenotipos de pared, a distintos efectos sobre la regulación de la propia ruta.

Las categorías funcionales más representadas dentro de este grupo de mutantes fueron las relacionados con pared celular y morfogénesis, genes de función desconocida, transducción de señal, transporte y transcripción.

Dentro del grupo de genes asociados con pared celular y morfogénesis se aisló un subgrupo de genes relacionados con la organización del citoesqueleto de actina (*SLA1*, *ABP1*, *BUD6*, *VRP1*, *ARC18*, *TPM1*, *DMA2*). Se ha descrito que perturbaciones en esta estructura conducen a una activación de la MAPK Slt2 a través de Pkc1, probablemente debido a la inducción de estrés sobre la pared celular, aunque el mecanismo molecular por el cual esto sucede es desconocido (Harrison *et al.*, 2004). El citoesqueleto de actina es clave durante los procesos de endocitosis, citoquinesis, determinación de la polaridad celular y morfogénesis (Moseley y Bruce, 2006), por tanto, es esperable que la delección de genes implicados en la organización de esta estructura conduzca a una activación de la ruta CWI. Un segundo subgrupo incluye genes que codifican proteínas implicadas directamente en la estructura de la pared celular como *GAS1* (β -1,3-glucanosiltransferasa), *ECM33* (proteína de unión a GPI posiblemente implicada en crecimiento apical de la yema), *YPS7* (aspartil proteasa) y *LAS21* (implicada en la síntesis del núcleo del GPI). La ausencia de estos genes da lugar a alteraciones en la pared celular y en la morfología de las células lo que sugiere que la integridad celular se encuentra comprometida. De hecho, se ha caracterizado a nivel transcripcional el mecanismo compensatorio desencadenado en un mutante *gas1* Δ y se ha observado que conlleva una significativa inducción del gen *MLP1* (Lagorce *et al.*, 2003). Adicionalmente, ya se ha descrito anteriormente (De Nobel *et al.*, 2000; De Groot

et al., 2001) que los mutantes *gas1Δ* y *ecm33Δ* presentan una activación basal de la MAPK Slt2. Otras proteínas identificadas fueron las relacionadas con el metabolismo de quitina, Chs1 y Chs6. La quitina es un componente esencial de la estructura de la pared celular, siendo esperable que en ausencia de proteínas implicadas en la síntesis de este polímero la integridad celular sea comprometida. De hecho, se han descrito interacciones genéticas (Tong *et al.*, 2004) entre *SLT2* y *CHS3* (responsable de la síntesis de quitina en la región del cuello entre la célula madre y la hija y en la pared lateral), *CHS4*, *CHS5*, *CHS6* y *CHS7* (requeridas para la localización y transporte de Chs3). Chs4 forma un complejo con Chs3 y es requerida para la actividad de dicha proteína durante el crecimiento vegetativo. El mutante *chs4Δ* ha sido identificado en el rastreo genómico por presentar una inducción transcripcional del gen *MLP1*, a pesar de que no se observó activación basal de Slt2 como ya había sido descrito por Carotti y colaboradores (2004). En cuanto al gen *CHS2* (implicado en la síntesis de quitina del septo primario) se ha descrito que su delección en otro fondo genético conduce a un incremento de la fosforilación basal de Slt2 y a un incremento de la activación transcripcional de genes como *MLP1*, *CWP1* y *SED1* (Rodríguez- Quiñones y Rodríguez-Medina, 2009) no siendo descartable que en el fondo BY4741 suceda lo mismo. El hecho de que se hayan identificado únicamente los genes *CHS1* y *CHS6*, cuya delección conduce a una activación de la ruta CWI, sugiere la existencia de cierta redundancia funcional entre los genes implicados en el metabolismo de quitina y que la ausencia de *CHS1* y *CHS6* genere en la célula un estrés particularmente importante sobre la pared celular. De hecho, Chs1 actúa como una enzima reparadora implicada en la reposición de quitina durante la citoquinesis (Cabib *et al.*, 1992). Por otro lado, la selección en el rastreo genómico de mutantes en genes relacionados con proteínas con actividad manosiltransferasa (Pmt1, Hoc1 y Alg6), confirma la importancia de los procesos de glicosilación de proteínas de la pared celular para la formación y estabilidad de esta estructura (Lesage y Bussey, 2006; Lommel y Strahl, 2009). De hecho, la respuesta transcripcional originada por defectos en O- y N-glicosilación en levadura, ha puesto de manifiesto la activación de una respuesta típica de daño sobre la pared celular (Cullen *et al.*, 2006; Arroyo *et al.*, 2011).

La identificación de las proteínas mencionadas hasta el momento es indicativa de su importancia específica en la construcción de la pared celular, ya que debido a la existencia de familias de genes en muchos casos con funciones redundantes, la delección de este tipo de genes frecuentemente no conduce a fenotipos detectables.

Un grupo de mutantes que esperábamos resultasen seleccionados en el rastreo genómico era el de los delecionados en genes relacionados con transducción de señales y

especialmente los integrantes de la propia ruta CWI. Así, se han seleccionado reguladores negativos de la ruta como las GAPs de Rho1, Sac7 y Bem2, y las fosfatasa, Sit4 y Msg5, que actúan, respectivamente, sobre Pkc1 y Slt2. Msg5 no es la única fosfatasa que actúa sobre Slt2, también lo hacen otras como Ptp2, Ptp3 y Sdp1 (Mattison et al., 1999; Collister et al., 2002; Flandez et al., 2004; Martín et al., 2005); sin embargo, el hecho de que sea la que tiene más actividad sobre la regulación de la MAPK en condiciones basales (Harrison et al., 2004) podría ser uno de los motivos por los que ha sido la única aislada en nuestra aproximación experimental. Adicionalmente, se identificó la proteína Rom2 a pesar de ser un activador (GEF) de Rho1. La presencia de activación basal de Slt2 en el mutante *rom2Δ* ya ha sido descrita en otros fondos genéticos por Loberg y colaboradores (2001). Estos autores postulan que dicho mutante tiene la pared celular defectuosa como consecuencia de una disminución en la actividad de Pkc1 y que dicha alteración sería la responsable de activar el módulo de MAPKs de la ruta CWI de forma Rom2 independiente. La identificación de este grupo de mutantes en el rastreo genómico valida el método utilizado para el descubrimiento de otros potenciales reguladores de la ruta CWI. En este sentido a pesar de que a priori no se ha identificado ningún elemento nuevo integrante de la ruta, como era de esperar debido a las múltiples y exhaustivas búsquedas que de dichos componentes se han llevado a cabo durante los últimos años, es interesante destacar el hecho de que sí hayamos identificado mutantes en elementos de otras rutas de señalización como *NBP2*, *KSP1*, *MOG1*, *SKN7*, *FPK1* e *YPK1* en los que la fosforilación de Slt2 se ve afectada. Este hecho sugiere posibles conexiones entre la ruta CWI y los procesos celulares controlados por cada uno de dichos elementos. Nbp2 (proteína adaptadora para la fosfatasa Ptc1 en la ruta HOG) regula la herencia del retículo endoplásmico a través de la ruta CWI modulando la MAPK Slt2 (Du et al., 2006). Se ha sugerido que dicha conexión con la ruta CWI sucede a nivel de la MAPKKK Bck1, actuando de nuevo Nbp2 como proteína adaptadora entre dicha MAPKKK y Ptc1 (Palacios, 2010). La proteína Ksp1, asociada recientemente con el crecimiento filamentoso en cepas haploides, actúa como diana del factor de transcripción Hsf1 (implicado en la respuesta a estrés, principalmente a choque térmico) y de la quinasa dependiente de cilinas Pho85, sugiriendo estos hechos la implicación de Ksp1 en ciclo celular y en la respuesta a estrés (Dephoure et al., 2005; Hashikawa et al., 2006). Además, se ha observado una interacción física entre Ksp1 y Slt2 (Ptacek et al., 2005), lo que relaciona a esta proteína con la ruta CWI.

El factor de transcripción Skn7 es una proteína multifuncional que ha sido implicada en muchos procesos celulares e interactúa genética y físicamente con las rutas HOG y CWI

(Alberts *et al.*, 1998; Brown *et al.*, 1994). La asociación con la ruta CWI se ha establecido a nivel de la GTPasa Rho1, sin embargo, el mecanismo por el que esta proteína activa a Skn7 es todavía desconocido. En condiciones de hiposmolaridad Skn7 se activa a través del sensor Sln1 de la ruta HOG regulando la respuesta transcripcional. En relación a este punto, se ha sugerido que la proteína Mog1 desempeña un papel a este nivel, siendo requerida para la correcta localización de Skn7 en el núcleo y unión a los promotores de los genes que regula (Lu *et al.*, 2004). Además, los análisis fenotípicos presentados en esta memoria muestran que la delección del gen *MOG1* conduce a fenotipos de sensibilidad en la mayoría de las condiciones ensayadas, apoyando este hecho su relación con la integridad celular. Finalmente, la proteína quinasa Ypk1, relacionada con la ruta de señalización de esfingolípidos, regula a la flipasa Fpk1 implicada en la translocación de fosfolípidos de membrana. Se ha descrito que el mutante *ypk1Δ* presenta defectos en la polarización del citoesqueleto de actina (Schemelzle *et al.*, 2001), lo cual apoyaría el hecho de que, según nuestros resultados, presentase una activación basal de Slt2, a pesar de que dichos autores sugieren que la proteína Ypk1 es requerida para la activación de la MAPK Slt2 en condiciones de estrés térmico.

Adicionalmente a los genes *FPK1* e *YPK1*, se ha identificado en el rastreo genómico otro gen, *ARV1*, relacionado con el metabolismo de esfingolípidos. Arv1 participa en el transporte de esteroles (Tinkelenberg *et al.*, 2000) requerido para un eficiente metabolismo de esfingolípidos. Así, el mutante *arv1Δ* presenta una acumulación de fitosfingosina (PHS) (Swain *et al.*, 2002), precursor de la ceramida B, la cual es responsable de la síntesis de esfingolípidos complejos. Se ha observado que defectos en el proceso de síntesis de estos compuestos ocasionados por agentes como la miriocina y aureobasidina A, conducen a una activación de la ruta CWI dependiente de la fosfatidilinositol-4-quinasa Stt4 (Jesch *et al.*, 2010). Por tanto, un efecto similar podría causar la delección del gen *ARV1*, lo que explicaría su identificación en el rastreo genómico. Además, se ha observado que en el mutante *arv1Δ* la unión del núcleo GPI a proteínas, que requieren de este anclaje para unirse a la pared celular, es defectuosa (Kajiwara *et al.*, 2008), presentando dicho mutante hipersensibilidad a calcofluor y un incremento en los niveles de quitina de la pared celular, hecho que coincide con los resultados obtenidos en nuestro trabajo y sugiere que la integridad celular este comprometida en este mutante.

En cuanto al grupo funcional de genes que codifican proteínas implicadas en regulación de la expresión génica se han identificado tanto reguladores generales como es el caso de Ssn8 y Ssn3 pertenecientes al complejo *mediator*, cuya ausencia posiblemente conduce a

algún tipo de estrés sobre la pared celular de forma indirecta, así como mutantes en genes que participan en respuestas ante diferentes situaciones de estrés como el estrés térmico (*RTR1*), oxidativo (*YPR115W*) o condiciones de hipoxia (*ROX1*). En relación con su aparición en el rastreo genómico, se ha descrito que tanto el estrés térmico como el oxidativo activan la ruta de integridad celular, aspecto que deberá estudiarse en el caso del crecimiento en condiciones de hipoxia. En ausencia de oxígeno se han descrito cambios en la composición de la membrana plasmática y la pared celular. Por ejemplo, las proteínas de la pared celular Cwp1 y Cwp2 son reemplazadas por proteínas codificadas por las familias de genes *DAN/TIR* (Abramova *et al.*, 2001b). Rox1 actúa como represor transcripcional de genes de hipoxia en condiciones aeróbicas (Keng, 1992, Deckert *et al.*, 1995). Se ha descrito que Rox1 inhibe la expresión de los genes *DAN/TIR* y *CWP1* en condiciones aeróbicas, observándose una inducción transcripcional de dichos genes en el mutante *rox1Δ* (Abramova *et al.*, 2001a; Linde y Steensma, 2002). Debido a que *CWP1* es uno de los genes de la respuesta transcripcional generada a través de la ruta CWI antes situaciones de estrés, este hecho apoya que la pared celular en ausencia de *ROX1* se encuentre alterada. Además, se ha observado que en ausencia de *ROX1* se induce la expresión transcripcional de genes como *GLC7* (Linde y Steensma, 2002) que codifica para la subunidad catalítica de una protein fosfatasa de tipo I (PP1) que interacciona genéticamente con *PKC1* (Andrews and Stark, 2000), sugiriéndose que PP1 podría promover la integridad celular. Finalmente, se ha observado una conexión entre los factores de transcripción Rox1 y Skn7 en la respuesta a estrés oxidativo (Kelley y Ideker, 2009). Todos estos hechos unidos a que el mutante *rox1Δ* presenta un fenotipo de hipersensibilidad a higromicina B (según resultados obtenidos en nuestro trabajo), apoyan la relación del gen *ROX1* con la homeostasis de la pared celular.

Un último grupo de interés fue el de los mutantes delecionados en genes relacionados con transporte a través del retículo endoplásmico, *SEC72* y *EMP47*, y mecanismos de control de plegamiento de proteínas como *ORM2* y *CNE1*. Se ha descrito que el estrés sobre el retículo endoplásmico por la presencia de proteínas mal plegadas activa la ruta CWI (Chen *et al.*, 2005). Un mecanismo similar podría suceder en ausencia de los genes citados siendo el responsable de la fosforilación basal de la MAPK Slt2.

Uno de los resultados interesantes obtenidos en el rastreo genómico fue la identificación de 11 mutantes en genes de función desconocida, lo que supone poder asociar estos genes con la pared celular o la regulación de la ruta CWI. Además, tras el análisis detallado de la información depositada en las bases de datos de los 64 mutantes que mostraron una activación constitutiva de la ruta, se observó que 15 de ellos (excluyendo el

grupo de función desconocida) no habían sido previamente relacionados fenotípicamente con alteraciones de la integridad celular.

Con el fin de poder caracterizar este aspecto en mayor detalle se procedió a llevar a cabo el estudio de la sensibilidad de las 26 cepas mutantes indicadas a compuestos que interfieren, a través de diferentes mecanismos, con la integridad celular (Rojo Congo, caspofungina, higromicina B, SDS y cafeína). Casi el 60% de los mutantes analizados presentaron un fenotipo de hipersensibilidad o resistencia al menos a una de las condiciones ensayadas. Este porcentaje fue similar tanto en el grupo de mutantes en genes de función desconocida como en el que ya habían sido relacionados con otras funciones celulares. Dentro de estos últimos se encuentran los mutantes delecionados en los genes *PHM8* (relacionado con el metabolismo de lípidos) y *SUV3* (relacionado con el metabolismo de RNA), para los que se ha descrito un fenotipo de sensibilidad a estrés osmótico (Yoshikawa *et al.*, 2009) y a estrés térmico, (Sinha *et al.*, 2008), respectivamente.

El hecho de que algunos de estos mutantes tengan más de un fenotipo sugiere la existencia alteraciones significativas de la pared celular que sean responsables de una activación constitutiva de la ruta CWI. Por el contrario, la presencia de mutantes en el grupo analizado sin fenotipos que a priori sugieran la presencia de defectos en la pared celular podría estar relacionada con la posibilidad de la que la ruta CWI pueda activarse por otros estímulos en estas cepas o que los daños que presentan en la pared celular sean muy moderados. En este sentido, se ha descrito la coordinación entre esta ruta y otras rutas de MAPKs para el mantenimiento de la integridad celular en determinadas condiciones de crecimiento de la levadura (Levin, 2005; Fuchs y Mylonakis, 2009; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010). De hecho, se ha postulado que la activación de la ruta CWI por diferentes estreses no sucede siempre de una manera lineal (*top-down*), sino que dicha ruta puede recibir estímulos laterales a diferentes niveles (Harrison *et al.*, 2004).

Otro aspecto que se ha estudiado en este trabajo ha sido la determinación del contenido en quitina en el grupo de los 64 mutantes con activación basal de Slt2. El incremento del contenido en este polímero se ha propuesto como parte de la respuesta de adaptación desencadenada al comprometerse la integridad celular, por tanto, sería esperable que un alto porcentaje de mutantes tuviesen mayor contenido en quitina que la cepa silvestre. Los resultados obtenidos determinaron que sólo 19 (30%) de los 64 mutantes presentaban más del doble del contenido de este polímero que la cepa control, indicando que dicha respuesta de adaptación se desencadena en estas células. Del mismo

modo que en el caso de los niveles de fosforilación de Slt2, se observó un amplio rango de contenido en quitina entre los distintos mutantes, sugiriendo que el incremento en la síntesis de este polímero depende de requerimientos celulares específicos. En algunos de estos mutantes, *nbp2Δ*, *sla1Δ*, *vrp1Δ*, *ylr338wΔ*, *gas1Δ* y *arc18Δ*, Lesage y colaboradores (2005) ya habían identificado niveles elevados de quitina. Por otro lado, en contraste con este grupo de 19 mutantes, se han identificado 45 cepas sin incremento significativo del contenido en quitina, lo cual indica que no todas las situaciones que desencadenan la activación de la ruta CWI conducen a un incremento en la síntesis de este polímero, apoyando la hipótesis de la existencia de respuestas de adaptación específicas frente a diferentes estímulos. En cualquier caso, el hecho de que aproximadamente el 50% de los mutantes con niveles incrementados de quitina esté relacionado funcionalmente con procesos de construcción de la pared celular y morfogénesis y sólo el 18% de los mutantes sin incremento significativo pertenezca a esta categoría funcional, sugiere una relación entre el incremento del contenido en quitina y la activación de la ruta CWI por alteraciones en la integridad de la pared celular. Esta asociación se apoya además en el hecho de que 8 de los 10 mutantes con niveles más altos de fosforilación de Slt2, en su mayoría relacionados con pared celular, presentan contenidos elevados de quitina. Sin embargo, en algunos casos como en los mutante *lea1Δ* y *gat2Δ*, niveles muy altos de fosforilación de Slt2 no conducen a un incremento significativo de quitina respecto a la cepa silvestre, a pesar de mostrar ambas cepas fenotipos típicos de alteraciones en la pared celular según el análisis fenotípico realizado de sensibilidad a compuestos que interfieren con la estabilidad de esta estructura. Al estudiar la participación de elementos clave de la ruta CWI en la activación de Slt2 en ambos mutantes, se determinó que la delección de *ROM2* en ambas cepas no afecta a la activación de dicha MAPK. Aunque Rom2 es la principal GEF de Rho1, responsable de transmitir las señales desde la superficie celular hasta Rho1 para su activación, debido a la redundancia de las distintas GEFs (Rom2, Rom1, Tus1) en la activación de Rho1, no se puede descartar la participación de Rom1 o Tus1 en la activación de la ruta en estos mutantes. Estos resultados difieren con la necesidad para la fosforilación de Slt2 de la actividad de Rom2 en respuesta al estrés causado por el Rojo Congo sobre la pared celular (Bermejo et al., 2008).

1.2. Análisis de la relación entre activación de la ruta CWI y la inducción transcripcional

La presencia de alteraciones en la pared celular desencadena una respuesta transcripcional a través de la ruta CWI, dependiente principalmente del factor de transcripción Rlm1. Un aspecto que nos pareció interesante estudiar fue la correlación

entre los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 y la activación transcripcional de los genes regulados a través de la ruta CWI. Del estudio de la inducción transcripcional de los genes *MLP1* y *CWP1* en un grupo de mutantes seleccionados con diferentes niveles de activación de Slt2, se pudo concluir que en la mayoría de los casos existía una buena correlación entre los niveles de expresión de dichos genes y los niveles de fosforilación de Slt2. No obstante, en el caso del mutante *lea1Δ* dichos niveles de inducción génica fueron significativamente más bajos de lo esperado, situación que podría darse también en otros mutantes no analizados transcripcionalmente. En este sentido, se ha descrito recientemente un comportamiento similar para el mutante *msg5Δ* en el que en condiciones basales, el aumento en la fosforilación de Slt2 no se correlaciona con la respuesta transcripcional dependiente de Rlm1 (Marin *et al.*, 2009). Un hecho similar sucede en el mutante *myo1Δ* afectado en citoquinesis (Myo1 es una miosina de tipo II), donde a pesar de presentar dicho mutante una activación basal de Slt2, no existe inducción transcripcional de los genes *MLP1* y *CWP1* (Rodríguez-Quiñones y Rodríguez-Medina, 2009).

En cuanto al grupo de mutantes originalmente seleccionado en el rastreo genómico que no presentaron activación basal de Slt2 (110 cepas), sólo en 38 de ellos se pudo confirmar la resistencia al antibiótico nourseotricina respecto a la cepa silvestre. Para confirmar los niveles de expresión de *MLP1* en este grupo se empleó como método alternativo la cuantificación de la actividad β -galactosidasa en extractos proteicos de dichos mutantes transformados con un plásmido incluyendo la fusión *MLP1-lacZ*. En 30 de ellos se observó un aumento de la expresión de *MLP1* respecto a la cepa silvestre, siendo especialmente elevada en el caso de los mutantes *ssd1Δ* y *pmt2Δ*. En cuanto a las funciones celulares de los genes delecionados en estos mutantes los grupos más representados fueron los relacionados con pared celular y morfogénesis, transcripción y genes de función desconocida. Este dato sugiere que a pesar de no ser detectable en las condiciones ensayadas la fosforilación de Slt2, la ruta CWI podría estar implicada en la respuesta transcripcional observada.

PMT2 cataliza el primer paso en la O-manosilación de proteínas (Lussier *et al.*, 1995) y *SSD1* regula la integridad de la pared celular de forma paralela a la ruta mediada por Slt2 (Kaeberlein y Guarente, 2002). De hecho, se ha descrito que Ssd1 es fosforilado por la quinasa Cbk1 (implicada en el crecimiento polarizado, separación celular e integridad celular) para modular la localización y/o expresión de los RNA mensajeros de proteínas implicadas en el crecimiento de la yema y biogénesis de la pared celular (Kurischko *et al.*, 2011). La deleción de elementos clave de la ruta (la propia MAPK y el factor de transcripción Rlm1) en los mutantes *ssd1Δ* y *pmt2Δ* conduce al bloqueo de la inducción transcripcional de genes que

participan en la respuesta a daño en pared (*MLP1*, *CWP1*, *SED1*) en comparación con los niveles de expresión de dichos genes obtenidos en los mutantes sencillos *ssd1Δ* y *pmt2Δ*. Reforzando la idea de que en estos mutantes la activación transcripcional es dependiente de la activación de la ruta a pesar de no poderse detectar niveles de fosforilación de Slt2 significativos, los estudios realizados utilizando plásmidos que incluyen formas mutadas de Slt2, tanto en el sitio de unión al ATP, bloqueando la actividad catalítica de la proteína, como en el lugar de fosforilación de las MAPKKs Mkk1/Mkk2, revelaron la esencialidad de la actividad catalítica de la MAPK en la expresión transcripcional de los genes analizados en dichos mutantes. Este fenómeno podría explicarse como consecuencia de que la fosforilación de Slt2 exista realmente aunque se encuentre por debajo del límite de sensibilidad de la técnica de Western Blot o porque la activación tenga lugar específicamente en un determinado estadio del ciclo celular, aunque en todo caso de forma moderada.

Como conclusión, estos resultados demuestran que en determinadas mutantes no existe necesariamente una asociación entre inducción de la expresión génica y la fosforilación de Slt2. De hecho, teniendo en cuenta estos datos, se demuestra que los estudios de activación de la ruta CWI deben realizarse analizando en paralelo la activación de la MAPK y otras respuestas efectoras como la activación transcripcional.

2. Relación del gen *YPL158C* con el mantenimiento de la integridad celular y procesos morfogénicos en *S. cerevisiae*

El objeto de la segunda parte de este trabajo ha sido la caracterización funcional de uno de los genes seleccionados en el rastreo genómico, el gen *YPL158C*. El hecho de que dicho gen pertenezca al grupo de función desconocida, hace más interesante su estudio y avala la utilidad de la aproximación genómica utilizada en esta memoria para la identificación de nuevos genes relacionados con el mantenimiento de la integridad celular.

La búsqueda de proteínas homólogas a la proteína Ypl158c no reveló la existencia de ninguna proteína con similitud en su secuencia en *S. cerevisiae* aunque si se han identificado proteínas similares en otros hongos. La proteína Ypl158c presenta una secuencia aminoacídica rica en serinas y en su extremo C-terminal una región rica en ácido glutámico. Además se han identificado seis fosfopéptidos en dicha proteína, según información procedente de la base de datos Phosphopep, lo que sugiere que pueda ser regulada por fosforilación.

La ausencia del gen *YPL158C* conduce a una activación transcripcional constitutiva del

gen *MLP1* asociada a una activación de la ruta CWI dependiente del sensor Wsc1, resultado que indica que el mutante presenta alguna alteración en la superficie celular. La activación transcripcional es totalmente dependiente de Slt2 aunque parcialmente de Wsc1 como se deduce de los resultados obtenidos con el doble mutante *wsc1Δ ypl158cΔ*. Este hecho podría explicar el ligero incremento en el contenido en quitina en dicho mutante respecto a la cepa silvestre, aunque inferior al del mutante *ypl158cΔ*, así como el escaso efecto sobre el crecimiento. Sin embargo, la viabilidad celular se encuentra seriamente comprometida en el doble mutante *ypl158cΔ slt2Δ*, confirmando el fenotipo sintético enfermo de dicho doble mutante, descrito previamente (Tong *et al.*, 2004). Similares defectos en el crecimiento fueron observados en el caso del doble mutante *rom2Δ ypl158cΔ*. De hecho, la visualización microscópica de dicha cepa (datos no mostrados) muestra severas alteraciones morfológicas. Además, la delección del gen *YPL158C* en el mutante *rom2Δ* conduce a fenotipos de hipersensibilidad a Rojo Congo, así como a un incremento en el contenido en quitina respecto a los mutantes sencillos. Los niveles de fosforilación de Slt2 y la activación transcripcional de *MLP1* y *CWP1* en dicho doble mutante son similares a los del mutante *rom2Δ* e inferiores a los del *ypl158cΔ*, lo que sugiere la participación de Rom2 en la señalización del daño en el mutante *ypl158cΔ*. Sin embargo, el hecho de que el mutante *rom2Δ ypl158cΔ* presente un fenotipo de pared celular muy exacerbado y el mutante *rom2Δ* no lo tenga, sugiere que Rom2 desempeña otras funciones a parte de su participación en la señalización a través de la ruta CWI en el mutante *ypl158cΔ*.

Adicionalmente, se ha identificado en el mutante *ypl158cΔ* un fenotipo de multigemación (una célula madre con dos células hijas) que afecta aproximadamente a un 30% de las células en cultivos asincrónicos, lo que sugiere que la proteína Ypl158c esté relacionada con procesos morfogenéticos en la levadura. No es descartable que en estas células la integridad de la pared celular se encuentre comprometida conduciendo a la activación de la ruta CWI. Estudios de activación de Slt2 a lo largo del ciclo celular en cultivos sincronizados del mutante serán necesarios para aclarar este punto.

El fenotipo morfológico no se agravó por el crecimiento a alta temperatura como se ha descrito para otros mutantes como *ptc1Δ* (Robinson *et al.*, 1994), cepa delecionada en el gen que codifica para una proteína fosfatasa que regula negativamente la ruta HOG (Warkma *et al.*, 2001). Sin embargo, el tratamiento de las células del mutante con sonicación leve, redujo la expresión de este fenotipo a un 10% de la población celular. La sonicación produce una agresión mecánica sobre la pared celular, de hecho, se ha utilizado para identificar mutantes de la levadura afectados en esta estructura (Ruiz *et al.*, 1999). En nuestro caso,

dicho tratamiento se utilizó para separar las células hijas de la madre en los casos en los que el tabique intercelular estuviese lo suficientemente formado, deduciéndose de los resultados obtenidos, que el mutante presenta un retardo en la separación celular. Además, el hecho de que este fenotipo se reduzca significativamente a tiempos largos de crecimiento (fase estacionaria) en medio sólido confirma esta hipótesis.

La explicación más lógica a este fenotipo podría ser que en ausencia de gen *YPL158C* la actividad quitinasa (*Cts1*), necesaria para la degradación del septo primario del lado de la célula hija (Colman-Lerner *et al.*, 2001) y permitir la separación celular, estuviese afectada. De hecho, el mutante *chs1Δ* muestra un fenotipo de agregación celular (Kuranda y Robbins, 1991). Sin embargo, al sobreexpresar *CTS1* en un fondo *yp158cΔ* no se observó efecto alguno sobre el fenotipo multigemante, indicando que su origen, en principio, no está asociado con un déficit de la actividad quitinasa. Según datos publicados, la expresión del *YPL158C* se regula a lo largo del ciclo celular de forma dependiente del factor de transcripción *Swi5* (Doolin *et al.*, 2001). *Swi5* regula la expresión de genes específicos en la transición de las fases M/G1 del ciclo celular como la endonucleasa *HO*, las ciclinas *Pcl2* y *Pcl9* y el iniciador de la replicación de DNA *Cdc6*. Curiosamente, el mutante *swi5Δ* presenta un fenotipo de multigemación similar al observado en el mutante *yp158cΔ*. El hecho de que el doble mutante *yp158cΔ swi5Δ* no presente alterado este fenotipo, apoya la hipótesis de que el defecto observado en la separación celular del mutante *swi5Δ* se deba en última instancia al efecto sobre la expresión del gen *YPL158C*.

Un elemento clave en el proceso división celular es el anillo de septinas ya que, entre otras funciones, actúa como lugar de anclaje de proteínas implicadas en dicho proceso como quitinasas, marcadores del lugar de gemación y componentes del anillo contráctil de actomiosina (Gladfelter *et al.*, 2001). El anillo de septinas comienza a formarse en el sitio de gemación incipiente antes de la emergencia de la yema y se extiende en una estructura similar a un reloj de arena después de la gemación, separándose en dos anillos después de la mitosis. A pesar de que el anillo de septinas tiene una apariencia normal en las células del mutante *yp158cΔ* que no muestran fenotipo multigemante; en las células multigemadas, sólo se observa el doble anillo en una de las células hijas, en general la de menor tamaño, habiendo desaparecido el anillo del lado de la célula madre en la otra. Similares defectos en el desensamblaje del anillo de septinas han sido observados en los mutantes *ptc1Δ* y *nbp2Δ* (Lorena Palacios, 2010). Esto indica que el defecto en el desensamblaje del anillo de septinas parece ser asimétrico y que la proteína *Ypl158c* podría desempeñar un papel en el desarrollo de este proceso fundamentalmente en el lado de la célula hija. De hecho,

aunque la localización de la proteína Ypl158c parece ser fundamentalmente perinuclear se ha observado en ocasiones una localización en el cuello entre la célula madre y la hija, por lo que no es descartable que dicha proteína tenga una función a este nivel.

Aunque el gen *YPL158C* presenta su expresión regulada por el factor de transcripción Swi5, expresándose específicamente en la fase M/G1 del ciclo celular, su sobreexpresión condujo a alteraciones morfológicas (células alargadas) asociadas con perturbaciones en el anillo de septinas. Aunque en estas condiciones se está expresando la proteína Ypl158c a lo largo de todo el ciclo celular, estos resultados apoyan la existencia de una relación funcional entre las septinas y la proteína Ypl158c. En este contexto se han descrito interacciones físicas (Tonikian *et al.*, 2009) entre la proteína Ypl158c y proteínas implicadas en el proceso de citoquinesis que se localizan en el cuello entre la célula madre y la hija de manera dependiente del anillo de septinas, como Hof1 y Cyk3 que participan junto con Inn1 (implicada en la coordinación de la contracción del anillo de actomiosina con la invaginación de la membrana plasmática) en la formación del septo primario (Nishihama *et al.*, 2009). Un fenotipo similar al causado por la sobreexpresión de la proteína Ypl158c se ha descrito en el triple mutante *hsl1Δ gin4Δ kcc4Δ* que muestra graves defectos morfogénéticos, con yemas alargadas incapaces de separarse de la célula madre (Barral *et al.*, 1999). Hsl1, Gin4 y Kcc4 son tres protein quinasas con funciones redundantes que se localizan en el cuello entre la célula madre y la hija asociadas a las septinas, dependiendo del correcto ensamblaje de éstas la actividad de dichas quinasas (Ozuzaki *et al.*, 1997; Longtine *et al.*, 1998). El hecho de que el fenotipo de células elongadas en el triple mutante *hsl1Δ gin4Δ kcc4Δ* sea suprimido al delecionar el gen *SWE1*, parece indicar que estas proteínas actúan como reguladores negativos de Swe1 (Barral *et al.*, 1999). Adicionalmente, dicho triple mutante presenta defectos en la localización del anillo de septinas que se anulan al delecionar el gen *SWE1* (Barral *et al.*, 1999). Perturbaciones en la organización del citoesqueleto de actina o del anillo de septinas conducen a una inhibición de la progresión del ciclo celular en las fases G₂/M, mediada por la proteína Swe1 que fosforila a la proteína Cdc28 (quinasa dependiente de ciclinas) en un residuo conservado de tirosina (revisado en Keaton y Lew, 2006). En estas condiciones de estrés, Swe1 se estabiliza y se acumula, sugiriéndose que su degradación es bloqueada por el *checkpoint* morfogénético (Sia *et al.*, 1998). El hecho de que el fenotipo debido a la sobreexpresión del gen *YPL158C* sea suprimido en ausencia de Swe1, sugiere que la sobreexpresión del gen *YPL158C* induce dicho *checkpoint* probablemente por alteraciones en el anillo de septinas que impiden una correcta localización de elementos necesarios para la degradación de Swe1.

Un segundo efecto de la proteína Ypl158c sobre el ciclo celular consiste en la observación de que el mutante *yp1158cΔ* presenta un retraso en la salida de la fase G₁ del ciclo celular asociado a un retardo en el proceso de gemación. Normalmente, los procesos de síntesis de DNA y gemación ocurren simultáneamente. Sin embargo, se han identificado cepas, como el doble mutante *clb5Δ clb6Δ* (delecionado en los genes que codifican las ciclinas de la fase S) que presentan un retraso en el inicio de la fase S en relación a la aparición de células gemadas (Schwob y Nasmyth, 1993). Recientemente, un rastreo genómico realizado para identificar mutantes delecionados en factores de transcripción con alteraciones en la progresión del ciclo celular ha revelado que el 67% de los mutantes seleccionados presenta un retraso en la salida de la fase G₁ (White *et al.*, 2008), consistente con el hecho de que muchos procesos están implicados en el control de la salida de esta fase y consiguiente replicación de DNA. Dichos factores de transcripción están implicados en gran variedad de procesos biológicos, entre ellos, los más representados son los relacionados con organización y biogénesis de orgánulos, transcripción, ciclo celular, metabolismo de RNA y respuesta a estrés. En levaduras, la progresión del ciclo celular desde la fase G₁ a la fase S requiere la activación de la proteína Cdc28 por las ciclinas de la fase G₁ (Cln1, Cln2, Cln3), con la consecuente formación de los complejos Cdc28-Cln que fosforilan a la proteína Sic1 para su degradación (Schwob *et al.*, 1994), de hecho, ésta parece ser la única función esencial de estos complejos ya que el fenotipo de letalidad del triple mutante *cln1Δ cln2Δ cln3Δ* es suprimido por la delección de *SIC1* (Scheider *et al.*, 1996). La proteína Sic1 es una CKI (*Cyclin dependent Kinase Inhibitor*) que impide la progresión del ciclo celular a la fase S inhibiendo la formación de los complejos Cdc28-Clb. Un retraso similar en la progresión del ciclo celular al observado en el mutante *yp1158cΔ* se ha descrito en condiciones de estrés osmótico (Escote *et al.*, 2004). En estas condiciones, Hog1 fosforila un residuo de treonina (Thr173) del extremo C-terminal de Sic1, que en combinación con una disminución en la expresión de las ciclinas de fase G₁, conduce a una estabilización de Sic1 y por tanto, una inhibición de la progresión del ciclo celular. En presencia de choque térmico también se ha descrito un retraso en la fase G₁ del ciclo celular asociada a una disminución de la expresión de las ciclinas *CLN1* y *CLN2* (Rowley *et al.*, 1993), sugiriéndose que las ciclinas Cln3 y Clb5 desempeñan un papel importante en la reanudación del ciclo celular en estas condiciones (Li y Cai, 1999). Recientemente, se ha descrito que el estrés oxidativo conduce a un retraso similar en la progresión del ciclo celular a través de la oxidación del factor de transcripción Swi6 específico de la transición de las fases G₁/S, y como consecuencia a una supresión de la expresión de las ciclinas de fase G₁ (Chiu *et al.*, 2011). Además, cepas mutantes en genes como *SDA1* (implicado en la organización del citoesqueleto de actina) o la exposición

a drogas como la latrunculina que causan la despolarización del citoesqueleto de actina también conducen a un retraso en la emergencia de la yema (Buscemi *et al.*, 2000; Sia *et al.*, 1998). Finalmente, se ha observado un retraso en la transición entre las fases G₁/S del ciclo celular en ausencia del gen SIT4 (codifica para una fosfatasa que actúa sobre Pkc1) (Fernandez-Sarabia *et al.*, 1992); (Clotet *et al.*, 1999), mediado por un exceso de actividad de la proteína Pkc1 (Angeles de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002). De hecho, se ha descrito que la sobreexpresión de *PKC1* induce una fase G₁ prolongada en cultivos creciendo en fase exponencial (Torre-Ruiz *et al.*, 2002). Serán necesarios estudios adicionales para determinar si el retraso en la progresión del ciclo celular observado en el mutante *yp158cΔ* se debe a un mecanismo similar a los citados.

7. CONCLUSIONES

1. La utilización de la fusión transcripcional del gen *MLP1* de *S. cerevisiae* al gen de resistencia al antibiótico nourseotricina, ha demostrado ser un sistema eficaz para la identificación a escala genómica de genes relacionados con la homeostasis de la pared celular en este organismo.
2. En el rastreo genómico para la identificación de mutantes de *S. cerevisiae* con inducción transcripcional del gen *MLP1* se han identificado 64 cepas que presentan incrementados de forma constitutiva los niveles de fosforilación de la MAPK de la ruta CWI. La mayoría de los mutantes seleccionados están relacionados con organización de la pared celular y morfogénesis, transducción de señal, transporte, transcripción y genes de función desconocida.
3. El análisis fenotípico del grupo de mutantes delecionados en genes de función desconocida y un grupo de genes no relacionados previamente con la integridad, sugiere que la activación de la ruta en este grupo se deba directa o indirectamente a alteraciones sobre la pared celular.
4. El 30% de los mutantes con activación constitutiva de la ruta CWI presenta mayor contenido en quitina que la cepa silvestre. Por tanto, la activación de la MAPK Slt2 no se asocia siempre con un incremento del contenido en quitina en la pared celular.
5. En general, existe un elevado grado de correlación entre los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 en los mutantes analizados y los niveles de activación transcripcional de genes regulados por la ruta de integridad activados en la respuesta a daños sobre la pared celular.
6. Se han identificado mutantes, como *ssd1Δ* o *pmt2Δ*, en los cuales existe activación transcripcional relevante de genes relacionados con la integridad celular dependiente de la actividad de la MAPK Slt2 o del factor de transcripción Rlm1, en ausencia de incrementos detectables en la fosforilación de la MAPK.
7. La caracterización del mutante delecionado en el gen de función desconocida *YPL158C*, identificado en el rastreo genómico, ha demostrado que su ausencia conduce a una activación de la ruta CWI dependiente del sensor Wsc1, a un incremento en el contenido en quitina y a fenotipos de sensibilidad a compuestos que afectan la integridad celular. Adicionalmente, el mutante *yp158cΔ* presenta un retraso en la salida de la fase G₁ del ciclo celular.
8. Aproximadamente un 30% de la población celular del mutante *yp158cΔ* presenta un fenotipo de multigemación asociado a un defecto en citoquinesis, concomitante con un fallo en el desensamblaje del anillo de septinas.

9. La sobreexpresión del gen YPL158C conduce a un fenotipo de hiperpolarización celular, además de observarse alteraciones en el anillo de septinas, dependiente de Swe1 (proteín quinasa que regula la transición entre las fases G₂/M del ciclo celular) y compatible con la inducción del *checkpoint morfogenético*.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Abramova,N., Sertil,O., Mehta,S., y Lowry,C.V. (2001) Reciprocal regulation of anaerobic and aerobic cell wall mannoprotein gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **183**: 2881-2887.
- Agarwal,A.K., Rogers,P.D., Baerson,S.R., Jacob,M.R., Barker,K.S., Cleary,J.D. *et al.* (2003) Genome-wide expression profiling of the response to polyene, pyrimidine, azole, and echinocandin antifungal agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 34998-35015.
- Aimanianda,V., Clavaud,C., Simenel,C., Fontaine,T., Delepierre,M., y Latge,J.P. (2009) Cell wall beta-(1,6)-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*: structural characterization and in situ synthesis. *J Biol Chem* **284**: 13401-13412.
- Alberts,A.S., Bouquin,N., Johnston,L.H., yTreisman,R. (1998) Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem* **273**: 8616-8622.
- Alexander,M.R., Tyers,M., Perret,M., Craig,B.M., Fang,K.S., y Gustin,M.C. (2001) Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. *Mol Biol Cell* **12**: 53-62.
- Alic,N., Higgins,V.J., Pichova,A., Breitenbach,M., y Dawes,I.W. (2003) Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 41849-41855.
- Amberg, D.C., Burke, D.J. and Strthorn, J.N. (2005) *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. New York; John English.
- Amon,A. (2002) Synchronization procedures. *Methods Enzymol* **351:457-67.**: 457-467.
- Andersson,J., Simpson,D.M., Qi,M., Wang,Y., y Elion,E.A. (2004) Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes. *EMBO J* **23**: 2564-2576.
- Andrews,P.D., and Stark,M.J. (2000) Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci* **113**: 2685-2693.
- Angeles de la Torre-Ruiz, Torres,J., Arino,J., y Herrero,E. (2002) Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 33468-33476.
- Arroyo,J., Bermejo,C., Garcia,R., yRodriguez-Peña,J.M. (2009) Genomics in the detection of damage in microbial systems: cell wall stress in yeast. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 1:44-6.**: 44-46.
- Arroyo,J., Hutzler,J., Bermejo,C., Ragni,E., Garcia-Cantalejo,J., Botias,P. *et al.* (2011) Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Mol Microbiol* **79**: 1529-1546.
- Asano,S., Park,J.E., Sakchaisri,K., Yu,L.R., Song,S., Supavilai,P. *et al.* (2005) Concerted

mechanism of Swe1/Wee1 regulation by multiple kinases in budding yeast. *EMBO J* **24**: 2194-2204.

Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, S.A. y Struhl, K. (1993), *Current Protocols in Molecular Biology*. Mew York: Greene Publishing Associates and Willey Interscience.

Babour, A., Bicknell, A.A., Tourtellotte, J., y Niwa, M. (2010) A surveillance pathway monitors the fitness of the endoplasmic reticulum to control its inheritance. *Cell* **142**: 256-269.

Baetz, K., Moffat, J., Haynes, J., Chang, M., y Andrews, B. (2001) Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol* **21**: 6515-6528.

Baladron, V., Ufano, S., Duenas, E., Martin-Cuadrado, A.B., del, R.F., y Vazquez 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.

Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S., y Snyder, M. (1999) Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev* **13**: 176-187.

Bermejo, C. Caracterización genómica funcional de las respuestas transcripcionales a situaciones que afectan a la integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Tesis Doctoral).

Bermejo, C., Garcia, R., Straede, A., Rodriguez-Peña, J.M., Nombela, C., Heinisch, J.J., y Arroyo, J. (2010) Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of wsc1 and mid2 deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS* **14**: 679-688.

Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Peña, J.M., Rodriguez de la Concepcion ML, Rivas, C. *et al.* (2008) The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell* **19**: 1113-1124.

Bharucha, N., Ma, J., Dobry, C.J., Lawson, S.K., Yang, Z., y Kumar, A. (2008) Analysis of the yeast kinome reveals a network of regulated protein localization during filamentous growth. *Mol Biol Cell* **19**: 2708-2717.

Bishop, A.L., y Hall, A. (2000) Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2:241-55**: 241-255.

Bloom, J., and Cross, F.R. (2007) Multiple levels of cyclin specificity in cell-cycle control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 149-160.

Bonilla, M., y Cunningham, K.W. (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* **14**: 4296-4305.

Booher, R.N., Deshaies, R.J., y Kirschner, M.W. (1993) Properties of *Saccharomyces*

cerevisiae wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J* **12**: 3417-3426.

Boorsma,A., de,N.H., ter,R.B., Bargmann,B., Brul,S., Hellingwerf,K.J., y Klis,F.M. (2004) Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 413-427.

Bos,J.L., Rehmann,H., y Wittinghofer,A. (2007) GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**: 865-877.

Boye,E., Skjolberg,H.C., y Grallert,B. (2009) Checkpoint regulation of DNA replication. *Methods Mol Biol* **521:55-70.**: 55-70.

Brewster,J.L., de,V.T., Dwyer,N.D., Winter,E., and Gustin,M.C. (1993) An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **19;259**: 1760-1763.

Brown,J.L., Bussey,H., y Stewart,R.C. (1994) Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J* **13**: 5186-5194.

Bryan,B.A., Knapp,G.S., Bowen,L.M., y Polymenis,M. (2004) The UV response in **Saccharomyces cerevisiae** involves the mitogen-activated protein kinase Slp2p. *Curr Microbiol* **49**: 32-34.

Buehrer,B.M., y Errede,B. (1997) Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **17**: 6517-6525.

Bulawa,C.E., y Osmond,B.C. (1990) Chitin synthase I and chitin synthase II are not required for chitin synthesis in vivo in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7424-7428.

Bulawa,C.E., Slater,M., Cabib,E., Au-Young,J., Sburlati,A., Adair,W.L., Jr., y Robbins,P.W. (1986) The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* **46**: 213-225.

Buscemi,G., Saracino,F., Masnada,D., y Carbone,M.L. (2000) The *Saccharomyces cerevisiae* SDA1 gene is required for actin cytoskeleton organization and cell cycle progression. *J Cell Sci* **113**: 1199-1211.

Cabib,E. (2009) Two novel techniques for determination of polysaccharide cross-links show that Crh1p and Crh2p attach chitin to both beta(1-6)- and beta(1-3)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Eukaryot Cell* **8**: 1626-1636.

Cabib,E. (2004) The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Arch Biochem Biophys* **426**: 201-207.

Cabib,E., Blanco,N., Grau,C., Rodriguez-Pena,J.M.,y Arroyo,J. (2007) Crh1p and Crh2p are required for the cross-linking of chitin to beta(1-6)glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **63**: 921-935.

Cabib,E., Drgonova,J., y Drgon,T. (1998) Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **67:307-33.**: 307-333.

- Cabib,E., y Duran,A. (2005) Synthase III-dependent chitin is bound to different acceptors depending on location on the cell wall of budding yeast. *J Biol Chem* **280**: 9170-9179.
- Cabib,E., Farkas,V., Kosik,O., Blanco,N., Arroyo,J., y McPhie,P. (2008) Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases in vivo and in vitro. *J Biol Chem* **283**: 29859-29872.
- Cabib,E., Roh,D.H., Schmidt,M., Crotti,L.B., yVarma,A. (2001) The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J Biol Chem* **276**: 19679-19682.
- Cabib,E., Silverman,S.J., y Shaw,J.A. (1992) Chitinase and chitin synthase 1: counterbalancing activities in cell separation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **138**: 97-102.
- Cappellaro,C., Baldermann,C., Rachel,R., y Tanner,W. (1994) Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of a- and alpha-agglutinin. *EMBO J* **13**: 4737-4744.
- Carotti,C., Ragni,E., Palomares,O., Fontaine,T., Tedeschi,G., Rodriguez,R. *et al.* (2004) Characterization of recombinant forms of the yeast Gas1 protein and identification of residues essential for glucanosyltransferase activity and folding. *Eur J Biochem* **271**: 3635-3645.
- Carroll,A.S., y O'Shea,E.K. (2002) Pho85 and signaling environmental conditions. *Trends Biochem Sci* **27**: 87-93.
- Chen,R.E., y Thorner,J. (2007) Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1773**: 1311-1340.
- Chen,T., Li,F., y Chen,B.S. (2009) Cross-talks of sensory transcription networks in response to various environmental stresses. *Interdiscip Sci* **1**: 46-54.
- Chen,Y., Feldman,D.E., Deng,C., Brown,J.A., De Giacomo,A.F., Gaw,A.F. *et al.* (2005) Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cancer Res* **3**: 669-677.
- Chiu,J., Tactacan,C.M., Tan,S.X., Lin,R.C., Wouters,M.A., y Dawes,I.W. (2011) Cell cycle sensing of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidation of a specific cysteine residue in the transcription factor Swi6p. *J Biol Chem* **286**: 5204-5214.
- Choi,W.J., Santos,B., Duran,A., y Cabib,E. (1994) Are yeast chitin synthases regulated at the transcriptional or the posttranslational level? *Mol Cell Biol* **14**: 7685-7694.
- Chowdhury,S., Smith,K.W.,y Gustin,M.C. (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J Cell Biol* **118**: 561-571.
- Chuang,J.S., ySchekman,R.W. (1996) Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* **135**: 597-610.
- Cid,V.J., Adamikova,L., Cenamor,R., Molina,M., Sanchez,M., y Nombela,C. (1998) Cell integrity and morphogenesis in a budding yeast septin mutant. *Microbiology* **144**: 3463-3474.

Cid,V.J., Duran,A., del,R.F., Snyder,M.P., Nombela,C., and Sanchez,M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Rev* **59**: 345-386.

Cid,V.J., Jimenez,J., Molina,M., Sanchez,M., Nombela,C., and Thorner,J.W. (2002) Orchestrating the cell cycle in yeast: sequential localization of key mitotic regulators at the spindle pole and the bud neck. *Microbiology* **148**: 2647-2659.

Claret,S., Gatti,X., Doignon,F., Thoraval,D., and Crouzet,M. (2005) The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1375-1386.

Clotet,J., Escote,X., Adrover,M.A., Yaakov,G., Gari,E., Aldea,M. *et al.* (2006) Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *EMBO J* **25**: 2338-2346.

Clotet,J., Gari,E., Aldea,M., and Arino,J. (1999) The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol Cell Biol* **19**: 2408-2415.

Clotet,J., and Posas,F. (2007) Control of cell cycle in response to osmotic stress: lessons from yeast. *Methods Enzymol* **428:63-76.**: 63-76.

Cohen,T.J., Mallory,M.J., Strich,R., and Yao,T.P. (2008) Hos2p/Set3p deacetylase complex signals secretory stress through the Mpk1p cell integrity pathway. *Eukaryot Cell* **7**: 1191-1199.

Collister,M., Didmon,M.P., MacIsaac,F., Stark,M.J., MacDonald,N.Q., and Keyse,S.M. (2002) YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **527**: 186-192.

Colman-Lerner,A., Chin,T.E., and Brent,R. (2001) Yeast Cbk1 and Mob2 activate daughter-specific genetic programs to induce asymmetric cell fates. *Cell* **107**: 739-750.

Correia,I.,onso-Monge,R., and Pla,J. (2010) MAPK cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans*. *Future Microbiol* **5**: 1125-1141.

Cos,T., Ford,R.A., Trilla,J.A., Duran,A., Cabib,E., and Roncero,C. (1998) Molecular analysis of Chs3p participation in chitin synthase III activity. *Eur J Biochem* **256**: 419-426.

Cox,J.S., Shamu,C.E., and Walter,P. (1993) Transcriptional induction of genes encoding endoplasmic reticulum resident proteins requires a transmembrane protein kinase. *Cell* **73**: 1197-1206.

Cross,F.R. (1995) Starting the cell cycle: what's the point? *Curr Opin Cell Biol* **7**: 790-797.

Cullen,P.J., Xu-Friedman,R., Delrow,J., and Sprague,G.F. (2006) Genome-wide analysis of the response to protein glycosylation deficiency in yeast. *FEMS Yeast Res* **6**: 1264-1273.

Davenport,K.R., Sohaskey,M., Kamada,Y., Levin,D.E., and 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.

de Bruin,R.A., and Wittenberg,C. (2009) All eukaryotes: before turning off G1-S transcription, please check your DNA. *Cell Cycle* **8**: 214-217.

de Groot,P.W., Ruiz,C., Vazquez de Aldana,C.R., Duenas,E., Cid,V.J., del,R.F. *et al.* (2001) A genomic approach for the identification and classification of genes involved in cell wall formation and its regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Comp Funct Genomics* **2**: 124-142.

de Nobel,J.G., Klis,F.M., Priem,J., Munnik,T., and Van Den,E.H. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**: 491-499.

de,N.H., Ruiz,C., Martin,H., Morris,W., Brul,S., Molina,M., and 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* **146**: 2121-2132.

Dean,N. (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 1287-1291.

Dean,N. (1999) Asparagine-linked glycosylation in the yeast Golgi. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 309-322.

Deckert,J., Perini,R., Balasubramanian,B., and Zitomer,R.S. (1995) Multiple elements and auto-repression regulate Rox1, a repressor of hypoxic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **139**: 1149-1158.

Delley,P.A., and Hall,M.N. (1999) Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol* **147**: 163-174.

DeMarini,D.J., Adams,A.E., Fares,H., De,V.C., Valle,G., Chuang,J.S., and Pringle,J.R. (1997) A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J Cell Biol* **139**: 75-93.

Dempski,R.E., Jr., and Imperiali,B. (2002) Oligosaccharyl transferase: gatekeeper to the secretory pathway. *Curr Opin Chem Biol* **6**: 844-850.

Denis,V., and Cyert,M.S. (2005) Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot Cell* **4**: 36-45.

Dephoure,N., Howson,R.W., Blethrow,J.D., Shokat,K.M., and O'Shea,E.K. (2005) Combining chemical genetics and proteomics to identify protein kinase substrates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 17940-17945.

Deresinski,S.C., and Stevens,D.A. (2003) Caspofungin. *Clin Infect Dis* **36**: 1445-1457.

Deutschbauer,A.M., Williams,R.M., Chu,A.M., and Davis,R.W. (2002) Parallel phenotypic

analysis of sporulation and postgermination growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15530-15535.

Dijkgraaf,G.J., Abe,M., Ohya,Y., and Bussey,H. (2002) Mutations in Fks1p affect the cell wall content of beta-1,3- and beta-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 671-690.

Dijkgraaf,G.J., Brown,J.L., and Bussey,H. (1996) The KNH1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of KRE9. *Yeast* **12**: 683-692.

Dodou,E., and Treisman,R. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 1848-1859.

Dohrmann,P.R., Butler,G., Tamai,K., Dorland,S., Greene,J.R., Thiele,D.J., and Stillman,D.J. (1992) Parallel pathways of gene regulation: homologous regulators SWI5 and ACE2 differentially control transcription of HO and chitinase. *Genes Dev* **6**: 93-104.

Doi,K., Gartner,A., Ammerer,G., Errede,B., Shinkawa,H., Sugimoto,K., and Matsumoto,K. (1994) MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO J* **13**: 61-70.

Doolin,M.T., Johnson,A.L., Johnston,L.H., and Butler,G. (2001) Overlapping and distinct roles of the duplicated yeast transcription factors Ace2p and Swi5p. *Mol Microbiol* **40**: 422-432.

Du,Y., Walker,L., Novick,P., and Ferro-Novick,S. (2006) Ptc1p regulates cortical ER inheritance via Slt2p. *EMBO J* **25**: 4413-4422.

Dupres,V., Alsteens,D., Wilk,S., Hansen,B., Heinisch,J.J., and Dufrene,Y.F. (2009) The yeast Wsc1 cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat Chem Biol* **5**: 857-862.

Ecker,M., Deutzmann,R., Lehle,L., Mrsa,V., and Tanner,W. (2006) Pir proteins of *Saccharomyces cerevisiae* are attached to beta-1,3-glucan by a new protein-carbohydrate linkage. *J Biol Chem* **281**: 11523-11529.

Elion,E.A. (2000) Pheromone response, mating and cell biology. *Curr Opin Microbiol* **3**: 573-581.

Epstein,C.B., and Cross,F.R. (1992) CLB5: a novel B cyclin from budding yeast with a role in S phase. *Genes Dev* **6**: 1695-1706.

Errede,B., Cade,R.M., Yashar,B.M., Kamada,Y., Levin,D.E., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev* **42**: 477-485.

Escote,X., Zapater,M., Clotet,J., and Posas,F. (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* **6**: 997-1002.

Feldmesser,M., Kress,Y., Mednick,A., and Casadevall,A. (2000) The effect of the echinocandin analogue caspofungin on cell wall glucan synthesis by *Cryptococcus neoformans*. *J Infect Dis* **182**: 1791-1795.

Fernandez-Sarabia,M.J., Sutton,A., Zhong,T., and Arndt,K.T. (1992) SIT4 protein phosphatase

is required for the normal accumulation of SWI4, CLN1, CLN2, and HCS26 RNAs during late G1. *Genes Dev* **6**: 2417-2428.

Ferrell, J.E., Jr., and Bhatt, R.R. (1997) Mechanistic studies of the dual phosphorylation of mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* **272**: 19008-19016.

Fiorani, P., Reid, R.J., Schepis, A., Jacquiau, H.R., Guo, H., Thimmaiah, P. *et al.* (2004) The deubiquitinating enzyme Doa4p protects cells from DNA topoisomerase I poisons. *J Biol Chem* **279**: 21271-21281.

Flandez, M., Cosano, I.C., Nombela, C., Martin, H., and Molina, M. (2004) Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **279**: 11027-11034.

Fuchs, B.B., and Mylonakis, E. (2009) Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell* **8**: 1616-1625.

Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Peña, J.M., Francois, J. *et al.* (2004) The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem* **279**: 15183-15195.

Garcia, R., Rodriguez-Peña, J.M., Bermejo, C., Nombela, C., and 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.

Garcia-Rodriguez, L.J., Duran, A., and Roncero, C. (2000) Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol* **182**: 2428-2437.

Garcia-Rodriguez, L.J., Valle, R., Duran, A., and Roncero, C. (2005) Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett* **579**: 6186-6190.

Gari E, *et al.* A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 837-848, 1997

Gentsch, M., and Tanner, W. (1997) Protein-O-glycosylation in yeast: protein-specific mannosyltransferases. *Glycobiology* **7**: 481-486.

Gerber, L.D., Kodukula, K., and Udenfriend, S. (1992) Phosphatidylinositol glycan (PI-G) anchored membrane proteins. Amino acid requirements adjacent to the site of cleavage and PI-G attachment in the COOH-terminal signal peptide. *J Biol Chem* **267**: 12168-12173.

Gietz, R.D., and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96.: 87-96.

Gimeno, C.J., Ljungdahl, P.O., Styles, C.A., and Fink, G.R. (1992) Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **70**: 1077-1090.

- Gladfelter,A.S., Pringle,J.R., and Lew,D.J. (2001) The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr Opin Microbiol* **4**: 681-689.
- Goffeau,A., Barrell,B.G., Bussey,H., Davis,R.W., Dujon,B., Feldmann,H. *et al.* (1996) Life with 6000 genes. *Science* **274**: 546, 563-546, 567.
- Gray,J.V., Ogas,J.P., Kamada,Y., Stone,M., Levin,D.E., and Herskowitz,I. (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* **16**: 4924-4937.
- Gray,J.V., Petsko,G.A., Johnston,G.C., Ringe,D., Singer,R.A., and Werner-Washburne,M. (2004) "Sleeping beauty": quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**: 187-206.
- Hahn,J.S., and Thiele,D.J. (2002) Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem* **277**: 21278-21284.
- Han,S., Lone,M.A., Schneider,R., and Chang,A. (2010) Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 5851-5856.
- Hanahan,D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.
- Hanks,S.K., and 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., and Lew,D.J. (2001) A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol* **3**: 417-420.
- Harrison,J.C., Zyla,T.R., Bardes,E.S., and Lew,D.J. (2004) Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J Biol Chem* **279**: 2616-2622.
- Hashikawa,N., Mizukami,Y., Imazu,H., and Sakurai,H. (2006) Mutated yeast heat shock transcription factor activates transcription independently of hyperphosphorylation. *J Biol Chem* **281**: 3936-3942.
- Haystead,T.A., Dent,P., Wu,J., Haystead,C.M., and Sturgill,T.W. (1992) Ordered phosphorylation of p42mapk by MAP kinase kinase. *FEBS Lett* **306**: 17-22.
- Heinisch,J.J. (2005) Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors--targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochim Biophys Acta* **1754**: 171-182.
- Heinisch,J.J., Dupres,V., Wilk,S., Jendretzki,A., and Dufrene,Y.F. (2010) Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One* **5**: e111104.
- Herrero,A.B., Magnelli,P., Mansour,M.K., Levitz,S.M., Bussey,H., and Abeijon,C. (2004) KRE5 gene null mutant strains of *Candida albicans* are avirulent and have altered cell wall

composition and hypha formation properties. *Eukaryot Cell* **3**: 1423-1432.

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

Hohmann,S. (2009) Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **583**: 4025-4029.

Hohmann,S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.

Hohmann,S., Krantz,M., and Nordlander,B. (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**:29-45.

Huh,W.K., Falvo,J.V., Gerke,L.C., Carroll,A.S., Howson,R.W., Weissman,J.S., and O'Shea,E.K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature* **425**: 686-691.

Hutzler,F., Gerstl,R., Lommel,M., and Strahl,S. (2008) Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol Microbiol* **68**: 1438-1449.

Igual,J.C., Johnson,A.L., and Johnston,L.H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J* **15**: 5001-5013.

Inoue,S.B., Qadota,H., Arisawa,M., Watanabe,T., and Ohya,Y. (1999) Prenylation of Rho1p is required for activation of yeast 1, 3-beta-glucan synthase. *J Biol Chem* **274**: 38119-38124.

Inoue,S.B., Takewaki,N., Takasuka,T., Mio,T., Adachi,M., Fujii,Y. *et al.* (1995) Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **231**: 845-854.

Irie,K., Takase,M., Lee,K.S., Levin,D.E., Araki,H., Matsumoto,K., and Oshima,Y. (1993) MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol* **13**: 3076-3083.

Ito,H., Fukuda,Y., Murata,K., and Kimura,A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**: 163-168.

Iyer,V.R., Horak,C.E., Scafe,C.S., Botstein,D., Snyder,M., and Brown,P.O. (2001) Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature* **409**: 533-538.

Jansen,J.M., Wanless,A.G., Seidel,C.W., and Weiss,E.L. (2009) Cbk1 regulation of the RNA-binding protein Ssd1 integrates cell fate with translational control. *Curr Biol* **19**: 2114-2120.

Jendretzki,A., Wittland,J., Wilk,S., Straede,A., and Heinisch,J.J. (2011) How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol* **90**: 740-744.

Jesch,S.A., Gaspar,M.L., Stefan,C.J., Aregullin,M.A., and Henry,S.A. (2010) Interruption of inositol sphingolipid synthesis triggers Stt4p-dependent protein kinase C signaling. *J Biol*

Chem **285**: 41947-41960.

Jimenez-Sanchez,M., Cid,V.J., and Molina,M. (2007) Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **282**: 31174-31185.

Jung,U.S., and Levin,D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**: 1049-1057.

Jung,U.S., Sobering,A.K., Romeo,M.J., and Levin,D.E. (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol* **46**: 781-789.

Kaeberlein,M., and Guarente,L. (2002) *Saccharomyces cerevisiae* MPT5 and SSD1 function in parallel pathways to promote cell wall integrity. *Genetics* **160**: 83-95.

Kajiwara,K., Watanabe,R., Pichler,H., Ihara,K., Murakami,S., Riezman,H., and Funato,K. (2008) Yeast ARV1 is required for efficient delivery of an early GPI intermediate to the first mannosyltransferase during GPI assembly and controls lipid flow from the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **19**: 2069-2082.

Kamada,Y., Jung,U.S., Piotrowski,J., and Levin,D.E. (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev* **9**: 1559-1571.

Kaptein, J.C., van den Ende, H., and Klis, F.M. (1999). The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim. Biophys. Acta* **1426**: 373-383.

Kaptein, J.C., ter Riet, B., Vink, E., Blad, S., De Nobel, H., Van Den Ende, H. y Klis, F.M. (2001). Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol* **39**: 469-479.

Keaton,M.A., and Lew,D.J. (2006) Eavesdropping on the cytoskeleton: progress and controversy in the yeast morphogenesis checkpoint. *Curr Opin Microbiol* **9**: 540-546.

Kelley,R., and Ideker,T. (2009) Genome-wide fitness and expression profiling implicate Mga2 in adaptation to hydrogen peroxide. *PLoS Genet* **5**: e1000488.

Keng,T. (1992) HAP1 and ROX1 form a regulatory pathway in the repression of HEM13 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **12**: 2616-2623.

Ketela,T., Green,R., and Bussey,H. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* **181**: 3330-3340.

Kim,K.Y., Truman,A.W., Caesar,S., Schlenstedt,G., and Levin,D.E. (2010) Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol Biol Cell* **21**: 1609-1619.

Kim,K.Y., Truman,A.W., and Levin,D.E. (2008) Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol* **28**: 2579-2589.

- Kitamura,K., and Yamamoto,Y. (1972) Purification and properties of an enzyme, zymolyase, which lyses viable yeast cells. *Arch Biochem Biophys* **153**: 403-406.
- Klebl,F., and Tanner,W. (1989) Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **171**: 6259-6264.
- Klis,F.M., Boorsma,A., and de Groot,P.W. (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185-202.
- Klis,F.M., Mol,P., Hellingwerf,K., and Brul,S. (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239-256.
- Kollar,R., Petrakova,E., Ashwell,G., Robbins,P.W., and Cabib,E. (1995) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1-->3)-glucan. *J Biol Chem* **270**: 1170-1178.
- Kollar,R., Reinhold,B.B., Petrakova,E., Yeh,H.J., Ashwell,G., Drgonova,J. *et al.* (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J Biol Chem* **272**: 17762-17775.
- Kono,K., Nogami,S., Abe,M., Nishizawa,M., Morishita,S., Pellman,D., and Ohya,Y. (2008) G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **19**: 1763-1771.
- Kota,J., and Ljungdahl,P.O. (2005) Specialized membrane-localized chaperones prevent aggregation of polytopic proteins in the ER. *J Cell Biol* **168**: 79-88.
- Kovacech,B., Nasmyth,K., and Schuster,T. (1996) EGT2 gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol Cell Biol* **16**: 3264-3274.
- Krause,S.A., and Gray,J.V. (2002) The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol* **12**: 588-593.
- Krysan,D.J., Ting,E.L., Abeijon,C., Kroos,L., and Fuller,R.S. (2005) Yapsins are a family of aspartyl proteases required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1364-1374.
- Kumar,A., Agarwal,S., Heyman,J.A., Matson,S., Heidtman,M., Piccirillo,S. *et al.* (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev* **16**: 707-719.
- Kumar,R., Reynolds,D.M., Shevchenko,A., Shevchenko,A., Goldstone,S.D., and Dalton,S. (2000) Forkhead transcription factors, Fkh1p and Fkh2p, collaborate with Mcm1p to control transcription required for M-phase. *Curr Biol* **10**: 896-906.
- Kuranda,K., Leberre,V., Sokol,S., Palamarczyk,G., and Francois,J. (2006) Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol* **61**: 1147-1166.
- Kuranda,M.J., and Robbins,P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 19758-19767.

- Kurischko,C., Kuravi,V.K., Herbert,C.J., and Luca,F.C. (2011) Nucleocytoplasmic shuttling of Ssd1 defines the destiny of its bound mRNAs. *Mol Microbiol* **81**: 831-849.
- Kurita,T., Noda,Y., Takagi,T., Osumi,M., and Yoda,K. (2011) Kre6 protein essential for yeast cell wall beta-1,6-glucan synthesis accumulates at sites of polarized growth. *J Biol Chem* **286**: 7429-7438.
- Lagorce,A., Hauser,N.C., Labourdette,D., Rodriguez,C., Martin-Yken,H., Arroyo,J. *et al.* (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 20345-20357.
- Lambou,K., Perkhofer,S., Fontaine,T., and Latge,J.P. (2010) Comparative functional analysis of the OCH1 mannosyltransferase families in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **27**: 625-636.
- Lee,K.S., and Levin,D.E. (1992) Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* **12**: 172-182.
- Lenssen,E., Azzouz,N., Michel,A., Landrieux,E., and Collart,M.A. (2007) The Ccr4-not complex regulates Skn7 through Srb10 kinase. *Eukaryot Cell* **6**: 2251-2259.
- Lesage,G., and Bussey,H. (2006) Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 317-343.
- Levin,D.E. (2005b) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.
- Levin,D.E. (2005a) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**: 262-291.
- Levin,D.E., and 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.
- Levin,D.E., Bowers,B., Chen,C.Y., Kamada,Y., and Watanabe,M. (1994) Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* **40**: 229-239.
- Levin,D.E., Fields,F.O., Kunisawa,R., Bishop,J.M., and Thorner,J. (1990) A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**: 213-224.
- Lew,D.J. (2003) The morphogenesis checkpoint: how yeast cells watch their figures. *Curr Opin Cell Biol* **15**: 648-653.
- Lew,D.J. (2000) Cell-cycle checkpoints that ensure coordination between nuclear and cytoplasmic events in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Genet Dev* **10**: 47-53.
- Lew,D.J., and Reed,S.I. (1993) Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J Cell Biol* **120**: 1305-1320.
- Lew,D.J., and Reed,S.I. (1995) A cell cycle checkpoint monitors cell morphogenesis in

budding yeast. *J Cell Biol* **129**: 739-749.

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

Li,X., and Cai,M. (1999) Recovery of the yeast cell cycle from heat shock-induced G(1) arrest involves a positive regulation of G(1) cyclin expression by the S phase cyclin Clb5. *J Biol Chem* **20;274**: 24220-24231.

Lipke,P.N., and Kurjan,J. (1992) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol Rev* **56**: 180-194.

Liu,H., and Bretscher,A. (1992) Characterization of TPM1 disrupted yeast cells indicates an involvement of tropomyosin in directed vesicular transport. *J Cell Biol* **118**: 285-299.

Lodder,A.L., Lee,T.K., and Ballester,R. (1999) Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**: 1487-1499.

Lommel,M., Bagnat,M., and Strahl,S. (2004) Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol Cell Biol* **24**: 46-57.

Lommel,M., and Strahl,S. (2009) Protein O-mannosylation: conserved from bacteria to humans. *Glycobiology* **19**: 816-828.

Longtine,M.S., Fares,H., and Pringle,J.R. (1998) Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* **143**: 719-736.

Longtine,M.S., Theesfeld,C.L., McMillan,J.N., Weaver,E., Pringle,J.R., and Lew,D.J. (2000) Septin-dependent assembly of a cell cycle-regulatory module in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **20**: 4049-4061.

Lorberg,A., Jacoby,J.J., Schmitz,H.P., and Heinisch,J.J. (2001) The PH domain of the yeast GEF Rom2p serves an essential function in vivo. *Mol Genet Genomics* **266**: 505-513.

Lu,J.M., Deschenes,R.J., and Fassler,J.S. (2004) Role for the Ran binding protein, Mog1p, in *Saccharomyces cerevisiae* SLN1-SKN7 signal transduction. *Eukaryot Cell* **3**: 1544-1556.

Lussier,M., Gentsch,M., Sdicu,A.M., Bussey,H., and Tanner,W. (1995) Protein O-glycosylation in yeast. The PMT2 gene specifies a second protein O-mannosyltransferase that functions in addition to the PMT1-encoded activity. *J Biol Chem* **270**: 2770-2775.

Lussier,M., Sdicu,A.M., Shahinian,S., and Bussey,H. (1998) The *Candida albicans* KRE9 gene is required for cell wall beta-1, 6-glucan synthesis and is essential for growth on glucose. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 9825-9830.

Lussier,M., White,A.M., Sheraton,J., di,P.T., Treadwell,J., Southard,S.B. *et al.* (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**: 435-450.

- Madden,K., Sheu,Y.J., Baetz,K., Andrews,B., and Snyder,M. (1997) SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**: 1781-1784.
- Mapes,J., and Ota,I.M. (2004) Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *EMBO J* **23**: 302-311.
- Marin,M.J., Flandez,M., Bermejo,C., Arroyo,J., Martin,H., and 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.
- Martin,H., Flandez,M., Nombela,C., and Molina,M. (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* **58**: 6-16.
- Martin,H., Rodriguez-Pachon,J.M., Ruiz,C., Nombela,C., and Molina,M. (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 1511-1519.
- Mattison,C.P., Spencer,S.S., Kresge,K.A., Lee,J., and Ota,I.M. (1999) Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol Cell Biol* **19**: 7651-7660.
- Mazur,P., Morin,N., Baginsky,W., el-Sherbeini,M., Clemas,J.A., Nielsen,J.B., and Foor,F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* **15**: 5671-5681.
- Mazzoni,C., Zarov,P., Rambourg,A., and Mann,C. (1993) The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **123**: 1821-1833.
- McMillan,J.N., Sia,R.A., and Lew,D.J. (1998) A morphogenesis checkpoint monitors the actin cytoskeleton in yeast. *J Cell Biol* **142**: 1487-1499.
- Measday,V., Moore,L., Retnakaran,R., Lee,J., Donoviel,M., Neiman,A.M., and Andrews,B. (1997) A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase. *Mol Cell Biol* **17**: 1212-1223.
- Mendenhall,M.D., and Hodge,A.E. (1998) Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1191-1243.
- Mio,T., Yamada-Okabe,T., Yabe,T., Nakajima,T., Arisawa,M., and Yamada-Okabe,H. (1997) Isolation of the *Candida albicans* homologs of *Saccharomyces cerevisiae* KRE6 and SKN1: expression and physiological function. *J Bacteriol* **179**: 2363-2372.
- Moffat,J., and Andrews,B. (2004) Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat Cell Biol* **6**: 59-66.
- Moffat,J., Huang,D., and Andrews,B. (2000) Functions of Pho85 cyclin-dependent kinases in budding yeast. *Prog Cell Cycle Res* **4:97-106.**: 97-106.
- Moran,P., and Caras,I.W. (1991) Fusion of sequence elements from non-anchored proteins

to generate a fully functional signal for glycosylphosphatidylinositol membrane anchor attachment. *J Cell Biol* **115**: 1595-1600.

Moseley, J.B., and Goode, B.L. (2006) The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 605-645.

Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M. *et al.* (2000) Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanoyltransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *J Biol Chem* **275**: 14882-14889.

Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsch, M., and Tanner, W. (1997) Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1145-1154.

Nagahashi, S., Lussier, M., and Bussey, H. (1998) Isolation of *Candida glabrata* homologs of the *Saccharomyces cerevisiae* KRE9 and KNH1 genes and their involvement in cell wall beta-1,6-glucan synthesis. *J Bacteriol* **180**: 5020-5029.

Nakano, K., Yamamoto, T., Kishimoto, T., Noji, T., and Tanaka, K. (2008) Protein kinases Fpk1p and Fpk2p are novel regulators of phospholipid asymmetry. *Mol Biol Cell* **19**: 1783-1797.

Negishi, T., and Ohya, Y. (2010) The cell wall integrity checkpoint: coordination between cell wall synthesis and the cell cycle. *Yeast* **27**: 513-519.

Nishihama, R., Schreiter, J.H., Onishi, M., Vallen, E.A., Hanna, J., Moravcevic, K. *et al.* (2009) Role of Inn1 and its interactions with Hof1 and Cyk3 in promoting cleavage furrow and septum formation in *S. cerevisiae*. *J Cell Biol* **185**: 995-1012.

Nuoffer, C., Horvath, A., and Riezman, H. (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J Biol Chem* **268**: 10558-10563.

Okuzaki, D., Tanaka, S., Kanazawa, H., and Nojima, H. (1997) Gin4 of *S. cerevisiae* is a bud neck protein that interacts with the Cdc28 complex. *Genes Cells* **2**: 753-770.

Orlean, P. (1997) Biogenesis of yeast cell wall and surface components. In *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Cell cycle and cell biology.* J.R. Pringle, J.R. a.E.W.J. (ed). Cold Spring Harbor, NY : Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 229-362.

Osmond, B.C., Specht, C.A., and Robbins, P.W. (1999) Chitin synthase III: synthetic lethal mutants and "stress related" chitin synthesis that bypasses the CSD3/CHS6 localization pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11206-11210.

Osumi, M. (1998) The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**: 207-233.

Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H. *et al.* (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**: 2196-2207.

Palacios, L. (2010). Ptc1, una serín/treonín fosfatasa que regula la señalización mediada por MAPKs y procesos morfogenéticos en *Saccharomyces cerevisiae* a través de su proteína adaptadora Nbp2 (Tesis Doctoral)

Pan,X., and Heitman,J. (2000) Sok2 regulates yeast pseudohyphal differentiation via a transcription factor cascade that regulates cell-cell adhesion. *Mol Cell Biol* **20**: 8364-8372.

Paravicini,G., Cooper,M., Friedli,L., Smith,D.J., Carpentier,J.L., Klig,L.S., and Payton,M.A. (1992) The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol Cell Biol* **12**: 4896-4905.

Paravicini,G., and Friedli,L. (1996) Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet* **251**: 682-691.

Perez,P., and Rincon,S.A. (2010) Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* **426**: 243-253.

Petkova,M.I., Pujol-Carrion,N., Arroyo,J., Garcia-Cantalejo,J., and Angeles de la Torre-Ruiz (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.

Philip,B., and Levin,D.E. (2001) Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**: 271-280.

Ponton,J. (2008) [The fungal cell wall and the mechanism of action of anidulafungin]. *Rev Iberoam Micol* **25**: 78-82.

Popolo,L., Gilardelli,D., Bonfante,P., and Vai,M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the ggp1delta mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **179**: 463-469.

Popolo,L., Gualtieri,T., and Ragni,E. (2001) The yeast cell-wall salvage pathway. *Med Mycol* **39 Suppl 1**:111-121.

Primig,M., Sockanathan,S., Auer,H., and Nasmyth,K. (1992) Anatomy of a transcription factor important for the start of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **358**: 593-597.

Ptacek,J., Devgan,G., Michaud,G., Zhu,H., Zhu,X., Fasolo,J. *et al.* (2005) Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**: 679-684.

Qadota,H., Python,C.P., Inoue,S.B., Arisawa,M., Anraku,Y., Zheng,Y. *et al.* (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**: 279-281.

Qi,M., and Elion,E.A. (2005) MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**: 3569-3572.

Racki,W.J., Becam,A.M., Nasr,F., and Herbert,C.J. (2000) Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **19**: 4524-4532.

- Ragni,E., Piberger,H., Neupert,C., Garcia-Cantalejo,J., Popolo,L., Arroyo,J. *et al.* (2011) The genetic interaction network of CCW12, a *Saccharomyces cerevisiae* gene required for cell wall integrity during budding and formation of mating projections. *BMC Genomics* **12**:107.: 107.
- Rajavel,M., Philip,B., Buehrer,B.M., Errede,B., and Levin,D.E. (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 3969-3976.
- Ram,A.F., Brekelmans,S.S., Oehlen,L.J., and Klis,F.M. (1995) Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **358**: 165-170.
- Ram,A.F., Kapteyn,J.C., Montijn,R.C., Caro,L.H., Douwes,J.E., Baginsky,W. *et al.* (1998) Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J Bacteriol* **180**: 1418-1424.
- Reed,S.I. (1992) The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu Rev Cell Biol* **8**: 529-561.
- Reinoso-Martin,C., Schuller,C., Schuetzer-Muehlbauer,M., and Kuchler,K. (2003) The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* **2**: 1200-1210.
- REYNOLDS,E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* **17**:208-12.: 208-212.
- Roberts,C.J., Nelson,B., Marton,M.J., Stoughton,R., Meyer,M.R., Bennett,H.A. *et al.* (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**: 873-880.
- Roberts,R.L., Bowers,B., Slater,M.L., and Cabib,E. (1983) Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **3**: 922-930.
- Roberts,R.L., and Fink,G.R. (1994) Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* **8**: 2974-2985.
- Robinson,M.K., van Zyl,W.H., Phizicky,E.M., and 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.
- Rodriguez-Peña,J.M., ez-Muniz,S., Nombela,C., and Arroyo,J. (2008) A yeast strain biosensor to detect cell wall-perturbing agents. *J Biotechnol* **133**: 311-317.
- Rodriguez-Peña,J.M., Garcia,R., Nombela,C., and Arroyo,J. (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**: 495-502.
- Rodriguez-Peña,J.M., Perez-Diaz,R.M., Alvarez,S., Bermejo,C., Garcia,R., Santiago,C. *et al.*

(2005) The 'yeast cell wall chip' - a tool to analyse the regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **151**: 2241-2249.

Rodríguez-Peña, J.M., Rodríguez, C., Álvarez, A., Nombela, C., and Arroyo, J. (2002) Mechanisms for targeting of the *Saccharomyces cerevisiae* GPI-anchored cell wall protein Crh2p to polarised growth sites. *J Cell Sci* **115**: 2549-2558.

Rodríguez-Quinones, J.F., and Rodríguez-Medina, J.R. (2009) Differential gene expression signatures for cell wall integrity found in chitin synthase II (chs2Delta) and myosin II (myo1Delta) deficient cytokinesis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Res Notes* **2:87**: 87.

Roelants, F.M., Baltz, A.G., Trott, A.E., Fereres, S., and Thorner, J. (2010) A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 34-39.

Roemer, T., and Bussey, H. (1991) Yeast beta-glucan synthesis: KRE6 encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**: 11295-11299.

Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A., and Bussey, H. (1994) Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol* **127**: 567-579.

Roh, D.H., Bowers, B., Schmidt, M., and Cabib, E. (2002) The septation apparatus, an autonomous system in budding yeast. *Mol Biol Cell* **13**: 2747-2759.

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

Roncero, C., and Duran, A. (1985) Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J Bacteriol* **163**: 1180-1185.

Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Werner-Washburne, M., and Singer, R.A. (1993) Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 1034-1041.

Ruiz, C., Cid, V.J., Lussier, M., Molina, M., and Nombela, C. (1999) A large-scale sonication assay for cell wall mutant analysis in yeast. *Yeast* **15**: 1001-1008.

Rupes, I. (2002) Checking cell size in yeast. *Trends Genet* **18**: 479-485.

Saito, H., and Tatebayashi, K. (2004) Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem (Tokyo)* **136**: 267-272.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Santos, B., and Snyder, M. (1997) Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J Cell Biol* **136**: 95-110.

Saracino,F., Bassler,J., Muzzini,D., Hurt,E., and gostoni Carbone,M.L. (2004) The yeast kinase Swe1 is required for proper entry into cell cycle after arrest due to ribosome biogenesis and protein synthesis defects. *Cell Cycle* **3**: 648-654.

Sato,K., and Nakano,A. (2002) Emp47p and its close homolog Emp46p have a tyrosine-containing endoplasmic reticulum exit signal and function in glycoprotein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **13**: 2518-2532.

Schmelzle,T., Helliwell,S.B., and Hall,M.N. (2002b) 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.

Schmelzle,T., Helliwell,S.B., and Hall,M.N. (2002a) 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.

Schmidt,A., Schmelzle,T., and Hall,M.N. (2002b) The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **45**: 1433-1441.

Schmidt,A., Schmelzle,T., and Hall,M.N. (2002a) The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **45**: 1433-1441.

Schneider,B.L., Yang,Q.H., and Futcher,A.B. (1996) Linkage of replication to start by the Cdk inhibitor Sic1. *Science* **272**: 560-562.

Schwob,E., Bohm,T., Mendenhall,M.D., and Nasmyth,K. (1994) The B-type cyclin kinase inhibitor p40SIC1 controls the G1 to S transition in *S. cerevisiae*. *Cell* **79**: 233-244.

Schwob,E., and Nasmyth,K. (1993) CLB5 and CLB6, a new pair of B cyclins involved in DNA replication in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **7**: 1160-1175.

Scrimale,T., Didone,L., de Mesy Bentley,K.L., and Krysan,D.J. (2009) The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **20**: 164-175.

Serrano,R., Martin,H., Casamayor,A., and Arino,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.

Shahinian,S., and Bussey,H. (2000) beta-1,6-Glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **35**: 477-489.

Shaner,N.C., Campbell,R.E., Steinbach,P.A., Giepmans,B.N., Palmer,A.E., and Tsien,R.Y. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* **22**: 1567-1572.

Shaw,J.A., Mol,P.C., Bowers,B., Silverman,S.J., Valdivieso,M.H., Duran,A., and Cabib,E. (1991) The function of chitin synthases 2 and 3 in the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J Cell Biol* **114**: 111-123.

Sheu,Y.J., Santos,B., Fortin,N., Costigan,C., and Snyder,M. (1998) Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* **18**: 4053-4069.

Shimizu,J., Yoda,K., and Yamasaki,M. (1994) The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae* hpo2 mutant is due to a mutation in PKC1, which regulates expression of beta-glucanase. *Mol Gen Genet* **242**: 641-648.

Sia,R.A., Bardes,E.S., and Lew,D.J. (1998) Control of Swe1p degradation by the morphogenesis checkpoint. *EMBO J* **17**: 6678-6688.

Sikorski, R.S., y 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.

Sinha,H., David,L., Pascon,R.C., Clauder-Munster,S., Krishnakumar,S., Nguyen,M. *et al.* (2008) Sequential elimination of major-effect contributors identifies additional quantitative trait loci conditioning high-temperature growth in yeast. *Genetics* **180**: 1661-1670.

Smits,G.J., Van Den,E.H., and Klis,F.M. (2001) Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology* **147**: 781-794.

Soler,M., Plovins,A., Martin,H., Molina,M., and Nombela,C. (1995) Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol Microbiol* **17**: 833-842.

Spellman,P.T., Sherlock,G., Zhang,M.Q., Iyer,V.R., Anders,K., Eisen,M.B. *et al.* (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell* **9**: 3273-3297.

Staleva,L., Hall,A., and Orlow,S.J. (2004) Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent Manner. *Mol Biol Cell* **15**: 5574-5582.

Stark,G.R., and Taylor,W.R. (2006) Control of the G2/M transition. *Mol Biotechnol* **32**: 227-248.

Stevens,D.A., Ichinomiya,M., Koshi,Y., and Horiuchi,H. (2006) Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. *Antimicrob Agents Chemother* **50**: 3160-3161.

Stone,E.A., Fung,H.B., and Kirschenbaum,H.L. (2002) Caspofungin: an echinocandin antifungal agent. *Clin Ther* **24**: 351-377.

Strahl-Bolsinger,S., Gentsch,M., and Tanner,W. (1999) Protein O-mannosylation. *Biochim Biophys Acta* **1426**: 297-307.

Sumita,T., Yoko-o T, Shimma,Y., and Jigami,Y. (2005) Comparison of cell wall localization among Pir family proteins and functional dissection of the region required for cell wall binding and bud scar recruitment of Pir1p. *Eukaryot Cell* **4**: 1872-1881.

- Surana,U., Robitsch,H., Price,C., Schuster,T., Fitch,I., Futcher,A.B., and Nasmyth,K. (1991) The role of CDC28 and cyclins during mitosis in the budding yeast *S. cerevisiae*. *Cell* **65**: 145-161.
- Suzuki,M., Igarashi,R., Sekiya,M., Utsugi,T., Morishita,S., Yukawa,M., and Ohya,Y. (2004) Dynactin is involved in a checkpoint to monitor cell wall synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Cell Biol* **6**: 861-871.
- Swain,E., Stukej,J., McDonough,V., Germann,M., Liu,Y., Sturley,S.L., and Nickels,J.T., Jr. (2002) Yeast cells lacking the ARV1 gene harbor defects in sphingolipid metabolism. Complementation by human ARV1. *J Biol Chem* **277**: 36152-36160.
- Szklarczyk,D., Franceschini,A., Kuhn,M., Simonovic,M., Roth,A., Minguéz,P. *et al.* (2011) The STRING database in 2011: functional interaction networks of proteins, globally integrated and scored. *Nucleic Acids Res* **39**: D561-D568.
- Teparic,R., Stuparevic,I., and Mrsa,V. (2004) Increased mortality of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall protein mutants. *Microbiology* **150**: 3145-3150.
- Ter Linde,J.J., and Steensma,H.Y. (2002) A microarray-assisted screen for potential Hap1 and Rox1 target genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**: 825-840.
- Terashima,H., Hamada,K., and Kitada,K. (2003) The localization change of Ybr078w/Ecm33, a yeast GPI-associated protein, from the plasma membrane to the cell wall, affecting the cellular function. *FEMS Microbiol Lett* **218**: 175-180.
- Tinkelenberg,A.H., Liu,Y., Alcantara,F., Khan,S., Guo,Z., Bard,M., and Sturley,S.L. (2000) Mutations in yeast ARV1 alter intracellular sterol distribution and are complemented by human ARV1. *J Biol Chem* **275**: 40667-40670.
- Tolliday,N., Pitcher,M., and Li,R. (2003) Direct evidence for a critical role of myosin II in budding yeast cytokinesis and the evolvability of new cytokinetic mechanisms in the absence of myosin II. *Mol Biol Cell* **14**: 798-809.
- Tong,A.H., Lesage,G., Bader,G.D., Ding,H., Xu,H., Xin,X. *et al.* (2004) Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science* **303**: 808-813.
- Tonikian,R., Xin,X., Toret,C.P., Gfeller,D., Landgraf,C., Panni,S. *et al.* (2009) Bayesian modeling of the yeast SH3 domain interactome predicts spatiotemporal dynamics of endocytosis proteins. *PLoS Biol* **7**: e1000218.
- Torres,L., Martin,H., Garcia-Saez,M.I., Arroyo,J., Molina,M., Sanchez,M., and Nombela,C. (1991) A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol* **5**: 2845-2854.
- Trilla,J.A., Duran,A., and Roncero,C. (1999) Chs7p, a new protein involved in the control of protein export from the endoplasmic reticulum that is specifically engaged in the regulation of chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **145**: 1153-1163.
- Truman,A.W., Millson,S.H., Nuttall,J.M., King,V., Mollapour,M., Prodromou,C. *et al.* (2006) Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90

chaperone that complements loss of the Slp2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell* **5**: 1914-1924.

Utsugi,T., Minemura,M., Hirata,A., Abe,M., Watanabe,D., and Ohya,Y. (2002) Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells* **7**: 1-9.

Valdivia,R.H., and Schekman,R. (2003) The yeasts Rho1p and Pkc1p regulate the transport of chitin synthase III (Chs3p) from internal stores to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 10287-10292.

Valdivieso,M.H., Ferrario,L., Vai,M., Duran,A., and Popolo,L. (2000) Chitin synthesis in a gas1 mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **182**: 4752-4757.

Valdivieso,M.H., Mol,P.C., Shaw,J.A., Cabib,E., and Duran,A. (1991) CAL1, a gene required for activity of chitin synthase 3 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **114**: 101-109.

van,d., V, Caro,L.H., Chapman,J.W., Klis,F.M., and Verrips,C.T. (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 3104-3110.

van,d., V, van Schagen,F.S., Mooren,A.T., Chapman,J.W., Klis,F.M., and Verrips,C.T. (1996) The retention mechanism of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Wall-bound Cwp2p is beta-1,6-glucosylated. *Biochim Biophys Acta* **1291**: 206-214.

van,D.F., and Peter,M. (2002) Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol* **12**: 1698-1703.

Verna,J., Lodder,A., Lee,K., Vagts,A., and Ballester,R. (1997) A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 13804-13809.

Verstrepen,K.J., Derdelinckx,G., Verachtert,H., and Delvaux,F.R. (2003) Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 197-205.

Vetter,I.R., and Wittinghofer,A. (2001) The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**: 1299-1304.

Vilella,F., Herrero,E., Torres,J., and 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.

Visintin,R., Craig,K., Hwang,E.S., Prinz,S., Tyers,M., and Amon,A. (1998) The phosphatase Cdc14 triggers mitotic exit by reversal of Cdk-dependent phosphorylation. *Mol Cell* **2**: 709-718.

Warmka,J., Hanneman,J., Lee,J., Amin,D., and 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.

Watanabe,D., Abe,M., and Ohya,Y. (2001) Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-beta-glucan synthesis. *Yeast* **18**: 943-951.

Watanabe,Y., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995) Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **15**: 5740-5749.

Watanabe,Y., Takaesu,G., Hagiwara,M., Irie,K., and Matsumoto,K. (1997) Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slf2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **17**: 2615-2623.

Wennerberg,K.; Rossman,K.L.; Der,C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J. Cell Sci* **118**: 843-846

White,M.A., Riles,L., and Cohen,B.A. (2009) A systematic screen for transcriptional regulators of the yeast cell cycle. *Genetics* **181**: 435-446.

Willer,T., Valero,M.C., Tanner,W., Cruces,J., and Strahl,S. (2003) O-mannosyl glycans: from yeast to novel associations with human disease. *Curr Opin Struct Biol* **13**: 621-630.

Winkler,A., Arkind,C., Mattison,C.P., Burkholder,A., Knoche,K., and Ota,I. (2002) Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell* **1**: 163-173.

Yaakov,G., Duch,A., Garcia-Rubio,M., Clotet,J., Jimenez,J., Aguilera,A., and Posas,F. (2009) The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress. *Mol Biol Cell* **20**: 3572-3582.

Yan,Q., and Lennarz,W.J. (2002) Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits: a glycosylatable photoprobe binds to the luminal domain of Ost1p. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**: 15994-15999.

Yoshida,S., Bartolini,S., and Pellman,D. (2009) Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev* **23**: 810-823.

Yoshida,S., Kono,K., Lowery,D.M., Bartolini,S., Yaffe,M.B., Ohya,Y., and Pellman,D. (2006) Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* **313**: 108-111.

Yoshikawa,K., Tanaka,T., Furusawa,C., Nagahisa,K., Hirasawa,T., and Shimizu,H. (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 32-44.

Young,B.P., Craven,R.A., Reid,P.J., Willer,M., and Stirling,C.J. (2001) Sec63p and Kar2p are required for the translocation of SRP-dependent precursors into the yeast endoplasmic reticulum in vivo. *EMBO J* **20**: 262-271.

Zarrov,P., Mazzoni,C., and Mann,C. (1996) The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J* **15**: 83-91.

Zettel,M.F., Garza,L.R., Cass,A.M., Myhre,R.A., Haizlip,L.A., Osadebe,S.N. *et al.* (2003) The budding index of *Saccharomyces cerevisiae* deletion strains identifies genes important for cell cycle progression. *FEMS Microbiol Lett* **223**: 253-258.

Zhao,C., Jung,U.S., Garrett-Engel,P., Roe,T., Cyert,M.S., and Levin,D.E. (1998) Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol* **18**: 1013-1022.

Ziman,M., Chuang,J.S., and Schekman,R.W. (1996) Chs1p and Chs3p, two proteins involved in chitin synthesis, populate a compartment of the *Saccharomyces cerevisiae* endocytic pathway. *Mol Biol Cell* **7**: 1909-1919.

Ziman,M., Chuang,J.S., Tsung,M., Hamamoto,S., and Schekman,R. (1998) Chs6p-dependent anterograde transport of Chs3p from the chitosome to the plasma membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **9**: 1565-1576.

9. ANEXO

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Genome-wide survey of yeast mutations leading to activation of the yeast cell integrity MAPK pathway: Novel insights into diverse MAPK outcomes

Patricia Arias, Sonia Díez-Muñiz, Raúl García, César Nombela, José M Rodríguez-Peña* and Javier Arroyo

Abstract

Background: The yeast cell wall integrity mitogen-activated protein kinase (CWI-MAPK) pathway is the main regulator of adaptation responses to cell wall stress in yeast. Here, we adopt a genomic approach to shed light on two aspects that are only partially understood, namely, the characterization of the gene functional catalog associated with CWI pathway activation and the extent to which MAPK activation correlates with transcriptional outcomes.

Results: A systematic yeast mutant deletion library was screened for constitutive transcriptional activation of the CWI-related reporter gene *MLP1*. Monitoring phospho-Slt2/Mpk1 levels in the identified mutants revealed sixty-four deletants with high levels of phosphorylation of this MAPK, including mainly genes related to cell wall construction and morphogenesis, signaling, and those with unknown function. Phenotypic analysis of the last group of mutants suggests their involvement in cell wall homeostasis. A good correlation between levels of Slt2 phosphorylation and the magnitude of the transcriptional response was found in most cases. However, the expression of CWI pathway-related genes was enhanced in some mutants in the absence of significant Slt2 phosphorylation, despite the fact that functional MAPK signaling through the pathway was required. CWI pathway activation was associated to increased deposition of chitin in the cell wall - a known survival compensatory mechanism - in about 30% of the mutants identified.

Conclusion: We provide new insights into yeast genes related to the CWI pathway and into how the state of activation of the Slt2 MAPK leads to different outcomes, discovering the versatility of this kind of signaling pathways. These findings potentially have broad implications for understanding the functioning of other eukaryotic MAPKs.

Background

The capacity to respond properly to external stimuli or environmental conditions is essential for homeostasis in eukaryotes. Signaling pathways, in particular those mediated by mitogen-activated protein kinases (MAPKs), play a key role in these processes. A significant amount of research has been conducted in recent years to characterize these signal transduction pathways, based largely on the model yeast *Saccharomyces cerevisiae* (also known as baker's or budding yeast). Since MAPK pathways are evolutionarily conserved, insights gained from yeast contribute to a better understanding of orthologous pathways in higher organisms. The basic assembly of MAPK

pathways is a three-component module conserved from yeast to humans, consisting of three kinases that establish a sequential activation pathway by means of phosphorylation events [1]. The regulation of MAPK signal transduction depends on a variety of mechanisms including scaffold proteins, subcellular localization of different elements and the action of protein phosphatases [2].

In yeast, six MAPK cascades have been identified that mediate the response to different stimuli: (i) pheromones (pheromone response pathway); (ii) nitrogen starvation (filamentous growth pathway); (iii) hyperosmolarity (high osmolarity/glycerol pathway); (iv) *STE* vegetative growth pathway (SVG) [3]; (v) nutrient starvation (spore wall assembly pathway); and (vi) cell wall stress (CWI: cell wall integrity pathway) (see an extensive review of MAPK pathways in [2]). The CWI pathway is essential for maintaining

* Correspondence: josemanu@farm.ucm.es
Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, IRYCIS, 28040 Madrid, Spain