

# UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Farmacia

Departamento de Microbiología II



## TESIS DOCTORAL

**Estudio de la regulación negativa por proteínas fosfatasa de las rutas de señalización mediadas por MAPKs de apareamiento e integridad celular en *Saccharomyces cerevisiae***

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Almudena Sacristán Reviriego**

Directores

María Molina Martín  
Humberto Martín Brieva

**Madrid, 2014**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**Estudio de la regulación negativa por proteínas fosfatasa de  
las rutas de señalización mediadas por MAPKs de  
apareamiento e integridad celular en *Saccharomyces  
cerevisiae***

Memoria presentada para optar al grado de doctor por

**Almudena Sacristán Reviriego**

Directores:

**María Molina Martín  
Humberto Martín Brieva**

Madrid 2014



COMPLUTENSE UNIVERSITY OF MADRID  
FACULTY OF PHARMACY  
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY II



**Study of the negative regulation of the mating and cell wall  
integrity MAPK pathways by protein phosphatases in  
*Saccharomyces cerevisiae***

Thesis submitted in fulfillment of the requirements for the

Degree of Doctor by

**Almudena Sacristán Reviriego**

Supervisors:

**María Molina Martín**

**Humberto Martín Brieva**

Madrid 2014



**D<sup>a</sup> CONCEPCIÓN GIL GARCÍA, Directora del Departamento de Microbiología  
II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid**

**CERTIFICA:**

Que **ALMUDENA SACRISTÁN REVIRIEGO** 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 **MARÍA MOLINA MARTÍN** y **HUMBERTO MARTÍN BRIEVA** el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor con el título:

**“Estudio de la regulación negativa por proteín fosfatasas de las rutas de  
señalización mediadas por MAPKs de apareamiento e integridad celular en  
*Saccharomyces cerevisiae*”**

Y para que así conste, firmo la presente certificación en Madrid, 2014

Fdo. Dra. D<sup>a</sup> Concepción Gil García



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

- **BIO2010-22369-C02-01:** “*Saccharomyces cerevisiae* como modelo para el estudio de la señalización eucariótica y su aplicación al diseño de bioensayos de cribado farmacológico”, subvencionado por el Ministerio de Economía y Competitividad (2010-2014).
- **S2011/BDM2014:** “Programación de circuitos microbianos en medicina protectiva y terapéutica”, subvencionado por la Comunidad de Madrid (2010-2014).

Así como a la concesión de las siguientes ayudas:

- **Beca de Formación del Profesorado Universitario (FPU)** concedida por el Ministerio de Ciencia e Innovación durante el periodo 2009-2013.
- **Ayuda para la realización de Estancias Breves dentro del programa FPU**, concedida para la estancia temporal en el laboratorio de la Dra. Lydia Tabernero, *The University of Manchester*, Reino Unido, 2011.
- **Ayuda Wood-Whelan Fellowship**, subvencionada por la IUBMB (*International Union of Biochemistry and Molecular Biology*) para la realización de una estancia temporal en el laboratorio del Dr. Daniel Lew, *Duke University, North Carolina*, USA, 2014.



*A mis padres*



*Con estas líneas pretendo expresar mi gratitud y cariño a todos aquellos que me han acompañado en este emocionante camino a lo largo de los últimos años.*

*Me gustaría comenzar agradeciendo a mis directores de Tesis, Humberto y María, porque no podría haber imaginado mejores mentores para mí. Gracias por el esfuerzo, dedicación e implicación mostrados en este proyecto. Me habéis inculcado con cercanía y simpatía la ilusión por la Ciencia y la paciencia, que siempre va ligada a ella. No puedo olvidarme de Víctor, con el que he tenido la oportunidad de aprender a través de seminarios y me ha transmitido su inagotable entusiasmo. Los tres sois sensibles, brillantes, os complementáis a la perfección y soy consciente de que allá donde vaya os echaré de menos.*

*Gracias a todas las personas que forman parte del Departamento: profesores, secretarias, técnicos y becarios, porque siempre estáis dispuestos a compartir, echar una mano y resolver cualquier duda. Me acogisteis con los brazos abiertos y ha sido un placer formar parte de este gran equipo.*

*Especial mención para los becarios de la Unidad 3, los que se quedan y los que nos dejaron hace tiempo. Compañeros de fatigas y aventura: gracias por todo el apoyo que me habéis mostrado. Estos años han sido inolvidables a vuestro lado. Me llevo vuestra amistad.*

*I would also like to thank Dr Lydia Tabernero and Dr Daniel Lew for giving me the opportunity to open my eyes to another ways of addressing, studying, analysing and performing Science. I really appreciate your help and I will never forget such rewarding and challenging experiences.*

*Y como quien soy Hoy se lo debo al Ayer, agradezco de igual forma a aquellas personas que, fuera del laboratorio, me han acompañado a lo largo de mi vida y con las que he compartido grandes momentos: mis abuelos, mis primos y tíos, los de la Guardé, los del Cole, las del pueblo, las de ballet, los de Almería, los del Conser, los de la orquesta, los de la Ruta Quetzal, los de Granville, los de la Uni, los de Eastbourne, los de Montpellier, las de Barretstown, las ketchupas, los de Manchester y los de Duke.*

*Por último, a mis padres. Lo cierto es que no resulta fácil expresar con palabras el reconocimiento y el amor que siento hacia ellos.*

*Ésto sólo ha sido un aperitivo... Show must go on*



# Índice

---



<b>Abreviaturas</b> .....	11
<b>Summary</b> .....	15
<b>Introducción</b> .....	23
1. RUTAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKS .....	25
1.1. Función y estructura .....	25
1.2 Mecanismos de regulación de la fidelidad y especificidad .....	28
1.2.1 Proteínas de andamiaje ( <i>scaffold</i> ) .....	29
1.2.2 Dominios de interacción entre proteínas (dominios <i>Docking</i> ) .....	29
1.1.2.1 Dominios de unión en proteínas que interaccionan con MAPKs .....	30
1.1.2.2 Sitios de anclaje en las MAPKs .....	31
2. RUTAS de MAPKs en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	33
2.1 Ruta de apareamiento .....	33
2.2 Ruta de crecimiento invasivo o pseudofilamentoso .....	36
2.3 Ruta de esporulación .....	38
2.4 Ruta de respuesta a alta osmolaridad .....	39
2.5 Ruta de integridad celular .....	42
2.5.1 Sensores .....	45
2.5.2 Rho1 .....	45
2.5.3 Proteín quinasa C 1 (Pkc1) .....	46
2.5.4 Módulo de MAPKs .....	46
2.5.5 Factores de transcripción: Rlm1 y el complejo SBF (Swi4/Swi6) .....	48
3. REGULACIÓN NEGATIVA DE LAS RUTAS DE MAPKs POR PROTEÍN FOSFATASAS .....	49
3.1 Proteín fosfatasas de serinas y treoninas .....	50
3.1.1 Fosfoproteín fosfatasas (PPPs) .....	51
3.1.2 Proteín fosfatasas metalodependientes (PPMs) .....	51
3.2 Proteín fosfatasas de tirosinas .....	52
3.3 Proteín fosfatasas de especificidad dual .....	54

3.3.1 MKPs: MAPK <i>Phosphatases</i> .....	54
4. PROTEÍN FOSFATASAS DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	58
4.1 Proteín fosfatasas de serinas y treoninas .....	58
4.1.1 PPPs.....	58
4.1.1.1 PP1.....	58
4.1.1.2 PP2A .....	59
4.1.1.3 PP2B .....	59
4.1.1.4 PP5- <i>like</i> .....	60
4.1.2 FCPs.....	60
4.1.3 PPMs o PP2Cs .....	60
4.2 Proteín fosfatasas de tirosinas .....	60
4.3 Proteín fosfatasas de especificidad dual .....	61
5. REGULACIÓN NEGATIVA DE LAS RUTAS DE MAPKs POR PROTEÍN FOSFATASAS EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	62
5.1 Proteín fosfatasas de serinas y treoninas que actúan en rutas de MAPKs .....	63
5.1.1 Ptc1.....	63
5.1.1.1 Ptc1 en la ruta de alta osmolaridad .....	63
5.1.1.2 Ptc1 en la ruta de integridad celular .....	63
5.1.1.3 Ptc1 en la ruta de apareamiento.....	64
5.1.1.4 Otras funciones de Ptc1 .....	65
5.1.2 Ptc2, Ptc3 y Ptc4.....	65
5.1.2.1 Ptc2, Ptc3 y Ptc4 en la ruta de alta osmolaridad .....	65
5.2 Proteín fosfatasas de tirosinas de MAPKs .....	66
5.2.1 Ptp2 y Ptp3 .....	66
5.2.1.1 Ptp2 y Ptp3 en la ruta de alta osmolaridad .....	66
5.2.1.2 Ptp2 y Ptp3 en la ruta de apareamiento .....	67
5.2.1.3 Ptp2 y Ptp3 en la ruta de integridad celular .....	68

5.3 Proteín fosfatasas de especificidad dual de MAPKs .....	68
5.3.1 Msg5 .....	68
5.3.1.1 Msg5 en la ruta de apareamiento .....	69
5.3.1.2 Msg5 en la ruta de integridad celular .....	71
5.3.2 Sdp1 .....	72
5.3.2.1 Sdp1 en la ruta de integridad celular .....	72
<b>Materiales y Métodos .....</b>	<b>79</b>
1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS .....	81
1.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	81
1.2 <i>Escherichia coli</i> .....	82
2. MEDIOS DE CULTIVO .....	83
3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS .....	84
3.1 Condiciones generales de crecimiento .....	84
3.2 Determinación del crecimiento y condiciones de conservación .....	85
3.3 Ensayos de sensibilidad en placa .....	85
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MANIPULACIÓN DEL DNA .....	86
4.1 Mutagénesis dirigida .....	86
4.2 Oligonucleótidos utilizados .....	87
4.3 Plásmidos utilizados .....	89
4.4 Plásmidos generados .....	94
5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA .....	97
6. CITOMETRÍA DE FLUJO .....	98
7. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA .....	98
8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE <i>WESTERN-BLOTTING</i> .....	99
8.1 Obtención de extractos y preparación de muestras .....	99
8.2 Electroforesis de proteínas y transferencia a membranas de nitrocelulosa .....	100
8.3 Inmunodetección .....	100
9. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE LEVADURA EN <i>E.coli</i> .....	101
10. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS .....	102

10.1 Ensayos de copurificación <i>in vivo</i> .....	102
10.2 Ensayos de copurificación <i>in vitro</i> .....	103
10.3 Sistema de dos híbridos .....	103
10.3.1 Valoración cuantitativa de la interacción (actividad $\beta$ -galactosidasa) .....	104
11. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL .....	105
12. SOPORTE BIOINFORMÁTICO .....	105
<b>Resultados</b> .....	<b>107</b>
1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE Msg5 Y Sdp1 SOBRE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR .....	109
1.1 Análisis de la regiones de Slit2 y Mlp1 implicadas en la unión a Msg5 .....	109
1.1.1 La extensión C-terminal de Slit2 es dispensable para su unión a Msg5 .....	110
1.1.2 La región N-terminal de Slit2 es dispensable para su unión a Msg5 .....	113
1.1.3 La región 274-373 de Slit2 media la unión a Msg5 de forma independiente al motivo <i>Common Docking</i> de la MAPK .....	113
1.1.4 La región 274-373 de Mlp1 media la unión a Msg5 de forma independiente al motivo <i>Common Docking</i> de la pseudoquinasa .....	115
1.1.5 La región 274-373 de Slit2 media la unión a Mkk1 de manera dependiente del motivo <i>Common Docking</i> .....	116
1.2 Caracterización de la función del motivo IYT de Msg5 y Sdp1 en la ruta de integridad celular .....	117
1.2.1 Identificación del motivo IYT en fosfatasa de especificidad dual de distintas especies de hongos .....	117
1.2.2 El motivo IYT de Msg5 media la interacción con Slit2 y Mlp1 .....	119
1.2.3 El motivo IYT de Sdp1 media la interacción con Slit2 y Mlp1 .....	123
1.2.3 Efecto de la ausencia del motivo IYT de Msg5 sobre la ruta de integridad celular .....	126
1.2.3.1 La mutación del motivo IYT de Msg5 no afecta a la fosforilación de Slit2 ni a la expresión de genes dependientes de la ruta CWI en presencia de rojo Congo .....	126

1.2.3.2 La mutación del motivo IYT de Msg5 aumenta la sensibilidad a rojo Congo.....	128
1.2.3.3 La mutación del motivo IYT de Msg5 reduce su propia fosforilación por parte de Slit2 tras condiciones de estimulación de la ruta de integridad celular.....	129
1.2.3.4 El motivo IYT de Msg5 es esencial para que una versión catalíticamente inactiva (Msg5 <sup>C319A</sup> ) desarrolle el efecto de <i>trapping</i> o secuestro sobre Slit2 pero no sobre Fus3.....	130
1.2.4 Efecto de la ausencia del motivo IYT de Sdp1 sobre la ruta de integridad celular .....	132
1.2.4.1 La mutación del motivo IYT reduce la capacidad de Sdp1 para regular negativamente la ruta de integridad celular .....	132
1.2.4.2 El motivo IYT de Sdp1 es esencial para que una versión catalíticamente inactiva (Sdp1 <sup>C140A</sup> ) desarrolle el efecto de <i>trapping</i> o secuestro sobre Slit2.....	135
1.2.4.3 La mutación individual de los residuos I <sup>3</sup> e Y <sup>4</sup> del motivo IYT de la versión catalíticamente inactiva Sdp1 <sup>C140A</sup> conduce a una pérdida del efecto de <i>trapping</i> sobre Slit2 .....	138
1.3 Estudio de los sitios de fosforilación de Msg5 por Slit2 en respuesta a la activación de la ruta de integridad celular .....	139
1.3.1 Identificación de los posibles residuos de fosforilación de Msg5 por MAPKs .....	139
1.3.2 La fosforilación de la extensión C-terminal de Msg5 es la responsable de su cambio en la movilidad electroforética tras la activación de la ruta de integridad celular .....	140
1.3.3 Las versiones no fosforilables de Msg5 interaccionan con Slit2 .....	141
1.3.4 El estado de fosforilación de Msg5 no afecta a la respuesta transcripcional dependiente de Rlm1.....	143
2. BÚSQUEDA DE PROTEÍN FOSFATASAS QUE REGULEN NEGATIVAMENTE LA RUTA DE APAREAMIENTO .....	145
2.1 Estudios basados en la sobreexpresión de proteín fosfatasas .....	146

2.1.1 Identificación de proteín fosfatasas cuya sobreexpresión atenúa la hiperactivación de la ruta de apareamiento provocada por la sobreexpresión de Ste4 .....	146
2.1.2 Identificación de proteín fosfatasas cuya sobreexpresión atenúa la hiperactivación de la ruta de apareamiento provocada por la expresión del alelo hiperactivo Ste11-4 .....	150
2.2 Estudios realizados sobre los mutantes sencillos carentes de proteín fosfatasas .....	151
2.2.1 Identificación de proteín fosfatasas cuya eliminación provoca una activación de la ruta de apareamiento .....	151
2.3 La tirosín fosfatasa Ptp1 interacciona con la MAPK Fus3 .....	152
3. BÚSQUEDA DE PROTEÍN FOSFATASAS QUE REGULEN NEGATIVAMENTE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR.....	154
3.1 Estudios basados en la sobreexpresión de proteín fosfatasas .....	154
3.1.1 Identificación de proteín fosfatasas cuya sobreexpresión atenúa la inhibición del crecimiento provocada por la expresión del alelo hiperactivo Pkc1 <sup>AAA</sup> .....	154
3.1.2 Identificación de proteín fosfatasas cuya sobreexpresión atenúa la inhibición del crecimiento provocada por la sobreexpresión del extremo C-terminal de Bck1 .....	155
3.1.3 Identificación de proteín fosfatasas cuya sobreexpresión atenúa la activación de la ruta de integridad celular en respuesta a rojo Congo.....	156
3.2 Estudios realizados sobre los mutantes sencillos carentes de proteín fosfatasas .....	158
3.2.1 Identificación de proteín fosfatasas cuya eliminación provoca una activación de la ruta de integridad celular.....	158
3.3 La tirosín fosfatasa Ptp1 interacciona con la MAPK Sit2.....	160
3.4 La fosfatasa dual Yvh1 es importante para el mantenimiento de la integridad celular .....	162
3.4.1 La ausencia de actividad catalítica de Yvh1 no es la causa de los fenotipos del mutante <i>yvh1Δ</i> asociados a un daño en la pared celular.....	162
3.4.2 El factor de ensamblaje ribosomal Mrt4 participa en el mantenimiento de la integridad celular .....	163

3.4.3 La sobreexpresión de la versión catalíticamente inactiva Yvh1 <sup>C117A</sup> reduce los niveles de expresión de <i>MLP1</i> en respuesta a rojo Congo .....	165
4. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE Ptc1 SOBRE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR.....	166
4.1 Búsqueda de la diana de Ptc1 en la ruta de integridad celular mediante el uso de alelos hiperactivos.....	166
4.1.1 La sobreexpresión de Ptc1 reduce la señalización provocada por Bck1 <sup>CT</sup> y Bck1-20 en los mutantes <i>pkc1Δ</i> y <i>bck1Δ</i> .....	167
4.1.2 La sobreexpresión de Ptc1 no reduce la señalización provocada por Mkk1 <sup>S386P</sup> en un mutante <i>bck1Δ</i> .....	168
4.1.3 La sobreexpresión de Ptc1 reduce la señalización de la ruta de integridad celular tanto en un mutante <i>mkk1Δ</i> como en un mutante <i>mkk2Δ</i> .....	170
4.2 Análisis de la interacción genética entre Ptc1 y Mkk1 .....	172
4.2.1 La delección de <i>MKK1</i> en un mutante <i>ptc1Δ</i> bloquea la hiperactivación de la ruta de integridad celular .....	172
4.2.2 La actividad quinasa de Mkk1 es la responsable de mantener la elevada fosforilación de Slit2 en un mutante <i>ptc1Δ</i> .....	175
<b>Discusión</b> .....	177
Determinantes moleculares implicados en la unión de las MKPs Msg5 y Sdp1 a la MAPK Slit2 y la pseudoquinasa Mlp1 .....	179
Identificación de nuevos reguladores negativos de las rutas de apareamiento e integridad celular.....	191
Ptp1: un regulador negativo de Fus3 y Slit2 .....	197
Relación entre Ptc1 y las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 en la regulación de la ruta de integridad celular.....	198
<b>Conclusiones</b> .....	203
<b>Referencias</b> .....	207
<b>Anexo</b> .....	233



# Abreviaturas

---



$\alpha$	Alfa
$\beta$	Beta
$\Delta$	Delección
$\mu\text{g}$	Microgramo
$\mu\text{l}$	Microlitro
$\mu\text{M}$	Micromolar
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
AMPK	<i>5'-AMP-activated Protein Kinase</i>
AD	Dominio de activación ( <i>Activation Domain</i> )
ATP	Adenosín trifosfato
BD	Dominio de unión ( <i>Binding Domain</i> )
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
$^{\circ}\text{C}$	Grado centígrado
CD	<i>Common Docking</i>
CDK	<i>Cyclin Dependent Kinase</i>
cDNA	DNA complementario
CWI	Integridad Celular ( <i>Cell Wall Integrity</i> )
DEF	<i>Docking site for ERK FXFP</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleid Acid</i> )
DO	Densidad Óptica
DSP	<i>Dual Specificity Phosphatase</i>
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiamino tetraacético
ERK	<i>Extracellular signal Regulated Kinase</i>
FCP	<i>TFIIF-associating component of RNA polymerase II CTD (C-terminal domain) Phosphatase</i>
FRE	<i>Filamentation Response Element</i>
GAP	Proteína activadora de GTPasa ( <i>GTPase Activating Protein</i> )
GEF	Factor intercambiador de GTP ( <i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i> )
GFP	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
GST	Glutation S-transferasa
GTP	Guanosín trifosfato
GTPasa	Guanosín trifosfatasa
h	Horas
HCl	Ácido Clorhídrico
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i>
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-galactopiranosido
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
KIM	<i>Kinase Interaction Motif</i>
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>
MEK	<i>MAPK ERK Kinase</i>
ME	Mercaptoetanol
MKB	<i>MAPK Binding</i>
MKK	<i>MAPK Kinase</i>
MKP	<i>MAPK Phosphatase</i>
min	Minutos
ml	Mililitro

mRNA	RNA mensajero
NaCl	Cloruro Sódico
NaF	Fluoruro Sódico
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NES	<i>Nuclear Export Signal</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
ONPG	orto-nitro fenil- $\beta$ -D galactopiranosido
ORF	Marco abierto de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> )
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida ( <i>PoliAcrylamide Gel Electrophoresis</i> )
PAK	<i>p21 Activated Kinase</i>
pb	Pares de bases
PBS	Buffer Salino Fosfato ( <i>Phosphate Buffer Saline</i> )
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PDK	3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase
pH	Potencial de Hidrógeno
PKC	Protein Kinasa C
PMSF	<i>Phenyl Methyl Sulfonyl Fluoride</i>
pNPP	<i>Para Nitro Phenyl Phosphate</i>
PP	<i>Protein Phosphatase</i>
PPM	<i>Metal-dependent Protein Phosphatase</i>
PPP	<i>Phospho Protein Phosphatase</i>
PRE	<i>Pheromone Response Element</i>
PSP	<i>Protein Serine/threonine Phosphatase</i>
PTM	Modificación postraduccional ( <i>Post Translational Modification</i> )
PTP	<i>Protein Tyrosin Phosphatase</i>
RC	Rojo Congo
RGS	<i>Regulator of G protein Signaling</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Retrotranscripción inversa asociada a PCR cuantitativa en tiempo real
SAPK	<i>Stress-Activated Protein Kinase</i>
SBF	<i>Swi-Binding Factors</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SCP	<i>Small CTD (C-terminal domain) Phosphatase</i>
SD	<i>Synthetic Dextrose</i>
SDS	Docecil Sulfato Sódico
SGD	<i>Saccharomyces Genome Database</i>
SH3	<i>Src Homology 3</i>
SR	<i>Synthetic Raffinose</i>
STRE	<i>Stress Response Element</i>
TAE	Solución Tris-acetato EDTA
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
UV	Ultravioleta
wt	Cepa silvestre ( <i>Wild Type</i> )
YPD	<i>Yeast extract Peptone Dextrose</i>
ZL	Zimoliasa

# Summary

---



## Study of the negative regulation of the mating and cell wall integrity MAPK pathways by protein phosphatases in *Saccharomyces cerevisiae*

### Introduction

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways constitute very tightly regulated signalling modules that both transmit and convert extracellular stimuli into appropriate cellular responses. The MAPK pathways are highly conserved in eukaryotes from yeast to human and are involved in many physiological processes such as cell growth, differentiation, metabolism, apoptosis and stress responses (Cargnello and Roux, 2011). MAPK pathways share a common architecture of a three-tiered kinase cascade comprised of a MAPKKK, a MAPKK and the MAPK itself where activation results from the sequential phosphorylation of each component (Hamel *et al.*, 2012). Upon activation, MAPKs phosphorylate distinct targets including transcription factors that account for the expression of certain genes essential for the biological response (Yoon and Seger, 2006). One property of these pathways is that the duration and magnitude of activation plays a major role in determining the biological outcome of signalling. Therefore the protein phosphatases are the main negative regulators of these cellular routes by limiting excessive signalling activity (Caunt and Keyse, 2013). The dephosphorylation could be achieved by serine/threonine phosphatases (including PP1, PP2A, PP2B and PP2C subfamilies), tyrosine phosphatases (PTPs) and dual-specificity phosphatases (DSPs). These dephosphorylation events not only require a transient enzyme-substrate interaction involving the active site of kinases and phosphatases, but also the formation of a complex through specific docking interactions between conserved regions within the enzymes. Such docking sites are located outside the catalytic domains of these proteins and promote binding specificity and high affinity interactions. One of the best characterised docking motifs found in MAPK-interacting proteins, such as PTPs and DSPs, is the D-domain (Bardwell and Shah, 2006), which comprises a cluster of basic residues followed by a hydrophobic sub-motif that binds to the common docking (CD) domain which is composed of acidic residues located in the MAPKs (Akella *et al.*, 2008).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has five MAPK signalling pathways involved in mating, pseudohyphal/invasive growth, osmoregulation, ascospore formation and cell wall integrity (CWI) (Chen and Thorner, 2007). It has been described that several protein phosphatases are involved in the downregulation of the MAPKs Fus3, Sit2 and Hog1 from the mating, CWI and high osmolarity pathways respectively. While the PP2C phosphatases, namely Ptc1, Ptc2 and Ptc3, are known to act on the MAPK Hog1, the tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3 show redundancy

and promiscuity because they can act on Fus3, Slit2 and Hog1. The DSP Msg5 is a negative regulator of the mating and CWI pathways and its paralogue Sdp1 only dephosphorylates the MAPK Slit2 (Martin *et al.*, 2005).

## **Objectives**

The aims of this study are headed for the identification of novel negative regulators of the mating and CWI MAPK pathways and the characterization of the domains involved in the interaction of the already known DSPs Msg5 and Sdp1 with the MAPK Slit2 and the pseudokinase Mlp1 in order to gain insight into the mechanisms that control specificity and fidelity through signalling.

## **Results and Discussion**

### **1. Analysis of the domains involved in the interaction of the DSPs Msg5 and Sdp1 with the MAPK Slit2 and the pseudokinase Mlp1**

Previous studies carried out in our laboratory revealed that neither the D domain of Msg5 nor the CD domain of Slit2 or Mlp1 are involved in the interaction between these proteins (Marin , 2009), contrary to the mechanism used by Msg5 to bind the MAPKs Kss1 or Fus3 (Remenyi *et al.*, 2005). In an attempt to localize the Msg5-binding region within Slit2 and Mlp1 we proved through pull-down experiments that a Slit2 or Mlp1 fragment spanning aminoacids 274-373 was able to bind Msg5 in a CD-independent manner. Next we tried to define the residues within Msg5 and Sdp1 important for binding to Slit2 or Mlp1. Our BLAST analysis revealed a short region of homology in the N-terminal regulatory domain of fungal Msg5 orthologues that contains an IYT motif. To address the involvement of this putative motif in binding to the CWI kinases the conserved Ile, Tyr and Thr were changed to Ala both in Msg5 and Sdp1 and the interaction with Slit2 and Mlp1 was assayed by two-hybrid, *in vitro* and *in vivo* co-purification experiments. Our data showed that loss of the IYT motif prevented Msg5 and Sdp1 from binding to Slit2 or Mlp1. Cells expressing the mutant Msg5<sup>IAYATA</sup> in a *msg5*Δ background showed an intermediate Congo red sensitivity between *msg5*Δ cells and the wild type strain, suggesting that Msg5<sup>IAYATA</sup> is not able to fully complement the lack of Msg5. However, no differences were detected in the transcription of several CWI regulated genes or in the Slit2 phosphorylation between cells expressing Msg5 or Msg5<sup>IAYATA</sup>. Due to the absence of an evident phenotype in *sdp1*Δ cells we studied the effect of the lack of IYT through overexpression. Interestingly, *MLP1* transcription was significantly higher in cells overexpressing the mutant Sdp1<sup>IAYATA</sup> compared to those overexpressing wild type Sdp1, indicating a reduced function of Sdp1<sup>IAYATA</sup> version on Slit2 activity. We next investigated the importance of the IYT motif in the ability of catalytically inactive

versions of Msg5 and Sdp1 to form a stable complex with Sit2, a phenomenon known as substrate trapping that leads to a high phosphorylation of the MAPK but interferes with signal transmission towards its substrates. Of remark, removal of the IYT motif from catalytically inactive Msg5 or Sdp1 reduced the amount of phospho-Sit2 and increased the Rim1-dependent transcriptional activation, indicating significant reduction of the trapping effect due to a diminished interaction between the MAPK and the inactive DSPs. It has been described that Msg5 gets phosphorylated by Sit2 following activation of the CWI pathway (Flandez *et al.*, 2004). Interestingly, a significant reduction in Msg5 phosphorylation was observed in the Msg5<sup>IAYATA</sup> mutant as compared with the wild type indicating that the IYT is also critical for this post-translational modification. Furthermore, our results showed that removal of 7 putative MAPK phosphorylation sites located at the C-terminal extension of Msg5 abolished this Sit2-mediated post-translational modification of the DSP, suggesting that some of these residues are phosphorylated by Sit2 upon stimulation of the CWI pathway.

## 2. Identification of novel negative regulators of the mating and CWI MAPK pathways

In order to identify novel putative phosphatases operating in yeast MAPK signalling, we took advantage of growth inhibition promoted by overproduction of constitutively active components of the mating and CWI pathways to perform the screening of a collection of 43 protein phosphatases or phosphatase-regulatory proteins. Selected phosphatases, which alleviate the induced growth inhibition when overproduced, were further studied by their ability to downregulate expression of mating and CWI responsive promoters and the consequences on MAPK signalling of their removal. The overexpression of already known downregulators of the mating pathway such as Msg5 and Ptp2 but also Ptp1, Ppq1, Oca2 and Ptc2 recovered cell growth inhibition caused by the G $\beta$  subunit Ste4 overexpression and efficiently reduced *FUS1*-driven transcription in cells that express the hyperactive allele of the MAPKKK Ste11-4. These results suggest that these phosphatases could act downstream Ste11 in the MAPK module. Regarding the CWI pathway we performed two complementary screenings in which this pathway was activated from two different levels using a constitutively active mutant of Pkc1 (Pkc1<sup>AAA</sup>) or a version of the MAPKKK Bck1 lacking the first 1171 aminoacids (Bck1<sup>CT</sup>) whose overexpression under the *GAL1* promoter results in growth inhibition. The ten phosphatase-related genes selected in the Bck1<sup>CT</sup>-based screening (Ptc1, Ptc2, Ptc4, Cnb1, Oca2, Oca6, Ptp1, Ptp2, Msg5 and Sdp1) were also able to reduce *MLP1*-driven transcription under stimulation of the pathway with Congo red, suggesting that they may act on the MAPK module. Among the positives found exclusively in the Pkc1<sup>AAA</sup> screening only Mih1, Yvh1, Tep1 and Psr1 reduced CWI signalling. The tyrosine phosphatase

Ptp1 came up in both mating and CWI screenings and proved to be one of the strongest negative regulators of these pathways when overexpressed. In addition, *ptp1* $\Delta$  cells showed a slight but significant increase in signalling through both pathways suggesting that this phosphatase is likely to be a negative regulator. In fact, our pull-down experiments showed that Ptp1 physically interacts with Slit2 and Fus3 so that it could have a role by acting on these MAPKs. We also found that the overexpression of the DSP Yvh1 rescued growth inhibition promoted by Pkc1<sup>AAA</sup> and reduced *MLP1*-driven transcription while its deletion resulted in high Slit2 phosphorylation and Congo red sensitivity. All these phenotypes were independent of its catalytic activity indicating that the role of Yvh1 on the ribosomal assembly, which is also independent of its phosphatase activity, could be important for all these functions (Kemmler *et al.*, 2009). In fact, a mutant lacking the Mrt4 assembly factor also showed high levels of phospho-Slit2, reduced *MLP1*-driven transcription and increased sensitivity to Congo red as compared with wild type cells, supporting the view that the function of these factors in ribosomal maturation is essential for the cell wall integrity.

### 3. Characterization of the functional target of the PP2C Ptc1 in the CWI MAPK pathway

It has been described that Ptc1 binds to Bck1 through the adaptor protein Nbp2 (Stanger *et al.*, 2012). Experiments performed previously by our group also pointed out that Ptc1 could be acting on the CWI MAPK module (Palacios, 2010). Therefore, an epistatic analysis based on Ptc1 overexpression and using the dual phosphorylation of Slit2 as readout of pathway activation was performed in order to know the target of Ptc1. Interestingly, Ptc1 overexpression reduced the amount of phosphorylated Slit2 in a *nbp2* $\Delta$  strain, indicating that, in these conditions, Nbp2 is not necessary for Ptc1 to act on the CWI target protein. When overexpressed, Ptc1 reduced the high levels of phospho-Slit2 promoted by Bck1<sup>CT</sup>, a constitutively active version of Bck1 that lacks not only the Nbp2-binding motif (Hruby *et al.*, 2011), but also the Pkc1 phosphorylation sites responsible for Bck1 activation (Levin *et al.*, 1994). The fact that Ptc1 overexpression still reduced the Slit2 phosphorylation promoted by Bck1<sup>CT</sup> in a *pkc1* $\Delta$  strain clearly showed that the target is neither Pkc1 nor Bck1 but a downstream kinase. Next we showed that Ptc1, when overexpressed, brought down Slit2 phosphorylation caused by the expression of a constitutively active Mkk1 version (*MKK1*<sup>S368P</sup>) in a *bck1* $\Delta$  strain. All together these results indicate that Ptc1 is acting at the MAPKK level of the CWI pathway. Moreover, overexpression of Ptc1 decreased signaling on *mkk1* $\Delta$  or *mkk2* $\Delta$  cells showing that Ptc1 is able to act on both Mkk1 and Mkk2. These results show for the first time in *S. cerevisiae* that a phosphatase is able to act on the MAPK module a level different from the MAPK. Of remark, *mkk1* $\Delta$  and *mkk2* $\Delta$  mutants showed

different levels of Slit2 phosphorylation. Since the absence of Ptc1 promotes the hyperactivation of the CWI pathway (Gonzalez *et al.*, 2006), the role of Mkk1 and Mkk2 in transmitting the signal to Slit2 in a *ptc1Δ* strain was investigated. In contrast to Mkk2, the lack of Mkk1 promoted a strong reduction of the high levels of phospho-Slit2 displayed by a *ptc1Δ* mutant and let the cells to grow in the presence of Congo red. These data reinforce the idea that Mkk1 is more effective than Mkk2 in signaling to Slit2.

### **Conclusions**

1. A central region (amino acids 274-373) of the MAPK Slit2 and the pseudokinase Mlp1 is responsible for binding to the DSP Msg5.
2. The Common Docking domain of Slit2 and Mlp1 is not involved in the interaction with Msg5.
3. The N-terminal IYT motif of the DSPs Msg5 and Sdp1 is necessary for the interaction with the MAPK Slit2 and the pseudokinase Mlp1.
4. The IYT motif within Msg5 is required for the phosphorylation of this DSP by Slit2 in the presence of a cell wall stress.
5. The IYT motif is essential for the catalytic inactive versions of Msg5 and Sdp1 to trap Slit2.
6. Among the 16 putative MAPK phosphorylation sites within Msg5, the ones located in the C-terminal extension are responsible for the mobility shift experienced by this DSP after Slit2 stimulation.
7. The protein phosphatases Ppq1, Ptc2, Ptp1 and Oca2 are putative novel negative regulators of the MAPK module of the mating pathway, and Ptc2, Ptc4, Ptp1 and Oca2 of the MAPK module of the CWI pathway.
8. The tyrosine phosphatase Ptp1 physically interacts with the CWI and mating MAPKs Slit2 and Fus3 respectively and negatively regulates both pathways.
9. The DSP Yvh1 is important for the maintenance of cell wall integrity in an independent manner of its catalytic activity.
10. The MAPKKs Mkk1 and Mkk2 are targets of the serine/threonine phosphatase Ptc1 in the CWI pathway.
11. The kinase activity of Mkk1 but not Mkk2 is required for the increased CWI signaling displayed by *ptc1Δ* mutants due to the principal role of Mkk1 in transmitting the signal through this pathway.



# Introducción

---



# 1. RUTAS de TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADAS POR MAPKs

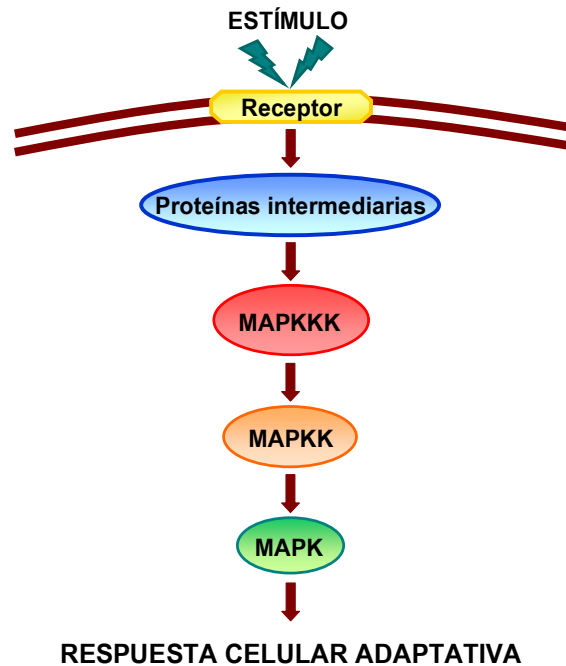
## 1.1. Función y estructura

Todas las células poseen la capacidad de detectar y generar respuestas apropiadas y coordinadas frente a diferentes estímulos y cambios medioambientales. Entre los dispositivos moleculares más frecuentemente utilizados para llevar a cabo estas respuestas de adaptación se encuentran las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinases*). Por medio de ellas se regulan diferentes procesos celulares como el metabolismo, la expresión génica, la proliferación y diferenciación celular o la apoptosis (Cowan y Storey, 2003; Cargnello y Roux, 2011). A través de las rutas de MAPKs la célula detecta, amplifica e integra señales procedentes del exterior para finalmente generar una respuesta adecuada a través de modificaciones en su patrón de expresión génica o en su actividad celular. Los componentes y mecanismos implicados en estas rutas se encuentran altamente conservados a lo largo de la evolución en el dominio Eukarya (Hamel *et al.*, 2012). Muchos de ellos fueron identificados por primera vez en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, la cual es un organismo modelo versátil gracias a la facilidad para realizar sobre él estudios genéticos, bioquímicos y biológicos (Chen y Thorner, 2007).

Las rutas de MAPKs se componen de un módulo central de tres proteínas quinasas cuya activación se produce de forma secuencial por fosforilación (Figura 1). Es decir, tras la llegada del estímulo la MAPKKK (MAPK *kinase kinase* o MEKK) fosforila a la MAPKK (MAPK *kinase* o MEK) que activa también por fosforilación a la MAPK. Con este mecanismo se consigue tanto la amplificación como la integración de diferentes señales iniciadas en la superficie celular (Marshall, 1994; Cooper, 1994; Cobb y Goldsmith, 1995).

Para iniciar la cascada de señalización, el estímulo es percibido por un receptor que puede ser de varios tipos: receptor acoplado a proteína G, sensor de fosforilación histidina-aspártico (sistemas de dos componentes), proteína integral de membrana o receptor de tipo tirosín quinasa (Herskowitz, 1995). A continuación, la señal es transmitida al módulo central de quinasas MAP a través de proteínas intermediarias o moléculas adaptadoras que generalmente son de tipo GTPasa (proteínas G) (Widmann *et al.*, 1999). Estas proteínas G pueden ser heterotriméricas (formadas por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ ) o monoméricas, pertenecientes a la

superfamilia Ras. Seguidamente, las GTPasas actúan sobre diferentes efectores intracelulares: proteínas de la familia PAK (p21-*activated-kinase*), o bien, pertenecientes a la familia PKC (proteín quinasa C), ambas con actividad serín-treonín quinasa (Qi y Elion, 2005).



**Figura 1: Esquema del módulo de activación en cascada de las rutas de MAPKs.**

Una vez activada por alguna de estas quinasas, la MAPKKK, a través de su dominio catalítico C-terminal, fosforila en residuos de serinas y treoninas a la MAPKK; y ésta, al ser una quinasa de especificidad dual, fosforila a la MAPK en residuos de treonina y tirosina (T-X-Y) (donde X puede ser glutámico, prolina o glicina, según el tipo de MAPK) ubicados en posiciones conservadas dentro del dominio de activación (Bardwell, 2006; Krishna y Narang, 2008). Una vez activada, la MAPK fosforila a otras proteínas en residuos de serina y treonina en motivos consenso T/SP (treonina o serina seguidas de prolina) (Raman *et al.*, 2007). Los sustratos de la MAPK son fundamentalmente factores de transcripción, reguladores de la traducción, proteín quinasas, proteín fosfatasas y otras proteínas implicadas en la regulación del metabolismo, ciclo celular, morfología celular o expresión génica, como respuesta final frente a un estrés extracelular. También se han descrito situaciones en las que la MAPK es capaz de regular directamente y por sí sola, la activación transcripcional mediante la formación de interacciones estables con el DNA (Chow y Davis, 2006; Kim *et al.*, 2008).

En mamíferos, las rutas de MAPKs son claves para la regulación de diferentes procesos celulares de tal manera que alteraciones en ellas están en muchos casos relacionadas con el cáncer (Dhillon *et al.*, 2007), la diabetes (Fransson *et al.*, 2014), la obesidad (Hirosumi *et al.*, 2002), la respuesta inmune en procesos infecciosos (Rincon y Davis, 2009; Arthur y Ley, 2013), las enfermedades coronarias (Muslin, 2008), inflamatorias (Kyriakis y Avruch, 2012), autoinmunes (Kaminska y Swiatek-Machado, 2008; Kyttaris, 2012) o neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson o la distrofia muscular (Lawrence *et al.*, 2008). Por tanto, es realmente importante conocer sus mecanismos de regulación con el fin de desarrollar tratamientos terapéuticos (Roberts y Der, 2007; Patterson *et al.*, 2013).

Hasta el momento se han descrito 7 familias de MAPKs en mamíferos. Las MAPKs ERK1/2 (*Extracellular signal-regulated kinase*), cuyo motivo de activación es TEY, se activan por estímulos mitogénicos (factores de crecimiento, citoquinas) y regulan procesos de proliferación, desarrollo, diferenciación y supervivencia celular (Kummer *et al.*, 2012). Las MAPKs tipo JNK (*c-Jun N-terminal kinases*), con motivo de activación TPY, responden principalmente a estímulos asociados a estrés (térmico, osmótico, isquemia, radiaciones UV, hormonas) y se encuentran implicadas en procesos de inflamación y apoptosis (Bogoyevitch y Kobe, 2006). Las MAPKs tipo p38, cuyo motivo de activación presenta una glicina (TGY), median respuestas inflamatorias con producción de citoquinas frente a distintos tipos de estrés (Roux y Blenis, 2004; Cuenda y Rousseau, 2007). Ambas, JNK y p38, reciben el nombre de SAPKs (*Stress-activated protein kinases*) (Raman *et al.*, 2007). ERK5, con motivo TEY, es esencial en la angiogénesis y el desarrollo cardiovascular y neuronal. Posee un extremo carboxilo terminal no catalítico con función probablemente autoinhibitoria (Buschbeck y Ullrich, 2005; Glatz *et al.*, 2013). Las MAPKs ERK3/4, NLK y ERK7, también llamadas MAPKs atípicas, son mucho menos conocidas (Coulombe y Meloche, 2007). Las ERK3/4 carecen de los residuos conservados de treonina y tirosina presentes en el dominio de activación y en su lugar constan de un motivo SEG; están presentes exclusivamente en vertebrados (Aberg *et al.*, 2009).

## **1.2 Mecanismos de regulación de la fidelidad y especificidad**

Resulta interesante destacar la fidelidad de señalización que presentan estas rutas de MAPKs en las que, en ciertos casos, una misma proteína opera en más de una de ellas. Son necesarios mecanismos de regulación muy finos para asegurar que sistemas tan complejos funcionen correctamente y que cada elemento actúe únicamente en la ruta adecuada. Con el fin de

mantener la eficacia, fidelidad y especificidad de señalización se han descrito diferentes mecanismos que controlan tanto la duración e intensidad del estímulo como la actuación concreta de cada componente de la cascada (Tanoue y Nishida, 2002; Zhang y Dong, 2007), garantizando la correcta localización subcelular espacial y temporal de los distintos elementos (Gaestel, 2008; Brown y Sacks, 2009). Dichos mecanismos han sido revisados ampliamente (Krishna y Narang, 2008; Saito, 2010) y los principales son: la existencia de dominios de unión (*docking sites*) específicos en las proteínas que participan en la señalización (Bardwell, 2006), las interacciones facilitadas por proteínas de andamiaje o *scaffold* (Dard y Peter, 2006), la presencia de varias isoformas de una misma proteína (Raman *et al.*, 2007), la inhibición de la señalización cruzada (*cross-talk*) no deseada entre rutas (Schwartz y Madhani, 2004), el aislamiento cinético (*kinetic insulation*) (Behar *et al.*, 2007) y la existencia de retroalimentación positiva o negativa (*feedback*) (Hao *et al.*, 2012).

Muchos de los mecanismos que controlan la fidelidad y especificidad de la señal están regulados a su vez por modificaciones postraduccionales. Se trata de procesos como la fosforilación, acetilación, metilación, SUMOilación, glicosilación o ubiquitinación (Molina *et al.*, 2010; Whelan *et al.*, 2012; Hurst y Dohlman, 2013), mediante los que se modula la actividad enzimática de las proteínas, su localización subcelular, su interacción con otras proteínas e incluso su estabilidad y degradación (Beltrao *et al.*, 2013). La modificación postraduccional más importante en las rutas de MAPKs es sin duda la fosforilación (Minguez *et al.*, 2013). En ella, un grupo fosfato se añade a residuos de serina, treonina, tirosina o histidina dando lugar a la transmisión de la señal en la cascada de señalización. Además, la fosforilación en residuos tanto cercanos como lejanos al sitio de unión entre proteínas puede dar lugar a cambios conformacionales que modulen la fuerza de unión entre dos proteínas. Este hecho podría constituir un mecanismo de amplificación de la señal al aumentar la selectividad de la interacción (Sohaskey y Ferrell, 2002; Nishi *et al.*, 2011). Asimismo la fosforilación puede regular la localización de las proteínas determinando su presencia citoplasmática o nuclear (Nardozi *et al.*, 2010). En ocasiones, fosforilación y ubiquitinación son dos procesos coordinados ya que la fosforilación es una señal para que la proteína sea ubiquitinada y por tanto degradada (Fuchs *et al.*, 1996; Lin *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2013).

### **1.2.1 Proteínas de andamiaje (*scaffold*)**

Un mecanismo esencial para garantizar la especificidad es la existencia de proteínas de andamiaje, denominadas en inglés *scaffold*. Son proteínas capaces de reclutar a dos o más componentes de la cascada formando un complejo proteico que favorece la propagación de la señal y evita el entrecruzamiento de rutas de señalización que comparten elementos entre sí (Morrison y Davis, 2003). Además, funcionan determinando la localización subcelular de los componentes, acercándolos por ejemplo a la membrana plasmática donde se recibe el estímulo (Dard y Peter, 2006). La importancia de estas proteínas de andamiaje reside no sólo en este reclutamiento sino porque también pueden funcionar como activadores alostéricos facilitando de esta forma la actividad catalítica de las enzimas con las que interactúan (Bhattacharyya *et al.*, 2006; Good *et al.*, 2009). Asimismo se ha descrito que las proteínas *scaffold* aíslan a las quinasas de la acción de fosfatasa (Witzel *et al.*, 2012) y que son susceptibles de ser reguladas a su vez por dichas enzimas (Malleshaiah *et al.*, 2010; Molina *et al.*, 2010). Actualmente se ha sugerido que las proteínas de andamiaje podrían ser prometedoras dianas terapéuticas ya que garantizarían la inhibición concreta de únicamente una y no todas las diversas funciones de una misma MAPK (Brown y Sacks, 2009).

### **1.2.2 Dominios de interacción entre proteínas (dominios *Docking*)**

La señalización a través de las cascadas de MAPKs se lleva a cabo gracias a interacciones específicas proteína-proteína que conducen a la activación secuencial correcta de cada uno de los componentes. Al tratarse de interacciones enzima-sustrato, el reconocimiento más importante tiene lugar entre el sitio activo de la quinasa y el residuo fosfoceptor localizado en la diana correspondiente. Sin embargo, las evidencias indican que existen otros determinantes moleculares involucrados en dirigir las quinasas hacia sus sustratos correctos asegurando de esta forma la transferencia de un grupo fosfato (Biondi y Nebreda, 2003; Goldsmith *et al.*, 2007). En la mayoría de las moléculas que interactúan con MAPKs (MEKs, factores de transcripción y fosfatasas), así como en las propias MAPKs, se han encontrado motivos esenciales para esta unión que están alejados del centro catalítico. Estos sitios favorecen una asociación física de alta afinidad entre la MAPK y su sustrato y determinan además su localización subcelular, garantizando de esta forma la eficiencia y selectividad en la transmisión de la señal (Grewal *et al.*, 2006).

### 1.1.2.1 Dominios de unión en proteínas que interactúan con MAPKs

El dominio más común y mejor caracterizado en proteínas que interactúan con MAPKs es el denominado dominio D (por *docking*), también llamado dominio  $\delta$  o DEJL (*docking site for ERK and JNK, LXL*). Se compone de un grupo de residuos básicos (argininas o lisinas) seguido de un submotivo que contiene dos aminoácidos hidrofóbicos (leucina, isoleucina o valina) separados por un residuo cualquiera, respondiendo por tanto a la siguiente secuencia consenso:  $(K/R)_{1-3}-X_{2-6}-\varphi X\varphi$  (Bardwell y Shah, 2006). Estos dos submotivos suelen estar acompañados de un tercer submotivo hidrofóbico posterior.

Aparte de estar presentes en sustratos de MAPKs, los dominios D también se han encontrado en proteínas reguladoras de estas MAPKs como proteínas fosfatasa, proteínas *scaffold* y sus activadoras las MAPKKs (Enslin y Davis, 2001) (Tabla 1). De hecho, el motivo D se identificó por primera vez en la MAPKK Ste7 de *S. cerevisiae* (Bardwell *et al.*, 1996) y está muy conservado en eucariotas puesto que ha sido descrito posteriormente para todas las MEKs de mamífero excepto para MK5, cuyo dominio de interacción se compone de aminoácidos ácidos (Seyfried *et al.*, 2005).

<u>Proteínas que interactúan con MAPKs</u>	<u>Dominio D</u>
	$(K/R)_{1-3}-X^{1-6}-\varphi-X-\varphi$
<b>MEKs/MKKs</b>	
MEK1	MP <b>KKK</b> PTP---IQLN <b>P</b> APDG
MEK2	ML <b>ARRK</b> PVLP <b>A-LT</b> INPTIAE
MKK3	GKS <b>KRKK</b> D---L <b>KL</b> SCMSKP
MKK6	SKG <b>KKR</b> NPG---L <b>K</b> IPK
MKK4	SMQG <b>KRKA</b> ---L <b>KL</b> NF
ScSte7	TLQ <b>RR</b> NLKG--L <b>N</b> LNL
<b>Proteín fosfatasa</b>	
MKP1	TIV <b>RRR</b> AKGA- <b>M</b> GLEHIVPN
PTPSL	GLQ <b>ERR</b> GSNV <b>SLTL</b>
HePTP	RLQ <b>ERR</b> GSNVAL <b>LML</b>
<b>Factores de transcripción</b>	
ATF2	AVH <b>KHK</b> HE--- <b>M</b> TLKFGPAR
ScDig1	KSL <b>KRGR</b> VPAP <b>LNL</b> SDSNTN
ScDig2	HSL <b>KRKR</b> VPPAL <b>NF</b> SDIQAS
ScFar1	MMS <b>KRGN</b> IPK <b>LNL</b> SKPISP

**Tabla 1: Secuencia de los dominios D presentes en proteínas que interactúan con MAPKs.**

Aparece indicada la secuencia del dominio D con los residuos básicos en verde y subrayados y los residuos hidrofóbicos del motivo  $\varphi-X-\varphi$  en rojo. Reproducido de Bardwell (2006).

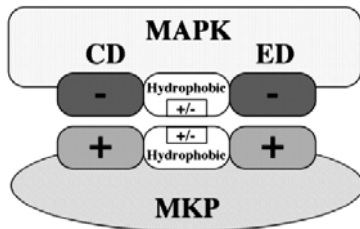
Este dominio D también está presente en la región aminoterminal de tirosín fosfatasa (PTPs: *protein tyrosine phosphatases*) de mamíferos, en las que se denominó KIM (*kinase interaction motif*) (Pulido *et al.*, 1998). En algunos casos se ha descrito que la unión a través del dominio KIM da lugar a una regulación recíproca entre la tirosín fosfatasa y la MAPK. De esta forma, la región aminoterminal de ciertas PTPs es fosforilada por la MAPK y al mismo tiempo esta proteína fosfatasa desfosforila el residuo de tirosina del dominio de activación de la MAPK. Ambos procesos van acompañados de cambios conformacionales en ambas proteínas (Mustelin *et al.*, 2005;Peti y Page, 2013). Asimismo en las fosfatasas de especificidad dual (DSPs: *dual specificity phosphatases*) también se han identificado diferentes dominios D en su región aminoterminal (Kondoh y Nishida, 2007). Sin embargo, no es necesaria la presencia de cada uno de los tres submotivos del dominio D para que éste actúe como tal. De hecho, estos tipos de dominios D incompletos son muy habituales en las DSPs de mamíferos (Masuda *et al.*, 2003).

Otro tipo de dominio de interacción con MAPKs es el denominado dominio DEF (*docking site for ERK EXFP*), también llamado sitio F, que consta de dos fenilalaninas (o una fenilalanina y una tirosina) separadas por un aminoácido y seguidas de una prolina (FXFP) y está localizado en el extremo carboxiterminal de la proteína (Roux y Blenis, 2004). Este tipo de dominios se ha descrito únicamente en proteínas que interactúan con ERK1/2 (Lee *et al.*, 2004;Sheridan *et al.*, 2008) y p38 (Galanis *et al.*, 2001). Por ejemplo, las fosfatasas duales de mamífero DSP1, DSP4, DSP6, DSP7 y DSP9 portan motivos DEF implicados en su unión con ERK1/2 (Theodosiou y Ashworth, 2002).

### 1.1.2.2 Sitios de anclaje en las MAPKs

La región de las MAPKs que interactúa con el dominio D de otras proteínas es bastante compleja (Figura 2). Se compone de un motivo CD (*Common Docking*) (Akella *et al.*, 2008), localizado en el extremo carboxiterminal, que se caracteriza por contener aminoácidos cargados negativamente (aspárticos y glutámicos) que interactúan electrostáticamente con los residuos cargados positivamente del motivo D de sus sustratos (Tanoue *et al.*, 2000;Enslin y Davis, 2001). Próximo en su estructura terciaria al dominio CD se localiza un motivo de dos aminoácidos que en el caso de ERK1/2 son neutros (motivo TT) mientras que en p38 son ácidos (motivo ED). Su importancia quedó demostrada cuando el cambio del motivo neutro de ERK2 por uno cargado negativamente hizo que esta quinasa fuera capaz de unirse a MK3, que en condiciones normales es un sustrato exclusivo de p38 (Tanoue *et al.*, 2001). Junto a la región CD/ED reside un bolsillo hidrofóbico, con gran afinidad por el submotivo hidrofóbico del sitio D, que es clave y completa esta compleja unión de la MAPK a su sustrato.

A pesar de estar conservado en todas las subfamilias de MAPKs de distintos organismos (Tanoue y Nishida, 2003; Remenyi *et al.*, 2005), existen ciertos casos en los que el *Common Docking* es dispensable para la unión de la quinasa a algunos de sus sustratos. Un ejemplo de ello es la interacción de ERK3/4 con MK5 en la que no está involucrado el CD sino un nuevo motivo FRIEDE (Aberg *et al.*, 2009).



**Figura 2: Representación esquemática de las interacciones mediadas por dominios de tipo *docking* entre MAPKs y MKPs (MAPK phosphatases).** Reproducido de Tanoue *et al.* (2002)

Las interacciones mediadas por dominios *docking*, además de promover uniones específicas entre proteínas, afectan a la accesibilidad de distintas regiones e incluso provocan cambios en la conformación del centro activo de la quinasa tras la unión al sustrato. Asimismo se ha descrito que estas interacciones pueden estar reguladas por eventos de fosforilación tanto en el dominio D como en el CD (Mayor *et al.*, 2007), y que a su vez pueden tener una importancia clave en procesos de retrofosforilación que ejerce la MAPK hacia su activador, la MAPKK (Xu *et al.*, 1999; Hao *et al.*, 2012). Además, parece que la interacción estable a través de estos dominios *docking* secuestra a las MAPKs definiendo así su localización subcelular. En ocasiones se ha descrito esta unión como un mecanismo para retener a la MAPK en el citoplasma y evitar su translocación al núcleo, donde residen la mayoría de sustratos (Blanco-Aparicio *et al.*, 1999; Zuñiga *et al.*, 1999; Rubinfeld *et al.*, 1999; Mustelin *et al.*, 2005). Por otro lado, el hecho de que la misma región de la MAPK esté implicada en la unión a distintas proteínas sugiere que deben existir fenómenos de competición entre sus distintos sustratos (Legewie *et al.*, 2007). Por ello, se está estudiando el uso tanto *in vitro* como *in vivo* de péptidos que contienen el motivo D como inhibidores de MAPKs en el tratamiento de diversas enfermedades (Bonny, 2006; Gaestel y Kracht, 2009). Actualmente se han desarrollado herramientas computacionales basadas en estas interacciones canónicas con el fin de indentificar nuevos sustratos de MAPKs hasta ahora desconocidos (Whisenant *et al.*, 2010), así como herramientas moleculares que permiten construir y evaluar el comportamiento de proteínas quimeras (Mody *et al.*, 2009).

## 2. RUTAS de MAPKs en *Saccharomyces cerevisiae*

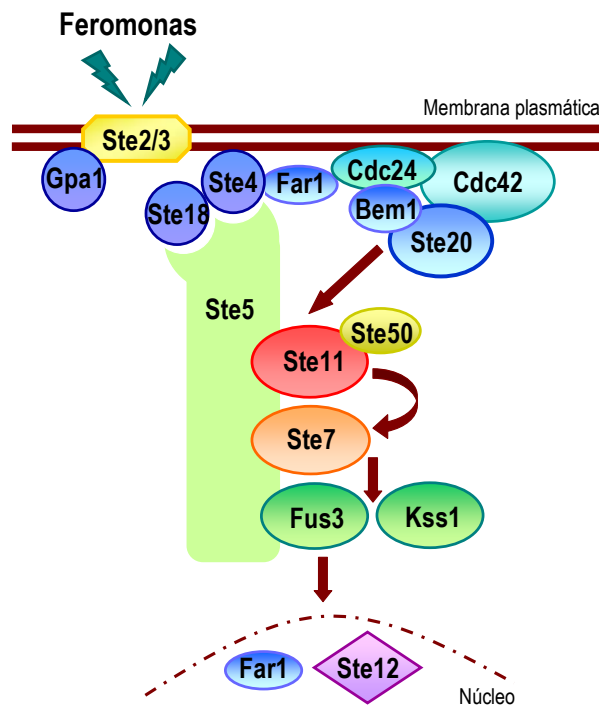
Existen cinco rutas de señalización mediadas por MAPKs en *S. cerevisiae*: la ruta de apareamiento en la que intervienen las MAPKs Fus3 y Kss1 (similares a las quinasas ERK1/2 de mamíferos); la ruta de crecimiento invasivo o pseudofilamentoso mediada por la MAPK Kss1; la ruta de integridad celular dirigida por la MAPK Slf2 (cuyo ortólogo estructural y funcional en células de mamífero es ERK5); la ruta de respuesta a alta osmolaridad conducida por Hog1 (el ortólogo de la MAPK p38 en mamíferos); y, por último, la ruta de esporulación mediada a través de la MAPK Smk1 (Chen y Thorner, 2007).

### 2.1 Ruta de apareamiento

En *S. cerevisiae* existen dos tipos de células haploides: *MATa* y *MAT $\alpha$* . Una célula **a** y una célula  $\alpha$  pueden aparearse a través de una fusión celular y nuclear generando un tercer tipo celular: el diploide *MATa/MAT $\alpha$*  (Merlini *et al.*, 2013). El apareamiento es el resultado final de una serie de cambios en la fisiología celular promovidos por la inducción de la transcripción de determinados genes y que se inician como respuesta a feromonas peptídicas secretadas por una célula de tipo sexual opuesto. Las células **a** secretan factor **a**, un péptido de 12 residuos farnesilado en su extremo carboxiterminal que actúa sobre las células  $\alpha$ ; mientras que las células  $\alpha$  secretan factor  $\alpha$ , que contiene 13 residuos, no está modificado y actúa sobre las células **a** (Michaelis y Barrowman, 2012). La inducción de la transcripción de genes relacionados con este proceso provoca una parada de ciclo en fase G1, crecimiento polarizado que conduce a una morfología denominada *shmoo*, cambios nucleares que favorecen la cariogamia así como cambios en la membrana plasmática y pared celular dependientes de una reorganización del citoesqueleto de actina que posibilitan la fusión de ambas células (plasmogamia) (Roberts y Fink, 1994; Blackwell *et al.*, 2003).

La ruta que regula el proceso de apareamiento (Figura 3) se estimula cuando la feromona se une a sus receptores específicos que presentan 7 dominios transmembranales (Ste3 en células  $\alpha$  y Ste2 para células **a**) acoplados a una proteína G heterotrimérica formada por tres subunidades  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ . El receptor activado se comporta como una proteína GEF (*guanine nucleotide exchange factor*) que cataliza el intercambio de GDP por GTP; de esta manera la subunidad  $\alpha$  (Gpa1) en su forma activa se disocia del heterodímero formado por las subunidades  $\beta$  (Ste4) y  $\gamma$  (Ste18) que son entonces capaces de interactuar con sus efectores (Elion, 2000; Dohlman y Thorner,

2001;Dohlman, 2002). La activación de la proteína G finaliza gracias a su capacidad intrínseca para hidrolizar el GTP, que es estimulada por la proteína RGS (*Regulator of Gprotein Signaling*) Sst2. Ésta se une a Gpa1-GTP acelerando su actividad GTPasa. Por tanto, Sst2 es considerado el principal regulador negativo de la ruta de apareamiento (Slessareva y Dohlman, 2006;Ballon *et al.*, 2006).



**Figura 3:** Esquema de la ruta de apareamiento en *S. cerevisiae*.

Uno de los efectores del heterodímero Ste4-Ste18 es Cdc24, una proteína GEF activadora de la GTPasa monomérica Cdc42 (Zhao *et al.*, 1995;Nern y Arkowitz, 1998). La activación de Cdc42 a través de Cdc24 está mediada por Far1 (Butty *et al.*, 1998). Esta proteína se asocia con el complejo Cdc24-Bem1 y Ste4 (Leeuw *et al.*, 1995); de esta forma contribuye a reclutar a Cdc42 a determinadas zonas de la membrana plasmática y así orientar el crecimiento polarizado en respuesta a feromona (Wang *et al.*, 2005). A través de la unión de la forma activa de Cdc42 a Ste20, que es una quinasa de tipo PAK (*p21-activated protein kinase*), se desencadena toda la cascada de señalización que finaliza con una parada en el ciclo celular. Ste20 fosforila y, por tanto activa, al primer componente del módulo de quinasas, la MAPKKK Ste11. Una vez fosforilada, Ste11 activa a la MAPKK Ste7 que a su vez activa a las MAPKs Fus3 y Kss1, siendo

Fus3 la principal responsable de la señalización en respuesta a feromona, aunque la activación de Kss1 sea también necesaria (Dohlman, 2002).

En este proceso actúan también otros componentes como Ste50 y Ste5. Ste50 actúa como proteína adaptadora favoreciendo la interacción de Ste11 con Cdc42 y Ste20 (Ramezani-Rad, 2003). Por otro lado, Ste5 es una proteína *scaffold* encargada de mantener la unión de los tres componentes del módulo de MAPKs (Ste11, Ste7 y Fus3) (Nakabayashi, 2012). De este modo se incrementa la especificidad de la cascada ya que esta ruta comparte componentes con otras vías de señalización (Zalatan *et al.*, 2012). Al unirse Ste5 al complejo Ste4-Ste18 y Cdc24 (Wang *et al.*, 2005) favorece el reclutamiento a la membrana plasmática del módulo de quinasas y lo pone en contacto con la PAK Ste20 permitiendo de esta forma la activación secuencial por fosforilación y favoreciendo la catálisis y la amplificación de la señal (Roberts *et al.*, 2000; Elion, 2001; Winters *et al.*, 2005; Lamson *et al.*, 2006; Garrenton *et al.*, 2006; Hao *et al.*, 2008a). A diferencia de lo que ocurre con Fus3 (Good *et al.*, 2009), la activación de Kss1 vía Ste11 y Ste7 es independiente de Ste5 (Andersson *et al.*, 2004; Maleri *et al.*, 2004; Flatauer *et al.*, 2005).

Todas las proteínas de la cascada de señalización deben localizarse en la punta del *shmoo*. Por un lado se ha descrito que Gpa1 interacciona con Fus3 fosforilada favoreciendo así la presencia de esta MAPK activa en ese lugar (Metodiev *et al.*, 2002; Maeder *et al.*, 2007). Bem1 actúa a su vez como *scaffold* reclutando a Ste20 y Ste5 (Lyons *et al.*, 1996) mientras que Far1 determina la localización de Cdc24 y G $\beta$  $\gamma$  (Ste4-Ste18) en sitios de crecimiento polarizado durante el apareamiento (Nern y Arkowitz, 1998; Wiget *et al.*, 2004). Fus3 actúa además fosforilando a Far1 que es un inhibidor de Cdc28, una quinasa dependiente de ciclinas (CDK: *Cyclin dependent kinase*), facilitando la parada de ciclo celular en fase G1 (Chang y Herskowitz, 1990; Peter *et al.*, 1993; Dohlman y Thorner, 2001; Yu *et al.*, 2008). La GTPasa Cdc42 controla también el crecimiento polarizado a través de su interacción con Bni1 y otras proteínas ligadas al citoesqueleto de actina (Evangelista *et al.*, 1997; Butty *et al.*, 1998; Matheos *et al.*, 2004).

Una vez activada, la MAPK Fus3 se transloca al núcleo donde fosforila al factor de transcripción Ste12, que es el responsable de activar la expresión de genes que contienen en su región promotora la secuencia PRE (*Pheromone Response Element*) (Roberts *et al.*, 2000). Además, Fus3 fosforila a Dig1 y Dig2, que son dos reguladores negativos de Ste12, inactivándolos; de esta manera se promueve una correcta activación transcripcional (Blackwell *et al.*, 2007).

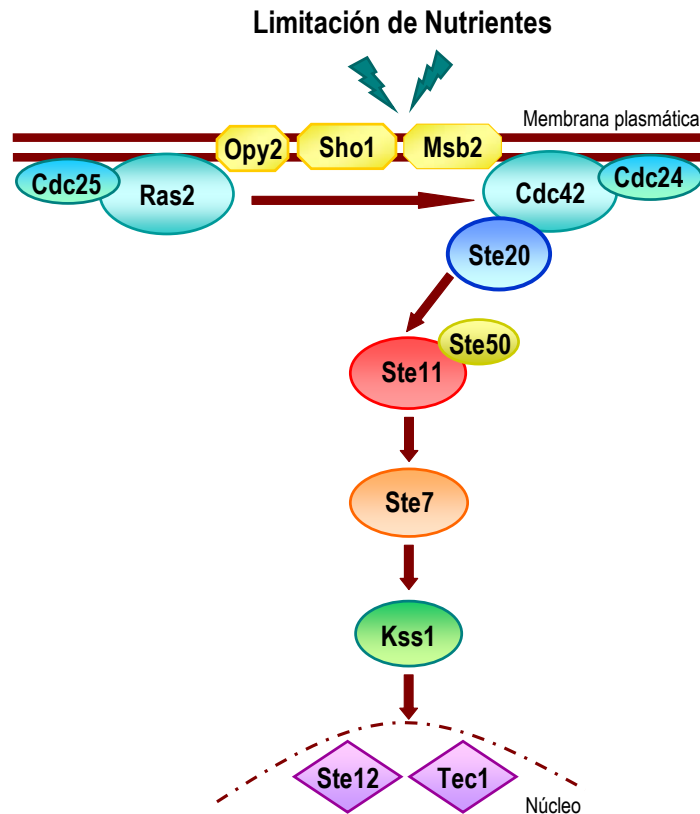
Tras una exposición a feromona se induce la expresión de genes de cada fase de la respuesta de apareamiento, como los implicados en el proceso de diferenciación celular desde el control de la polaridad celular a la fusión celular y nuclear (*FUS1*, *FUS2*, *AGA1*) (Trueheart *et al.*, 1987) y

los denominados *Factor Induced Gene* (*FIG1*, *FIG2*, *FIG3* y *FIG4*) (Erdman *et al.*, 1998). Los genes *FIG1* y *FUS1* codifican proteínas de membrana implicadas en polarización celular, formación de *shmoos* y fusión de membranas de las células que aparean (Nolan *et al.*, 2006; Aguilar *et al.*, 2007). Asimismo en respuesta a feromona se inducen genes que codifican proteínas cuya función es la remodelación de la pared, como *Slf2*, *Rlm1* y *Mlp1*, relacionadas con la ruta de integridad celular (Roberts *et al.*, 2000); y factores que regulan negativamente la ruta de apareamiento, como *Sst2* o las fosfatasas *Msg5* y *Ptp2* (Chen y Thorner, 2007) implicados en el proceso de recuperación.

## **2.2 Ruta de crecimiento invasivo o pseudofilamentoso**

Varias especies de levaduras son capaces de adoptar dos formas de crecimiento: levaduriforme (células esféricas) y filamentoso (células alargadas). En microorganismos patógenos como *Candida albicans* esta transición desempeña un papel importante en la invasión del hospedador. En las células diploides de *S. cerevisiae* también pueden tener lugar cambios en su morfología (alargamiento) y una parada de ciclo en fase G1 que retrasa la mitosis, dando lugar a una proliferación según un patrón de gemación unipolar en el que la célula madre e hija se encuentran fuertemente unidas, lo que conduce a un crecimiento filamentoso de tipo pseudohifal (Cullen y Sprague, 2000). En las células haploides una limitación de los nutrientes provoca el paso desde formas levaduriformes a la formación de cadenas de células que penetran en la superficie del agar con el fin de invadir y alcanzar los nutrientes (crecimiento invasivo) (Truckses *et al.*, 2004), mientras que es ante una falta de nitrógeno cuando las células diploides adoptan un crecimiento pseudohifal (Gancedo, 2001).

Se han definido distintas rutas que actúan en paralelo, cooperan entre sí y son las responsables de regular el crecimiento invasivo/pseudofilamentoso: la ruta de MAPKs mediada por *Kss1* en respuesta a carencia nutricional (Figura 4), la ruta de la proteína quinasa dependiente de 5'-AMP (AMPK) *Snf1* en respuesta a limitaciones de glucosa (Kuchin *et al.*, 2003), la ruta TOR en respuesta a limitación de nitrógeno (Cutler *et al.*, 2001) y la ruta *Ras2/cAMP-PKA* (proteína quinasa dependiente de AMPc), en la que la activación del receptor de membrana *Gpr1* (que señala a través de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G *Gpa2*) regula la producción de AMPc en respuesta a glucosa a través de la adenilato ciclasa *Cyr1* y la activación de la proteína quinasa A (Palecek *et al.*, 2002; Colombo *et al.*, 2004).



**Figura 4: Esquema de la ruta de crecimiento invasivo o pseudofilamentoso en *S. cerevisiae*.**

La ruta de MAPKs que regula este proceso comparte muchos elementos con la ruta de respuesta a feromonas: la PAK Ste20, la proteína adaptadora Ste50, el módulo de quinasas Ste11-Ste7-Kss1 y el factor de transcripción Ste12. La cascada se inicia a través de los sensores Sho1 y Msb2, que participan también en la ruta de alta osmolaridad (Pitoniak *et al.*, 2009), que son capaces de interaccionar con la GTPasa Ras2 que transmite la señal a Cdc42 y ésta a la PAK Ste20 (Pan *et al.*, 2000). A diferencia de lo que ocurre en la ruta de apareamiento, la activación de Cdc42 va a ser dependiente de Ras2 y su GEF (*Guanine nucleotide Exchange factor*) Cdc25 (Cullen *et al.*, 2004). Para transmitir la señal al módulo de MAPKs es necesaria la presencia de Opy2 (Karunanithi y Cullen, 2012), una activación óptima de Ste11 (Truckses *et al.*, 2006) y Ste50, que recluta los componentes del módulo a la membrana plasmática (Ramezani *et al.*, 1998).

La activación final de Kss1 inactiva los represores Dig1 y Dig2, permitiendo la transcripción mediante la unión de los factores Ste12 y Tec1 a genes que contienen en su promotor una secuencia FRE (*Filamentation Response Element*), formada por dos secuencias colocadas en tándem: la secuencia TCS (*Tec1-binding site*) y la secuencia PRE (*Pheromone Response*

*Element*) (Chou *et al.*, 2006). A pesar de compartir el factor de transcripción Ste12 con la ruta de respuesta a feromona existe un mecanismo de regulación específico a través de la formación de dos complejos diferentes: Ste12/Dig1/Dig2 que proporciona la expresión de genes involucrados en el apareamiento y Ste12/Dig1/Tec1 que promueve la inducción de la expresión de genes en estados invasivo/pseudofilamentoso como *FLO11* y *MUC1*, que codifican glicoproteínas con un papel importante en la adhesión celular (Lo y Dranginis, 1998; Rupp *et al.*, 1999).

Dado que la ruta de apareamiento y crecimiento invasivo comparten muchos elementos entre sí, se han descrito diversos mecanismos implicados en el mantenimiento de la especificidad en la señalización. Una diferencia notable es la ausencia de la proteína de andamiaje Ste5, que no interacciona con Kss1, siendo así esencial para evitar entrecruzamientos entre ambas rutas (Witzel *et al.*, 2012). Además, distintas evidencias indican que la ruta de apareamiento ejerce un efecto inhibitorio sobre la ruta de crecimiento invasivo. Parece que la MAPK Fus3 regula negativamente a Kss1 ya que un mutante *fus3Δ* presenta elevados niveles de esta MAPK en su forma activa (Sabbagh *et al.*, 2001). De hecho, Fus3 atenúa la actividad de Kss1 a través de la retrofosforilación de Ste7 en presencia de feromona (Hao *et al.*, 2012). Por otro lado, en presencia de feromona Fus3 fosforila al factor de transcripción Tec1 desencadenando su degradación; de esta forma Tec1 dejaría de estar disponible para ser activado por Kss1 (Bruckner *et al.*, 2004; Chou *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2009).

## **2.3 Ruta de esporulación**

En condiciones de ausencia de nutrientes, las células diploides de *S. cerevisiae* experimentan un proceso de meiosis mediante el cual envuelven cuatro ascosporas haploides en una cubierta (asca), resistente al calor y a la desecación, que germinarán dando lugar a cuatro formas vegetativas haploides (Coluccio *et al.*, 2004).

Dos proteínas quinasas actúan en este proceso de esporulación: la quinasa Sps1 (homóloga a miembros de la familia de las PAKs) (Iwamoto *et al.*, 2005) y la MAPK Smk1 (Krisak *et al.*, 1994). Ambas son esenciales para la formación de la pared de la espora pero no intervienen en la división meiótica. Esta ruta regula la activación transcripcional de genes implicados en la construcción de la pared como *FKS2* y *CHS3* (Chen y Thorner, 2007). El módulo de MAPKs que activaría a Smk1 no se ha determinado, lo que indica que quizá esta quinasa no se active por la clásica cascada de MAPKs (McDonald *et al.*, 2005). De hecho se ha descrito recientemente que

Smk1 es fosforilada por la quinasa dependiente de ciclina Cak1 y que es capaz de autofosforilarse a sí misma en presencia de la proteína Ssp2 (Whinston *et al.*, 2013).

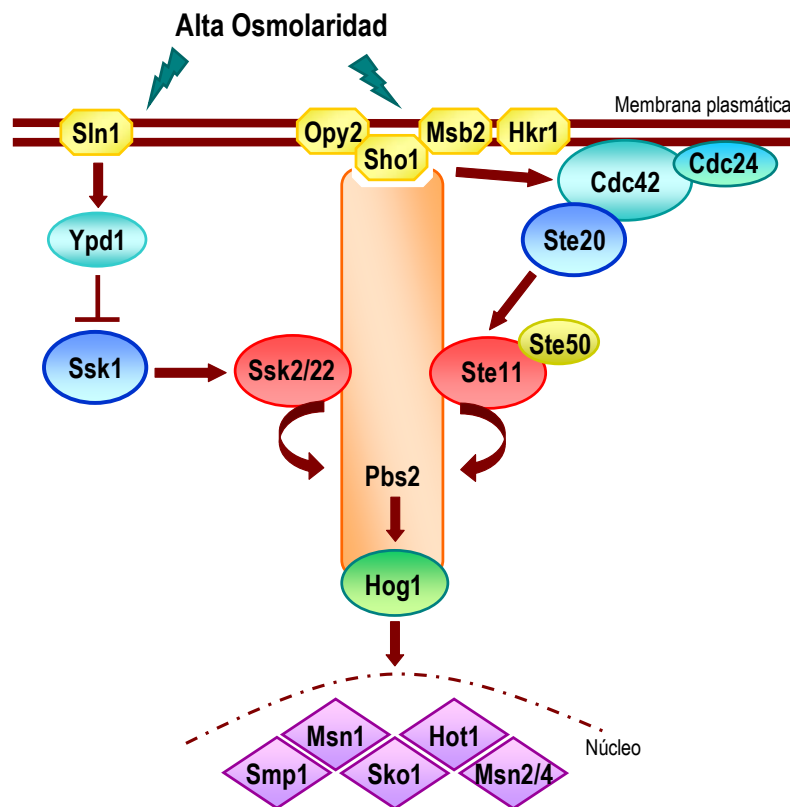
## **2.4 Ruta de respuesta a alta osmolaridad**

La ruta HOG (*high osmolarity glycerol*) dirige la adaptación fisiológica de las células frente a una elevación en la osmolaridad (aumento de la concentración de solutos) del medio extracelular, evitando la pérdida de agua (Saito y Posas, 2012). Así, mantiene la forma y turgencia celular a través de la síntesis y retención de solutos que aseguran un equilibrio osmótico entre el citosol y el medio extracelular (Hohmann, 2009). El estrés osmótico no sólo induce la acumulación de glicerol, sino que también provoca parada de ciclo celular, reorganización del citoesqueleto de actina y cambios en la pared celular (Belli *et al.*, 2001;Hohmann, 2002). De igual manera, otro tipo de estímulos son capaces de activar esta ruta: el estrés oxidativo (Bilsland *et al.*, 2004), la presencia de arsenito (Thorsen *et al.*, 2006;Sotelo y Rodriguez-Gabriel, 2006), ácido acético (Mollapour y Piper, 2006), zimoliasa (Bermejo *et al.*, 2008), peróxido de hidrógeno (Staleva *et al.*, 2004), nistatina (Reiser *et al.*, 2003), condiciones de hipoxia (Hickman *et al.*, 2011), pH ácido (Kapteyn *et al.*, 2001), temperaturas altas (Winkler *et al.*, 2002) o bajas (Hayashi y Maeda, 2006;Panadero *et al.*, 2006) y la inhibición de la síntesis de esfingolípidos (Tanigawa *et al.*, 2012).

La fosforilación y activación de la MAPK Hog1 está controlada por dos ramas independientes que convergen en la MAPKK Pbs2 denominadas vía de Sln1 y vía de Sho1 (Figura 5). Parece que la rama en la que interviene Sln1 desempeña una función más importante ya que es más sensible y rápida a cambios osmóticos y desarrolla una activación total en ausencia de la vía en la que participa Sho1 (O'Rourke y Herskowitz, 1998;Hohmann, 2002;Macia *et al.*, 2009). La vía de Sho1 se considera menos sensible ya que se activa en respuesta a una mayor concentración de osmolitos en el medio (Maeda *et al.*, 1994;Maeda *et al.*, 1995).

La primera de estas ramas está controlada por el sensor de membrana Sln1, relacionado evolutivamente con los sensores de los sistemas de dos componentes descritos por primera vez en procariontes (Posas *et al.*, 1996). Este receptor posee un dominio histidín quinasa; al formar un dímero con capacidad de autofosforilación le permite situarse al comienzo de una cascada de fosfotransferencia compuesta por Sln1-Ypd1-Ssk1 (Hohmann, 2009). Sln1 se encuentra constitutivamente en estado activo, cataliza su propia fosforilación y por tanto la fosforilación de Ypd1 y Ssk1, que al estar fosforilado no interacciona con las MAPKKs Ssk2 y Ssk22 (Horie *et*

*al.*, 2008). Sin embargo, en condiciones de alta osmolaridad este osmosensor está inhibido, con la consiguiente desfosforilación de Ssk1, capaz en estas condiciones de interactuar con Ssk2 y Ssk22 para transmitir la señal (Tatebayashi *et al.*, 2003). Estas dos MAPKKKs fosforilan a la MAPKK Pbs2, la cual es responsable de la doble fosforilación y activación de la MAPK Hog1 (Posas y Saito, 1997). A pesar de que Ssk2 y Ssk22 parecen redundantes, Ssk2 tiene una función adicional en la reorganización del citoesqueleto de actina tras un choque osmótico (Yuzyuk *et al.*, 2002; Bettinger *et al.*, 2007).



**Figura 5:** Esquema de la ruta de alta osmolaridad en *S. cerevisiae*.

La segunda rama de la ruta de respuesta a alta osmolaridad está controlada por Sho1. Se trata de una proteína con cuatro dominios transmembranales y un dominio SH3 (*Src Homology*) citoplasmático. Sho1 no es capaz de detectar cambios en la osmolaridad por sí mismo sino que lo hace en conexión a dos osmosensores de tipo mucina altamente glicosilados anclados a la membrana denominados Hkr1 y Msb2; este último participa también junto con Sho1 en la ruta de crecimiento filamentoso (Raitt *et al.*, 2000; Tatebayashi *et al.*, 2007; Vadaie *et al.*, 2008). La función de Sho1 se basa en la unión a través de su dominio SH3 a regiones ricas en prolina presentes en Pbs2 (Maeda *et al.*, 1995; Zarrinpar *et al.*, 2004) que actúa como *scaffold* y de esta

manera recluta a la membrana diferentes componentes de la cascada para que se localicen en lugares de crecimiento polarizado y remodelado activo (Reiser *et al.*, 2000). En la respuesta a altas temperaturas que promueve la hiperactivación de la MAPK Hog1 participa únicamente Sho1; de esta manera se evidencia que los osmosensores son capaces de discriminar entre distintos tipos de estímulos (Winkler *et al.*, 2002).

Se ha descrito la existencia de un tercer osmosensor, Opy2. Se trata de una proteína integrada en la membrana plasmática que actúa en conexión con Sho1 y Ste50; de esta forma, aunque la ruta de filamentación y la de alta osmolaridad compartan muchos componentes de la cascada, la regulación de Opy2 en la membrana determina una respuesta específica frente a un estrés osmótico (Wu *et al.*, 2006a; Ekiel *et al.*, 2009; Yamamoto *et al.*, 2010).

Cuando Sho1 y Opy2 reciben el estímulo se produce la activación de Cdc42, que a su vez se une y activa a la quinasa Ste20, la cual promueve la activación por fosforilación secuencial del módulo de MAPKs Ste11-Pbs2-Hog1. La proteína Pbs2 actúa como una plataforma de ensamblaje que pone en contacto a Sho1 con la MAPKKK Ste11 y la MAPK Hog1 (Posas *et al.*, 1997). Por otro lado, Ste11 se encuentra unido constitutivamente a la proteína adaptadora Ste50 para favorecer su interacción con Cdc42-Ste20 (Posas y Saito, 1998) (Ramezani-Rad, 2003; Wu *et al.*, 2006a). Sho1 consta a su vez de una región por la que se une a Ste11 independientemente de Pbs2 (Zarrinpar *et al.*, 2004). Así, todos los componentes de la cascada se encuentran anclados a la membrana plasmática a través de Sho1 (Raitt *et al.*, 2000).

Finalmente, la activación de Pbs2 a través de las dos ramas descritas (tanto por Ssk2/22 como por Ste11) induce la fosforilación de la MAPK Hog1 (Figura 5), que se transloca al núcleo para a su vez fosforilar factores de transcripción que activan la transcripción de genes que contienen la secuencia STRE (*Stress Response Element*) en su región promotora. Entre los factores de transcripción sobre los que actúa Hog1 destacan los activadores Smp1, Msn2/Msn4, Msn1 y Hot1 y el represor Sko1 (de Nadal *et al.*, 2007). El activador Hot1, constitutivamente unido al promotor del gen *GPD1*, controla la producción de glicerol en la célula (Alepez *et al.*, 2001). Además, la MAPK Hog1 no sólo recluta la RNA-polimerasa II a genes diana, sino también complejos remodeladores de cromatina (Mas *et al.*, 2009) y participa en la fase de elongación transcripcional (de Nadal *et al.*, 2011).

A pesar de que la ruta de alta osmolaridad y la de crecimiento invasivo comparten muchos de sus componentes, se han descrito diversos mecanismos que garantizan la especificidad de la señalización. En este sentido, ya hemos comentado previamente que las proteínas Pbs2 y Opy2 (a través de su unión a Ste50) desempeñan un papel muy importante. También se ha descrito

que Ste50 interacciona con Sho1 pero la función que tiene esta unión es todavía desconocida (Tatebayashi *et al.*, 2006). Asimismo se ha comprobado que la retrofosforilación que ejerce la MAPK Hog1 sobre Ste50, que es una proteína común a otras rutas, limita la duración de la activación de Kss1, inhibiendo el crecimiento invasivo en condiciones de alta osmolaridad y evitando así el entrecruzamiento entre rutas (Hao *et al.*, 2008b). La MAPK Hog1 es además la responsable de inactivar al factor de transcripción Tec1 en condiciones de estrés osmótico (Shock *et al.*, 2009). Por otro lado, el sensor de membrana Msb2 es capaz de detectar defectos en la glicosilación y activar únicamente y selectivamente a la ruta de crecimiento filamentoso en estas condiciones (Cullen *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2009).

Existen evidencias que plantean la existencia de un entrecruzamiento entre las rutas de integridad celular y alta osmolaridad. La MAPK Hog1 regula la expresión de Slf2 tras estrés osmótico (Hahn y Thiele, 2002). Por otra parte, la inducción transcripcional en presencia de zimoliasa ( $\beta$ -1,3 glucanasa) necesita de elementos de la ruta de alta osmolaridad (Bermejo *et al.*, 2008), a pesar de que la expresión de genes como *CRH1* (que codifica una proteína involucrada en remodelación de pared) (Rodríguez-Peña *et al.*, 2000) está mediada por Rlm1 y no por los factores de transcripción activados por la MAPK Hog1 (Bermejo *et al.*, 2008).

En cuanto a las rutas de alta osmolaridad y apareamiento, a pesar de compartir ciertos elementos (Cdc42, Ste20, Ste50 y Ste11), se encuentran perfectamente aisladas puesto que las MAPKs Hog1 y Fus3 se activan sólo en presencia de estrés osmótico y feromona respectivamente (Patterson *et al.*, 2010). Para ello son necesarios ciertos componentes como Hog1 o Pbs2, ya que en ausencia de estas quinasas las MAPKs Fus3 y Kss1 se activan frente a un estrés hiperosmótico (O'Rourke y Herskowitz, 1998; O'Rourke y Herskowitz, 2004; Pitoniak *et al.*, 2009). Para que el entrecruzamiento entre rutas no tenga lugar es necesaria tanto la presencia en el citoplasma como la actividad catalítica de Hog1, que limita la activación de Fus3 en respuesta a un choque hiperosmótico y suspende el apareamiento hasta que la célula se haya adaptado a este estímulo (Westfall y Thorner, 2006; Westfall *et al.*, 2008; Nagiec y Dohlman, 2012).

## **2.5 Ruta de integridad celular**

La pared celular es una envoltura externa que rodea a las células de *S. cerevisiae*. Constituye un elemento esencial tanto para el mantenimiento de su morfología como para la protección frente a agentes externos con el fin de garantizar su integridad y, en consecuencia, su supervivencia. La

célula debe remodelar esta estructura durante el crecimiento vegetativo, los procesos morfogénicos como el apareamiento, la esporulación y el crecimiento pseudohifal (Cid *et al.*, 1995; Molina *et al.*, 2000), así como frente a choques osmóticos y condiciones externas adversas (Klis *et al.*, 2006). Es por tanto una estructura dinámica que puede variar en composición y grosor a través de una respuesta adaptativa conocida como “mecanismo compensatorio” con el fin de moldearse o repararse bajo condiciones de estrés (Popolo *et al.*, 2001). La pared celular se compone de polisacáridos (glucano y quitina) y proteínas glicosiladas (manoproteínas). Está constituida por una red tridimensional interna de fibras de  $\beta$ -1,3-glucano y quitina, que dota de elasticidad y resistencia a la estructura, y una capa externa de manoproteínas que se asocian directamente a la red de  $\beta$ -1,3-glucano o a través de los polímeros de  $\beta$ -1,6-glucano (Lesage y Bussey, 2006; Orlean, 2012). El carácter esencial de esta estructura para la célula fúngica y el hecho de que no esté presente en las células eucariotas superiores hacen que su estudio pueda contribuir a la identificación de dianas potenciales para el desarrollo de nuevos agentes antifúngicos (Emri *et al.*, 2013).

La principal ruta de transducción de señales que regula esta remodelación de la pared es la ruta de integridad celular o CWI (*Cell Wall Integrity*) mediada por la MAPK Sit2 (Levin, 2005). Esta ruta se activa frente a una gran variedad de estímulos y condiciones que alteran la pared celular entre los que destacan la elevada temperatura (37-39°C) (Kamada *et al.*, 1995); la baja temperatura (12°C) (Corcoles-Saez *et al.*, 2012); la despolarización del citoesqueleto de actina (Harrison *et al.*, 2004); el choque hipotónico (Davenport *et al.*, 1995); la presencia de feromonas (Errede *et al.*, 1995); el ácido palmítico (Lockshon *et al.*, 2012); el tratamiento con arsenato (Matia-Gonzalez y Rodriguez-Gabriel, 2011), cafeína y vanadato (Martin *et al.*, 2000); el estrés de retículo endoplasmático (Scrimale *et al.*, 2009); los defectos en O-glicosilación (Arroyo *et al.*, 2011); el estrés oxidativo (peróxido de hidrógeno, diamida) (Alic *et al.*, 2003; Vilella *et al.*, 2005; Petkova *et al.*, 2010); los pHs extremos (Claret *et al.*, 2005; Serrano *et al.*, 2006); la exposición a agentes de unión a quitina (rojo Congo, Blanco de Calcoflúor) (Ketela *et al.*, 1999; de Nobel *et al.*, 2000); los agentes que degradan enzimáticamente la pared celular como la zimoliasa ( $\beta$ -1,3 glucanasa) (Bermejo *et al.*, 2008) o antifúngicos como la caspofungina (inhibidor de la  $\beta$ -1,3 glucan-sintasa) (Reinoso-Martin *et al.*, 2003). Asimismo, mutaciones en genes importantes para la biogénesis de la pared celular como *FKS1*, *GAS1* y *MNN9* entre otros, dan lugar a células con una pared debilitada y presentan una activación de la ruta en condiciones basales (de Nobel *et al.*, 2000; Lagorce *et al.*, 2003). En estas circunstancias, la estabilización osmótica del medio por adición de sorbitol disminuye la activación de la ruta e impide que se

produzca la muerte por lisis celular, permitiendo también la viabilidad de mutantes delecionados en los componentes de la ruta (de Nobel *et al.*, 2000; Martin *et al.*, 2000).

La vía de integridad celular (Figura 6) se compone de los sensores Wsc1-3, Mid2 y Mtl1, situados en la membrana plasmática, la GTPasa Rho1 (y sus moduladores), que se une y activa a la proteína quinasa C Pkc1, que transmite la señal al módulo conservado de MAPKs. Pkc1 fosforila al primer eslabón de dicho módulo, la MAPKKK Bck1 (Lee y Levin, 1992) que a su vez fosforila y activa las MAPKKs Mkk1/2 (Irie *et al.*, 1993), responsables de la activación, en último lugar, de la MAPK Slt2 (Torres *et al.*, 1991), también denominada Mpk1 (Levin, 2011). En el último punto de esta cascada se sitúan dos factores de transcripción que son fosforilados por Slt2 en su forma activa, Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1997) y el complejo SBF (*S*wi-*b*inding *f*actors) formado por Swi4 y Swi6 (Madden *et al.*, 1997), permitiendo de esta manera su unión a los promotores de genes que mediarán la respuesta frente al daño en la pared celular. Se sabe además que la MAPK Slt2, una vez activa, fosforila a otros sustratos, como la proteína Sir3, que interviene en el silenciamiento génico transcripcional (Ray *et al.*, 2003).

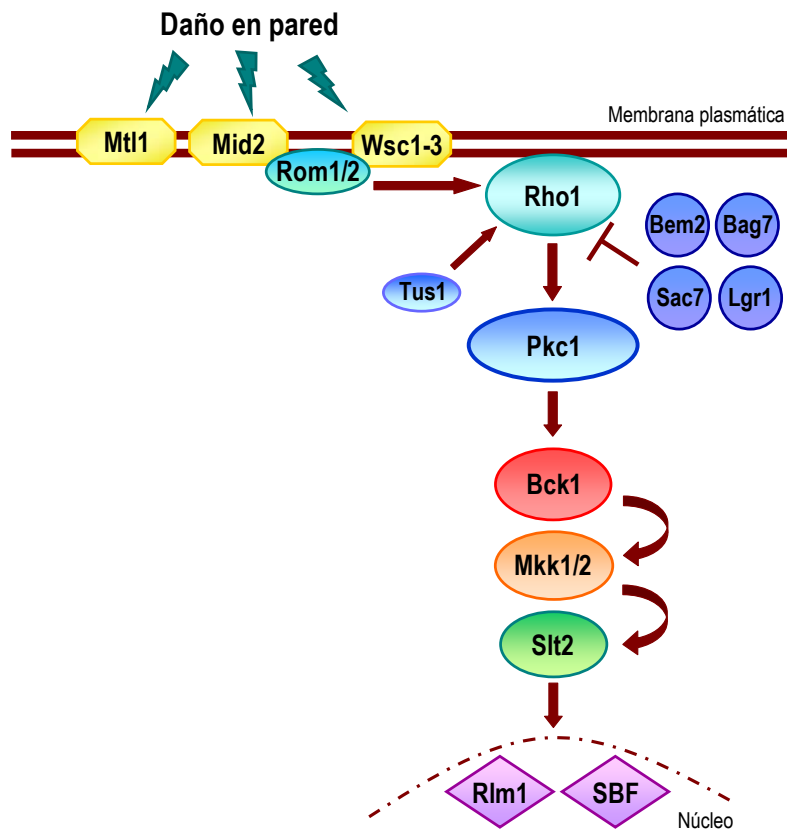


Figura 7: Esquema de la ruta de integridad celular en *S. cerevisiae*.

### **2.5.1 Sensores**

Se han descrito una serie de sensores implicados en detectar y transmitir la señal: Wsc1 (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998), Wsc2, Wsc3 (Verna *et al.*, 1997), Mid2 y Mtl1 (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Son proteínas con un pequeño dominio C-terminal citoplasmático, una región transmembranal y un dominio extracelular rico en residuos de serinas y treoninas altamente O-manosiladas (Jendretzki *et al.*, 2011). Además, los sensores de la familia Wsc se caracterizan por presentar un dominio rico en cisteína que es clave en la formación de puentes disulfuro entre moléculas de sensores y en la transmisión de la señal en situaciones de estrés (Dupres *et al.*, 2011). Parece que Wsc1 y Mid2 son los principales activadores de esta ruta ya que el doble mutante *wsc1Δmid2Δ* da lugar a un fenotipo inviable en ausencia de estabilización osmótica (Rajavel *et al.*, 1999). Se comportan como mecanosensores que detectan cambios en la rigidez de la pared celular o alteraciones en la membrana plasmática actuando como “nanomuelles” (Dupres *et al.*, 2009; Rodicio y Heinisch, 2010).

La funcionalidad de estos sensores es estímulo-dependiente, existiendo papeles específicos para cada sensor en función de la naturaleza del estrés. Por ejemplo, la respuesta transcripcional consecuencia del tratamiento con rojo Congo está mayoritariamente mediada por Mid2, mientras que la respuesta a caspofungina depende casi exclusivamente de Wsc1 (Bermejo *et al.*, 2010).

Los dominios citoplasmáticos C-terminales de estos sensores interactúan con Rom1/2, la GEF de Rho1, estimulando el intercambio de nucleótido de GDP por GTP, activando a la GTPasa Rho1 (Philip y Levin, 2001).

### **2.5.2 Rho1**

La GTPasa Rho1 transita entre dos estados: Rho1-GDP (forma inactiva) y Rho1-GTP (forma activa). De esta manera Rho1 es activado por medio de las GEFs Rom1, Rom2 y Tus1; mientras que las GAPs (*GTPasa activating proteins*) Sac7, Bem2, Lgr1 y Bag7 son las encargadas de su regulación negativa (Perez y Rincon, 2010). Se ha detallado la existencia de cinco efectores de Rho1: Pkc1 en la ruta de integridad celular (Kamada *et al.*, 1996), las subunidades catalíticas Fks1 y Fks2 de la  $\beta$ -1,3-glucan sintasa sobre las que actúa como la subunidad reguladora (Qadota *et al.*, 1996; Mazur y Baginsky, 1996), las forminas Bni1 y Bnr1 implicadas en el ensamblaje de filamentos de actina (Kohno *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.*, 1998), el factor de transcripción Skn7 que regula la expresión de genes relacionados con la biogénesis de la pared

celular (Alberts *et al.*, 1998) y el componente Sec3 del exocisto que favorece la secreción polarizada (Guo *et al.*, 2001).

### **2.5.3 Proteín quinasa C 1 (Pkc1)**

La proteín quinasa C Pkc1 fue el primer componente de la ruta de integridad celular identificado (Levin *et al.*, 1990). Su estructura presenta dos dominios HR1A y HR1B en el extremo N-terminal; seguidamente una región similar al dominio C2 de las proteín quinasa C de mamíferos; la región del pseudosustrato que interacciona con el dominio catalítico y es responsable de la inhibición intramolecular de la actividad catalítica en condiciones basales; dos dominios ricos en cisteínas denominados C1A y C1B; y, por último, el dominio quinasa situado en el extremo C-terminal. Los dominios HR1A y C1B son los responsable de la unión a Rho1 (Schmidt *et al.*, 2002;Heinisch, 2005). Una vez unida a Rho1, Pkc1 se activa (Kamada *et al.*, 1996). Se conocen además otros activadores de Pkc1, en concreto las quinasas Pkh1 y Pkh2, homólogos de las PDKs (*3-phosphoinositide-dependent protein kinases*) de mamíferos (Inagaki *et al.*, 1999).

La proteín quinasa C se localiza principalmente en zonas de crecimiento polarizado siguiendo un patrón similar a Rho1 (Andrews y Stark, 2000). Durante la mitosis se ubica en el cuello entre la célula madre y la yema junto al anillo de septinas (Denis y Cyert, 2005).

El mutante *pkc1Δ* muestra inviabilidad en condiciones normales de crecimiento (sólo es viable en presencia de sorbitol 0,8-1M) mientras que la delección de cualquiera de los miembros de la cascada de MAPK no presenta fenotipos tan graves; esto sugiere que Pkc1 está implicada en la regulación de múltiples rutas celulares (Levin, 2005). Se ha relacionado a Pkc1 con la regulación del huso mitótico (Khalfan *et al.*, 2000;Hosotani *et al.*, 2001) y del citoesqueleto de actina a través de la quinasa Tor2 (Helliwell *et al.*, 1998), con la activación de la formina Bni1 (Dong *et al.*, 2003) y con la respuesta frente a estrés genotóxico (Soriano-Carot *et al.*, 2014). Sin embargo, a pesar de que se le atribuyen varios sustratos intracelulares, únicamente se conoce con detalle su regulación sobre el módulo de quinasas Bck1-Mkk1/2-Slt2.

### **2.5.4 Módulo de MAPKs**

La MAPK Bck1 es fosforilada *in vitro* por Pkc1 en los residuos Ser<sup>939</sup>, Thr<sup>1119</sup> y Ser<sup>1134</sup> en una región bisagra entre su dominio regulatorio N-terminal y su dominio catalítico C-terminal (Levin *et al.*, 1994). Bck1 activada fosforila a las MAPKs Mkk1 (en los residuos Ser<sup>377</sup> y Thr<sup>381</sup>) (Levin, 2005) y Mkk2. Cualquiera de ellas es capaz por sí sola de mantener la funcionalidad de la ruta de integridad celular, siendo necesario un doble mutante *mkk1Δmkk2Δ* para conferir sensibilidad

en respuesta a estímulos de la ruta (Irie *et al.*, 1993); otros autores también han definido estas dos quinasas como redundantes (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007). Mkk1 y Mkk2 presentan un dominio quinasa C-terminal similar pero divergen en la región N-terminal por lo que se ha propuesto que esta región desempeña un papel regulatorio como mediador de la interacción con otras proteínas como Slt2 (Soler *et al.*, 1995) o el componente del polarisoma Spa2 que actúa como *scaffold* reclutando a Mkk1 y Slt2 en sitios de crecimiento polarizado (van Drogen y Peter, 2002). Existe un mecanismo de retrofosforilación mediante el cual Slt2 fosforila a Mkk1 y Mkk2, ejerciendo una posible retroalimentación negativa sobre la ruta de integridad celular (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007).

La MAPK Slt2 es la homóloga funcional de la MAPK ERK5 de humanos (Truman *et al.*, 2006). Se describió como supresor del fenotipo lítico de los mutantes *lyt2Δ* (Torres *et al.*, 1991) y *bck1Δ* (Lee *et al.*, 1993). Es activada por fosforilación en los residuos de Thr<sup>190</sup> y Tyr<sup>192</sup> por las Mkks en condiciones de activación de la ruta (Lee *et al.*, 1993). Tras el dominio quinasa, presenta una larga cola en su extremo C-terminal con posible función autoinhibitoria (Levin-Salomon *et al.*, 2009). Se localiza en núcleo, citoplasma (Kamada *et al.*, 1995), sitios de crecimiento polarizado y en la punta del *shmoo* (van Drogen y Peter, 2001; Baetz *et al.*, 2001). A diferencia del resto de MAPKs, Slt2 consta de un dominio de activación transcripcional dentro de la zona C-terminal (Soler *et al.*, 1995; Kasler *et al.*, 2000). Uno de estos dominios se encuentra en la región definida por los aminoácidos 274-329 y el segundo es una secuencia rica en glutaminas definida por los aminoácidos 347-374, que está implicada tanto en la activación transcripcional como en la asociación de Slt2 consigo misma (dimerización) (Kim *et al.*, 2007; datos sin publicar). La MAPK Slt2, además de activarse por estímulos que afectan a la pared celular, se encuentra también fosforilada y activa en condiciones de estrés genotóxico (radiaciones UV, metil-metano sulfonato o hidroxidurea) (Queralt y Igual, 2005; Dardalhon *et al.*, 2009; Bandyopadhyay *et al.*, 2010; Soriano-Carot *et al.*, 2012), mitofagia (Mao *et al.*, 2011) y pexofagia (Manjithaya *et al.*, 2010).

Se ha descrito la existencia de un parálogo a Slt2, codificado por el gen *MLP1* (*Mpk1-like protein kinase*) (Watanabe *et al.*, 1997). Se trata de una pseudoquinasa, surgida de una duplicación ancestral del genoma de *S. cerevisiae* (Kellis *et al.*, 2004), que presenta un elevado grado de similitud (53% de su secuencia) con Slt2. Mlp1 carece del motivo de activación característico conservado en las MAPKs (T-X-Y) (en Mlp1 una lisina reemplaza a la treonina) y de otros dominios esenciales para la actividad catalítica (Hanks y Hunter, 1995). A pesar de ello, Mlp1 contiene un motivo CD que le permite interactuar con sustratos típicos de Slt2 como Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1995) y también mantiene la capacidad de actuar como activador

transcripcional a través del complejo SBF por un mecanismo no catalítico, como lo hace *Slf2* (Kim *et al.*, 2008; Truman *et al.*, 2009; Kim y Levin, 2010). El gen *MLP1* se ha usado habitualmente como gen reportero de la ruta de integridad celular porque se induce transcripcionalmente en respuesta a múltiples situaciones de estrés sobre la pared (Lagorce *et al.*, 2003; Agarwal *et al.*, 2003; Garcia *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2009).

### **2.5.5 Factores de transcripción: Rlm1 y el complejo SBF (Swi4/Swi6)**

La fosforilación de *Slf2* conduce a la activación de dos factores de transcripción, *Rlm1* y *SBF*, que producen cambios importantes en la expresión génica (Madden *et al.*, 1997; Jung y Levin, 1999; Garcia *et al.*, 2004).

La proteína *Rlm1* es el principal responsable de la respuesta transcripcional como consecuencia de la activación de la ruta de integridad celular. Controla la expresión de genes relacionados con la biogénesis de la pared celular (*GFA1*, *CHS3*, *CRH1*, *BGL2*), el metabolismo y la generación de energía y la regulación de la ruta de integridad celular (*SLT2*, *MID2*, *PTP2*, *MSG5*, *MLP1*) (Garcia *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2009).

El gen *RLM1* se identificó en una búsqueda de mutantes resistentes a la inhibición de crecimiento causada por la sobreexpresión de un alelo constitutivamente activo de *Mkk1* (*Mkk1<sup>S386P</sup>*) (Watanabe *et al.*, 1995). *Rlm1* presenta un dominio de unión a DNA en su extremo N-terminal de tipo MADS (*MCM1*, *Agamous Deficiens Serum response factor*), un dominio de activación transcripcional en el extremo C-terminal (Dodou y Treisman, 1997), una región que contiene un dominio D por el que se une a *Slf2* (Watanabe *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002) y dos residuos principales para la fosforilación por *Slf2* (*Ser<sup>427</sup>* y *Thr<sup>439</sup>*) 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 de integridad celular, la delección de *RLM1* no produce fenotipos de sensibilidad a estímulos que afectan a la pared celular, excepto el de sensibilidad a cafeína (Watanabe *et al.*, 1995). Por tanto, el leve fenotipo de un mutante *rlm1Δ*, comparado con el de un mutante *slt2Δ* sugiere que *Slf2* ha de tener dianas adicionales.

Por otro lado, el factor de transcripción *SBF* es un complejo dimérico formado por la subunidad *Swi4*, de unión a DNA, y la subunidad reguladora *Swi6*. Se considera que el dominio C-terminal de *Swi4* es un dominio con actividad autoinhibitoria que previene su unión al DNA hasta que se asocia con *Swi6*, permitiendo entonces que el heterodímero active la transcripción de genes que regulan el ciclo celular promoviendo la expresión de las ciclinas de fase G1 (*CLN1*, *CLN2*, *PCL1* y *PCL2*) que se unen a *Cdc28* (Madden *et al.*, 1997; Baetz *et al.*, 2001). En situaciones de estrés

sobre la pared celular, el complejo SBF regula la activación transcripcional (independientemente de Rlm1) de los genes *FKS2* (Kim *et al.*, 2008), *CHA1*, *YLR042C* e *YKR013W* (Kim y Levin, 2010). Estos genes se activan a través de un mecanismo no catalítico de la MAPK: la forma activa o fosforilada de la MAPK Slt2 y su pseudoquinasa Mlp1, forman un complejo con Swi4 que se asocia a los promotores de los genes diana independientemente de Swi6. Sin embargo, el reclutamiento posterior de Swi6 es necesario para la activación de la transcripción (Kim *et al.*, 2008; Kim y Levin, 2010). Además, se ha descrito recientemente que Slt2 posee también una función no catalítica en el proceso de elongación de la transcripción (Kim y Levin, 2011).

### 3. REGULACIÓN NEGATIVA DE LAS RUTAS DE MAPKs POR PROTEÍN FOSFATASAS

La señalización llevada a cabo por las rutas de MAPKs constituye un proceso complejo en el que tanto la duración como la magnitud de la activación son cruciales en la respuesta fisiológica (Sabbagh *et al.*, 2001; Ebisuya *et al.*, 2005). Ambos parámetros pueden ser regulados en diferentes niveles de la cascada: MAPKKK, MAPKK o MAPK. La actividad de estas enzimas es el resultado de la modulación de su estado de fosforilación gobernado por un equilibrio entre señales activadoras (que recibe a través de otras quinasas) y señales inhibitorias en las que están implicadas las proteínas fosfatasa (Keyse, 2000; Saxena y Mustelin, 2000). La fosforilación en los residuos de treonina y tirosina de las MAPKs es necesaria para su activación; sin embargo, la desfosforilación de tan sólo uno de estos residuos propicia su inactivación (Marshall, 1994). Por tanto, las fosfatasa de serinas y treoninas (PSPs, *protein serine/threonine phosphatases*), fosfatasa de tirosinas (PTPs: *protein tyrosine phosphatases*) y fosfatasa de especificidad dual (DSPs, *dual specificity phosphatases*) desempeñan un papel esencial en la regulación negativa de estas rutas de señalización (Farooq y Zhou, 2004; Kondoh y Nishida, 2007).

La existencia de diferentes fosfatasa que regulan una misma MAPK da idea de la complejidad de la maquinaria de regulación que controla la intensidad, amplitud y duración de la respuesta; por eso, no es sorprendente que la eliminación de una de ellas normalmente no de lugar a un fenotipo evidente. Además, es frecuente que una misma fosfatasa regule varias MAPKs. Sin embargo, a pesar de la aparente redundancia y falta de especificidad, existen varios

mecanismos por medio de los cuales se asegura la selectividad de cada fosfatasa sobre su sustrato, como por ejemplo la sublocalización celular de la fosfatasa o la interacción mediada por dominios D con la MAPK (Theodosiou y Ashworth, 2002; Martin *et al.*, 2005).

Las proteínas fosfatasas no actúan simplemente eliminando fosfatos de residuos de serinas, tirosinas o treoninas. Recientemente se ha destacado el papel que desarrollan en la fidelidad de señalización ya que regulan la correcta localización de las MAPKs y evitan el entrecruzamiento entre distintas rutas. También son capaces de proporcionar puntos de conexión con otras vías de señalización no mediadas por MAPKs (Caunt y Keyse, 2013). Por otro lado, la expresión de las fosfatasas suele estar regulada por la propia MAPK con la que interacciona (retroalimentación negativa) y, en muchas ocasiones, también su actividad catalítica se desencadena por la unión directa con su MAPK sustrato (Tamura *et al.*, 2002). Estas proteínas pueden realizar su acción en condiciones de estimulación de la ruta, ya sea para controlar los niveles máximos de activación como para favorecer la adaptación o recuperación en aquellos casos en que se requiera una activación transitoria, así como en condiciones no estimuladoras para mantener un estado basal bajo de fosforilación de la MAPK y asegurar su rápida respuesta y alta sensibilidad frente a cambios ambientales (Owens y Keyse, 2007).

En células de mamífero, existen fosfatasas que actúan sobre rutas de MAPKs que regulan la respuesta defensiva del hospedador en la invasión por microorganismos (Jono *et al.*, 2003) o constituyen dianas celulares de proteínas patógenas microbianas (Kar-Roy *et al.*, 2004). Asimismo, su ausencia o desregulación puede implicar la aparición de cáncer, trastornos neurológicos, defectos en la inmunidad, el desarrollo fetal, el metabolismo o la formación de hueso (Lang *et al.*, 2006; Ostman *et al.*, 2006; Salojin y Oravec, 2007; Hardy *et al.*, 2012; Hendriks *et al.*, 2013). Por ello, estas enzimas pueden utilizarse como factores pronóstico en ciertos tipos de cáncer (Vicent *et al.*, 2004), actuar como mediadores de la acción de ciertos fármacos en carcinogénesis (Chen *et al.*, 2005) o usarse como dianas terapéuticas para el desarrollo de fármacos (Taberner *et al.*, 2008). Como consecuencia, el estudio de fosfatasas de MAPKs de mamíferos y sus homólogos en levadura sigue perfilándose como un campo de investigación esencial en los próximos años.

### **3.1 Proteín fosfatasas de serinas y treoninas**

Las serín-treonín fosfatasas (PSPs: *protein serine/threonine phosphatases*) se caracterizan por su capacidad para eliminar grupos fosfato de residuos específicos de serinas y treoninas en sus

sustratos. Las PSPs se agrupan a su vez en tres superfamilias atendiendo a su mecanismo catalítico y estructura: las fosfoproteín fosfatasas o PPPs (*phosphoprotein phosphatases*), las proteín fosfatasas metalo-dependientes o PPMs (*metal-dependent protein phosphatases*) y las proteínas basadas en aspartato como la FCP (*TFIIIF-associating component of RNA polymerase II CTD (C-terminal domain) phosphatase*) y la SCP (*small CTD phosphatase*) que interaccionan con el dominio C-terminal de la RNA polimerasa II (Shi, 2009).

### **3.1.1 Fosfoproteín fosfatasas (PPPs)**

La superfamilia PPP se compone de PP1, PP2A, PP2B (conocida comúnmente como calcineurina), PP4, PP5, PP6 y PP7. Los miembros de este grupo son holoenzimas (enzima más cofactor). Constan de una subunidad catalítica muy conservada y una o dos subunidades regulatorias, que modulan su actividad determinando su localización subcelular y la especificidad por su sustrato (Virshup y Shenolikar, 2009). Varios mecanismos como los relativos a la composición de la holoenzima, la metilación y fosforilación de la subunidad catalítica pueden regular su actividad (Longin *et al.*, 2007).

A pesar de que todas ellas están implicadas en diversos procesos celulares como la apoptosis, reorganización del citoesqueleto, metabolismo, síntesis de proteínas, morfogénesis o regulación de canales de membrana (Janssens y Goris, 2001; Lechward *et al.*, 2001; Ceulemans y Bollen, 2004; Jeong y Yang, 2013), sólo la PP2A se ha relacionado con la inactivación de las vías de señalización mediadas por MAPKs (Gomez y Cohen, 1991; Millward *et al.*, 1999). *In vitro*, PP2A puede desfosforilar e inactivar tanto a MEK1/2 como a ERK1/2. También existen evidencias *in vivo* de la regulación negativa de MEK1/2 por PP2A (Kins *et al.*, 2003). De igual forma se ha mostrado que PP2A regula también la ruta de JNK (Shanley *et al.*, 2001) y p38 gracias a su acción sobre el activador de la MAPK p38, MKK3 (Prickett y Brautigan, 2007). Se ha descrito un importante papel para PP2A como supresor de tumores (Chen *et al.*, 2013) y en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer (Vogelsberg-Ragaglia *et al.*, 2001).

### **3.1.2 Proteín fosfatasas metalodependientes (PPMs)**

Al igual que la familia FCP/SCP, las PPMs son enzimas monoméricas que necesitan utilizar cationes de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) o manganeso ( $Mn^{2+}$ ) para realizar su catálisis. Dentro de esta superfamilia destacan las llamadas PP2C. La resolución de la estructura tridimensional de la isoforma humana PP2Ca reveló que un residuo de aspártico es esencial para la coordinación

con los iones  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  (Das *et al.*, 1996). Las PP2C están muy conservadas, desde procariotas a eucariotas (Shi, 2009).

Estudios en células de mamífero han revelado que existen al menos 16 genes que codifican 22 isoformas (Lammers y Lavi, 2007). Su función se desarrolla principalmente en cascadas de señalización en respuesta a estrés mediadas por MAPKs (p38 y JNK), señalización en la vía PI3K/Akt, procesamiento del mRNA, ubiquitinación y degradación de proteínas, metabolismo y apoptosis o supervivencia celular (Tamura *et al.*, 2002; Lu y Wang, 2008). Algunos miembros como PP2C $\alpha$  y PP2C $\beta$  se consideran supresores tumorales por su actividad sobre p53 (Ofek *et al.*, 2003) mientras que otros como PP2C $\delta$  (Wip1) se catalogan como oncogenes (Le y Bulavin, 2010). Por otro lado, PP2C $m$  se localiza exclusivamente en la matriz mitocondrial. Su falta no produce fallos en la producción de ATP, pero sí altera la permeabilidad disminuyendo el potencial de membrana y produciendo graves defectos a nivel cardiaco (Lu *et al.*, 2007).

Con respecto a las vías de señalización mediadas por MAPKs se ha descrito que PP2C $\alpha$  desfosforila e inactiva tanto *in vivo* como *in vitro* a MKK3/6 (p38 MAPKKs) (Takekawa *et al.*, 1998) y a MKK4/7 (JNK MAPKKs) (Hanada *et al.*, 1998) mientras que la isoforma PP2C $\Sigma$  regula negativamente las rutas de JNK y p38 pero actuando en este caso sobre las MAPKKKs (Saito *et al.*, 2007). También se ha visto que la sobreexpresión de PP2C $\beta$  suprime la activación de p38 a través de la desfosforilación directa de la MAPKKK TAK1 (Hanada *et al.*, 2001) y que la isoforma PP2C $\delta$  regula negativamente a p38 (Takekawa *et al.*, 2000). Aunque en principio se pensó que las PP2C no actuaban sobre la señalización producida por proteínas tipo ERK (Zhou *et al.*, 2002), en un rastreo buscando reguladores negativos de estas proteínas se identificó a *dPPM1* como un nuevo inhibidor de la activación de las MAPKs tipo ERK en *Drosophila* (Friedman y Perrimon, 2006).

### **3.2 Proteín fosfatasas de tirosinas**

En mamíferos el grupo de fosfatasas de tirosinas constituye una gran familia con más de 100 enzimas (Alonso *et al.*, 2004). Las PTPs clásicas contienen uno o dos dominios fosfatasa conservados (dominios PTP) de unos 280 aminoácidos (Wang *et al.*, 2003). Estudios estructurales muestran que el centro activo de estas enzimas es una hendidura en la superficie de la molécula, cuya gran profundidad determina la especificidad exclusiva hacia residuos de fosfotirosina y no frente a los de fosfoserina o fosfotreonina (Jia *et al.*, 1995).

Se caracterizan por presentar en su centro activo el motivo CX<sub>5</sub>R, también presente en las fosfatasa de especificidad dual (DSPs), con las que comparten además el mecanismo catalítico. El residuo de cisteína es el responsable del ataque nucleofílico que sufrirá el sustrato mientras que el residuo de arginina juega un papel importante en la unión al sustrato y en la estabilización de los intermediarios de la reacción (cisteinil-fosfato) (Zhang *et al.*, 1994). El mecanismo catalítico de las PTPs requiere a su vez de la participación de un residuo de aspártico que funciona como ácido en un primer paso de protonación y como base en un segundo paso de hidrólisis dejando el residuo de cisteína libre (Denu y Dixon, 1995; Denu *et al.*, 1996). A pesar de ser críticos ambos, cisteína y aspártico, sólo la sustitución del residuo de cisteína por una alanina o serina es suficiente para hacer que la proteína pierda su actividad fosfatasa (Taberner *et al.*, 2008). El mutante sin actividad catalítica es capaz de unirse fuertemente a su sustrato, siendo en este caso la sustitución del aspártico por alanina la que da lugar a una proteína con mayor capacidad de interacción (Garton *et al.*, 1996).

En su región aminoterminal y fuera del sitio activo se identificó un motivo de unos 16 aminoácidos, que se denominó dominio KIM (*kinase interaction motif*), que dirige selectivamente cada fosfatasa hacia su sustrato (Pulido *et al.*, 1998) y que se corresponde con el dominio D de interacción con MAPKs presente en otras proteínas, como se ha mencionado anteriormente.

Otra característica a destacar está relacionada con el cambio conformacional que adoptan las PTPs tras la unión al sustrato. En ausencia de sustrato, el sitio activo adopta una conformación abierta en la cual el residuo ácido de aspártico se sitúa lejos del sitio activo, lo que le impide actuar como donador de protones. No obstante, tras la interacción con el sustrato, el sitio activo se cierra rodeando a la cadena de fosfotirosina de manera que este cambio conformacional reposiciona el aspártico para ejercer su función catalítica (Tonks y Neel, 2001).

Las PTPs están implicadas en patologías como el cáncer, la diabetes o enfermedades de tipo autoinmune (Alonso *et al.*, 2004; Mustelin *et al.*, 2005) y son por tanto presumibles dianas terapéuticas. La bibliografía contiene numerosos estudios sobre inhibidores de estas enzimas (Bialy y Waldmann, 2005; Tautz *et al.*, 2006; Blaskovich, 2009; Nunes-Xavier *et al.*, 2013). Algunas de ellas regulan rutas de MAPKs; por ejemplo, la MAPK p38 $\alpha$  se une a las tirosin fosfatasa de tejidos neuronales STEP (*striatal enriched phosphatase*) y PTP-SL (*STEP-like phosphatase*, PTP-RR, *receptor type R*) y a la tirosin fosfatasa de células hematopoyéticas HePTP (*hematopoietic PTP*) (Francis *et al.*, 2013). Por otro lado, HePTP y STEP se unen a ERK1/2 a través de su dominio KIM (Pulido *et al.*, 1998; Mustelin *et al.*, 2005). La fosfatasa PTP-SL es además capaz de desfosforilar a ERK5 (Buschbeck *et al.*, 2002) y a ERK1/2 (Noordman *et al.*,

2006; Balasu *et al.*, 2009), teniendo un papel esencial en el desarrollo de cáncer cervical (Su *et al.*, 2013).

### **3.3 Proteín fosfatasas de especificidad dual**

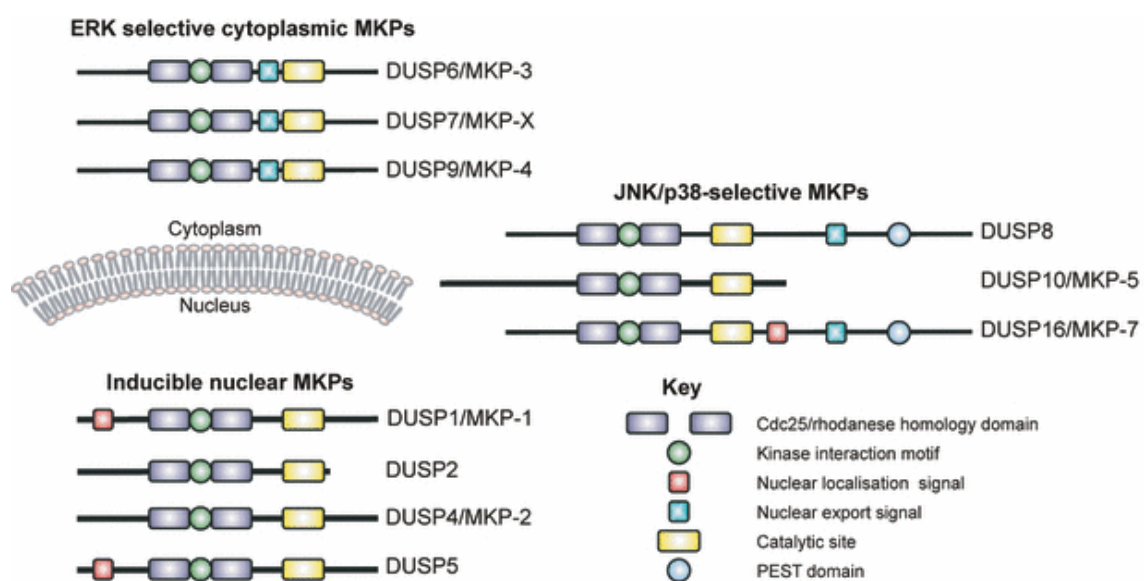
Las fosfatasas de especificidad dual (DSPs o DUSPs, *dual specificity phosphatases*) son capaces de desfosforilar tanto los residuos de serina/treonina como los de tirosina de sus sustratos. En mamíferos se han identificado 61 DSPs, con gran variedad de estructuras y funciones (Patterson *et al.*, 2009), que actúan sobre proteínas, lípidos, RNA o carbohidratos. Los principales grupos dentro de las DSPs de mamíferos incluyen la subfamilia MKPs (MAPK Phosphatases), las fosfatasas de lípidos representadas por PTEN y las DSPs atípicas de bajo peso molecular (LMW-DSPs, *low molecular weight*). A este último grupo pertenecen las fosfatasas que carecen de la región aminoterminal que contiene el dominio D (*Docking domain*) característico de las MKPs pero que, a pesar de ello, mantienen una especificidad de sustrato por MAPKs. Este hecho sugiere que estas LMW-DSPs podrían presentar mecanismos de unión alternativos al mediado por el dominio D de las PTPs y MKPs y el *Common Docking* de las MAPKs (Hood *et al.*, 2002). La LMW-DSP VHR (*Vaccinia H1 related*) desfosforila ERK y JNK (Todd *et al.*, 1999; Alonso *et al.*, 2001; Todd *et al.*, 2002) mientras que la LMW-DSP2 actúa sobre p38 y JNK (Aoyama *et al.*, 2001), la DSP21 lo hace sobre p38 (Deng *et al.*, 2014). Sin embargo, no todas las atípicas LMW-DUSPs han mostrado actividad sobre MAPKs, como por ejemplo DSP18 (Jeong *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 2006b).

Con el uso de herramientas bioinformáticas se ha definido una nueva familia de DSPs llamada PFA-DSPs (*Plant and Fungi atypical DSPs*) presente en plantas, hongos y protozoos (Roma-Mateo *et al.*, 2007); estas enzimas comparten una serie de motivos aminoacídicos que se alejan del centro catalítico convencional de las DSPs de mamíferos.

#### **3.3.1 MKPs: MAPK Phosphatases**

Las MKPs presentan especificidad de sustrato por MAPKs y realizan por tanto un papel muy destacado en la regulación de la señalización por rutas de este tipo. Las 10 DSPs que forman parte de esta subfamilia comparten una misma estructura. En ellas se observan dos regiones con funciones claramente diferenciadas (Figura 7). Por un lado, la región C-terminal en la que se localiza el centro catalítico, muy parecido al de las PTPs. Por otro lado, la región N-terminal con función reguladora MKB (MAPK binding), menos conservada que el dominio catalítico y

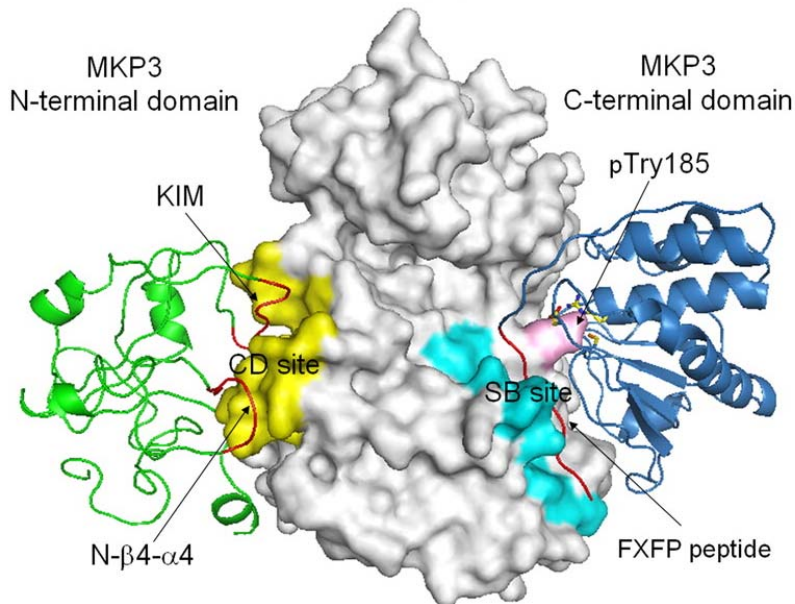
responsable de regular la especificidad enzimática a través de las interacciones con las MAPKs (Camps *et al.*, 2000; Dickinson y Keyse, 2006). El centro activo consta de la secuencia conservada HC(X)<sub>5</sub>R característica de las PTPs. Como en las PTP clásicas, los residuos de cisteína y arginina, localizados en el sitio activo, son esenciales para el ataque nucleofílico dirigido al fosfato del sustrato y existe un residuo de aspártico conservado, posicionado cerca del centro activo, que participa también en esta catálisis (Patterson *et al.*, 2009). El bolsillo catalítico de las DSPs es poco profundo pero más ancho que el las PTPs. Por esta razón es capaz de acomodar residuos de serina o treonina además de residuos de tirosina (Denu y Dixon, 1998).



**Figura 7: Clasificación, localización y dominios estructurales de las MKPs de mamíferos.** Figura tomada de Caunt y Keyse (2013).

El dominio de unión a MAPKs MKB contiene en su secuencia una región que muestra similitud con un dominio de la fosfatasa Cdc25, denominado motivo CH2 o *Cdc25-like* (Keyse y Ginsburg, 1993) y esto refleja que este dominio se encuentra estructuralmente relacionado con la familia Rhodanasa de las sulfotransferasas (Bordo y Bork, 2002). En esta región ubicada en el extremo N-terminal se encuentra el dominio D o KIM, responsable de la interacción con el dominio CD presente en las MAPKs (Tanoue y Nishida, 2003) (Figura 8). Como ocurría en las PTPs, en algunas MKPs la unión de la MAPK fosforilada al dominio D ocasiona cambios conformacionales que incrementan la actividad catalítica de estas fosfatasas (Chen *et al.*, 2001; Slack *et al.*, 2001) (Figura 9). Sin embargo, este mecanismo no es universal para todas las MKPs; por ejemplo, la

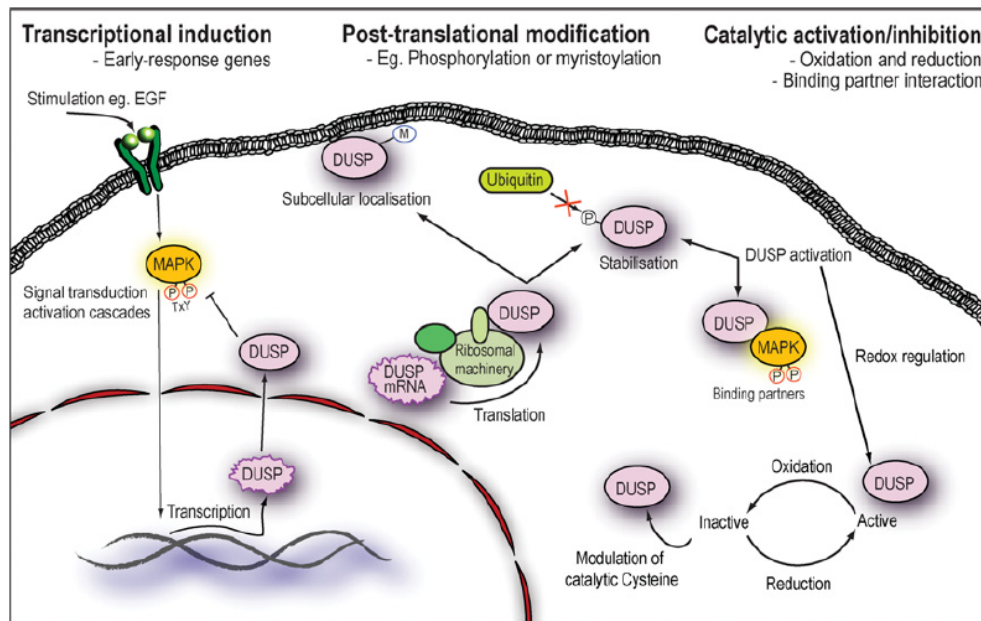
unión de DSP5 y DSP10 a ERK2 y p38 respectivamente no activa su acción enzimática (Tanoue *et al.*, 1999; Mandl *et al.*, 2005).



**Figura 8: Modelo estructural del complejo ERK2-MKP3.** Interacciones entre ERK2 y los dominios N- y C-terminal de MKP3. La superficie de ERK2 se muestra en gris. Los dominios amino y carboxiterminales de MKP3 en verde y azul respectivamente. El dominio CD está representado en amarillo mientras que el dominio SB está coloreado en azul. El residuo fosforilado de tirosina (pTyr<sup>185</sup>) de ERK2 se muestra en rosa. El dominio KIM, el *loop* N-β4-α4 y el péptido FXFP de MKP3 se destacan en rojo. Imagen tomada de Zhou *et al.*, (2006).

Distintas modificaciones postraduccionales (PTMs) pueden afectar tanto a la actividad enzimática de la MKP como a su unión con la MAPK dando lugar a fenómenos de retroalimentación positiva o negativa en la cascada de señalización (Figura 9). Por ejemplo, ERK fosforila el extremo C-terminal de DSP1, DSP4 y DSP5 aumentando la estabilidad de la proteína (retroalimentación negativa) (Brondello *et al.*, 1997). Por el contrario, cuando ERK fosforila a DSP1 en unos residuos de serina distintos provoca su ubiquitinación y por tanto su degradación (retroalimentación positiva). A veces, la fosforilación de ciertos residuos deja inaccesible el dominio KIM y se impide de esta forma la unión de la fosfatasa a su sustrato. En otros casos, la acetilación de un residuo de lisina aumenta la afinidad del dominio KIM por el CD. Las modificaciones postraduccionales sobre las MKPs pueden regular además el entrecruzamiento de distintas rutas. Por ejemplo, ERK fosforila el extremo C-terminal de DSP16 (una fosfatasa específica de JNK) haciéndola más estable y favoreciendo la regulación negativa de la ruta mediada por JNK (Patterson *et al.*, 2009).

La localización subcelular de las MKPs determina en muchas ocasiones su especificidad de actuación. En el extremo N-terminal o en extensiones C-terminales se han encontrado señales de localización nuclear NLS (Nuclear localization signal) (Mandl *et al.*, 2005) y de exportación núcleo-citoplasmática NES (Nuclear export signal) (Masuda *et al.*, 2001) (Figura 7).



**Figura 9: Regulación de DUSPs.** Imagen tomada de Patterson *et al.* (2009).

A diferencia de lo que ocurre con las PSPs, la expresión de la mayoría de las MKPs se induce en condiciones de activación de la MAPK que desfosforilan (Nunes-Xavier *et al.*, 2010) (Figura 9). Esto sugiere que la función que ejercen las MKPs sea más importante en la regulación negativa de estas rutas frente a un estímulo sostenido y mantenido en el tiempo (Caunt y Keyse, 2013).

Si las MKPs actúan como reguladores negativos de las rutas de MAPKs, es lógico pensar que se comporten como supresores de tumores (Keyse, 2008; Balko *et al.*, 2012). No obstante, una ganancia de función de estas MKPs puede bloquear los efectos antiapoptóticos de ciertos antitumorales vía JNK y p38 y asociarse con un peor pronóstico de la enfermedad (Wang *et al.*, 2006; Small *et al.*, 2007). Por esta razón, se están desarrollando actualmente inhibidores selectivos de MKPs con el fin de tratar diversas enfermedades (Rios *et al.*, 2014).

## 4. PROTEÍN FOSFATASAS DE *Saccharomyces cerevisiae*

### 4.1 Proteín fosfatasas de serinas y treoninas

La familia de serín-treonín fosfatasas de levadura agrupa una gran variedad de enzimas con heterogeneidad de funciones. Aunque sólo las PP2C muestran actividad en rutas mediadas por MAPKs se detalla a continuación una breve reseña de cada una de ellas.

#### 4.1.1 PPPs

La levadura *S. cerevisiae* contiene 12 miembros de la familia de las PPPs: una isoforma de PP1 (Glc7), dos isoformas de PP2A (Pph21 y Pph22), dos isoformas de PP2B (Cnb1 y Cmp1/2), y 7 enzimas adicionales: tres de ellas muy similares a PP1, PP1-*like* (Ppq1/Sal6, Ppz1 y Ppz2), otras tres similares a PP2A, PP2A-*like* (Sit4, Pph3 y Ppg1); y Ppt1, también conocida como PP5-*like* (Stark, 1996).

##### 4.1.1.1 PP1

La proteína Glc7 es la subunidad catalítica de la serín-treonín fosfatasa PP1. Participa en muchos procesos fisiológicos tales como el metabolismo de glucógeno, transcripción, iniciación de la traducción, esporulación, mitosis, homeostasis iónica y organización de la pared celular (Cannon, 2010). Carece por sí sola de especificidad de sustrato; son las subunidades regulatorias las que dirigen a Glc7 hacia ellos. Por ejemplo, las interacciones entre Bud14 y Glc7 son importantes para la formación de la yema y el crecimiento polarizado en respuesta a feromonas (Cullen y Sprague, 2002; Knaus *et al.*, 2005) mientras que el complejo Gac1-Glc7 está involucrado en la activación de la transcripción de genes en respuesta a choque térmico (Williams-Hart *et al.*, 2002).

Las serín-treonín fosfatasas redundantes Ppz1 y Ppz2 regulan el pH y los niveles intracelulares de potasio (Gonzalez *et al.*, 2013); de esta forma, están implicadas en la progresión del ciclo celular, en la tolerancia salina (Posas *et al.*, 1995) y en el mantenimiento de la integridad celular (Yenush *et al.*, 2002). Ambas están relacionadas con la MAPK Sit2 ya que la sobreexpresión de estas fosfatasas suprime el fenotipo lítico de un mutante *slt2Δ* (Ariño, 2002). La fosfatasa Ppq1 presenta similitud estructural con las fosfatasas Ppz1 y Ppz2, y parece estar involucrada en síntesis de proteínas (Chen *et al.*, 1993; Vincent *et al.*, 1994).

#### 4.1.1.2 PP2A

En *S.cerevisiae*, la subunidad catalítica de la PP2A está codificada por los genes *PPH21* y *PPH22* (Sneddon *et al.*, 1990); la estructural o *scaffold* por el gen *TPD3* (van Zyl *et al.*, 1992); y las subunidades regulatorias son Cdc55 (Healy *et al.*, 1991) y Rts1 (Shu *et al.*, 1997). Parece que la función principal del complejo PP2A reside en procesos relacionados con la regulación metabólica (Castermans *et al.*, 2012), progresión del ciclo celular (Gentry y Hallberg, 2002; Jiang, 2006), replicación del DNA, traducción, transcripción y la ruta TOR (Target of rapamycin) (Georis *et al.*, 2011; Garipler y Dunn, 2013; Messier *et al.*, 2013). La delección de *PPH21* y *PPH22* da lugar a un enlentecimiento en el crecimiento, sensibilidad a altas temperaturas, defectos en la pared celular y morfología anormal como consecuencia de una desregulación del citoesqueleto (Ronne *et al.*, 1991; Lin y Arndt, 1995).

Existen además otras tres fosfatasa que se relacionan estructuralmente con el complejo PP2A (PP2A-like phosphatases): Ppg1, Pph3 y Sit4. La fosfatasa Ppg1 actúa a nivel del metabolismo del glucógeno (Posas *et al.*, 1993) interaccionando con Tap42. La fosfatasa Pph3 interviene en el *checkpoint* frente a daño en DNA (O'Neill *et al.*, 2007). La fosfatasa Sit4 actúa en combinación con las proteínas Sap4, Sap155, Sap185 y Sap190 (SAP: *Sit4-associated proteins*) que dotan de actividad a la subunidad catalítica (Luke *et al.*, 1996). Sit4 se encuentra a su vez formando complejos con Tap42 en la regulación de la vía TOR de respuesta a concentración de nutrientes en el medio (Zabrocki *et al.*, 2002). También controla el ciclo celular por medio de la expresión de ciclinas a través del factor de transcripción SBF (Swi4/6) (Jiang, 2006). Además, se encuentra involucrada en la señalización mediada por Pkc1; de esta manera, la fosfatasa Sit4 media la transición G1 a través de varios mecanismos, entre los que destaca la regulación negativa sobre la ruta de integridad celular (Angeles de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002).

#### 4.1.1.3 PP2B

La calcineurina es un heterodímero formado por una subunidad catalítica (Cna1 y Cmp2) y una subunidad regulatoria, Cnb1. Ejerce un importante papel en la respuesta a diferentes formas de estrés y regula principalmente la homeostasis de cationes (Na, Li, Mn) (Cyert, 2003; Casado *et al.*, 2010; Marquina *et al.*, 2012). En condiciones de altas concentraciones de calcio esta proteína desfosforila al factor de transcripción Tcn1/Crz1, lo que causa la activación de la transcripción de genes que promueven la supervivencia celular (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos y Cyert, 1997). Con respecto a la relación de la calcineurina con rutas de MAPKs se ha sugerido que este complejo favorece el proceso de construcción de la pared y actúa en una vía paralela a la ruta de

integridad celular al activar la expresión del gen *FKS2* (Mazur *et al.*, 1995;Zhao *et al.*, 1998). Además, la vía calcineurina-Crz1 regula negativamente la ruta de alta osmolaridad específicamente a través de la rama de Sln1 y no de Sho1 (Shitamukai *et al.*, 2004). Por otro lado, las células de levadura requieren a la calcineurina para mantener la viabilidad en exposiciones prolongadas a feromona (Withee *et al.*, 1997).

#### **4.1.1.4 PP5-like**

La serín-treonín fosfatasa Ppt1 es el homólogo en *S. cerevisiae* de la fosfatasa PP5 de células de mamífero. Presenta una región catalítica C-terminal muy similar a las subunidades catalíticas de las PP1, PP2A y PP2B (Jeong *et al.*, 2003). Actúa como regulador de la chaperona Hsp90 y de la cochaperona Cdc37 (Wandering *et al.*, 2006;Vaughan *et al.*, 2008) y desfosforila a Hsf1 (*Heat shock transcription factor 1*) en respuesta a etanol (Noguchi *et al.*, 2012;Cho *et al.*, 2014).

#### **4.1.2 FCPs**

La proteína Fcp1 se clasifica dentro del grupo de fosfatasas CTD (*C-terminal domain*) al igual que Ssu72, porque desfosforilan el dominio C-terminal de la RNA polimerasa II (Krishnamurthy *et al.*, 2004;Suh *et al.*, 2005). Son por tanto importantes para el proceso de transcripción (Reyes-Reyes y Hampsey, 2007;Zhang *et al.*, 2012) y en la formación de *loops* de DNA necesarios para comenzar un nuevo ciclo de transcripción (Tan-Wong *et al.*, 2012).

#### **4.1.3 PPMs o PP2Cs**

En *S. cerevisiae* existen 5 genes que codifican las clásicas PP2Cs, denominados *PTC1-5* (Stark, 1996). Más tarde se unieron a esta familia los genes *PTC6* (Ruan *et al.*, 2007) y *PTC7* (Jiang *et al.*, 2002). Todas comparten un dominio catalítico típico de las PP2C que puede acompañarse de extensiones amino (Ptc5 y Ptc7) o carboxiterminales (Ptc2 y Ptc3). Sólo Ptc1, Ptc2, Ptc3 y Ptc4 han sido relacionadas con vías de señalización mediadas por MAPKs (Ariño *et al.*, 2011).

## **4.2 Proteín fosfatasas de tirosinas**

Sólo dos proteínas de las tirosín fosfatasas clásicas, Ptp2 y Ptp3, han mostrado actividad sobre MAPKs en levadura, como se detallará más adelante. Se desconocen aún las funciones de Ptp1, la primera tirosín fosfatasa clásica que se clonó (Guan *et al.*, 1991). Fuera del ámbito de las rutas de transducción de señales, se ha estudiado la función que ejercen diversas fosfatasas de tirosinas en la fisiología celular. La tirosín fosfatasa Mih1 es una de las más conocidas.

Desfosforila a la quinasa dependiente de ciclinas (CDK, *Cyclin dependent kinase*) Cdc28 y regula de este modo la transición G2/M del ciclo celular (Sia *et al.*, 1996). Hasta el momento no existe ninguna evidencia que demuestre que Mih1 esté implicada en el control de las rutas de MAPKs. Sin embargo, se ha descrito que tanto Pkc1 como la MAPK Sit2 fosforilan a Mih1 para controlar la progresión del ciclo celular (Harrison *et al.*, 2001;Yano *et al.*, 2013). A pesar de conocerse sus estructuras cristalinas, la función de las tirosín fosfatasas Ych1 y Ltp1 en levadura es todavía desconocida (Wang *et al.*, 2000;Yeo y Lee, 2009).

### **4.3 Proteín fosfatasas de especificidad dual**

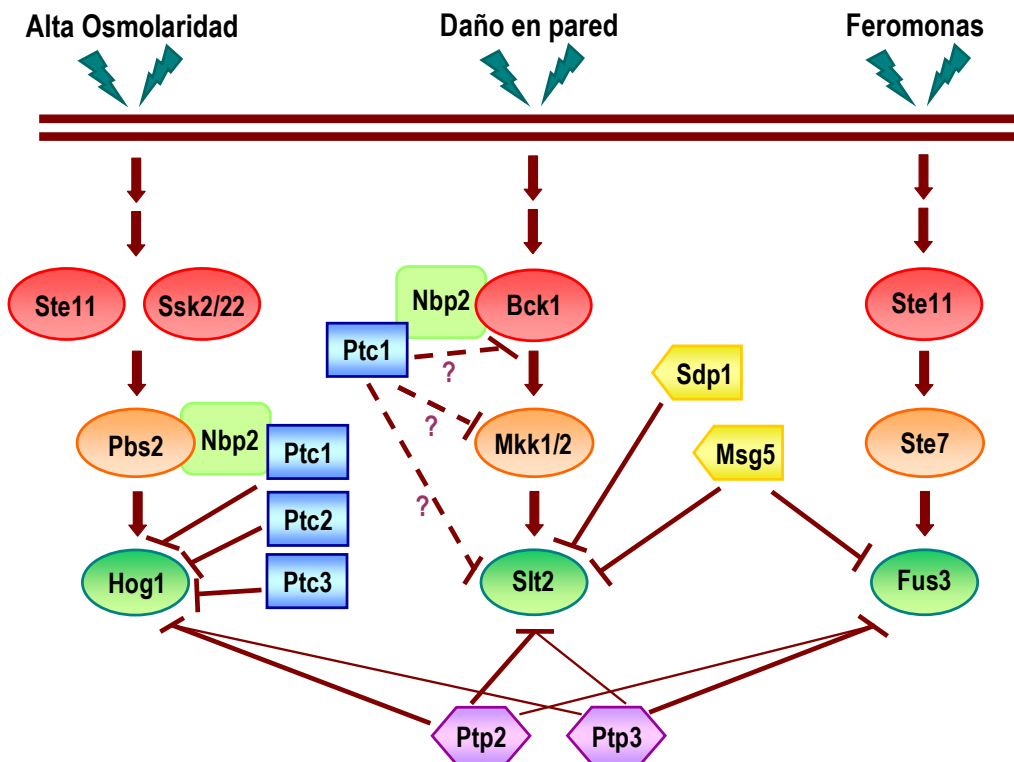
En la levadura *S. cerevisiae* se han descrito tan sólo dos DSPs como reguladores negativos de MAPKs: Msg5 y Sdp1, cuya función se desarrollará en posteriores apartados.

La fosfatasa dual Yvh1 regula, incluso en ausencia de actividad catalítica, el proceso de esporulación a través de la vía de la PKA dependiente de AMPc (Beeser y Cooper, 2000). El mutante *yvh1Δ* presenta defectos en el crecimiento, acumulación de glucógeno (Sugiyama *et al.*, 2011) y es sensible a baja temperatura (Sakumoto *et al.*, 2002). Además, Yvh1 participa en la maduración del ribosoma (Lo *et al.*, 2009;Liu y Chang, 2009) a través de su extremo C-terminal rico en cisteínas que se unen al catión de Zinc (*Zn finger domain*) (Kemmler *et al.*, 2009). Por otro lado, la fosfatasa dual Cdc14 regula activamente eventos de la mitosis (anafase, desensamblaje del huso, citoquinesis) y meiosis (segregación de cromosomas) (Mocciaro y Schiebel, 2010). El gen *PPS1* codifica una proteína que interviene en la síntesis de DNA durante el ciclo celular (Ernsting y Dixon, 1997). Por su parte, Tep1 es el ortólogo de la proteína supresora de tumores PTEN en *S.cerevisiae*; su función es aún desconocida pero podría estar relacionada con el proceso de esporulación (Heymont *et al.*, 2000).

La familia de las OCAs (*Oxidant induced cell cycle arrest*) incluye fosfatasas duales relacionadas con el grupo PFA-DSPs anteriormente mencionado (Roma-Mateo *et al.*, 2011). Los mutantes sencillos son sensibles a cafeína y rapamicina (Parsons *et al.*, 2004;Dudley *et al.*, 2005;Roma-Mateo *et al.*, 2011) por lo que se les relaciona con rutas de MAPKs y la ruta TOR. El mutante *oca6Δ* es sensible además a tunicamicina y DTT (Tan *et al.*, 2009). Oca1 está involucrada en la parada de ciclo celular frente a estrés oxidativo (Alic *et al.*, 2001) mientras que la fosfatasa Oca3/Siw14 ejerce un papel importante en la organización de los filamentos de actina y endocitosis en respuesta a carencia nutricional (Care *et al.*, 2004;Hirasaki *et al.*, 2010).

## 5. REGULACIÓN NEGATIVA DE LAS RUTAS DE MAPKs POR PROTEÍN FOSFATASAS EN *Saccharomyces cerevisiae*

Estudios bioquímicos y genéticos en la levadura modelo *S. cerevisiae* han permitido ampliar el conocimiento de los aspectos claves de la regulación negativa sobre MAPKs, ya que existe una notable conservación de los componentes y de los mecanismos moleculares que participan en el proceso (Martin *et al.*, 2005). En la figura 10 se representa la regulación negativa de las rutas de alta osmolaridad, apareamiento e integridad celular por serín-treonín fosfatasa, tirosín fosfatasa y fosfatasa de especificidad dual.



**Figura 10:** Esquema de la regulación negativa de las rutas de alta osmolaridad, integridad celular y apareamiento por proteínas fosfatasa. Las serín-treonín fosfatasa se muestran en color azul, las tirosín fosfatasa en color morado y las fosfatasa de especificidad dual en amarillo. Las líneas más gruesas indican un papel principal como regulador negativo.

## **5.1 Proteín fosfatasas de serinas y treoninas que actúan en rutas de MAPKs**

### **5.1.1 Ptc1**

Dentro de la familia PP2C, la proteín fosfatasa Ptc1 es, con diferencia, la mejor caracterizada. A pesar de que comparte algunas de sus funciones con otros miembros, el perfil transcripcional del mutante *ptc1Δ* reveló una marcada diferencia con respecto a los perfiles de los mutantes *ptc2Δ*, *ptc3Δ*, *ptc4Δ* y *ptc5Δ* (Gonzalez *et al.*, 2006). Este hecho refuerza la idea de que Ptc1 realiza funciones celulares específicas y propias en las que no está involucrado ningún otro miembro de la misma familia.

Estudios globales de interacción entre proteínas en *S. cerevisiae* utilizando el sistema de dos híbridos identificaron a Nbp2 (*Nap-1 binding protein*) como una proteína de unión a Ptc1 (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Hruby *et al.*, 2011). La fosfatasa Ptc1 necesita a la proteína adaptadora Nbp2 para realizar la mayoría de sus funciones. De hecho, la delección de *NBP2* ocasiona defectos propios de un mutante *ptc1Δ* (Roeder *et al.*, 1998; Ohkuni *et al.*, 2003; Du *et al.*, 2006; Jin *et al.*, 2009). Nbp2 contiene en su extremo C-terminal un dominio SH3 (*Src homology 3*), que se une a motivos ricos en prolina presentes en otras proteínas. El dominio SH3 se compone de una superficie hidrofóbica formada por tres bolsillos definidos por un residuo aromático conservado, en concreto un triptófano (Mayer, 2001). Los dominios SH3 son capaces de unir dos tipos de secuencias consenso ricas en prolinas: [R/K]xXPxXP y XPxXPx[R/K], siendo X cualquier aminoácido hidrofóbico distinto de glicina (Kaneko *et al.*, 2008). Por otro lado, en el extremo N-terminal de Nbp2 residen residuos claves para la interacción con Ptc1 (Mapes y Ota, 2004); en concreto se han identificado los pares de residuos K<sup>62</sup>D<sup>63</sup> y H<sup>73</sup>Y<sup>74</sup> (Stanger *et al.*, 2012).

#### **5.1.1.1 Ptc1 en la ruta de alta osmolaridad**

*PTC1* se identificó por primera vez como una serín-treonín fosfatasa en 1993 cuando su delección exacerbó el fenotipo de un mutante *ptp2Δ*, carente de una proteín tirosín fosfatasa (Maeda *et al.*, 1993). Un año después se determinó la actividad reguladora de Ptc1 sobre la vía HOG ya que su sobreexpresión suprimió la letalidad de un mutante *sln1Δ* (Maeda *et al.*, 1994). Esta proteín fosfatasa tiene un papel importante en el mantenimiento de los niveles basales de activación de Hog1 en ausencia de estimulación e inactiva esta MAPK durante la respuesta a estrés osmótico. La delección de *PTC1* genera un significativo retraso en la activación de Hog1 ya que el mantenimiento de sus niveles basales de activación resulta imprescindible para que se produzca

la rápida inducción tras la llegada del estímulo (Warmka *et al.*, 2001). Ptc1 desfosforila a Hog1 gracias a la unión de su proteína adaptadora Nbp2 a una zona rica en prolinas de la MAPKK de esta ruta, Pbs2 (Mapes y Ota, 2004).

### 5.1.1.2 Ptc1 en la ruta de integridad celular

La fosfatasa Ptc1 presenta una relación genética con la ruta de integridad celular ya que la delección de *PTC1* en combinación con la mutación de *SLT2*, *FKS1* o *GAS1* es letal (Huang y Symington, 1995). Se ha descrito que en ciertos fondos genéticos, el doble mutante *ptc1Δslt2Δ* es viable, pero extremadamente sensible a agentes que alteran la pared celular (Gonzalez *et al.*, 2006). El mutante sencillo *ptc1Δ* presenta elevados niveles de Slit2 fosforilado y es sensible a altas temperaturas (Ohkuni *et al.*, 2003), blanco de calcoflúor (Ram *et al.*, 1994), caspofungina (Markovich *et al.*, 2004), cafeína (Giaever *et al.*, 2002) y pH alcalino (Serrano *et al.*, 2006). Además, estudios sobre el perfil transcripcional de un mutante *ptc1Δ* revelaron que estas células presentan un patrón característico de cepas que sufren algún daño en pared celular, en el que la expresión de *CRH1*, *SED1* o *YKL161C*, entre otros, se encuentra incrementada con respecto a una célula silvestre (Gonzalez *et al.*, 2006).

Estudios realizados en nuestro laboratorio y por otros grupos muestran que Ptc1 regula la ruta de integridad celular a través de su interacción con Bck1 mediada por Nbp2 (Palacios, 2010; Hruby *et al.*, 2011; Stanger *et al.*, 2012). Los residuos Y<sup>119</sup> y F<sup>165</sup> del dominio SH3 de Nbp2 son importantes para su interacción con el motivo rico en prolinas P<sup>809</sup>XXP<sup>812</sup> de Bck1. De hecho, la sustitución de dichos aminoácidos por alanina conduce a una elevada fosforilación basal de Slit2, similar a la que presentan los mutantes sencillos *ptc1Δ* o *nbp2Δ*, y a un incremento en la sensibilidad que presentan estos mutantes frente a un estrés sobre la pared celular (Stanger *et al.*, 2012). Sin embargo, el sustrato al que Ptc1 desfosforila en la ruta de integridad celular todavía se desconoce.

### 5.1.1.3 Ptc1 en la ruta de apareamiento

Ptc1 también ejerce una función sobre la ruta de apareamiento. En condiciones basales de activación, la MAPK Fus3 y la proteína *scaffold* Ste5 se encuentran formando un complejo. En un proceso dependiente de las concentraciones extracelulares de feromona se induce el reclutamiento de Ptc1 a Ste5 y, por tanto, a la membrana; entonces esta PP2C desfosforila a Ste5 con la consiguiente liberación de Fus3 del complejo y la activación de la transcripción de genes que promueven la formación de *shmoo*s (Malleshaiah *et al.*, 2010). Probablemente, la unión de Nbp2 a través de su dominio SH3 al dominio rico en prolinas de Ste20 sea clave para la

desfosforilación de Ste5 (Hruby *et al.*, 2011). Se trata por tanto de un mecanismo novedoso en el que, a diferencia de lo estudiado hasta ahora, Ptc1 desempeña funciones de regulación positiva sobre las vías de señalización y no sólo negativa como se había descrito hasta el momento.

#### 5.1.1.4 Otras funciones de Ptc1

Además de su acción sobre rutas de MAPKs, Ptc1 es también necesaria para el correcto funcionamiento de otras vías de señalización, como la vía TOR (*Target of rapamycin*) que regula el crecimiento celular en respuesta a la cantidad de nutrientes presentes en el medio extracelular (Kuranda *et al.*, 2006;Gonzalez *et al.*, 2009). Asimismo, Ptc1 parece estar implicada en el proceso de *splicing* de los tRNAs (Robinson *et al.*, 1994), en la herencia vacuolar (Jin *et al.*, 2009), mitocondrial (Roeder *et al.*, 1998;Frederick y Shaw, 2007;Swayne *et al.*, 2011) y del retículo endoplásmico, ya que un mutante *ptc1Δ* presenta un retraso tanto en el transporte mitocondrial como en el transporte de túbulos del retículo endoplasmático y vacuolas hacia la punta de la yema en fases tempranas del ciclo celular (Du *et al.*, 2006). Por otra parte, esta fosfatasa está involucrada en la tolerancia al catión litio, ya que la delección de *PTC1* produce sensibilidad a dicho catión (Ruiz *et al.*, 2006). Además, diversos autores relacionan a Ptc1 con la función vacuolar. El mutante *ptc1Δ* presenta fragmentación vacuolar y la sobreexpresión de *VPS73*, una proteína implicada en la selección de proteínas dirigidas a vacuola, rescata una gran variedad de diferentes fenotipos de un mutante *ptc1Δ* como la sensibilidad a agentes que alteran la pared celular, pH alcalino o altos niveles de calcio (Gonzalez *et al.*, 2006).

### 5.1.2 Ptc2, Ptc3 y Ptc4

#### 5.1.2.1 Ptc2, Ptc3 y Ptc4 en la ruta de alta osmolaridad

Las fosfatasas Ptc2 y Ptc3 tienen cierta relevancia sobre la ruta de alta osmolaridad. Estas dos enzimas son idénticas en un 75% y tienen funciones similares que difieren de las realizadas por Ptc1, quizá por la presencia en estas dos proteínas de un dominio no catalítico en la región C-terminal de unos 170 aminoácidos, ausente en Ptc1. Ni Ptc2 ni Ptc3 interaccionan con la proteína adaptadora Nbp2 (Mapes y Ota, 2004).

Al igual que *PTC1*, *PTC2* y *PTC3* se identificaron como supresores en multicopia de la letalidad de un mutante *sln1Δ*, que presenta una hiperactivación de la cascada de Hog1 (Warmka *et al.*, 2001). La delección individual de *PTC2* o *PTC3* no afecta a la actividad de Hog1; sin embargo, el doble mutante presenta una hiperactivación de esta MAPK bajo condiciones de estrés osmótico. Estas dos fosfatasas actúan más bien regulando los niveles máximos de activación de Hog1

mientras que Ptc1 actúa sobre los niveles basales. La localización nuclear y citoplasmática de Ptc2 y Ptc3 permanece inalterada en condiciones de activación de la ruta (Young *et al.*, 2002). En el análisis transcriptómico de los mutantes *ptc2Δ* y *ptc3Δ* se observó que, a pesar de su similitud estructural, el perfil transcripcional de un mutante *ptc3Δ* se asemeja más al de los mutantes *ptc4Δ* y *ptc5Δ* (Gonzalez *et al.*, 2006).

La proteína fosfatasa Ptc4 se localiza en el citoplasma y también podría regular negativamente la ruta de alta osmolaridad. La sobreexpresión de *PTC4*, al igual que ocurre con la sobreexpresión individual de *PTC1*, *PTC2* o *PTC3*, rescata la letalidad del doble mutante *cnb1Δslt2Δ* al reducir la fosforilación de Hog1 (Shitamukai *et al.*, 2004).

Asimismo se han descrito otras funciones distintas de la regulación de vías de MAPKs para estas fosfatasas; así, Ptc2 y Ptc3 actúan como reguladores negativos de Rad53 y, por tanto, se encuentran implicadas en la modulación de la respuesta frente a un daño en el DNA (Marsolier *et al.*, 2000; Leroy *et al.*, 2003). Por otro lado, participan en la regulación del ciclo celular puesto que son capaces de desfosforilar a Cdc28, la principal quinasa dependiente de ciclinas (CDK) de levaduras (Cheng *et al.*, 1999).

## **5.2 Proteín fosfatasas de tirosinas de MAPKs**

Sólo dos proteínas pertenecientes a las tirosín fosfatasas clásicas, Ptp2 y Ptp3, han mostrado actividad sobre MAPKs en levadura. Al igual que ocurre con las PTPs de humanos, son capaces de regular la actividad de las MAPKs de tipo p38 (Hog1) o de tipo ERK (Fus3 y Slt2), mostrando distinta afinidad por cada una de ellas. Así, Ptp2 regula principalmente las MAPKs Hog1 y Slt2, mientras que Ptp3 manifiesta mayor actividad sobre Fus3 (Martin *et al.*, 2005).

### **5.2.1 Ptp2 y Ptp3**

#### **5.2.1.1 Ptp2 y Ptp3 en la ruta de alta osmolaridad**

Los genes *PTP2* y *PTP3* se aislaron como supresores en multicopia de la letalidad de un mutante *sln1Δ*, que conduce a la hiperactivación de la ruta de alta osmolaridad (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). Ambas fosfatasas regulan la actividad de la MAPK Hog1 en condiciones basales, siendo Ptp2 la que ejerce un papel más relevante en el mantenimiento de un bajo nivel basal de fosforilación de Hog1. De hecho, la delección de *PTP2*, pero no la de *PTP3*, conduce a un incremento en la fosforilación constitutiva de Hog1 incluso en ausencia de alta osmolaridad.

Tanto Ptp2 como Ptp3 participan también en el proceso de adaptación de esta ruta ya que sus niveles de expresión aumentan de forma dependiente de Hog1 en respuesta a estrés osmótico (Jacoby *et al.*, 1997; Proft *et al.*, 2005).

Las diferencias en la afinidad y localización de ambas fosfatasa podrían explicar su distinta actividad. Ptp2 se localiza en el núcleo mientras que Ptp3 es una proteína citoplasmática. Ya que Hog1 se acumula en el núcleo tras su activación (Ferrigno *et al.*, 1998), la localización nuclear de Ptp2 podría favorecer su mayor actuación sobre esta MAPK. Además de regular la actividad de Hog1, Ptp2 y Ptp3 determinan su localización subcelular al actuar como puntos de anclaje, secuestrándola en el núcleo o citoplasma, respectivamente (Mattison y Ota, 2000). Se ha descrito que Ptp2 interacciona con Hog1 a través del motivo *Common Docking* presente en la MAPK (Murakami *et al.*, 2008).

La MAPK Hog1 se activa no sólo frente a un estrés osmótico sino también en situaciones de estrés térmico (Winkler *et al.*, 2002). Este último efecto es dependiente del osmosensor Sho1. La falta de Ptp2 y Ptp3 ocasiona hiperactivación de Hog1 y, como consecuencia, letalidad ante elevadas temperaturas. Por el contrario, el mismo doble mutante no desarrolla un fenotipo letal bajo condiciones de estrés osmótico. Se ha sugerido que estas dos proteínas fosfatasa bloquean el inapropiado entrecruzamiento de señales entre las rutas de alta osmolaridad y de integridad celular, contribuyendo de esta forma a la especificidad de señalización. Así, la expresión del alelo hiperactivo de la MAPKK que opera en la ruta de integridad celular *MKK1<sup>386</sup>* es letal de manera dependiente de Hog1 sólo en ausencia de Ptp2 y Ptp3. De esta forma la delección conjunta de *PTP2* y *PTP3* deja a la MAPK Hog1 susceptible de ser activada por otras rutas a través de un entrecruzamiento erróneo.

### 5.2.1.2 Ptp2 y Ptp3 en la ruta de apareamiento

Se ha definido claramente que la función que ejerce Ptp3 es más importante que la de Ptp2 sobre la ruta de apareamiento (Zhan *et al.*, 1997). La MAPK Fus3 no está constitutivamente fosforilada en un mutante *ptp2Δ*; mientras que la ausencia de Ptp3, sola o en combinación con la de Ptp2, induce la fosforilación de Fus3 tanto en condiciones basales como tras la estimulación con feromona. Estos datos indican que la proteína fosfatasa Ptp3 es crucial tanto en el mantenimiento de la actividad basal de Fus3 como en el proceso de adaptación y recuperación tras estimulación de la ruta.

En cuanto a su interacción, la región aminoterminal de Ptp3 es la encargada de su interacción con la MAPK Fus3 a través de un motivo dentro del dominio CH2, característico de las MKPs de

mamíferos y ausente en Ptp2, y un dominio KIM adyacente. La ausencia o mutación de cualquiera de estos dos motivos impide que Ptp3 desfosforile a Fus3, no por falta de actividad, sino por la imposibilidad de unirse a ella. Además, el residuo de aspártico (D<sup>317</sup>) conservado en el *Common Docking* de Fus3 es clave para su unión a Ptp3 (Zhan y Guan, 1999).

### 5.2.1.3 Ptp2 y Ptp3 en la ruta de integridad celular

En cuanto a la ruta de integridad celular, tanto Ptp2 como Ptp3 participan en el mantenimiento de los niveles basales de Slt2 ya que el doble mutante *ptp2Δptp3Δ*, y no los mutantes sencillos, presenta elevados niveles basales de Slt2 fosforilado. Por otro lado, intervienen también en condiciones de activación de la MAPK ya que tanto el doble mutante como los individuales muestran mayores niveles de fosfo-Slt2 que la cepa silvestre tras recibir un choque térmico (Mattison *et al.*, 1999). Sin embargo, la proteína fosfatasa Ptp2 parece desempeñar un papel más destacado que el de Ptp3. Varios hechos podrían explicar las diferencias en la actividad de estas fosfatasas frente a Slt2. Tanto la localización nuclear de Ptp2 como la mayor afinidad de unión a Slt2 favorecen la desfosforilación de esta MAPK. Por otra parte, la transcripción de *PTP2*, bajo el control de Rlm1, se ve aumentada tras la exposición a altas temperaturas. Por tanto, Ptp2 forma parte de un mecanismo de retroalimentación negativo con el fin de controlar los niveles de activación de la MAPK Slt2 frente a un choque térmico. Así se ha observado que la expresión en multicopia de *PTP2*, pero no de *PTP3*, suprime los defectos en el crecimiento que provoca la expresión de los alelos hiperactivos de Bck1-20 y Mkk1<sup>S386P</sup>. De acuerdo con esto, tan sólo la delección de *PTP2* agrava el fenotipo causado por el alelo hiperactivo de Mkk1. Sin embargo, la expresión de *MKK1<sup>S386P</sup>* es letal en un doble mutante *ptp2Δptp3Δ* pero no en los sencillos, lo cual pone de manifiesto la participación de Ptp3 en esta regulación (Mattison *et al.*, 1999).

## 5.3 Proteínas fosfatasas de especificidad dual de MAPKs

### 5.3.1 Msg5

Esta fosfatasa de especificidad dual se produce en la célula como dos isoformas de distinto peso molecular debido a la presencia de dos comienzos de traducción alternativos de su mRNA. La isoforma más larga posee 45 aminoácidos en la región aminoterminal de la proteína que la isoforma corta no posee (Flandez *et al.*, 2004). Los estudios realizados sobre ella han demostrado que esta fosfatasa interviene en las rutas de apareamiento e integridad celular regulando negativamente a las correspondientes MAPKs, Fus3 y Slt2. Sin embargo, existen

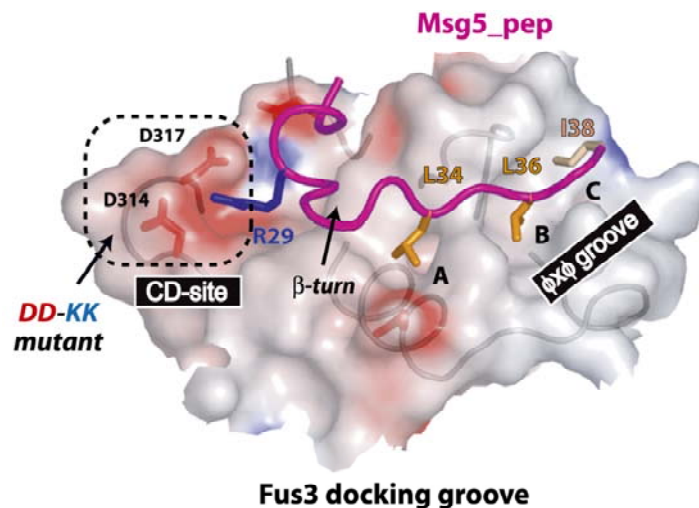
evidencias de que no lo hace sobre la ruta de alta osmolaridad. La sobreexpresión de *MSG5* no suprime la letalidad de un mutante *sln1Δ* producida por una activación constitutiva de la ruta (Watanabe *et al.*, 1995). Además, un doble mutante *msg5Δptp2Δ* no muestra diferencias en la fosforilación de Hog1 con respecto al mutante sencillo *ptp2Δ*, y el doble mutante *msg5Δsdp1Δ* exhibe similares niveles de Hog1 fosforilado que los de una cepa silvestre (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997). Por tanto, parece que *Msg5* actúa únicamente sobre MAPKs de tipo ERK.

### 5.3.1.1 *Msg5* en la ruta de apareamiento

El gen *MSG5* se aisló por primera vez como supresor en multicopia de la letalidad de un mutante *gpa1Δ*, de ahí su nombre (*Multicopy Supresor of Gpa1*). Al carecer de la subunidad  $\alpha$  de la proteína G acoplada al receptor de feromonas, las subunidades  $\beta\gamma$  libres ocasionan una activación constitutiva de la ruta de apareamiento que conduce a la muerte celular. El análisis de su secuencia reveló que *MSG5* codificaba una proteína fosfatasa de 489 aminoácidos con un motivo HC(X)<sub>5</sub>R, característico de las PTPs, en el que el residuo de cisteína en la posición 319 es esencial para su actividad catalítica. Como otras MKPs, *Msg5* mostró actividad fosfatasa *in vitro* sobre pNPP (*para-nitrophenyl phosphate*) y en concreto sobre la MAPK Fus3 (Doi *et al.*, 1994).

En condiciones de estimulación por feromona, la sobreexpresión de *MSG5* reduce la activación transcripcional regulada por el factor de transcripción Ste12 y acelera la reanudación del crecimiento tras la parada de ciclo celular ocasionada por la presencia de ese estímulo (Doi *et al.*, 1994). Además, la transcripción de *MSG5* aumenta en respuesta a factor  $\alpha$ . Todo ello indica que la función de *Msg5* es intervenir en el proceso de recuperación tras estimulación con feromona a través de una desfosforilación de la MAPK Fus3 (Doi *et al.*, 1994). Posteriormente se ha descrito que *Msg5* también regula los niveles de Fus3 en condiciones basales, ya que un mutante *msg5Δ* presenta una morfología alargada típica de *shmoos*, altos niveles de Fus3 fosforilada que dan lugar a un incremento en la expresión de, entre otros, los genes *FUS1* y *FIG1* como consecuencia de una activación constitutiva de la ruta (Flandez *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2009). Se ha observado a la proteína fosfatasa *Msg5* tanto en núcleo como en citoplasma y parece que es requerida para una correcta localización de la MAPK Fus3 ya que su sobreexpresión provoca una disminución de la acumulación de esta MAPK fosforilada en el núcleo en condiciones de estimulación con feromona, mientras que el mutante *msg5Δ* muestra elevados niveles basales de Fus3 activa en el núcleo con respecto a la cepa silvestre (Blackwell *et al.*, 2003).

Por tanto, Msg5 participa junto con las tirosín fosfatasas Ptp2 y Ptp3 en la inactivación de Fus3 por lo que la delección conjunta de *MSG5*, *PTP2* y *PTP3* tiene un efecto sinérgico importante en el proceso de adaptación y sensibilidad a feromona (Zhan *et al.*, 1997). Se demuestra así la existencia de una regulación coordinada de la función de una MAPK, Fus3, a través de la acción de dos tirosín fosfatasas y una fosfatasa de especificidad dual.



**Figura 11: Estructura de Fus3 en complejo con el motivo D de Msg5.** Se muestran dos regiones principales de interacción: una zona hidrofóbica descrita como  $\phi\chi\phi$  groove y la región acídica, conocida como motivo CD que se une a los residuos básicos del dominio D. Imagen tomada de Remenyi *et al.*, (2005).

Existen evidencias genéticas que relacionan a Msg5 con la MAPK Kss1. Por ejemplo, la sobreexpresión de *MSG5* suprime la osmosensibilidad mostrada por mutantes *pbs2-3*, en los cuales la transmisión de la ruta de alta osmolaridad se encuentra afectada pero presenta un incremento en la fosforilación y actividad de Kss1 en respuesta a choque osmótico. En esta situación, Msg5 suprime la osmosensibilidad al reducir la activación de Kss1 (Davenport *et al.*, 1999). Asimismo, la sobreexpresión de esta MKP disminuye la elevada fosforilación que presenta Kss1 en un mutante *itc1Δ* (Marin *et al.*, 2009). Sin embargo, aunque se ha demostrado que Msg5 y Kss1 interactúan, parece que en condiciones fisiológicas esta fosfatasa no tiene un efecto claro sobre la fosforilación de Kss1, ya que ésta no se modifica en un mutante *msg5Δ* ni en condiciones basales ni de estimulación de la ruta de pseudofilamentación (Marin *et al.*, 2009).

Al igual que las MKPs de mamíferos, Msg5 posee en su extremo N-terminal un motivo D o KIM, con un único residuo básico de arginina en lugar de dos (LQNRNTKNLSLDI), que se une al

motivo CD de la MAPKs Fus3 y Kss1, estableciendo de esta forma una interacción canónica entre MKP y MAPK (Figura 11) (Remenyi *et al.*, 2005;Marin, 2009).

### 5.3.1.2 Msg5 en la ruta de integridad celular

La DSP Msg5 es, hasta el momento, la proteína fosfatasa más importante implicada en la regulación de la ruta de integridad celular ya que controla los niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 tanto en condiciones basales como en condiciones de estimulación de la ruta (Andersson *et al.*, 2004;Flandez *et al.*, 2004). La primera evidencia que sugirió la existencia de una regulación negativa de Msg5 sobre la MAPK Slt2 apareció en 1995, cuando la sobreexpresión de esta fosfatasa suprimió la inhibición del crecimiento ocasionada por la sobreexpresión de un alelo hiperactivo de la MAPKK Mkk1 (*MKK1<sup>386</sup>*) (Watanabe *et al.*, 1995). Más tarde, se observó que la delección de *MSG5* se traduce en un incremento de los niveles de fosfo-Slt2 en condiciones basales y tras choque térmico (Martin *et al.*, 2000;Harrison *et al.*, 2004) y que Msg5 es capaz de interaccionar y desfosforilar directamente a Slt2 *in vitro* e *in vivo* (Flandez *et al.*, 2004). De acuerdo con esto, los mutantes *msg5Δ* presentan cierto aumento en la expresión de genes dependientes de esta ruta, como *FKS2*, *SLT2* o *MLP1*, y un fenotipo de sensibilidad a rojo Congo (Flandez *et al.*, 2004;Marin *et al.*, 2009). Sin embargo, existe una falta de correlación entre los altos niveles de fosforilación de la MAPK Slt2 y la escasa inducción transcripcional dependiente de Rim1, lo que sugiere que el aumento de fosforilación provocado por la ausencia de Msg5 no es suficiente para la activación completa de la MAPK Slt2 (Marin *et al.*, 2009).

En cuanto a la interacción de Msg5 con Slt2, se ha descrito que lo hace a través de su región regulatoria N-terminal (Flandez *et al.*, 2004) y que ambas isoformas son capaces de unirse a Slt2 (Marin *et al.*, 2009). Sin embargo, de forma previa a este trabajo se desconocían los mecanismos moleculares implicados en esta unión.

A diferencia de lo que ocurre en la ruta de apareamiento, los niveles de transcripción de *MSG5* no aumentan tras la estimulación de la ruta de integridad celular (Jung *et al.*, 1999). Se ha descrito incluso un ligero descenso en la cantidad de mRNA (Hahn y Thiele, 2002) o proteína (Flandez *et al.*, 2004) tras choque térmico. De hecho, la ruta de integridad celular no presenta fenómeno de adaptación, de manera que se mantienen altos niveles de Slt2 fosforilado horas después del inicio de la exposición al estímulo. A pesar de la falta de regulación transcripcional de Msg5 en la ruta de integridad celular, Slt2 contribuye a la regulación postraduccional de Msg5. Las dos isoformas de esta fosfatasa son fosforiladas por Slt2 tras la activación de la ruta de integridad celular en presencia de alta temperatura o blanco de calcoflúor. Ésta es la primera

descripción de la existencia en levadura de una regulación recíproca entre una MAPK y su MKP (Flandez *et al.*, 2004).

### **5.3.2 Sdp1**

#### **5.3.2.1 Sdp1 en la ruta de integridad celular**

Sdp1 (*Stress-inducible dual specificity phosphatase*) es una pequeña proteína fosfatasa de 209 aminoácidos que mostró interacción con la MAPK Slt2 en un ensayo de dos híbridos a gran escala (Uetz *et al.*, 2000). Su secuencia contiene el dominio conservado del sitio activo de las PTPs pero carece del dominio aminoterminal regulatorio característico de las MKPs. El residuo de cisteína en la posición 140 es esencial para su actividad catalítica frente a pNPP (Collister *et al.*, 2002).

La función de Sdp1 se desarrolla exclusivamente sobre la ruta de integridad celular. Interacciona específicamente y desfosforila a Slt2 tanto *in vivo* como *in vitro* mientras que no lo hace con el resto de MAPKs (Collister *et al.*, 2002; Hahn y Thiele, 2002). Su delección agrava los defectos en el crecimiento ocasionados por la sobreexpresión del alelo hiperactivo *MKK1<sup>386</sup>* mientras que la sobreexpresión de *SDP1* los suprime (Hahn y Thiele, 2002). Los niveles de Slt2 fosforilado detectados tras choque térmico son ligeramente superiores en el mutante *sdp1Δ* que en la cepa silvestre (Hahn y Thiele, 2002; Kuravi *et al.*, 2011). Por el contrario, no parece que Sdp1 sea importante para la regulación de la ruta de integridad celular en condiciones basales.

Los niveles de expresión de Sdp1 se incrementan bajo condiciones que activan la ruta de integridad celular (estrés oxidativo, osmótico, térmico). Sin embargo, la expresión de Sdp1 está mediada por través del factor de transcripción Msn2/4, que es un regulador de la expresión de genes en condiciones de estrés y es independiente de Rim1 (Hahn y Thiele, 2002).

La localización de Sdp1 en fusión a GFP es nuclear y citoplasmática en condiciones normales de crecimiento (Hahn y Thiele, 2002). Tras choque térmico se acumula en puntos distribuidos por toda la célula, que colocalizan con las mitocondrias (Kuravi *et al.*, 2011).

Sdp1 es la primera fosfatasa basada en cisteína que se ha visto que se inactiva por agentes reductores (DTT) y que aumenta su actividad enzimática en condiciones de estrés oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) debido a la formación de un puente disulfuro intramolecular entre dos residuos de cisteína (Cys<sup>47</sup>-Cys<sup>142</sup>), en el que no está involucrado el residuo catalítico de cisteína (Cys<sup>140</sup>) (Fox *et al.*, 2007). Parece que este mecanismo de regulación pudiera estar conservado en MKPs de levaduras y tener importancia fisiológica en la adaptación a este tipo de estrés; de hecho Msg5

también forma un puente disulfuro en presencia de agentes oxidantes (Cys<sup>80</sup>-Cys<sup>321</sup>) que incrementa su actividad catalítica.



# Antecedentes y Objetivos

---



Dada la relevancia de las rutas de señalización mediadas por MAPKs en el desarrollo de múltiples funciones biológicas y que su desregulación está asociada a la aparición de diversas enfermedades nuestro Departamento ha establecido en los últimos años una línea de investigación basada en el estudio de la regulación negativa que ejercen las proteínas fosfatasa sobre las rutas de MAPKs en el organismo modelo *Saccharomyces cerevisiae*.

Previamente a la realización de esta tesis doctoral se abordó el estudio de la serín-treonín fosfatasa Ptc1 y la fosfatasa de especificidad dual Msg5. La MKP Msg5 es un regulador negativo de las rutas de apareamiento e integridad celular. Entre los hallazgos más relevantes se descubrió que esta fosfatasa se expresa en la célula como dos isoformas de distinto peso molecular que son fosforiladas por Sit2 tras la estimulación de la ruta. A pesar de que resultados previos indicaron que Msg5 es capaz de interactuar con Kss1 y Fus3 a través del dominio D de la MKP y del dominio CD de las MAPKs se desconocía el mecanismo que media la unión con la MAPK Sit2 y la pseudoquinasa Mlp1. Con respecto a Ptc1, experimentos anteriores a la realización del trabajo presentado en esta memoria mostraron que esta fosfatasa se une a Bck1, la MAPKKK de la ruta de integridad celular, a través de la proteína adaptadora Nbp2. Sin embargo, la diana funcional de Ptc1 en esta ruta de señalización era aún desconocida.

Con el fin de ampliar el conocimiento sobre el papel que ejercen las proteínas fosfatasas en la regulación negativa de la señalización mediada por MAPKs así como profundizar en la función de las MKPs Msg5 y Sdp1 y de la PP2C Ptc1 en la ruta de integridad celular, nos planteamos los siguientes objetivos:

1. Analizar la regulación negativa que desempeñan las MKPs Msg5 y Sdp1 sobre la ruta de integridad celular.
  - 1a. Identificar los determinantes moleculares de la interacción de la MAPK Sit2 y la pseudoquinasa Mlp1 con las MKPs Msg5 y Sdp1 e investigar su relevancia funcional.
  - 1b. Determinar los residuos que Sit2 fosforila en Msg5 tras activación de la ruta de integridad celular y establecer su posible función biológica.
2. Buscar nuevos reguladores negativos de las rutas de apareamiento e integridad celular.
3. Conocer la diana funcional de la PP2C Ptc1 en la ruta de integridad celular.



# Materiales y Métodos

---



# 1. MICROORGANISMOS EMPLEADOS

## 1.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Las cepas de levadura utilizadas en el transcurso de este trabajo se detallan en la Tabla II.

**Tabla II. Cepas de *S. cerevisiae* empleadas.**

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
BY4741	MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0	Euroscarf
Y03520	Isogénica BY4741; nbp2Δ::KanMX4	Euroscarf
Y00956	Isogénica BY4741; ste20Δ::KanMX4	Euroscarf
Y07373	Isogénica BY474; msg5Δ::KanMX4	Euroscarf
Y02272	Isogénica BY474; sdp1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y03702	Isogénica BY4741; ptc1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y07269	Isogénica BY4741; ptc2Δ::KanMX4	Euroscarf
Y07163	Isogénica BY4741; ptc4Δ::KanMX4	Euroscarf
Y05492	Isogénica BY4741; ltp1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y00612	Isogénica BY4741; mih1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y03927	Isogénica BY4741; ptp1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y02464	Isogénica BY4741; ptp2Δ::KanMX4	Euroscarf
Y04791	Isogénica BY4741; rts3Δ::KanMX4	Euroscarf
Y01325	Isogénica BY4741; sap185Δ::KanMX4	Euroscarf
Y04753	Isogénica BY4741; ppt1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y02073	Isogénica BY4741; ppq1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y05040	Isogénica BY4741; cnb1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y05961	Isogénica BY4741; yvh1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y01498	Isogénica BY4741; psr1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y03886	Isogénica BY4741; pph22Δ::KanMX4	Euroscarf
Y02948	Isogénica BY4741; tep1Δ::KanMX4	Euroscarf
Y07211	Isogénica BY4741; oca2Δ::KanMX4	Euroscarf
Y04002	Isogénica BY4741; oca6Δ::KanMX4	Euroscarf

Y04858	Isogénica BY4741; <i>mrt4Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y00897	Isogénica BY4741; <i>gas1Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y01328	Isogénica BY4741; <i>bck1Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y02487	Isogénica BY4741; <i>mkk1Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
Y02112	Isogénica BY4741; <i>mkk2Δ::KanMX4</i>	Euroscarf
YPL14	Isogénica BY4741; <i>mkk1Δ::KanMX4 ptc1::HIS3</i>	Dra. Lorena Palacios
YPL15	Isogénica BY4741; <i>mkk2Δ::KanMX4 ptc1::HIS3</i>	Dra. Lorena Palacios
<i>pkc1Δ</i>	Isogénica BY4741; <i>pkc1Δ::HIS3</i>	Dra. Patricia Arias
CML128	MATa <i>leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1<sup>r</sup></i>	Dra. MA. de la Torre-Ruiz
MML344	Isogénica CML128; <i>pkc1Δ::LEU2</i>	Dra. MA. de la Torre-Ruiz
YPH499	MATa <i>ade2-101 trp-63 leu2-1 ura3-52 his3-Δ200 lys2-801</i>	P.Hieter
YMJ1	Isogénica YPH499; <i>mkk1Δ::KanMX4</i>	(Jimenez-Sanchez et al., 2007)
YMJ2	Isogénica YPH499; <i>mkk2Δ::SpHIS5</i>	(Jimenez-Sanchez et al., 2007)
DD1 – 2D	Isogénica DD1-2B; <i>msg5Δ::LEU2</i>	(Doi et al., 1994)
PJ69-4A	MATa, <i>trp1-901, leu2-3112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ</i>	(James et al., 1996)
PJ69-4α	MATα, <i>trp1-901, leu2-3112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1-HIS3, GAL2-ADE2, met2::GAL7-lacZ</i>	(James et al., 1996)
SEY6211	MATa <i>trp1Δ901 leu2 3112 ade2-101 ura3-52 his3-Δ200 suc2 Δ9</i>	(Rodríguez-Pachón et al., 2002)
1783	MAT a; <i>ura3-52; his4; trp1-1; leu2-3112; can R</i>	(Lee et al., 1993)
YMF1	Isogénica 1783, <i>MSG5::6MYC::LEU2</i>	(Flandez et al., 2004)

## 1.2 Escherichia coli

Para llevar a cabo la amplificación de los plásmidos utilizados en este trabajo se empleó la cepa de *E.coli* DH5α: *supE44 ΔlacU169 (Φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1* (Hanahan, 1983). Los experimentos de sobreexpresión de proteínas se realizaron con la cepa de *E.coli* Rosetta DE3 (Novagen): *F-ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm* (DE3) pRARE (Cam<sup>R</sup>), derivada de la cepa BL21.

## 2. MEDIOS DE CULTIVO

La composición de los medios de cultivo empleados en este trabajo se detalla en la Tabla III. El agua utilizada para su disolución fue agua desionizada mediante sistemas de purificación Millipore. Posteriormente los medios fueron esterilizados en autoclave a 121°C y 1 atmósfera de presión durante 20 minutos. Para la obtención de medios sólidos se añadió un 2% peso/volumen de agar a la composición habitual. A la hora de realizar ensayos de sensibilidad tanto en medio líquido como sólido se elaboraron medios específicos mediante la adición de determinados compuestos a los medios generales. Estos agentes, la concentración usada, sus características y utilidad se detallan en la tabla IV.

**Tabla III. Medios de cultivo utilizados para *E. coli* y *S. cerevisiae*.**

MEDIO	COMPOSICIÓN	UTILIDAD	REFERENCIA
LB (Luria-Bertani)	1 % bactotripton, 0.5 % extracto de levadura y 0.5 % NaCl	Medio rico utilizado para el crecimiento de bacterias  Adición de ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (50 µg/ml) para la selección de transformantes con plásmidos portadores de la resistencia a dichos antibióticos	(Sambrook et al., 1989)
YPD (Yeast extract Peptone Dextrose)	1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % glucosa	Medio completo para el cultivo de levaduras  La adición de geneticina (200 mg/l) se realizó para la selección de transformantes portadores de la casette de delección KANMX4	(Sherman et al., 1986)
YPDA (Yeast extract Peptone Dextrose Adenine)	1 % extracto de levadura, 2 % peptona, 2 % glucosa y 0,01% adenina	Medio rico suplementado con adenina para facilitar el crecimiento de cepas con genotipo ade2	(Sherman et al., 1986)
YPG (Yeast extract Peptone Galactose)	1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % galactosa	Medio rico que permite la inducción de la expresión de genes controlados bajo el promotor GAL1	(Sherman et al., 1986)

Medio Sintético SD: <u>Synthetic</u> <u>Dextrose</u>	2% glucosa, 0,17 % base nitrogenada para levaduras, 0,5 % sulfato amónico y 0,19 % de mezcla de aminoácidos comercial (Formedium)	Medio sintético para el crecimiento de levaduras. Se suplementa con los aminoácidos correspondientes para la selección y el mantenimiento de transformantes portadores de diferentes marcadores de auxotrofias	(Sherman et al., 1986)
Medio Sintético SR: <u>Synthetic</u> <u>Raffinose</u>	1,5% rafinosa, 0,17 % base nitrogenada para levaduras, 0,5 % sulfato amónico y 0,19 % de mezcla de aminoácidos comercial (Formedium)	A diferencia del medio SD, la glucosa es sustituida por rafinosa para impedir que el promotor GAL1 se encuentre reprimido	(Sherman et al., 1986)

**Tabla IV. Compuestos adicionales que se añaden a los medios generales de cultivo.**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN	UTILIDAD Y CARACTERÍSTICAS
Rojo Congo (RC) (MERCK)	30 $\mu\text{g/mL}$ en medio líquido; de 25 a 100 $\mu\text{g/mL}$ en medio sólido	Interfiere con la correcta construcción de la pared celular de levaduras a través de su unión a quitina
Zimoliasa 100T (ZL) (ImmunO™, MP BIOMEDICALS, Inc.)	0,4 U/mL	Cóctel de proteasas y $\beta$ -(1,3)-glucanasas procedente del cultivo del microorganismo <i>Arthrobacter luteus</i> que degradan la pared celular fúngica
Sorbitol	De 0,8 a 1M	Aumento de la osmolaridad externa
Feromona ( $\alpha$ -factor)	3 $\mu\text{M}$	Desencadena la formación de "shmoos" y el apareamiento de levaduras

### 3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

#### 3.1 Condiciones generales de crecimiento

Las condiciones de incubación de los microorganismos fueron las siguientes:

- *E. coli*: temperatura de 37°C y 200-220 rpm para incubaciones en medio líquido.

- *S. cerevisiae*: se utilizaron temperaturas de 24°C y 30°C como condiciones normales de crecimiento a velocidades de agitación entre 180 y 220 rpm. Los experimentos de choque térmico se realizaron a 37-39°C. En la mayoría de las aproximaciones experimentales realizadas se procedió inoculando el medio de cultivo líquido apropiado YPD o SD (si se trata de cepas transformadas con plásmidos) con las cepas a estudiar, cultivándolas en agitación durante toda la noche, de tal manera que al día siguiente el cultivo hubiera alcanzado su fase estacionaria de crecimiento. Los cultivos se refrescaron a una  $DO_{600}$  de 0,3 y se incubaron durante aproximadamente 2-3h más hasta que se añadió la droga correspondiente. De este modo, el cultivo se encontraba en fase de crecimiento exponencial, ideal para la mayoría de las aproximaciones que se han llevado a cabo en este trabajo. Transcurrido el tiempo conveniente, las células se recogieron por centrifugación en frío. Las cepas transformadas con plásmidos que portan el promotor *GAL1* fueron incubadas en medio SR durante una noche. Al día siguiente, las células se inocularon a una  $DO_{600}$  de 0,2 en medio YPG o se añadió galactosa al medio SR a una concentración final del 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*.

### **3.2 Determinación del crecimiento y condiciones de conservación**

El seguimiento del crecimiento de los cultivos en medio líquido se realizó a través de la medida de su absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU640. Para ello se realizaron las diluciones adecuadas de forma que la medida de densidad óptica (DO) se encontrara en el intervalo de linealidad del espectro. Las cepas de levadura se conservaron a una temperatura de -80°C en una solución de glicerol al 50% (v/v). La conservación de las cepas de *E.coli* portadoras de los diferentes plásmidos se llevó a cabo también a -80°C en glicerol al 25% (v/v) tras su crecimiento en medio LB con el antibiótico correspondiente.

### **3.3 Ensayos de sensibilidad en placa**

La sensibilidad o resistencia de las cepas a diferentes condiciones de crecimiento o compuestos en el medio de cultivo se determinó mediante ensayos de sensibilidad en placa, utilizando la técnica de siembra de gota en medio sólido. Para ello, partiendo de cultivos celulares en fase

estacionaria, en los que se igualó la densidad de células a una  $DO_{600}$  de 0,5, se realizaron diluciones decimales seriadas en placa de 96 pocillos utilizando agua esterilizada. Finalmente, con la ayuda de un replicador (modelo VP407AH Multi-blot Replicador de V&P Scientific, Inc.) se sembraron 5 uL de cada dilución en el medio sólido apropiado. Como 1  $DO_{600}$  equivale aproximadamente a  $10^7$  células/mL, en la primera gota se inocularon unas  $2,5 \times 10^4$  células, y unas 25 células en la cuarta y última gota. Las placas se incubaron durante 48-72 horas a 24°C o 30°C.

## 4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y MANIPULACIÓN DEL DNA

Las técnicas básicas de biología molecular de extracción de DNA plasmídico de *E. coli* mediante lisis alcalina, digestión con enzimas de restricción, desfosforilación del extremo 5' del DNA, amplificación del DNA mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), etc. se llevaron a cabo siguiendo los protocolos clásicos (Sambrook *et al.*, 1989; Ausubel *et al.*, 1993). La transformación de *E. coli* se realizó según el método de Hanahan (1983), y la de *S. cerevisiae* según el método del acetato de litio (Ito *et al.*, 1983).

Para la extracción y purificación de DNA plasmídico se utilizaron sistemas comerciales de la casa Roche Diagnostics (*High Pure Plasmid Isolation Kit*). Las enzimas de restricción empleadas, la T4-DNA ligasa y la DNA fosfatasa (CIAP, *calf intestine alkaline phosphatase*) procedían de Roche Diagnostics. La separación del DNA se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (0,8-1%) preparados en tampón TAE (0,004M Tris Acetato pH 7.5, 0,001M EDTA pH 8). El DNA se visualizó mediante la adición de GelRed al gel de agarosa y se observó en un transiluminador de luz UV. Para la elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa, se empleó el kit comercial *GeneClean Turbo* (Q-Bio Gene). La secuenciación de DNA se realizó en la Unidad de Secuenciación Automatizada de DNA del Parque Científico de Madrid/UCM.

### 4.1 Mutagénesis dirigida

La mutagénesis de residuos puntuales se llevó a cabo mediante mutagénesis dirigida (Wang y Malcolm, 1999) por PCR empleando la enzima DNA polimerasa Turbo *Pful* (Stratagene). Se

diseñaron oligonucleótidos que amplificaban el plásmido que contenía la secuencia de DNA a mutagenizar, pero sustituyendo las bases necesarias para conseguir las mutaciones deseadas. El producto de la PCR fue digerido con la enzima *DpnI* y transformado en *E. coli*. Se verificó la presencia de la mutación mediante secuenciación. Gracias al programa informático *WatCut* se introdujo una mutación silenciosa en los cebadores, variando alguna base nitrogenada que dentro del codón sigue codificando el mismo aminoácido, pero que en la secuencia introduce un punto de corte para una enzima de restricción que no existe en la versión silvestre permitiendo conocer qué clones de *E. coli* portan la mutación antes de su envío al servicio de secuenciación.

## 4.2 Oligonucleótidos utilizados

Los oligonucleótidos (sintetizados por Sigma) empleados en la realización de este trabajo se detallan a continuación en la Tabla V.

**Tabla V. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.** Las secuencias reconocidas por las enzimas de restricción se encuentran subrayadas.

NOMBRE	SECUENCIA	UTILIDAD
F-MSG5	GGAATTCCATATGATGCAATTCAGATAAGC	Amplificación del fragmento MSG5 <sup>1-123</sup>
R-MSG5 123	CCGCTCGAGTTAGGATGATTTGTATACACGCTTGG	
F-MSG5 MUTD	AGCGAGGCCCTCTGCAGCTGCACTACCAACATCTTTGAAGAACC GAACTG	Mutagénesis dirigida del docking site IYT de MSG5: I102AY103AT104A
R-MSG5 MUTD	AGATGTTGGTAGTGCAGCTGCAGAGGCCCTCGCTTCGCTCATC GACAGC	
F-SLT2	ACGCGTGCACCTTCATATGATGGCTGATAAGATAGAGAG	Amplificación de los fragmentos: SLT2 <sup>1-373</sup> SLT2 <sup>1-273</sup> SLT2 <sup>274-373</sup>
R-SLT2 273	TCGCGTGCACCTCGAGCTAACCTAATTGATGTATGTAGTCC	
R-SLT2 373	TCGCGTGCACCTCGAGCTATAATTGCCTTTGCTCTTCTAATAG	
F-SLT2 274	ACGCGTGCACCCCATATGTTTCATTCCAAAAGTACCTTTTGTC	
F-MLP1 274	ACGCGTGCACCCCATATG AATATCCCGGAAGATCGTTTG	Amplificación del fragmento MLP1 <sup>274-373</sup>
R-MLP1 373	TCGCGTGCACCTCGAGTTATGATGGGGAATCACCGC	

<i>F</i> -SDP1 <i>NcoI</i>	CATG <u>CCATGG</u> CCATGAACATATACACATCACCCACG	Amplificación de SDP1 y SDP1 <sup>IAYATA</sup>
<i>F</i> -SDP1 SD <i>NcoI</i>	CATG <u>CCATGG</u> CCATGAACGCAGCCGCATCACC	
<i>R</i> -SDP1 <i>SacI</i>	TCGCGAGCTC <u>CGGTACTTTT</u> CTATAACTGTTGGC	
<i>F</i> -promSDP1	CATGA <u>AAGCTT</u> GGTGGCCCAAAGTAACACTTC	Amplificación de SDP1 con su propio promotor
<i>R</i> -SDP1 <i>BamHI</i>	TCGCGGATC <u>CCCGTACTTTT</u> CTATAACTGTTGGC	
<i>F</i> -SDP1 <i>HindIII</i>	CATGA <u>AAGCTT</u> CTTG TAGCCATAATCTCGCATG	Amplificación de SDP1, SDP1 <sup>C140A-IA</sup> , SDP1 <sup>C140A-YA</sup> , SDP1 <sup>C140A-TA</sup>
<i>F</i> -SDP1I3A <i>Hind</i>	CATGA <u>AAGCTT</u> CTTG TAGCCATAATCTCGCATGAACGCATACACA TCACCCACG	
<i>F</i> -SDP1Y4A <i>Hind</i>	CATGA <u>AAGCTT</u> CTTG TAGCCATAATCTCGCATGAACATAGCCACA TCACCCACGCG	
<i>F</i> -SDP1T5A <i>Hind</i>	<u>AAGCTT</u> CTTG TAGCCATAATCTCGCATGAACATATACGCATC	
<i>R</i> -SDP1 <i>myc SacI</i>	TCGCGAGCTC <u>ACTAGGTAATACGACTCACTATAG</u>	
<i>F</i> -SDP1 MUTD	G TAGCCATAATCTCGCATGAACGC <u>AGCTGCATCACCCACGCGA</u> ACACCGAAC	
<i>R</i> -SDP1 MUTD	G TTCGGTGTTCCGCGTGGGTGATGC <u>AGCTGCGTTCATGCGAGAT</u> TATGGCTAC	Mutagénesis dirigida del docking site IYT de SDP1: I3AY4AT5A
<i>F</i> -SDP1 MUTC	GAAGATACTGATACATGCCCAATGTGGGCTC <u>TCGAGATCCGCA</u> ACG	Mutagénesis dirigida de la cisteína catalítica de SDP1: C140A
<i>R</i> -SDP1 MUTC	CGTTGCGGATC <u>TCGAGAGCCCACATTGGGCATGTATCAGTATC</u> TTC	
<i>F</i> -MLP1	TCGCGGATC <u>CCATGGCGACTGACACCGAGAG</u>	Amplificación de MLP1
<i>R</i> -MLP1	TCGCGT <u>CGACTTAGTTAACACCCTGAAATGAATTAGAG</u>	
<i>F</i> -BCK1	CATGTCTAGAAAGGAATTCGCTGGATGAAGG	Amplificación del fragmento BCK1 <sup>1172-1478</sup>
<i>R</i> -BCK1	CATGGT <u>CGACCTATTCAGTTTTATTCTCCTGAGAGG</u>	
<i>F</i> -PTP1	CGCGGATC <u>CCATGGCAGCTGCACCATGG</u>	Amplificación de PTP1

R-PTP1	CGCGGATCCTTGGTTCACGGAAAGACTGTTAAG	
MLP1 UP	TGAATTATCAAGAATGCACAAAAGC	Amplificación del gen MLP1 mediante PCR cuantitativa
MLP1 RP	TCCTTCCCTTCAAACATTGGTT	
CRHF	ACTACCCAGATATCAAGCAAATACACA	Amplificación del gen CRH1 mediante PCR cuantitativa
CRHR	TCAGCACCGTTAGAAATTTGAACA	
FKS2F	CCGTCAAATCCGTCCTCCTAT	Amplificación del gen FKS2 mediante PCR cuantitativa
FKS2R	GTACAAGCTGCAATACCTCCTAACC	
PIR3-F	TCGTTGCCAACAGACAGTTC	Amplificación del gen PIR3 mediante PCR cuantitativa
PIR3-R	TTCATGGCACTGAGAACCAA	

### 4.3 Plásmidos utilizados

Los plásmidos empleados en la realización de este trabajo se detallan en la Tabla VI.

**Tabla VI. Plásmidos utilizados en este trabajo.**

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS	PROCEDENCIA
pGEM-T	ori bla lacZ	Promega
pEG(KG)	ori 2 $\mu$ bla URA3 GAL1p GST	(Mitchell et al., 1993)
pEG(KG)-SLT2	ori 2 $\mu$ bla URA3 GAL1p GST-SLT2	(Flandez et al., 2004)
pEG(KG)-SLT2 <sup>274-373</sup>	ori 2 $\mu$ bla URA3 GAL1p GST-SLT2 <sup>274-373</sup>	Dra. Inmaculada Cosano
pEG(KG)-FUS3	ori 2 $\mu$ bla URA3 GAL1p GST-FUS3	(Marín et al., 2009)
pEG(KG)-PTC1	ori 2 $\mu$ bla URA3 GAL1p GST-PTC1	Dra. Lorena Palacios
pEG(KG)-MKK1 <sup>S386P</sup>	ori 2 $\mu$ bla URA3 GAL1p GST-MKK1 <sup>S386P</sup>	Dr. Humberto Martín
YCpLG	ori CEN4 bla LEU2 lacZ GAL1p	(Bardwell et al., 1994)

YCpLG-GFP	ori CEN4 LEU2 lacZ GAL1p GFP	(Rodríguez-Escudero et al., 2006)
YCplac111-SLT2-HA	ori CEN4 LEU2 lacZ SLT2-HA	Dr. David Levin.
pRS316	ori CEN6 URA3 lacZ	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS316-BCK1-20	ori CEN6 URA3 lacZ BCK1-20	(Lee y Levin, 1992)
pRS315	ori CEN6 LEU2 lacZ	(Sikorski y Hieter, 1989)
pRS315-pGAL1-STE4	ori CEN6 LEU2 lacZ pGAL1-STE4	(Dohlman et al., 1995)
YEplac112-PKC1 <sup>A398A405A406</sup>	ori 2 $\mu$ bla TRP1 lacZ GAL1p-PKC1 <sup>A398A405A406</sup>	(Martin et al., 2000)
YEplac181	ori 2 $\mu$ bla LEU2 lacZ	Dr. Joaquín Ariño
YEplac181-PTC1	ori 2 $\mu$ bla LEU2 lacZ PTC1	Dr. Joaquín Ariño
pYES2	ori 2 $\mu$ bla URA3 lacZ GAL1p	Invitrogen
pYES3	ori 2 $\mu$ bla TRP1 lacZ GAL1p	Invitrogen
pYES3/CT-GFP	ori 2 $\mu$ bla TRP1 lacZ GAL1p GFP	(Andres-Pons et al., 2007)
pYES3-GFP-PTC1	ori 2 $\mu$ bla TRP1 lacZ GAL1p GFP-PTC1	Dra. Lorena Palacios
YEp352	ori 2 $\mu$ bla lacZ(MCS) URA3	(Hill et al., 1986)
YEp352-pMLP1-lacZ	ori 2 $\mu$ bla lacZ(MCS) URA3 MLP1p	(García et al., 2009)
YEp352(H)-pMLP1-lacZ	ori 2 $\mu$ bla lacZ(MCS) HIS3 MLP1p	Dra. Ana Belén Sanz
YEp352-MSG5-GST	ori 2 $\mu$ bla lacZ(MCS) URA3 MSG5-GST	Dra. María José Marín
YEp352-MSG5 <sup>C319A</sup> -GST	ori 2 $\mu$ bla lacZ(MCS) URA3 MSG5 <sup>C319A</sup> -GST	Dra. María José Marín
YEp352-MLP1-GFP	ori 2 $\mu$ bla lacZ(MCS) URA3 MLP1-GFP	(Rodríguez-Peña et al., 2008)
YEp352(H)-MLP1-GFP	ori 2 $\mu$ bla lacZ(MCS) HIS3 MLP1-GFP	Dra. Ana Belén Sanz
YCplac22	ori CEN4 TRP1 lacZ	(Gietz y Sugino, 1988)
YCplac22-MSG5myc	ori CEN4 TRP1 lacZ MSG5-6MYC	(Flandez et al., 2004)

<i>pRS305-myc</i>	<i>ori bla LEU2 lacZ 6MYC</i>	(Flandez et al., 2004)
<i>pGADT7</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA</i>	Clontech
<i>pGADT7-KSS1</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA KSS1</i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pGADT7-FUS3</i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA FUS3</i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pGADT7-SLT2<sup>cd</sup></i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA SLT2<sup>cd</sup></i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pGADT7-MLP1<sup>cd</sup></i>	<i>ori 2μ bla GAL4 AD LEU2 HA MLP1<sup>cd</sup></i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pGBKT7</i>	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kanr c-Myc</i>	Clontech
<i>pGBKT7-MSG5</i>	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kanr c-Myc MSG5</i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pGBKT7-MSG5<sup>1-123</sup></i>	<i>ori 2μ GAL4 DNA-BD TRP1 kanr c-Myc MSG5<sup>1-123</sup></i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pRS315-pFIG1-GFP</i>	<i>ori CEN6 LEU2 pFIG1-GFP</i>	Dr. Humberto Martín
<i>pRS423-pFUS1-lacZ</i>	<i>ori 2μ HIS3 pFUS1-lacZ</i>	Dr. HG. Dohlman
<i>pET15b</i>	<i>ori bla lacZ</i>	Novagen
<i>pET15b-SLT2</i>	<i>ori bla lacZ SLT2</i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pET15b-MLP1</i>	<i>ori bla lacZ MLP1</i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pGEX(KG)</i>	<i>ori bla P<sub>tac</sub>-GST</i>	(Guan y Dixon, 1991)
<i>pGEX(KG)-MKK1</i>	<i>ori bla P<sub>tac</sub>-GST-MKK1</i>	(Martin et al., 2000)
<i>pGEX6-P1-MSG5</i>	<i>ori bla lacZ GST-MSG5</i>	(Palacios et al., 2011)
<i>pETGEXCT</i>	<i>ori bla lacZ GST</i>	(Sharrocks, 1994)
<i>YCplac111</i>	<i>ori CEN4 LEU2 lacZ</i>	(Gietz y Sugino, 1988)
<i>YCplac111-SLT2<sup>1-373</sup></i>	<i>ori CEN4 LEU2 lacZ- SLT2<sup>1-373</sup></i>	Dra. Inmaculada Cosano
<i>pRS416</i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ</i>	(Sikorski y Hieter, 1989)
<i>pRS416-MKK1myc</i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ MKK1myc</i>	(Jiménez-Sánchez et al., 2007)

<i>pRS416-MKK2myc</i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ MKK2myc</i>	(Jiménez-Sánchez et al., 2007)
<i>pRS416-MKK1<sup>K250R</sup>myc</i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ MKK1<sup>K250R</sup>myc</i>	(Jiménez-Sánchez et al., 2007)
<i>pRS416-MKK2<sup>K243R</sup>myc</i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ MKK2<sup>K243R</sup>myc</i>	Dra. M. Jiménez-Sánchez
<i>pRS425-STE11-4</i>	<i>ori CEN6 HIS3 lacZ STE11-4</i>	(Ramezani et al., 1998)
<i>pRS425-SLT2-GFP</i>	<i>ori CEN6 HIS3 lacZ SLT2-GFP</i>	(Hahn y Thiele 2002)
<i>pUC57-MSG5<sup>N9A</sup></i>	<i>ori bla lacZ MSG5<sup>N9A</sup></i>	GenScript
<i>pUC57-MSG5<sup>C7A</sup></i>	<i>ori bla lacZ MSG5<sup>C7A</sup></i>	GenScript
<i>pRS316-YVH1</i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ YVH1</i>	(Kemmler et al., 2009)
<i>pRS316-YVH1<sup>C117A</sup></i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ YVH1<sup>C117A</sup></i>	(Kemmler et al., 2009)
<i>pRS315-YVH1<sup>223-364</sup></i>	<i>ori CEN6 URA3 lacZ YVH1<sup>223-364</sup></i>	(Kemmler et al., 2009)
<i>BG1805-LTP1</i>	<i>bla URA3 GAL1p LTP1</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-SSU72</i>	<i>bla URA3 GAL1p SSU72</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-CNA1</i>	<i>bla URA3 GAL1p CNA1</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-PPZ1</i>	<i>bla URA3 GAL1p PPZ1</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-PPZ2</i>	<i>bla URA3 GAL1p PPZ2</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-SAP155</i>	<i>bla URA3 GAL1p SAP155</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-MIH1</i>	<i>bla URA3 GAL1p MIH1</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-OCA1</i>	<i>bla URA3 GAL1p OCA1</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-OCA2</i>	<i>bla URA3 GAL1p OCA2</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-OCA6</i>	<i>bla URA3 GAL1p OCA6</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-CDC55</i>	<i>bla URA3 GAL1p CDC55</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-PPH21</i>	<i>bla URA3 GAL1p PPH21</i>	Open Biosystems
<i>BG1805-PPH22</i>	<i>bla URA3 GAL1p PPH22</i>	Open Biosystems

BG1805-PPS1	<i>bla URA3 GAL1p PPS1</i>	Open Biosystems
BG1805-SIT4	<i>bla URA3 GAL1p SIT4</i>	Open Biosystems
BG1805-YCH1	<i>bla URA3 GAL1p YCH1</i>	Open Biosystems
BG1805-PTC1	<i>bla URA3 GAL1p PTC1</i>	Open Biosystems
BG1805-PTC2	<i>bla URA3 GAL1p PTC2</i>	Open Biosystems
BG1805-PTC4	<i>bla URA3 GAL1p PTC4</i>	Open Biosystems
BG1805-PTC5	<i>bla URA3 GAL1p PTC5</i>	Open Biosystems
BG1805-PTC6	<i>bla URA3 GAL1p PTC6</i>	Open Biosystems
BG1805-PTC7	<i>bla URA3 GAL1p PTC7</i>	Open Biosystems
BG1805-PTP1	<i>bla URA3 GAL1p PTP1</i>	Open Biosystems
BG1805-PTP2	<i>bla URA3 GAL1p PTP2</i>	Open Biosystems
BG1805-SDP1	<i>bla URA3 GAL1p SDP1</i>	Open Biosystems
BG1805-CMP1	<i>bla URA3 GAL1p CMP1</i>	Open Biosystems
BG1805-CMP2	<i>bla URA3 GAL1p CMP2</i>	Open Biosystems
BG1805-CDC14	<i>bla URA3 GAL1p CDC14</i>	Open Biosystems
BG1805-TEP1	<i>bla URA3 GAL1p TEP1</i>	Open Biosystems
BG1805-MSG5	<i>bla URA3 GAL1p MSG5</i>	Open Biosystems
BG1805-CNB1	<i>bla URA3 GAL1p CNB1</i>	Open Biosystems
BG1805-SIW14	<i>bla URA3 GAL1p SIW14</i>	Open Biosystems
BG1805-YVH1	<i>bla URA3 GAL1p YVH1</i>	Open Biosystems
BG1805-FCP1	<i>bla URA3 GAL1p FCP1</i>	Open Biosystems
BG1805-PSR1	<i>bla URA3 GAL1p PSR1</i>	Open Biosystems
BG1805-PSR2	<i>bla URA3 GAL1p PSR2</i>	Open Biosystems

<i>BG1805-PPG1</i>	<i>bla URA3 GAL1p PPG1</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-PPQ1</i>	<i>bla URA3 GAL1p PPQ1</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-RTS1</i>	<i>bla URA3 GAL1p RTS1</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-RTS3</i>	<i>bla URA3 GAL1p RTS3</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-TPD3</i>	<i>bla URA3 GAL1p TPD3</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-SAP185</i>	<i>bla URA3 GAL1p SAP185</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-PPT1</i>	<i>bla URA3 GAL1p PPT1</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-SAP4</i>	<i>bla URA3 GAL1p SAP4</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>BG1805-FUS3</i>	<i>bla URA3 GAL1p FUS3</i>	<i>Open Biosystems</i>
<i>pEGH-GST-PTP1</i>	<i>bla URA3 GAL1p GST-PTP1</i>	<i>Open Biosystems</i>

#### 4.4 Plásmidos generados

El procedimiento de construcción de los plásmidos generados en este trabajo se detalla en la Tabla VII. Todos los productos de PCR se clonaron en el vector pGEMT donde fueron secuenciados y a partir del que fueron subclonados a otro vector.

**Tabla VII. Plásmidos generados en este trabajo.**

PLÁSMIDO	PROCEDIMIENTO DE CONSTRUCCIÓN
<i>pRS315-pMLP1-GFP</i>	Se digirió el plásmido <i>pRS315-pFIG1-GFP</i> con las enzimas de restricción <i>PspOMI</i> y <i>XhoI</i> , que liberan <i>FIG1p</i> , e introduciendo en su lugar el inserto que porta el promotor de <i>MLP1</i> , tras su amplificación por PCR con los oligonucleótidos <i>FMLP1PR</i> y <i>RMLP1PR</i> .
<i>pEG(KG)-MLP1</i>	Se amplificó el ORF de <i>MLP1</i> usando los cebadores <i>F-MLP1</i> y <i>R-MLP1</i> y se subclonó en <i>pEG(KG)</i> en los puntos <i>BamHI</i> y <i>Sall</i> .
<i>pGBKT7-MSG5<sup>IAYATA</sup></i>	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido <i>pGBKT7-MSG5</i> empleando los oligonucleótidos <i>F-MSG5 MUTD</i> y <i>R-MSG5 MUTD</i> .
<i>pGBKT7-MSG5<sup>1-123-IAYATA</sup></i>	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido <i>pGBKT7-MSG5<sup>1-123</sup></i> empleando los oligonucleótidos <i>F-MSG5 MUTD</i> y <i>R-MSG5 MUTD</i> .

YCplac22-MSG5 <sup>IAYATA</sup> myc	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido YCplac22-MSG5myc empleando los oligonucleótidos F-MSG5 MUTD y R-MSG5 MUTD.
YEp352-MSG5 <sup>C319A-IAYATA</sup> -GST	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido YEp352-MSG5 <sup>C319A</sup> -GST empleando los oligonucleótidos F-MSG5 MUTD y R-MSG5 MUTD.
pRS305-SDP1myc	Se amplificó el promotor (-1000pb) y el ORF de SDP1 con los cebadores F-promSDP1 y R-SDP1 BamHI y se subclonó en pRS305-myc en los puntos HindIII y BamHI.
YCplac22-SDP1myc	Se subclonó el fragmento HindIII-SacI procedente del pRS305-SDP1myc que lleva el promotor de SDP1 (-1000pb) y su ORF marcado con 6 epítopos myc en C-terminal.
YCplac22-SDP1 <sup>IAYATA</sup> myc	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido YCplac22-SDP1myc empleando los oligonucleótidos F-SDP1 MUTD y R-SDP1 MUTD.
pYES2-SDP1myc	Se amplificó el ORF de SDP1 con myc a partir de YCplac22-SDP1myc con los cebadores F-SDP1 HindIII y R-SDP1myc SacI y se subclonó en pYES2 (HindIII y SacI).
pYES2-SDP1 <sup>IAYATA</sup> myc	Se generó del mismo modo que pYES2-SDP1myc pero realizando una PCR sobre el molde YCplac22-SDP1 <sup>IAYATA</sup> myc.
pYES2-SDP1 <sup>C140A</sup> myc	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido pYES2-SDP1myc empleando los oligonucleótidos F-SDP1 MUTC y R-SDP1 MUTC.
pYES2-SDP1 <sup>C140A-IAYATA</sup> myc	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido pYES2-SDP1 <sup>IAYATA</sup> myc empleando los oligonucleótidos F-SDP1 MUTC y R-SDP1 MUTC.
pYES2-SDP1 <sup>C140A-I<sup>A</sup></sup> myc	Se amplificó el ORF de SDP1 <sup>C140A</sup> con myc a partir de pYES2-SDP1 <sup>C140A</sup> myc con los cebadores F-SDP1I3AHind y R-SDP1myc SacI y se subclonó en pYES2 (HindIII y SacI).
pYES2-SDP1 <sup>C140A-Y<sup>A</sup></sup> myc	Se amplificó el ORF de SDP1 <sup>C140A</sup> con myc a partir de pYES2-SDP1 <sup>C140A</sup> myc con los cebadores F-SDP1Y4AHind y R-SDP1myc SacI y se subclonó en pYES2.
pYES2-SDP1 <sup>C140A-T<sup>A</sup></sup> myc	Se amplificó el ORF de SDP1 <sup>C140A</sup> con myc a partir de pYES2-SDP1 <sup>C140A</sup> myc con los cebadores F-SDP1T5AHind y R-SDP1myc SacI y se subclonó en pYES2.
pYES3-BCK1 <sup>1172-1478</sup> (BCK1 <sup>CT</sup> )	Se obtuvo el fragmento C-terminal de Bck1 (1172-1478) procedente del pGBT9-BCK1 cortando con EcoRI y Sall y se subclonó en los puntos EcoRI-XhoI de pYES3.
YCpLG-BCK1 <sup>1172-1478</sup> (BCK1 <sup>CT</sup> )	Se amplificó el fragmento de Bck1 que contiene los residuos 1172-1478 usando los cebadores F-BCK1 y R-BCK1 y se subclonó en YCpLG en los puntos XbaI y Sall.
YCplac22-MSG5 <sup>N9A</sup> myc	YCplac22-MSG5myc se abrió con ClaI y en él se subclonó el fragmento ClaI procedente del pUC57-MSG5 <sup>N9A</sup> en el que se encuentran mutados los posibles 9 residuos de fosforilación del extremo N-terminal de Msg5.
YCplac22-MSG5 <sup>C7A</sup> myc	YCplac22-MSG5myc se abrió con NsiI-NotI y en él se subclonó el fragmento NsiI-NotI procedente del pUC57-MSG5 <sup>C7A</sup> en el que se encuentran mutados los posibles 7 residuos de fosforilación de la extensión C-terminal de Msg5.

YCplac22-MSG5 <sup>16A</sup> myc	YCplac22-MSG5 <sup>9A</sup> myc se abrió con Nsil-NotI y en él se subclonó el fragmento Nsil-NotI procedente del pUC57-MSG5 <sup>CTA</sup> en el que se encuentran mutados los posibles 7 residuos de fosforilación de la extensión C-terminal de Msg5.
pET15b-SLT2 <sup>1-373</sup>	Se amplificó el fragmento de SLT2 que codifica los aminoácidos 1-373 usando los cebadores F-SLT2 y R-SLT2 373 y se subclonó en pET15b en los puntos NdeI y XhoI.
pET15b-SLT2 <sup>1-273</sup>	Se amplificó el fragmento de SLT2 que codifica los aminoácidos 1-273 usando los cebadores F-SLT2 y R-SLT2 273 y se subclonó en pET15b en los puntos NdeI y XhoI.
pET15b-SLT2 <sup>274-373-CD</sup>	Se amplificó el fragmento de SLT2 que codifica los aminoácidos 274-373 usando los cebadores F-SLT2 274 y R-SLT2 373 y se subclonó en pET15b (NdeI-XhoI).
pET15b-SLT2 <sup>274-373-cd</sup>	Se generó del mismo modo que pET15b-SLT2 <sup>274-373-CD</sup> pero realizando una PCR sobre una versión de SLT2 que contiene las mutaciones D323N,D326N,E327N.
pET15b-MLP1 <sup>274-373-CD</sup>	Se amplificó el fragmento MLP1 que codifica los aminoácidos 274-373 usando los cebadores F-MLP1 274 y R-MLP1 373 y se subclonó en pET15b (NdeI- XhoI).
pET15b-MLP1 <sup>274-373-cd</sup>	Se generó del mismo modo que pET15b-MLP1 <sup>274-373-CD</sup> pero realizando una PCR sobre una versión de MLP1 que contiene la mutación D326N.
pGEX6-P1-MSG5 <sup>IAYATA</sup>	Mutagénesis dirigida sobre el plásmido pGEX6-P1-MSG5 empleando los oligonucleótidos F-MSG5 MUTD y R-MSG5 MUTD.
pGEX6-P1-MSG5 <sup>1-123</sup>	Se amplificó el fragmento de Msg5 entre los residuos 1-123 usando los cebadores F-MSG5 y R-MSG5 123 y se subclonó en pGEX6-P1 en los puntos NdeI y XhoI.
pGEX6-P1-MSG5 <sup>1-123-IAYATA</sup>	Se generó del mismo modo que pGEX6P1-MSG5 <sup>1-123</sup> pero realizando una PCR sobre una versión de Msg5 que contiene las mutaciones I102AY103AT104A.
pETGEXCT-SDP1	Se amplificó el ORF de SDP1 usando como molde YCplac22-SDP1myc y los cebadores F-SDP1 NcoI y R-SDP1 SacI y se subclonó en pETGEXCT en los puntos NcoI y SacI.
pETGEXCT-SDP1 <sup>IAYATA</sup>	Se amplificó el ORF de SDP1 usando como molde YCplac22-SDP1myc los cebadores F-SDP1SD NcoI y R-SDP1 SacI y se subclonó en pETGEXCT en los puntos NcoI y SacI.
YCpIG-PTC1-GFP	Se obtuvo el ORF de Ptc1 procedente del plásmido pYES2-GFP-PTC1 cortando con BamHI y se subclonó en YCpIG-GFP
YCpIG-PTP1-GFP	Se amplificó el ORF de PTP1 usando los cebadores F-PTP1 y R-PTP1 y se subclonó en YCpIG-GFP en el punto BamHI
BG1805-YVH1 <sup>C117A</sup>	Se obtuvo el ORF de Yvh1 <sup>C117A</sup> procedente del plásmido pRS316-YVH1 <sup>C117A</sup> cortando con ClaI y SpeI y se subclonó en BG1805-YVH1 abierto con las mismas enzimas

## 5. ENSAYOS DE ACTIVIDAD $\beta$ -GALACTOSIDASA

Este tipo de determinación se utilizó para cuantificar los niveles de expresión de fusiones transcripcionales de diversas regiones promotoras de genes de interés al gen *lacZ* de *E. coli* que codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa.

Las cepas en estudio, transformadas con el plásmido correspondiente, se cultivaron y procesaron según se describe en el apartado 3.1. Se recogió un volumen de 15 mL por centrifugación en frío y se congelaron los sedimentos de células a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, las células se resuspendieron en 250  $\mu\text{l}$  de tampón de rotura (100mM Tris-HCl pH=8, 1mM DTT, 20% de glicerol) y 5  $\mu\text{l}$  del inhibidor de proteasas PMSF 0,1M. Seguidamente, se añadió 1/3 del volumen de bolitas de vidrio de 1mm de diámetro (Glasperlen, Germany) para romper las células en la Fast-prep FP120 (BIO101/Savant) aplicando dos pulsos a una fuerza de 5,5 durante 30 segundos. La concentración de proteína del extracto celular total obtenido se determinó mediante el método de Bradford.

El ensayo de  $\beta$ -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  $\mu\text{L}$  de tampón Z (16,1 g/l  $\text{Na}_2\text{PO}_4+7\text{H}_2\text{O}$ , 5,5 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 0,75 g/l KCl y 0,246 g/l  $\text{MgSO}_4+7\text{H}_2\text{O}$ ) con  $\beta$ -mercaptoetanol ( $\beta$ -ME) (2,7 ml/l), a los que se añadieron después 5-10  $\mu\text{L}$  del extracto proteico en tampón de lisis. A continuación se añadieron 20  $\mu\text{L}$  de orto-nitrofenil- $\beta$ -Dgalactopiranósido (ONPG) (4 mg/mL en tampón Z) que al ser utilizado como sustrato por la enzima  $\beta$ -galactosidasa produce orto-nitrofenol, compuesto de color amarillo que se puede medir espectrofotométricamente. La placa así preparada se incubó a  $30^{\circ}\text{C}$  durante un tiempo determinado (en general 10 minutos) y se paró la reacción añadiendo a cada pocillo 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1M. La lectura se realizó en un lector de placas multipocillo (*Microplate Reader Model* 680, BioRad) a 415 nm. El resultado se expresó calculando la actividad específica  $\beta$ -galactosidasa, de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{Actividad específica } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{DO}_{415} \times 0,17}{0,0045 \times \text{proteína (mg/mL)} \times \text{volumen de extracto (mL)} \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

## 6. CITOMETRÍA DE FLUJO

Se realizaron ensayos de citometría de flujo con el fin de cuantificar los niveles de expresión de distintos genes de interés. Se han utilizado diversas construcciones en las que bien las regiones promotoras o bien las secuencias codificantes de dichos genes de interés están fusionadas a la proteína verde fluorescente GFP (*Green fluorescent protein*).

Las cepas transformadas con el plásmido correspondiente se cultivaron y procesaron según se describe en el apartado 3.1. Se recogió por centrifugación a temperatura ambiente un volumen de 200 $\mu$ L de cultivo en fase exponencial. Con el fin de detener la síntesis proteica las células se resuspendieron en una solución de cicloheximida (10 $\mu$ g/mL) en PBS. Para realizar el análisis se utilizó el citómetro de flujo CyAn MLE (Dako, Glostrup, Denmark) del Centro de Citometría y Microscopía de Fluorescencia de la UCM así como el citómetro Guava EasyCyte (Millipore) y el programa InCyte. La fluorescencia de GFP se midió a través de un láser de azul de excitación (488nm) y un filtro detector de emisión verde (525/30nm). Los parámetros iniciales del citómetro se ajustaron con células de levadura que no expresaban GFP (blanco).

## 7. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

Las imágenes de *S. cerevisiae* se obtuvieron tras la observación en un montaje húmedo, utilizando un microscopio invertido Eclipse TE2000U Nikon Eclipse TE2000-U. Las imágenes digitales se adquirieron a través de una cámara Hamamatsu ORCA-ER-CCD utilizando los programas Aquacosmos 1.3 y HClmage. El brillo y contraste fue uniformizado con este último y posteriormente con el programa Adobe Photoshop CS4.

En los estudios de localización de la proteína verde fluorescente (GFP) se recogió un volumen de 1 ml de células en fase exponencial de crecimiento mediante centrifugación durante 3 minutos a 5000 rpm y a 4°C. A continuación, se lavaron las células dos veces con PBS 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 en fusión a GFP se utilizó el filtro Nikon B-2E/C.

## 8. DETECCIÓN DE PROTEÍNAS MEDIANTE *WESTERN-BLOTTING*

### 8.1 Obtención de extractos y preparación de muestras

Los preinóculos de células de levadura se cultivaron durante toda la noche a 24°C en medio rico YPD. Al día siguiente se refrescaron los cultivos a una densidad óptica de 0,3 y se dejaron crecer hasta alcanzar una  $DO_{600} \sim 0,6$ ; justo en este punto se les sometió al estímulo correspondiente durante el tiempo indicado. Seguidamente las células se recogieron en tubos Falcon con hielo y se centrifugaron a 2600 rpm durante 3 minutos a 4°C y, tras eliminar el sobrenadante, se congelaron directamente en nitrógeno líquido para posteriormente conservarlos a -80°C hasta su rotura.

Para la rotura de las células, éstas se resuspendieron en tampón de lisis frío compuesto de 50mM Tris HCl pH 7,5, 10% de glicerol, 1% Tritón X-100, 0,1% SDS, 0,1% de NP40, 150mM NaCl, 5mM EDTA, 50mM NaF, 50mM  $\beta$ -glicerol-fosfato, 5mM pirofosfato sódico y 1mM ortovanadato sódico. Con el fin de evitar la degradación de las proteínas durante el proceso de rotura celular se adicionaron a este tampón de lisis los siguientes inhibidores de proteasas: fenilmetil-sulfonil-fluoruro (PMSF 1mM) y la mezcla comercial de inhibidores de proteasas Complete mini Complete Mini EDTA-free, Protease inhibitor cocktail tablets, (Roche) (una pastilla/10 ml tampón de lisis). Se incorporaron perlas de vidrio de Ballotini de 1mm (Braun Biotech) y se agitó la mezcla en un aparato homogenizador de células Fast-Prep FP120 (BIO101/Savant) a una intensidad de 5,5 durante 30 segundos. A continuación se separaron los extractos celulares de las perlas de vidrio y restos celulares mediante centrifugación refrigerada a 4°C y 13000 rpm durante 15 minutos. Posteriormente los extractos proteicos fueron valorados midiendo la absorbancia a 280 nm de una dilución de los mismos en un espectrofotómetro Beckman DU 640 (1 unidad de densidad óptica corresponde aproximadamente a 1,5 mg/ml de proteína). Se igualó la cantidad de proteína en todas las muestras, aumentando el volumen cuando era necesario con tampón de lisis. A los extractos ya equilibrados se les añadió tampón de carga SDS-PAGE 2X (125mM Tris HCl pH 6,8, SDS 5%, 25% glicerol, azul de bromofenol; se añade 1/5 del volumen final de DTT 1M justo antes de usar) y se calentaron a 99°C durante 5 minutos para su desnaturalización. Las muestras ya preparadas se cargaron en un gel de electroforesis o se conservaron a -20°C para su posterior utilización.

## **8.2 Electroforesis de proteínas y transferencia a membranas de nitrocelulosa**

Para la separación de las proteínas del extracto se utilizaron geles de poliacrilamida constituidos por un concentrador al 5% y un separador al 8%, 10% o 15% en condiciones desnaturizantes, con SDS. Se realizó en cubetas Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 150-180 voltios. Se utilizó un tampón de electroforesis con la siguiente composición: 196mM glicina, 0,1% SDS, 50mM Tris-HCl pH=8,3. Como patrón de pesos moleculares se empleó el suministrado por Invitrogen o Bio-Rad.

Una vez separadas las proteínas en el gel de poliacrilamida se transfirieron desde el gel a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham) y como material protector y absorbente se utilizó papel Whatman 3MM Chr. Se emplearon unas cubetas de transferencia *Mini Trans-Blot Transfer Cell* (Bio-Rad) y un voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora. El tampón de transferencia empleado se compone de 5,8 g/l Tris, 2,9 g/l glicina y 0,37 g/l de SDS al que se añadió un 20% del volumen final de etanol justo antes de su utilización.

## **8.3 Inmunodetección**

Una vez obtenidas las membranas se incubaron con solución bloqueante Odyssey (LI-COR Biosciences) o con leche desnatada al 5% en PBS durante una hora en agitación con el fin de evitar la unión inespecífica de los anticuerpos a la membrana. Posteriormente, las membranas se incubaron toda la noche, a 4°C y en agitación, con el anticuerpo primario correspondiente disuelto en una de las soluciones bloqueantes previamente descritas. A continuación, se realizaron 5 lavados con PBS-Tween (Tween-20 al 0,1%) de 5 minutos cada uno. Seguidamente, las membranas fueron incubadas de nuevo durante una hora, en agitación y oscuridad, con los anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos con dos espectros de absorción distintos: 680nm (canal de detección 700) o 780nm (canal de detección 800). Se realizaron 3 lavados de la membrana de 5 minutos con PBS-Tween y para finalizar otros 2 más con PBS. Por último, se visualizaron las membranas a través del escáner *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences). La cuantificación de las bandas se llevó a cabo con el programa Odyssey versión 2.1 (Athena).

Los anticuerpos utilizados están recogidos en la tabla VIII.

Tabla VIII. Anticuerpos empleados en este trabajo.

ANTICUERPO	CARACTERÍSTICAS	DILUCIÓN	CASA COMERCIAL
Anti-phospho-p44/42 (Thr202/Tyr204)	Policlonal de conejo	1:2000	Cell Signalling
Anti- $\alpha$ actina clon C4	Monoclonal de ratón	1:1000	Inmuno MP Biomedicals
Anti-G6PDH	Policlonal de conejo	1:50.000	Sigma
Anti-GST (Z-5)	Policlonal de conejo	1:2000	Santa Cruz Biotechnology
Anti-myc, clon 4A6	Monoclonal de ratón	1:2000	Millipore
Anti-myc, clon 9E10	Monoclonal de ratón	1:1000	Covance
Anti-polyHistidine, clon HIS-1	Monoclonal de ratón	1:1000	Sigma
Anti-HA, clon 11	Monoclonal de ratón	1:1000	Covance
Anti-GFP (JL-8)	Monoclonal de ratón	1:2000	Clontech
Anti-phospho-p38 (Thr180/Tyr182)	Policlonal de conejo	1:1000	Cell Signalling
IRDye 800CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (verde)	1:5000	Li-cor Biosciences
IRDye 680CW Goat anti-rabbit	Ac. secundario de conejo (rojo)	1:5000	Li-cor Biosciences
IRDye 680CW Goat anti-mouse	Ac. secundario de ratón (rojo)	1:5000	Li-cor Biosciences

## 9. EXPRESIÓN HETERÓLOGA DE PROTEÍNAS DE LEVADURA EN *E.coli*

Con el objetivo de mejorar la expresión de proteínas de *S.cerevisiae* en *E.coli* se eligió la cepa Rosetta DE3 (derivada de la cepa BL21) ya que está diseñada específicamente para conseguir una eficiente traducción incluso de aquellos codones de bajo uso en procariontas.

Se cultivó durante toda la noche a 37°C un preinóculo de 2 ml en LB suplementado con ampicilina de cada uno de los transformantes que portaban plásmidos para la expresión de

proteínas recombinantes fusionadas a GST o a una cola de histidinas. Al día siguiente el cultivo se refrescó añadiendo 100 ml del mismo medio. Cuando los cultivos alcanzaron una fase de crecimiento exponencial entre una DO de 0,5 y 0,6 se añadió IPTG (isopropil-1-tio-D-galactopiranosido) a una concentración final de 0,5mM y se incubaron durante 3 horas a 30°C para inducir la expresión heteróloga. Las células fueron recogidas por centrifugación a 3000 rpm durante 20 minutos a 4°C, obteniendo un sedimento de células que se conservó a -80°C.

Posteriormente, la células se resuspendieron en tampón fosfato PBS conteniendo 1mM DTT y 1mM EDTA al que se añadieron inhibidores de proteasas (2mM PMSF) y lisozima (1 mg/ml). Tras incubar en hielo durante 10 minutos, las células fueron sometidas a 10 ciclos de sonicación de 10 segundos cada uno. Posteriormente se centrifugó el lisado a 13.000 rpm durante 15 minutos y se separó el sobrenadante con el extracto proteico que se conservó a -80°C para realizar experimentos de interacción de proteínas *in vitro*. Tanto el lisado total como la fracción soluble fueron analizadas mediante electroforesis y tinción del gel con azul de Coomassie para verificar la correcta expresión de las proteínas.

## 10. ESTUDIOS DE INTERACCIÓN ENTRE PROTEÍNAS

### 10.1 Ensayos de copurificación *in vivo*

Los transformantes se cultivaron durante toda la noche en medio sintético con rafinosa (SR). Al día siguiente, en fase exponencial, se añadió galactosa hasta una concentración final del 2%, durante 6 horas, induciendo así la expresión de proteínas en fusión a distintos epítomos. Se obtuvieron los extractos proteicos según se ha descrito en el apartado 8.1 pero variando ligeramente la composición del tampón de lisis, que en este caso contenía menor cantidad de detergentes (sin SDS ni Tritón X-100) con el fin de favorecer la copurificación de las proteínas. Después de igualar la cantidad de proteína, se tomó una pequeña muestra para emplearla como control de extractos sin purificar, que se procesó hirviéndola en tampón de carga como se ha descrito anteriormente. Sobre el resto de muestra se añadieron 30 µl de la matriz *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare Life Sciences), previamente equilibrada al 50% con tampón de lisis. Con el objetivo de favorecer el contacto del extracto con la matriz se aumentó el volumen (hasta 300 µl) con dicho tampón de lisis. Después de una hora de incubación a 4°C en agitación rotatoria se realizaron varios lavados de la matriz con el mismo tampón de lisis frío y finalmente

se eluyeron las muestras hirviéndolas en 20  $\mu$ l de tampón de carga 2X SDS-PAGE durante 5 minutos con el fin de separar las proteínas de la matriz. Estas muestras se cargaron en geles de poliacrilamida para su inmunodetección por *western-blotting*, junto con los extractos previamente separados de proteínas sin purificar.

## **10.2 Ensayos de copurificación in vitro**

Después de expresar las proteínas recombinantes en *E.coli* y obtener los extractos proteicos deseados según el protocolo descrito en el apartado 9, se procedió a la purificación de las proteínas fusionadas a GST. A los extractos proteicos descongelados en hielo se adicionaron 30  $\mu$ l de la matriz *Glutathione Sepharose 4B* (GE Healthcare Life Sciences). Esta matriz se resuspendió en tampón fosfato PBS que contenía 1mM de EDTA, inhibidores de proteasas (2mM de PMSF) y 2mM de DTT con el fin de mantener un ambiente reductor que impida la dimerización de GST a través de sus puentes disulfuro y favoreciendo de este modo su unión a la matriz de glutation y purificación. Tras una hora de incubación a 4°C en agitación, se realizaron un par de lavados de la matriz con dicho tampón fosfato, siempre en frío. Posteriormente, los extractos proteicos fusionados a una cola de polihistidinas fueron añadidos a la matriz que lleva unida la proteína de fusión a GST de interés purificada en el paso previo. Para favorecer la posible interacción de ambas proteínas se incubó la mezcla en agitación a 4°C durante una hora. Finalmente se efectuaron 3 lavados sobre la matriz con tampón fosfato suplementado con inhibidores de proteasas y las proteínas purificadas fueron separadas de la matriz mediante una elución en 25  $\mu$ l de tampón de carga 2X SDS-PAGE y calentadas durante 5 minutos a 99°C. Las muestras se separaron o resolvieron en geles de poliacrilamida para su inmunodetección por *western-blotting*.

## **10.3 Sistema de dos híbridos**

Para la identificación de interacciones entre proteínas *in vivo* en la levadura *S. cerevisiae* se ha utilizado el sistema de doble híbrido basado en el factor de transcripción Gal4 en células diploides. Para la detección de interacción entre dos proteínas mediante este sistema, uno de los genes se subclonó en el vector pGBK-T7 en fase con el dominio de unión a DNA del gen *GAL4* y bajo el control del promotor *ADH1*. Del mismo modo, el otro gen objeto de estudio se subclonó en el vector pGAD-T7 en fase con el dominio activador de transcripción de *GAL4*, bajo el control

del mismo promotor. Es necesario que ambas proteínas híbridas se expresen de forma simultánea en la misma levadura; para ello cada uno de los plásmidos se transformó en dos cepas de tipo sexual opuesto; es decir, pGBK-T7 en la cepa PJ69-4A y pGAD-T7 en la cepa PJ69-4 $\alpha$ . Con el fin de inducir el apareamiento entre ellas, ambas cepas se incubaron a 30°C en medio líquido rico YPD, durante toda la noche. Posteriormente, se seleccionaron aquellas células diploides que expresaban ambas proteínas de interés tras sembrar 50  $\mu$ l de este cultivo en un medio selectivo carente de leucina (marcador del vector pGAD-T7) y triptófano (marcador del vector pGBK-T7).

### **10.3.1 Valoración cuantitativa de la interacción (actividad $\beta$ -galactosidasa)**

Para cuantificar la interacción entre ambas proteínas se analizó, a través de la actividad  $\beta$ -galactosidasa, la expresión del gen *lacZ* regulado por el factor de transcripción Gal4. El protocolo empleado para dicha valoración fue el siguiente:

Los diploides seleccionados se inocularon en medio líquido selectivo durante la noche. A la mañana siguiente, 300  $\mu$ l de este cultivo se refrescaron en 3 ml de YPDA (medio rico suplementado con adenina); se dejaron crecer durante 3 o 4 horas (para que se encontraran en fase de crecimiento exponencial) y se determinó la DO<sub>600</sub> de cada cultivo. En este punto, se recogieron las células por centrifugación en un tubo eppendorf y posteriormente se realizó un lavado con tampón Z (descrito en el apartado 5) con  $\beta$ -mercaptoetanol, para resuspenderlas posteriormente en 150  $\mu$ l de este tampón. La rotura de las células se llevó a cabo mediante 3 ciclos de congelación-descongelación en un baño de nitrógeno líquido y en otro conteniendo agua a 37°C, dejando las células durante un máximo de 5 minutos en cada uno de los baños. Posteriormente se añadió a cada tubo con las células rotas 810  $\mu$ l de la mezcla de tampón Z con  $\beta$ -mercaptoetanol (2,7ml/l) y ONPG (*Orto-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside*) (4mg/ml). Las reacciones se incubaron a 30°C; en el momento en el que se observó la aparición de color amarillo se paró la reacción con 400  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1M. Finalmente se midió la absorbancia de los sobrenadantes a 415 nm. Las unidades de  $\beta$ -galactosidasa se calcularon de la siguiente forma:

$$\text{Unidades actividad } \beta\text{-galactosidasa} = \frac{\text{DO}_{415} \times 1000}{\text{DO}_{600} \times \text{tiempo de incubación (min)}}$$

## 11. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Esta técnica permite llevar a cabo la cuantificación de ácidos nucleicos con gran precisión, imponiéndose hoy día como método de referencia para realizar estudios de expresión génica a pequeña escala. Las células de *S. cerevisiae* se procesaron tal y como se describe en el apartado 3.1 El volumen de cultivo recogido fue de 5 ml centrifugando a 4°C y 2600 rpm durante 3 min y congelando el sedimento de células inmediatamente después de retirar el sobrenadante en nitrógeno líquido. La extracción de RNA se realizó utilizando el kit *RNeasy Mini* (QIAGEN), mediante el procedimiento de disrupción mecánica descrito en las instrucciones del fabricante. Las concentraciones de RNA se determinaron midiendo la absorbancia a 260 nm y su calidad se comprobó mediante cromatografía capilar utilizando el equipo *Nano Bioanalyzer 2100B* (Agilent Technologies). La síntesis de cDNA se realizó mediante transcripción reversa con el kit *AS Transcription System* (Promega) empleando 2 µg de RNA total, siguiendo las instrucciones del fabricante. La PCR cuantitativa a tiempo real (qPCR) se llevó a cabo en un equipo ABI Prism 7700 (Applied Biosystems) utilizando las condiciones de amplificación recomendadas por defecto. Como molde se utilizaron 5 µl de una dilución 1/100 en agua destilada de cada cDNA sintetizado por reacción de PCR. La expresión de cada gen se normalizó relativizando los valores según la expresión del gen control *ACT1*. Los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los genes *CRH1*, *FKS2*, *MLP1* y *PIR3* fueron diseñados utilizando el programa informático *Primer Express* por el grupo del Dr. Javier Arroyo y se detallan en la tabla V.

## 12. SOPORTE BIOINFORMÁTICO

Durante la realización de esta Tesis Doctoral se han consultado diferentes bases de datos y se han empleado herramientas bioinformáticas disponibles en Internet. Las más utilizadas han sido las siguientes:

**Pubmed.** Base de datos de revistas científicas de la Biblioteca Nacional de Medicina de Estados Unidos. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>

***Saccharomyces genome Database (SGD).*** Servidor de la Universidad de Stanford con acceso a herramientas para el análisis de secuencias de *S. cerevisiae*, proyectos de genómica funcional, bibliografía, etc. <http://www.yeastgenome.org/>

**Basic Local Alignment Search Tool (BLAST).** Permite la búsqueda de similitudes entre las secuencias disponibles en las bases de datos, tanto de DNA como de proteínas.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>

**BIOBASE knowledge Library Proteome.** Proporciona información relacionada con la función molecular y el papel biológico de proteínas de organismos eucarióticos, fenotipos de mutaciones en distintos genes e información sobre interacciones proteicas y genéticas.

<https://portal.biobase-international.com/>

**Graphical Codon Usage Analyser 2.0.** Herramienta disponible para el estudio y comparativa de la frecuencia de uso de codones de distintos microorganismos y de secuencias problema.

<http://gcu.schoedl.de/>

**WatCut.** Herramienta *on line* de la Universidad de Waterloo para el realizar análisis de restricción de secuencias de DNA y el diseño de mutaciones silenciosas sobre oligonucleótidos.

<http://watcut.uwaterloo.ca/watcut/watcut/template.php>

**Meme:** Programa de alineamiento múltiple de secuencias, para identificar los aminoácidos más frecuentes en un determinado motivo.

<http://meme.nbcr.net/meme/cgi-bin/meme.cgi>

**Mega 5.2:** Programa para elaboración de dendogramas.

<http://www.megasoftware.net/>

**PhosphoGRID.** Base de datos de los sitios de fosforilación verificados experimentalmente *in vivo* de las proteínas del organismo modelo *S. cerevisiae*.

<http://www.phosphogrid.org/>

# Resultados

---



# 1. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE *Msg5* Y *Sdp1* SOBRE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR

Se ha comentado en la introducción la importancia de garantizar la eficacia, fidelidad y especificidad de señalización en las rutas de MAPKs (Grewal *et al.*, 2006). Existen dominios de unión (alejados del centro catalítico) que favorecen el reconocimiento y promueven interacciones específicas proteína-proteína. En el caso de las MAPKs, estos sitios favorecen una asociación física de alta afinidad entre la quinasa y sus sustratos. Normalmente, la MAPK interacciona a través de su motivo CD (*Common Docking*) con el motivo D (*Docking Domain*) de las MKPs (Bardwell, 2006). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio revelaron que la fosfatasa *Msg5* interacciona con *Fus3* y *Kss1* por medio de esta interacción canónica (Marín, 2009). Sin embargo, en la interacción de *Msg5* con la MAPK *Slf2* o la pseudoquinasa *Mlp1* tanto el motivo D como el CD resultan dispensables. Por ello, nuestros estudios han ido encaminados en primer lugar hacia la caracterización de las regiones de *Slf2* y *Mlp1* que median la unión con *Msg5*.

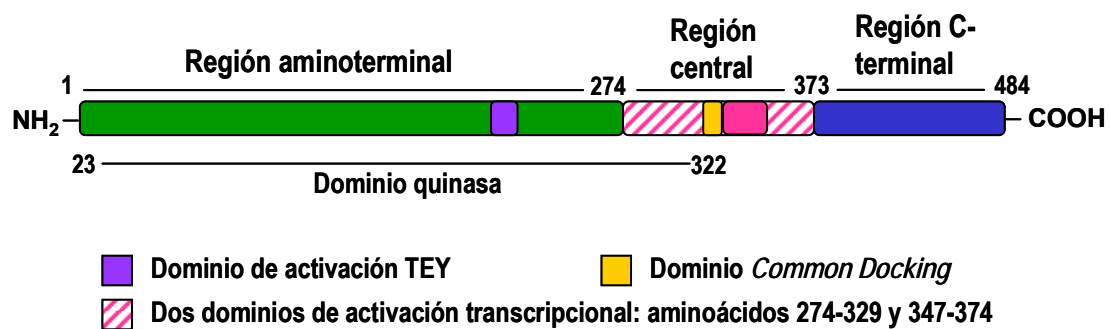
## **1.1 Análisis de las regiones de *Slf2* y *Mlp1* implicadas en la unión a *Msg5***

Con el fin de diseñar experimentos adecuados con los que pudiéramos mapear la región de *Slf2* que se une a *Msg5* se analizó previamente la secuencia aminoacídica de esta MAPK (Figura 12). El dominio catalítico o dominio quinasa se encuentra en la región aminoterminal de la proteína comprendiendo aproximadamente los primeros 320 aminoácidos. En él se localiza el dominio de activación (TEY) que se fosforila en los residuos de Thr<sup>190</sup> y Tyr<sup>192</sup> por las MAPKs *Mkk1* y *Mkk2* (Lee *et al.*, 1993). El dominio *Common Docking* (CD) con el que *Slf2* interacciona con algunas proteínas como *Rlm1* (Jung *et al.*, 2002) se encuentra al final del dominio quinasa. En concreto, los aminoácidos esenciales que componen el CD serían los residuos ácidos D<sup>323</sup>, D<sup>326</sup> y E<sup>327</sup>. Además, esta MAPK posee dos dominios de activación transcripcional en dos regiones cercanas al dominio CD (Kim *et al.*, 2007). Por último, *Slf2* consta de una extensión carboxiterminal, también presente en su ortólogo en humanos ERK5, de la que carecen el resto de MAPKs de tipo p38, ERK1/2 o JNK.

Para llevar a cabo el análisis de las regiones de *Slf2* implicadas en la interacción con *Msg5* se construyeron diferentes versiones truncadas de *Slf2* basadas en la división de esta MAPK en tres

partes: la región aminoterminal (aminoácidos 1-273) que incluye los primeros 10 subdominios conservados en proteínas quinasas y por tanto casi la totalidad del dominio catalítico, la región central (aminoácidos 274-373) que porta el subdominio XI de proteínas quinasas, el dominio CD y los dos dominios de activación transcripcional y la extensión carboxiterminal (aminoácidos 374-484) exclusiva de esta MAPK y ausente en Kss1, Fus3 y Hog1 (Figura 12).

M<sup>1</sup>ADKIERHTFKVFNQDFSVDKRFQLIKEIGHGAYGIVCSARFAEAAEDTTVA  
 IKKVTNVFSKTLCKRSLRELKLLRHFRGHKNITCLYDMDIVFYPDGSINGLYL  
 YEELMECDMHQIIKSGQPLTDAHYQSFTYQILCGLKYIHSADVLHRDLKPGN  
 LLVNADCQLKICDFGLARGYSENPVENSQFL<sup>189</sup>TEY<sup>192</sup>VATRWRAPPEIMLS  
 YQGYTKAIDVWSAGCILAFLGKPIFKGKDYVNQLNQLQVLGTPPETLR  
 RIGSKNVQDYIHLGF<sup>274</sup>IPKVPFVNLYPNANSQALDLLEQMLAFDPQKRITV  
 DEALEHPYLSIWH<sup>322</sup>DPADE<sup>327</sup>PVCSEKFEFSFESVNDMEDLKQMVIVQEVQD  
 FRLFVRQPLLEEQRQL<sup>373</sup>QLQQQQQQQQQQQQQQQQPSDVDNGNAAAS  
 EENYPKQMATSNSVAPQQESFGIHSQNLPRHDADFPFRPQESMMEMRPA  
 TGNTADIPPQNDNGTLLDLEKELEFGLDRKYF<sup>484</sup>



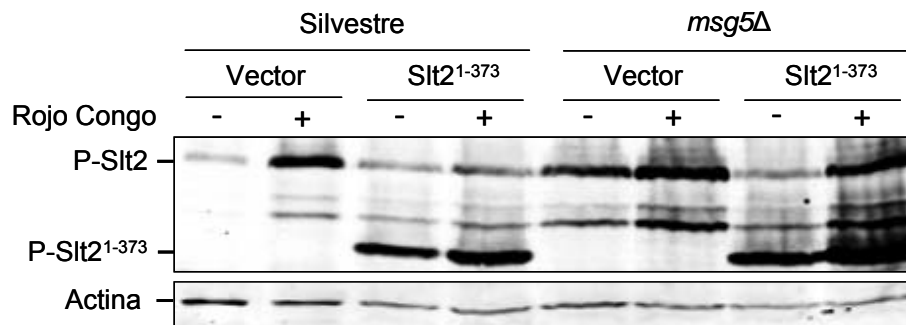
**Figura 12. Secuencia aminoacídica y representación esquemática de la MAPK Sit2.**

Se muestran en color verde, rosa y azul las regiones aminoterminal, central y carboxiterminal de Sit2. Los aminoácidos marcados en morado corresponden al dominio de activación mientras que los coloreados en amarillo identifican al dominio CD. Los dominios de activación transcripcional se representan en rayas rosas y blancas.

### 1.1.1 La extensión C-terminal de Sit2 es dispensable para su unión a Msg5

Como hemos comentado previamente, la MAPK Sit2 y su ortólogo en humanos ERK5 constan en su estructura de una extensión carboxiterminal que las caracteriza y diferencia claramente de las MAPKs de tipo p38, ERK1/2 o JNK. Se ha descrito que una versión de Sit2 que carece de esta extensión (Sit2<sup>394-484</sup>) presenta un incremento en los niveles de fosforilación de Sit2 (Levin-Salomon *et al.*, 2009). Una posible explicación de este hecho sería que esta región podría estar mediando la interacción con algún regulador negativo. Por tanto, decidimos estudiar el efecto de Msg5 en la fosforilación de una versión truncada de Sit2 que carece de dicha extensión C-terminal (Sit2<sup>1-373</sup>). Para ello, se analizó la fosforilación de esta versión truncada de Sit2 tanto en

una cepa silvestre como en una cepa mutante *msg5Δ*. Se utilizaron anticuerpos comerciales anti-fosfo-p44/42 que reconocen la forma doblemente fosforilada en el dominio de activación, y por tanto activa, de la MAPK Slt2 (Martin *et al.*, 2000).



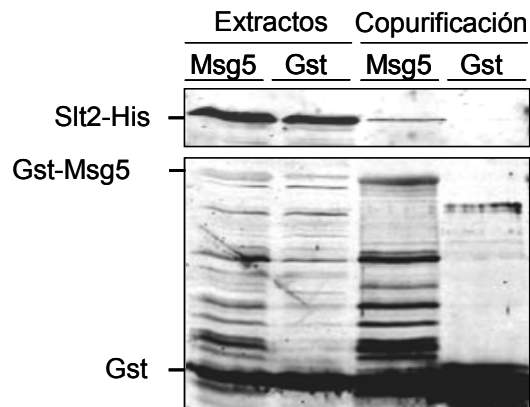
**Figura 13. Análisis del efecto de Msg5 en la fosforilación de la versión truncada de Slt2 (Slt2<sup>1-373</sup>).**

La cepa silvestre BY4741 y la cepa mutante isogénica *msg5Δ* (Y07373) se transformaron con el vector vacío YCplac111 o con el plásmido YCplac111-SLT2<sup>1-373</sup>. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 2 horas, según se indica (+). Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2 y actina como control de carga.

Como se observa en la figura 13, la versión corta de Slt2 (Slt2<sup>1-373</sup>) mostró niveles de fosforilación más altos que la versión silvestre de Slt2 tanto en condiciones basales como de activación de la MAPK en presencia de rojo Congo (un agente que altera la pared celular y activa la ruta CWI). Además, los niveles de fosforilación de ambas formas de Slt2 se incrementaron en una cepa *msg5Δ*. Este resultado sugiere que Msg5 es capaz de regular negativamente a una versión truncada de Slt2 (Slt2<sup>1-373</sup>) y, por tanto, que la extensión C-terminal de Slt2 es dispensable en su interacción con Msg5. Puesto que la versión truncada de Slt2 presenta una fosforilación incrementada que es independiente de la presencia de Msg5 es posible que la larga cola del extremo C-terminal de Slt2 tenga una función autoinhibitoria como habían sugerido previamente otros autores para ERK5 (Buschbeck *et al.*, 2005).

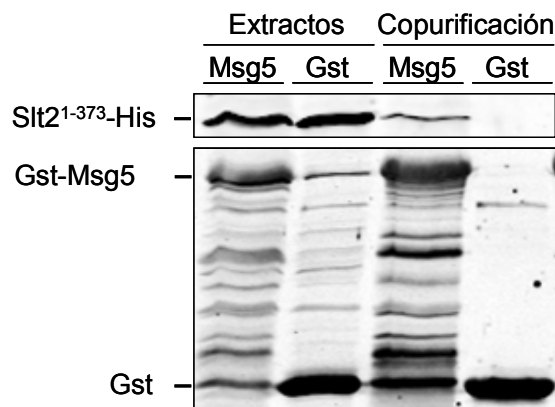
Dado que la MAPK Slt2 tiene la capacidad de interactuar consigo misma y dimerizar (Kim *et al.*, 2007), cabía la posibilidad de que el efecto de Msg5 sobre la versión truncada Slt2<sup>1-373</sup> estuviera facilitado por la presencia de la proteína endógena completa. Por tanto, decidimos confirmar el resultado anterior y profundizar en el estudio de las regiones de Slt2 implicadas en la interacción con Msg5 mediante ensayos de interacción de proteínas en un sistema *in vitro*. Es decir, expresando individualmente tanto Msg5 como las diferentes versiones de Slt2 en *E. coli*,

extrayendo las proteínas recombinantes y realizando los ensayos de copurificación sobre la mezcla de extractos proteicos obtenidos.



**Figura 14. Ensayo de copurificación *in vitro* de Slt2-His con la proteína de fusión Gst-Msg5.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E. coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX6-P1-MSG5 o pET15b-SLT2 que expresan Gst, Gst-Msg5 y Slt2-His respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst o Gst-Msg5 se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Slt2-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Msg5 y anti-poly-His para comprobar la presencia de Slt2-His.



**Figura 15. Ensayo de copurificación *in vitro* de Slt2<sup>1-373</sup>-His con la proteína de fusión Gst-Msg5.**

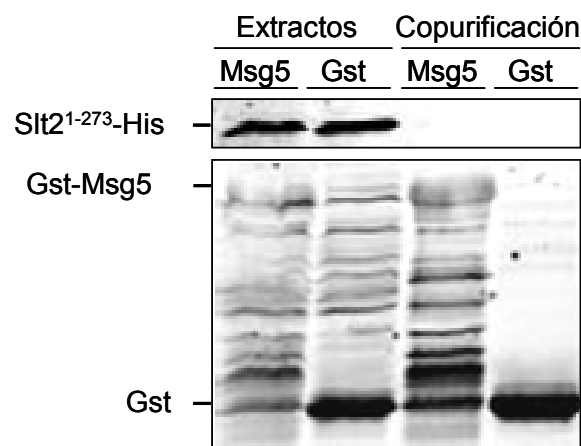
Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E. coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX6-P1-MSG5 o pET15b-SLT2<sup>1-373</sup> que expresan Gst, Gst-Msg5 y Slt2<sup>1-373</sup>-His respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst o Gst-Msg5 se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Slt2<sup>1-373</sup>-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Msg5 y anti-poly-His para comprobar la presencia de la versión truncada Slt2<sup>1-373</sup>-His.

En primer lugar se comprobó la idoneidad de este sistema con un ensayo de copurificación entre las proteínas completas Msg5 y Slt2. En la figura 14 se muestra que las proteínas recombinantes Slt2-His y Gst-Msg5 son capaces de interactuar en un ensayo *in vitro* a diferencia de lo que ocurre con la proteína Gst sola, incapaz de retener a Slt2-His (control negativo). Seguidamente

se realizó un segundo ensayo de copurificación *in vitro* del mismo tipo que el anterior en el que se comprobó que la versión truncada Sl2<sup>1-373</sup>-His interacciona con Gst-Msg5 (Figura 15). De esta forma corroboramos que Sl2 no se une a Msg5 a través de su extensión carboxiterminal.

### 1.1.2 La región N-terminal de Sl2 no interacciona con Msg5

En la región aminoterminal de las MAPKs se encuentra su dominio quinasa. Con el fin de comprobar si esta región de Sl2 es importante en la unión a Msg5 se realizó un ensayo de copurificación *in vitro* entre la versión truncada Sl2<sup>1-273</sup> y Msg5. La figura 16 muestra que los 273 primeros aminoácidos de Sl2 no copurificaron con Msg5.



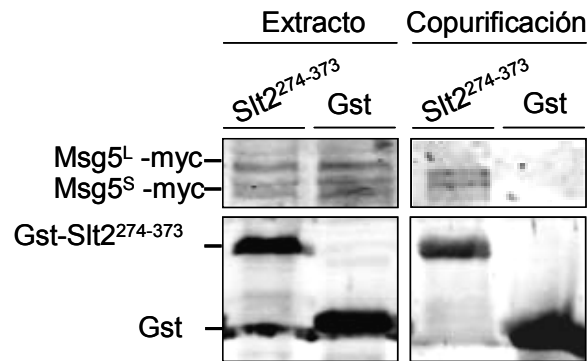
**Figura 16. Ensayo de copurificación *in vitro* de Sl2<sup>1-273</sup>-His con la proteína de fusión Gst-Msg5.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX6-P1-MSG5 o pET15b-SLT2<sup>1-273</sup> que expresan Gst, Gst-Msg5 y Sl2<sup>1-273</sup>-His respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst o Gst-Msg5 se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Sl2<sup>1-273</sup>-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Msg5 y anti-poly-His para comprobar la presencia de la versión truncada Sl2<sup>1-273</sup>-His.

### 1.1.3 La región 274-373 de Sl2 media la unión a Msg5 de forma independiente al motivo *Common Docking* de la MAPK

A la vista de los resultados anteriores, si los extremos amino y carboxiterminales de Sl2 son dispensables para la interacción con Msg5, la región central de esta MAPK comprendida entre los aminoácidos 274 y 373 debería ser capaz por sí sola de unir a Msg5.

Para comprobar esta hipótesis se llevó a cabo en primer lugar un ensayo de copurificación *in vivo* entre las proteínas Gst-Slt2<sup>274-373</sup> y Msg5-myc procedentes de extractos proteicos de levadura. Los resultados de dicho experimento muestran que las dos isoformas de Msg5, tanto la forma larga (Msg5<sup>L</sup>-myc) como la forma corta (Msg5<sup>S</sup>-myc) se unen al fragmento Slt2<sup>274-373</sup> que está fusionado a Gst mientras que no lo hacen a Gst sólo (Figura 17).



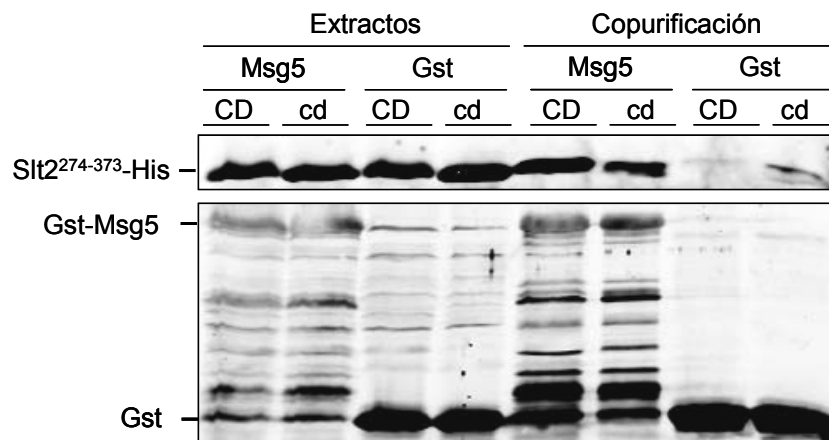
**Figura 17. Ensayo de copurificación *in vivo* de Msg5-myc con el fragmento Gst-Slt2<sup>274-373</sup>.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en los ensayos de copurificación *in vivo* con una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*). La cepa YMF1 (1783 Msg5-myc) se transformó con los plásmidos pEG(KG) y pEG(KG)-SLT<sup>274-373</sup>, que expresan Gst y Gst-Slt2<sup>274-373</sup> respectivamente. Las células se cultivaron en medio líquido selectivo sin uracilo utilizando como fuente de carbono rafinosa al 1,5%. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Gst y Gst-Slt2<sup>274-373</sup> mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Se utilizaron anticuerpos anti-myc para detectar Msg5-myc y anti-Gst para analizar la presencia del fragmento Gst-Slt2<sup>274-373</sup>.

Seguidamente se realizó un ensayo de copurificación *in vitro* con el objetivo de confirmar que dicha interacción entre Msg5 y el fragmento Slt2<sup>274-373</sup> se produce de manera directa, sin ninguna proteína intermediaria. Por otro lado, este fragmento de Slt2 contiene el dominio CD. Ensayos previos de nuestro equipo de investigación utilizando el sistema de dos híbridos revelaron que el dominio CD de Slt2 es dispensable para la unión a Msg5 (Marín, 2009). Decidimos corroborar estos resultados a través estudios de copurificación *in vitro* utilizando un fragmento de Slt2 en el que los aminoácidos ácidos del CD (aspárticos y glutámico) se sustituyeron por aminoácidos básicos (asparraginas), un cambio que conlleva la pérdida de su capacidad de unión con los aminoácidos básicos presentes en los motivos D de las proteínas que interaccionan con MAPKs (Tanoue *et al.*, 2000).

La figura 18 muestra que ambos fragmentos de Slt2, tanto el que expresa la versión silvestre (Slt2<sup>274-373</sup>-CD-His) como el que expresa el fragmento con una mutación en el dominio CD (Slt2<sup>274-373</sup>-cd-His) copurifican con la proteína recombinante Gst-Msg5 en un ensayo *in vitro*, lo que confirma que esos 100 aminoácidos de la región central de Slt2 son suficientes para su unión a

Msg5 y que el dominio *Common Docking* de la MAPK no está involucrado en la interacción con esta MKP.



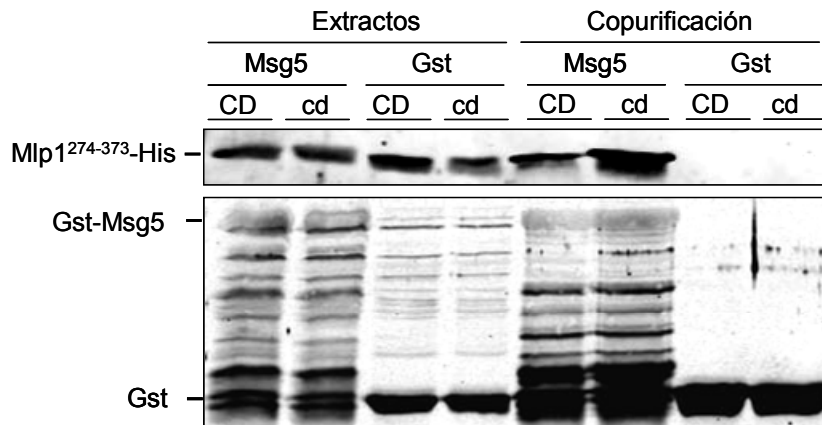
**Figura 18. Ensayo de copurificación *in vitro* de los fragmentos Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His y Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His con la proteína de fusión Gst-Msg5.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX6-P1-MSG5, pET15b-SLT2<sup>274-373-CD</sup> o pET15b-SLT2<sup>274-373-cd</sup> que expresan Gst, Gst-Msg5, Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His (versión silvestre) y Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His (Slt2<sup>274-373-D323N,D326N,E327N</sup>) respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst o Gst-Msg5 se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His o Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Msg5 y anti-poly-His para comprobar la presencia de Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His y Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His.

#### 1.1.4 La región 274-373 de Mlp1 media la unión a Msg5 de forma independiente al motivo *Common Docking* de la pseudoquinasa

La proteína Mlp1 es una pseudoquinasa, codificada por un gen parálogo de *SLT2*, surgida de una duplicación ancestral del genoma de *S. cerevisiae*. Presenta un elevado grado de similitud (53% de su secuencia) con Slt2. Sin embargo, carece del motivo de activación característico conservado en las MAPK (TXY) y de otros dominios esenciales para la actividad catalítica. A pesar de ello, Mlp1 consta de un dominio CD que le permite interaccionar con sustratos típicos de Slt2 como Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1997). Debido a dicha similitud entre Slt2 y Mlp1 nos interesó comprobar si esta pseudoquinasa era capaz de interaccionar con Msg5 de la misma manera que Slt2. Estudios de nuestro laboratorio previos a la realización de esta tesis doctoral demostraron a través del sistema de dos híbridos que Mlp1 y Msg5 interaccionan y que el CD de Mlp1 es dispensable en esta unión (Marín, 2009). Por tanto, decidimos comprobar si Msg5 se une a un fragmento de Mlp1 equivalente al fragmento de 100 aminoácidos de Slt2 que hemos acotado y confirmar a su vez que el CD no está involucrado.

El ensayo de copurificación *in vitro* entre las proteínas recombinantes Gst-Msg5 y Mlp1<sup>274-373</sup>-CD-His (versión silvestre) o Mlp1<sup>274-373</sup>-cd-His (versión mutada en el dominio CD) reveló que que ambos fragmentos interaccionan con Gst-Msg5. De esta forma se delimitó la zona de interacción de Mlp1 con Msg5 a 100 aminoácidos en posición central (aminoácidos 274-373) y además se confirmó que esta unión no es dependiente del CD de la pseudoquinasa.



**Figura 19. Ensayo de copurificación *in vitro* de los fragmentos Mlp1<sup>274-373</sup>-CD-His y Mlp1<sup>274-373</sup>-cd-His con la proteína de fusión Gst-Msg5.**

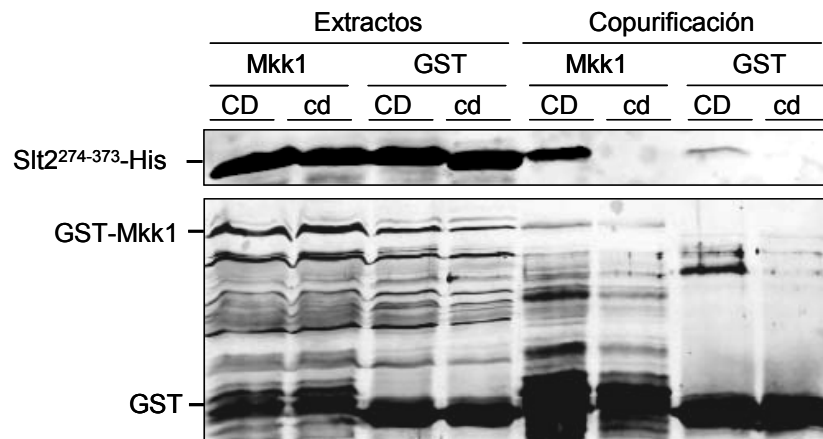
Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX6-P1-MSG5, pET15b-MLP<sup>1274-373</sup>-CD o pET15b-MLP<sup>1274-373</sup>-cd que expresan Gst, Gst-Msg5, Mlp1<sup>274-373</sup>-CD-His (versión silvestre) y Mlp1<sup>274-373</sup>-cd-His (Mlp1<sup>274-373</sup>-D326N) respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst o Gst-Msg5 se incubaron en presencia de una matriz de glutatión (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Mlp1<sup>274-373</sup>-CD-His o Mlp1<sup>274-373</sup>-cd-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Msg5 y anti-poly-His para comprobar la presencia de Mlp1<sup>274-373</sup>-CD-His y Mlp1<sup>274-373</sup>-cd-His.

### 1.1.5 La región 274-373 de Slt2 media la unión a Mkk1 de manera dependiente del motivo *Common Docking*

Se ha descrito que la mutación del motivo LXL de la MAPKK Mkk2 conduce a una pérdida de unión con Slt2 (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007). Como se ha comentado previamente, el motivo LXL forma parte del dominio D (*docking domain*) por medio del cual muchas proteínas interaccionan con el motivo CD de las MAPKs.

El siguiente experimento de copurificación *in vitro* se realizó con objeto de comprobar si la misma región de Slt2 que interacciona con Msg5 (Slt2<sup>274-373</sup>) es capaz de unirse a Mkk1 y, además, si esta interacción es dependiente del dominio CD de la MAPK. Como se observa en la figura 20, el fragmento Slt2<sup>274-373</sup>-CD-His es suficiente para copurificar Gst-Mkk1 pero, a diferencia de lo que

ocurre con Msg5, la interacción es dependiente del dominio CD de la MAPK puesto que Gst-Mkk1 no copurificó con la versión mutante Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His.



**Figura 20. Ensayo de copurificación *in vitro* de los fragmentos Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His y Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His con la proteína de fusión Gst-Mkk1.**

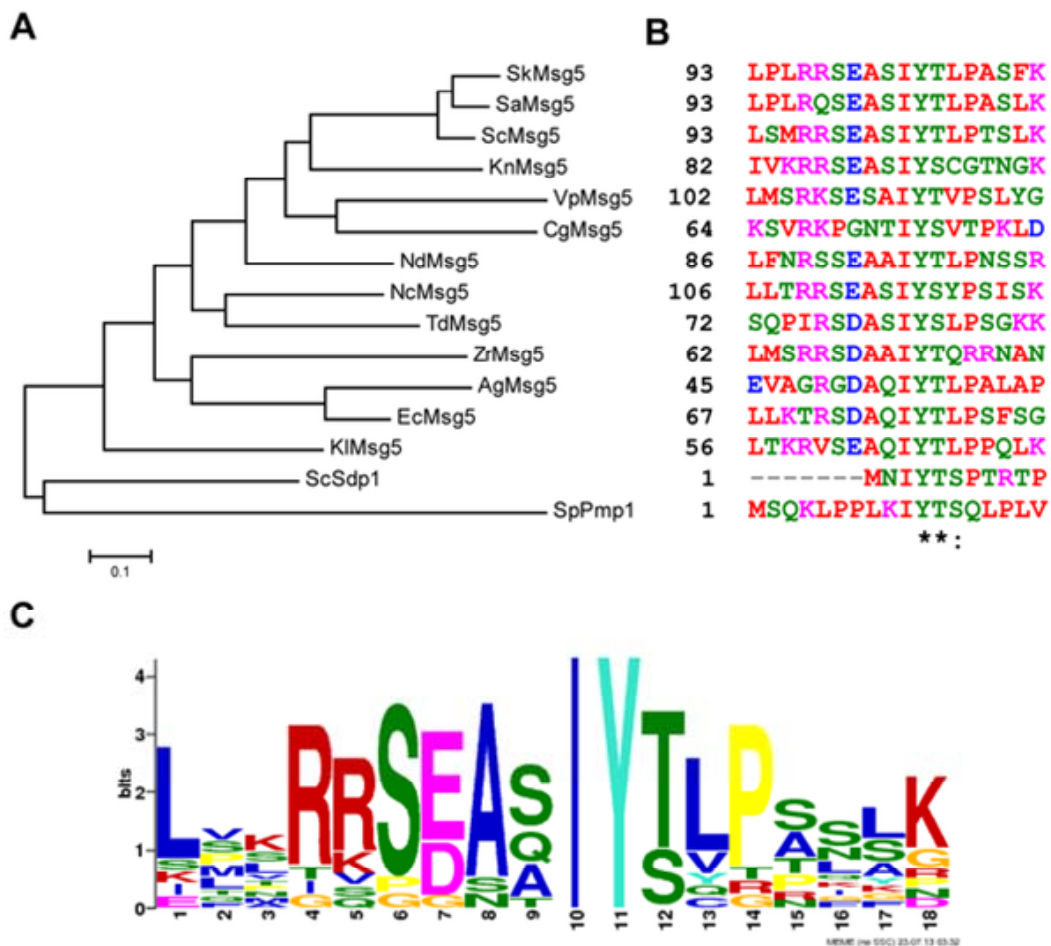
Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX(KG)-MKK1, pET15b-SLT<sup>274-373-CD</sup> o pET15b-SLT<sup>274-373-cd</sup> que expresan Gst, Gst-Mkk1, Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His (versión silvestre) y Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His (Slt2<sup>274-373-D323N,D326N,E327N</sup>) respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst o Gst-Msg5 se incubaron en presencia de una matriz de glutatión (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His o Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Mkk1 y anti-poly-His para comprobar la presencia de Slt2<sup>274-373-CD</sup>-His y Slt2<sup>274-373-cd</sup>-His.

## **1.2 Caracterización de la función del motivo IYT de Msg5 y Sdp1 en la ruta de integridad celular**

### **1.2.1 Identificación del motivo IYT en fosfatasa de especificidad dual de distintas especies de hongos**

La interacción canónica más conocida entre MAPKs y MKPs requiere de la presencia del motivo CD de la quinasa y del motivo D de la fosfatasa dual (Bardwell 2006). Sin embargo, hemos comprobado en el apartado anterior que el motivo CD de Slt2 y Mlp1 es totalmente dispensable para su unión a Msg5 mientras que su presencia es clave para la interacción con Fus3 y Kss1 (Remenyi *et al.*, 2005). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio mostraron que una versión de Msg5 que carece del motivo D es incapaz de interactuar con Fus3 y Kss1 mientras que sí lo hace con Slt2 y Mlp1, y que los determinantes moleculares que median esta unión

residen en los primeros 123 aminoácidos de Msg5 (Marín, 2009). Estos datos sugieren que esta MKP regula negativamente distintas MAPKs a través de mecanismos diferentes.



**Figura 21. Conservación del motivo IYT en fosfatasa de especificidad dual de distintas especies de hongos.**

(A) Dendrograma de las secuencias aminoacídicas completas de las fosfatasa de especificidad dual Msg5 y Sdp1 de *S. cerevisiae* (Sc) y sus ortólogos en distintas especies fúngicas: *S. kudriavzevii* (Sk), *S. arboricola* (Sa), *K. naganishii* (Kn), *V. polyspora* (Vp), *C. glabrata* (Cg), *N. dairenensis* (Nd), *N. castellii* (Nc), *T. delbrueckii* (Td), *Z. rouxii* (Zr), *A. gossypii* (Ag), *E. cymbalariae* (Ec), *K. lactis* (Kl) y *S. pombe* (Sp). (B) Alineamiento múltiple de la región que contiene el motivo IYT de las mismas fosfatasa duales que en la figura (A). Las secuencias se procesaron utilizando los programas Mega 5.1 (A) y ClustalW (B). Los residuos conservados se señalan con puntos mientras que los residuos idénticos se muestran con asteriscos. En rojo aminoácidos pequeños e hidrofóbicos incluyendo aromáticos menos tirosina; en azul aminoácidos ácidos; en magenta aminoácidos básicos; en verde aminoácidos con grupo hidroxilo, sulfidriilo o amino. (C) Secuencia consenso del motivo IYT generada a través del programa MEME a partir de las secuencias mostradas en (B). La altura global indica la conservación de la secuencia en esa posición mientras que la altura de cada símbolo o letra refleja la relativa frecuencia de cada aminoácido en esa posición. En rojo, rosa, azul y verde se muestran aminoácidos básicos, ácidos, hidrofóbicos y polares respectivamente. En verde claro aminoácidos aromáticos, en amarillo claro las prolinas y en amarillo oscuro la glicina.

La fosfatasa de especificidad dual Sdp1 regula exclusivamente la ruta de integridad celular actuando sobre Slf2 (Hahn y Thiele, 2002). Sdp1 es mucho más corta en su estructura que Msg5 (209 aminoácidos *versus* 489). Carece del extremo aminoterminal regulatorio donde reside el motivo D de las MKPs. A la vista de estos hechos todo parecía indicar que Msg5 y Sdp1 podrían compartir un mismo motivo de interacción con Slf2. Decidimos por tanto buscar regiones con similitud en la secuencia aminoacídica de Msg5, Sdp1 y sus ortólogos funcionales en otras especies fúngicas (Figura 21A): *Saccharomyces kudriavzevii*, *Saccharomyces arboricola*, *Kazachstania naganishii*, *Vanderwaltozyma polyspora*, *Candida glabrata*, *Naumovozyma dairenensis*, *Naumovozyma castellii*, *Torulaspota delbrueckii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, *Ashbya gossypii*, *Eremothecium cymbalariae*, *Kluyveromyces lactis* y *Schizosaccharomyces pombe*.

El alineamiento realizado usando el programa ClustalW (Figura 21B) reveló la presencia de tres aminoácidos muy conservados en todas las secuencias aminoacídicas. Se trata de un residuo de isoleucina, seguido de un residuo de tirosina y en tercera posición un residuo de treonina (en la mayoría de las proteínas analizadas) o serina. Se generó una secuencia consenso de este motivo IYT usando el programa NEME (Figura 21C) a partir de las secuencias mostradas en la figura 21b. En ella podemos de nuevo observar que los residuos de isoleucina y tirosina son invariables ya que están presentes en todas las secuencias analizadas. Parece importante destacar también que el motivo IYT suele estar precedido de aminoácidos básicos (arginina) y ácidos (aspártico o glutámico).

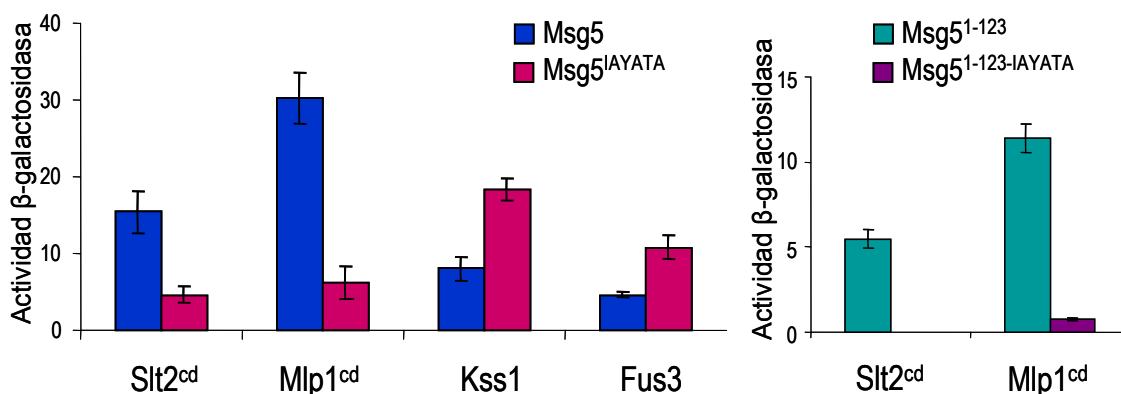
A la vista del dendograma (Figura 21A) podemos afirmar que entre las fosfatasas duales que portan el motivo IYT (o IYS) se encuentran proteínas muy alejadas filogenéticamente de Msg5, como la MKP Pmp1 de la levadura de fisión *S. pombe*. El hecho de que el motivo IYT esté conservado en fosfatasas duales de especies de hongos tan diversas sugería que podría estar ejerciendo una función importante en la interacción de Msg5 y Sdp1 con Slf2 y Mlp1.

### 1.2.2 El motivo IYT de Msg5 media la interacción con Slf2 y Mlp1

En primer lugar decidimos estudiar la importancia del motivo IYT de Msg5 en la interacción con Slf2 y Mlp1 realizando un ensayo de dos híbridos basado en el factor de transcripción Gal4. En este sistema las proteínas de estudio se fusionan al dominio de unión a DNA BD (*Binding Domain*) y al dominio de activación de la transcripción AD (*Activation Domain*) de Gal4. Sólo cuando las proteínas interaccionan los dos dominios de los que se compone este factor de transcripción se encuentran y este hecho da lugar a la expresión del gen *lacZ*.

En nuestro ensayo de dos híbridos se sustituyeron los residuos conservados I<sup>102</sup>, Y<sup>103</sup> y T<sup>104</sup> por alaninas tanto en la forma completa de Msg5 (Msg5<sup>IAYATA</sup>) como en el fragmento aminoterminal (Msg5<sup>1-123-IAYATA</sup>) y se estudió su unión a las MAPKs Fus3, Kss1 y a las versiones de Slf2 y Mlp1 en las que su motivo CD se encuentra mutado: Slf2<sup>cd</sup> (Slf2<sup>D323N,D326N,E327N</sup>) y Mlp1<sup>cd</sup> (Mlp1<sup>D326N</sup>).

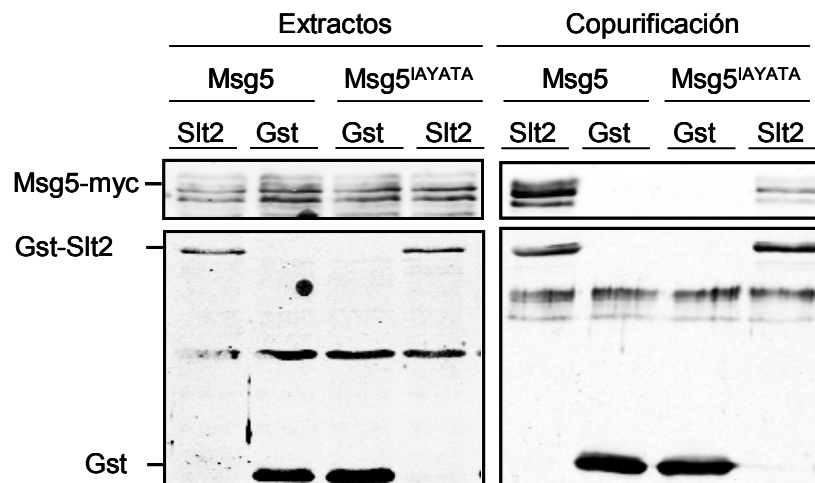
Los resultados reflejados en la figura 22 muestran que las versiones de Msg5 que carecen del motivo IYT, ya sea en la proteína completa (Msg5<sup>IAYATA</sup>) o en un fragmento aminoterminal (Msg5<sup>1-123-IAYATA</sup>), no interactúan con Slf2<sup>cd</sup> o Mlp1<sup>cd</sup> puesto que en todos los casos se observa una reducción en la actividad β-galactosidasa. Sin embargo, las células que expresan Fus3 o Kss1 junto con la versión mutante de Msg5 (Msg5<sup>IAYATA</sup>) presentan incluso un incremento de actividad β-galactosidasa con respecto a las células que expresan la versión silvestre de Msg5. Este hecho confirma que el cambio a alaninas en el motivo IYT no reduce la capacidad de interacción de Msg5 con Fus3 y Kss1. Además, se comprobó mediante *western-blotting* que los niveles de expresión de la versión silvestre de Msg5 son similares a los de la versión mutante Msg5<sup>IAYATA</sup> (datos no mostrados). Por tanto, la mutación en tres aminoácidos (IYT) es lo que provoca la falta de interacción con Slf2<sup>cd</sup> o Mlp1<sup>cd</sup>. Además, en este experimento utilizamos las versiones de Slf2 y Mlp1 en las que su motivo CD se encuentra mutado con el objetivo de confirmar una vez más que el *Common Docking* no está implicado en la unión a Msg5 como ya habíamos mostrado previamente a través de experimentos de copurificación.



**Figura 22. Ensayo de interacción de Slf2<sup>cd</sup>, Mlp1<sup>cd</sup>, Kss1 y Fus3 con Msg5, Msg5<sup>IAYATA</sup>, Msg5<sup>1-123</sup> o Msg5<sup>1-123-IAYATA</sup> mediante el sistema de dos híbridos.**

La cepa PJ69-4A se transformó con el plásmido PGBKT7, PGBKT7-MSG5, PGBKT7-MSG5<sup>IAYATA</sup>, PGBKT7-MSG5<sup>1-123</sup> o PGBKT7-MSG5<sup>1-123-IAYATA</sup>. La cepa PJ69-4a se transformó con los plásmidos PGADT7, PGADT7-SLF2<sup>cd</sup> (Slf2<sup>D323N,D326N,E327N</sup>), PGADT7-MLP1<sup>cd</sup> (Mlp1<sup>D326N</sup>), PGADT7-KSS1 o PGADT7-FUS3. Tras el apareamiento de ambas cepas, se seleccionaron las células diploides que expresaban las proteínas indicadas en la figura mediante crecimiento en un medio carente de leucina y triptófano. Se analizó cuantitativamente la interacción entre dichas proteínas mediante el análisis de la actividad β-galactosidasa de los extractos de las células diploides sobre ONPG. Se representan los valores medios de actividad β-galactosidasa y la desviación estándar del análisis de tres transformantes independientes.

La relevancia del motivo IYT de Msg5 en su interacción con Slit2 se confirmó desarrollando de forma paralela ensayos de copurificación tanto *in vivo* como *in vitro*. En primer lugar, se expresaron Msg5 y Msg5<sup>IAYATA</sup> en levadura desde su propio promotor; de este modo se puede observar la presencia de las dos isoformas de esta MKP. En la figura 23 se muestra que la interacción entre Slit2 y Msg5 es mucho menor cuando el motivo IYT no está presente.

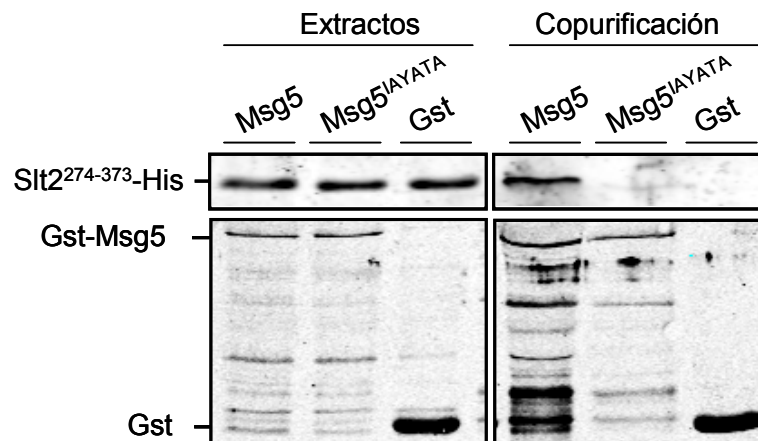


**Figura 23. Ensayo de copurificación *in vivo* de Msg5-myc y Msg5<sup>IAYATA</sup>-myc con la proteína de fusión Gst-Slit2.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en los ensayos de copurificación *in vivo* con una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*). La cepa DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con los plásmidos pEG(KG) y pEG(KG)-SLT2 que expresan Gst y Gst-Slit2 respectivamente y con el plásmido YCplac22-MSG5myc (que expresa la versión silvestre de Msg5) o YCplac22-MSG5<sup>IAYATA</sup>myc. Las células se cultivaron en medio líquido selectivo sin uracilo ni triptófano, utilizando como fuente de carbono rafinosa al 1,5%. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Gst-Slit2 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Se utilizaron anticuerpos anti-myc para detectar Msg5-myc y Msg5<sup>IAYATA</sup>-myc y anti-Gst para analizar la presencia de Slit2.

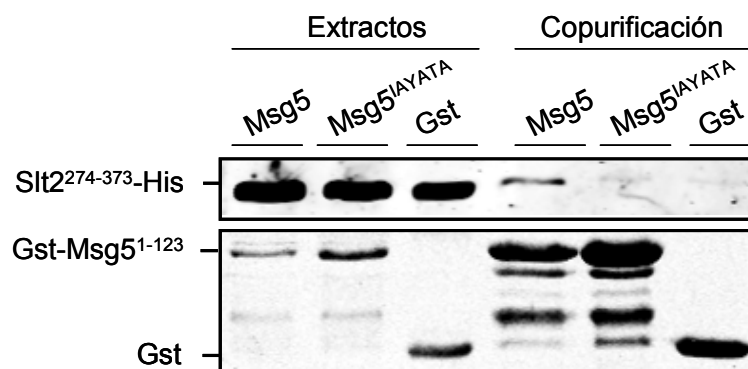
Se obtuvieron resultados más evidentes en los ensayos de copurificación *in vitro* que se muestran a continuación, en los que el motivo IYT resultó clave para la interacción. En ambos experimentos se utilizó el fragmento de 100 aminoácidos de Slit2 (Slit2<sup>274-373</sup>) que había demostrado previamente su interacción con Msg5. Además, nos interesó comprobar que tanto la proteína Msg5 completa como el fragmento aminoterminal de 123 aminoácidos utilizado en el ensayo de dos híbridos eran capaces de unir Slit2<sup>274-373</sup> de manera dependiente del motivo IYT en un ensayo *in vitro*. Como se observa en las figuras 24 y 25, el fragmento Slit2<sup>274-373</sup>-His copurificó con Gst-Msg5 y Gst-Msg5<sup>1-123</sup> pero no con Gst-Msg5<sup>IAYATA</sup> y Gst-Msg5<sup>1-123-IAYATA</sup>. Estos resultados son coherentes con los obtenidos en los ensayos previos (dos híbridos y

copurificación *in vivo*) y suponen otra evidencia más de la importancia del motivo IYT de Msg5 en su unión a Slit2.



**Figura 24. Ensayo de copurificación *in vitro* del fragmento Slit2<sup>274-373</sup>-His con las proteínas de fusión Gst-Msg5 y Gst-Msg5<sup>IAYATA</sup>.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX6-P1-MSG5, pGEX6-P1-MSG5<sup>IAYATA</sup> o pET15b-SLT2<sup>274-373</sup>-CD que expresan Gst, Gst-Msg5, Gst-Msg5<sup>IAYATA</sup> y Slit2<sup>274-373</sup>-His (versión silvestre) respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst, Gst-Msg5 o Gst-Msg5<sup>IAYATA</sup> se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Slit2<sup>274-373</sup>-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Msg5 y Gst-Msg5<sup>IAYATA</sup> y anti-poly-His para comprobar la presencia de Slit2<sup>274-373</sup>-His.

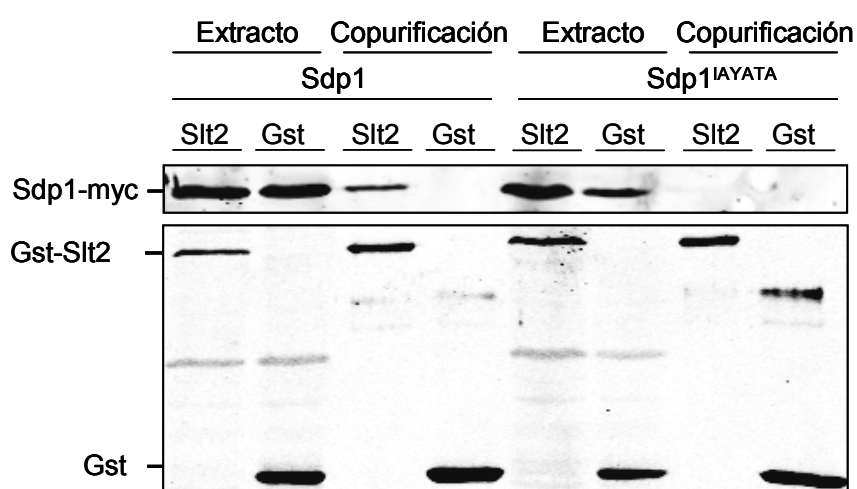


**Figura 25. Ensayo de copurificación *in vitro* del fragmento Slit2<sup>274-373</sup>-His con los fragmentos aminoterminales de fusión Gst-Msg5<sup>1-123</sup> y Gst-Msg5<sup>1-123</sup>-IAYATA.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pGEX6-P1-MSG5<sup>1-123</sup>, pGEX6-P1-MSG5<sup>1-123</sup>-IAYATA o pET15b-SLT2<sup>274-373</sup>-CD que expresan Gst, Gst-Msg5<sup>1-123</sup>, Gst-Msg5<sup>1-123</sup>-IAYATA y Slit2<sup>274-373</sup>-His (versión silvestre) respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst, Gst-Msg5<sup>1-123</sup> y Gst-Msg5<sup>1-123</sup>-IAYATA se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Slit2<sup>274-373</sup>-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Gst-Msg5<sup>1-123</sup> y Gst-Msg5<sup>1-123</sup>-IAYATA y anti-poly-His para comprobar la presencia de Slit2<sup>274-373</sup>-His.

### 1.2.3 El motivo IYT de Sdp1 media la interacción con Slit2 y Mlp1

Teniendo en cuenta los resultados logrados con Msg5 decidimos comprobar si el motivo IYT de Sdp1 se encuentra de igual forma implicado en la interacción con Slit2. Para ello, los residuos I<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup> y T<sup>5</sup> de esta fosfatasa fueron sustituidos por alaninas (Sdp1<sup>IAYATA</sup>) y se desarrolló un ensayo de copurificación *in vivo* con Slit2, expresando en la cepa silvestre Gst-Slit2 desde el promotor GAL1 y Sdp1-myc (versión silvestre) y Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc (versión mutante) a partir de su propio promotor. El resultado de la figura 26 muestra que, efectivamente, Sdp1-myc copurificó con Gst-Slit2 y no con Gst, mientras que Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc fue incapaz de unirse a esta MAPK.

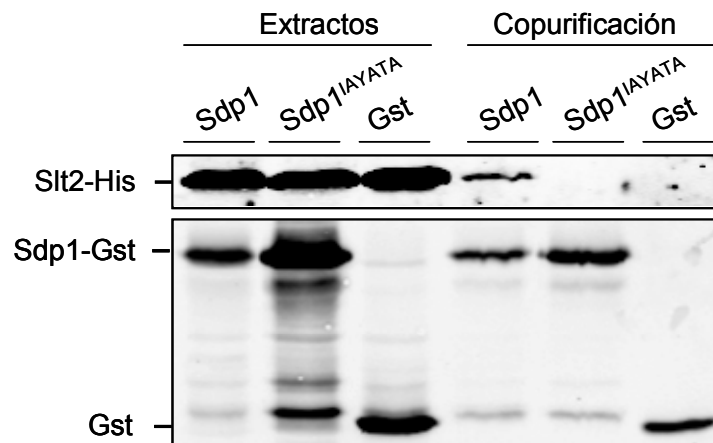


**Figura 26. Ensayo de copurificación *in vivo* de Sdp1-myc y Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc con la proteína de fusión Gst-Slit2.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en los ensayos de copurificación *in vivo* con una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*). La cepa YPH499 se transformó con los plásmidos pEG(KG) y pEG(KG)-SLT2 que expresan Gst y Gst-Slit2 respectivamente y con el plásmido YCplac22-SDP1myc o YCplac22-SDP1<sup>IAYATA</sup>myc. Las células se cultivaron en medio líquido selectivo sin uracilo ni triptófano, utilizando como fuente de carbono rafinosa al 1,5%. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Gst-Slit2 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Se utilizaron anticuerpos anti-myc para detectar Sdp1-myc y Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc y anti-Gst para analizar la presencia de Slit2.

Para confirmar la importancia del motivo IYT en la interacción de Sdp1 con Slit2 decidimos llevar a cabo un ensayo de copurificación *in vitro* (Figura 27). A diferencia de Msg5, el ORF de Sdp1 se clonó en fusión carboxiterminal a Gst ya que el motivo IYT se localiza en los primeros aminoácidos de la proteína y consideramos importante dejar estos residuos accesibles para su unión a la MAPK. Las proteínas recombinantes Slit2-His y Sdp1-Gst fueron capaces de interactuar *in vitro* a diferencia de lo que ocurrió con Sdp1<sup>IAYATA</sup>-Gst. Estos resultados, junto

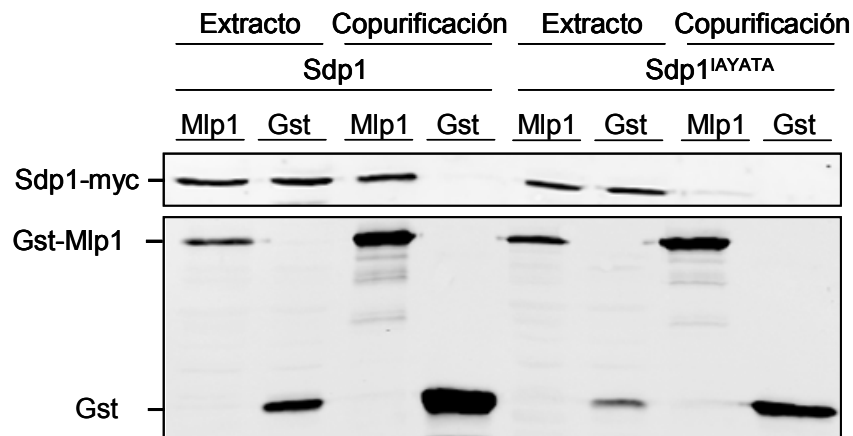
con los mostrados en la figura 26, corroboran que es el motivo IYT de Sdp1 el que media la unión de esta MKP a Slit2.



**Figura 27. Ensayo de copurificación *in vitro* de Slt2-His con las proteínas de fusión Sdp1-Gst y Sdp1<sup>IAYATA</sup>-Gst.**

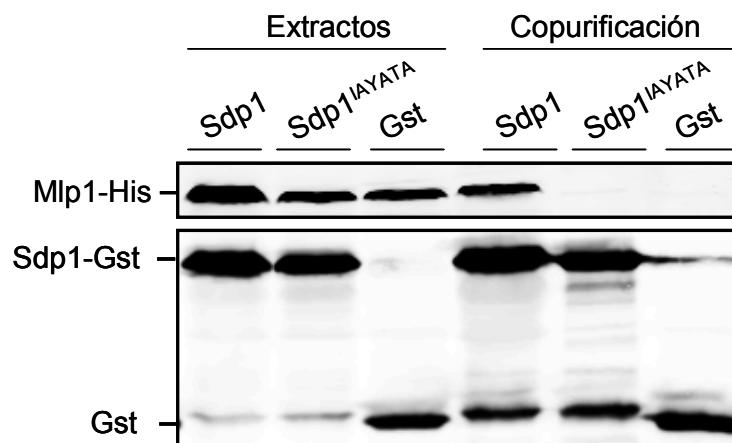
Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pETGEXCT-SDP1, pETGEXCT-SDP1<sup>IAYATA</sup> o pET15b-SLT2 que expresan Gst, Sdp1-Gst (versión silvestre), Sdp1<sup>IATAYA</sup>-Gst y Slt2-His respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst, Sdp1-Gst y Sdp1<sup>IATAYA</sup>-Gst se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Slt2-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Sdp1-Gst y Sdp1<sup>IATAYA</sup>-Gst y anti-poly-His para comprobar la presencia de Slt2-His.

Dado que Msg5 interacciona con Mlp1 a través del motivo IYT se podría pensar que Sdp1 pueda también unirse a esta pseudoquinasa y que, de hacerlo, utilice el mismo mecanismo. Con el fin de comprobar esta hipótesis se llevó a cabo un experimento de copurificación *in vivo* utilizando matrices de glutation que unen Gst o Gst-Mlp1 en extractos proteicos procedentes de levadura que contienen Sdp1-myc o Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc. En la figura 28 se muestra que Mlp1 y Sdp1 interaccionan físicamente y, además, que esta unión es dependiente del motivo IYT de la fosfatasa. Con objeto de verificar que dicha interacción se produce de manera directa, se realizó un ensayo de copurificación *in vitro*, mezclando extractos celulares procedentes de *E. coli* en los que se había inducido la expresión de forma individual de Sdp1-Gst, Sdp1<sup>IAYATA</sup>-Gst y Mlp1-His. En la figura 29, se puede apreciar que Mlp1-His queda retenido en la matriz de glutation en presencia de Sdp1-Gst pero no de Sdp1<sup>IAYATA</sup>-Gst o Gst. Los resultados de ambos experimentos sugieren que la presencia del motivo IYT es necesaria para que Sdp1 se una a Mlp1.



**Figura 28. Ensayo de copurificación *in vivo* de Sdp1-myc y Sdp1<sup>IA</sup>YATA-myc con la proteína de fusión Gst-Mlp1.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en los ensayos de copurificación *in vivo* con una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*). La cepa YPH499 se transformó con los plásmidos pEG(KG) y pEG(KG)-MLP1 que expresan Gst y Gst-Mlp1 respectivamente y con el plásmido YCplac22-SDP1myc o YCplac22-SDP1<sup>IA</sup>YATAmyc. Las células se cultivaron en medio líquido selectivo sin uracilo ni triptófano, utilizando como fuente de carbono rafinosa al 1,5%. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Gst-Mlp1 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Se utilizaron anticuerpos anti-myc para detectar Sdp1-myc y Sdp1<sup>IA</sup>YATA-myc y anti-Gst para analizar la presencia de Mlp1.



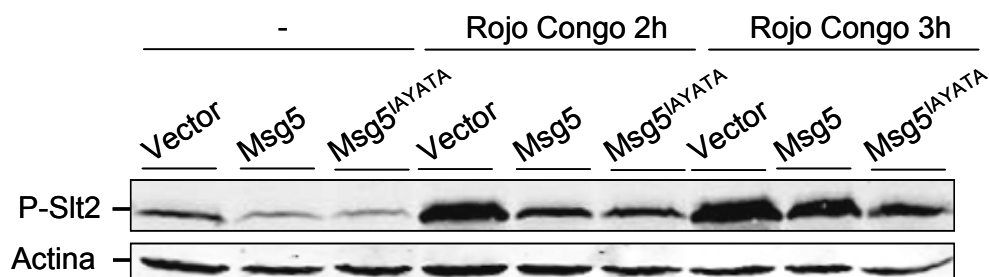
**Figura 29. Ensayo de copurificación *in vitro* de Mlp1-His con las proteínas de fusión Sdp1-Gst y Sdp1<sup>IA</sup>YATA-Gst.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. La cepa Rosetta DE3 de *E.coli* se transformó con los plásmidos pGEX(KG), pETGEXCT-SDP1, pETGEXCT-SDP1<sup>IA</sup>YATA o pET15b-MLP1 que expresan Gst, Sdp1-Gst (versión silvestre), Sdp1<sup>IA</sup>YATA-Gst y Mlp1-His respectivamente. Los extractos proteicos que contienen Gst, Sdp1-Gst y Sdp1<sup>IA</sup>YATA-Gst se incubaron en presencia de una matriz de glutation (*Glutathione Sepharose*) junto con aquellos extractos que contienen Mlp1-His. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para detectar Sdp1-Gst y Sdp1<sup>IA</sup>YATA-Gst y anti-poly-His para comprobar la presencia de Mlp1-His.

### 1.2.3 Efecto de la ausencia del motivo IYT de Msg5 sobre la ruta de integridad celular

#### 1.2.3.1 La mutación del motivo IYT de Msg5 no afecta a la fosforilación de Slit2 ni a la expresión de genes dependientes de la ruta CWI en presencia de rojo Congo

Hasta el momento hemos comprobado que el motivo IYT es esencial para que la interacción entre Msg5 y Slit2 tenga lugar. A continuación nos planteamos analizar la relevancia del motivo IYT en la función de Msg5 sobre la ruta de integridad celular. Con el fin de conocer cuáles son las consecuencias fisiológicas de la unión mediada por el motivo IYT, estudiamos el comportamiento del mutante  $\text{Msg5}^{\text{IAYATA}}$  basándonos en los diferentes fenotipos que exhibe el mutante de delección  $\text{msg5}\Delta$ . Como se ha comentado en la introducción, la delección de  $\text{MSG5}$  se traduce en un incremento de los niveles de fosfo-Slt2, incluso en condiciones basales (Martin *et al.*, 2000).

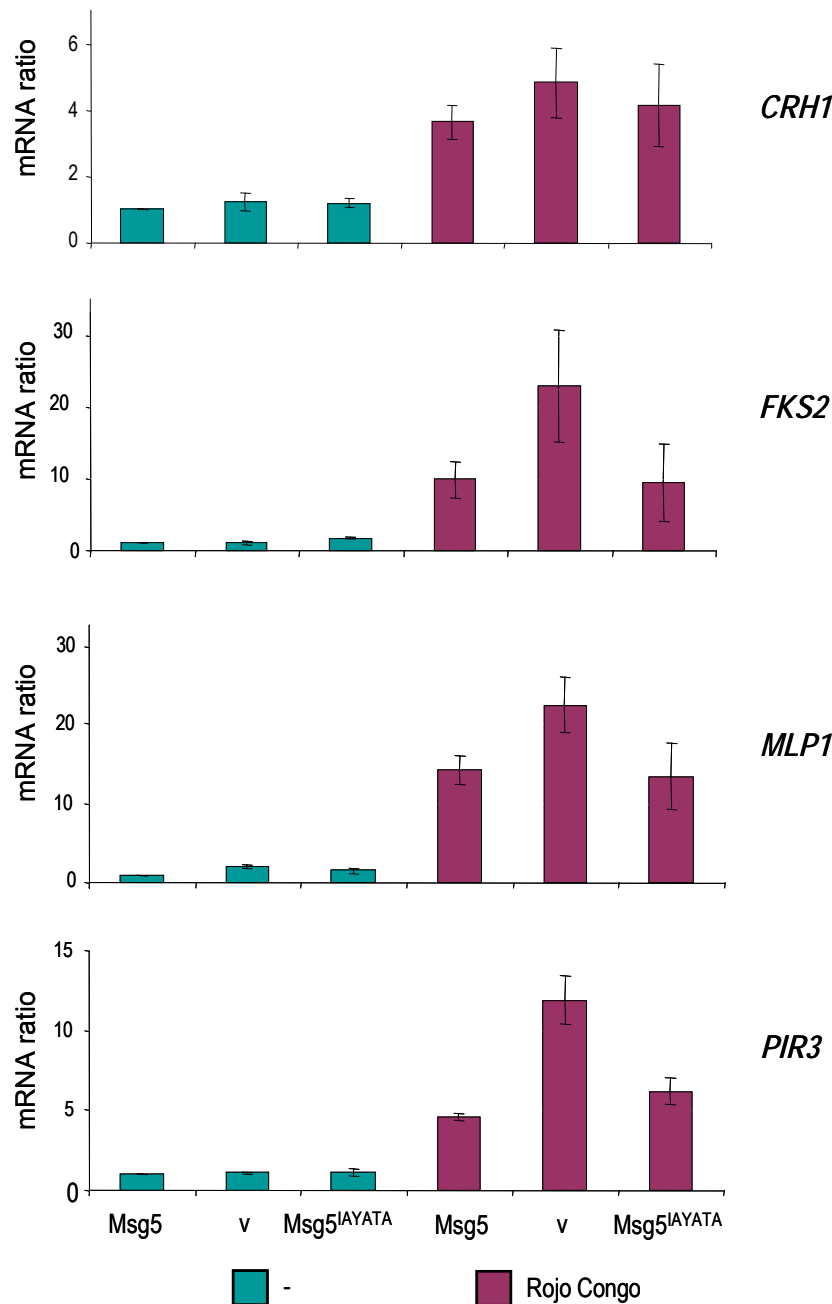


**Figura 30. Efecto de la ausencia del motivo IYT de Msg5 en los niveles de fosforilación de Slit2.**

La cepa mutante DD1-2D ( $\text{msg5}\Delta$ ) se transformó con el vector vacío YCplac22 o con los plásmidos YCplac22- $\text{MSG5}^{\text{myc}}$  o YCplac22- $\text{MSG5}^{\text{IAYATA}^{\text{myc}}}$ . Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPDA y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 2 o 3 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2 y anti-actina como control de carga.

En primer lugar se analizaron los niveles de la MAPK Slit2 fosforilada en un mutante  $\text{msg5}\Delta$  y se compararon con los de esta cepa expresando la versión silvestre de Msg5 o la versión mutante en la que los residuos del motivo IYT están sustituidos por alaninas. En la figura 30 se observa que, en condiciones basales y de estimulación de la ruta de integridad por rojo Congo, tanto las células que expresan la versión silvestre  $\text{Msg5}^{\text{myc}}$  como las que expresan la versión mutante  $\text{Msg5}^{\text{IAYATA}^{\text{myc}}}$  muestran menores niveles de Slit2 fosforilado que aquellas que carecen de Msg5. A pesar de que el motivo IYT es importante para que Msg5 interaccione con Slit2 no se apreciaron diferencias en los niveles de MAPK fosforilada entre las células transformadas con los plásmidos que portan cada una de las versiones de Msg5.

A continuación, decidimos estudiar si la ausencia del motivo IYT de Msg5 influye en la expresión de genes dependientes de la activación de Slf2. En general, los niveles de fosforilación de la MAPK se correlacionan con una inducción transcripcional dependiente del factor de transcripción Rlm1. En condiciones de estrés de pared (tratamiento con rojo Congo por ejemplo) se induce la expresión de genes relacionados con la biogénesis de la pared celular, como *CRH1*, *FKS2* o *PIR3* y con la regulación de la ruta de integridad celular, como *MLP1* (García *et al.*, 2004).



**Figura 31. Análisis de la expresión de genes dependientes de la ruta de integridad celular en células carentes de Msg5 o que expresan Msg5 silvestre o Msg5<sup>IAYATA</sup>.**

Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real del nivel de expresión de los genes indicados en la cepa mutante DD1-2D (*msg5* $\Delta$ ) transformada con el vector vacío YCplac22 (*v*) o con los plásmidos YCplac22-MSG5myc o YCplac22-MSG5<sup>IAYATA</sup>myc. La expresión de los genes YGR189C (*CRH1*), YGR032W (*FKS2*), YKL161C (*MLP1*) y YKL163W (*PIR3*) se determinó tanto en ausencia como en presencia de rojo Congo (30 $\mu$ g/ml). Los resultados corresponden a los valores de inducción de dichos genes en las distintas condiciones ensayadas. Las reacciones de PCR se realizaron al menos por duplicado para cada cDNA. Las barras de error indican las desviaciones estándar de tres transformantes distintos.

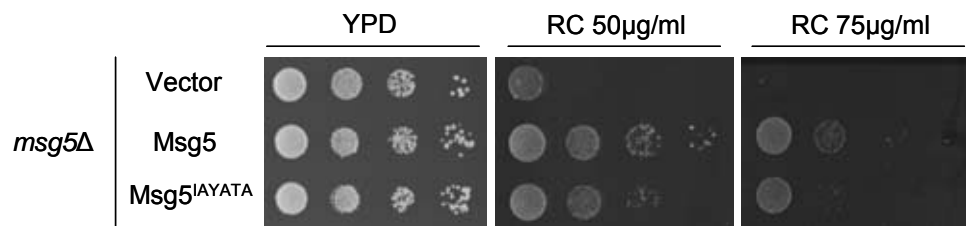
Se analizaron los niveles de RNA mensajero (RNAm) de los genes *CRH1*, *FKS2*, *PIR3* y *MLP1* mediante retrotranscripción inversa asociada a PCR cuantitativa (RT-qPCR) sobre los mismos transformantes que fueron empleados en el experimento previo: la cepa mutante *msg5Δ* transformada con un vector vacío, aquella que expresa la versión silvestre *Msg5* y la que expresa la versión mutante *Msg5<sup>IAYATA</sup>*, tanto en condiciones basales como de estimulación con rojo Congo (Figura 31).

Cabe destacar que en condiciones basales el mutante *msg5Δ* no presenta un incremento en la inducción transcripcional de genes dependientes de la ruta de integridad celular. Se observa por tanto una falta de correlación entre los altos niveles de fosforilación de la MAPK *Slf2* (Figura 30) y la escasa inducción transcripcional dependiente de *Rlm1* (Figura 31), como había descrito previamente nuestro grupo (Marin, 2009). En presencia de rojo Congo, los niveles de inducción transcripcional son menores tanto en las células que expresan el mutante *Msg5<sup>IAYATA</sup>* como en las que expresan la proteína silvestre *Msg5*, en comparación con los niveles mostrados por el mutante de delección *msg5Δ*. Basándonos en los datos de fosforilación de *Slf2* e inducción transcripcional podemos afirmar que la ausencia del motivo IYT de *Msg5* no conduce a una pérdida de funcionalidad de la fosfatasa sobre la MAPK *Slf2*.

### 1.2.3.2 La mutación del motivo IYT de *Msg5* aumenta la sensibilidad a rojo Congo

Se ha descrito que los mutantes *msg5Δ* son sensibles a rojo Congo por presentar un incremento en la fosforilación de *Slf2* que conduce a una hiperactivación constitutiva y sostenida de la ruta de integridad celular, lo que acaba provocando cierta inhibición del crecimiento en estas condiciones (Flandez *et al.*, 2004). A pesar de que no se observaron diferencias entre *Msg5* silvestre y el mutante *Msg5<sup>IAYATA</sup>* en cuanto a fosforilación de *Slf2* e inducción transcripcional en presencia de rojo Congo, decidimos estudiar la sensibilidad del mutante *Msg5<sup>IAYATA</sup>* a este estrés a través de un ensayo de siembra por dilución en gota en medio sólido.

En la figura 32 se aprecia que las células que expresan *Msg5<sup>IAYATA</sup>* presentan una sensibilidad intermedia a rojo Congo entre las células que expresan *Msg5* silvestre y las células carentes de esta fosfatasa. Este resultado indica que el mutante *Msg5<sup>IAYATA</sup>* no es capaz de complementar totalmente el fenotipo de sensibilidad de un mutante de delección *msg5Δ* en rojo Congo.

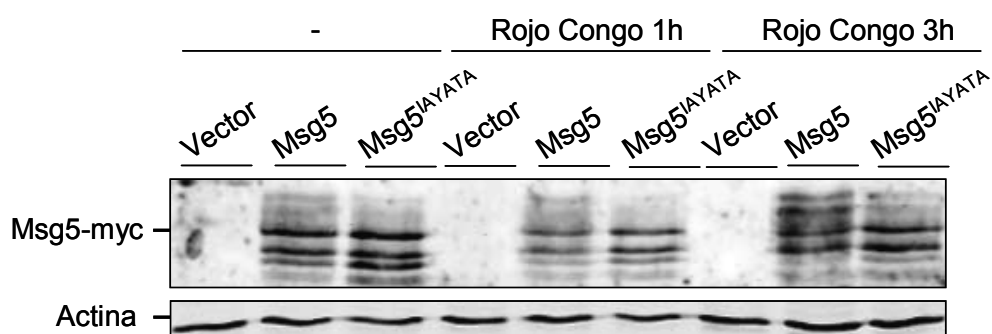


**Figura 32. Análisis de la sensibilidad a rojo Congo de células carentes de Msg5 o que expresan Msg5 o Msg5<sup>IAYATA</sup>.**

Ensayo fenotípico por crecimiento en gota de la cepa mutante DD1-2D (*msg5* $\Delta$ ) transformada con el vector vacío YCplac22, YCplac22-MSG5myc (que expresa la versión silvestre de Msg5) o YCplac22-MSG5<sup>IAYATA</sup>myc. Se realizaron diluciones seriadas decimales de estos transformantes en placas de YPD (control) y en presencia de rojo Congo a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml o 75  $\mu$ g/ml como se indica en la figura. Las placas se incubaron a 24°C durante 48 horas.

### 1.2.3.3 La mutación del motivo IYT de Msg5 reduce su propia fosforilación por parte de Slt2 tras condiciones de estimulación de la ruta de integridad celular

Se ha explicado en la introducción que Slt2 contribuye a la regulación postraduccional de Msg5. Las dos isoformas de esta fosfatasa son fosforiladas por Slt2 tras la activación de la ruta de integridad celular en presencia de alta temperatura o blanco de calcoflúor (Flandez *et al.*, 2004). Continuando con la caracterización del motivo IYT nos preguntamos si la fosforilación de Msg5 se encontraba afectada en ausencia de este motivo. Los mismos transformantes empleados anteriormente se trataron con rojo Congo y la fosforilación de las dos isoformas de Msg5 se detectó como una disminución en su movilidad electroforética.



**Figura 33. Efecto de la ausencia del motivo IYT en la fosforilación de Msg5.**

La cepa mutante DD1-2D (*msg5* $\Delta$ ) se transformó con el vector vacío YCplac22 o con los plásmidos YCplac22-MSG5myc o YCplac22-MSG5<sup>IAYATA</sup>myc. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPDA y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30  $\mu$ g/ml) durante 1 o 3 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-myc para valorar Msg5-myc y Msg5<sup>IAYATA</sup>-myc y anti-actina como control de carga.

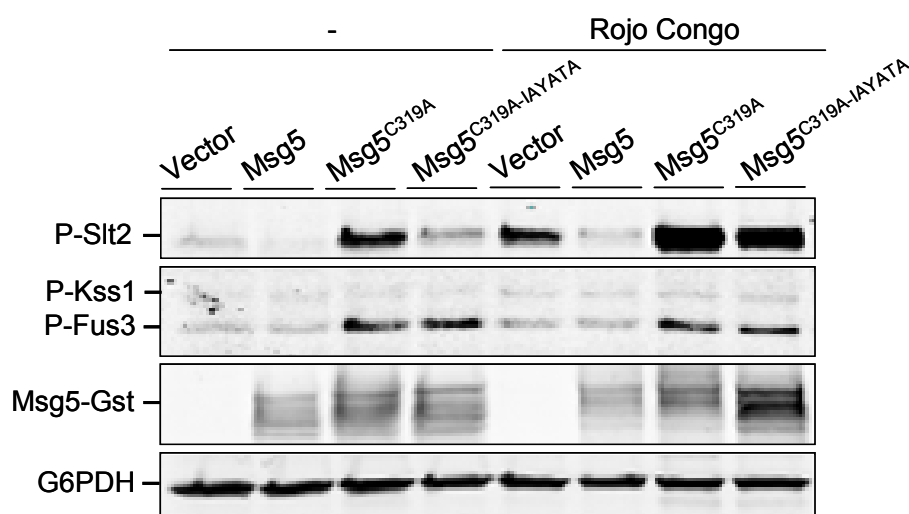
Tal y como se puede observar en la figura 33, la proporción de proteína Msg5<sup>IAYATA</sup> fosforilada fue menor que la de la proteína silvestre Msg5 en condiciones de estimulación de la ruta. Este hecho sugiere que la presencia del motivo IYT favorece la fosforilación de Slt2 hacia Msg5 cuando se activa la ruta CWI.

#### **1.2.3.4 El motivo IYT de Msg5 es esencial para que una versión catalíticamente inactiva (Msg5<sup>C319A</sup>) desarrolle el efecto de *trapping* o secuestro sobre Slt2 pero no sobre Fus3**

Las mutaciones que reducen la actividad catalítica de las proteínas fosfatasa de tirosinas sin afectar a su afinidad por el sustrato conducen al fenómeno denominado en inglés por el término de *substrate trapping* (secuestro del sustrato), debido a su capacidad para formar un complejo estable entre la enzima inactiva y su sustrato (Tonks y Neel, 1996). Así, se ha descrito que la expresión de una PTP catalíticamente inactiva provoca una fuerte unión con la MAPK sobre la que actúa, lo que conduce a un incremento en los niveles de fosforilación de ésta (Mattison *et al.*, 1999). Basándonos en estas premisas decidimos estudiar la implicación del motivo IYT de Msg5 en el fenómeno de *substrate trapping*. Si para que se establezca un complejo estable es necesaria una unión fuerte entre la MKP catalíticamente inactiva y la MAPK, la ausencia del motivo IYT de Msg5 podría dar lugar a la formación de complejos más inestables ya que estos tres aminoácidos son imprescindibles para que Msg5 se una a Slt2.

Para comprobar esta hipótesis se sustituyó en Msg5 el residuo conservado de cisteína característico de las MKPs (Patterson *et al.*, 2009) por un residuo de alanina con el fin de generar la versión dominante negativa de Msg5. De esta forma se expresaron en fusión a Gst la versión silvestre de Msg5, la catalíticamente inactiva (Msg5<sup>C319A</sup>) y la catalíticamente inactiva que carece además del motivo IYT (Msg5<sup>C319A-IAYATA</sup>). La figura 34 muestra que tanto en condiciones basales como de activación con rojo Congo la sobreexpresión de la versión catalíticamente inactiva de Msg5 (Msg5<sup>C319A</sup>) da lugar a una elevada fosforilación de las MAPKs Slt2 y Fus3, mayor que cuando se expresa Msg5 silvestre o el vector vacío. Las células que carecen además del motivo IYT (Msg5<sup>C319A-IAYATA</sup>) presentan, al igual que las que expresan Msg5<sup>C319A</sup>, una elevada fosforilación de Fus3. Sin embargo, la fosforilación de Slt2 en estas células es considerablemente menor que la que presentan las células que expresan la versión catalíticamente inactiva de Msg5. Estos resultados indican que la versión Msg5<sup>C319A-IAYATA</sup> mantiene intacta su capacidad para unirse a Fus3, al no verse afectado el dominio D, mientras

que su capacidad de unión con Slt2 se encuentra muy reducida al estar sustituidos por alaninas los aminoácidos de los que se compone el motivo IYT. A pesar de que las dos isoformas de Msg5 se expresan a partir de su propio promotor resulta difícil observar cambios en la movilidad electroforética y, por tanto, analizar la fosforilación de Msg5 en fusión a Gst, un epítipo más grande que el que habíamos utilizado previamente (6 copias del epítipo myc). Sin embargo, el revelado del *western-blotting* mostró una cantidad mayor de la versión  $\text{Msg5}^{\text{C319A-IAYATA}}$  con respecto a la versión silvestre (Msg5) y a la catalíticamente inactiva ( $\text{Msg5}^{\text{C319A}}$ ) en presencia de rojo Congo.

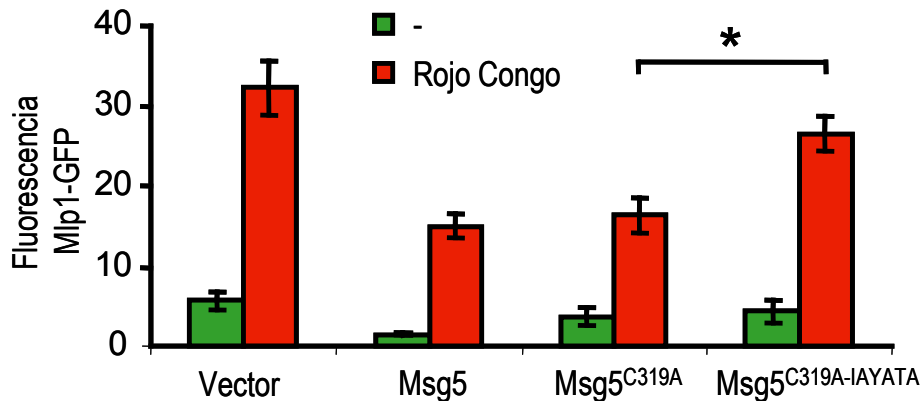


**Figura 34. Efecto de la expresión de distintas versiones de Msg5 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 y Fus3 en una cepa silvestre.**

La cepa silvestre YPH499 se transformó con el vector vacío YEp352 o con los plásmidos YEp352-MSG5-GST, YEp352-MSG5<sup>C319A</sup>-GST o YEp352-MSG5<sup>C319A-IAYATA</sup>-GST. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30 µg/ml) durante 3 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, fosfo-Kss1 y fosfo-Fus3; anti-G6PDH como control de carga y anti-Gst para detectar la presencia de Msg5-Gst,  $\text{Msg5}^{\text{C319A}}$ -Gst y  $\text{Msg5}^{\text{C319A-IAYATA}}$ -Gst.

Con el fin de conocer qué ocurre con la transmisión de la señal desde la MAPK Slt2 a los factores de transcripción, las células empleadas en el experimento anterior se transformaron con el plásmido YEp352(H)-MLP1-GFP, que expresa una fusión del gen *MLP1* a GFP, y se analizó la emisión de fluorescencia (GFP) en un citómetro de flujo. Consideramos adecuado realizar un análisis de la expresión de este gen en concreto ya que presenta altos niveles de activación dependientes de Rlm1 en la mayoría de las situaciones de estrés de pared estudiadas hasta el momento (Rodríguez-Peña *et al.*, 2008). La elevada fosforilación de Slt2 en células que expresan

Msg5<sup>C319A</sup> no provocó un aumento en la expresión de *MLP1-GFP* sino que por el contrario estos niveles fueron de similar magnitud a los encontrados en células que sobreexpresan la proteína catalíticamente activa. Sin embargo, la ausencia del motivo IYT de Msg5<sup>C319A</sup> ocasionó un aumento en la expresión de *MLP1* (Figura 35).



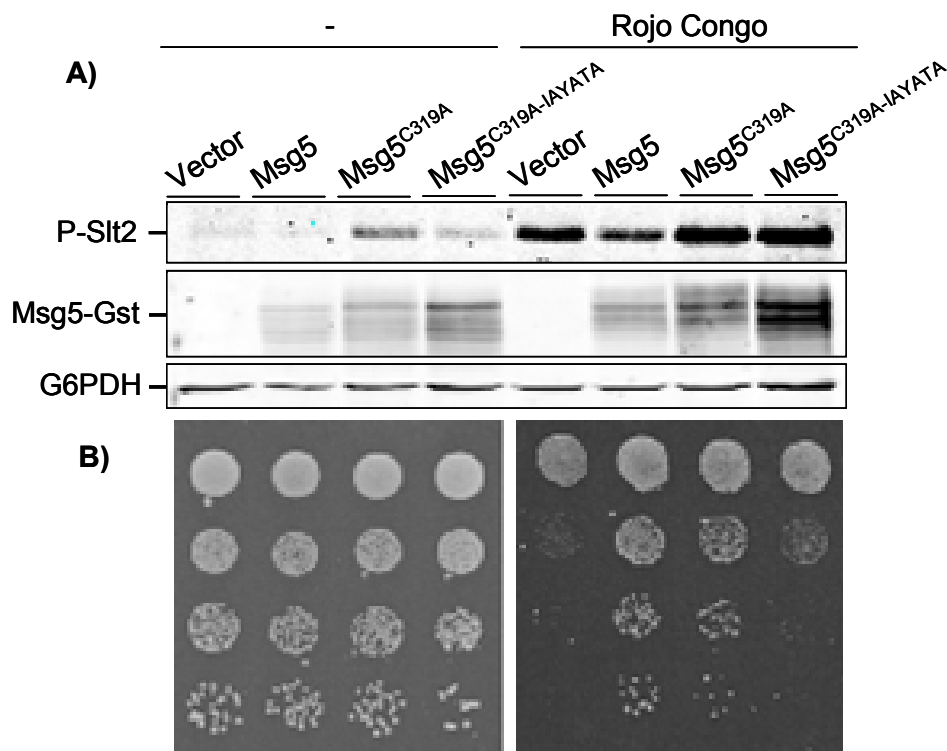
**Figura 35. Efecto de la expresión de distintas versiones de Msg5 sobre los niveles de expresión del gen *MLP1* en una cepa silvestre.**

La cepa silvestre YPH499 se cotransformó con el plásmido YEp352(H)-*MLP1-GFP* y con el vector vacío YEp352 o con los plásmidos YEp352-MSG5-GST, YEp352-MSG5<sup>C319A</sup>-GST o YEp352-MSG5<sup>C319A-IAYATA</sup>-GST. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 3 horas. Los niveles de expresión del gen *MLP1* se determinaron mediante la cuantificación de la emisión de GFP de dichas células en un citómetro de flujo. Se representan los valores medios y la desviación estándar del análisis de tres transformantes independientes. Un asterisco representa que las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.05$ .

Seguidamente analizamos la funcionalidad de las distintas versiones de Msg5 observando su efecto sobre la sensibilidad a rojo Congo de una cepa mutante *msg5Δ*. Como era de esperar, la expresión de la versión silvestre de Msg5 redujo los altos niveles de fosforilación de Slf2 del mutante *msg5Δ* y complementó su sensibilidad a rojo Congo (Figura 36). Sorprendentemente las células que expresan la versión catalíticamente inactiva de Msg5 (Msg5<sup>C319A</sup>), a pesar de presentar unos niveles de fosfo-Slf2 mayores que los de la cepa *msg5Δ*, fueron capaces de crecer en presencia de rojo Congo, al igual que las células que expresan la versión silvestre de Msg5. Este hecho sugiere que el secuestro de Slf2 por parte de Msg5<sup>C319A</sup> podría antagonizar la interacción entre Slf2 y Rlm1, dando lugar a un bloqueo en la transmisión de la señal desde la MAPK hacia este factor de transcripción. De esta forma, los niveles de expresión de *MLP1* analizados previamente concuerdan con los datos de crecimiento en presencia de rojo Congo: las cepas que expresan Msg5<sup>C319A</sup> presentan una disminución en los niveles de expresión de

*MLP1* con respecto a la cepa mutante *msg5Δ* y por eso son capaces de crecer en rojo Congo, al igual que ocurre en las células que expresan *Msg5* silvestre. Por el contrario, en presencia de rojo Congo, las células que expresan *Msg5*<sup>C319A-IAYATA</sup> presentan unos niveles de expresión de *MLP1* intermedios entre los de una cepa mutante *msg5Δ* y los de las células que expresan *Msg5* o *Msg5*<sup>C319A</sup>; por tanto, la versión *Msg5*<sup>C319A-IAYATA</sup> sólo rescata parcialmente el fenotipo de sensibilidad a rojo Congo que presentan las células carentes de esta fosfatasa.

Tras el análisis de la fosforilación de *Slt2*, la expresión de *MLP1* y la supervivencia en rojo Congo sugerimos que el motivo IYT de *Msg5* es necesario para que una versión catalíticamente inactiva de esta MKP se mantenga unida fuertemente a *Slt2* dando lugar al efecto conocido como *trapping*.



**Figura 36. Efecto de la expresión de distintas versiones de *Msg5* sobre los niveles de fosforilación de *Slt2* y sobre la sensibilidad a rojo Congo de una cepa mutante *msg5Δ*.**

La cepa mutante DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con el vector vacío YEp352 o con los plásmidos YEp352-MSG5-GST, YEp352-MSG5<sup>C319A</sup>-GST o YEp352-MSG5<sup>C319A-IAYATA</sup>-GST. (A) Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPDA y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30 µg/ml) durante 3 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-*Slt2*, anti-G6PDH como control de carga y anti-Gst para detectar la presencia de *Msg5*-Gst, *Msg5*<sup>C319A</sup>-Gst y *Msg5*<sup>C319A-IAYATA</sup>-Gst. (B) Se realizaron diluciones seriadas decimales de estos transformantes en placas de YPD (control) y YPD suplementado con rojo Congo (75 µg/ml) que se incubaron a 24°C durante 48 horas.

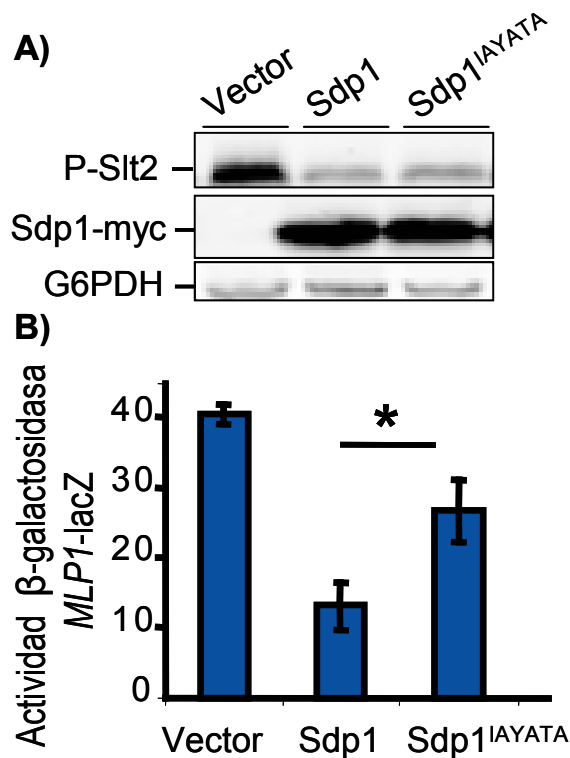
## 1.2.4 Efecto de la ausencia del motivo IYT de Sdp1 sobre la ruta de integridad celular

### 1.2.4.1 La mutación del motivo IYT reduce la capacidad de Sdp1 para regular negativamente la ruta de integridad celular

Los ensayos de copurificación llevados a cabo en experimentos anteriores permitieron determinar que la presencia del motivo IYT de Sdp1 es esencial para su interacción con Slt2. A continuación nos planteamos estudiar la relevancia del motivo IYT en la función que ejerce Sdp1 como regulador negativo de la ruta de integridad celular. Estudios previos sobre los mutantes de delección *sdp1Δ* mostraron que la falta de esta fosfatasa no conduce a un fenotipo evidente salvo por un ligero incremento de la fosforilación de Slt2 en respuesta a choque térmico (Hahn y Thiele, 2002). Nosotros confirmamos en distintos fondos genéticos que el mutante *sdp1Δ* no es sensible ni a altas temperaturas ni a la presencia de agentes que alteran la pared celular. Además, no obtuvimos diferencias significativas en la fosforilación de Slt2 tras activación de la ruta de integridad en el mutante *sdp1Δ* con respecto a la cepa silvestre (datos no mostrados).

Por lo tanto, para estudiar la importancia del motivo IYT en la función de Sdp1 recurrimos a la sobreexpresión de Sdp1 y Sdp1<sup>IAYATA</sup> en una cepa *gas1Δ*, que presenta una activación constitutiva de la ruta CWI debido a la falta de la enzima β-1,3-glucanosiltransferasa necesaria en la biogénesis de la pared celular (de Nobel *et al.*, 2000). Como consecuencia este mutante muestra una inducción significativa de la transcripción del gen *MLP1* dependiente de Rlm1 (Lagorce *et al.*, 2003). Así, la cepa *gas1Δ* se transformó con el plásmido YEp352(H)-*pMLP1-lacZ* (que contiene la región promotora de *MLP1* fusionada al gen reportero *lacZ*) y en ella se sobreexpresaron tanto Sdp1-myc como Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc.

En la figura 37 se muestra que la sobreexpresión de Sdp1 redujo los elevados niveles de fosforilación de Slt2 y de transcripción de *MLP1* que presenta un mutante *gas1Δ*. La sobreexpresión de una versión de Sdp1 que carece del motivo IYT (Sdp1<sup>IAYATA</sup>) también disminuyó los niveles de fosfo-Slt2 de un mutante *gas1Δ*. Sin embargo, la expresión de *MLP1* fue significativamente mayor en las células que sobreexpresan Sdp1<sup>IAYATA</sup> con respecto a las que sobreexpresan la versión silvestre de Sdp1. Estos resultados podrían indicar que el mutante Sdp1<sup>IAYATA</sup> presenta una actividad reducida en la regulación negativa hacia Slt2 en comparación con Sdp1 silvestre.



**Figura 37.** Efecto de la sobreexpresión de distintas versiones de Sdp1 sobre los niveles de fosforilación de Slit2 y de expresión del gen reportero *MLP1* en un mutante *gas1* $\Delta$ .

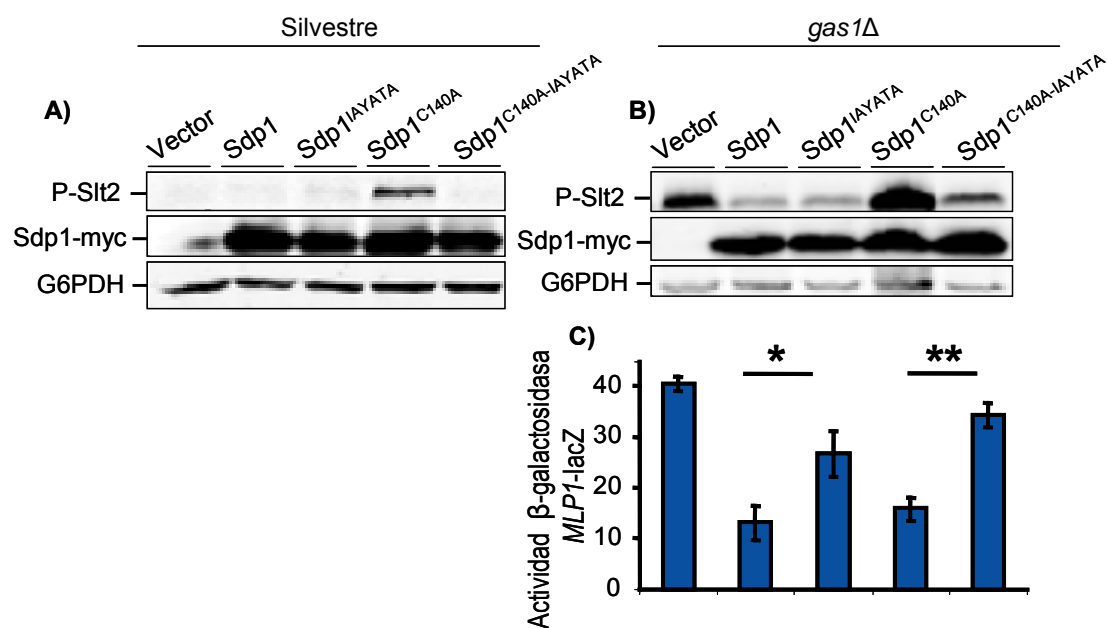
La cepa mutante Y00897 (*gas1* $\Delta$ ) se cotransformó con el plásmido YEp352(H)-*pMLP1-lacZ* y con el vector pYES2 o los plásmidos pYES2-*SDP1myc* o pYES2-*SDP1<sup>IAYATA</sup>myc*. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo carente de uracilo e histidina utilizando rafinosa al 1,5%. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de las distintas versiones de Sdp1 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 4 horas. **(A)** Los extractos proteicos se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-G6PDH como control de carga y anti-myc para detectar la presencia de Sdp1-myc y Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc. **(B)** Se representan los valores medios de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de tres transformantes independientes. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Un asterisco representa que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.05$ .

#### 1.2.4.2 El motivo IYT de Sdp1 es esencial para que una versión catalíticamente inactiva (Sdp1<sup>C140A</sup>) desarrolle el efecto de *trapping* o secuestro sobre Slit2

La utilización de una versión catalíticamente inactiva de Msg5 nos ayudó previamente a elucidar el papel que el motivo IYT ejerce en el *trapping* sobre Slit2. De igual forma quisimos conocer si la presencia del motivo IYT era necesaria para que una versión dominante negativa de Sdp1 forme un complejo estable con Slit2. Con tal fin se llevó a cabo una mutagénesis dirigida sobre los plásmidos usados anteriormente pYES2-*SDP1myc* y pYES2-*SDP1<sup>IAYATA</sup>myc* en la que se sustituyó el residuo conservado de cisteína del centro catalítico por un residuo de alanina.

Tanto en una cepa silvestre como en una cepa mutante *gas1* $\Delta$  la sobreexpresión de la versión catalíticamente inactiva de Sdp1 (Sdp1<sup>C140A</sup>-myc) causó una acumulación de fosfo-Slt2 (Figura 38A y 38B). Por el contrario, la sobreexpresión de la versión Sdp1<sup>C140A-IAYATA</sup>-myc no provocó un aumento en los niveles de fosforilación de Slit2 con respecto a los que presentan la cepa silvestre y el mutante *gas1* $\Delta$  transformadas con un vector vacío. De forma paralela estudiamos la inducción de la expresión del gen *MLP1* en un mutante *gas1* $\Delta$  que sobreexpresa Sdp1<sup>C140A</sup>-myc y Sdp1<sup>C140A-IAYATA</sup>-myc mediante la cuantificación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa del gen

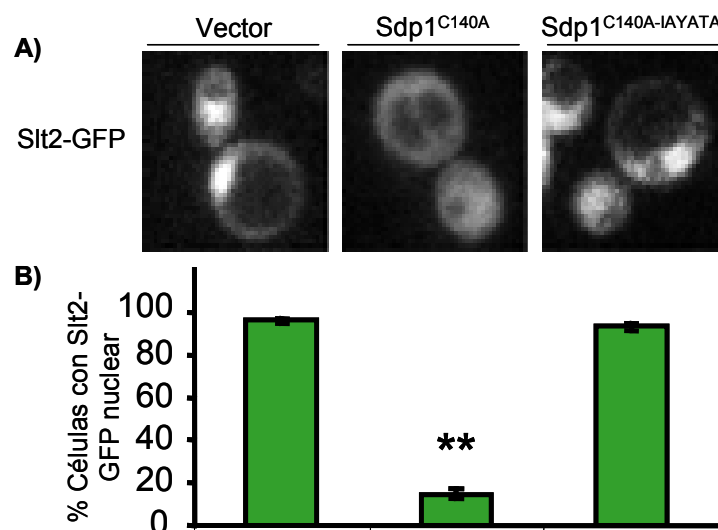
reportero *lacZ*. La sobreexpresión de Sdp1<sup>C140A</sup>-myc disminuyó notablemente los niveles de expresión de *MLP1* con respecto a la cepa *gas1Δ* que porta un vector vacío (Figura 37C). Sin embargo, la expresión de *MLP1* es significativamente mayor en las células que sobreexpresan la versión catalíticamente inactiva de Sdp1 que carece del motivo IYT (Sdp1<sup>C140A-IAYATA</sup>) en comparación con las células que sobreexpresan la versión Sdp1<sup>C140A</sup>. Estos datos son concordantes con los obtenidos en los ensayos de expresión de Msg5<sup>C319A-IAYATA</sup>, lo que indica que la ausencia del motivo IYT elimina los efectos derivados del *trapping* sobre Slt2 que presentan las versiones catalíticamente inactivas de estas MKPs.



**Figura 38. Efecto de la sobreexpresión de distintas versiones de Sdp1 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 y de expresión del gen reportero *MLP1* en una cepa silvestre y en un mutante *gas1Δ*.**

(A) La cepa silvestre YPH499 se transformó con el vector vacío pYES2 o los plásmidos pYES2-*SDP1myc*, pYES2-*SDP1<sup>IAYATA</sup>myc*, pYES2-*SDP1<sup>C140A</sup>myc* o pYES2-*SDP1<sup>C140A-IAYATA</sup>myc*. (B) y (C) La cepa mutante Y00897 (*gas1Δ*) se cotransformó con los mismos plásmidos que (A) y además con el plásmido YEp352(H)-*pMLP1-lacZ*. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo utilizando rafinosa al 1,5%. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de las distintas versiones de Sdp1 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 4 horas. Los extractos proteicos de (A) y (B) se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-G6PDH como control de carga y anti-myc para detectar la presencia de Sdp1-myc, Sdp1<sup>IAYATA</sup>-myc, Sdp1<sup>C140A</sup>-myc y Sdp1<sup>C140A-IAYATA</sup>-myc. (C) Los niveles de expresión se determinaron mediante la cuantificación de la actividad β-galactosidasa sobre los extractos proteicos de las mismas células que en B. Se representan los valores medios y la desviación estándar del análisis de tres transformantes independientes. Uno o dos asteriscos representan que las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$  respectivamente.

Una evidencia más que apoya esta afirmación se consiguió observando al microscopio la localización de Slit2 en células en las que se sobreexpresa Sdp1<sup>C140A</sup>-myc o Sdp1<sup>C140A-IAYATA</sup>-myc. A pesar de que la MAPK Slit2 debe transitar entre el citoplasma y el núcleo debido a las funciones que realiza en estos compartimentos, estudios previos han revelado que la localización de Slit2 es principalmente nuclear tanto en condiciones basales como de estimulación de la ruta (Hahn y Thiele, 2002). Para la visualización de Slit2 se transformaron las células con el plásmido pRS425-SLT2-GFP que expresa Slit2 fusionado a GFP. La sobreexpresión de la versión inactiva Sdp1<sup>C140A</sup>-myc redujo significativamente la localización nuclear de Slit2, lo que sugiere que el efecto de *trapping* impide la translocación de Slit2 al núcleo. Este efecto fue totalmente dependiente del motivo IYT, ya que las células que sobreexpresan de Sdp1<sup>C140A-IAYATA</sup>-myc contienen a la MAPK en el núcleo al igual que las células transformadas con el vector vacío (Figura 39).



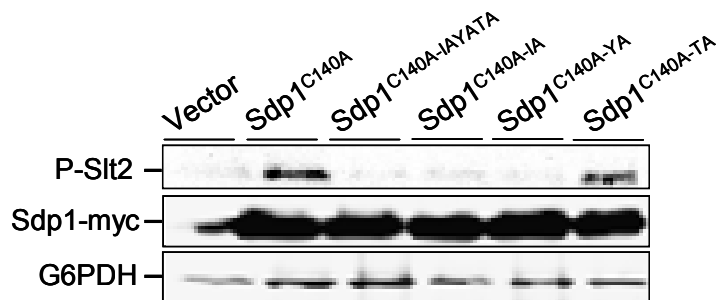
**Figura 39. Efecto de la sobreexpresión de distintas versiones catalíticamente inactivas de Sdp1 sobre la localización celular de la fusión Slit2-GFP.**

La cepa silvestre YPH499 se cotransformó con el plásmido pRS425-SLT2-GFP y con el vector vacío pYES2 o con los plásmidos pYES2-SDP1<sup>C140A</sup>myc o pYES2-SDP1<sup>C140A-IAYATA</sup>myc. Los transformantes se cultivaron a 28°C en medio mínimo selectivo carente de uracilo y leucina utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de las distintas versiones de Sdp1 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 4 horas. (A) Observación de la distribución celular de Slit2-GFP mediante microscopía de fluorescencia. (B) Porcentaje de células con acumulación nuclear de Slit2-GFP. Dos asteriscos representan que las diferencias obtenidas son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.01$ .

### 1.2.4.3 La mutación individual de los residuos I<sup>3</sup> e Y<sup>4</sup> del motivo IYT de la versión catalíticamente inactiva Sdp1<sup>C140A</sup> conduce a una pérdida del efecto de *trapping* sobre Slt2

Con el objetivo de determinar la relevancia de cada uno de los residuos de los que se compone el motivo IYT se construyeron versiones de Sdp1<sup>C140A</sup>-myc en las que se sustituyeron individualmente los residuos de I<sup>3</sup>, Y<sup>4</sup> y T<sup>5</sup> por alaninas. Se analizó el grado de unión a Slt2 de las versiones Sdp1<sup>C140A-IA</sup>-myc, Sdp1<sup>C140A-YA</sup>-myc y Sdp1<sup>C140A-TA</sup>-myc de una manera indirecta analizando si son capaces de provocar un efecto de *trapping* sobre la MAPK.

En primer lugar se verificó mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-myc que los niveles de expresión de las distintas versiones de Sdp1 eran similares (Figura 40). Seguidamente y de igual forma que en experimentos anteriores analizamos la cantidad de fosfo-Slt2 que presentan cada uno de los transformantes. La mutación individual de los residuos de isoleucina o tirosina impide que Sdp1<sup>C140A</sup>-myc se una fuertemente y secuestre a Slt2 y por tanto no se observa el incremento en los niveles de fosforilación de Slt2. Sin embargo, las células que expresan Sdp1<sup>C140A-TA</sup>-myc presentan los mismos valores de fosfo-Slt2 que las que contienen Sdp1<sup>C140A</sup>-myc. A la vista de estos resultados podemos concluir que los dos primeros residuos del motivo IYT de Sdp1 son indispensables para su unión a Slt2.



**Figura 40. Efecto de la sobreexpresión de distintas versiones catalíticamente inactivas de Sdp1 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 en una cepa silvestre.**

La cepa silvestre YPH499 se transformó con el vector vacío pYES2 o con los plásmidos pYES2-SDP1<sup>C140A</sup>myc, pYES2-SDP1<sup>C140A-IAYATA</sup>myc, pYES2-SDP1<sup>C140A-IA</sup>myc, pYES2-SDP1<sup>C140A-YA</sup>myc o pYES2-SDP1<sup>C140A-TA</sup>myc. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo sin uracilo utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de las distintas versiones de Sdp1 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 4 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-G6PDH como control de carga y anti-myc para detectar la presencia de Sdp1<sup>C140A</sup>-myc, Sdp1<sup>C140A-IAYATA</sup>-myc, Sdp1<sup>C140A-IA</sup>-myc, Sdp1<sup>C140A-YA</sup>-myc y Sdp1<sup>C140A-TA</sup>-myc.

## **1.3 Estudio de los sitios de fosforilación de Msg5 por Slt2 en respuesta a la activación de la ruta de integridad celular**

### **1.3.1 Identificación de los posibles residuos de fosforilación de Msg5 por MAPKs**

Como hemos comentado previamente en la introducción, estudios realizados en nuestro laboratorio describieron la existencia de una regulación recíproca entre la MAPK Slt2 y su MKP Msg5. Por un lado, Msg5 desfosforila a Slt2. Por otro, la MAPK modula mediante fosforilación la acción que ejerce la fosfatasa Msg5 sobre ella. Es decir, Slt2 contribuye activamente a la regulación postraduccional de Msg5. Así, las dos isoformas de esta fosfatasa son fosforiladas por Slt2 tras la activación de la ruta de integridad celular en presencia de alta temperatura o blanco de calcoflúor (Flandez *et al.*, 2004).

Las MAPKs de tipo ERK son serín-treonín quinasas que reconocen la secuencia consenso S/T-P (serina o treonina seguida de una prolina) en sus sustratos como sitios susceptibles de fosforilación (Jacobs *et al.*, 1999; Sharrocks *et al.*, 2002). La proteína Msg5 se compone de una región N-terminal regulatoria, donde se encuentran los dominios de unión con las MAPKs (Remenyi *et al.*, 2005; Marin *et al.*, 2009), seguida del dominio catalítico y una extensión C-terminal, de unos 100 aminoácidos, característica de esta MKP. Analizando la secuencia aminoacídica de Msg5 se encontraron nueve posibles sitios de fosforilación por MAPKs en la región aminoterminal y otros 7 sitios localizados en la extensión carboxiterminal (Figura 41).

MQFHSDKQHLDKTDIDFKPNSPRSLQNRNTKNLSLDIAALHPLMEFSSPSQDVPGSVKF  
 PSPTPLNLFMKPKPIVLEKCPPKVSPRPTPPSLSMRRSEASIYTLPTSLKNRTVSPSVYTKS  
 STVSSISKLSSSSPLSSSFSEKPHLNRVHSLSVKTKDLKLGIRGRSQTISGLETSTPISSTRE  
 GTLDSTDVNRFSNQKNMQTTLIFPEEDSDLNIDMVHAEIYQRTVYLDGPLLVLPNLYLYSE  
 PKLEDILSFDLVINVAKEIPNLEFLIPPEMAHKIKYYHIEWHTHSKIVKDL SRLTRIIHTAHSQG  
 KKILVHCQCGVSRASLIVAYIMRYYGSLSLNDAYNKLKGVAKDISPNMGLIFQLMEWGTML  
 SKNSPGEEGETVHMPEEDDIGNNEVSSTTKSYSSASFRSFPMTNLSSSPNDSSVNSSEV  
 TPRTPATLTGARTALATERGEDDEHCKSLSQPADSLEASVDNESISTAPEQMMFLP

**Figura 41. Residuos susceptibles de fosforilación por Slt2 en la secuencia aminoacídica de Msg5.**

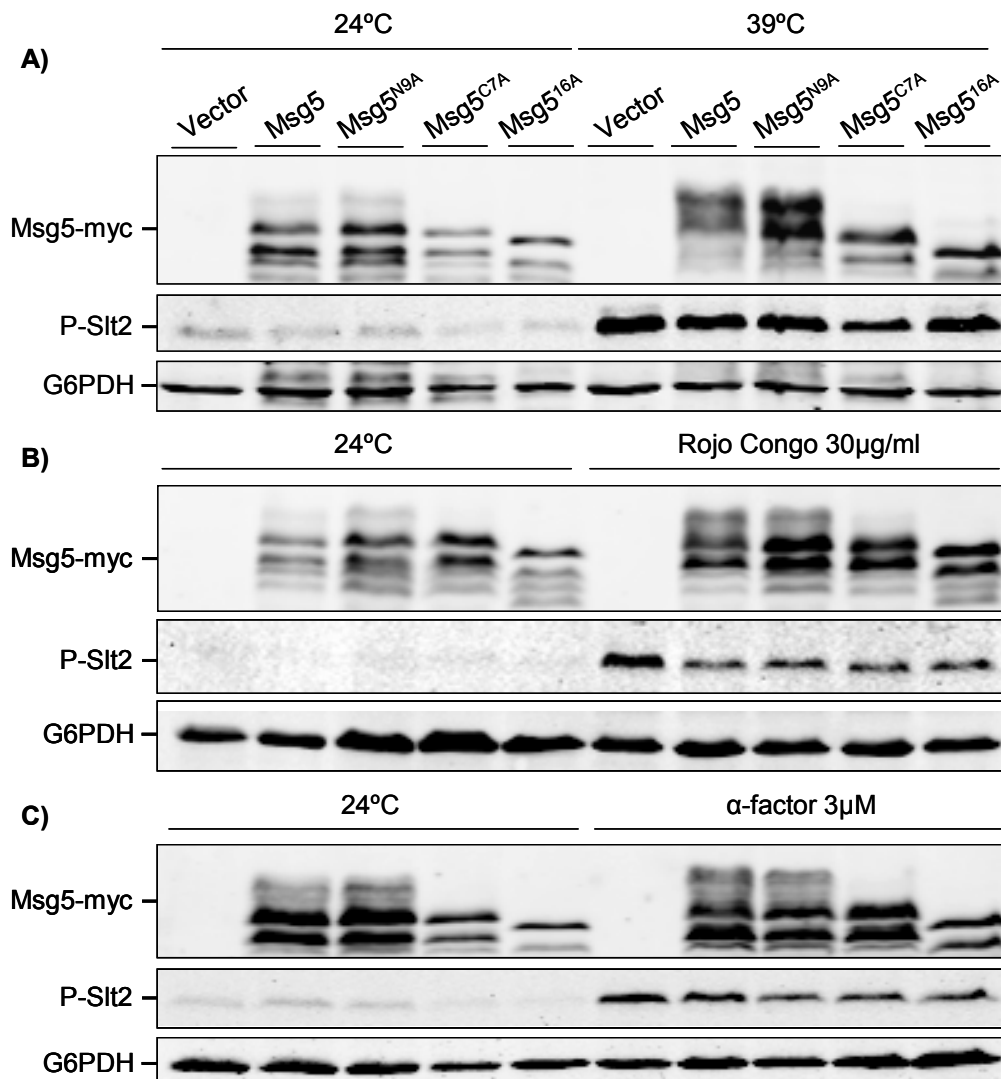
En color verde se muestran los residuos de prolina precedidos por los residuos de serina o treonina susceptibles de fosforilación por MAPKs marcados en color rojo.

### 1.3.2 La fosforilación de la extensión C-terminal de Msg5 es la responsable de su cambio en la movilidad electroforética tras la activación de la ruta de integridad celular

Dado que la secuencia aminoacídica de Msg5 consta de 16 residuos susceptibles de ser fosforilados por Slt2 es bastante probable que los sitios reales de fosforilación sean múltiples. Por esta razón, en lugar de eliminar estos residuos uno por uno, decidimos construir tres versiones de Msg5: Msg5<sup>N9A</sup> (en la que los 9 residuos fosforilables de la región aminoterminal están mutados a alaninas), Msg5<sup>C7A</sup> (con los 7 residuos fosforilables del extremo carboxiterminal sustituidos por alaninas) y Msg5<sup>16A</sup> (versión de Msg5 que carece de cualquier residuo susceptible de ser fosforilado por Slt2).

En una cepa *msg5Δ* se expresaron desde su propio promotor dichas versiones de Msg5. Los transformantes se cultivaron a 24°C y posteriormente fueron sometidos a distintos estímulos que activan la ruta de integridad celular: choque térmico a 39°C, tratamiento con rojo Congo o con feromona ( $\alpha$ -factor). Se analizaron los niveles de fosforilación de Slt2 de los extractos proteicos con objeto de verificar una adecuada activación de la ruta de integridad tras la aplicación de dichos estímulos (Figura 42). Hay que destacar que todas las versiones de Msg5 fueron capaces de desfosforilar a Slt2 en las distintas condiciones ensayadas ya que las células que expresan dichas versiones presentan niveles de fosfo-Slt2 menores que los de la cepa *msg5Δ*.

Gracias al revelado con anticuerpos anti-myc logramos visualizar las dos isoformas de Msg5. Tanto la proteína silvestre como aquella que porta mutaciones en los residuos fosforilables de la región N-terminal (Msg5<sup>N9A</sup>) experimentaron un cambio en su movilidad electroforética tras el tratamiento con cualquiera de los tres estímulos. Es decir, cuando se fosforilan las dos isoformas sufren un cambio conformacional dando lugar a la aparición de bandas de menor movilidad electroforética. Por el contrario, los mutantes Msg5<sup>C7A</sup> y Msg5<sup>16A</sup> no sufrieron cambios en la movilidad de las bandas correspondientes a las dos isoformas después de recibir algún estímulo. Estos resultados indican que la presencia de uno o varios de los 7 posibles residuos de fosforilación de la extensión C-terminal de Msg5 son esenciales para provocar un cambio en la movilidad electroforética de esta proteína frente a estímulos que activan la ruta de integridad. Curiosamente, las dos isoformas de la versión que carece de cualquier residuo susceptible de ser fosforilado (Msg5<sup>16A</sup>) presentan mayor movilidad electroforética que la versión Msg5<sup>C7A</sup> incluso en ausencia de estimulación, lo que podría ser debido a un cambio en la conformación de la proteína provocado por la mutación conjunta de 16 residuos.



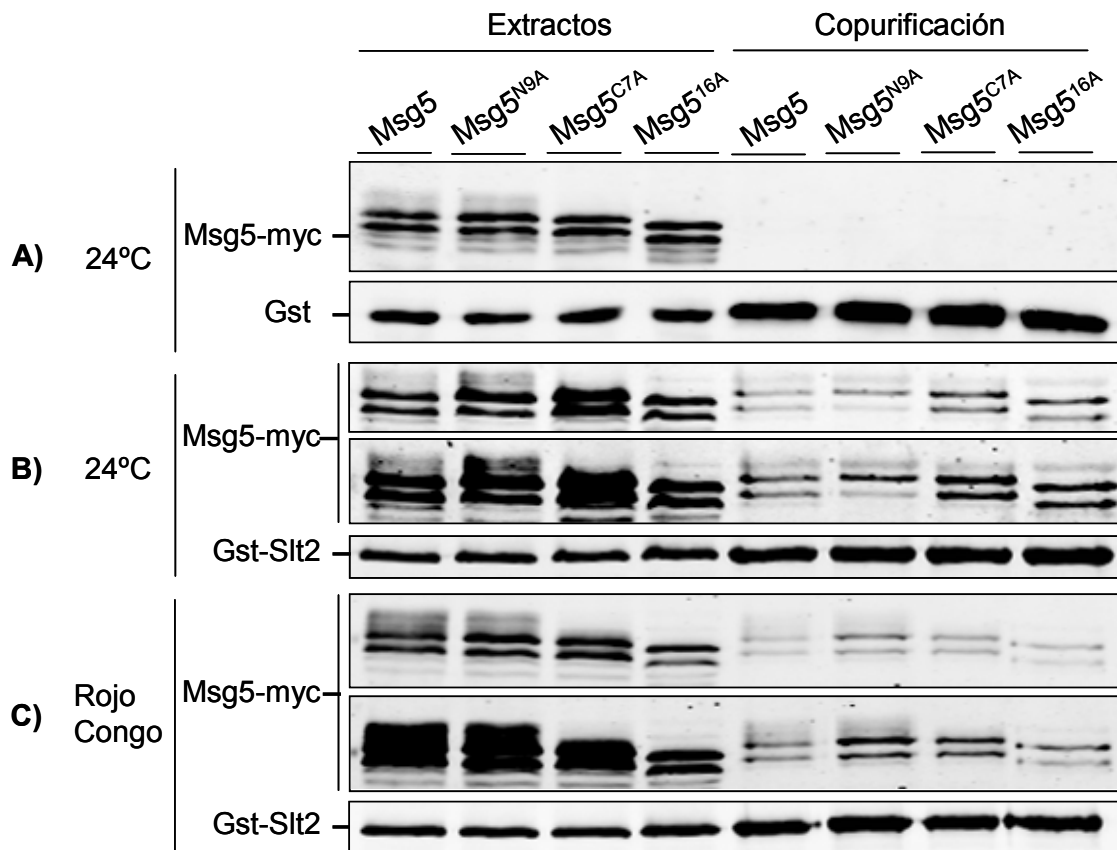
**Figura 42. Efecto de la expresión de Msg5-myc, Msg5<sup>N9A</sup>-myc, Msg5<sup>C7A</sup>-myc y Msg5<sup>16A</sup>-myc sobre los niveles de fosforilación de Slt2 y sobre la propia fosforilación de Msg5.**

La cepa mutante DD1-2D (*msg5Δ*) se transformó con el vector vacío YCplac22myc o con los plásmidos YCplac22-MSG5myc, YCplac22-MSG5<sup>N9A</sup>myc, YCplac22-MSG5<sup>C7A</sup>myc, YCplac22-MSG5<sup>16A</sup>myc. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPDA y cuando alcanzaron la fase exponencial se sometieron a una temperatura de 39°C durante 1 hora (A), se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 3 horas (B) o α-factor (3µM) durante 1 hora (C). Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-myc para valorar Msg5-myc, Msg5<sup>N9A</sup>-myc, Msg5<sup>C7A</sup>-myc y Msg5<sup>16A</sup>-myc y anti-G6PDH como control de carga.

### 1.3.3 Las versiones no fosforilables de Msg5 interactúan con Slt2

Algunos autores han apuntado que las fosforilaciones en residuos tanto cercanos como lejanos al sitio de unión entre proteínas pueden dar lugar a cambios conformacionales que modulen la fuerza de unión entre ellas (Sohaskey y Ferrel, 2002; Nishi *et al.*, 2011). Basándonos en esta premisa decidimos estudiar si la ausencia de residuos susceptibles de ser fosforilados por Slt2 en Msg5 afectaba de alguna forma a la unión entre estas dos proteínas. De esta forma se

llevaron a cabo experimentos de copurificación entre Gst-Slt2 y las versiones Msg5<sup>N9A</sup>, Msg5<sup>C7A</sup> y Msg5<sup>16A</sup> procedentes de cultivos de levadura creciendo a 24°C o tratados con rojo Congo. En la figura 43 se muestra que las versiones Msg5<sup>C7A</sup> y Msg5<sup>16A</sup>, que no sufren cambios en la movilidad electroforética en presencia de estímulo, mantienen intacta su capacidad para unirse a Slt2 en las dos condiciones analizadas (ausencia y presencia de estímulo). Por otro lado, son las formas de mayor peso molecular (no fosforiladas) de la proteína silvestre Msg5 y de la versión Msg5<sup>N9A</sup> las que copurifican con Gst-Slt2 en presencia de rojo Congo. A la vista de estos datos podemos afirmar que la interacción entre Slt2 y Msg5 se produce de manera independiente a la presencia de residuos susceptibles de ser fosforilados por la MAPK.



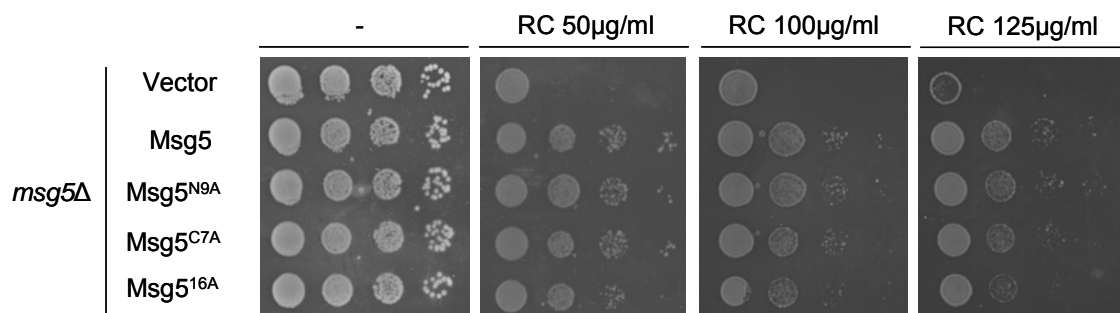
**Figura 43. Ensayo de copurificación de Msg5-myc, Msg5<sup>N9A</sup>-myc, Msg5<sup>C7A</sup>-myc y Msg5<sup>16A</sup>-myc con Gst-Slt2.**

Análisis mediante *western-blotting* tanto de los extractos proteicos como de las proteínas retenidas en los ensayos de copurificación *in vivo* con una matriz de glutación (*Glutahtione Sepharose*). La cepa YPH499 se transformó con los plásmidos pEG(KG) (A) y pEG(KG)-SLT2 (B) y (C) que expresan Gst y Gst-Slt2 respectivamente y con el plásmido YCplac22-MSG5myc, YCplac22-MSG5<sup>N9A</sup>myc, YCplac22-MSG5<sup>C7A</sup>myc o YCplac22-MSG5<sup>16A</sup>myc. Las células se cultivaron en medio líquido selectivo sin uracilo ni triptófano, utilizando como fuente de carbono rafinosa al 1,5%. Se refrescaron en medio rico YPG con galactosa al 2% para inducir la expresión de Gst-Slt2 y tras 4 horas se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 3 horas más sólo en (C). Se utilizaron anticuerpos anti-myc para detectar Msg5-myc, Msg5<sup>N9A</sup>-myc, Msg5<sup>C7A</sup>-myc y Msg5<sup>16A</sup>-myc y anti-Gst para analizar la presencia de Slt2.

### 1.3.4 El estado de fosforilación de Msg5 no afecta a la respuesta transcripcional dependiente de Rlm1

En búsqueda de las consecuencias biológicas de la fosforilación de Msg5 por Slt2, nos planteamos conocer si las versiones de Msg5 no susceptibles de ser fosforiladas por esta MAPK eran capaces de complementar el fenotipo de sensibilidad a rojo Congo de un mutante *msg5Δ*.

En la figura 44 se aprecia que las células que expresan Msg5<sup>N9A</sup>-myc o Msg5<sup>C7A</sup>-myc presentan la misma sensibilidad a rojo Congo que las células que expresan Msg5 silvestre; es decir, tanto Msg5<sup>N9A</sup>-myc como Msg5<sup>C7A</sup>-myc complementan este fenotipo del mutante *msg5Δ*. Sin embargo, las células que expresan la versión que carece de cualquier residuo fosforilable (Msg5<sup>16A</sup>) complementan sólo parcialmente la sensibilidad del mutante de delección *msg5Δ* en rojo Congo.



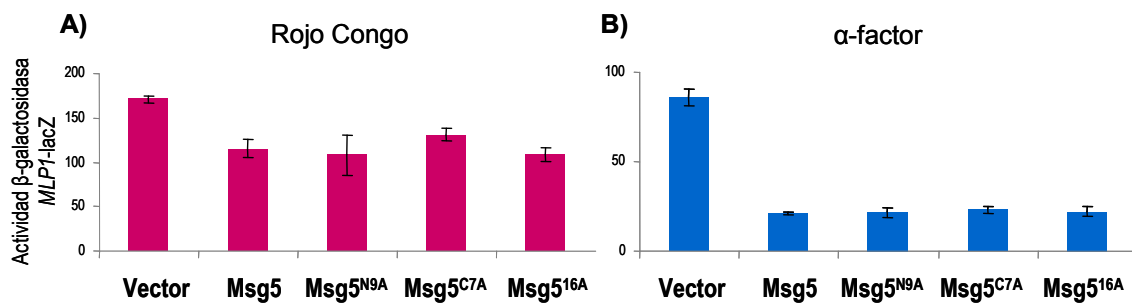
**Figura 44. Análisis de la sensibilidad a rojo Congo del mutante *msg5Δ* y de éste expresando Msg5-myc, Msg5<sup>N9A</sup>-myc, Msg5<sup>C7A</sup>-myc y Msg5<sup>16A</sup>-myc.**

Ensayo fenotípico por crecimiento en gota de la cepa mutante DD1-2D (*msg5Δ*) transformada con el vector vacío YCplac22 o los plásmidos YCplac22-MSG5myc, YCplac22-MSG5<sup>N9A</sup>myc, YCplac22-MSG5<sup>C7A</sup>myc o YCplac22-MSG5<sup>16A</sup>myc. Se realizaron diluciones seriadas decimales de estos transformantes en placas de YPDA como control (-) y en presencia de rojo Congo a una concentración final de 50 μg/ml, 100 μg/ml o 125 μg/ml como se indica en la figura. Las placas se incubaron a 24°C durante 48 horas.

De forma paralela se estudió si la existencia de residuos fosforilables en Msg5 tiene algún efecto sobre la inducción de la expresión del gen *MLP1* en condiciones que activan la ruta de integridad (tratamiento con rojo Congo y con feromona). Se cuantificó la actividad β-galactosidasa de las mismas células empleadas previamente que portan además el plásmido YEp352-*pMLP1-lacZ*. Como se observa en la figura 45, los valores de actividad β-galactosidasa de las células que expresan Msg5<sup>N9A</sup>, Msg5<sup>C7A</sup> o Msg5<sup>16A</sup> son menores que los de la cepa mutante *msg5Δ* y similares a los de las células que expresan la proteína silvestre Msg5, lo que indica que la eliminación de cualquiera de los posibles sitios de fosforilación por MAPKs en esta fosfatasa no

provocó diferencias en la expresión del gen *MLP1* tanto en presencia de rojo Congo como de estimulación de la ruta CWI con feromona.

Estos datos son coherentes con los obtenidos en el análisis de los niveles de fosfo-Slt2 y en los ensayos de sensibilidad a rojo Congo a excepción de la versión *Msg5<sup>16A</sup>*, que a pesar de mostrar niveles de fosfo-Slt2 y de expresión de *MLP1* similares a los que presenta la cepa que expresa la proteína silvestre *Msg5*, no complementa totalmente la sensibilidad a rojo Congo del mutante *msg5Δ*.



**Figura 45. Cuantificación de la expresión del gen *MLP1* en un mutante *msg5Δ* y en éste expresando *Msg5-myc*, *Msg5<sup>N9A</sup>-myc*, *Msg5<sup>C7A</sup>-myc* y *Msg5<sup>16A</sup>-myc*.**

La cepa mutante DD1-2D (*msg5Δ*) se cotransformó con el plásmido YEp352-*pMLP1-lacZ* y con el vector vacío YCplac22 o los plásmidos YCplac22-*MSG5myc*, YCplac22-*MSG5<sup>N9A</sup>myc*, YCplac22-*MSG5<sup>C7A</sup>myc* o YCplac22-*MSG5<sup>16A</sup>myc*. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo carente de uracilo y triptófano durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPDA y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 3 horas (A) o *α-factor* (3µM) durante 1 hora (B). Los niveles de expresión del gen reportero *lacZ* se determinaron mediante la cuantificación de la actividad β-galactosidasa sobre los extractos proteicos de dichas células. Se representan los valores medios y la desviación estándar del análisis de tres transformantes independientes.

## 2. BÚSQUEDA DE PROTEÍN FOSFATASAS QUE REGULEN NEGATIVAMENTE LA RUTA DE APAREAMIENTO

Actualmente sólo se conocen tres reguladores negativos de la ruta de apareamiento: las tirosín fosfatasas Ptp2 y Ptp3 y la fosfatasa de especificidad dual Msg5. Todas ellas desfosforilan a la MAPK Fus3 (Martin *et al.*, 2005). Con los experimentos que se describen a continuación se intentó conocer la existencia de proteín fosfatasas que actúen desfosforilando algún otro componente de la cascada de señalización.

Con tal fin se rastreó una colección de 43 proteín fosfatasas, subunidades reguladoras o proteínas asociadas que se clasifican en la tabla IX. En esta colección están representadas la mayoría de las proteín fosfatasas o subunidades asociadas a ellas del genoma de *S. cerevisiae*.

**Tabla IX. Clasificación de la colección de 43 proteín fosfatasas, subunidades reguladoras o proteínas asociadas utilizadas en este trabajo.**

<b>Serín-Treonín</b>	<b>PPPs</b>	<b>PP1-like:</b> Ppz1, Ppz2, Ppq1 <b>PP2A:</b> Subunidades catalíticas: Pph21, Pph22 Subunidad reguladora A: Tpd3 Subunidades reguladoras B: Cdc55, Rts1 <b>PP2A-like:</b> Ppg1, Sit4 Proteínas asociadas a Sit4: Rts3, Sap4, Sap155, Sap185 <b>PP2B:</b> Subunidades catalíticas: Cmp1, Cmp2 Subunidad reguladora: Cnb1 <b>PP5-like:</b> Ppt1
	<b>PPMs</b>	<b>PP2C:</b> Ptc1, Ptc2, Ptc4, Ptc5, Ptc6, Ptc7
	<b>FCPs</b>	Fcp1, Ssu72
<b>Tirosín</b>	Ptp1, Ptp2, Mih1, Ltp1, Ych1	
<b>Duales</b>	Siw14, Oca1, Oca2, Oca6, Msg5, Sdp1, Yvh1, Cdc14, Pps1, Tep1	
<b>Otras</b>	Psr1, Psr2	

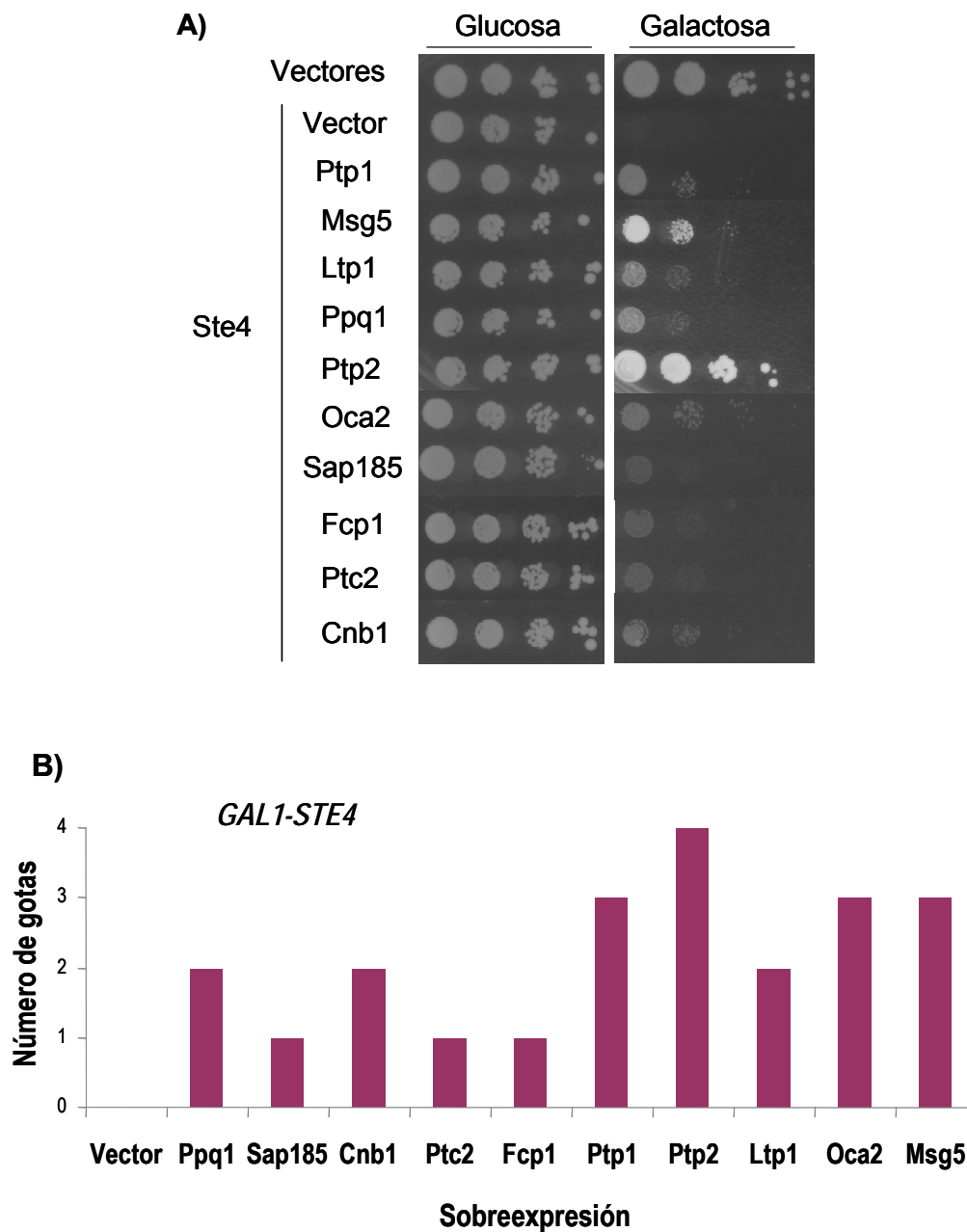
## **2.1 Estudios basados en la sobreexpresión de proteínas fosfatasa**

### **2.1.1 Identificación de proteínas fosfatasa cuya sobreexpresión atenúa la hiperactivación de la ruta de apareamiento provocada por la sobreexpresión de Ste4**

En la introducción se ha explicado que la proteína G heterotrimérica actúa acoplada al receptor de la ruta de apareamiento. En presencia de feromona, la subunidad  $\alpha$  (Gpa1) se disocia del heterodímero formado por las subunidades  $\beta$  y  $\gamma$  (Ste4-Ste18) que son entonces capaces de interactuar con sus efectores favoreciendo la transmisión de la señal a través de la cascada de MAPKs que opera en la ruta de apareamiento (Elion, 2000; Dohlman, 2002). La sobreexpresión de Ste4 bajo el control del promotor *GAL1* provoca una hiperactivación sostenida de dicha vía en ausencia de estimulación externa que da lugar como consecuencia a una inhibición del crecimiento de las células de levadura (Cole *et al.*, 1990). En estas condiciones, la sobreexpresión de una fosfatasa que actúe regulando negativamente cualquier componente de la cascada de señalización de la ruta de apareamiento debería recuperar la viabilidad de las células que sobreexpresan Ste4.

En nuestro laboratorio disponemos de una colección comercial de plásmidos de sobreexpresión de la gran mayoría de genes de *S. cerevisiae* bajo el control del promotor *GAL1* basados en el vector BG1805. Se escogieron aquellos plásmidos que portan los 43 genes codificantes de cada una de las proteínas fosfatasa o subunidades asociadas reflejadas en la tabla IX. Para realizar el ensayo fenotípico de crecimiento se realizaron diluciones decimales seriadas de los transformantes en placas de medio selectivo tanto en presencia de glucosa (control de crecimiento) como de galactosa, donde se induce la expresión de Ste4 y de cada una de las proteínas fosfatasa.

Del total de 43 proteínas sobreexpresadas sólo las 10 mostradas en la figura 46 atenuaron en diferente grado la inhibición del crecimiento ocasionado por la sobreexpresión de Ste4. Entre ellas Ptp2 y Msg5, dos reguladores negativos previamente conocidos, son las que presentaron un mayor efecto supresor. Además, serín-treonín fosfatasa como Ppq1, proteínas asociadas a la fosfatasa Sit4 como Sap185, la subunidad reguladora de la calcineurina (Cnb1), Fcp1 conocida por desfosforilar la RNA polimerasa II, dos proteínas fosfatasa de tirosinas (Ltp1 y Ptp1) y una fosfatasa dual atípica (Oca2).

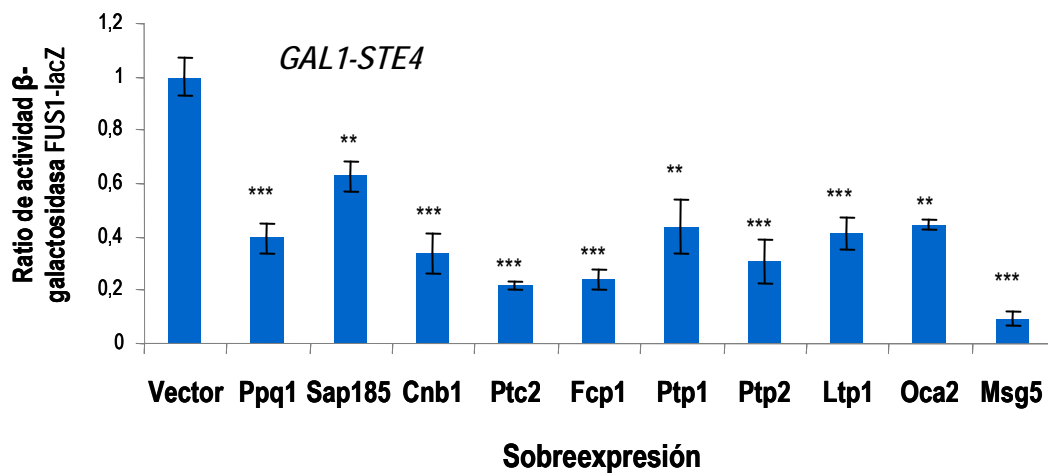


**Figura 46. Atenuación del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la sobreexpresión de Ste4 por la sobreexpresión de distintas proteínas fosfatasa o subunidades asociadas a éstas.**

(A) Diluciones seriadas decimales en medio SD (glucosa) y SG (galactosa) de la cepa BY4741 cotransformada con el plásmido pRS315-pGAL1-STE4 y el plásmido derivado del vector BG1805 que porta el ORF de las proteínas indicadas bajo el control del promotor GAL1. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas. Los ensayos se realizaron sobre tres transformantes distintos para cada una de las proteínas fosfatasa. (B) Representación gráfica de la recuperación del crecimiento de dichos transformantes en número de gotas en las que se aprecia crecimiento.

Con el fin de confirmar que las proteínas fosfatasa o subunidades asociadas aisladas en el ensayo anterior actúan como reguladores negativos de la ruta de apareamiento se cuantificó la expresión del gen *FUS1*. Este gen codifica una proteína que se localiza en la punta del *shmoo*,

es importante para la fusión de las células que aparean y su expresión está regulada directamente por la ruta de apareamiento a través del factor de transcripción Ste12 (Roberts *et al.*, 2000; Nolan *et al.*, 2006). Por tanto, la sobreexpresión de Ste4 da lugar a un incremento en la expresión de *FUS1*. Las células empleadas en la figura 46 se transformaron con el plásmido pRS423-*pFUS1-lacZ* (que contiene la región promotora del gen *FUS1* fusionada al gen reportero *lacZ*) y se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa. Los datos reflejados en la figura 47 confirman que la sobreexpresión de todas las proteínas fosfatasa o proteínas asociadas ensayadas reduce significativamente, aunque en diferente grado, la expresión del gen *FUS1* provocada por la sobreexpresión de Ste4. Este hecho valida los resultados obtenidos a través del ensayo fenotípico de crecimiento.



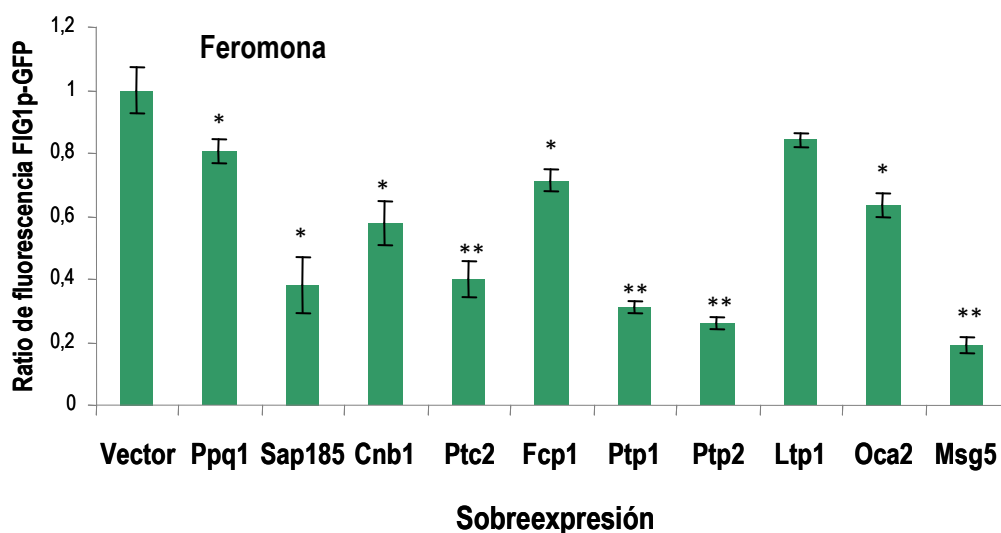
**Figura 47. Efecto de la sobreexpresión conjunta de Ste4 y distintas proteínas fosfatasa sobre la expresión del gen reportero *FUS1*.**

Actividad  $\beta$ -galactosidasa de la cepa BY4741 cotransformada con el plásmido pRS315-*pGAL1-STE4*, el plásmido pRS423-*pFUS1-lacZ* y los plásmidos derivados del vector BG1805, que llevan el gen codificante para cada una de las proteínas indicadas en el gráfico. Los transformantes se cultivaron a 30°C en medio mínimo selectivo carente de uracilo, leucina e histidina utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Ste4 y de las distintas fosfatasa mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Se representan los valores medios de la actividad  $\beta$ -galactosidasa de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa control transformada con el vector vacío (sin fosfatasa) a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Uno, dos o tres asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$  respectivamente.

De forma paralela se estudió si dichas proteínas fosfatasa o subunidades asociadas disminuyen la señalización de la ruta de apareamiento en respuesta al estímulo natural: feromona. En este caso se empleó el plásmido pRS315-*pFIG1-GFP*, en el que la expresión de GFP está controlada por el promotor del gen *FIG1*, que al igual que *FUS1* codifica una proteína de membrana

requerida en el proceso de apareamiento (Aguilar *et al.*, 2007). La expresión de *FIG1* está directamente relacionada con la activación de esta ruta de MAPKs.

De las lecturas de emisión de fluorescencia de GFP tomadas en un citómetro de flujo se obtuvieron los datos que se reflejan en la figura 48. Todas las proteínas fosfatasa o proteínas asociadas que reducían la expresión de *FUS1* inducida por la sobreexpresión de Ste4 también disminuyeron la expresión de *FIG1* tras el tratamiento con feromona. Las fosfatasa Ptc2, Ptp1, Ptp2 y Msg5 resultaron ser las enzimas más activas en ambas situaciones. Sin embargo, en algunos casos la capacidad de regular negativamente la ruta de apareamiento varió entre las dos condiciones ensayadas. Así, Ppq1, Ltp1 y Fcp1 parecen ser menos activas en presencia de feromona. Por otro lado, Sap185, Cnb1 y Oca2 mantienen una actividad similar presentando una reducción de la señalización en torno al 50% con respecto al control tanto en células que sobreexpresan Ste4 como en las tratadas con factor  $\alpha$ .

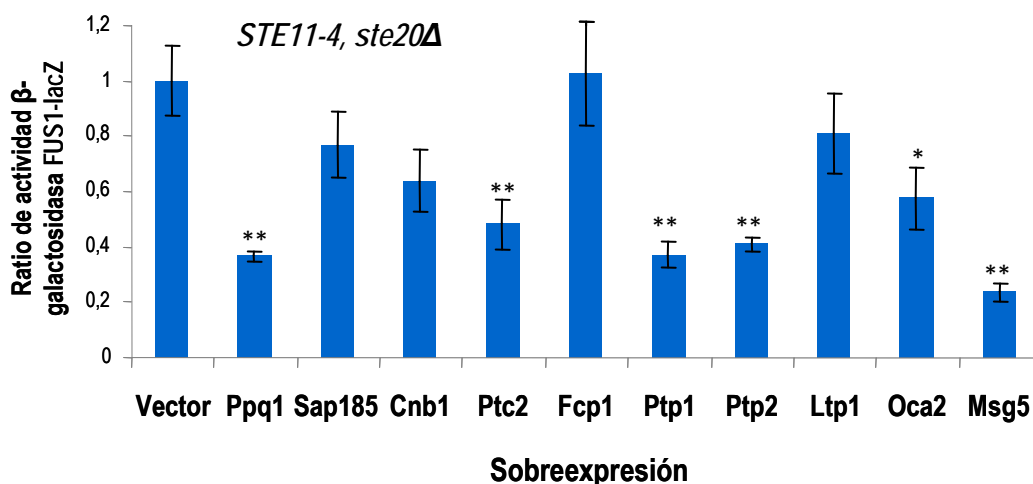


**Figura 48. Efecto de la sobreexpresión de proteínas fosfatasas sobre la expresión del gen *FIG1* en presencia de feromona.**

Citometría de flujo de la cepa BY4741 cotransformada con el plásmido pRS315-*pFIG1-GFP* y los plásmidos derivados del vector BG1805, que llevan el gen codificante para cada una de las proteínas indicadas en el gráfico. Los cotransformantes se cultivaron a 30°C en medio mínimo selectivo carente de uracilo y leucina utilizando galactosa a 2% como fuente de carbono durante 4 horas tras las cuales se añadió feromona ( $\alpha$ -factor) (10  $\mu$ M) durante 2 horas. Se muestran los valores medios de emisión de fluorescencia de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa control transformada con el vector vacío a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Uno o dos asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$ .

## 2.1.2 Identificación de proteínas fosfatasa cuya sobreexpresión atenúa la hiperactivación de la ruta de apareamiento provocada por la expresión del alelo hiperactivo *Ste11-4*

Con el fin de delimitar en qué punto de la cascada de señalización ejercen su acción cada una de las proteínas fosfatasa o subunidades asociadas aisladas previamente, inducimos la activación de la ruta de apareamiento desde la MAPKKK *Ste11*. Así, un mutante *ste20Δ* se transformó con el plásmido pRS425-*STE11-4* que expresa una versión hiperactiva de *Ste11* (*Ste11*<sup>T596I</sup>) (Stevenson *et al.*, 1992). Al realizar el ensayo en un mutante *ste20Δ* nos aseguramos de que este alelo hiperactivo induce, por sí solo la activación de *Ste7* y *Fus3* así como la expresión del gen *FUS1* de manera independiente al resto de componentes de la ruta que se encuentran por encima de la MAPKKK.



**Figura 49. Efecto de la sobreexpresión conjunta de *STE11-4* y distintas proteínas fosfatasa sobre la expresión del gen reportero *FUS1* en un mutante *ste20Δ*.**

Actividad β-galactosidasa de la cepa mutante Y00956 (*ste20Δ*) isogénica de la BY4741 cotransformada con el plásmido pRS425-*STE11-4*, el plásmido pRS423-*pFUS1-lacZ* y los plásmidos derivados del vector BG1805, que llevan el gen codificante para cada una de las proteínas indicadas en el gráfico. Los transformantes se cultivaron a 30°C en medio mínimo selectivo carente de uracilo, leucina e histidina utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de las distintas fosfatasa mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Se representan los valores medios de la actividad β-galactosidasa de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa control transformada con el vector vacío a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Uno o dos asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$  respectivamente.

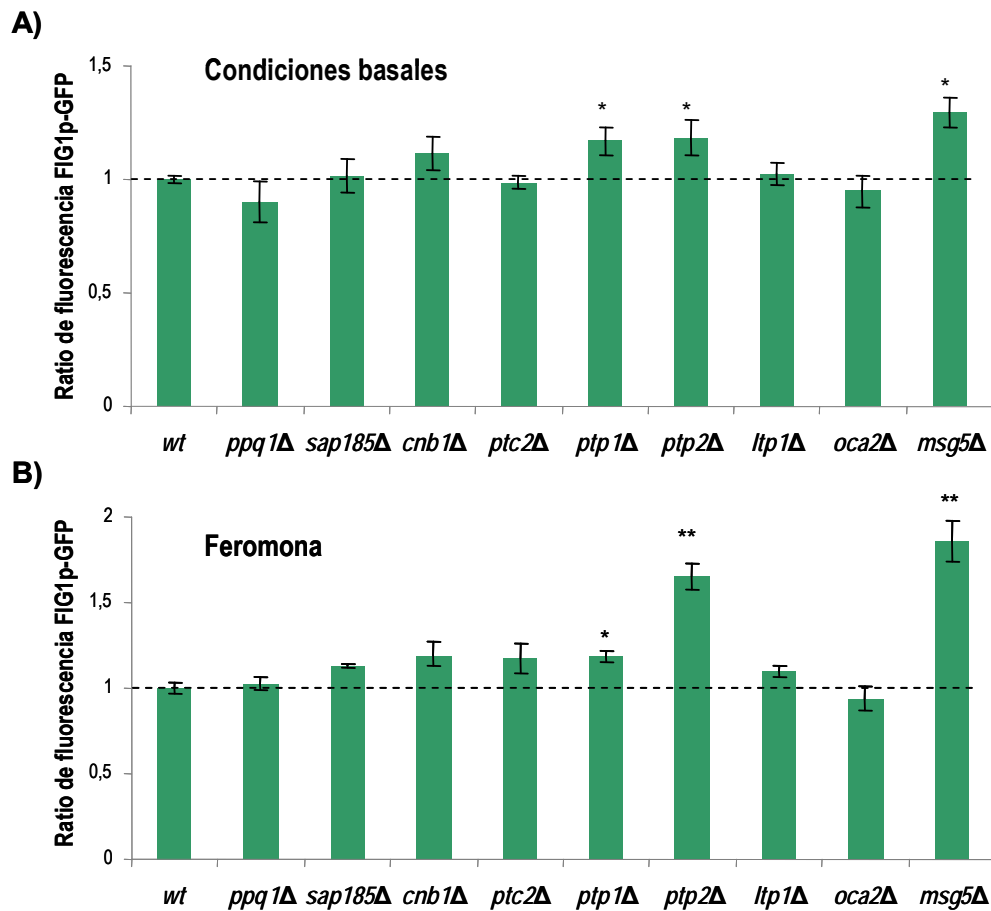
De forma similar al ensayo descrito en la figura 47 se cuantificó la actividad  $\beta$ -galactosidasa de las células que expresan conjuntamente el alelo hiperactivo Ste11-4 y cada una de las proteínas fosfatasa de estudio. Los resultados reflejados en la figura 49 muestran que la sobreexpresión de Ppq1, Ptc2, Ptp1, Ptp2, Oca2 y Msg5 redujo significativamente la expresión del gen *FUS1* en células que expresan el alelo hiperactivo Ste11-4. Sabiendo que Msg5 y Ptp2 desfosforilan a la MAPK Fus3 (Martin *et al.*, 2005), las proteínas fosfatasa Ppq1, Ptc2, Ptp1 y Oca2 se presentan como potenciales candidatos para regular negativamente bien a la MAPKK Ste7 o bien a la MAPK Fus3.

## **2.2 Estudios realizados sobre los mutantes sencillos carentes de proteínas fosfatasa**

### **2.2.1 Identificación de proteínas fosfatasa cuya eliminación provoca una activación de la ruta de apareamiento**

Nuestro siguiente objetivo se centró en conocer si la delección individual de cada uno de los genes identificados en el primer rastreo (a excepción del gen *FCP1*, que es esencial para las células de levadura) provoca un incremento en la señalización de la ruta de apareamiento con respecto a una cepa silvestre. De esta forma se analizaron los niveles de expresión del gen *FIG1* tanto en ausencia como en presencia de feromona cuantificando la emisión de fluorescencia de GFP de la cepa silvestre BY4741 y las mutantes isogénicas.

En la figura 50 se puede observar que en condiciones basales y especialmente en presencia de feromona, los mutantes *msg5* $\Delta$  y *ptp2* $\Delta$  presentan unos niveles de emisión de fluorescencia, y por tanto de expresión del gen *FIG1*, superiores al menos en un 20% a los observados en la cepa silvestre. Hay que destacar que el mutante *ptp1* $\Delta$  mostró también un incremento, ligero pero significativo, en la señalización tanto basal como tras activación de la cascada por factor  $\alpha$ . Este hecho, junto con los resultados anteriores, sugiere que es probable que esta fosfatasa ejerza un papel como regulador negativo de la ruta de apareamiento.



**Figura 50. Efecto de la ausencia de distintas proteínas fosfatasa sobre la expresión del gen *FIG1* en condiciones basales y de estimulación con feromona.**

Citometría de flujo de la cepa silvestre BY4741 (wt) y los distintos mutantes isogénicos transformados con el plásmido pRS315-*pFIG1-GFP*. Se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo carente de leucina durante toda la noche. Se recogieron muestras a tiempo cero (A) y tras 2 horas de incubación con feromona 10 μM (B). Se muestran los valores medios de emisión de fluorescencia de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa silvestre BY4741 a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Uno o dos asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.05$  y  $p \leq 0.01$  respectivamente.

## 2.3 La tirosín fosfatasa Ptp1 interacciona con la MAPK Fus3

Tras analizar los resultados obtenidos en la búsqueda de nuevos reguladores negativos de la ruta de apareamiento afirmamos que la tirosín fosfatasa Ptp1 es uno de los candidatos que, con más certeza, puede tener alguna función sobre el módulo de quinasas. Teniendo en cuenta que entre los componentes del módulo de quinasas la fosforilación en tirosina sólo es necesaria para la activación de la MAPK, en el caso de que Ptp1 sea un regulador de la ruta de apareamiento, lo más probable es que actúe y, por tanto, interaccione con Fus3.

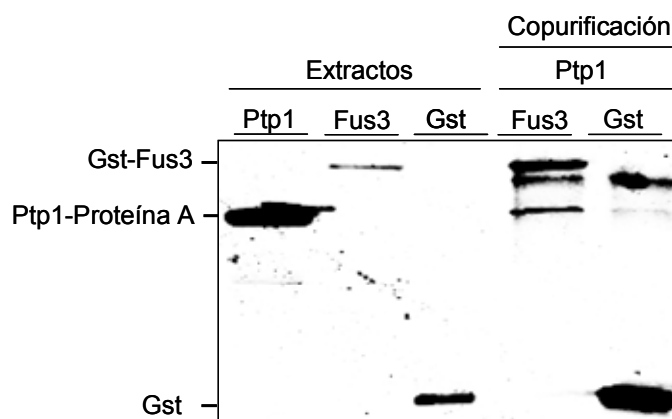
Para comprobar esta hipótesis se llevaron a cabo dos experimentos de copurificación *in vitro*. En el primero de ellos se expresó individualmente Fus3-ProteínaA, Gst y Gst-Ptp1 bajo el control del promotor *GAL1*. En el segundo se expresaron las mismas proteínas pero con diferentes etiquetas a las anteriores: Ptp1-ProteínaA, Gst y Gst-Fus3. Los extractos de levadura se mezclaron y se incubaron en presencia de una matriz de glutation. Mediante *western-blotting* se detectó la presencia de todas las proteínas con anticuerpos anti-Gst ya que la proteína A de *Staphylococcus aureus* utilizada como epítipo en estos ensayos es capaz de reconocer la cadena pesada de cualquier anticuerpo.

Los resultados de la figura 51 muestran que Ptp1 y Fus3 interactúan en ambos experimentos (Gst-Ptp1 se une a Fus3-ProteínaA y, a su vez, Ptp1-ProteínaA copurifica con Gst-Fus3) y sugieren que esta tirosín fosfatasa podría regular la ruta de apareamiento desfosforilando a la MAPK.

A)



B)



**Figura 51. Ensayos de copurificación de Fus3 con Ptp1.**

*Western blotting* de los extractos proteicos y de las proteínas retenidas en el ensayo de copurificación *in vitro*. (A) La cepa YPH499 se transformó con el plásmido BG1805-FUS3, pEG(KG) o pEGH-GST-PTP1 que expresan Fus3, Gst y Gst-Ptp1. (B) La cepa YPH499 se transformó con el plásmido BG1805-PTP1, pEG(KG) o pEG(KG)-FUS3 que expresan Ptp1, Gst y Gst-Fus3. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Fus3 y Gst-Ptp1 en (A) o Ptp1 y Gst-Fus3 en (B) mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Los extractos proteicos se incubaron con de una matriz de glutation. Se utilizaron anticuerpos anti-Gst para analizar la presencia tanto de las marcadas con Gst como las unidas a la proteína A.

### 3. BÚSQUEDA DE PROTEÍN FOSFATASAS QUE REGULEN NEGATIVAMENTE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR

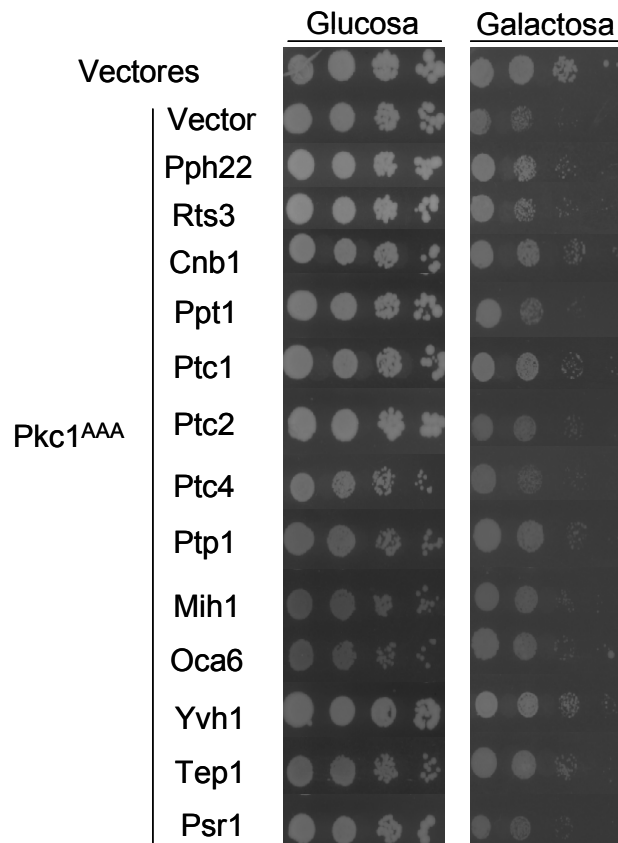
Hemos mencionado en la introducción que la ruta de integridad celular está regulada por las fosfatasa duales Msg5 y Sdp1 y las tirosín fosfatasa Ptp2 y Ptp3 que desfosforilan a la MAPK Sit2 (Martin *et al.*, 2005). Con el fin de conocer nuevos reguladores negativos de esta cascada de señalización se rastreó la misma colección de 43 genes que se emplearon para realizar el rastreo sobre la ruta de apareamiento (ver tabla IX).

#### 3.1 Estudios basados en la sobreexpresión de proteín fosfatasa

##### 3.1.1 Identificación de proteín fosfatasa cuya sobreexpresión atenúa la inhibición del crecimiento provocada por la expresión del alelo hiperactivo Pkc1<sup>AAA</sup>

Con el objetivo de encontrar nuevas proteín fosfatasa que actúen en la ruta de integridad celular a nivel del módulo de MAPKs se llevaron a cabo dos rastreos complementarios. En el primero de ellos se expresó una versión hiperactiva de *PKC1* (*PKC1<sup>A398A405A406</sup>* o *PKC1<sup>AAA</sup>*) bajo el control del promotor *GAL1*. Esta versión de Pkc1 presenta un cambio de las argininas de las posiciones 398, 405 y 406 de la zona del pseudosustrato a alaninas. La expresión de dicho alelo provoca la inhibición del crecimiento en la levadura (Martin *et al.*, 2000).

Para realizar el ensayo fenotípico de crecimiento en gota se cotransformó la cepa silvestre SEY6211 con el plásmido YEplac112-*PKC1<sup>AAA</sup>* y el plásmido que porta la secuencia codificante de cada uno de los 43 genes reflejados en la tabla IX. Se realizaron diluciones decimales seriadas de los transformantes en placas de medio selectivo tanto en presencia de glucosa (control de crecimiento) como de galactosa, donde se induce la expresión de Pkc1<sup>AAA</sup> y de cada una las proteín fosfatasa o subunidades asociadas. Del total de 43 genes ensayados, la sobreexpresión de 14 de ellos redujo el efecto inhibitorio sobre el crecimiento del alelo hiperactivo *PKC1<sup>AAA</sup>* (Figura 52).



**Figura 52. Atenuación del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la sobreexpresión del alelo hiperactivo Pkc1<sup>AAA</sup> por la sobreexpresión de distintas proteínas fosfatasa o subunidades asociadas a éstas.**

Diluciones seriadas decimales en medio SD (glucosa) y SG (galactosa) de la cepa SEY6211 cotransformada con el plásmido YEplac112-PKC1<sup>AAA</sup> (PKC1<sup>A368A405A406</sup>) y el plásmido basado en el vector BG1805 que porta el ORF de las proteínas indicadas bajo el control del promotor GAL1. Las placas se incubaron a 24°C durante 48-72 horas. Los ensayos se realizaron por triplicado (tres transformantes distintos) para cada una de las proteínas fosfatasa o subunidades asociadas.

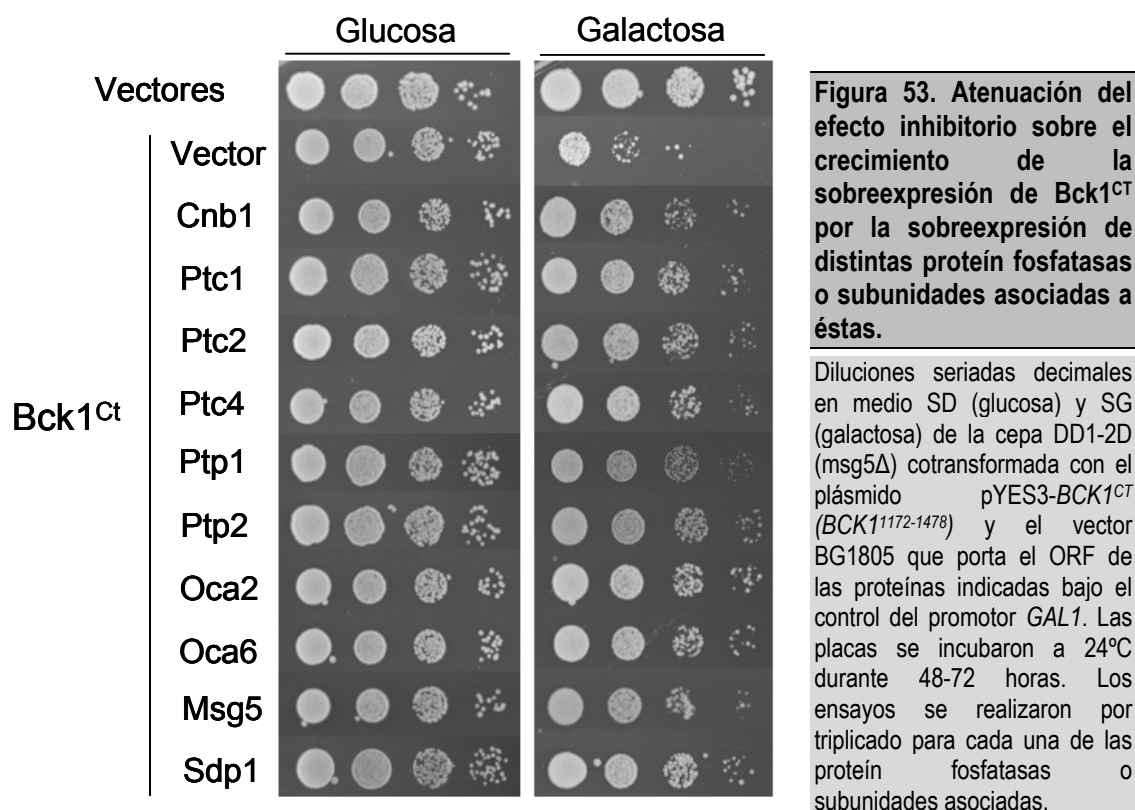
### 3.1.2 Identificación de proteínas fosfatasa cuya sobreexpresión atenúa la inhibición del crecimiento provocada por la sobreexpresión del extremo C-terminal de Bck1

Se conoce con detalle la activación del módulo de quinasas Bck1-Mkk1/2-Slt2 por parte de Pkc1. Seguramente no sean ni los únicos sustratos ni la única vía activada por esta quinasa. Así lo demuestra el hecho de que un mutante *pkc1Δ* sea inviable en condiciones normales de crecimiento mientras que la delección de cualquiera de los miembros de la ruta de integridad celular no presente un fenotipo tan grave (Levin, 2005). Por eso, la inhibición del crecimiento provocada por Pkc1<sup>AAA</sup> podría ser debido no sólo a la hiperactivación de la ruta de integridad sino a las consecuencias de una fosforilación sostenida sobre otras dianas celulares.

De esta forma, el rastreo previo realizado con este alelo hiperactivo puede dar lugar a la aparición de reguladores negativos que no sean específicos de la ruta de integridad. Por esta razón decidimos llevar a cabo un segundo rastreo en el que se activó la cascada desde la MAPKKK Bck1 con el fin de conocer posibles reguladores negativos tanto de Mkk1/2 como de Slt2. Se construyó una versión de Bck1 (Bck1<sup>CT</sup>:Bck1<sup>1172-1478</sup>) que carece de la región

aminoterminal regulatoria; cuando se sobreexpresa da lugar a una hiperactivación de Slit2 y, como consecuencia, a una ligera inhibición del crecimiento en una cepa silvestre (datos no mostrados) que fue más notable en un mutante *msg5Δ* (Figura 53).

La figura 53 muestra únicamente los ensayos fenotípicos por crecimiento en gota en los que la sobreexpresión de alguna proteína fosfatasa atenúa la inhibición del crecimiento provocada por la sobreexpresión de Bck1<sup>CT</sup>. Entre ellos se encuentran los reguladores negativos conocidos de Slit2 (Msg5, Sdp1 y Ptp2), cuya sobreexpresión es capaz de reducir el efecto inhibitorio provocado por Bck1<sup>CT</sup> mientras que no lo hacen sobre el causado por Pkc1<sup>AAA</sup>.



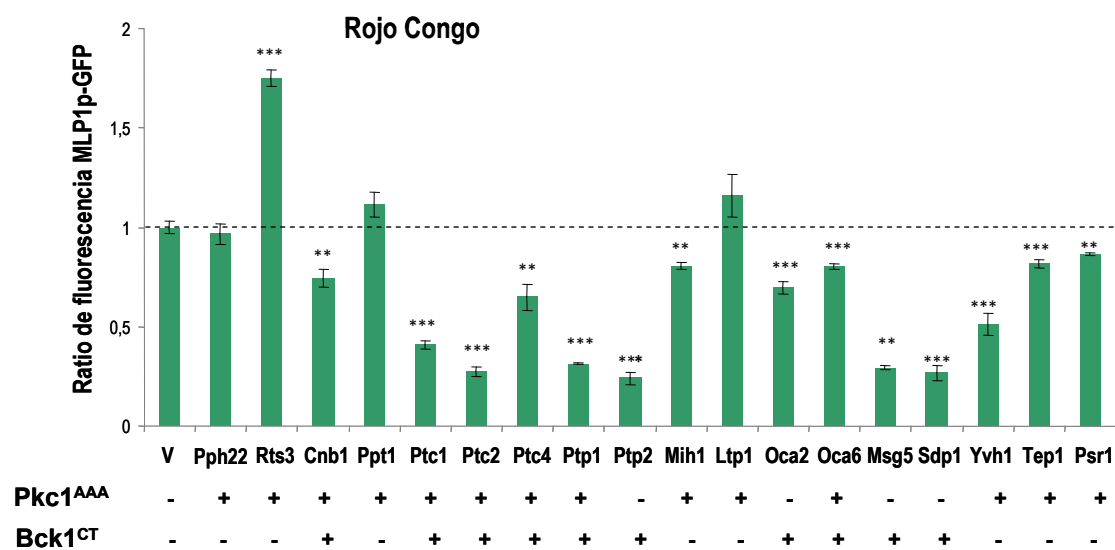
### 3.1.3 Identificación de proteínas fosfatasas cuya sobreexpresión atenúa la activación de la ruta de integridad celular en respuesta a rojo Congo

Seguidamente estudiamos si la sobreexpresión de las proteínas fosfatasas o subunidades reguladoras identificadas en los dos rastreos previos reduce la señalización de la ruta de integridad celular en respuesta a rojo Congo. A través de este experimento conseguimos, en primer lugar, comprobar si las proteínas fosfatasas que suprimen el efecto inhibitorio ocasionado

por la sobreexpresión de  $Pkc1^{AAA}$  lo hacen sobre alguno de los componentes de la ruta de integridad celular. En segundo lugar, logramos confirmar que las fosfatasa identificadas en el segundo rastreo actúan efectivamente regulando negativamente el módulo de MAPKs.

Se cuantificó por citometría de flujo la expresión de  $MLP1$  tanto en la cepa silvestre como en las células que sobreexpresan cada uno de los 18 genes aislados en los dos rastreos anteriores en presencia de rojo Congo y empleando una fusión del promotor de  $MLP1$  a GFP.

Resulta interesante destacar que todas las proteínas fosfatasa que atenuaron la inhibición del crecimiento ocasionada por  $Bck1^{CT}$  disminuyeron notablemente los niveles de expresión de  $MLP1$  en condiciones de activación de la ruta de integridad celular (Figura 54). Entre ellas se encuentran reguladores negativos conocidos de  $Slr2$  como  $Msg5$ ,  $Sdp1$  y  $Ptp2$ . También lo hicieron las serín-treonín fosfatasa  $Ptc1$ ,  $Ptc2$  y  $Ptc4$ ; la tirosín fosfatasa  $Ptp1$ ; la subunidad reguladora de la calcineurina ( $Cnb1$ ) y las fosfatasa duales atípicas  $Oca2$  y  $Oca6$ . Todas estas proteínas fosfatasa son, por tanto, potenciales candidatos que podrían desempeñar alguna función sobre el módulo de MAPKs de la ruta CWI.



**Figura 54. Cuantificación del efecto de la sobreexpresión de proteínas fosfatasa sobre la expresión del gen  $MLP1$  en presencia de rojo Congo.**

Citometría de flujo de la cepa BY4741 cotransformada con el plásmido pRS315- $pMLP1$ -GFP y los plásmidos derivados del vector BG1805, que portan la secuencia codificante para cada una de las proteínas indicadas en el gráfico. Los cotransformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo carente de uracilo y leucina utilizando galactosa a 2% como fuente de carbono durante 16 horas. A continuación se incubaron con rojo Congo (30 µg/ml) durante 4 horas en medio rico YPD. Se muestran los valores medios de emisión de fluorescencia de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa control transformada con el vector vacío (V) a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Uno, dos o tres asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un  $p$ -value de  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$  respectivamente.

La sobreexpresión de Pph22, Rts3, Ppt1 y Ltp1, identificadas sólo en el rastreo sobre Pkc1<sup>AAA</sup>, no redujo la expresión de *MLP1* (Figura 54). De esta forma consideramos que estas proteínas fosfatasa podrían estar actuando sobre otros posibles sustratos celulares de Pkc1 y no sobre el módulo de MAPKs. A pesar de que no fueron aisladas en el rastreo realizado sobre Bck1<sup>CT</sup>, la sobreexpresión de Mih1, Tep1 y Psr1 disminuyó de forma muy ligera pero significativa la señalización de la ruta de integridad en presencia de rojo Congo. Por ello no podemos descartar que actúen sobre el módulo de MAPKs, aunque este hecho parece poco probable. El caso de la fosfatasa dual Yvh1 resulta paradójico ya que su sobreexpresión claramente disminuyó la expresión de *MLP1* aunque no atenuó la inhibición del crecimiento provocada por Bck1<sup>CT</sup>.

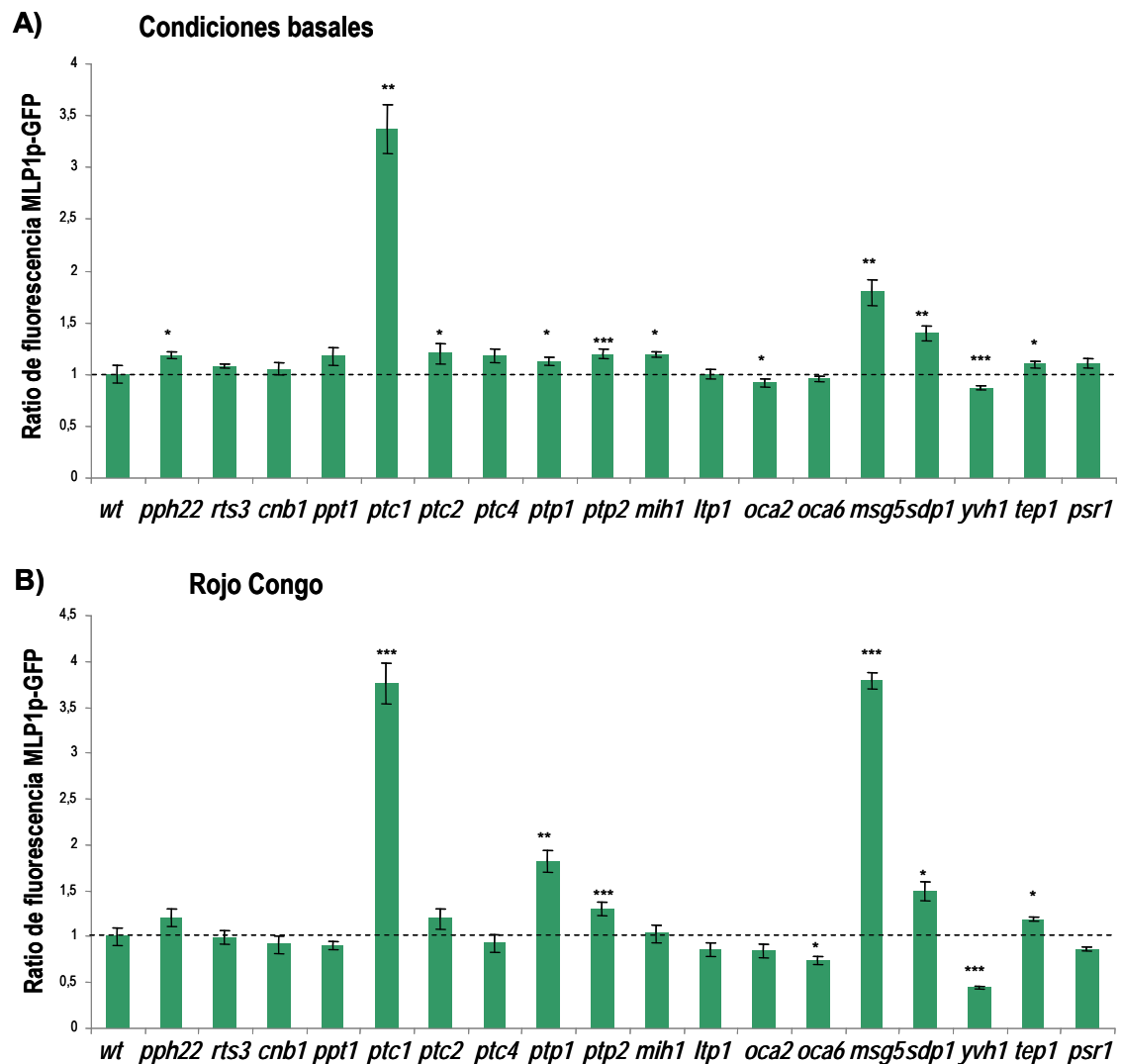
## **3.2 Estudios realizados sobre los mutantes sencillos carentes de proteína fosfatasa**

### **3.2.1 Identificación de proteínas fosfatasa cuya eliminación provoca una activación de la ruta de integridad celular**

En principio, si los genes indentificados en los dos rastreos descritos anteriormente fueran reguladores negativos sería esperable que su delección provocara una activación de la ruta de integridad celular. Para confirmar esta hipótesis se analizaron los niveles fosforilación de Slt2 y los de expresión de *MLP1* (cuantificando la emisión de fluorescencia de GFP por citometría de flujo) tanto de la cepa silvestre BY4741 como de las mutantes isogénicas en ausencia y presencia de rojo Congo.

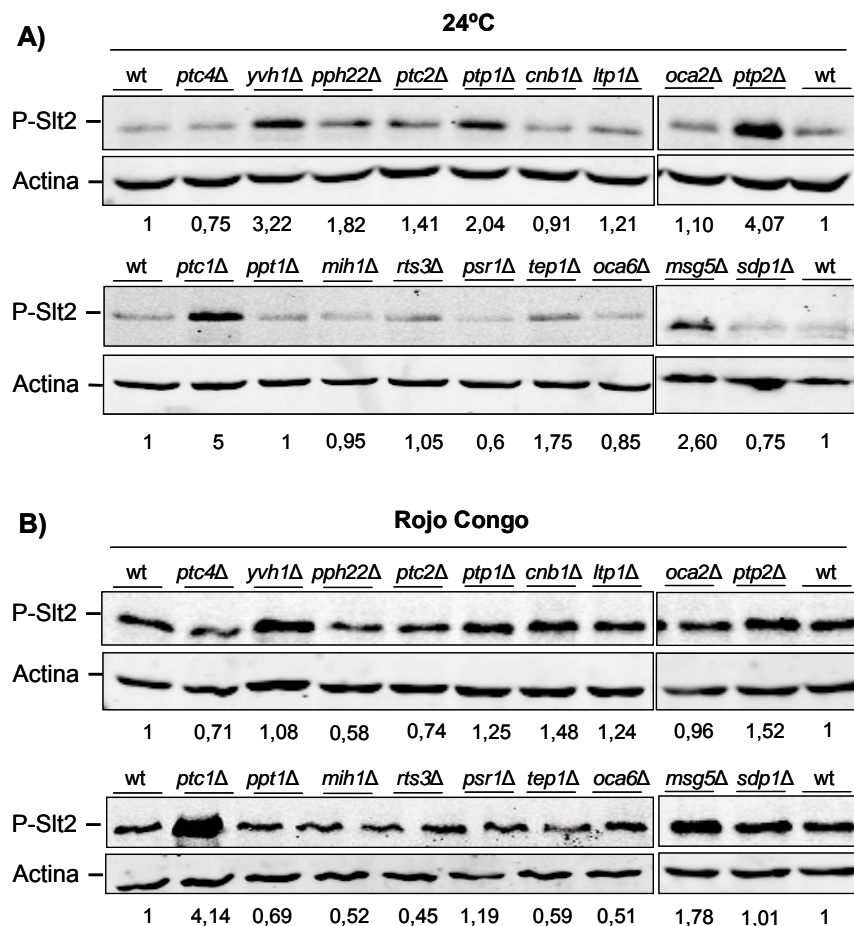
En ausencia de estimulación, la carencia de reguladores negativos conocidos de la ruta de integridad celular (*Msg5*, *Ptp2* y *Ptc1*) dió lugar a unos niveles de fosfo-Slt2 y de expresión de *MLP1* significativamente superiores a los observados en la cepa silvestre (Figuras 55 y 56). Además, los mutantes *sdp1Δ*, *pph22Δ*, *ptc2Δ*, *ptp1Δ*, *mih1Δ* y *tep1Δ* presentaron un ligero incremento en la señalización a través de la ruta CWI con respecto a la cepa silvestre como se observa en los datos de expresión de *MLP1* y, en algunos de ellos, también en la fosforilación de Slt2. En presencia de estimulación, únicamente los mutantes *msg5Δ*, *ptp2Δ* y *ptc1Δ* exhibieron una elevada fosforilación de Slt2 y, junto con el mutante *sdp1Δ*, también presentaron un incremento en la señal emitida por GFP en dichas condiciones. Además de los reguladores negativos previamente conocidos, los mutantes *ptp1Δ* y *tep1Δ* también mostraron un aumento significativo en la expresión de *MLP1* en presencia de rojo Congo. El mutante *yvh1Δ* presentó un

comportamiento paradójico ya que, a pesar de que los niveles de expresión de *MLP1* fueron significativamente más bajos que los de la cepa silvestre tanto en ausencia como en presencia de rojo Congo, este mutante mostró una acumulación de fosfo-Slt2 en ambas condiciones.



**Figura 55. Cuantificación del efecto de la ausencia de distintas fosfatasa sobre la expresión del gen *MLP1* en condiciones basales y de estimulación con rojo Congo.**

Citometría de flujo de la cepa silvestre BY4741 (wt) y los distintos mutantes isogénicos transformados con el plásmido pRS315-*pMLP1-GFP*. Se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo carente de leucina durante toda la noche. Se recogieron muestras a tiempo cero (A) y tras 4 horas de incubación con rojo Congo (30 µg/ml) en medio rico YPD (B). Se muestran los valores medios de emisión de fluorescencia de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa silvestre BY4741 a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Uno, dos o tres asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un valor p (*p-value*) de  $p \leq 0.05$ ,  $p \leq 0.01$  y  $p \leq 0.001$  respectivamente.



**Figura 56. Efecto de la ausencia de distintas fosfatasa sobre la fosforilación de la MAPK Slt2.**

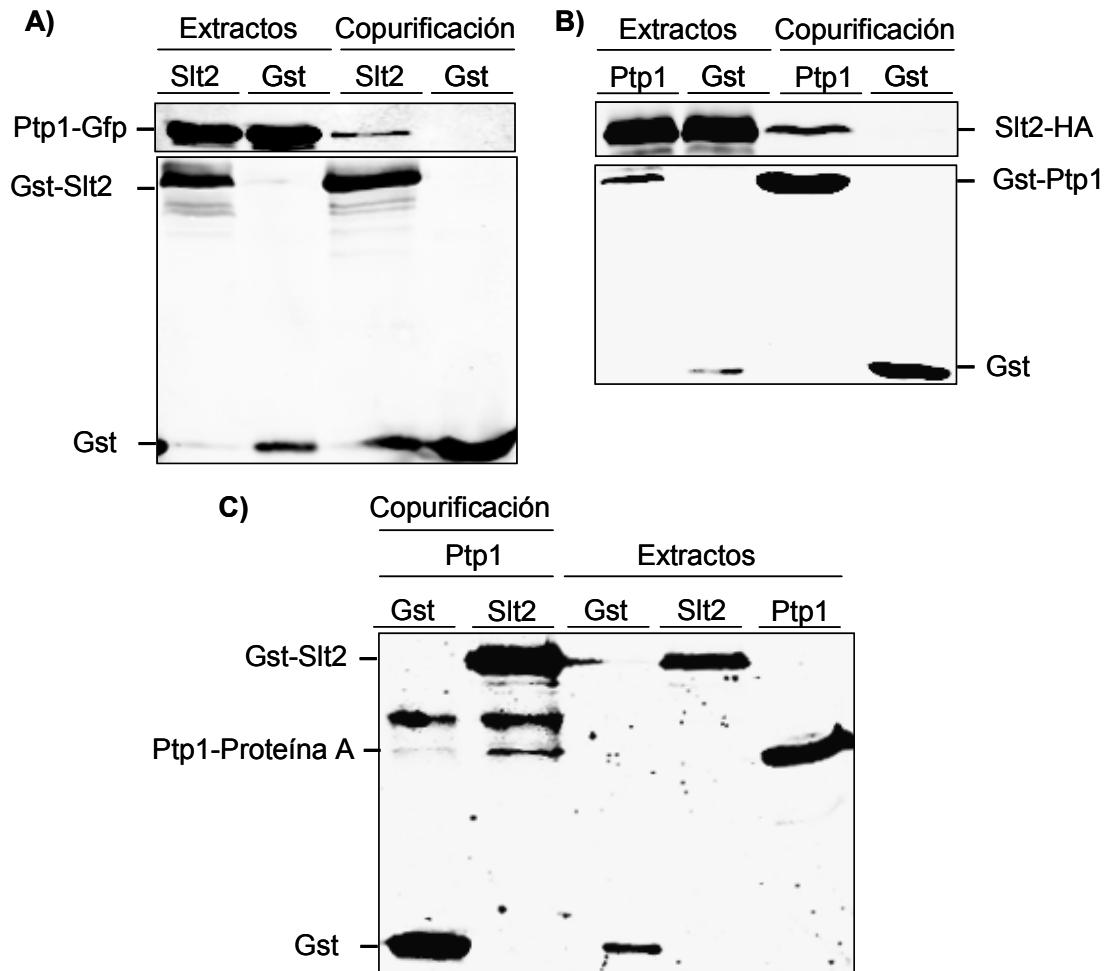
La cepa BY4741 (wt) y las mutantes isogénicas se cultivaron a 24°C en medio YPD y en fase exponencial se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 3 horas. Los extractos proteicos de se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2 y anti-actina como control de carga. Los números que aparecen debajo de los paneles indican los niveles de fosforilación de Slt2 con respecto a la actina y relativizados al valor de 1 en la cepa silvestre.

### 3.3 La tirosín fosfatasa Ptp1 interacciona con la MAPK Slt2

Tras estudiar los resultados obtenidos en la búsqueda de nuevos reguladores negativos de la ruta de integridad celular, parece que la tirosín fosfatasa Ptp1 es uno de los candidatos que podría estar desfosforilando algún componente del módulo de quinasas. Teniendo en cuenta que hemos demostrado en este trabajo que Ptp1 interacciona con Fus3 y que, entre los componentes del módulo de quinasas sólo la fosforilación en tirosina es necesaria para la activación de la MAPK, quisimos comprobar si Ptp1 era capaz de interaccionar también con Slt2.

Para ello se llevaron a cabo dos experimentos de copurificación *in vivo* (Figura 57A y 57B) con las proteínas etiquetadas de diferente manera y otro *in vitro* en el que se expresaron las proteínas individualmente en levadura y posteriormente se mezclaron los extractos proteicos (Figura 57C). En todos ellos se observó que Ptp1 y Slt2 interaccionan: Ptp1-Gfp se une a Gst-Slt2 (Figura 57A), Ptp1-Gst copurifica con Slt2-HA (Figura 57B) y Ptp1-ProteínaA se une a Gst-

Slit2 (Figura 57C). Estos datos sugieren que esta tirosín fosfatasa podría regular la ruta de integridad celular desfosforilando a la MAPK Slit2.



**Figura 57. Ensayos de copurificación de Slit2 con Ptp1.**

Western-blotting de los extractos proteicos y de las proteínas retenidas en los ensayos de copurificación. **(A)** La cepa YPH499 se cotransformó con el plásmido YCplG-PTP1-GFP y los plásmidos pEG(KG) o pEG(KG)-SLT2 que expresan Ptp1-GFP, Gst y Gst-Slit2. **(B)** La cepa YPH499 se cotransformó con el plásmido YEp351-SLT2-HA y los plásmidos pEG(KG) o pEGH-PTP1 que expresan Slit2-HA, Gst y Gst-Ptp1. **(C)** La cepa YPH499 se transformó con el plásmido BG1805-PTP1, pEG(KG) o pEG(KG)-SLT2 que expresan Ptp1, Gst y Gst-Slit2. Se cultivaron con rafinosa al 1,5% y en fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Ptp1-GFP, Gst-Slit2 **(A)**, Gst-Ptp1 **(B)** o Ptp1 y Gst-Slit2 **(C)** mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Los extractos proteicos se incubaron con una matriz de glutatión. Se utilizaron anticuerpos anti-Gfp y anti-Gst.

### **3.4 La fosfatasa dual Yvh1 es importante para el mantenimiento de la integridad celular**

#### **3.4.1 La ausencia de actividad catalítica de Yvh1 no es la causa de los fenotipos del mutante *yvh1Δ* asociados a un daño en la pared celular**

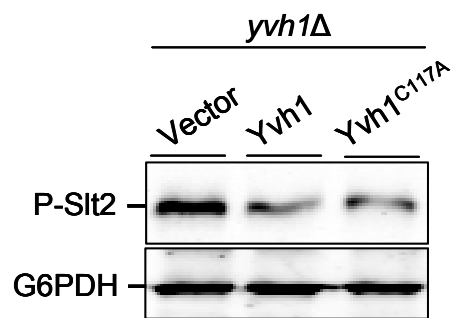
La sobreexpresión de la proteína fosfatasa Yvh1 atenuó el efecto inhibitorio en el crecimiento provocado por el alelo hiperactivo de Pkc1 ( $Pkc1^{AAA}$ ) y disminuyó notablemente la expresión del gen *MLP1* en presencia de rojo Congo. Por esta razón pensamos que Yvh1 podría estar regulando la ruta de integridad celular. Sin embargo, se observó un comportamiento paradójico en el mutante *yvh1Δ* ya que, a pesar de mostrar una acumulación de fosfo-Slt2, los niveles de expresión de *MLP1* fueron significativamente menores que los de la cepa silvestre tanto en ausencia como en presencia de rojo Congo.

Se ha descrito que la fosfatasa dual Yvh1 participa en la maduración del ribosoma. Esta proteína es reclutada a las partículas preribosomales pre-60S, lo que facilita la liberación del factor Mrt4, necesario para la maduración ribosomal (Lo *et al.*, 2009). Mientras que el dominio rico en cisteínas que coordina el catión de Zinc (*Zn finger domain*) situado en el extremo carboxiterminal de Yvh1 (Liu y Chang 2009) es necesario para una adecuada salida del núcleo y ensamblaje de las partículas pre-60S, la actividad fosfatasa es totalmente dispensable (Kemmler *et al.*, 2009).

En primer lugar quisimos conocer si la falta de actividad fosfatasa era la causa de que el mutante *yvh1Δ* presentara altos niveles de fosforilación de Slt2. Se expresaron en dicho mutante y desde su propio promotor tanto la versión silvestre de Yvh1 como la versión que porta una mutación en la cisteína catalítica ( $Yvh1^{C117A}$ ). En la figura 58 se observa que ambas versiones reducen los niveles de fosforilación de Slt2 del mutante *yvh1Δ* por lo que la actividad catalítica de Yvh1 no es importante en el mantenimiento de los niveles basales de fosfo-Slt2.

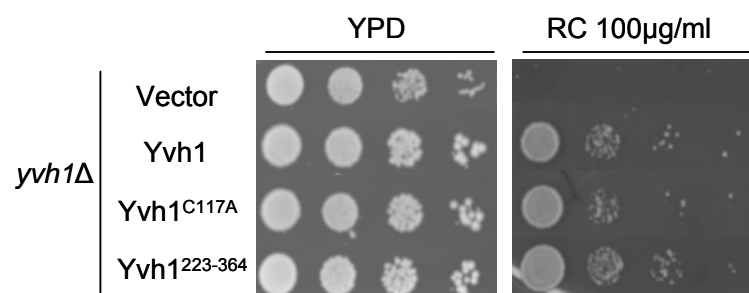
Los mutantes de delección en elementos de la ruta de integridad celular presentan fenotipos de sensibilidad a agentes que interfieren con la construcción de la pared celular debido a una defectuosa transducción de la señal. Si el mutante *yvh1Δ* presenta unos niveles de expresión de *MLP1* por debajo de los de la cepa silvestre podría mostrar cierta sensibilidad a dichos compuestos por presentar una débil e insuficiente respuesta adaptativa. En la figura 59 se muestra que las células que carecen de Yvh1 son sensibles a rojo Congo. Además, se comprobó que la versión catalíticamente inactiva de Yvh1 ( $Yvh1^{C117A}$ ) complementa, al igual que lo hace la versión silvestre, la sensibilidad del mutante *yvh1Δ* a rojo Congo y que el dominio C-terminal no

catalítico de Yvh1 (Yvh1<sup>223-364</sup>) es suficiente para mantener una adecuada respuesta frente a este estímulo.



**Figura 58. Efecto de la ausencia de la actividad fosfatasa de Yvh1 en los niveles de fosforilación de Slt2.**

La cepa mutante isogénica de la BY4741 Y05961 (*yvh1Δ*) se transformó con el vector vacío pRS316, pRS316-YVH1 (que expresa la versión silvestre de Yvh1) o pRS316-YVH1<sup>C117A</sup> (que expresa la versión catalíticamente inactiva de Yvh1). Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche y se refrescaron en medio rico YPD. Los extractos proteicos se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2 y anti-G6PDH como control de carga.



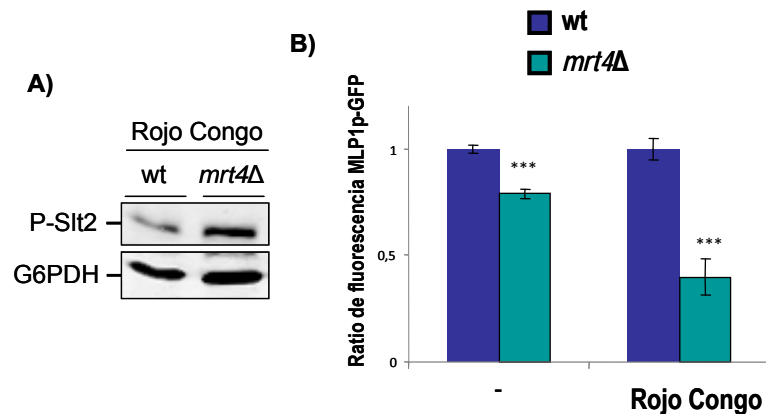
**Figura 59. Análisis fenotípico de la sensibilidad a rojo Congo de células carentes de Yvh1 o que expresan Yvh1, Yvh1<sup>C117A</sup> o Yvh1<sup>223-364</sup>.**

Ensayo fenotípico por crecimiento en gota de la cepa mutante isogénica de la BY4741 Y05961 (*yvh1Δ*) se transformó con el vector vacío pRS316, pRS316-YVH1 (que expresa la versión silvestre de Yvh1), pRS316-YVH1<sup>C117A</sup> o pRS315-YVH1<sup>223-364</sup>. Se realizaron diluciones seriadas decimales de estos transformantes en placas de YPD (control) y en presencia de rojo Congo (RC) (100 μg/ml) como se indica en la figura. Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas.

### 3.4.2 El factor de ensamblaje ribosomal Mrt4 participa en el mantenimiento de la integridad celular

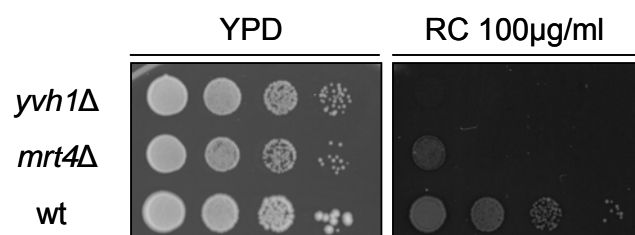
El hecho de que el dominio en dedos de Zn (*Zn finger domain*) de la región carboxiterminal de Yvh1 pueda estar jugando un papel en el mantenimiento de la integridad celular sugiere que la actividad de Yvh1 sobre la maduración ribosomal podría estar involucrada en esta función. Para comprobar esta hipótesis se analizaron fenotipos relacionados con la ruta de integridad celular en un mutante carente del factor de ensamblaje ribosomal Mrt4.

Los resultados reflejados en las figuras 60 y 61 indican que el mutante *mrt4Δ*, al igual que la cepa *yvh1Δ*, presenta mayor nivel de fosfo-Slt2 y menor nivel de expresión de *MLP1* con respecto a la cepa silvestre; siendo también más sensible a rojo Congo. Este hecho sugiere que la delección de *YVH1* o *MRT4* podría afectar a la traducción de RNAm específicos implicados en la respuesta frente a un daño en pared.



**Figura 60. Efecto de la delección de *MRT4* sobre los niveles fosforilación de Slt2 y de expresión del gen *MLP1*.**

(A) La cepa silvestre BY4741 (wt) y la mutante isogénica Y06015 (*mrt4Δ*) se cultivaron en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30 μg/ml) durante 4 horas. Los extractos proteicos se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2 y anti-G6PDH como control de carga. (B) Las cepas utilizadas en A se transformaron con el plásmido pRS315-*pMLP1-GFP*. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30 μg/ml) durante 4 horas. Se muestran los valores medios de emisión de fluorescencia de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa silvestre BY4741 a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Tres asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.001$ .

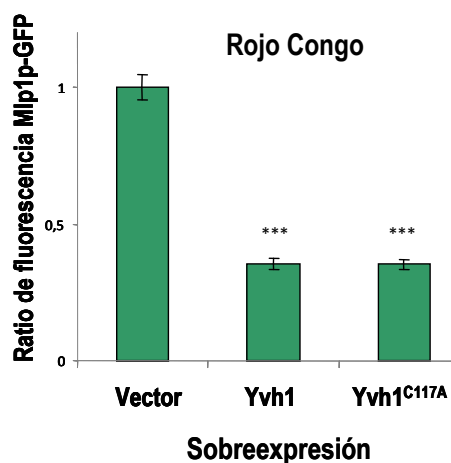


**Figura 61. Análisis fenotípico de la sensibilidad a rojo Congo y de los mutantes *yvh1Δ* y *mrt4Δ*.**

Ensayo fenotípico por crecimiento en gota de la cepa silvestre BY4741 (wt) y las mutantes isogénicas Y05961 (*yvh1Δ*) y Y06015 (*mrt4Δ*). Se realizaron diluciones seriadas decimales de estas cepas en placas de YPD (control) y en presencia de rojo Congo (RC) (100 μg/ml). Las placas se incubaron a 30°C durante 48 horas.

### 3.4.3 La sobreexpresión de la versión catalíticamente inactiva Yvh1<sup>C117A</sup> reduce los niveles de expresión de *MLP1* en respuesta a rojo Congo

La actividad catalítica de Yvh1 no está implicada en los fenotipos que hemos observado hasta el momento y parece que también es dispensable para el resto de sus funciones descritas (Beeser y Cooper, 2000; Kemmler *et al.*, 2009). En la figura 62 se muestra que la sobreexpresión de la versión Yvh1<sup>C117A</sup>, que carece de actividad fosfatasa, reduce los niveles de expresión de *MLP1* en respuesta a rojo Congo al igual que lo hace la versión silvestre. Estos datos sugieren que la sobreexpresión de Yvh1 no da lugar a ningún evento de desfosforilación sobre la cascada de MAPKs sino que es el aumento en la cantidad de Yvh1 lo que provoca alteraciones en el proceso de traducción dando lugar a la atenuación del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de la sobreexpresión de Pkc1<sup>AAA</sup> o a la disminución en los niveles de expresión de *MLP1*.



**Figura 62. Efecto de la sobreexpresión de Yvh1 y Yvh1<sup>C117A</sup> sobre los niveles de expresión de *MLP1* en presencia de rojo Congo.**

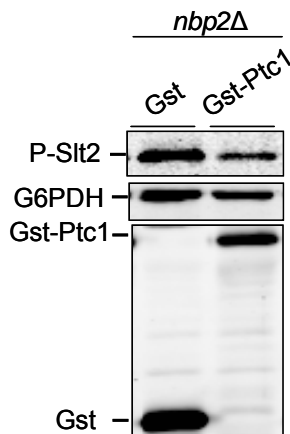
La cepa silvestre BY4741 se cotransformó con el plásmido pRS315-*MLP1pGFP* y con el vector BG1805 o los plásmidos BG1805-*YVH1* o BG1805-*YVH1*<sup>C117A</sup>. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio SG durante toda la noche y se refrescaron en medio YPD con rojo Congo (30µg/ml) durante 4 horas. Se muestran los valores medios de emisión de fluorescencia de tres transformantes independientes como ratio, es decir, relativos a la cepa silvestre a la que se asigna un valor de 1. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Tres asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.001$ .

## 4. ESTUDIO DE LA REGULACIÓN NEGATIVA DE Ptc1 SOBRE LA RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR

Los datos obtenidos en la búsqueda de nuevos reguladores negativos de la ruta de integridad celular (apartado 3 de resultados) sugieren que la serín-treonín fosfatasa Ptc1 podría actuar desfosforilando algún componente del módulo de MAPKs ya que en sobreexpresión atenúa la inhibición del crecimiento provocada por la sobreexpresión de Pkc1<sup>AAA</sup> y Bck1<sup>CT</sup>. Como se ha comentado en la introducción, se ha relacionado previamente a esta proteína fosfatasa con la ruta de integridad celular. Así, los mutantes *ptc1Δ* son sensibles a agentes que alteran la pared celular (caspofungina, blanco de calcoflúor, pH alcalino) (Ram *et al.*, 1994; Markovich *et al.*, 2004; Serrano *et al.*, 2006) y presentan elevados niveles de fosfo-Slt2 y de expresión del gen *MLP1* (Gonzalez *et al.*, 2006). Además, la proteína adaptadora Nbp2 interacciona con Bck1 (Palacios, 2010; Hruby *et al.*, 2011; Stanger *et al.*, 2012). Sin embargo, el componente de la ruta de integridad celular sobre el que actúa Ptc1 todavía se desconoce.

### 4.1 Búsqueda de la diana de Ptc1 en la ruta de integridad celular mediante el uso de alelos hiperactivos

Con el fin de buscar la diana de Ptc1, se realizaron una serie de ensayos epistáticos empleando alelos hiperactivos que inducen la activación de la ruta de integridad celular desde diferentes niveles. Todos estos experimentos se basaron en el análisis de la fosforilación de Slt2 en condiciones de sobreexpresión de *PTC1* bajo el control del promotor *GAL1*. A pesar de que Ptc1 realiza sus funciones a través de la proteína adaptadora Nbp2 (Uetz *et al.*, 2000) y que la delección de *NBP2* ocasiona defectos propios de un mutante *ptc1Δ* (Du *et al.*, 2006), parece que cuando Ptc1 se sobreexpresa no es necesaria la presencia de Nbp2 para que esta fosfatasa actúe como regulador negativo de la ruta de integridad celular. Así lo hemos constatado en los rastreos previos del apartado 3 de resultados. De hecho, la sobreexpresión de Ptc1 en un mutante *nbp2Δ* continúa reduciendo los niveles de fosfo-Slt2 (Figura 63). De esta forma se comprobó que la proteína Nbp2 es dispensable para que en sobreexpresión Ptc1 realice su función sobre la ruta de integridad celular. Este resultado da validez a los experimentos realizados a continuación de búsqueda del sustrato de Ptc1 mediante su sobreexpresión en células que carecen de Bck1 o de su dominio de interacción con Nbp2.



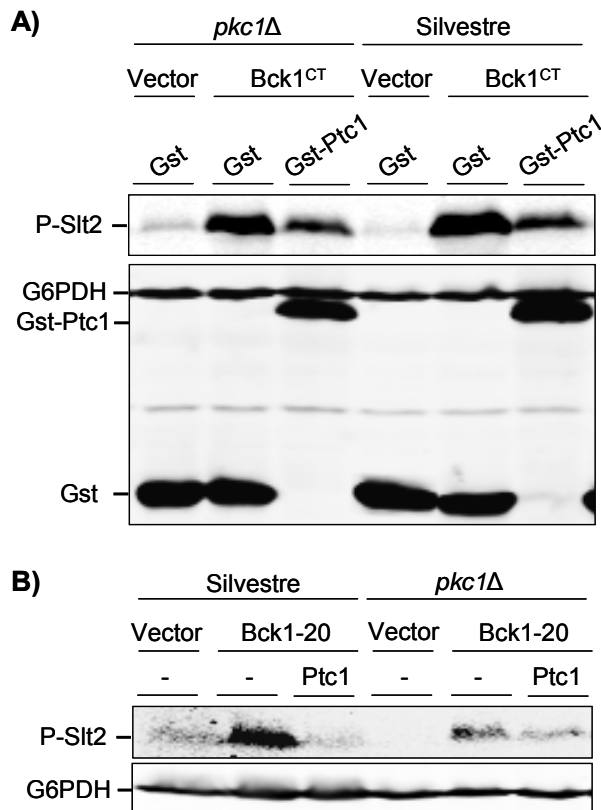
**Figura 63. Efecto de la sobreexpresión de Ptc1 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 en un mutante *nbp2Δ*.**

La cepa mutante isogénica de la BY4741 Y03520 (*nbp2Δ*) se transformó con el vector vacío pEG-(KG) o con el plásmido pEG-(KG)-*PTC1* como se indica en la figura. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Gst-Ptc1 mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-GST para detectar la presencia de Ptc1 y anti-G6PDH como control de carga.

#### 4.1.1 La sobreexpresión de Ptc1 reduce la señalización provocada por Bck1<sup>CT</sup> y Bck1-20 en los mutantes *pkc1Δ* y *bck1Δ*

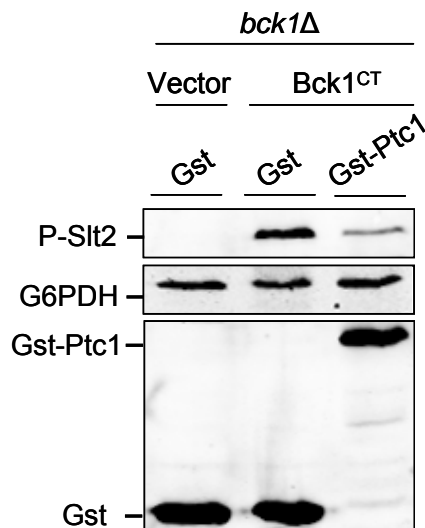
Con el fin de activar artificialmente el módulo de MAPKs en ausencia de cualquier elemento superior a él realizamos el siguiente ensayo sobre un mutante *pkc1Δ*. Como hemos comentado anteriormente estos mutantes son viables aunque requieren de la adición de sorbitol al medio de cultivo (de Nobel *et al.*, 2000). En estas células se sobreexpresó Bck1<sup>CT</sup> (Bck1<sup>1172-1478</sup>) bajo el control del promotor *GAL1*. Esta versión truncada de Bck1, empleada previamente en el rastreo, carece de los aminoácidos que interaccionan con Nbp2 (Stanger *et al.*, 2012) y de los residuos conocidos sobre los que Pkc1 fosforila y activa a Bck1 (Ser<sup>939</sup>, Thr<sup>1119</sup> y Ser<sup>1134</sup>) (Lee y Levin, 1992). Por otro lado, se utilizó también el alelo hiperactivo Bck1-20, un alelo mutante que mimetiza la forma activa de Bck1 (Lee y Levin, 1992).

Los resultados muestran que la expresión de Gst-Ptc1 inducida por galactosa redujo los niveles de fosforilación de Slt2 tras la sobreexpresión de Bck1<sup>CT</sup> tanto en una cepa silvestre como en el mutante *pkc1Δ* (Figura 64A). Además, la expresión de Gst-Ptc1 con su propio promotor desde un plásmido episómico también disminuyó la cantidad de fosfo-Slt2 provocada por la expresión del alelo Bck1-20 en células silvestres y carentes de Pkc1 (Figura 64B). Estos datos indican claramente que Ptc1 no actúa sobre Pkc1 y sugieren que Bck1 tampoco es su diana ya que la versión Bck1<sup>CT</sup> se compone únicamente del dominio quinasa y no contiene la región fosforilada por Pkc1 para activar esta MAPKKK. Además, cuando se sobreexpresa Bck1<sup>CT</sup> en un mutante *bck1Δ* la sobreexpresión de Ptc1 reduce la fosforilación de Slt2 de la misma manera que en el mutante *pkc1Δ* (Figura 65).



**Figura 64. Efecto de la sobreexpresión de Ptc1 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 en un mutante *pkc1Δ* que expresa Bck1<sup>CT</sup> o Bck1-20.**

(A) La cepa silvestre CML128 y la mutante isogénica MML344 (*pkc1Δ*) se cotransformaron con los vectores vacíos pEG-(KG) y pYES3 o con los plásmidos pEG(KG)-*PTC1* o pYES3-*BCK1<sup>CT</sup>*. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Gst-Ptc1 y Bck1<sup>CT</sup> mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. (B) La cepa silvestre BY4741 y la mutante isogénica *pkc1Δ* se cotransformaron con los vectores vacíos pRS316 y YEplac181 o con los plásmidos pRS316-*BCK1-20* o YEplac181-*PTC1*. Todos los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo en presencia de sorbitol (0,8M). Los extractos proteicos se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-Gst para detectar la presencia de Ptc1 y anti-G6PDH como control de carga.



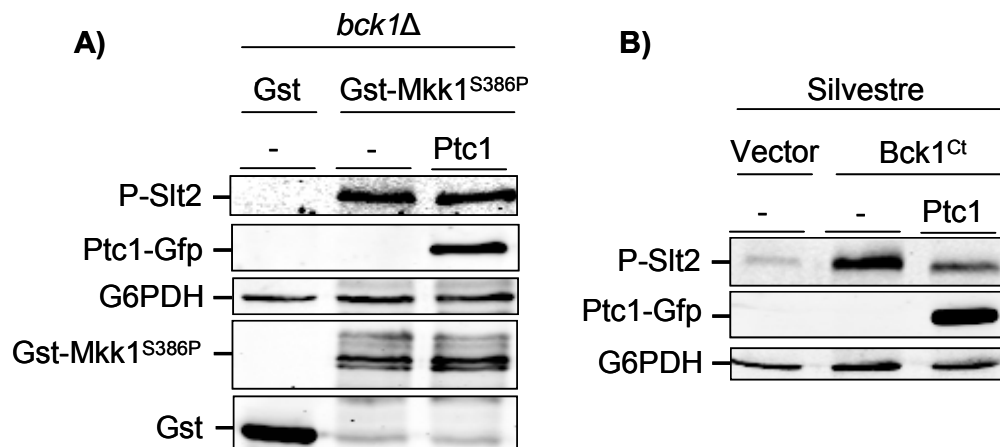
**Figura 65. Efecto de la sobreexpresión de Ptc1 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 en un mutante *bck1Δ* que sobreexpresa Bck1<sup>CT</sup>.**

La cepa mutante isogénica de la BY4741 Y01328 (*bck1Δ*) se cotransformó con los vectores vacíos pEG-(KG) y YCplG o con los plásmidos pEG-(KG)-*PTC1* o YCplG-*BCK1<sup>CT</sup>* como se indica en la figura. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de Gst-Ptc1 y Bck1<sup>CT</sup> mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-GST para detectar la presencia de Ptc1 y anti-G6PDH como control de carga.

#### 4.1.2 La sobreexpresión de Ptc1 no reduce la señalización provocada por Mkk1<sup>S386P</sup> en un mutante *bck1Δ*

El análisis de los anteriores ensayos nos llevó a pensar que o bien Mkk1 y Mkk2 o bien Slt2 podrían ser el sustrato de Ptc1 en la ruta de integridad celular. Con el fin de discernir entre

MAPKKs y MAPK se llevó a cabo un experimento en el que se sobreexpresó un alelo hiperactivo de Mkk1 ( $Mkk1^{S386P}$ ) en un mutante  $bck1\Delta$ . La mutación de una serina a prolina en la posición 386 de Mkk1 ocasiona la activación de la ruta CWI de forma constitutiva incluso en ausencia de elementos localizados por encima de la MAPKK (Watanabe *et al.*, 1995). Empleamos un mutante  $bck1\Delta$  para eliminar la conexión de Mkk1 y Mkk2 silvestres con elementos superiores de la ruta de integridad y así conseguir que toda la fosforilación de Slit2 observada sea únicamente consecuencia de la sobreexpresión de  $Mkk1^{S386P}$ .



**Figura 66. Efecto de la sobreexpresión de Ptc1 sobre los niveles de fosforilación de Slit2 en un mutante  $bck1\Delta$  o una cepa silvestre que expresan el alelo hiperactivo  $Mkk1^{S386P}$  o  $Bck1^{CT}$ , respectivamente.**

(A) La cepa mutante isogénica de la BY4741 Y01328 ( $bck1\Delta$ ) se cotransformó con los vectores vacíos pEG-(KG) y YCplG-GFP o con los plásmidos pEG-(KG)- $MKK1^{S386P}$  o YcplG- $PTC1$ -GFP. (B) La cepa silvestre YPH499 se cotransformó con los vectores vacíos YCplG-GFP y pYES3 o con los plásmidos YcplG- $PTC1$ -GFP o pYES3- $BCK1^{CT}$ . Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de  $Gst$ - $Mkk1^{S386P}$ ,  $Ptc1$ -Gfp o  $Bck1^{CT}$  mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Los extractos proteicos se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-Gst para detectar la presencia de  $Mkk1^{S386P}$ , anti-GFP para detectar la presencia de Ptc1 y anti-G6PDH como control de carga.

Los elevados niveles de fosfo-Slt2 ocasionados por la expresión del alelo hiperactivo de Mkk1 no disminuyeron en presencia de Ptc1-Gfp (Figura 66A). Al utilizar una proteína de fusión de Ptc1 diferente a la utilizada en ensayos anteriores, de forma paralela se comprobó la funcionalidad de esta construcción Ptc1-Gfp evaluando su capacidad para reducir la señalización provocada por la sobreexpresión de  $Bck1^{CT}$  (Figura 66B). El hecho de que Ptc1-Gfp sea capaz de disminuir los niveles de fosforilación de Slit2 cuando se sobreexpresa  $Bck1^{CT}$  pero que no lo haga cuando se sobreexpresa  $Mkk1^{S386P}$  en un mutante  $bck1\Delta$  indica que la fosfatasa Ptc1 no es capaz de desfosforilar a la MAPK Slit2.

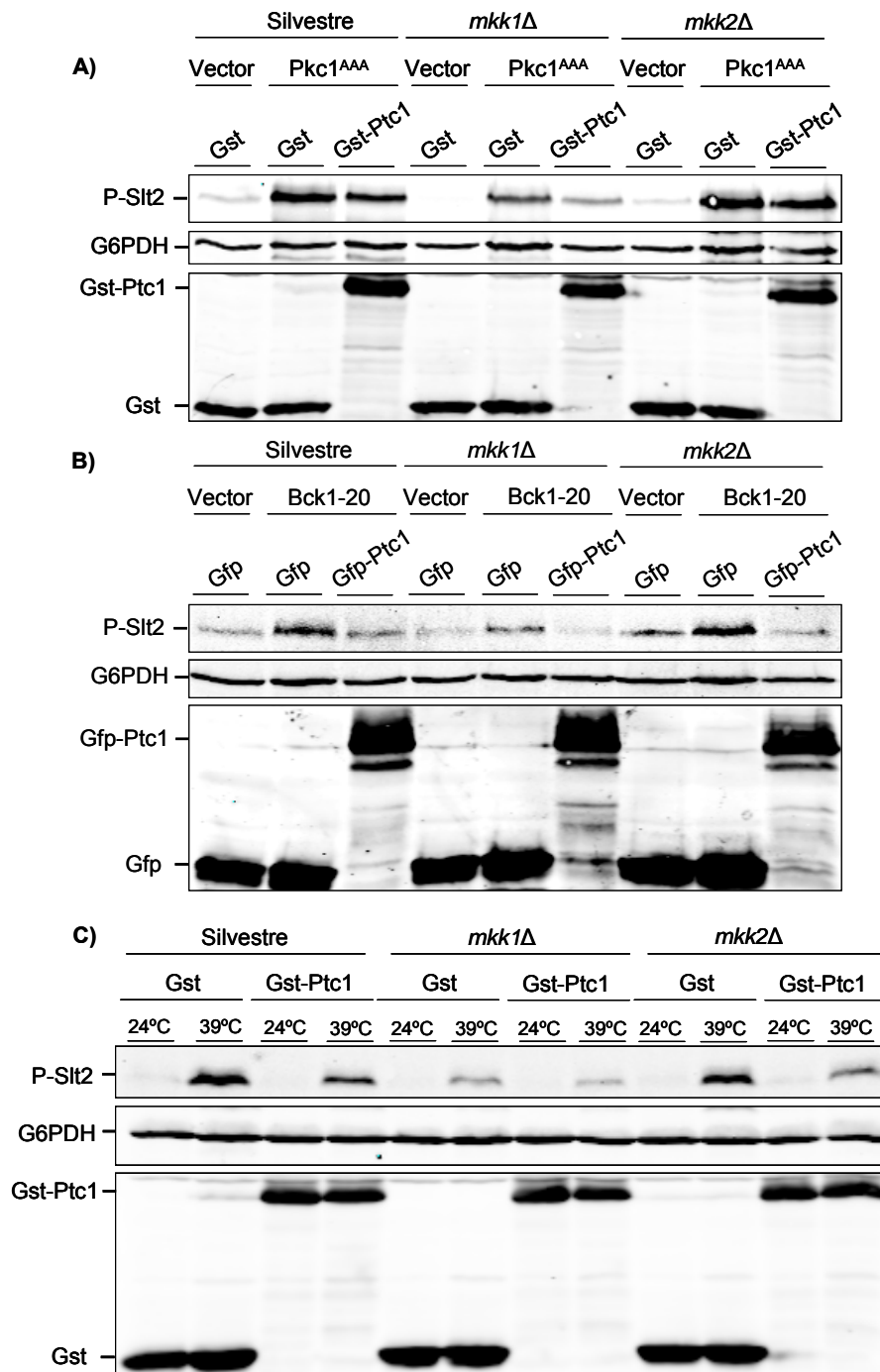
### 4.1.3 La sobreexpresión de Ptc1 reduce la señalización de la ruta de integridad celular tanto en un mutante *mkk1Δ* como en un mutante *mkk2Δ*

Los resultados obtenidos en los experimentos anteriores sugieren que Pkc1, la MAPKKK Bck1 y la MAPK Slit2 no son los sustratos de Ptc1 en la ruta de integridad celular por lo que esta fosfatasa debe estar actuando sobre la MAPKKs Mkk1, Mkk2 o sobre ambas.

Para comprobarlo, decidimos analizar la fosforilación de Slit2 en condiciones de sobreexpresión de Ptc1 en los mutantes sencillos *mkk1Δ* y *mkk2Δ*. Los resultados muestran que la fosforilación de Slit2 disminuyó tanto en un mutante *mkk1Δ* como en un mutante *mkk2Δ* cuando se sobreexpresó Ptc1 tras activación de la ruta CWI mediante la expresión del alelo hiperactivo Pkc1<sup>AAA</sup> (Figura 67A), el alelo hiperactivo Bck1-20 (Figura 67B) o con una exposición a alta temperatura (Figura 67C). Estos datos sugieren que Ptc1 desfosforila tanto Mkk1 como Mkk2.

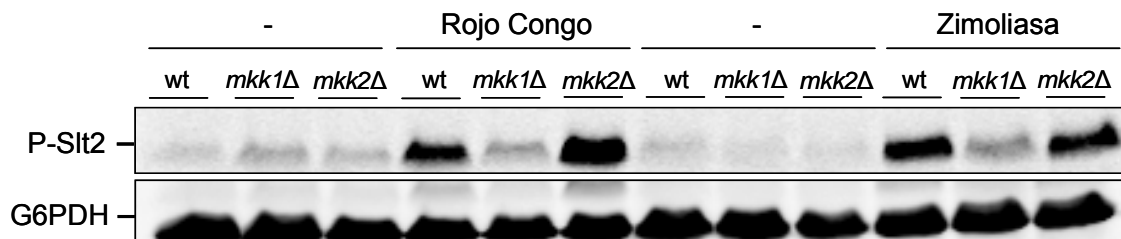
En estos experimentos también se observa que los mutantes *mkk1Δ* presentaron menor nivel de fosfo-Slit2 que los mutantes *mkk2Δ* en las diferentes cepas ensayadas y tras estimular la cascada de señalización a través de mecanismos distintos (Figura 67). Estos datos parecen indicar que Mkk1 y Mkk2 podrían tener una contribución diferente a la transmisión de la señal hacia Slit2. Para comprobar este hecho se realizaron experimentos complementarios en los que comparamos la fosforilación de Slit2 de los mutantes sencillos *mkk1Δ* y *mkk2Δ* en respuesta a agentes que provocan un daño en pared como el rojo Congo y la zimoliasa ( $\beta$ -1,3-glucanasa). El revelado del *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 volvió a mostrar un comportamiento diferente de los mutantes *mkk1Δ* y *mkk2Δ*. Mientras que los niveles de fosfo-Slit2 del mutante *mkk2Δ* tras recibir ambos estímulos fueron elevados y similares a los de la cepa silvestre, se observó un bajo nivel de MAPK fosforilada en el mutante *mkk1Δ* en estas mismas condiciones (Figura 68).

La fosforilación de Slit2 en los mutantes *mkk1Δ* y *mkk2Δ* se correlaciona con los niveles de expresión del gen *MLP1* como se muestra en la figura 69. A diferencia de Mkk2, la ausencia de Mkk1 conduce a una disminución en la expresión de *MLP1* con respecto a la cepa silvestre, lo que indica una menor transmisión de la señal. Estos datos sugieren que Mkk1 y Mkk2 presentan diferencias en cuanto a la función que ejercen en la ruta de integridad celular.



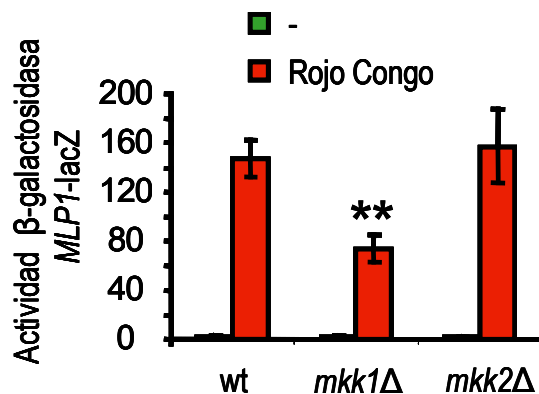
**Figura 67. Efecto de la sobreexpresión de Ptc1 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 en una cepa silvestre y en los mutantes *mkk1Δ* y *mkk2Δ*.**

(A) La cepa silvestre YPH499 y las mutantes isogénicas YMJ1 (*mkk1Δ*) y YMJ2 (*mkk2Δ*) se cotransformaron con los vectores vacíos pEG-(KG) y YEplac112 o con los plásmidos pEG(KG)-PTC1 o YEplac112-PKC1<sup>AAA</sup>. (B) La cepa silvestre YPH499 y las mutantes isogénicas YMJ1 (*mkk1Δ*) y YMJ2 (*mkk2Δ*) se cotransformaron con los vectores vacíos pRS316 y pYES3-GFP o con los plásmidos pRS316-BCK1-20 o pYES3-GFP-PTC1. (C) La cepa silvestre BY4741 y las mutantes isogénicas Y02487 (*mkk1Δ*) y Y02112 (*mkk2Δ*) se transformaron con el vector vacío pEG-(KG) o con el plásmido pEG(KG)-PTC1. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo utilizando rafinosa al 1,5% como fuente de carbono. En fase exponencial de crecimiento se indujo la expresión de las distintas proteínas mediante la adición al medio de galactosa al 2% durante 6 horas. Los cultivos se sometieron a una temperatura de 39°C durante una hora en C. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 para valorar los niveles de fosfo-Slt2, anti-Gfp o anti-Gst para detectar la presencia de Ptc1 y anti-G6PDH como control de carga.



**Figura 68. Efecto de la ausencia de Mkk1 o Mkk2 sobre los niveles de fosforilación de Slt2 en condiciones basales y de activación de la ruta de integridad celular.**

La cepa silvestre BY4741 (wt) y las mutantes isogénicas Y02487 (*mkk1Δ*) y Y02112 (*mkk2Δ*) se cultivaron a 24°C en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30µg/ml) o zimoliasa 100T (0,8U/ml) durante 3 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 y anti-P-p38 para valorar los niveles de fosfo-Slt2 y anti-G6PDH como control de carga.



**Figura 69. Cuantificación del efecto de la ausencia de Mkk1 o Mkk2 sobre los niveles de expresión del gen *MLP1*.**

La cepa silvestre BY4741 (wt) y las mutantes isogénicas Y02487 (*mkk1Δ*) y Y02112 (*mkk2Δ*) se transformaron con el plásmido YEp352-*pMLP1-lacZ*. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo, se refrescaron en medio rico YPD y en fase exponencial se añadió rojo Congo (30µg/ml) durante 3 horas. Se representan los valores medios de la actividad β-galactosidasa de tres transformantes independientes. La barra de error corresponde a la desviación estándar. Dos asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.01$ .

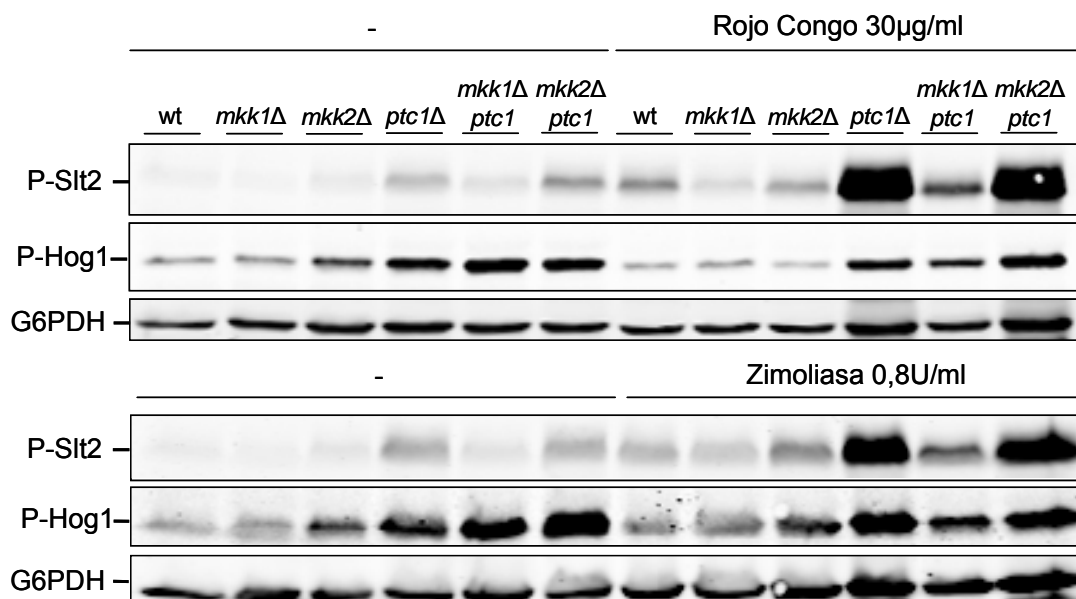
## 4.2 Análisis de la interacción genética entre *Ptc1* y *Mkk1*

### 4.2.1 La delección de *MKK1* en un mutante *ptc1Δ* bloquea la hiperactivación de la ruta de integridad celular

Sabiendo que la delección de *PTC1* conduce a una hiperactivación de la ruta de integridad celular (Gonzalez *et al.*, 2006) nos preguntamos cuál era la función de Mkk1 y Mkk2 en la transmisión de la señal hacia Slt2 en un mutante *ptc1Δ*. Con este fin se analizó la fosforilación de Slt2 en los dobles mutantes *mkk1Δptc1* y *mkk2Δptc1*. En la figura 70 se aprecia que la elevada fosforilación de Slt2 típica de un mutante sencillo *ptc1Δ* se reduce significativamente cuando se deleciona además *MKK1* tanto en condiciones basales como de estimulación de la ruta CWI. Sin embargo,

el doble mutante *mkk2Δptc1* muestra una fosforilación de Slit2 similar a la que exhibe un mutante sencillo *ptc1Δ*.

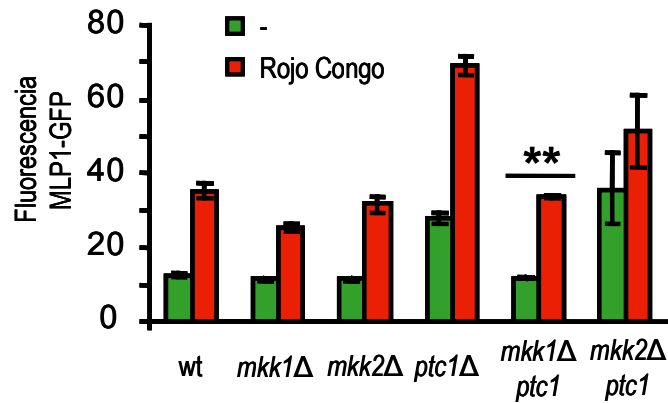
La ausencia de Ptc1 da lugar a una hiperactivación constitutiva de la ruta de alta osmolaridad ya que Ptc1 desfosforila a Hog1 (Mapes y Ota 2004). Sin embargo, a pesar de que la cepa *mkk1Δptc1* presenta una disminución en los niveles de fosfo-Slt2, la delección de *MKK1* o *MKK2* sobre un mutante *ptc1Δ* no alteró los niveles de fosforilación de Hog1.



**Figura 70. Efecto de la ausencia de Ptc1 sobre los niveles de fosforilación de las MAPKs Slit2 y Hog1 en los mutantes *mkk1Δ* y *mkk2Δ* tanto en condiciones basales como de activación de la ruta de integridad celular.**

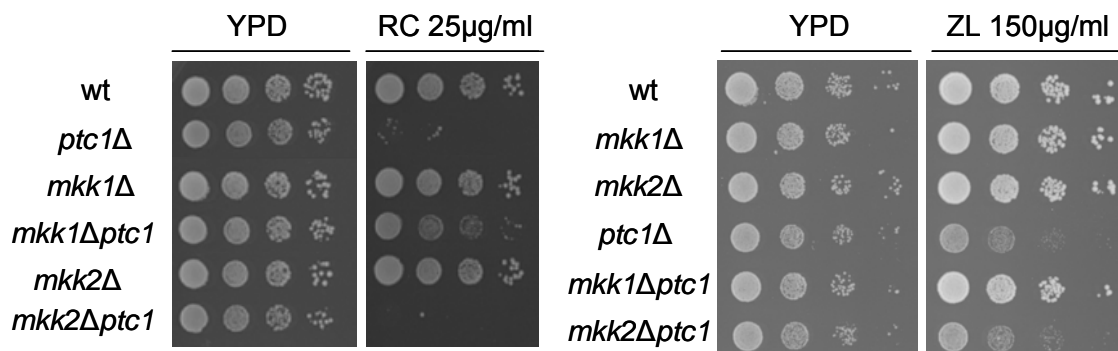
La cepa silvestre BY4741 (wt) y las mutantes isogénicas *mkk1Δ* (Y02487), *mkk2Δ* (Y02112), *ptc1Δ* (Y03702), *mkk1Δptc1* (YPL14) y *mkk2Δptc1* (YPL15) se cultivaron a 24°C en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30μg/ml) o zimoliasa 100T (0,8U/ml) durante 3 horas. Los extractos proteicos de dichas células se analizaron mediante *western-blotting* con anticuerpos anti-P-p44/42 y anti-P-p38 para valorar los niveles de fosfo-Slt2 y fosfo-Hog1 respectivamente y anti-G6PDH como control de carga.

De forma paralela estudiamos la inducción de la expresión del gen *MLP1* tras un tratamiento con rojo Congo en los dobles mutantes *mkk1Δptc1* y *mkk2Δptc1* mediante la cuantificación de la fluorescencia emitida por la proteína de fusión Mlp1-GFP. Como era de esperar, la ausencia de Mkk1 redujo significativamente los niveles de expresión de *MLP1* que presenta un mutante *ptc1Δ* tanto en ausencia como en presencia de estímulo (Figura 71). Estos datos son concordantes con la fosforilación de Slit2 observada anteriormente.



**Figura 71. Cuantificación del efecto de la ausencia de Ptc1 sobre los niveles de expresión del gen *MLP1* en los mutantes *mkk1Δ* y *mkk2Δ*.**

La cepa silvestre BY4741 (wt) y las mutantes isogénicas *mkk1Δ* (Y02487), *mkk2Δ* (Y02112), *ptc1Δ* (Y03702), *mkk1Δptc1* (YPL14) y *mkk2Δptc1* (YPL15) se transformaron con el plásmido YEp352-*MLP1*-GFP. Los transformantes se cultivaron a 24°C en medio mínimo selectivo durante toda la noche, se refrescaron en medio rico YPD y cuando alcanzaron la fase exponencial se añadió rojo Congo (30 µg/ml) durante 3 horas. Los niveles de expresión del gen *MLP1* se determinaron mediante la cuantificación de la emisión de fluorescencia de GFP de dichas células en un citómetro de flujo. Se representan los valores medios y la desviación estándar del análisis de tres transformantes independientes. Dos asteriscos representan que las diferencias obtenidas en relación al control son estadísticamente significativas con un *p-value* de  $p \leq 0.01$ .



**Figura 72. Análisis de la sensibilidad a rojo Congo y zimoliasa de mutantes sencillos en componentes de la ruta de integridad celular y dobles mutantes en combinación con la delección de *PTC1*.**

Ensayo fenotípico por crecimiento en gota de una cepa silvestre BY4741 (wt) y de las cepas mutantes isogénicas *mkk1Δ* (Y02487), *mkk2Δ* (Y02112), *ptc1Δ* (Y03702), *mkk1Δptc1* (YPL14) y *mkk2Δptc1* (YPL15). Se realizaron diluciones seriadas decimales de estas cepas en placas de YPD (control), YPD suplementado con rojo Congo (RC) (25 µg/ml) y zimoliasa 20T (ZL) (150 µg/ml) que se incubaron a 24°C durante 48 horas.

Se ha descrito que la hiperactivación de la ruta de integridad produce letalidad para la célula (Watanabe *et al.*, 1995) y por esta razón los mutantes *ptc1Δ* son sensibles a agentes que dañan la pared celular (Markovich *et al.*, 2004). Con el fin de comprobar si la delección de *MKK1* en un mutante *ptc1Δ* era capaz de recuperar el crecimiento se llevó a cabo un ensayo fenotípico en presencia de rojo Congo y zimoliasa. Mientras que la ausencia de Mkk1 hace que un mutante

*ptc1Δ* recupere el crecimiento celular en estas condiciones, la falta Mkk2 no provoca ningún cambio en cuanto a la sensibilidad de un mutante *ptc1Δ* sencillo (Figura 72). Este resultado, junto con los mostrados previamente, sugiere que existe una interacción genética positiva entre *PTC1* y *MKK1* en presencia de agentes que alteran la pared celular.

#### **4.2.2 La actividad quinasa de Mkk1 es la responsable de mantener la elevada fosforilación de Slf2 en un mutante *ptc1Δ***

Seguidamente nos interesó conocer si la falta de actividad catalítica de Mkk1 es la causa por la que el doble mutante *mkk1Δptc1* presenta menores niveles de fosforilación de Slf2 en comparación con la cepa *mkk2Δptc1*. Con este objetivo se transformaron versiones silvestres y catalíticamente inactivas (en las que el residuo conservado de lisina está sustituido por una arginina) de Mkk1 y Mkk2 fusionadas al epítipo myc sobre los dobles mutantes *mkk1Δptc1* y *mkk2Δptc1*, respectivamente, y se analizaron los niveles de fosfo-Slf2.

Los resultados de la figura 73 indican que la expresión de la versión silvestre de Mkk1 sobre el doble mutante *mkk1Δptc1* restaura la elevada fosforilación que presenta un mutante sencillo *ptc1Δ* tanto en condiciones basales como de activación de la ruta de integridad (rojo Congo). Sin embargo, cuando se expresa la versión catalíticamente inactiva de Mkk1 (Mkk1<sup>KR</sup>) en el doble mutante *mkk1Δptc1*, los niveles de fosfo-Slf2 fueron similares a los del doble mutante y, por tanto, considerablemente menores que los que exhibe el mutante sencillo *ptc1Δ* o el doble mutante *mkk2Δptc1*. Esto no es debido a un problema de expresión de Mkk1<sup>KR</sup>, ya que se detectaron altos niveles de expresión de esta proteína, incluso mayores que los de la proteína silvestre Mkk1 (Figura 73). Estos datos sugieren que la actividad quinasa de Mkk1 es necesaria para que tenga lugar una completa transmisión de la señal a través de la ruta de integridad celular en un mutante *ptc1Δ*.



# Discusión

---



Dada la importancia de las rutas de transducción de señales mediadas por MAPKs en la fisiología celular, la magnitud y duración de su activación debe de estar perfectamente regulada. El hecho de que la cascada se active mediante fosforilación hace que las proteínas fosfatasa sean elementos esenciales en la regulación de dicha señalización. En general, la función que ejercen las proteínas fosfatasas sobre estas rutas es, con diferencia, mucho más desconocida que la que desempeñan las quinasas, debido principalmente a su naturaleza promiscua. Su redundancia biológica y amplia especificidad de sustrato han dificultado la identificación de reguladores negativos de rutas mediadas por MAPKs a través del empleo de rastreos fenotípicos tradicionales. De hecho, mutantes sencillos o incluso dobles en genes que codifican proteínas fosfatasas rara vez dan lugar a fenotipos evidentes a causa de dicha redundancia fisiológica (Sakamoto *et al.*, 2002; Virshup *et al.*, 2009). El hecho de que diferentes fosfatasas puedan regular una misma ruta y que una misma fosfatasa sea capaz de defosforilar sustratos que operan en distintas cascadas de señalización da idea de la complejidad de la maquinaria de regulación que controla la intensidad, amplitud y duración de la respuesta.

En el transcurso de este trabajo hemos tratado de realizar un amplio estudio que abarca diferentes aspectos y aporta nuevos e interesantes datos a la regulación negativa de las rutas de MAPKs en *S. cerevisiae*. Por una parte, hemos identificado posibles reguladores negativos de las rutas de apareamiento e integridad celular a través de la realización de rastreos genéticos y desarrollado experimentos de epistasis para establecer, dentro de la cascada de señalización, la diana sobre la que actúa alguno de ellos. Por otra parte, se ha llevado a cabo el estudio de los determinantes moleculares implicados en la interacción entre las fosfatasas de especificidad dual que actúan en la ruta de integridad celular, Msg5 y Sdp1, y sus sustratos, la MAPK Slit2 y la pseudoquinasa Mlp1. Además, hemos analizado las modificaciones postraduccionales que experimenta Msg5 en respuesta a la activación de dicha ruta.

### **Determinantes moleculares implicados en la unión de las MKPs Msg5 y Sdp1 a la MAPK Slit2 y la pseudoquinasa Mlp1**

Muchos estudios han demostrado que las MKPs actúan como reguladores negativos de múltiples rutas mediadas por MAPKs (Martín *et al.*, 2005). Para comprender la función de las MKPs en la señalización de distintas rutas es necesario conocer cómo una misma fosfatasa puede actuar de manera selectiva, en determinadas condiciones, frente a un sustrato y no frente a otros. Resulta por tanto imprescindible conocer con detalle los mecanismos que dotan de especificidad a la

unión entre MKPs y MAPKs para comprender la trascendencia biológica de dicha regulación. Por eso, en este trabajo se ha profundizado en el estudio de los motivos implicados en la unión de Msg5 y Sdp1 con Slt2 y Mlp1.

### **El motivo IYT de Msg5 y Sdp1 en la regulación negativa de la ruta de integridad celular**

A pesar de que el dominio catalítico de las MKPs reconoce los residuos fosforilados de la MAPK, normalmente dicho reconocimiento es insuficiente para garantizar y dotar de especificidad a la unión entre la enzima y su sustrato. Se ha aceptado comúnmente que la especificidad y eficiencia de acción de las MKPs está controlada por las interacciones mediadas por los dominios *docking* (dominios D) (Patterson *et al.*, 2009).

Sin embargo, resulta interesante destacar que no todas las MKPs de mamíferos se unen a las MAPKs a través de dichos dominios D. Existen también motivos DEF, ricos en fenilalaninas (FXFP), presentes en el extremo carboxiterminal de fosfatasas de ERK1/2 que median la interacción entre ambas proteínas (Lin y Yang, 2006). En ocasiones, dominios D incompletos son suficientes para desencadenar la unión con los sustratos. De esta forma, se ha visto que la MKP7 posee un dominio I (carente del submotivo LXL) que media la interacción con ERK mientras que el dominio II, formado por el submotivo LXL pero sin los residuos básicos de arginina, es necesario para la unión a JNK (Masuda *et al.*, 2003). Se sabe además que el dominio D de la fosfatasa MKP1 participa en la unión con ERK y p38, pero no con JNK a pesar de que esta fosfatasa muestra capacidad de desfosforilación de las tres MAPKs (Slack *et al.*, 2001). Algo parecido ocurre en el caso de MKP2, en la que los residuos básicos presentes en su dominio D son esenciales para la unión a ERK y p38, y sin embargo, para interaccionar con JNK emplea un mecanismo distinto que no involucra a este dominio D (Chen *et al.*, 2001).

De forma similar, trabajos de nuestro grupo previos a la realización de esta tesis doctoral mostraron que el dominio D de Msg5 no está involucrado en la unión con Slt2, mientras que es imprescindible para su interacción con Kss1 y Fus3 (Palacios *et al.*, 2011). Además, la MKP Sdp1, que también regula negativamente a Slt2, carece de un dominio D en su extremo aminoterminal. Estos datos indicaban que un mecanismo alternativo a la interacción canónica entre MKPs y MAPKs debería estar participando en la regulación de Msg5 y Sdp1 sobre Slt2.

En este trabajo hemos demostrado mediante estudios de unión entre proteínas basados en el sistema de dos híbridos y en técnicas de copurificación *in vivo* e *in vitro* que el motivo IYT de

Msg5 y Sdp1 es indispensable para su unión con la MAPK Slit2 y con la pseudoquinasa Mlp1. Este motivo se localiza, al igual que el motivo D, en el extremo aminoterminal de ambas enzimas. Este hecho refuerza la importancia del dominio regulatorio N-terminal característico de las MKPs, independientemente de los residuos que participan en la unión a los sustratos. Mientras que el motivo D de Msg5 se compone de dos submotivos (residuos básicos seguidos de un agrupamiento formado por residuos hidrofóbicos) (Bardwell y Shah, 2006), el motivo IYT es mucho más sencillo ya que consta únicamente de estos tres aminoácidos. A pesar de que hace unos años se resolvió la estructura de Sdp1 (Fox *et al.*, 2007), los ensayos se realizaron sobre una versión truncada que carece de los primeros 16 aminoácidos del extremo aminoterminal, donde se localiza el motivo IYT de esta fosfatasa. Como consecuencia, no podemos predecir las bases estructurales de la unión mediada por dicho motivo en Sdp1.

El motivo IYT está presente en ortólogos funcionales fúngicos de Msg5 y Sdp1. Aunque la mayoría de ellos pertenecen a géneros cercanos a *Saccharomyces*, estos tres residuos están también conservados en MKPs de organismos filogenéticamente más distantes, como es el caso de la fosfatasa Pmp1 de la levadura de fisión *S. pombe*. La enzima Pmp1 es la única fosfatasa de especificidad dual que regula negativamente a la MAPK Pmk1 (Sugiura *et al.*, 1998; Madrid *et al.*, 2007). Su extremo N-terminal regulatorio carece de dominios D; quizá por esta razón esta MKP regula exclusivamente la ruta de integridad celular de este microorganismo.

Con el fin de conocer la relevancia del motivo IYT de Pmp1 en su unión a Pmk1 se desarrolló una colaboración con el laboratorio del doctor José Cansado en la Universidad de Murcia, que permitió comprobar que este motivo es también clave en la interacción entre estas dos proteínas de *S. pombe* (Sacristan-Reviriego *et al.*, 2014). Este hecho sugiere que el motivo IYT forma parte de un nuevo mecanismo de interacción conservado, surgido en MKPs ancestrales, y que probablemente ha perdurado a lo largo de la evolución por una causa específica, que podría estar relacionada con la regulación de las MAPKs de la ruta de integridad celular en levaduras.

El alineamiento de las secuencias de los ortólogos funcionales de Msg5 y Sdp1 en otras especies fúngicas reveló que el motivo IYT suele estar precedido de un agrupamiento de residuos ácidos (aspárticos o glutámicos) seguidos de aminoácidos básicos (argininas). Sin embargo, Sdp1 carece de dichos residuos conservados ya que el motivo IYT se localiza justo al comienzo de la secuencia proteica. Además, trabajos previos realizados en nuestro laboratorio determinaron que los residuos básicos en posiciones R<sup>96</sup> y R<sup>97</sup> de Msg5 son dispensables en la unión a Slit2 (Palacios *et al.*, 2011). Estos datos apoyan la idea de que el motivo IYT de las MKPs no precisa de ningún residuo adyacente para interactuar con la MAPK.

Aunque no podemos descartar que otros residuos lejanos al motivo IYT pudieran participar, la ausencia de interacción de las versiones Msg5<sup>IAYATA</sup> y Sdp1<sup>IAYATA</sup> con Slf2 y Mlp1 nos lleva a pensar que el motivo IYT es esencial para la unión. En mamíferos se ha descrito que MKP3, además de un dominio D, posee en su región carboxiterminal el motivo FTAP (parecido al motivo DEF, FXFP) cuya mutación reduce la afinidad de unión a ERK2 y evita la activación de MKP3 por esta MAPK (Zhou *et al.*, 2006). Aunque en Msg5 no existe una secuencia que coincida totalmente con la del motivo FXFP, en la zona C-terminal se localiza una secuencia parecida (<sup>409</sup>FRSFP<sup>414</sup>) que podría de alguna manera contribuir y facilitar la interacción de Msg5 con las MAPKs pero nunca ser esencial, ya que nuestros datos indican que los primeros 123 aminoácidos de Msg5 (Msg5<sup>1-123</sup>) son suficientes para interactuar con Slf2 y Mlp1.

El análisis mutacional individual de cada uno de los aminoácidos de los que se compone el motivo IYT mostró, a través del efecto sobre el *substrate trapping* que ejerce una versión catalíticamente inactiva de Sdp1, que sólo los residuos de isoleucina y tirosina son esenciales en la unión de esta fosfatasa a Slf2. Resulta interesante que las fosfatasas duales atípicas de mamíferos DSP18 y DSP21 (Jeong *et al.*, 2006), que carecen de cualquier dominio conocido de unión a MAPKs, presentan en su singular extensión carboxiterminal un motivo IYE. El hecho de que el tercer residuo de treonina sea dispensable en la unión de Sdp1 a Slf2 y que además sea el residuo más variable dentro del motivo IYT de otros ortólogos fúngicos (en algunos es IYS) sugiere que el motivo IYE podría mediar la interacción de las fosfatasas duales atípicas DSP18 y DSP21 con sus MAPKs sustrato. Existe por tanto la posibilidad de que el motivo IYT se haya transformado a lo largo de la evolución con el fin de adaptarse a las funciones de algunas de las DSPs en eucariotas superiores.

A diferencia de lo que ocurre en la mayoría de especies fúngicas (Rispaill *et al.*, 2009), *S. cerevisiae* consta de dos fosfatasas de especificidad dual, surgidas probablemente de una duplicación ancestral del genoma de levadura (Kellis *et al.*, 2004), que regulan negativamente una misma MAPK, Slf2. Mientras que Sdp1 sólo desfosforila a Slf2 bajo estrés térmico (Hahn y Thiele, 2002), Msg5 ejerce una función más significativa controlando la fosforilación de Slf2 tanto en condiciones basales como de activación de la ruta de integridad celular (Martin *et al.*, 2000; Harrison *et al.*, 2004). De hecho, recientes análisis a gran escala sobre mutantes sencillos delecionados en genes de fosfatasas revelaron que la falta de Sdp1 provoca menos cambios en los perfiles transcriptómico y fosfoproteómico con respecto a células silvestres que la ausencia de Msg5 (van *et al.*, 2010; Bodenmiller *et al.*, 2010). Estos datos son coherentes con nuestros propios resultados experimentales en los que se observa que los mutantes *sdp1Δ* carecen de un

fenotipo detectable en condiciones de activación de la ruta de integridad mientras que los mutantes *msg5Δ* son hipersensibles a agentes que alteran la pared celular (Flandez *et al.*, 2004). A pesar de que el motivo IYT es importante para la interacción de Msg5 con Slt2, no se apreciaron diferencias significativas ni en los niveles de MAPK fosforilada ni en la inducción transcripcional de genes dependientes de la ruta CWI entre las células que expresan Msg5 silvestre o Msg5<sup>IAYATA</sup>. Sin embargo, el mutante Msg5<sup>IAYATA</sup> no fue capaz de complementar totalmente el fenotipo de sensibilidad a rojo Congo característico de células delecionadas en *MSG5*, mostrando en presencia de este agente un crecimiento intermedio entre una cepa silvestre y un mutante *msg5Δ*. Del mismo modo, una versión de Msg5 que carece del dominio D por el que se une a Fus3 disminuye sólo parcialmente los niveles de expresión del gen *FUS1* en presencia de feromona, adoptando también un comportamiento intermedio entre un mutante *msg5Δ* y una cepa que expresa la proteína Msg5 silvestre (Remenyi *et al.*, 2005). Resulta interesante destacar que una versión mutante de Mkk2 que no interacciona con Slt2 también da lugar a un fenotipo parcial y a una funcionalidad reducida, pero no suprimida (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007). Por todo ello, tanto nuestros datos como los ya publicados sugieren que el dominio D y el motivo IYT contribuyen a la capacidad de Msg5 para regular negativamente a Fus3 y Slt2 respectivamente.

Las mutaciones que reducen la actividad catalítica de las PTPs o MKPs sin afectar a su afinidad por el sustrato conducen al fenómeno denominado *substrate trapping* debido a la formación de un complejo estable entre la enzima inactiva y su sustrato (Tonks y Neel, 1996). En mamíferos, la sobreexpresión de los dominios catalíticamente inactivos de MKP3 y PTPSL retiene a ERK altamente fosforilada en el citoplasma y previenen la señalización a través de ella (Zuñiga *et al.*, 1999; Brunet *et al.*, 1999). Incluso la expresión del fragmento N-terminal que contiene el dominio KIM (dominio D) pero que carece del dominio fosfatasa de la MKP3 genera un incremento en la fosforilación de ERK1/2 (Cejudo-Marin *et al.*, 2012). En levadura, la expresión de una versión catalíticamente inactiva de Ptp2 conduce a un aumento de la fosforilación de Hog1 y secuestra a esta MAPK en el núcleo (Wurgler-Murphy *et al.*, 1997; Mattison y Ota, 2000). De igual forma, en este trabajo hemos observado que cuando se sobreexpresa la versión inactiva Msg5<sup>C319A</sup> en un mutante *msg5Δ*, a pesar de que se favorece la fosforilación de Slt2 por la ausencia de actividad fosfatasa, se impide la señalización hacia el factor de transcripción Rlm1 al quedar la MAPK atrapada. Esta falta de transmisión de la señal puede ser la causa de la supresión de la sensibilidad a rojo Congo del mutante *msg5Δ* por parte de esta versión de Msg5, dado que este fenotipo es consecuencia de una hiperactivación de la ruta CWI. Sin embargo, las versiones

catalíticamente inactivas de Msg5 y Sdp1 que además carecen del motivo IYT pierden la capacidad de unirse a Slit2 y por tanto todos los efectos derivados del *trapping* sobre esta MAPK.

A la vista de estos resultados podemos afirmar que el análisis de la fosforilación de las MAPKs y de la inducción transcripcional cuando se sobreexpresan versiones catalíticamente inactivas de PTPs o MKPs resulta una herramienta particularmente útil en la identificación de sus dianas celulares, así como en la caracterización de los motivos implicados en la interacción, especialmente cuando la eliminación individual de la fosfatasa o su sobreexpresión no provoca un fenotipo evidente como en el caso de Sdp1.

La fosfatasa Msg5 se produce en la célula como dos formas de distinto peso molecular debido a la presencia de dos comienzos de traducción alternativos de su RNAm. La isoforma corta carece de 45 aminoácidos en la región aminoterminal que la isoforma larga posee (Flandez *et al.*, 2004). Por ello, tan sólo la isoforma larga de Msg5, gracias a la presencia del dominio D en esta extensión, es capaz de interaccionar con Fus3 y Kss1, mientras que ambas isoformas se unen a Slit2 dado que el motivo IYT se localiza en la posición 103. Nuestros datos confirman resultados previos de nuestro equipo de investigación en los que la forma corta de Msg5 copurificó con Slit2, y no con Kss1 o Fus3 (Marin *et al.*, 2009). El hecho de que ambas isoformas interaccionen con Slit2 podría ser una manera de asegurar la existencia de la actividad fosfatasa de Msg5 sobre esta MAPK en situaciones en las que se incrementa la cantidad de Fus3, como tras estimulación con feromona. Por tanto, la presencia de varias isoformas de una misma fosfatasa que incluyen diferentes dominios de interacción podría suponer un nuevo mecanismo de regulación de MAPKs tanto en *S. cerevisiae* como en células de eucariotas superiores donde se han encontrado fosfatasas de tirosinas (PTP-SL) (Chirivi *et al.*, 2004) o duales (Pyst1) que también presentan comienzos alternativos de la traducción (Dowd *et al.*, 1998).

### **Slit2 y Mlp1 no utilizan el dominio CD para unirse a Msg5**

Las MAPKs presentan en su extremo carboxiterminal un dominio CD (*Common Docking*) formado por aminoácidos cargados negativamente (aspárticos y glutámicos) que interaccionan electrostáticamente con los residuos básicos del motivo D de activadores, efectores o reguladores negativos (Enslin y Davis, 2001). De esta forma, cuando se eliminan los residuos que componen el CD de ERK2, esta MAPK presenta baja capacidad de unión a MEK1, MKP3 y PTP-SL (Tanoue y Nishida, 2002; Tanoue y Nishida, 2003). El CD no es sólo esencial en MAPKs tipo ERK; su presencia también es indispensable en la interacción de MKP5 con p38 (Zhang *et*

*al.*, 2011). Trabajos previos realizados por nuestro grupo de investigación mostraron que la mutación en el residuo D<sup>326</sup> del dominio *Common Docking* de Slit2 conducía a una mayor fosforilación de la MAPK, lo que sugería que este motivo podría estar involucrado en la interacción de Msg5 con Slit2 (Flandez *et al.*, 2004). Sin embargo, en este trabajo hemos demostrado que no sólo el dominio D de Msg5 es dispensable, sino que los residuos ácidos conservados D<sup>323</sup>, D<sup>326</sup> y E<sup>327</sup> de Slit2 y el residuo D<sup>326</sup> de Mlp1 tampoco están implicados en la unión a Msg5. Por ello podemos concluir que la unión de Msg5 con Slit2 o Mlp1, a diferencia de lo que ocurre con Fus3 y Kss1 (Remenyi *et al.*, 2005; Palacios *et al.*, 2011), no está mediada por las interacciones convencionales entre MKPs y MAPKs.

Gracias a la realización de experimentos de copurificación hemos definido una región de 100 aminoácidos, entre las posiciones 274 y 373 de Slit2 y Mlp1, necesaria para la interacción con Msg5. Aunque esta región incluye el dominio CD, en ella deben existir residuos distintos que participen en esta unión. Nuestro caso no es el único en el que el CD de la MAPK es dispensable para la interacción con sus sustratos. Por ejemplo, la unión entre JNK y MKP2 de mamíferos no está mediada por el dominio CD de la quinasa o el dominio D de la fosfatasa (Chen *et al.*, 2001).

Asimismo se han descrito casos en los que las MAPKs utilizan otras regiones adicionales al dominio CD para interactuar con sus sustratos. En ERK2 se han identificado una serie de residuos aminoacídicos concretos, alejados del CD en la secuencia primaria aunque cercanos a éste en la estructura tridimensional, que contribuyen junto con los residuos ácidos del CD en la unión entre ERK2 y MKP3 (Zhang *et al.*, 2003). Asimismo las MAPKs ERK2 y p38 son capaces de unirse a proteínas que presentan motivos DEF, ricos en aminoácidos aromáticos, a través de residuos conservados de leucina cercanos al dominio de activación TEY y residuos de tirosina de las posiciones 231 y 258 de forma independiente del *Common Docking* (Sheridan *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae* un dominio adyacente al CD en la MAPK Hog1, al que se ha denominado PDB-2, participa junto con el CD en la activación de la MAPK por la MAPKK Pbs2 y en la interacción de la MAPK con la fosfatasa Ptp2 (Murakami *et al.*, 2008). Se podría hipotetizar por tanto que una zona semejante sea importante para mediar la interacción de Slit2 y Mlp1 con la MKP Msg5. De hecho, el dominio PDB-2 de Hog1, entre los aminoácidos 320 y 350, presenta elevada homología en su secuencia con los fragmentos de Slit2 (Slit2<sup>274-373</sup>) y Mlp1 (Mlp1<sup>274-373</sup>) que interactúan con Msg5.

A pesar de que ERK3 y ERK4 presentan un dominio CD en su secuencia aminoacídica y que su sustrato, la proteína quinasa MK5, contiene un dominio D, estos motivos son totalmente dispensables para la interacción entre estas proteínas al igual que ocurre en la unión de Slit2 y

Mlp1 a Msg5. En este caso, es el motivo FRIEDE de ERK3 y ERK4 el que se une al extremo carboxiterminal de MK5 (Aberg *et al.*, 2009). Dicho motivo se encuentra en la región de ERK3 y ERK4 comprendida entre las posiciones 326 y 340, muy cercano al CD. Es curioso que tanto el dominio *Common Docking*, como el motivo FRIEDE de ERK3/4 o el motivo PDB-2 de Hog1 se localicen en una región englobada en los fragmentos Slf2<sup>274-373</sup> y Mlp1<sup>274-373</sup> que se unen a Msg5. Esta región de 100 aminoácidos incluye el *loop* número 16 de las MAPKs. Muchos autores han propuesto que este *loop* 16 está involucrado en las interacciones proteína-proteína y en los procesos de homodimerización (Khokhlatchev *et al.*, 1998). De hecho, se han definido dentro de esta región los residuos de ERK2 involucrados en su autoasociación (Wilsbacher *et al.*, 2006) y experimentos de nuestro grupo de investigación apuntan a que esta misma zona está implicada en la interacción de Slf2 consigo misma (Kim *et al.*, 2007).

Las MAPKs fúngicas que actúan en rutas de reparación de daños en la pared celular suelen presentar una característica extensión carboxiterminal con función autoinhibitoria (Levin-Salomon *et al.*, 2009). Es posible que las uniones que no involucran dominios *docking* puedan afectar a la función de esta extensión C-terminal de forma distinta a las interacciones canónicas clásicas. Por ello, y dada la presencia del motivo IYT en las MKPs fúngicas que desfosforilan este tipo de MAPKs, este nuevo mecanismo de unión de Msg5 y Sdp1 a Slf2 podría ser un mecanismo compartido y conservado en las MAPKs que poseen dicha extensión C-terminal.

A diferencia de lo que ocurre con Msg5, nuestros ensayos han mostrado que la unión entre Slf2 y la MAPKK Mkk1 es dependiente del CD de la MAPK. Estos resultados son coherentes con los previamente publicados por otros miembros de nuestro laboratorio en los que una versión de Mkk2 que carecía del dominio D no fue capaz de interactuar con Slf2 (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007). Resulta por tanto interesante que Slf2 utilice mecanismos distintos en su unión a las diferentes proteínas que interactúan con esta MAPK: uniones mediadas por dominios *docking*, en la interacción de Slf2 con sus activadores, las MAPKKs Mkk1 y Mkk2, y con sus efectores, los factores de transcripción Rlm1 (Jung *et al.*, 2002) y Swi4 (Truman *et al.*, 2009), y otro tipo de mecanismo alternativo para unirse al menos a algunos de sus reguladores negativos, las MKPs Msg5 y Sdp1.

El hecho de que la expresión de péptidos que contienen motivos D inhiba la fosforilación de las MAPKs mediada por las MAPKKs o la desfosforilación mediada por las MKPs (Bardwell y Shah, 2006) sugiere que tanto activadores como reguladores negativos compiten por unirse al dominio CD de una misma MAPK como ocurre en el caso de ERK2 con MEK1 y MKP3 (Zhang *et al.*, 2003). A pesar de que la unión de Slf2 con Mkk1 o Msg5 tiene lugar a través de motivos

distintos, éstos se localizan en la misma región de la proteína por lo que podría existir también cierto impedimento estérico que dificulte la unión de ambos sustratos a la vez. Otra posibilidad sería que Slt2 pudiera beneficiarse de la interacción con Msg5 a través de un mecanismo específico, reduciendo de esta forma el fenómeno de competencia con las Mkks o los factores de transcripción. También se ha propuesto que la activación de la MAPK provoca cambios estructurales que podrían exponer los motivos de unión con otras proteínas (Aberg *et al.*, 2009;Rodriguez Limardo *et al.*, 2011). Por tanto, la presencia de distintos motivos de unión en Slt2 podría ser un mecanismo por medio del cual se regulen y promuevan las interacciones con los activadores Mkk1/2 o los reguladores negativos Msg5 y Sdp1 según el estado de fosforilación de la MAPK Slt2.

Si Msg5 y Sdp1 emplean el mismo motivo IYT para unirse a Slt2 y a Mlp1 es lógico que tanto la MAPK como la pseudoquinasa utilicen los mismos determinantes moleculares para interactuar con ambas fosfatasas y, de hecho, nuestros datos indican que ambas proteínas interactúan por la misma región. Por esta razón, la existencia de fenómenos de competencia entre Slt2 y Mlp1 por unirse a las MKPs o entre Msg5 y Sdp1 por unirse a la MAPK y a la pseudoquinasa podría contribuir activamente a la regulación de la ruta CWI. Dado que Mlp1 interactúa con Rlm1 (Watanabe *et al.*, 1997) y que su expresión se induce en respuesta a estrés sobre la pared celular (García *et al.*, 2004) parece que esta proteína realiza alguna función importante para el mantenimiento de la integridad celular aunque su papel específico es aún poco conocido. A pesar de que Mlp1 es muy similar a Slt2 carece del motivo de activación característico conservado en las MAPK (T-X-Y), en el que el residuo de treonina está reemplazado por un residuo de lisina. Sin embargo, el cambio del residuo Tyr<sup>192</sup> por Phe<sup>192</sup> disminuye la capacidad de Mlp1 de suprimir el fenotipo de sensibilidad a cafeína de un mutante *bck1Δ* (Watanabe *et al.*, 1997), lo que sugiere que el residuo de tirosina podría ser importante para la actividad de Mlp1. Cabe por tanto la posibilidad de que tanto Msg5 como Sdp1 modulen la funcionalidad de Mlp1 desfosforilando el residuo Tyr<sup>192</sup> con objeto de contribuir en la regulación de la ruta CWI.

### **Estudio de la fosforilación de Msg5 por Slt2**

Las modificaciones postraduccionales constituyen un importante mecanismo de regulación de las proteínas ya que modulan su actividad enzimática, su localización subcelular, su interacción con otras proteínas e incluso su estabilidad y degradación (Beltrao *et al.*, 2013). Es una forma rápida y fina que tiene la célula de adaptarse a estímulos sin necesidad de regulación transcripcional o

traduccional (Minguez *et al.*, 2012). Por ejemplo, de esta forma las rutas de MAPKs se regulan por retrofosforilaciones de la MAPK hacia otros componentes de la cascada, como las MAPKKs (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007; Cirit *et al.*, 2010; Hao *et al.*, 2012), los receptores de membrana (Feng y Davis, 2000), las proteínas GEF (Guo *et al.*, 2009), los sensores (Hao *et al.*, 2007) o las proteínas *scaffold* (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

Hace unos años nuestro grupo de investigación describió que la fosfatasa Msg5 es fosforilada por Slt2 en condiciones de estimulación de la ruta de integridad celular (Flandez *et al.*, 2004). La secuencia mínima descrita necesaria para la fosforilación por MAPKs de tipo ERK es serina o treonina seguida por una prolina (S/T-P) (Jacobs *et al.*, 1999; Sharrocks *et al.*, 2000). En la secuencia aminoacídica de Msg5 se encuentran 16 residuos susceptibles de ser fosforilados por Slt2. En este trabajo hemos definido que la mutación de los 7 residuos situados en la extensión carboxiterminal elimina el cambio en la movilidad electroforética de Msg5 dependiente de Slt2 tras la activación de la ruta de integridad. Por tanto, alguno o varios de estos 7 residuos de serina y/o treonina son fosforilados por Slt2 en estas condiciones. Sin embargo, no podemos descartar que alguno de los 9 sitios de la región aminoterminal sea a su vez fosforilado por la MAPK. Para comprobarlo, sería necesario realizar experimentos de fosfoproteómica ya que no es apreciable mediante *western-blotting*. De hecho, en la base de datos PhosphoGRID existen anotaciones de 4 sitios de fosforilación por MAPKs en Msg5: 3 sobre el extremo N-terminal, identificados en un análisis proteómico a gran escala en presencia de factor  $\alpha$  (Li *et al.*, 2007) y 1 sobre la extensión C-terminal detectado también en un ensayo a gran escala pero en condiciones basales de crecimiento (Breitkreutz *et al.*, 2010). Hay que destacar que Sdp1, que carece de la extensión carboxiterminal tras el dominio catalítico característica de Msg5, no experimenta un cambio en su movilidad electroforética tras la activación de la ruta de integridad celular (datos no mostrados), lo que sugiere que esta fosfatasa o bien no está regulada mediante fosforilación por Slt2 o bien sufre una fosforilación que no afecta a su tamaño o conformación para ser detectada por electroforesis.

En mamíferos se han descrito varios casos de fosforilación en la región C-terminal de las MKPs por MAPKs con distintas consecuencias. Por ejemplo, ERK fosforila a MKP2 y a MKP1 en los residuos S<sup>359</sup> y S<sup>364</sup> provocando un aumento de la estabilidad de la proteína que refuerza la actividad catalítica sobre la MAPK (Brondello *et al.*, 1999; Cagnol y Rivard, 2013). Del mismo modo se comporta la fosforilación de la MAPK Sty1 sobre la tirosín fosfatasa Pyp2 en *S. pombe* (Kowalczyk *et al.*, 2013). Por el contrario, la fosforilación de ERK sobre las posiciones S<sup>296</sup> y S<sup>323</sup> de MKP1 facilita la ubiquitinación y degradación de la enzima (Lin *et al.*, 2003; Lin y Yang, 2006).

Otros autores han mostrado que en muchos casos la fosforilación sólo tiene un efecto modesto sobre la estabilidad y conformación de las proteínas (Murray *et al.*, 1998; Serber y Ferrell, 2007; Strickfaden *et al.*, 2007). Actualmente carecemos de datos suficientes para conocer si la fosforilación de la extensión C-terminal de Msg5 pudiera promover cierta degradación. Nuestro trabajo ha mostrado que la ausencia de los residuos susceptibles de ser fosforilados de Msg5 (en amino o carboxilterminal) no provoca cambios significativos en la fosforilación de Slit2 y en la expresión de *MLP1*, teniendo sólo un ligero efecto en la supervivencia en presencia de rojo Congo. En consecuencia podemos afirmar que, en principio, la fosforilación de Msg5 no compromete al menos de manera importante su capacidad para regular negativamente a Slit2, lo que sugiere que no promueve la degradación de la proteína. Es cierto que, en ocasiones, los mutantes no fosforilables carecen de fenotipos claros. Por ejemplo, la mutación de 35 residuos susceptibles de ser fosforilados por PAKs (Cla4) o CDKs (Cdc28) en la GEF Cdc24 elimina por completo la fosforilación de esta proteína pero no ocasiona ningún cambio en la polarización o en el crecimiento de las células de levadura (Wai *et al.*, 2009). Esto no significa que en estos casos la fosforilación no tenga una función de regulación fisiológica sino que probablemente no seamos capaces de reproducir en el laboratorio las condiciones en las que dicha modificación resulta relevante.

De hecho, la fosforilación en residuos tanto cercanos como lejanos al sitio de unión entre proteínas puede dar lugar a cambios conformacionales que modulen la fuerza de las interacciones y dotar así de gran diversidad a los mecanismos de reconocimiento entre proteínas (Nishi *et al.*, 2011). Por ejemplo, la fosforilación en el extremo C-terminal de DSP5 por parte de ERK origina una unión estable con la quinasa que refuerza la actividad fosfatasa (Kucharska *et al.*, 2009). A la inversa, la fosforilación de la serina adyacente a la arginina del motivo D de MKP4 provoca cambios electrostáticos y elimina la interacción de esta fosfatasa con ERK y p38 (Dickinson *et al.*, 2011). Del mismo modo, la fosforilación de HePTP1 por ERK2 disminuye la afinidad entre ambas proteínas (Saxena *et al.*, 1999). En este mismo sentido, parece que en condiciones en las que se produce la fosforilación de Msg5, es decir cuando se activa la ruta de integridad, se reduce notablemente la interacción entre Slit2 y Msg5 (Flandez *et al.*, 2004). Esto sugiere que esta modificación postraduccional podría afectar a la afinidad entre MAPK y MKP.

Nuestros resultados apuntan precisamente a que la presencia del motivo IYT de Msg5 es necesaria para que tenga lugar la fosforilación de esta MKP por parte de Slit2. Éste no es el único caso, ya que se ha observado que una mutación en el dominio D de DSP5 elimina la fosforilación por parte de ERK (Kucharska *et al.*, 2009) y que el dominio D de MEK1 es imprescindible para la

retrofosforilación de ERK2 sobre MEK1 (Xu *et al.*, 1999). También la ausencia de la interacción entre Slf2 y su activador Mkk2, debido a la eliminación del dominio D de esta MAPKK, afecta negativamente a su retrofosforilación (Jimenez-Sanchez *et al.*, 2007). Por tanto, quizás en ausencia del motivo IYT la unión entre Msg5 y Slf2 sea demasiado efímera como para permitir su fosforilación por Slf2. Por eso es lógico que la eliminación del dominio IYT tenga consecuencias fenotípicas parecidas (sensibilidad a rojo Congo) a la eliminación de los sitios de fosforilación por Slf2 en Msg5.

Cuando dos rutas de señalización comparten componentes, las fosforilaciones pueden contribuir a mantener la especificidad de la señal. Por ejemplo, una MAPK es capaz de limitar la activación de otra cascada a través de una retroalimentación negativa sobre uno de sus componentes comunes (Errede y Ge, 1996; Maleri *et al.*, 2004; Hao *et al.*, 2008a). De esta forma, el hecho de que Msg5 participe en la desfosforilación de MAPKs que operan en distintas rutas sugiere que deben existir mecanismos muy precisos que modulen su actuación específicamente frente a una u otra quinasa en función de los requerimientos celulares. Así, la fosforilación del extremo C-terminal de MKP7 por parte de ERK aumenta la estabilidad de la fosfatasa favoreciendo de este modo la desfosforilación de la MAPK JNK (Katagiri *et al.*, 2005). En presencia de feromona se activa la ruta de apareamiento y se induce la transcripción de *MSG5* con el fin de llevar a cabo el proceso de adaptación (Doi *et al.*, 1994; Zhan *et al.*, 1997). En estas condiciones Slf2 también se activa pero permanece fosforilado durante más tiempo debido a que la ruta de integridad carece de fenómeno de adaptación (Zarzov *et al.*, 1996). Estos datos sugieren que de alguna manera la célula es capaz de orientar la actuación de Msg5 hacia Fus3 y no hacia Slf2 durante ese tiempo. La fosforilación de Msg5 por Slf2 podría constituir por tanto un mecanismo que garantice la especificidad en estas condiciones, disminuyendo su afinidad por Slf2 y dirigiendo así su actividad hacia Fus3.

En resumen, tanto el análisis de la fosforilación de Msg5 como los estudios de interacción entre MAPKs y MKPs llevados a cabo en este trabajo ponen de manifiesto la elevada complejidad de la regulación negativa que ejercen las MKPs sobre las cascadas de señalización y revelan la flexibilidad de la que disfrutan tanto una misma MKP para desfosforilar distintas MAPKs como una misma MAPK para interactuar con distintos sustratos (activadores, efectores y reguladores negativos). Sin duda, la presencia de modificaciones postraduccionales concretas junto con la existencia de diversos mecanismos de unión entre proteínas favorece la especificidad en la transmisión de la señal y garantiza la correcta actividad de las rutas de señalización mediadas por MAPKs.

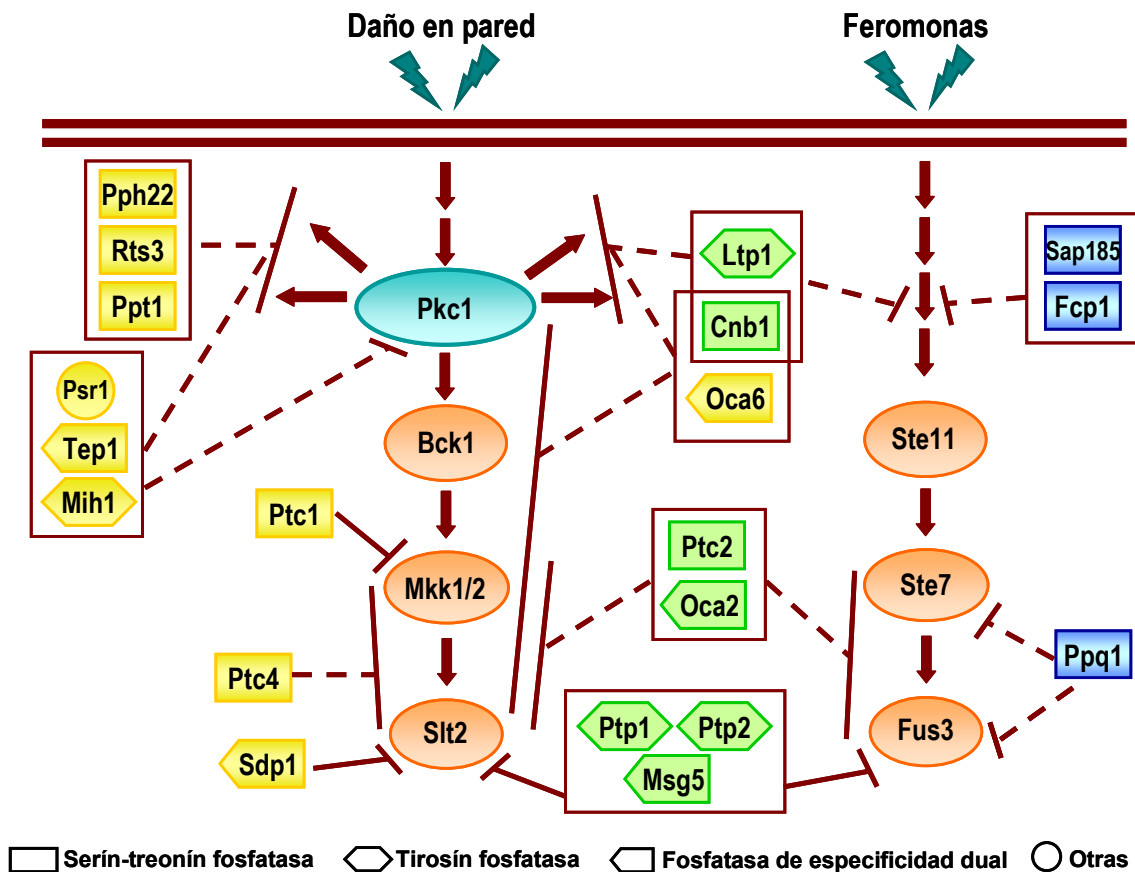
## **Identificación de nuevos reguladores negativos de las rutas de apareamiento e integridad celular**

Con el fin de encontrar nuevos reguladores negativos de la ruta de apareamiento e integridad celular se realizaron rastreos primarios que evaluaron el efecto de la sobreexpresión individual de 43 genes (que codifican proteínas fosfatasa o subunidades asociadas a ellas) sobre la inhibición del crecimiento provocada por la expresión de alelos hiperactivos que activan estas rutas en distintos niveles. Hay que señalar que este tipo de rastreo presenta el inconveniente de que, en ocasiones, la sobreexpresión de un gen puede ser letal o por el contrario puede mejorar el crecimiento de las células al afectar a otras funciones de forma independiente de la ruta de MAPKs que estamos hiperactivando. Por ello, estos estudios de sobreexpresión se complementaron con el análisis fenotípico de los correspondientes mutantes sencillos. Sin embargo, hemos comprobado que la sobreexpresión es una herramienta mucho más potente que el uso de cepas delecionadas en la identificación de nuevos genes implicados en la regulación de las rutas de MAPKs debido a la ya comentada redundancia fisiológica que muestran muchas proteínas fosfatasa, responsable de la ausencia de un fenotipo detectable. De hecho, la sobreexpresión ha sido ampliamente utilizada en la identificación de la función biológica de numerosos genes (Prelich, 2012).

El escrutinio primario sobre la ruta de apareamiento se desarrolló mediante la sobreexpresión de Ste4, la subunidad  $\beta$  de la proteína G heterotrímica. Este componente es específico de esta cascada de señalización y además la inhibición del crecimiento está originada exclusivamente por la hiperactivación de esta ruta. Así, el empleo de Ste4 es una estrategia selectiva para identificar reguladores negativos en toda la cascada, incluso en elementos superiores al módulo de MAPKs. Por el contrario, dado que Pkc1 no participa exclusivamente en la ruta de integridad celular sino que presenta diversas dianas celulares (Mascaraque *et al.*, 2013), fue necesario llevar a cabo dos rastreos complementarios hiperactivando la ruta de integridad celular a nivel de Pkc1 o de Bck1 con el objetivo de discernir entre fosfatasa que actúan sobre el módulo de quinasas o sobre otros sustratos de Pkc1.

Hay que señalar que, en ambos rastreos, se identificaron reguladores negativos conocidos de la ruta de apareamiento (Msg5, Ptp2) y de la ruta de integridad celular (Msg5, Ptp2, Sdp1, Ptc1) (Martin *et al.*, 2005; González *et al.*, 2006), lo que valida los resultados de estos ensayos. En la figura 74 se muestra un resumen de las proteínas identificadas por su efecto en sobreexpresión

sobre los diferentes alelos hiperactivos y el nivel al que los potenciales reguladores negativos podrían estar actuando en la ruta de apareamiento o de integridad celular.



**Figura 74. Representación esquemática de los potenciales reguladores negativos de las rutas de integridad celular y apareamiento identificados en este trabajo.**

Se muestran en color amarillo o azul las proteínas fosfatasa o subunidades asociadas identificadas en el rastreo realizado sobre la ruta de integridad (izquierda) o apareamiento (derecha) respectivamente, mientras que el color verde refleja los genes identificados en ambos rastreos. En línea continua se señalan, dentro de la cascada de señalización, las dianas fisiológicas de las proteínas fosfatasa previamente conocidas o halladas en este trabajo mientras que la línea discontinua marca las posibles dianas basadas en los resultados obtenidos en los rastreos realizados.

Resulta interesante que las proteínas fosfatasa Ltp1, Ptc2, Ptp1, Oca2 y Cnb1 hayan sido identificadas en ambos rastreos. Este hecho podría denotar la amplia especificidad de sustrato de estas enzimas. Sin embargo, la sobreexpresión de Ltp1 tiene un efecto muy discreto sobre la expresión de *MLP1* o *FIG1* en presencia de rojo Congo o feromona, respectivamente, por lo que consideramos que su función sobre estas rutas de MAPKs no es relevante en condiciones fisiológicas. A pesar de que la sobreexpresión de Cnb1, la subunidad reguladora de la calcineurina, reduce moderadamente la señalización de estas rutas en distintas condiciones de

estimulación, no pensamos que esté regulando directamente algún componente de la cascada sino más bien que se trate de un efecto indirecto. En este sentido se ha observado que, en presencia de feromona, se produce un aumento en la concentración intracelular de calcio y se activa la calcineurina, la cual pone en marcha diversos mecanismos con el fin de aumentar la supervivencia (Moser *et al.*, 1996; Withee *et al.*, 1997). Por otro lado, se ha sugerido que la calcineurina participa en el proceso de construcción de la pared al actuar en una vía paralela a la ruta de integridad celular (Nakamura *et al.*, 1996) activando la expresión del gen *FKS2* (Mazur *et al.*, 1995; Zhao *et al.*, 1998).

En cuanto a la identificación de reguladores negativos de la ruta de apareamiento, pensamos que la atenuación del crecimiento provocada por la sobreexpresión de Fcp1 podría ser también un efecto indirecto y no relacionado con la ruta de MAPKs ya que esta fosfatasa regula la síntesis de RNAm a través de la desfosforilación del dominio C-terminal de la subunidad mayor de la RNA polimerasa II Gosh *et al.*, 2008). Por otra parte, Sap185 es una proteína que se asocia a Sit4 para dotar de actividad a esta subunidad catalítica (Luke *et al.*, 1996). El hecho de que su sobreexpresión reduzca la señalización de la ruta de apareamiento cuando se estimula con feromona pero no cuando se expresa el alelo hiperactivo Ste11-4 sugiere que Sap185 podría contribuir a la regulación de esta ruta dirigiendo a Sit4 a algún componente por encima del módulo de MAPKs. Según nuestros datos, la serín-treonín fosfatasa Ppq1 podría desfosforilar la MAPKK Ste7 o la MAPK Fus3. La función de esta proteína es aún desconocida, aunque parece estar involucrada en síntesis de proteínas (Chen *et al.*, 1993; Vincent *et al.*, 1994). Muy recientemente se ha aislado a Ppq1 en un rastreo parecido al desarrollado en este trabajo, en el que para identificar nuevos reguladores negativos de la ruta de apareamiento han fusionado distintas proteínas fosfatasas al *scaffold* Ste5 (Shim y Park, 2014). A pesar de que en nuestras manos no se observara un fenotipo claro en el mutante *ppq1Δ*, estos autores han detectado un ligero incremento en la fosforilación de Fus3, que podría deberse al empleo de la cepa W303 en lugar de la cepa BY4741 que hemos utilizado en nuestros experimentos. Estos autores han visto además que Ppq1 no es capaz de desfosforilar a Fus3 en un ensayo *in vitro* y proponen por tanto que debe estar actuando sobre Ste11 o Ste7. Si unimos estos datos con los nuestros todo parece indicar que el sustrato de Ppq1 podría ser la MAPKK Ste7, ya que reduce significativamente la señalización ocasionada por el alelo Ste11-4. Es interesante destacar que dicho reciente rastreo las proteínas fosfatasas Ptp1, Ptp2 y Ptc2 no se identificaron como reguladores negativos de la ruta de apareamiento, lo cual no coincide con nuestros resultados.

Puesto que se sabe que Ptp2 desfosforila a Fus3 (Zhan *et al.*, 1997), quizás la fusión de ciertas proteínas a Ste5 modifique su conformación haciéndolas inaccesibles a sus sustratos naturales.

Entre las fosfatasas que tienen un efecto negativo sobre la señalización de Pkc1 pero no sobre la ruta de integridad celular están Pph22 y Rts3, subunidad catalítica y reguladora respectivamente del complejo enzimático PP2A. Existen evidencias previas que relacionan a este complejo con Pkc1. Dado que Pkc1 participa en la regulación del citoesqueleto de actina a través del complejo TORC2 (Cybulski y Hall 2009), la atenuación del crecimiento ocasionada por la sobreexpresión de Pph22 en presencia del alelo Pkc1<sup>AAA</sup> podría ser debida a que PP2A antagoniza los efectos de TORC2 (Zabrocki *et al.*, 2002; Pracheil *et al.*, 2012). Por otro lado, algunos autores han mostrado que el complejo PP2A participa en la progresión de la fase M del ciclo celular (Messier *et al.*, 2013). De esta forma, dicha función podría ser la causa de la mejora en el crecimiento que experimentan las células que expresan Pkc1<sup>AAA</sup> al sobreexpresar Pph22. Por su parte, la proteína Rts3 no sólo interacciona con los componentes del complejo PP2A sino también con la fosfatasa PP2A-like Sit4. Se ha propuesto que Sit4 actúa sobre la ruta CWI a través de la regulación negativa de Pkc1 modulando de esta forma todas las funciones relacionadas con esta quinasa (Angeles de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002). Además, se ha descrito que el mutante *rts3Δ* es sensible a cafeína y rapamicina y que su sobreexpresión confiere resistencia a cafeína a través de la regulación negativa de Sit4 (Hood-DeGrenier 2011). Estos resultados son coincidentes con nuestra observación de que la sobreexpresión de Rts3 aumenta de la expresión de Mlp1 en presencia de rojo Congo, lo que sugiere que Rts3 podría favorecer la estimulación de la respuesta transcripcional y la consecuente reparación de daños en la pared celular.

Otra de las fosfatasas que pudiera estar actuando sobre Pkc1 o algún sustrato de esta quinasa distinto a Bck1 es Ppt1. Se ha descrito que Ppt1 desfosforila a Hsf1 (*Heat shock transcription factor 1*) (Noguchi *et al.*, 2012), la chaperona Hsp90 (Wandinger *et al.*, 2006) y la cochaperona Cdc37 (Vaughan *et al.*, 2008). Se sabe que estas proteínas están relacionadas con la ruta de integridad celular, ya que es necesario que la forma doblemente fosforilada y activa de la MAPK Sit2 se una a Hsp90 (Millson *et al.*, 2005) y a Cdc37 (Hawle *et al.*, 2007) para que tenga lugar una correcta activación de Rlm1. A pesar de que, según estos datos, la desfosforilación de Cdc37 o Hsp90 por parte de Ppt1 podría modular la transmisión de la señal desde Sit2 hacia los factores de transcripción, en este trabajo hemos observado que la sobreexpresión de Ppt1 no altera la expresión de *MLP1* en condiciones de estimulación de la ruta CWI. Según un ensayo de dos híbridos, la chaperona Hsp90 es capaz de interactuar con 177 proteínas distintas (Millson *et al.*, 2005). De esta forma, la atenuación de la inhibición en el crecimiento del alelo Pkc1<sup>AAA</sup>

provocada por sobreexpresión de Ppt1 podría deberse a la función del complejo Hsp90-Cdc37-Ppt1 sobre otras proteínas distintas a Slf2 o incluso a funciones desconocidas de Ppt1 fuera de este complejo.

La fosfatasa Tep1 es el ortólogo del supresor de tumores PTEN en levadura. Su función biológica es aún desconocida aunque se ha descrito que su expresión aumenta durante el proceso de esporulación (Heymont *et al.*, 2000). Teóricamente, Tep1 debería actuar principalmente como una fosfatasa de lípidos como PTEN, que desfosforila al PIP<sub>3</sub> (*Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate*). Sin embargo, ni existe PIP<sub>3</sub> en levadura ni Tep1 es capaz de catalizar esta reacción *in vivo* (Rodríguez-Escudero *et al.*, 2005) o *in vitro* (Maehama *et al.*, 2001). Dado que su sobreexpresión atenúa la inhibición del crecimiento provocada por el alelo hiperactivo Pkc1<sup>AAA</sup>, Tep1 podría comportarse como una fosfatasa de proteínas y desfosforilar algún sustrato de Pkc1.

Por su parte, Mih1 desfosforila a la quinasa dependiente de ciclinas Cdc28 y regula de este modo la transición G2/M del ciclo celular (Sia *et al.*, 1996). Se ha descrito que tanto Pkc1 como la MAPK Slf2 fosforilan a Mih1 con el fin de parar el ciclo celular en situaciones de estrés (Harrison *et al.*, 2001;Yano *et al.*, 2013). Sería por tanto posible que, en condiciones de sobreexpresión de Mih1, se favorezca la activación de Cdc28 y la consiguiente progresión del ciclo celular, incluso en condiciones de hiperactivación de la ruta de integridad celular como es la expresión del alelo hiperactivo Pkc1<sup>AAA</sup> que hemos empleado en este trabajo.

Se sabe que la fosfatasa Psr1 actúa posiblemente desfosforilando al factor de transcripción Msn2, siendo de esta manera necesario para desencadenar una completa activación de la respuesta general a estrés a través de la transcripción de genes cuyos promotores contienen la secuencia STRE (*Stress Response Element*) (Kaida *et al.*, 2002). También se ha descrito que, en respuesta a un daño en la pared celular, se activa la transcripción de genes dependientes no sólo de los factores de transcripción Rlm1 y SBF, activados por Slf2, sino también de Msn2/4 (Lagorce *et al.*, 2003). El hecho de que la sobreexpresión de Psr1 no disminuya notablemente la expresión de *MLP1*, controlada por el factor de transcripción Rlm1, pero sí sea capaz de atenuar la inhibición del crecimiento provocada por el alelo hiperactivo Pkc1<sup>AAA</sup> sugiere que esto es debido a la capacidad de Psr1 de desencadenar una respuesta basada en la expresión de genes regulados por secuencias STRE inducida por el factor de transcripción Msn2/4.

Resulta también destacable que se hayan identificado enzimas de la familia OCA, relacionadas con el grupo de fosfatasas duales atípicas PFA-DSPs (Romá-Mateo *et al.*, 2011). Mientras que Oca2 podría estar desfosforilando las MAPKKs o las MAPKs de las rutas de apareamiento e

integridad celular, Oca6 podría tener alguna función sobre el módulo de quinasas de la ruta CWI o sobre algún sustrato de Pkc1 (Figura 74). Aunque la sobreexpresión de ambas reduce la señalización de estas rutas de una forma menos notable que los reguladores negativos conocidos, existen evidencias previas que relacionan a estas fosfatasa con la ruta CWI y la ruta TOR. Los mutantes sencillos son sensibles a cafeína y rapamicina (Parsons *et al.*, 2004; Dudley *et al.*, 2005; Romá-Mateo *et al.*, 2011) y el mutante *oca6Δ* es sensible además a tunicamicina y DTT (Tan *et al.*, 2009). Sin embargo, estas dos fosfatasas carecen de los residuos esenciales de cisteína y/o arginina catalíticos por lo que es bastante complejo predecir su mecanismo de acción en estas rutas. En mamíferos se ha propuesto que algunas PTPs inactivas pueden formar heterodímeros con enzimas activas, y que de esta manera son capaces de regular rutas de señalización (Gross *et al.*, 2002). No podemos descartar que este mecanismo esté presente también en *S. cerevisiae* ya que se ha detectado que Oca2 interacciona físicamente en ensayos de doble híbrido a gran escala con Oca3 (Uetz *et al.*, 2000; Ito *et al.*, 2001; Yu *et al.*, 2008), el único miembro de esta familia que se ha descrito que presenta actividad fosfatasa *in vitro* (Romá-Mateo *et al.*, 2011). Resulta interesante también que Oca2 y Ppq1 presenten una interacción genética negativa (Bandyopadhyay *et al.*, 2010). Dado que ambas reducen en sobreexpresión la señalización de la ruta de apareamiento, la delección conjunta podría ocasionar una activación potenciada de esta cascada de señalización.

Es curioso que, a pesar de buscar reguladores negativos de la ruta CWI entre las proteínas fosfatasas, hayamos descubierto que la sobreexpresión de Yvh1 reduce la señalización de forma independiente de su actividad catalítica, lo que indica que no actúa desfosforilando ningún componente de esta cascada. De la misma manera, el residuo de cisteína del centro activo también es dispensable para la participación de esta fosfatasa en el proceso de esporulación (Beeser y Cooper 2000) o en la maduración ribosomal (Liu y Yang 2008). Nuestros resultados indican que el mantenimiento de unos niveles correctos de esta proteína es necesario para una adecuada respuesta frente a un daño en la pared celular, ya que tanto la ausencia de Yvh1 como su sobreexpresión dan lugar a una reducción de la señalización de la ruta CWI. Este efecto sobre la respuesta frente a un daño en pared podría ser bastante específico dado que se ha propuesto que la pérdida de proteínas ribosomales afecta a específicas categorías funcionales de genes (Komili *et al.*, 2007). Asimismo hemos comprobado que la ausencia de Mrt4, que participa junto con Yvh1 en el proceso de traducción (Lo *et al.*, 2009), provoca los mismos efectos que la delección de *YVH1*. Pensamos por ello que la función que ejercen Yvh1 y Mrt4 en el proceso de maduración ribosomal es importante para la respuesta a un daño en pared, ya que

la pérdida de estas proteínas podría afectar a la traducción de mRNAs relacionados con la integridad celular, conduciendo a una sensibilidad en presencia de rojo Congo. Los mutantes *yvh1Δ* y *mrt4Δ* presentan constitutivamente un incremento en la cantidad de fosfo-Slt2 que paradójicamente se correlaciona con unos niveles de expresión de *MLP1* menores que los que presenta una cepa silvestre. La elevada fosforilación de Slt2 podría ser consecuencia de una estimulación constitutiva de la ruta CWI causada por una pared celular alterada, como ocurre en mutantes que presentan defectos en la construcción de su pared como *gas1Δ* o *fks1Δ* (de Nobel *et al.*, 2000).

### **Ptp1: un regulador negativo de Fus3 y Slt2**

En cuanto a la familia de las PTPs de *S. cerevisiae*, las tirosín fosfatasa Ptp2 y Ptp3 son enzimas de naturaleza promiscua ya que actúan como reguladores negativos de tres MAPKs distintas: Fus3, Slt2 y Hog1 (Martín *et al.*, 2005). Los ensayos de sobreexpresión y de interacción entre proteínas realizados en este trabajo indican que otro miembro de esta misma familia, la fosfatasa Ptp1, también podría regular las rutas de integridad celular y apareamiento a través de la desfosforilación de Slt2 y Fus3 respectivamente. El hecho de que la delección de *PTP1* de lugar a un incremento, aunque sea ligero, en la señalización de ambas rutas es otra evidencia adicional en este sentido. Además, hemos comprobado que, en sobreexpresión, Ptp1 reduce notablemente la transcripción de *FUS1* en un mutante *ste20Δ* expresando el alelo hiperactivo Ste11-4, que es el mismo que fue utilizado en la identificación de Ptp2 y Ptp3 (Zhan *et al.*, 1997). Sin embargo, otros autores observaron que Ptp1 no era capaz de reducir los niveles de expresión de genes que contienen en su región promotora la secuencia PRE (*Pheromone Response Element*) (Zhan y Guan, 1999). Quizás la expresión de Ptp1 desde un vector episómico sea insuficiente para ver un efecto y se necesite un promotor más fuerte, como el promotor *GAL1* que hemos utilizado en nuestro trabajo. En cuanto a una posible función sobre la ruta CWI, en estudios previos se observó que la sobreexpresión de Ptp1 rescata la letalidad sintética del doble mutante *ptp2Δptc1Δ* (Maeda *et al.*, 1993), lo que la relaciona funcionalmente con estas dos fosfatasa que actúan sobre dicha ruta. A través de experimentos de interacción empleando *microarrays* de proteínas se ha detectado que Ptp1 es también capaz de unirse a la MAPK Kss1 y que su sobreexpresión suprime la aparición de pseudohifas (Fasolo *et al.*, 2011). Por tanto, Ptp1 podría estar regulando tres rutas de señalización a través de la desfosforilación de tres MAPKs distintas: Slt2, Fus3 y Kss1. De hecho, Ptp1 ya había sido descrita previamente

como una enzima con amplia especificidad de sustrato, tanto en ensayos *in vivo* como *in vitro* (Wilson *et al.*, 1995). Sin embargo, la sobreexpresión de Ptp1 no rescata la letalidad de los mutantes *ypd1Δ* o *sln1Δ* de la ruta de respuesta a alta osmolaridad (Maeda *et al.*, 1993; Maeda *et al.*, 1994). De esta forma parece que su actividad podría limitarse a las MAPKs de tipo ERK, lo que la diferencia claramente de Ptp2 y Ptp3, que son además reguladores negativos de Hog1. En relación al mecanismo de unión de Ptp1 a Fus3 y Slf2, podría ser similar al que utilizan otras PTPs conocidas que actúan sobre MAPKs. Se sabe que Ptp3 necesita dos motivos dentro del dominio CH2 (característico de las MKPs de mamíferos y ausente en Ptp2) para interaccionar con el *common docking* de Fus3 (Zhan y Guan, 1999), mientras que se desconocen los motivos que median la unión de estas PTPs con Slf2. La tirosín fosfatasa Ptp1 consta de 335 aminoácidos, mientras que Ptp2 y Ptp3 presentan secuencias mucho más largas (750 y 928 aminoácidos respectivamente). Por ello, el extremo regulatorio aminoterminal de Ptp1 se extiende solo 50 aminoácidos antes del comienzo del dominio fosfatasa. En un análisis preliminar de esta región, hemos encontrado residuos de arginina y de leucina que podrían formar parte de un dominio D o KIM incompleto y por tanto participar en la unión a las MAPKs Fus3, Slf2 y Kss1, mientras que no aparece ningún motivo IYT. En cualquier caso, cabe la posibilidad de que, al igual que ocurre con Msg5, Ptp1 utilice mecanismos distintos en la interacción con diferentes MAPKs.

### **Relación entre Ptc1 y las MAPKKs Mkk1 y Mkk2 en la regulación de la ruta de integridad celular**

Las fosfatasas PP2C son, junto con las PTPs, las enzimas más versátiles y activas sobre rutas de MAPKs en *S. cerevisiae*. La serín-treonín fosfatasa Ptc1 actúa como regulador negativo de la ruta de alta osmolaridad desfosforilando a la MAPK Hog1 (Warmka *et al.*, 2001) gracias a la interacción de la proteína adaptadora Nbp2 con la MAPKK Pbs2 (Mapes y Ota 2004). Asimismo, varios trabajos han mostrado que Ptc1 realiza sus funciones sobre la ruta de integridad por medio de la interacción de Nbp2 sobre Bck1 (Stanger *et al.*, 2012). Sin embargo, como mostramos en este trabajo, este requerimiento parece ser dispensable en condiciones de sobreexpresión de Ptc1 y no es debido a la pérdida de especificidad, ya que no da lugar a una reducción de la fosforilación de Fus3 en condiciones de hiperactivación de la ruta de apareamiento. En este mismo sentido, se ha descrito que la sobreexpresión de Ptc1 suprime el fenotipo termosensible de un mutante *nbp2Δ* pero no al revés (Okhuni *et al.*, 2003).

Los experimentos de epistasia realizados en este trabajo utilizando alelos hiperactivos de Pkc1, Bck1 y Mkk1 en cepas delecionadas en elementos superiores de la ruta muestran que Ptc1 regula negativamente la ruta de integridad celular actuando a nivel de las MAPKKs Mkk1 y Mkk2. Ésta es la primera vez que se describe en esta levadura un caso de regulación negativa por una proteína fosfatasa dentro del módulo de MAPKs a un nivel distinto del de la MAPK. Sin embargo, en mamíferos es bastante común que fosfatasas pertenecientes a la familia PP2C actúen desfosforilando MAPKKs o MAPKKKs. Por ejemplo, la isoforma PP2C $\alpha$  inactiva a las MAPKKs de p38, MKK3/6 (Takekawa *et al.*, 1998) y a las de JNK, MKK4/7 (Hanada *et al.*, 1998), mientras que las isoformas PP2C $\Sigma$  y PP2C $\beta$  desfosforilan a la MAPKKK TAK1 que interviene en varias rutas (Hanada *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2007). Por otro lado, no se ha descrito que alguna PP2C sea capaz de regular rutas mediadas por ERK en mamíferos, mientras que en la levadura *S. cerevisiae* Ptc1 actúa sobre una ruta de MAPKs de tipo ERK (ruta CWI).

También se ha descrito que Ptc1 desfosforila a la proteína *scaffold* Ste5 desencadenando la disociación de Fus3 del complejo y la consiguiente expresión de genes que promueven la formación de *shmoos* (Malleshaiah *et al.*, 2010). Por tanto, Ptc1 es capaz de desfosforilar tres rutas de MAPKs en tres niveles distintos, pudiendo actuar tanto como regulador negativo como positivo. A diferencia de Msg5 que emplea distintos dominios para unirse a diferentes MAPKs, Ptc1 siempre parece actuar a través de Nbp2. Resulta curioso que la proteína con la que interacciona Nbp2 no suele ser el sustrato al que Ptc1 desfosforila (Nbp2 se une Bck1 en la ruta CWI y a Pbs2 en la ruta HOG) lo que la diferencia de otros miembros de su familia como Ptc2, que se une directamente y desfosforila a Hog1 (Young *et al.*, 2002).

En este trabajo hemos identificado además la existencia de una relación genética positiva entre Mkk1 y Ptc1, que ha puesto de manifiesto la diferencia funcional entre las MAPKKs Mkk1 y Mkk2. Nuestro grupo ya había observado que un mutante *mkk1* $\Delta$  presenta menores niveles de fosfo-Slt2 que una cepa silvestre o un mutante *mkk2* $\Delta$  tras estimulación de la ruta CWI (Martín *et al.*, 2000); sin embargo, en trabajos posteriores Mkk1 y Mkk2 fueron consideradas redundantes (Jiménez-Sánchez *et al.*, 2007). Los resultados del presente trabajo, fundamentalmente gracias al uso del mutante carente de Ptc1, aportan nuevas evidencias para aclarar esta cuestión. El mecanismo compensatorio dependiente de la ruta de integridad conlleva una remodelación de la pared celular y es esencial para lograr la supervivencia frente a condiciones adversas del medio externo, pero una respuesta excesiva, como la que produce la sobreexpresión de los alelos hiperactivos de Pkc1 o Mkk1 (Watanabe *et al.*, 1995; Martín *et al.*, 2000), puede ser igual de dañina que una falta de respuesta. Los mutantes *ptc1* $\Delta$  presentan altos niveles de fosfo-Slt2

incluso en condiciones basales (Gonzalez *et al.*, 2006) y son sensibles a blanco de calcoflúor (Ram *et al.*, 1994) o rojo Congo (de Nobel *et al.*, 2000). La hiperactivación de la ruta CWI es la causa de estos fenotipos ya que la delección de *RLM1* reduce la sensibilidad del mutante *ptc1Δ* a estos agentes que alteran la pared celular (Gonzalez *et al.*, 2006). El hecho de que la eliminación de *Mkk1* y no de *Mkk2* disminuya los niveles de fosfo-Slt2 y de expresión de *MLP1* en células deficientes en *Ptc1*, y que esto conlleve también una reducción en la sensibilidad a este tipo de compuestos, pone de manifiesto que *Mkk1* es la principal MAPKK que activa a Slt2. En este sentido, nuestros datos apuntan a que existen diferencias funcionales intrínsecas entre estas dos MAPKKs ya que *Mkk1* transmite la señal hacia Slt2 de forma más efectiva, no sólo en ausencia de *Ptc1*, sino frente a distintas condiciones de activación de la cascada.

Se ha propuesto que *Ptc1* participa en procesos celulares muy diversos. Los mutantes *ptc1Δ* son sensibles a cationes (Ruiz *et al.*, 2006), pH alcalino (Serrano *et al.*, 2004), presentan defectos en la morfología vacuolar y un patrón de gemación anormal a 37°C (Gonzalez *et al.*, 2006). En colaboración con el grupo de investigación del doctor Joaquín Ariño actualmente se está estudiando cómo afecta la delección de *MKK1* conjuntamente con la de *PTC1* sobre todos estos fenotipos con objeto de discernir si se deben a una hiperactivación de la ruta de integridad celular o bien a otros efectos relacionados con otras funciones celulares de *Ptc1*.

Además de *Ptc1*, los resultados de los rastreos llevados a cabo en este trabajo sugieren que *Ptc2*, otro miembro de la familia PP2C, podría desfosforilar a las MAPKKs o a la MAPK de las rutas de apareamiento e integridad celular (Figura 74). Esta enzima se caracterizaría por tener una amplia especificidad de sustrato debido a que también regula negativamente la ruta de alta osmolaridad (Young *et al.*, 2002). Asimismo nuestros resultados indican que *Ptc4* podría estar regulando la fosforilación de *Mkk1/2* o de Slt2. De hecho, ya se había descrito con anterioridad que la sobreexpresión de *Ptc2* o *Ptc4* suprime la letalidad de un mutante *nbp2Δ* a alta temperatura (Okhuni *et al.*, 2003). Según nuestros datos, la sobreexpresión de las fosfatasas *Ptc2* o *Ptc4* en un mutante *nbp2Δ* disminuiría la elevada fosforilación de Slt2 a través de una regulación negativa sobre las MAPKKs o la propia MAPK favoreciendo de este modo el crecimiento de un mutante *nbp2Δ* a elevada temperatura.

En definitiva, los datos presentados en esta tesis doctoral han generado nueva información sobre la regulación negativa que ejercen las proteínas fosfatasas en las cascadas de señalización mediadas por MAPKs en *S. cerevisiae* y podrían extrapolarse satisfactoriamente a otros organismos eucarióticos. Nuestros estudios evidencian la elevada complejidad y diversidad de regulación de estas rutas, ponen de manifiesto la importancia del mantenimiento de la

intensidad, amplitud y duración de la respuesta y abren nuevos interrogantes para resolver en investigaciones futuras.



# Conclusiones

---



1. A central region (amino acids 274-373) of the MAPK Slt2 and the pseudokinase Mlp1 is responsible for binding to the MKP Msg5.
2. The Common Docking domain of Slt2 and Mlp1 is not involved in the interaction with Msg5 but is required for binding between Slt2 and the MAPKK Mkk1.
3. The N-terminal IYT motif of the MKPs Msg5 and Sdp1 is necessary for the interaction with the MAPK Slt2 and the pseudokinase Mlp1.
4. The IYT motif within Msg5 is required for the phosphorylation of this MKP by Slt2 in the presence of a cell wall stress.
5. The overexpression of the catalytically inactive versions of Msg5 or Sdp1 triggers Slt2 trapping effects characterized by an increase in phosphorylated-Slt2 levels, an accumulation of this MAPK outside the nucleus and a reduction in *MLP1*- driven transcription.
6. The IYT motif is essential for the catalytically inactive versions of Msg5 and Sdp1 to trap Slt2.
7. Among the 16 putative MAPK phosphorylation sites within Msg5, the ones located in the C-terminal extension are responsible for the mobility shift experienced by this MKP after stimulation of the CWI pathway.
8. The protein phosphatases Ppq1, Ptc2, Ptp1 and Oca2 are putative novel negative regulators of the MAPK module of the mating pathway, and Ptc2, Ptc4, Ptp1 and Oca2 of the MAPK module of the CWI pathway
9. The tyrosine phosphatase Ptp1 physically interacts with the CWI and mating MAPKs Slt2 and Fus3 respectively and negatively regulates both pathways.
10. The DSP Yvh1 is important for the maintenance of cell wall integrity in an independent manner of its catalytic activity.
11. The MAPKKs Mkk1 and Mkk2 are targets of the serine/threonine phosphatase Ptc1 in the CWI pathway.
12. The kinase activity of Mkk1 but not Mkk2 is required for the increased CWI signaling displayed by *ptc1* $\Delta$  mutants due to the principal role of Mkk1 in transmitting signaling through this pathway.



# Referencias

---



1. Aberg,E., Torgersen,K.M., Johansen,B., Keyse,S.M., Perander,M., and Seternes,O.M. (2009). Docking of PRAK/MK5 to the atypical MAPKs ERK3 and ERK4 defines a novel MAPK interaction motif. *J. Biol. Chem.*, **284**, 19392-19401.
2. Agarwal,A.K., Rogers,P.D., Baerson,S.R., Jacob,M.R., Barker,K.S., Cleary,J.D., Walker,L.A., Nagle,D.G., and Clark,A.M. (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.
3. Aguilar,P.S., Engel,A., and Walter,P. (2007). The plasma membrane proteins Prm1 and Fig1 ascertain fidelity of membrane fusion during yeast mating. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 547-556.
4. Akella,R., Moon,T.M., and Goldsmith,E.J. (2008). Unique MAP Kinase binding sites. *Biochim. Biophys. Acta*, **1784**, 48-55.
5. Alberts,A.S., Bouquin,N., Johnston,L.H., and Treisman,R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8616-8622.
6. Alepuz,P.M., Jovanovic,A., Reiser,V., and Ammerer,G. (2001). Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol. Cell*, **7**, 767-777.
7. Alic,N., Higgins,V.J., and Dawes,I.W. (2001). Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* gene that is required for G1 arrest in response to the lipid oxidation product linoleic acid hydroperoxide. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 1801-1810.
8. Alic,N., Higgins,V.J., Pichova,A., Breitenbach,M., and Dawes,I.W. (2003). Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 41849-41855.
9. Alonso,A., Sasin,J., Bottini,N., Friedberg,I., Friedberg,I., Osterman,A., Godzik,A., Hunter,T., Dixon,J., and Mustelin,T. (2004). Protein tyrosine phosphatases in the human genome. *Cell.*, **117**, 699-711.
10. Alonso,A., Saxena,M., Williams,S., and Mustelin,T. (2001). Inhibitory role for dual specificity phosphatase VHR in T cell antigen receptor and CD28-induced Erk and Jnk activation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4766-4771.
11. Andersson,J., Simpson,D.M., Qi,M., Wang,Y., and Elion,E.A. (2004). Differential input by Ste5 scaffold and Msg5 phosphatase route a MAPK cascade to multiple outcomes. *EMBO J.*, **23**, 2564-2576.
12. Andres-Pons,A., Rodriguez-Escudero,I., Gil,A., Blanco,A., Vega,A., Molina,M., Pulido,R., and Cid,V.J. (2007). In vivo functional analysis of the counterbalance of hyperactive phosphatidylinositol 3-kinase p110 catalytic oncoproteins by the tumor suppressor PTEN. *Cancer Res.*, **67**, 9731-9739.
13. Andrews,P.D. and Stark,M.J. (2000). Type 1 protein phosphatase is required for maintenance of cell wall integrity, morphogenesis and cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Sci.*, **113**, 507-520.
14. Angeles de la Torre-Ruiz, Torres,J., Ariño,J., and Herrero,E. (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **277**, 33468-33476.
15. Aoyama,K., Nagata,M., Oshima,K., Matsuda,T., and Aoki,N. (2001). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, LMW-DSP2, that lacks the cdc25 homology domain. *J. Biol. Chem.*, **276**, 27575-27583.
16. Ariño,J. (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1072-1077.
17. Ariño,J., Casamayor,A., and Gonzalez,A. (2011). Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryot. Cell.*, **10**, 21-33.
18. Arroyo,J., Hutzler,J., Bermejo,C., Ragni,E., Garcia-Cantalejo,J., Botias,P., Piberger,H., Schott,A., Sanz,A.B., and Strahl,S. (2011). Functional and genomic analyses of blocked protein O-mannosylation in baker's yeast. *Mol. Microbiol.*, **79**, 1529-1546.
19. Arthur,J.S. and Ley,S.C. (2013). Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **13**, 679-692.
20. Ausubel,F.M., Brent,R., Kingston,R.E., Moore,D.D., Seidman,J.G., Smith,J.A., and Struhl,K. (1993). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
21. Baetz,K., Moffat,J., Haynes,J., Chang,M., and Andrews,B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Sit2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 6515-6528.
22. Balasu,M.C., Spiridon,L.N., Miron,S., Craescu,C.T., Scheidig,A.J., Petrescu,A.J., and Szedlacsek,S.E. (2009). Interface analysis of the complex between ERK2 and PTP-SL. *PLoS. One.*, **4**, e5432.
23. Balko,J.M., Cook,R.S., Vaught,D.B., Kuba,M.G., Miller,T.W., Bholra,N.E., Sanders,M.E., Granja-Ingram,N.M., Smith,J.J., Meszoely,I.M., Salter,J., Dowsett,M., Stemke-Hale,K., Gonzalez-Angulo,A.M., Mills,G.B., Pinto,J.A., Gomez,H.L., and Arteaga,C.L. (2012). Profiling of residual breast cancers after

- neoadjuvant chemotherapy identifies DUSP4 deficiency as a mechanism of drug resistance. *Nat. Med.*, **18**, 1052-1059.
24. Ballon,D.R., Flanary,P.L., Gladue,D.P., Konopka,J.B., Dohlman,H.G., and Thorner,J. (2006). DEP-domain-mediated regulation of GPCR signaling responses. *Cell.*, **126**, 1079-1093.
  25. Bandyopadhyay,S., Mehta,M., Kuo,D., Sung,M.K., Chuang,R., Jaehnicg,E.J., Bodenmiller,B., Licon,K., Copeland,W., Shales,M., Fiedler,D., Dutkowski,J., Guenole,A., van Attikum,H., Shokat,K.M., Kolodner,R.D., Huh,W.K., Aebersold,R., Keogh,M.C., Krogan,N.J., and Ideker,T. (2010). Rewiring of genetic networks in response to DNA damage. *Science.*, **330**, 1385-1389.
  26. Bardwell,L. (2006). Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem. Soc. Trans.*, **34**, 837-841.
  27. Bardwell,L., Cook,J.G., Chang,E.C., Cairns,B.R., and Thorner,J. (1996). Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase Ste7. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 3637-3650.
  28. Bardwell,L., Cook,J.G., Inouye,C.J., and Thorner,J. (1994). Signal propagation and regulation in the mating pheromone response pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Dev. Biol.*, **166**, 363-379.
  29. Bardwell,L. and Shah,K. (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase activation and interactions with regulators and substrates. *Methods*, **40**, 213-223.
  30. Beeser,A.E. and Cooper,T.G. (2000). The dual-specificity protein phosphatase Yvh1p regulates sporulation, growth, and glycogen accumulation independently of catalytic activity in *Saccharomyces cerevisiae* via the cyclic AMP-dependent protein kinase cascade. *J. Bacteriol.*, **182**, 3517-3528.
  31. Behar,M., Dohlman,H.G., and Elston,T.C. (2007). Kinetic insulation as an effective mechanism for achieving pathway specificity in intracellular signaling networks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 16146-16151.
  32. Belli,G., Gari,E., Aldea,M., and Herrero,E. (2001). Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **39**, 1022-1035.
  33. Beltrao,P., Bork,P., Krogan,N.J., and van,N., V (2013). Evolution and functional cross-talk of protein post-translational modifications. *Mol. Syst. Biol.*, **9**, 714.
  34. Bermejo,C., Garcia,R., Straede,A., Rodriguez-Peña ,J.M., Nombela,C., Heinisch,J.J., and Arroyo,J. (2010). Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS.*, **14**, 679-688.
  35. Bermejo,C., Rodriguez,E., Garcia,R., Rodriguez-Peña ,J.M., Rodriguez de la Concepcion ML, Rivas,C., Arias,P., Nombela,C., Posas,F., and Arroyo,J. (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.
  36. Bettinger,B.T., Clark,M.G., and Amberg,D.C. (2007). Requirement for the polarisome and formin function in Ssk2p-mediated actin recovery from osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **175**, 1637-1648.
  37. Bhattacharyya,R.P., Remenyi,A., Good,M.C., Bashor,C.J., Falick,A.M., and Lim,W.A. (2006). The Ste5 scaffold allosterically modulates signaling output of the yeast mating pathway. *Science.*, **311**, 822-826.
  38. Bialy,L. and Waldmann,H. (2005). Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: next-generation drugs? *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, **44**, 3814-3839.
  39. Bilsland,E., Molin,C., Swaminathan,S., Ramne,A., and Sunnerhagen,P. (2004). Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol. Microbiol.*, **53**, 1743-1756.
  40. Biondi,R.M. and Nebreda,A.R. (2003). Signalling specificity of Ser/Thr protein kinases through docking-site-mediated interactions. *Biochem. J.*, **372**, 1-13.
  41. Blackwell,E., Halatek,I.M., Kim,H.J., Ellicott,A.T., Obukhov,A.A., and Stone,D.E. (2003). Effect of the pheromone-responsive G(alpha) and phosphatase proteins of *Saccharomyces cerevisiae* on the subcellular localization of the Fus3 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 1135-1150.
  42. Blackwell,E., Kim,H.J., and Stone,D.E. (2007). The pheromone-induced nuclear accumulation of the Fus3 MAPK in yeast depends on its phosphorylation state and on Dig1 and Dig2. *BMC. Cell Biol.*, **8**, 44.
  43. Blanco-Aparicio,C., Torres,J., and Pulido,R. (1999). A novel regulatory mechanism of MAP kinases activation and nuclear translocation mediated by PKA and the PTP-SL tyrosine phosphatase. *J. Cell Biol.*, **147**, 1129-1136.
  44. Blaskovich,M.A. (2009). Drug discovery and protein tyrosine phosphatases. *Curr. Med. Chem.*, **16**, 2095-2176.
  45. Bodenmiller,B., Wanka,S., Kraft,C., Urban,J., Campbell,D., Pedrioli,P.G., Gerrits,B., Picotti,P., Lam,H., Vittek,O., Brusniak,M.Y., Roschitzki,B., Zhang,C., Shokat,K.M., Schlapbach,R., Colman-Lerner,A., Nolan,G.P., Nesvizhskii,A.I., Peter,M., Loewith,R., von,M.C., and Aebersold,R. (2010). Phosphoproteomic analysis reveals interconnected system-wide responses to perturbations of kinases and phosphatases in yeast. *Sci. Signal.*, **3**, rs4.
  46. Bogoyevitch,M.A. and Kobe,B. (2006). Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 1061-1095.

47. Bonny,C. (2006). Blocking stress signaling pathways with cell permeable peptides. *Adv. Exp. Med. Biol.*, **588**, 133-143.
48. Bordo,D. and Bork,P. (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.*, **3**, 741-746.
49. Breikreutz,A., Choi,H., Sharom,J.R., Boucher,L., Neduva,V., Larsen,B., Lin,Z.Y., Breikreutz,B.J., Stark,C., Liu,G., Ahn,J., Dewar-Darch,D., Reguly,T., Tang,X., Almeida,R., Qin,Z.S., Pawson,T., Gingras,A.C., Nesvizhskii,A.I., and Tyers,M. (2010). A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science.*, **328**, 1043-1046.
50. Brondello,J.M., Brunet,A., Pouyssegur,J., and McKenzie,F.R. (1997). The dual specificity mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 and -2 are induced by the p42/p44MAPK cascade. *J. Biol. Chem.*, **272**, 1368-1376.
51. Brondello,J.M., Pouyssegur,J., and McKenzie,F.R. (1999). Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science*, **286**, 2514-2517.
52. Brown,M.D. and Sacks,D.B. (2009). Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cell Signal.*, **21**, 462-469.
53. Bruckner,S., Kohler,T., Braus,G.H., Heise,B., Bolte,M., and Mosch,H.U. (2004). Differential regulation of Tec1 by Fus3 and Kss1 confers signaling specificity in yeast development. *Curr. Genet.*, **46**, 331-342.
54. Brunet,A., Roux,D., Lenormand,P., Dowd,S., Keyse,S., and Pouyssegur,J. (1999). Nuclear translocation of p42/p44 mitogen-activated protein kinase is required for growth factor-induced gene expression and cell cycle entry. *EMBO J.*, **18**, 664-674.
55. Buschbeck,M., Eickhoff,J., Sommer,M.N., and Ullrich,A. (2002). Phosphotyrosine-specific phosphatase PTP-SL regulates the ERK5 signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **277**, 29503-29509.
56. Buschbeck,M. and Ullrich,A. (2005). The unique C-terminal tail of the mitogen-activated protein kinase ERK5 regulates its activation and nuclear shuttling. *J. Biol. Chem.*, **280**, 2659-2667.
57. Butty,A.C., Pryciak,P.M., Huang,L.S., Herskowitz,I., and Peter,M. (1998). The role of Far1p in linking the heterotrimeric G protein to polarity establishment proteins during yeast mating. *Science.*, **282**, 1511-1516.
58. Cagnol,S. and Rivard,N. (2013). Oncogenic KRAS and BRAF activation of the MEK/ERK signaling pathway promotes expression of dual-specificity phosphatase 4 (DUSP4/MKP2) resulting in nuclear ERK1/2 inhibition. *Oncogene.*, **32**, 564-576.
59. Camps,M., Nichols,A., and Arkinstall,S. (2000). Dual specificity phosphatases: a gene family for control of MAP kinase function. *FASEB J.*, **14**, 6-16.
60. Cannon,J.F. (2010). Function of protein phosphatase-1, Glc7, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv. Appl. Microbiol.*, **73**, 27-59.
61. Care,A., Vousden,K.A., Binley,K.M., Radcliffe,P., Trevethick,J., Mannazzu,I., and Sudbery,P.E. (2004). A synthetic lethal screen identifies a role for the cortical actin patch/endocytosis complex in the response to nutrient deprivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **166**, 707-719.
62. Cargnello,M. and Roux,P.P. (2011). Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **75**, 50-83.
63. Casado,C., Yenush,L., Melero,C., Ruiz,M.C., Serrano,R., Perez-Valle,J., Ariño,J., and Ramos,J. (2010). Regulation of Trk-dependent potassium transport by the calcineurin pathway involves the Hal5 kinase. *FEBS Lett.*, **584**, 2415-2420.
64. Castermans,D., Somers,I., Kriel,J., Louwet,W., Wera,S., Versele,M., Janssens,V., and Thevelein,J.M. (2012). Glucose-induced posttranslational activation of protein phosphatases PP2A and PP1 in yeast. *Cell Res.*, **22**, 1058-1077.
65. Caunt,C.J. and Keyse,S.M. (2013). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs): shaping the outcome of MAP kinase signalling. *FEBS J.*, **280**, 489-504.
66. Cejudo-Marin,R., Tarrega,C., Nunes-Xavier,C.E., and Pulido,R. (2012). Caspase-3 cleavage of DUSP6/MKP3 at the interdomain region generates active MKP3 fragments that regulate ERK1/2 subcellular localization and function. *J. Mol. Biol.*, **420**, 128-138.
67. Ceulemans,H. and Bollen,M. (2004). Functional diversity of protein phosphatase-1, a cellular economizer and reset button. *Physiol Rev.*, **84**, 1-39.
68. Chang,F. and Herskowitz,I. (1990). Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell.*, **63**, 999-1011.
69. Chen,M.X., Chen,Y.H., and Cohen,P.T. (1993). PPK, a novel protein phosphatase containing a Ser + Asn-rich amino-terminal domain, is involved in the regulation of protein synthesis. *Eur. J. Biochem.*, **218**, 689-699.
70. Chen,P., Hutter,D., Yang,X., Gorospe,M., Davis,R.J., and Liu,Y. (2001). Discordance between the binding affinity of mitogen-activated protein kinase subfamily members for MAP kinase phosphatase-2 and their ability to activate the phosphatase catalytically. *J. Biol. Chem.*, **276**, 29440-29449.
71. Chen,R.E. and Thorner,J. (2007). Function and regulation in MAPK signaling pathways: Lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1773**, 1311-1340.

72. Chen,W., Wang,Z., Jiang,C., and Ding,Y. (2013). PP2A-Mediated Anticancer Therapy. *Gastroenterol. Res. Pract.*, **2013**, 675429.
73. Chen,Y.W., Huang,S.C., Lin-Shiau,S.Y., and Lin,J.K. (2005). Bowman-Birk inhibitor abates proteasome function and suppresses the proliferation of MCF7 breast cancer cells through accumulation of MAP kinase phosphatase-1. *Carcinogenesis*, **26**, 1296-1306.
74. Cheng,A., Ross,K.E., Kaldis,P., and Solomon,M.J. (1999). Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes Dev.*, **13**, 2946-2957.
75. Chirivi,R.G., Dilaver,G., van,d., V, Wanschers,B., Schepens,J., Croes,H., Fransen,J., and Hendriks,W. (2004). Characterization of multiple transcripts and isoforms derived from the mouse protein tyrosine phosphatase gene Ptprr. *Genes Cells.*, **9**, 919-933.
76. Cho,B.R., Lee,P., and Hahn,J.S. (2014). CK2-dependent inhibitory phosphorylation is relieved by Ppt1 phosphatase for the ethanol stress-specific activation of Hsf1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **93**, 306-316.
77. Chou,S., Huang,L., and Liu,H. (2004). Fus3-regulated Tec1 degradation through SCFCdc4 determines MAPK signaling specificity during mating in yeast. *Cell.*, **119**, 981-990.
78. Chou,S., Lane,S., and Liu,H. (2006). Regulation of mating and filamentation genes by two distinct Ste12 complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 4794-4805.
79. Chow,C.W. and Davis,R.J. (2006). Protein kinases: chromatin-associated enzymes? *Cell.*, **127**, 887-890.
80. Cid,V.J., Durán,A., del Rey,F., Snyder,M.P., Nombela,C., and Sánchez,M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.*, **59**, 345-386.
81. Cirit,M., Wang,C.C., and Haugh,J.M. (2010). Systematic quantification of negative feedback mechanisms in the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling network. *J. Biol. Chem.*, **285**, 36736-36744.
82. 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.
83. Cobb,M.H. and Goldsmith,E.J. (1995). How MAP kinases are regulated. *J. Biol. Chem.*, **270**, 14843-14846.
84. Cole,G.M., Stone,D.E., and Reed,S.I. (1990). Stoichiometry of G protein subunits affects the *Saccharomyces cerevisiae* mating pheromone signal transduction pathway. *Mol. Cell Biol.*, **10**, 510-517.
85. 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 Sit2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **527**, 186-192.
86. Colombo,S., Ronchetti,D., Thevelein,J.M., Winderickx,J., and Martegani,E. (2004). Activation state of the Ras2 protein and glucose-induced signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 46715-46722.
87. Coluccio,A., Bogengruber,E., Conrad,M.N., Dresser,M.E., Briza,P., and Neiman,A.M. (2004). Morphogenetic pathway of spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell*, **3**, 1464-1475.
88. Cooper,J.A. (1994). MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr. Biol.*, **4**, 1118-1121.
89. Corcoles-Saez,I., Ballester-Tomas,L., De La Torre-Ruiz MA, Prieto,J.A., and Randez-Gil,F. (2012). Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.*, **446**, 477-488.
90. Coulombe,P. and Meloche,S. (2007). Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1773**, 1376-1387.
91. Cowan,K.J. and Storey,K.B. (2003). Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J. Exp. Biol.*, **206**, 1107-1115.
92. Cuenda,A. and Rousseau,S. (2007). p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1773**, 1358-1375.
93. Cullen,P.J., Sabbagh,W., Jr., Graham,E., Irick,M.M., van Olden,E.K., Neal,C., Delrow,J., Bardwell,L., and Sprague,G.F., Jr. (2004). A signaling mucin at the head of the Cdc42- and MAPK-dependent filamentous growth pathway in yeast. *Genes Dev.*, **18**, 1695-1708.
94. Cullen,P.J., Schultz,J., Horecka,J., Stevenson,B.J., Jigami,Y., and Sprague,G.F., Jr. (2000). Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics*, **155**, 1005-1018.
95. Cullen,P.J. and Sprague,G.F., Jr. (2000). Glucose depletion causes haploid invasive growth in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 13619-13624.
96. Cullen,P.J. and Sprague,G.F., Jr. (2002). The Glc7p-interacting protein Bud14p attenuates polarized growth, pheromone response, and filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.*, **1**, 884-894.
97. Cutler,N.S., Pan,X., Heitman,J., and Cardenas,M.E. (2001). The TOR signal transduction cascade controls cellular differentiation in response to nutrients. *Mol. Biol. Cell.*, **12**, 4103-4113.

98. Cyert, M.S. (2003). Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **311**, 1143-1150.
99. Dard, N. and Peter, M. (2006). Scaffold proteins in MAP kinase signaling: more than simple passive activating platforms. *Bioessays*, **28**, 146-156.
100. Dardalhon, M., Agoutin, B., Watzinger, M., and Averbek, D. (2009). Sit2 (Mpk1) MAP kinase is involved in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to 8-methoxypsoralen plus UVA. *J. Photochem. Photobiol. B.*, **95**, 148-155.
101. Das, A.K., Helps, N.R., Cohen, P.T., and Barford, D. (1996). Crystal structure of the protein serine/threonine phosphatase 2C at 2.0 Å resolution. *EMBO J.*, **15**, 6798-6809.
102. Davenport, K.D., Williams, K.E., Ullmann, B.D., and Gustin, M.C. (1999). Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics*, **153**, 1091-1103.
103. 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.
104. de Nadal, E., Ammerer, G., and Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. *Nat. Rev. Genet.*, **12**, 833-845.
105. de Nadal, E., Real, F.X., and Posas, F. (2007). Mucins, osmosensors in eukaryotic cells? *Trends Cell Biol.*, **17**, 571-574.
106. de Nobel, 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 Sit2/Mpk1 MAP kinase and in an Sit2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*, **146**, 2121-2132.
107. Deng, Q., Li, K.Y., Chen, H., Dai, J.H., Zhai, Y.Y., Wang, Q., Li, N., Wang, Y.P., and Han, Z.G. (2014). RNA interference against cancer/testis genes identifies dual specificity phosphatase 21 as a potential therapeutic target in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, **59**, 518-530.
108. 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.
109. Denu, J.M. and Dixon, J.E. (1995). A catalytic mechanism for the dual-specific phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 5910-5914.
110. Denu, J.M. and Dixon, J.E. (1998). Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 633-641.
111. Denu, J.M., Stuckey, J.A., Saper, M.A., and Dixon, J.E. (1996). Form and function in protein dephosphorylation. *Cell*, **87**, 361-364.
112. Dhillon, A.S., Hagan, S., Rath, O., and Kolch, W. (2007). MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, **26**, 3279-3290.
113. Dickinson, R.J., Delavaine, L., Cejudo-Marin, R., Stewart, G., Staples, C.J., Didmon, M.P., Trinidad, A.G., Alonso, A., Pulido, R., and Keyse, S.M. (2011). Phosphorylation of the kinase interaction motif in mitogen-activated protein (MAP) kinase phosphatase-4 mediates cross-talk between protein kinase A and MAP kinase signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **286**, 38018-38026.
114. Dickinson, R.J. and Keyse, S.M. (2006). Diverse physiological functions for dual-specificity MAP kinase phosphatases. *J. Cell Sci.*, **119**, 4607-4615.
115. 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.
116. Dohlman, H.G. (2002). G proteins and pheromone signaling. *Annu. Rev. Physiol*, **64**, 129-152.
117. Dohlman, H.G., Apaniesk, D., Chen, Y., Song, J., and Nusskern, D. (1995). Inhibition of G-protein signaling by dominant gain-of-function mutations in Sst2p, a pheromone desensitization factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 3635-3643.
118. Dohlman, H.G. and Thorner, J.W. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu. Rev. Biochem.*, **70**, 703-754.
119. 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.
120. Dong, Y., Pruyne, D., and Bretscher, A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J. Cell Biol.*, **161**, 1081-1092.
121. Dowd, S., Sneddon, A.A., and Keyse, S.M. (1998). Isolation of the human genes encoding the pyst1 and Pyst2 phosphatases: characterisation of Pyst2 as a cytosolic dual-specificity MAP kinase phosphatase and its catalytic activation by both MAP and SAP kinases. *J. Cell Sci.*, **111**, 3389-3399.
122. Du, Y., Walker, L., Novick, P., and Ferro-Novick, S. (2006). Ptc1p regulates cortical ER inheritance via Sit2p. *EMBO J.*, **25**, 4413-4422.

123. Dudley,A.M., Janse,D.M., Tanay,A., Shamir,R., and Church,G.M. (2005). A global view of pleiotropy and phenotypically derived gene function in yeast. *Mol. Syst. Biol.*, **1**, 2005.
124. 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.
125. Dupres,V., Heinisch,J.J., and Dufrene,Y.F. (2011). Atomic force microscopy demonstrates that disulfide bridges are required for clustering of the yeast cell wall integrity sensor Wsc1. *Langmuir.*, **27**, 15129-15134.
126. Ebisuya,M., Kondoh,K., and Nishida,E. (2005). The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell Sci.*, **118**, 2997-3002.
127. Ekiel,I., Sulea,T., Jansen,G., Kowalik,M., Minailiuc,O., Cheng,J., Harcus,D., Cygler,M., Whiteway,M., and Wu,C. (2009). Binding the atypical RA domain of Ste50p to the unfolded Opy2p cytoplasmic tail is essential for the high-osmolarity glycerol pathway. *Mol. Biol. Cell.*, **20**, 5117-5126.
128. Elion,E.A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 573-581.
129. Elion,E.A. (2001). The Ste5p scaffold. *J. Cell Sci.*, **114**, 3967-3978.
130. Emri,T., Majoros,L., Toth,V., and Pocsi,I. (2013). Echinocandins: production and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **97**, 3267-3284.
131. Enslin,H. and Davis,R.J. (2001). Regulation of MAP kinases by docking domains. *Biol. Cell*, **93**, 5-14.
132. Erdman,S., Lin,L., Malczynski,M., and Snyder,M. (1998). Pheromone-regulated genes required for yeast mating differentiation. *J. Cell Biol.*, **140**, 461-483.
133. Ernsting,B.R. and Dixon,J.E. (1997). The PPS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* codes for a dual specificity protein phosphatase with a role in the DNA synthesis phase of the cell cycle. *J. Biol. Chem.*, **272**, 9332-9343.
134. 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. *Molecular Reproduction and Development*, **42**, 477-485.
135. Errede,B. and Ge,Q.Y. (1996). Feedback regulation of map kinase signal pathways. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, **351**, 143-148.
136. Evangelista,M., Blundell,K., Longtine,M.S., Chow,C.J., Adames,N., Pringle,J.R., Peter,M., and Boone,C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science*, **276**, 118-122.
137. Farooq,A. and Zhou,M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell Signal.*, **16**, 769-779.
138. Fasolo,J., Sboner,A., Sun,M.G., Yu,H., Chen,R., Sharon,D., Kim,P.M., Gerstein,M., and Snyder,M. (2011). Diverse protein kinase interactions identified by protein microarrays reveal novel connections between cellular processes. *Genes Dev.*, **25**, 767-778.
139. Feng,Y. and Davis,N.G. (2000). Feedback phosphorylation of the yeast a-factor receptor requires activation of the downstream signaling pathway from G protein through mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 563-574.
140. Ferrigno,P., Posas,F., Koepp,D., Saito,H., and Silver,P.A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.*, **17**, 5606-5614.
141. Flandez,M., Cosano,I.C., Nombela,C., Martin,H., and Molina,M. (2004). Reciprocal regulation between Sit2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**, 11027-11034.
142. Flatauer,L.J., Zadeh,S.F., and Bardwell,L. (2005). Mitogen-activated protein kinases with distinct requirements for Ste5 scaffolding influence signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 1793-1803.
143. Fox,G.C., Shafiq,M., Briggs,D.C., Knowles,P.P., Collister,M., Didmon,M.J., Makrantonis,V., Dickinson,R.J., Hanrahan,S., Totty,N., Stark,M.J., Keyse,S.M., and McDonald,N.Q. (2007). Redox-mediated substrate recognition by Sdp1 defines a new group of tyrosine phosphatases. *Nature*, **447**, 487-492.
144. Francis,D.M., Kumar,G.S., Koveal,D., Tortajada,A., Page,R., and Peti,W. (2013). The differential regulation of p38alpha by the neuronal kinase interaction motif protein tyrosine phosphatases, a detailed molecular study. *Structure.*, **21**, 1612-1623.
145. Fransson,L., Rosengren,V., Saha,T.K., Grankvist,N., Islam,T., Honkanen,R.E., Sjöholm,A., and Ortsäter,H. (2014). Mitogen-activated protein kinases and protein phosphatase 5 mediate glucocorticoid-induced cytotoxicity in pancreatic islets and beta-cells. *Mol. Cell Endocrinol.*, **383**, 126-136.
146. Frederick,R.L. and Shaw,J.M. (2007). Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic.*, **8**, 1668-1675.
147. Friedman,A. and Perrimon,N. (2006). A functional RNAi screen for regulators of receptor tyrosine kinase and ERK signalling. *Nature.*, **444**, 230-234.
148. Fuchs,S.Y., Dolan,L., Davis,R.J., and Ronai,Z. (1996). Phosphorylation-dependent targeting of c-Jun ubiquitination by Jun N-kinase. *Oncogene.*, **13**, 1531-1535.

149. Fujiwara,T., Tanaka,K., Mino,A., Kikyo,M., Takahashi,K., Shimizu,K., and Takai,Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 1221-1233.
150. Gaestel,M. (2008). Specificity of signaling from MAPKs to MAPKAPKs: kinases' tango nuevo. *Front Biosci.*, **13**, 6050-6059.
151. Gaestel,M. and Kracht,M. (2009). Peptides as signaling inhibitors for mammalian MAP kinase cascades. *Curr. Pharm. Des.*, **15**, 2471-2480.
152. Galanis,A., Yang,S.H., and Sharrocks,A.D. (2001). Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 965-973.
153. Gancedo,J.M. (2001). Control of pseudohyphae formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **25**, 107-123.
154. Garcia,R., Bermejo,C., Grau,C., Perez,R., Manuel Rodriguez-Peña ,J., Francois,J., Nombela,C., and Arroyo,J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.*, **279**, 15183-15195.
155. 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.
156. Garipler,G. and Dunn,C.D. (2013). Defects associated with mitochondrial DNA damage can be mitigated by increased vacuolar pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **194**, 285-290.
157. Garrenton,L.S., Young,S.L., and Thorner,J. (2006). Function of the MAPK scaffold protein, Ste5, requires a cryptic PH domain. *Genes Dev.*, **20**, 1946-1958.
158. Garton,A.J., Flint,A.J., and Tonks,N.K. (1996). Identification of p130(cas) as a substrate for the cytosolic protein tyrosine phosphatase PTP-PEST. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 6408-6418.
159. Gentry,M.S. and Hallberg,R.L. (2002). Localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A subunits throughout mitotic cell cycle. *Mol. Biol. Cell.*, **13**, 3477-3492.
160. Georis,I., Tate,J.J., Feller,A., Cooper,T.G., and Dubois,E. (2011). Intranuclear function for protein phosphatase 2A: Pph21 and Pph22 are required for rapamycin-induced GATA factor binding to the DAL5 promoter in yeast. *Mol. Cell Biol.*, **31**, 92-104.
161. Giaever,G., Chu,A.M., Ni,L., Connelly,C., Riles,L., Veronneau,S., Dow,S., Lucau-Danila,A., Anderson,K., Andre,B., Arkin,A.P., Astromoff,A., El Bakkoury,M., Bangham,R., Benito,R., Brachat,S., Campanaro,S., Curtiss,M., Davis,K., Deutschbauer,A., Entian,K.D., Flaherty,P., Foury,F., Garfinkel,D.J., Gerstein,M., Gotte,D., Guldener,U., Hegemann,J.H., Hempel,S., Herman,Z., Jaramillo,D.F., Kelly,D.E., Kelly,S.L., Kotter,P., LaBonte,D., Lamb,D.C., Lan,N., Liang,H., Liao,H., Liu,L., Luo,C., Lussier,M., Mao,R., Menard,P., Ooi,S.L., Revuelta,J.L., Roberts,C.J., Rose,M., Ross-Macdonald,P., Scherens,B., Schimmack,G., Shafer,B., Shoemaker,D.D., Sookhai-Mahadeo,S., Storms,R.K., Strathern,J.N., Valle,G., Voet,M., Volckaert,G., Wang,C.Y., Ward,T.R., Wilhelmy,J., Winzeler,E.A., Yang,Y., Yen,G., Youngman,E., Yu,K., Bussey,H., Boeke,J.D., Snyder,M., Philippsen,P., Davis,R.W., and Johnston,M. (2002). Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature.*, **418**, 387-391.
162. Gietz,R.D. and Sugino,A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**, 527-534.
163. Glatz,G., Gogl,G., Alexa,A., and Remenyi,A. (2013). Structural mechanism for the specific assembly and activation of the extracellular signal regulated kinase 5 (ERK5) module. *J. Biol. Chem.*, **288**, 8596-8609.
164. Goldsmith,E.J., Akella,R., Min,X., Zhou,T., and Humphreys,J.M. (2007). Substrate and docking interactions in serine/threonine protein kinases. *Chem. Rev.*, **107**, 5065-5081.
165. Gomez,N. and Cohen,P. (1991). Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature.*, **353**, 170-173.
166. Gonzalez,A., Casado,C., Petrezselyova,S., Ruiz,A., and Ariño,J. (2013). Molecular analysis of a conditional hal3 vhs3 yeast mutant links potassium homeostasis with flocculation and invasiveness. *Fungal. Genet. Biol.*, **53**, 1-9.
167. Gonzalez,A., Ruiz,A., Casamayor,A., and Ariño,J. (2009). Normal function of the yeast TOR pathway requires the type 2C protein phosphatase Ptc1. *Mol. Cell Biol.*, **29**, 2876-2888.
168. Gonzalez,A., Ruiz,A., Serrano,R., Ariño,J., and Casamayor,A. (2006). Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *J. Biol. Chem.*, **281**, 35057-35069.
169. Good,M., Tang,G., Singleton,J., Remenyi,A., and Lim,W.A. (2009). The Ste5 scaffold directs mating signaling by catalytically unlocking the Fus3 MAP kinase for activation. *Cell.*, **136**, 1085-1097.
170. 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.
171. Grewal,S., Molina,D.M., and Bardwell,L. (2006). Mitogen-activated protein kinase (MAPK)-docking sites in MAPK kinases function as tethers that are crucial for MAPK regulation in vivo. *Cell Signal.*, **18**, 123-134.

172. Guan,K.L., Deschenes,R.J., Qiu,H., and Dixon,J.E. (1991). Cloning and expression of a yeast protein tyrosine phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 12964-12970.
173. Guan,K.L. and Dixon,J.E. (1991). Eukaryotic proteins expressed in *Escherichia coli*: an improved thrombin cleavage and purification procedure of fusion proteins with glutathione S-transferase. *Anal. Biochem.*, **192**, 262-267.
174. Guo,S., Shen,X., Yan,G., Ma,D., Bai,X., Li,S., and Jiang,Y. (2009). A MAP kinase dependent feedback mechanism controls Rho1 GTPase and actin distribution in yeast. *PLoS. One.*, **4**, e6089.
175. Guo,W., Tamanoi,F., and Novick,P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 353-360.
176. 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.
177. Hamel,L.P., Nicole,M.C., Duplessis,S., and Ellis,B.E. (2012). Mitogen-activated protein kinase signaling in plant-interacting fungi: distinct messages from conserved messengers. *Plant Cell.*, **24**, 1327-1351.
178. Hanada,M., Kobayashi,T., Ohnishi,M., Ikeda,S., Wang,H., Katsura,K., Yanagawa,Y., Hiraga,A., Kanamaru,R., and Tamura,S. (1998). Selective suppression of stress-activated protein kinase pathway by protein phosphatase 2C in mammalian cells. *FEBS Lett.*, **437**, 172-176.
179. Hanada,M., Ninomiya-Tsuji,J., Komaki,K., Ohnishi,M., Katsura,K., Kanamaru,R., Matsumoto,K., and Tamura,S. (2001). Regulation of the TAK1 signaling pathway by protein phosphatase 2C. *J. Biol. Chem.*, **276**, 5753-5759.
180. Hanahan,D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**, 557-580.
181. 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.
182. Hao,N., Behar,M., Parnell,S.C., Torres,M.P., Borchers,C.H., Elston,T.C., and Dohlman,H.G. (2007). A systems-biology analysis of feedback inhibition in the Sho1 osmotic-stress-response pathway. *Curr. Biol.*, **17**, 659-667.
183. Hao,N., Nayak,S., Behar,M., Shanks,R.H., Nagiec,M.J., Errede,B., Hasty,J., Elston,T.C., and Dohlman,H.G. (2008a). Regulation of cell signaling dynamics by the protein kinase-scaffold Ste5. *Mol. Cell.*, **30**, 649-656.
184. Hao,N., Yildirim,N., Nagiec,M.J., Parnell,S.C., Errede,B., Dohlman,H.G., and Elston,T.C. (2012). Combined computational and experimental analysis reveals mitogen-activated protein kinase-mediated feedback phosphorylation as a mechanism for signaling specificity. *Mol. Biol. Cell.*, **23**, 3899-3910.
185. Hao,N., Zeng,Y., Elston,T.C., and Dohlman,H.G. (2008b). Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *J. Biol. Chem.*, **283**, 33798-33802.
186. Hardy,S., Julien,S.G., and Tremblay,M.L. (2012). Impact of oncogenic protein tyrosine phosphatases in cancer. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **12**, 4-18.
187. 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.
188. 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.
189. Hayashi,M. and Maeda,T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.*, **139**, 797-803.
190. Healy,A.M., Zolnierowicz,S., Stapleton,A.E., Goebel,M., DePaoli-Roach,A.A., and Pringle,J.R. (1991). CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 5767-5780.
191. 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.
192. Helliwell,S.B., Schmidt,A., Ohya,Y., and Hall,M.N. (1998). The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr. Biol.*, **8**, 1211-1214.
193. Hendriks,W.J., Elson,A., Harroch,S., Pulido,R., Stoker,A., and den Hertog,J. (2013). Protein tyrosine phosphatases in health and disease. *FEBS J.*, **280**, 708-730.
194. Herskowitz,I. (1995). MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell.*, **80**, 187-197.
195. Heymont,J., Berenfeld,L., Collins,J., Kaganovich,A., Maynes,B., Moulin,A., Ratskovskaya,I., Poon,P.P., Johnston,G.C., Kamenetsky,M., DeSilva,J., Sun,H., Petsko,G.A., and Engebrecht,J. (2000). TEP1, the yeast homolog of the human tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1, is linked to the phosphatidylinositol pathway and plays a role in the developmental process of sporulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 12672-12677.
196. Hickman,M.J., Spatt,D., and Winston,F. (2011). The Hog1 mitogen-activated protein kinase mediates a hypoxic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **188**, 325-338.

197. Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J., and Tzagoloff, A. (1986). Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, **2**, 163-167.
198. Hirasaki, M., Nakamura, F., Yamagishi, K., Numamoto, M., Shimada, Y., Uehashi, K., Muta, S., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Kuhara, S., and Harashima, S. (2010). Deciphering cellular functions of protein phosphatases by comparison of gene expression profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 433-441.
199. Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorgun, C.Z., Uysal, K.T., Maeda, K., Karin, M., and Hotamisligil, G.S. (2002). A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature.*, **420**, 333-336.
200. Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **66**, 300-372.
201. Hohmann, S. (2009). Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, **583**, 4025-4029.
202. Hood, K.L., Tobin, J.F., and Yoon, C. (2002). Identification and characterization of two novel low-molecular-weight dual specificity phosphatases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **298**, 545-551.
203. Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., and Saito, H. (2008). Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 5172-5183.
204. Hosotani, T., Koyama, H., Uchino, M., Miyakawa, T., and Tsuchiya, E. (2001). PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubule function through the yeast EB1 homologue, BIM1. *Genes Cells.*, **6**, 775-788.
205. Hruby, A., Zapatka, M., Heucke, S., Rieger, L., Wu, Y., Nussbaumer, U., Timmermann, S., Dunkler, A., and Johnsson, N. (2011). A constraint network of interactions: protein-protein interaction analysis of the yeast type II phosphatase Ptc1p and its adaptor protein Nbp2p. *J. Cell Sci.*, **124**, 35-46.
206. Huang, K.N. and Symington, L.S. (1995). Suppressors of a *Saccharomyces cerevisiae* *pkc1* mutation identify alleles of the phosphatase gene PTC1 and of a novel gene encoding a putative basic leucine zipper protein. *Genetics*, **141**, 1275-1285.
207. Hurst, J.H. and Dohlman, H.G. (2013). Dynamic ubiquitination of the mitogen-activated protein kinase kinase (MAPKK) Ste7 determines mitogen-activated protein kinase (MAPK) specificity. *J. Biol. Chem.*, **288**, 18660-18671.
208. Inagaki, M., Schmelzle, T., Yamaguchi, K., Irie, K., Hall, M.N., and Matsumoto, K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol. Cell Biol.*, **19**, 8344-8352.
209. 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.
210. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.*, **153**, 163-168.
211. Ito, T., Chiba, T., and Yoshida, M. (2001). Exploring the protein interactome using comprehensive two-hybrid projects. *Trends Biotechnol.*, **19**, S23-27.
212. Iwamoto, M.A., Fairclough, S.R., Rudge, S.A., and Engebrecht, J. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* Sps1p regulates trafficking of enzymes required for spore wall synthesis. *Eukaryot. Cell.*, **4**, 536-544.
213. Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., and Kornfeld, K. (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev.*, **13**, 163-175.
214. Jacoby, J.J., Nilius, S.M., and Heinisch, J.J. (1998). A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol. Gen. Genet.*, **258**, 148-155.
215. Jacoby, T., Flanagan, H., Faykin, A., Seto, A.G., Mattison, C., and Ota, I. (1997). Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *J. Biol. Chem.*, **272**, 17749-17755.
216. James, P., Halladay, J., and Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics.*, **144**, 1425-1436.
217. Janssens, V. and Goris, J. (2001). Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling. *Biochem. J.*, **353**, 417-439.
218. 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.
219. Jeong, A.L. and Yang, Y. (2013). PP2A function toward mitotic kinases and substrates during the cell cycle. *BMB. Rep.*, **46**, 289-294.
220. Jeong, D.G., Cho, Y.H., Yoon, T.S., Kim, J.H., Son, J.H., Ryu, S.E., and Kim, S.J. (2006). Structure of human DSP18, a member of the dual-specificity protein tyrosine phosphatase family. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **62**, 582-588.
221. Jeong, J.Y., Johns, J., Sinclair, C., Park, J.M., and Rossie, S. (2003). Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* protein Ser/Thr phosphatase T1 and comparison to its mammalian homolog PP5. *BMC. Cell Biol.*, **4**, 3.

222. Jia,Z., Barford,D., Flint,A.J., and Tonks,N.K. (1995). Structural basis for phosphotyrosine peptide recognition by protein tyrosine phosphatase 1B. *Science.*, **268**, 1754-1758.
223. Jiang,L., Whiteway,M., Ramos,C., Rodriguez-Medina,J.R., and Shen,S.H. (2002). The YHR076w gene encodes a type 2C protein phosphatase and represents the seventh PP2C gene in budding yeast. *FEBS Lett.*, **527**, 323-325.
224. Jiang,Y. (2006). Regulation of the cell cycle by protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 440-449.
225. Jimenez-Sanchez,M., Cid,V.J., and Molina,M. (2007). Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Sit2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.*, **282**, 31174-31185.
226. Jin,Y., Taylor,E.P., Tang,F., and Weisman,L.S. (2009). PTC1 is required for vacuole inheritance and promotes the association of the myosin-V vacuole-specific receptor complex. *Mol. Biol. Cell.*, **20**, 1312-1323.
227. Jono,H., Xu,H., Kai,H., Lim,D.J., Kim,Y.S., Feng,X.H., and Li,J.D. (2003). Transforming growth factor-beta-Smad signaling pathway negatively regulates nontypeable Haemophilus influenzae-induced MUC5AC mucin transcription via mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1-dependent inhibition of p38 MAPK. *J. Biol. Chem.*, **278**, 27811-27819.
228. 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.
229. 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.
230. 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.
231. Kamada,Y., Qadota,H., Python,C.P., Anraku,Y., Ohya,Y., and Levin,D.E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J. Biol. Chem.*, **271**, 9193-9196.
232. Kaminska,B. and Swiatek-Machado,K. (2008). Targeting signaling pathways with small molecules to treat autoimmune disorders. *Expert. Rev. Clin. Immunol.*, **4**, 93-112.
233. Kaneko,T., Li,L., and Li,S.S. (2008). The SH3 domain--a family of versatile peptide- and protein-recognition module. *Front Biosci.*, **13**, 4938-4952.
234. Kapteyn,J.C., ter Riet,B., Vink,E., Blad,S., de Nobel,H., van den,E.H., and 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.
235. Kar-Roy,A., Korkaya,H., Oberoi,R., Lal,S.K., and Jameel,S. (2004). The hepatitis E virus open reading frame 3 protein activates ERK through binding and inhibition of the MAPK phosphatase. *J. Biol. Chem.*, **279**, 28345-28357.
236. Karunaniithi,S. and Cullen,P.J. (2012). The filamentous growth MAPK Pathway Responds to Glucose Starvation Through the Mig1/2 transcriptional repressors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **192**, 869-887.
237. Kasler,H.G., Victoria,J., Duramad,O., and Winoto,A. (2000). ERK5 is a novel type of mitogen-activated protein kinase containing a transcriptional activation domain. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 8382-8389.
238. Katagiri,C., Masuda,K., Urano,T., Yamashita,K., Araki,Y., Kikuchi,K., and Shima,H. (2005). Phosphorylation of Ser-446 determines stability of MKP-7. *J. Biol. Chem.*, **280**, 14716-14722.
239. Kellis,M., Birren,B.W., and Lander,E.S. (2004). Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **428**, 617-624.
240. Kemmler,S., Occhipinti,L., Veisu,M., and Panse,V.G. (2009). Yvh1 is required for a late maturation step in the 60S biogenesis pathway. *J. Cell Biol.*, **186**, 863-880.
241. 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.
242. Keyse,S.M. (2000). Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion in Cell Biology*, **12**, 186-192.
243. Keyse,S.M. (2008). Dual-specificity MAP kinase phosphatases (MKPs) and cancer. *Cancer Metastasis Rev.*, **27**, 253-261.
244. Keyse,S.M. and Ginsburg,M. (1993). Amino acid sequence similarity between CL100, a dual-specificity MAP kinase phosphatase and cdc25. *Trends Biochem. Sci.*, **18**, 377-378.
245. Khalfan,W., Ivanovska,I., and Rose,M.D. (2000). Functional interaction between the PKC1 pathway and CDC31 network of SPB duplication genes. *Genetics.*, **155**, 1543-1559.
246. Khokhlatchev,A.V., Canagarajah,B., Wilsbacher,J., Robinson,M., Atkinson,M., Goldsmith,E., and Cobb,M.H. (1998). Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, **93**, 605-615.
247. Kim,K.Y., Cosano,I.C., Levin,D.E., Molina,M., and Martin,H. (2007). Dissecting the transcriptional activation function of the cell wall integrity MAP kinase. *Yeast.*, **24**, 335-342.

248. Kim,K.Y. and Levin,D.E. (2010). Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast*, **27**, 541-548.
249. Kim,K.Y. and Levin,D.E. (2011). Mpk1 MAPK association with the Paf1 complex blocks Sen1-mediated premature transcription termination. *Cell*, **144**, 745-756.
250. 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.
251. Kins,S., Kurosinaki,P., Nitsch,R.M., and Gotz,J. (2003). Activation of the ERK and JNK signaling pathways caused by neuron-specific inhibition of PP2A in transgenic mice. *Am. J. Pathol.*, **163**, 833-843.
252. Klis,F.M., Boorsma,A., and De Groot,P.W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**, 185-202.
253. Knaus,M., Cameroni,E., Pedruzzi,I., Tatchell,K., De Virgilio,C., and Peter,M. (2005). The Bud14p-Glc7p complex functions as a cortical regulator of dynein in budding yeast. *EMBO J.*, **24**, 3000-3011.
254. Kohno,H., Tanaka,K., Mino,A., Umikawa,M., Imamura,H., Fujiwara,T., Fujita,Y., Hotta,K., Qadota,H., Watanabe,T., Ohya,Y., and Takai,Y. (1996). Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **15**, 6060-6068.
255. Komili,S., Farny,N.G., Roth,F.P., and Silver,P.A. (2007). Functional specificity among ribosomal proteins regulates gene expression. *Cell*, **131**, 557-571.
256. Kondoh,K. and Nishida,E. (2007). Regulation of MAP kinases by MAP kinase phosphatases. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1773**, 1227-1237.
257. Kowalczyk,K.M., Hartmuth,S., Perera,D., Stansfield,P., and Petersen,J. (2013). Control of Sty1 MAPK activity through stabilisation of the Pyp2 MAPK phosphatase. *J. Cell Sci.*, **126**, 3324-3332.
258. Krisak,L., Strich,R., Winters,R.S., Hall,J.P., Mallory,M.J., Kreitzer,D., Tuan,R.S., and Winter,E. (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **8**, 2151-2161.
259. Krishna,M. and Narang,H. (2008). The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol. Life Sci.*, **65**, 3525-3544.
260. Krishnamurthy,S., He,X., Reyes-Reyes,M., Moore,C., and Hampsey,M. (2004). Ssu72 is an RNA polymerase II CTD phosphatase. *Mol. Cell*, **14**, 387-394.
261. Kucharska,A., Rushworth,L.K., Staples,C., Morrice,N.A., and Keyse,S.M. (2009). Regulation of the inducible nuclear dual-specificity phosphatase DUSP5 by ERK MAPK. *Cell Signal*, **21**, 1794-1805.
262. Kuchin,S., Vyas,V.K., and Carlson,M. (2003). Role of the yeast Snf1 protein kinase in invasive growth. *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 175-177.
263. Kummer,L., Parizek,P., Rube,P., Millgramm,B., Prinz,A., Mittl,P.R., Kaufholz,M., Zimmermann,B., Herberg,F.W., and Pluckthun,A. (2012). Structural and functional analysis of phosphorylation-specific binders of the kinase ERK from designed ankyrin repeat protein libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **109**, E2248-E2257.
264. 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.
265. Kuravi,V.K., Kurischko,C., Puri,M., and Luca,F.C. (2011). Cbk1 kinase and Bck2 control MAP kinase activation and inactivation during heat shock. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 4892-4907.
266. Kyriakis,J.M. and Avruch,J. (2012). Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev.*, **92**, 689-737.
267. Kyttaris,V.C. (2012). Kinase inhibitors: a new class of antirheumatic drugs. *Drug Des Devel. Ther.*, **6**, 245-250.
268. Lagorce,A., Hauser,N.C., Labourdette,D., Rodriguez,C., Martin-Yken,H., Arroyo,J., Hoheisel,J.D., and Francois,J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **278**, 20345-20357.
269. Lammers,T. and Lavi,S. (2007). Role of type 2C protein phosphatases in growth regulation and in cellular stress signaling. *Crit Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 437-461.
270. Lamson,R.E., Takahashi,S., Winters,M.J., and Pryciak,P.M. (2006). Dual role for membrane localization in yeast MAP kinase cascade activation and its contribution to signaling fidelity. *Curr. Biol.*, **16**, 618-623.
271. Lang,R., Hammer,M., and Mages,J. (2006). DUSP meet immunology: dual specificity MAPK phosphatases in control of the inflammatory response. *J. Immunol.*, **177**, 7497-7504.
272. Lawrence,M.C., Jivan,A., Shao,C., Duan,L., Goad,D., Zaganjor,E., Osborne,J., McGlynn,K., Stippec,S., Earnest,S., Chen,W., and Cobb,M.H. (2008). The roles of MAPKs in disease. *Cell Res.*, **18**, 436-442.
273. Le,G., X and Bulavin,D.V. (2010). WIP1 phosphatase at the crossroads of cancer and aging. *Trends Biochem. Sci.*, **35**, 109-114.
274. Lechward,K., Awotunde,O.S., Swiatek,W., and Muszynska,G. (2001). Protein phosphatase 2A: variety of forms and diversity of functions. *Acta Biochim. Pol.*, **48**, 921-933.

275. Lee, K.S., Irie, K., Gotoh, Y., Watanabe, Y., Araki, H., Nishida, E., Matsumoto, K., and Levin, D.E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 3067-3075.
276. 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.
277. Lee, T., Hoofnagle, A.N., Kabuyama, Y., Stroud, J., Min, X., Goldsmith, E.J., Chen, L., Resing, K.A., and Ahn, N.G. (2004). Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol. Cell*, **14**, 43-55.
278. Leeuw, T., Fourest-Lieuvain, A., Wu, C., Chenevert, J., Clark, K., Whiteway, M., Thomas, D.Y., and Leberer, E. (1995). Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science*, **270**, 1210-1213.
279. Legewie, S., Schoeberl, B., Bluthgen, N., and Herzog, H. (2007). Competing docking interactions can bring about bistability in the MAPK cascade. *Biophys. J.*, **93**, 2279-2288.
280. Leroy, C., Lee, S.E., Vaze, M.B., Ochsenbier, F., Guerois, R., Haber, J.E., and Marsolier-Kergoat, M.C. (2003). PP2C phosphatases Ptc2 and Ptc3 are required for DNA checkpoint inactivation after a double-strand break. *Mol. Cell*, **11**, 827-835.
281. Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **70**, 317-343.
282. Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 262-291.
283. Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, **189**, 1145-1175.
284. 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.
285. 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.
286. Levin-Salomon, V., Maayan, I., Vrahami-Moyal, L., Marbach, I., Livnah, O., and Engelberg, D. (2009). When expressed in yeast, mammalian mitogen-activated protein kinases lose proper regulation and become spontaneously phosphorylated. *Biochem. J.*, **417**, 331-340.
287. Li, X., Gerber, S.A., Rudner, A.D., Beausoleil, S.A., Haas, W., Villen, J., Elias, J.E., and Gygi, S.P. (2007). Large-scale phosphorylation analysis of alpha-factor-arrested *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Proteome Res.*, **6**, 1190-1197.
288. Lin, F.C. and Arndt, K.T. (1995). The role of *Saccharomyces cerevisiae* type 2A phosphatase in the actin cytoskeleton and in entry into mitosis. *EMBO J.*, **14**, 2745-2759.
289. Lin, Y.W., Chuang, S.M., and Yang, J.L. (2003). ERK1/2 achieves sustained activation by stimulating MAPK phosphatase-1 degradation via the ubiquitin-proteasome pathway. *J. Biol. Chem.*, **278**, 21534-21541.
290. Lin, Y.W. and Yang, J.L. (2006). Cooperation of ERK and SCFSkp2 for MKP-1 destruction provides a positive feedback regulation of proliferating signaling. *J. Biol. Chem.*, **281**, 915-926.
291. Liu, Y. and Chang, A. (2009). A mutant plasma membrane protein is stabilized upon loss of Yvh1, a novel ribosome assembly factor. *Genetics*, **181**, 907-915.
292. Lo, K.Y., Li, Z., Wang, F., Marcotte, E.M., and Johnson, A.W. (2009). Ribosome stalk assembly requires the dual-specificity phosphatase Yvh1 for the exchange of Mrt4 with P0. *J. Cell Biol.*, **186**, 849-862.
293. Lo, W.S. and Dranginis, A.M. (1998). The cell surface flocculin Flo11 is required for pseudohyphae formation and invasion by *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 161-171.
294. Lockshon, D., Olsen, C.P., Brett, C.L., Chertov, A., Merz, A.J., Lorenz, D.A., Van Gilst, M.R., and Kennedy, B.K. (2012). Rho signaling participates in membrane fluidity homeostasis. *PLoS. One.*, **7**, e45049.
295. Longin, S., Zwaenepoel, K., Louis, J.V., Dilworth, S., Goris, J., and Janssens, V. (2007). Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic subunit. *J. Biol. Chem.*, **282**, 26971-26980.
296. Lu, G., Ren, S., Korge, P., Choi, J., Dong, Y., Weiss, J., Koehler, C., Chen, J.N., and Wang, Y. (2007). A novel mitochondrial matrix serine/threonine protein phosphatase regulates the mitochondria permeability transition pore and is essential for cellular survival and development. *Genes Dev.*, **21**, 784-796.
297. Lu, G. and Wang, Y. (2008). Functional diversity of mammalian type 2C protein phosphatase isoforms: new tales from an old family. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **35**, 107-112.
298. Luke, M.M., Della, S.F., Di Como, C.J., Sugimoto, H., Kobayashi, R., and Arndt, K.T. (1996). The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 2744-2755.
299. Lyons, D.M., Mahanty, S.K., Choi, K.Y., Manandhar, M., and Elion, E.A. (1996). The SH3-domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 4095-4106.

300. Macia,J., Regot,S., Peeters,T., Conde,N., Sole,R., and Posas,F. (2009). Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Sci. Signal.*, **2**, ra13.
301. 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.
302. Madrid,M., Nunez,A., Soto,T., Vicente-Soler,J., Gacto,M., and Cansado,J. (2007). Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol. Biol. Cell*, **18**, 4405-4419.
303. Maeda,T., Takekawa,M., and Saito,H. (1995). Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*, **269**, 554-558.
304. Maeda,T., Tsai,A.Y., and Saito,H. (1993). Mutations in a protein tyrosine phosphatase gene (PTP2) and a protein serine/threonine phosphatase gene (PTC1) cause a synthetic growth defect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 5408-5417.
305. Maeda,T., Wurgler-Murphy,S.M., and Saito,H. (1994). A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*, **369**, 242-245.
306. Maeder,C.I., Hink,M.A., Kinkhabwala,A., Mayr,R., Bastiaens,P.I., and Knop,M. (2007). Spatial regulation of Fus3 MAP kinase activity through a reaction-diffusion mechanism in yeast pheromone signalling. *Nat. Cell Biol.*, **9**, 1319-1326.
307. Maleri,S., Ge,Q., Hackett,E.A., Wang,Y., Dohlman,H.G., and Errede,B. (2004). Persistent activation by constitutive Ste7 promotes Kss1-mediated invasive growth but fails to support Fus3-dependent mating in yeast. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 9221-9238.
308. Malleshaiah,M.K., Shahrezaei,V., Swain,P.S., and Michnick,S.W. (2010). The scaffold protein Ste5 directly controls a switch-like mating decision in yeast. *Nature*, **465**, 101-105.
309. Mandl,M., Slack,D.N., and Keyse,S.M. (2005). Specific inactivation and nuclear anchoring of extracellular signal-regulated kinase 2 by the inducible dual-specificity protein phosphatase DUSP5. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 1830-1845.
310. Manjithaya,R., Jain,S., Farre,J.C., and Subramani,S. (2010). A yeast MAPK cascade regulates pexophagy but not other autophagy pathways. *J. Cell Biol.*, **189**, 303-310.
311. Mao,K., Wang,K., Zhao,M., Xu,T., and Klionsky,D.J. (2011). Two MAPK-signaling pathways are required for mitophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.*, **193**, 755-767.
312. 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.
313. Marin,MJ.(2009). Estudio de la interacción física y funcional de la proteína fosfatasa dual Msg5 con MAP quinasas en *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid.
314. 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.
315. Markovich,S., Yekutieli,A., Shalit,I., Shadkchan,Y., and Osherov,N. (2004). Genomic approach to identification of mutations affecting caspofungin susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **48**, 3871-3876.
316. Marquina,M., Gonzalez,A., Barreto,L., Gelis,S., Munoz,I., Ruiz,A., Alvarez,M.C., Ramos,J., and Ariño,J. (2012). Modulation of yeast alkaline cation tolerance by Ypi1 requires calcineurin. *Genetics*, **190**, 1355-1364.
317. Marshall,C.J. (1994). MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **4**, 82-89.
318. Marsolier,M.C., Roussel,P., Leroy,C., and Mann,C. (2000). Involvement of the PP2C-like phosphatase Ptc2p in the DNA checkpoint pathways of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **154**, 1523-1532.
319. 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.
320. Martin,H., Rodriguez-Pachon,J.M., Ruiz,C., Nombela,C., and Molina,M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**, 1511-1519.
321. Mas,G., de Nadal,E., Dechant,R., Rodriguez de la Concepcion ML, Logie,C., Jimeno-Gonzalez,S., Chavez,S., Ammerer,G., and Posas,F. (2009). Recruitment of a chromatin remodelling complex by the Hog1 MAP kinase to stress genes. *EMBO J.*, **28**, 326-336.
322. Mascaraque,V., Hernaez,M.L., Jimenez-Sanchez,M., Hansen,R., Gil,C., Martin,H., Cid,V.J., and Molina,M. (2013). Phosphoproteomic analysis of protein kinase C signaling in *Saccharomyces cerevisiae* reveals Sit2 mitogen-activated protein kinase (MAPK)-dependent phosphorylation of eisosome core components. *Mol. Cell Proteomics*, **12**, 557-574.
323. Masuda,K., Shima,H., Katagiri,C., and Kikuchi,K. (2003). Activation of ERK induces phosphorylation of MAPK phosphatase-7, a JNK specific phosphatase, at Ser-446. *J. Biol. Chem.*, **278**, 32448-32456.

324. Masuda,K., Shima,H., Watanabe,M., and Kikuchi,K. (2001). MKP-7, a novel mitogen-activated protein kinase phosphatase, functions as a shuttle protein. *J. Biol. Chem.*, **276**, 39002-39011.
325. Matheos,D., Metodiev,M., Muller,E., Stone,D., and Rose,M.D. (2004). Pheromone-induced polarization is dependent on the Fus3p MAPK acting through the formin Bni1p. *J. Cell Biol.*, **165**, 99-109.
326. Matheos,D.P., Kingsbury,T.J., Ahsan,U.S., and Cunningham,K.W. (1997). Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **11**, 3445-3458.
327. Matia-Gonzalez,A.M. and Rodriguez-Gabriel,M.A. (2011). Slit2 MAPK pathway is essential for cell integrity in the presence of arsenate. *Yeast.*, **28**, 9-17.
328. Mattison,C.P. and Ota,I.M. (2000). Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev.*, **14**, 1229-1235.
329. 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.
330. Mayer,B.J. (2001). SH3 domains: complexity in moderation. *J. Cell Sci.*, **114**, 1253-1263.
331. Mayor,F., Jr., Jurado-Pueyo,M., Campos,P.M., and Murga,C. (2007). Interfering with MAP kinase docking interactions: implications and perspective for the p38 route. *Cell Cycle*, **6**, 528-533.
332. Mazur,P. and Baginsky,W. (1996). In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J. Biol. Chem.*, **271**, 14604-14609.
333. 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.
334. McDonald,C.M., Cooper,K.F., and Winter,E. (2005). The Ama1-directed anaphase-promoting complex regulates the Smk1 mitogen-activated protein kinase during meiosis in yeast. *Genetics.*, **171**, 901-911.
335. Merlini,L., Dudin,O., and Martin,S.G. (2013). Mate and fuse: how yeast cells do it. *Open. Biol.*, **3**, 130008.
336. Messier,V., Zenklusen,D., and Michnick,S.W. (2013). A nutrient-responsive pathway that determines M phase timing through control of B-cyclin mRNA stability. *Cell.*, **153**, 1080-1093.
337. Metodiev,M.V., Matheos,D., Rose,M.D., and Stone,D.E. (2002). Regulation of MAPK function by direct interaction with the mating-specific Galpha in yeast. *Science*, **296**, 1483-1486.
338. Michaelis,S. and Barrowman,J. (2012). Biogenesis of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone a-factor, from yeast mating to human disease. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **76**, 626-651.
339. Millson,S.H., Truman,A.W., King,V., Prodromou,C., Pearl,L.H., and Piper,P.W. (2005). A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slit2p (Mpk1p). *Eukaryot. Cell.*, **4**, 849-860.
340. Millward,T.A., Zolnierowicz,S., and Hemmings,B.A. (1999). Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 186-191.
341. Minguetz,P., Letunic,I., Parca,L., and Bork,P. (2013). PTMcode: a database of known and predicted functional associations between post-translational modifications in proteins. *Nucleic Acids Res.*, **41**, D306-D311.
342. Minguetz,P., Parca,L., Diella,F., Mende,D.R., Kumar,R., Helmer-Citterich,M., Gavin,A.C., van,N., V, and Bork,P. (2012). Deciphering a global network of functionally associated post-translational modifications. *Mol. Syst. Biol.*, **8**, 599.
343. Mitchell,D.A., Marshall,T.K., and Deschenes,R.J. (1993). Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast*, **9**, 715-722.
344. Mocciano,A. and Schiebel,E. (2010). Cdc14: a highly conserved family of phosphatases with non-conserved functions? *J. Cell Sci.*, **123**, 2867-2876.
345. Mody,A., Weiner,J., and Ramanathan,S. (2009). Modularity of MAP kinases allows deformation of their signalling pathways. *Nat. Cell Biol.*, **11**, 484-491.
346. Molina,M., Cid,V.J., and Martin,H. (2010). Fine regulation of *Saccharomyces cerevisiae* MAPK pathways by post-translational modifications. *Yeast.*, **27**, 503-511.
347. Molina,M., Gil,C., Pla,J., Arroyo,J., and Nombela,C. (2000). Protein localisation approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc. Res. Tech.*, **51**, 601-612.
348. Mollapour,M. and Piper,P.W. (2006). Hog1p mitogen-activated protein kinase determines acetic acid resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **6**, 1274-1280.
349. Morrison,D.K. and Davis,R.J. (2003). Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **19**, 91-118.
350. Murakami,Y., Tatebayashi,K., and Saito,H. (2008). Two adjacent docking sites in the yeast Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase differentially interact with the Pbs2 MAP kinase kinase and the Ptp2 protein tyrosine phosphatase. *Mol. Cell Biol.*, **28**, 2481-2494.
351. Murray,S.R., Evans,C.J., and von Zastrow,M. (1998). Phosphorylation is not required for dynamin-dependent endocytosis of a truncated mutant opioid receptor. *J. Biol. Chem.*, **273**, 24987-24991.

352. Muslin,A.J. (2008). MAPK signalling in cardiovascular health and disease: molecular mechanisms and therapeutic targets. *Clin. Sci. (Lond)*, **115**, 203-218.
353. Mustelin,T., Tautz,L., and Page,R. (2005). Structure of the hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP) catalytic domain: structure of a KIM phosphatase with phosphate bound at the active site. *J. Mol. Biol.*, **354**, 150-163.
354. Nagiec,M.J. and Dohlman,H.G. (2012). Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. *PLoS. Genet.*, **8**, e1002437.
355. Nakabayashi,J. (2012). Optimal ratio of scaffold complex to free Fus3 to maximise the accumulation of phosphorylated Fus3 in yeast pheromone signalling pathway. *IET. Syst. Biol.*, **6**, 9-21.
356. Nakamura,T., Ohmoto,T., Hirata,D., Tsuchiya,E., and Miyakawa,T. (1996). Genetic evidence for the functional redundancy of the calcineurin- and Mpk1-mediated pathways in the regulation of cellular events important for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **251**, 211-219.
357. Nardozi,J.D., Lott,K., and Cingolani,G. (2010). Phosphorylation meets nuclear import: a review. *Cell Commun. Signal.*, **8**, 32-38.
358. Nern,A. and Arkowitz,R.A. (1998). A GTP-exchange factor required for cell orientation. *Nature*, **391**, 195-198.
359. Nguyen,L.K., Kolch,W., and Kholodenko,B.N. (2013). When ubiquitination meets phosphorylation: a systems biology perspective of EGFR/MAPK signalling. *Cell Commun. Signal.*, **11**, 52-11.
360. Nishi,H., Hashimoto,K., and Panchenko,A.R. (2011). Phosphorylation in protein-protein binding: effect on stability and function. *Structure.*, **19**, 1807-1815.
361. Noguchi,C., Watanabe,D., Zhou,Y., Akao,T., and Shimoj,H. (2012). Association of constitutive hyperphosphorylation of Hsf1p with a defective ethanol stress response in *Saccharomyces cerevisiae* sake yeast strains. *Appl. Environ. Microbiol.*, **78**, 385-392.
362. Nolan,S., Cowan,A.E., Koppel,D.E., Jin,H., and Grote,E. (2006). FUS1 regulates the opening and expansion of fusion pores between mating yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **17**, 2439-2450.
363. Noordman,Y.E., Jansen,P.A., and Hendriks,W.J. (2006). Tyrosine-specific MAPK phosphatases and the control of ERK signaling in PC12 cells. *J. Mol. Signal.*, **1:4**, 4.
364. Nunes-Xavier,C.E., Martin-Perez,J., Elson,A., and Pulido,R. (2013). Protein tyrosine phosphatases as novel targets in breast cancer therapy. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1836**, 211-226.
365. Nunes-Xavier,C.E., Tarrega,C., Cejudo-Marin,R., Frijhoff,J., Sandin,A., Ostman,A., and Pulido,R. (2010). Differential up-regulation of MAP kinase phosphatases MKP3/DUSP6 and DUSP5 by Ets2 and c-Jun converge in the control of the growth arrest versus proliferation response of MCF-7 breast cancer cells to phorbol ester. *J. Biol. Chem.*, **285**, 26417-26430.
366. O'Neill,B.M., Szyjka,S.J., Lis,E.T., Bailey,A.O., Yates,J.R., III, Aparicio,O.M., and Romesberg,F.E. (2007). Pph3-Psy2 is a phosphatase complex required for Rad53 dephosphorylation and replication fork restart during recovery from DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 9290-9295.
367. O'Rourke,S.M. and Herskowitz,I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **12**, 2874-2886.
368. O'Rourke,S.M. and Herskowitz,I. (2004). Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Mol. Biol. Cell*, **15**, 532-542.
369. Ofek,P., Ben Meir,D., Kariv-Inbal,Z., Oren,M., and Lavi,S. (2003). Cell cycle regulation and p53 activation by protein phosphatase 2C alpha. *J. Biol. Chem.*, **278**, 14299-14305.
370. Ohkuni,K., Okuda,A., and Kikuchi,A. (2003). Yeast Nap1-binding protein Nbp2p is required for mitotic growth at high temperatures and for cell wall integrity. *Genetics.*, **165**, 517-529.
371. Orlean,P. (2012). Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics.*, **192**, 775-818.
372. Ostman,A., Hellberg,C., and Bohmer,F.D. (2006). Protein-tyrosine phosphatases and cancer. *Nat. Rev. Cancer.*, **6**, 307-320.
373. Owens,D.M. and Keyse,S.M. (2007). Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene*, **26**, 3203-3213.
374. Palacios,L. (2010). Ptc1, una serín/treonín fosfatasa que regula la señalización mediada por MAPKs y procesos morfogénicos en *Saccharomyces cerevisiae* a través de su proteína adaptadora Nbp2. Tesis Dcotoral, Universidad Complutense de Madrid.
375. Palacios,L., Dickinson,R.J., Sacristan-Reviriego,A., Didmon,M.P., Marin,M.J., Martin,H., Keyse,S.M., and Molina,M. (2011). Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **286**, 42037-42050.
376. Palecek,S.P., Parikh,A.S., and Kron,S.J. (2002). Sensing, signalling and integrating physical processes during *Saccharomyces cerevisiae* invasive and filamentous growth. *Microbiology*, **148**, 893-907.
377. Pan,X., Harashima,T., and Heitman,J. (2000). Signal transduction cascades regulating pseudohyphal differentiation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Opin. Microbiol.*, **3**, 567-572.

378. Panadero, J., Pallotti, C., Rodriguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., and Prieto, J.A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **281**, 4638-4645.
379. Parsons, A.B., Brost, R.L., Ding, H., Li, Z., Zhang, C., Sheikh, B., Brown, G.W., Kane, P.M., Hughes, T.R., and Boone, C. (2004). Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 62-69.
380. Patterson, J.C., Klimenko, E.S., and Thorner, J. (2010). Single-cell analysis reveals that insulation maintains signaling specificity between two yeast MAPK pathways with common components. *Sci. Signal.*, **19**, ra75.
381. Patterson, K.I., Brummer, T., O'Brien, P.M., and Daly, R.J. (2009). Dual-specificity phosphatases: critical regulators with diverse cellular targets. *Biochem. J.*, **418**, 475-489.
382. Patterson, S.L., Colbert, M.K., and Hawk, E. (2013). Cancer chemoprevention: successes and failures. *Clin. Chem.*, **59**, 94-101.
383. Perez, P. and Rincon, S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.*, **426**, 243-253.
384. Peter, M., Gartner, A., Horecka, J., Ammerer, G., and Herskowitz, I. (1993). FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell.*, **73**, 747-760.
385. Peti, W. and Page, R. (2013). Molecular basis of MAP kinase regulation. *Protein Sci.*, **22**, 1698-1710.
386. 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.
387. 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.
388. Pitoniak, A., Birkaya, B., Dionne, H.M., Vadaie, N., and Cullen, P.J. (2009). The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response. *Mol. Biol. Cell.*, **20**, 3101-3114.
389. Popolo, L., Gualtieri, T., and Ragni, E. (2001). The yeast cell-wall salvage pathway. *Med. Mycol.*, **39**, 111-121.
390. Posas, F., Camps, M., and Ariño, J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 13036-13041.
391. Posas, F., Clotet, J., Muns, M.T., Corominas, J., Casamayor, A., and Ariño, J. (1993). The gene PPG encodes a novel yeast protein phosphatase involved in glycogen accumulation. *J. Biol. Chem.*, **268**, 1349-1354.
392. Posas, F. and Saito, H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, **276**, 1702-1705.
393. Posas, F. and Saito, H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J.*, **17**, 1385-1394.
394. Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996). Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell*, **86**, 865-875.
395. Prickett, T.D. and Brautigan, D.L. (2007). Cytokine activation of p38 mitogen-activated protein kinase and apoptosis is opposed by alpha-4 targeting of protein phosphatase 2A for site-specific dephosphorylation of MEK3. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 4217-4227.
396. Proft, M., Gibbons, F.D., Copeland, M., Roth, F.P., and Struhl, K. (2005). Genomewide identification of Sko1 target promoters reveals a regulatory network that operates in response to osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.*, **4**, 1343-1352.
397. Pulido, R., Zuñiga, A., and Ullrich, A. (1998). PTP-SL and STEP protein tyrosine phosphatases regulate the activation of the extracellular signal-regulated kinases ERK1 and ERK2 by association through a kinase interaction motif. *EMBO J.*, **17**, 7337-7350.
398. Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., and Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science.*, **272**, 279-281.
399. Qi, M.S. and Elion, E.A. (2005). MAP kinase pathways. *Journal of Cell Science*, **118**, 3569-3572.
400. Queralt, E. and Igual, J.C. (2005). Functional connection between the Clb5 cyclin, the protein kinase C pathway and the Swi4 transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.*, **171**, 1485-1498.
401. Raitt, D.C., Posas, F., and Saito, H. (2000). Yeast Cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J.*, **19**, 4623-4631.
402. 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.
403. Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R., and Klis, F.M. (1994). A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast*, **10**, 1019-1030.

404. Raman,M., Chen,W., and Cobb,M.H. (2007). Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*, **26**, 3100-3112.
405. Ramezani,R.M., Jansen,G., Buhning,F., and Hollenberg,C.P. (1998). Ste50p is involved in regulating filamentous growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and associates with Ste11p. *Mol. Gen. Genet.*, **259**, 29-38.
406. Ramezani-Rad,M. (2003). The role of adaptor protein Ste50-dependent regulation of the MAPKKK Ste11 in multiple signalling pathways of yeast. *Curr. Genet.*, **43**, 161-170.
407. Ray,A., Hector,R.E., Roy,N., Song,J.H., Berkner,K.L., and Runge,K.W. (2003). Sir3p phosphorylation by the Slt2p pathway effects redistribution of silencing function and shortened lifespan. *Nat. Genet.*, **33**, 522-526.
408. 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.
409. Reiser,V., Raitt,D.C., and Saito,H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J. Cell Biol.*, **161**, 1035-1040.
410. Reiser,V., Salah,S.M., and Ammerer,G. (2000). Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 620-627.
411. Remenyi,A., Good,M.C., Bhattacharyya,R.P., and Lim,W.A. (2005). The role of docking interactions in mediating signaling input, output, and discrimination in the yeast MAPK network. *Mol. Cell.*, **20**, 951-962.
412. Reyes-Reyes,M. and Hampsey,M. (2007). Role for the Ssu72 C-terminal domain phosphatase in RNA polymerase II transcription elongation. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 926-936.
413. Rincon,M. and Davis,R.J. (2009). Regulation of the immune response by stress-activated protein kinases. *Immunol. Rev.*, **228**, 212-224.
414. Rios,P., Nunes-Xavier,C.E., Tabernero,L., Kohn,M., and Pulido,R. (2014). Dual-specificity phosphatases as molecular targets for inhibition in human disease. *Antioxid. Redox. Signal.*, **20**, 2251-2273.
415. Rispail,N., Soanes,D.M., Ant,C., Czajkowski,R., Grunler,A., Huguet,R., Perez-Nadales,E., Poli,A., Sartorel,E., Valiante,V., Yang,M., Beffa,R., Brakhage,A.A., Gow,N.A., Kahmann,R., Lebrun,M.H., Lenasi,H., Perez-Martin,J., Talbot,N.J., Wendland,J., and Di,P.A. (2009). Comparative genomics of MAP kinase and calcium-calmodulin signalling components in plant and human pathogenic fungi. *Fungal. Genet. Biol.*, **46**, 287-298.
416. Roberts,C.J., Nelson,B., Marton,M.J., Stoughton,R., Meyer,M.R., Bennett,H.A., He,Y.D., Dai,H., Walker,W.L., Hughes,T.R., Tyers,M., Boone,C., and Friend,S.H. (2000). Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science*, **287**, 873-880.
417. Roberts,P.J. and Der,C.J. (2007). Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*, **26**, 3291-3310.
418. 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.
419. 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.
420. Rodicio,R. and Heinisch,J.J. (2010). Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast*, **27**, 531-540.
421. Rodriguez Limardo,R.G., Ferreira,D.N., Roitberg,A.E., Marti,M.A., and Turjanski,A.G. (2011). p38gamma Activation Triggers Dynamical Changes in Allosteric Docking Sites. *Biochemistry*, **50**, 1384-95.
422. Rodriguez-Escudero,I., Rotger,R., Cid,V.J., and Molina,M. (2006). Inhibition of Cdc42-dependent signalling in *Saccharomyces cerevisiae* by phosphatase-dead SigD/SopB from *Salmonella typhimurium*. *Microbiology*, **152**, 3437-3452.
423. Rodríguez-Pachón,J.M., Martín,H., North,G., Rotger,R., Nombela,C., and Molina,M. (2002). A Novel Connection between the Yeast Cdc42 GTPase and the Slt2-mediated Cell Integrity Pathway Identified through the Effect of Secreted *Salmonella* GTPase Modulators. *J. Biol. Chem.*, **277**, 27094-27102.
424. Rodríguez-Peña ,J.M., Cid,V.J., Arroyo,J., and Nombela,C. (2000). A novel family of cell wall-related proteins regulated differently during the yeast life cycle. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 3245-3255.
425. Rodríguez-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.
426. Roeder,A.D., Hermann,G.J., Keegan,B.R., Thatcher,S.A., and Shaw,J.M. (1998). Mitochondrial inheritance is delayed in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the serine/threonine phosphatase PTC1. *Mol. Biol. Cell.*, **9**, 917-930.
427. Roma-Mateo,C., Rios,P., Tabernero,L., Attwood,T.K., and Pulido,R. (2007). A novel phosphatase family, structurally related to dual-specificity phosphatases, that displays unique amino acid sequence and substrate specificity. *J. Mol. Biol.*, **374**, 899-909.

428. Roma-Mateo,C., Sacristan-Reviriego,A., Beresford,N.J., Caparros-Martin,J.A., Cullanez-Macia,F.A., Martin,H., Molina,M., Tabernero,L., and Pulido,R. (2011). Phylogenetic and genetic linkage between novel atypical dual-specificity phosphatases from non-metazoan organisms. *Mol. Genet. Genomics.*, **285**, 341-354.
429. Ronne,H., Carlberg,M., Hu,G.Z., and Nehlin,J.O. (1991). Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 4876-4884.
430. Roux,P.P. and Blenis,J. (2004). ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **68**, 320-344.
431. Ruan,H., Yan,Z., Sun,H., and Jiang,L. (2007). The YCR079w gene confers a rapamycin-resistant function and encodes the sixth type 2C protein phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.*, **7**, 209-215.
432. Rubinfeld,H., Hanoch,T., and Seger,R. (1999). Identification of a cytoplasmic-retention sequence in ERK2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 30349-30352.
433. Ruiz,A., Gonzalez,A., Garcia-Salcedo,R., Ramos,J., and Ariño,J. (2006). Role of protein phosphatases 2C on tolerance to lithium toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **62**, 263-277.
434. Rupp,S., Summers,E., Lo,H.J., Madhani,H., and Fink,G. (1999). MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast FLO11 gene. *EMBO J.*, **18**, 1257-1269.
435. Sabbagh,W., Jr., Flatauer,L.J., Bardwell,A.J., and Bardwell,L. (2001). Specificity of MAP kinase signaling in yeast differentiation involves transient versus sustained MAPK activation. *Mol. Cell*, **8**, 683-691.
436. Sacristan-Reviriego,A., Madrid,M., Cansado,J., Martin,H., and Molina,M. (2014). A conserved non-canonical docking mechanism regulates the binding of dual specificity phosphatases to cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in budding and fission yeasts. *PLoS. One.*, **9**, e85390.
437. Saito,H. (2010). Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr. Opin. Microbiol.*, **13**, 677-683.
438. Saito,H. and Posas,F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics.*, **192**, 289-318.
439. Saito,J., Toriumi,S., Awano,K., Ichijo,H., Sasaki,K., Kobayashi,T., and Tamura,S. (2007). Regulation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by protein phosphatase 2Cepsilon. *Biochem. J.*, **405**, 591-596.
440. Sakumoto,N., Matsuoka,I., Mukai,Y., Ogawa,N., Kaneko,Y., and Harashima,S. (2002). A series of double disruptants for protein phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae* and their phenotypic analysis. *Yeast*, **19**, 587-599.
441. Salojin,K. and Oravec,T. (2007). Regulation of innate immunity by MAPK dual-specificity phosphatases: knockout models reveal new tricks of old genes. *J. Leukoc. Biol.*, **81**, 860-869.
442. Sambrook,J., Fritsch,E.F., and Maniatis,T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
443. Saxena,M. and Mustelin,T. (2000). Extracellular signals and scores of phosphatases: all roads lead to MAP kinase. *Semin. Immunol.*, **12**, 387-396.
444. Saxena,M., Williams,S., Brockdorff,J., Gilman,J., and Mustelin,T. (1999). Inhibition of T cell signaling by mitogen-activated protein kinase-targeted hematopoietic tyrosine phosphatase (HePTP). *J. Biol. Chem.*, **274**, 11693-11700.
445. Schmidt,A., Schmelzle,T., and Hall,M.N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **45**, 1433-1441.
446. Schwartz,M.A. and Madhani,H.D. (2004). Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.*, **38**, 725-748.
447. Scrimale,T., Didone,L., 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.
448. Serber,Z. and Ferrell,J.E., Jr. (2007). Tuning bulk electrostatics to regulate protein function. *Cell.*, **128**, 441-444.
449. Serrano,R., Martin,H., Casamayor,A., and Ariño,J. (2006). Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Sit2 MAPK pathway. *J. Biol. Chem.*, **281**, 39785-39795.
450. Seyfried,J., Wang,X., Kharebava,G., and Tournier,C. (2005). A novel mitogen-activated protein kinase docking site in the N terminus of MEK5alpha organizes the components of the extracellular signal-regulated kinase 5 signaling pathway. *Mol. Cell Biol.*, **25**, 9820-9828.
451. Shanley,T.P., Vasi,N., Denenberg,A., and Wong,H.R. (2001). The serine/threonine phosphatase, PP2A: endogenous regulator of inflammatory cell signaling. *J. Immunol.*, **166**, 966-972.
452. Sharrocks,A.D. (1994). A T7 expression vector for producing N- and C-terminal fusion proteins with glutathione S-transferase. *Gene*, **138**, 105-108.
453. Sharrocks,A.D., Yang,S.H., and Galanis,A. (2000). Docking domains and substrate-specificity determination for MAP kinases. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 448-453.

454. Sheridan,D.L., Kong,Y., Parker,S.A., Dalby,K.N., and Turk,B.E. (2008). Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J. Biol. Chem.*, **283**, 19511-19520.
455. Sherman,F., Fink,G.R., and Hicks,J.B. (1986). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
456. Shi,Y. (2009). Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. *Cell.*, **139**, 468-484.
457. Shim,E. and Park,S.H. (2014). Identification of a novel Ser/Thr protein phosphatase Ppq1 as a negative regulator of mating MAP kinase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **443**, 252-258.
458. Shitamukai,A., Hirata,D., Sonobe,S., and Miyakawa,T. (2004). Evidence for antagonistic regulation of cell growth by the calcineurin and high osmolarity glycerol pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **279**, 3651-3661.
459. Shock,T.R., Thompson,J., Yates,J.R., III, and Madhani,H.D. (2009). Hog1 mitogen-activated protein kinase (MAPK) interrupts signal transduction between the Kss1 MAPK and the Tec1 transcription factor to maintain pathway specificity. *Eukaryot. Cell.*, **8**, 606-616.
460. Shu,Y., Yang,H., Hallberg,E., and Hallberg,R. (1997). Molecular genetic analysis of Rts1p, a B' regulatory subunit of *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 3242-3253.
461. Sia,R.A., Herald,H.A., and Lew,D.J. (1996). Cdc28 tyrosine phosphorylation and the morphogenesis checkpoint in budding yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **7**, 1657-1666.
462. Sikorski,R.S. and Hieter,P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
463. Slack,D.N., Seternes,O.M., Gabrielsen,M., and Keyse,S.M. (2001). Distinct binding determinants for ERK2/p38alpha and JNK map kinases mediate catalytic activation and substrate selectivity of map kinase phosphatase-1. *J. Biol. Chem.*, **276**, 16491-16500.
464. Slessareva,J.E. and Dohlman,H.G. (2006). G protein signaling in yeast: New components, new connections, new compartments. *Science*, **314**, 1412-1413.
465. Small,G.W., Shi,Y.Y., Higgins,L.S., and Orlowski,R.Z. (2007). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is a mediator of breast cancer chemoresistance. *Cancer Res.*, **67**, 4459-4466.
466. Sneddon,A.A., Cohen,P.T., and Stark,M.J. (1990). *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *EMBO J.*, **9**, 4339-4346.
467. Sohaskey,M.L. and Ferrell,J.E., Jr. (2002). Activation of p42 mitogen-activated protein kinase (MAPK), but not c-Jun NH(2)-terminal kinase, induces phosphorylation and stabilization of MAPK phosphatase XCL100 in *Xenopus oocytes*. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 454-468.
468. 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.
469. Soriano-Carot,M., Bano,M.C., and Igual,J.C. (2012). The yeast mitogen-activated protein kinase Slt2 is involved in the cellular response to genotoxic stress. *Cell Div.*, **7**, 1-7.
470. Soriano-Carot,M., Quilis,I., Bano,M.C., and Igual,J.C. (2014). Protein kinase C controls activation of the DNA integrity checkpoint. *Nucleic Acids Res.*, **42**, 7084-7095.
471. Sotelo,J. and Rodriguez-Gabriel,M.A. (2006). Mitogen-activated protein kinase Hog1 is essential for the response to arsenite in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot. Cell.*, **5**, 1826-1830.
472. 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.
473. Stanger,K., Gorelik,M., and Davidson,A.R. (2012). Yeast adaptor protein, Nbp2p, is conserved regulator of fungal Ptc1p phosphatases and is involved in multiple signaling pathways. *J. Biol. Chem.*, **287**, 22133-22141.
474. Stark,M.J. (1996). Yeast protein serine/threonine phosphatases: multiple roles and diverse regulation. *Yeast*, **12**, 1647-1675.
475. Stathopoulos,A.M. and Cyert,M.S. (1997). Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.*, **11**, 3432-3444.
476. Stevenson,B.J., Rhodes,N., Errede,B., and Sprague,G.F., Jr. (1992). Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev.*, **6**, 1293-1304.
477. Strickfaden,S.C., Winters,M.J., Ben Ari,G., Lamson,R.E., Tyers,M., and Pryciak,P.M. (2007). A mechanism for cell-cycle regulation of MAP kinase signaling in a yeast differentiation pathway. *Cell.*, **128**, 519-531.
478. Su,P.H., Lin,Y.W., Huang,R.L., Liao,Y.P., Lee,H.Y., Wang,H.C., Chao,T.K., Chen,C.K., Chan,M.W., Chu,T.Y., Yu,M.H., and Lai,H.C. (2013). Epigenetic silencing of PTPRR activates MAPK signaling, promotes metastasis and serves as a biomarker of invasive cervical cancer. *Oncogene.*, **32**, 15-26.
479. Sugiura,R., Toda,T., Shuntoh,H., Yanagida,M., and Kuno,T. (1998). pmp1+, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.*, **17**, 140-148.

480. Sugiyama,M., Nugroho,S., Iida,N., Sakai,T., Kaneko,Y., and Harashima,S. (2011). Genetic interactions of ribosome maturation factors Yvh1 and Mrt4 influence mRNA decay, glycogen accumulation, and the expression of early meiotic genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem.*, **150**, 103-111.
481. Suh,M.H., Ye,P., Zhang,M., Hausmann,S., Shuman,S., Gnatt,A.L., and Fu,J. (2005). Fcp1 directly recognizes the C-terminal domain (CTD) and interacts with a site on RNA polymerase II distinct from the CTD. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **102**, 17314-17319.
482. Swayne,T.C., Zhou,C., Boldogh,I.R., Charalel,J.K., McFaline-Figueroa,J.R., Thoms,S., Yang,C., Leung,G., McInnes,J., Erdmann,R., and Pon,L.A. (2011). Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Curr. Biol.*, **21**, 1994-1999.
483. Taberner,L., Aricescu,A.R., Jones,E.Y., and Szedlacsek,S.E. (2008). Protein tyrosine phosphatases: structure-function relationships. *FEBS J.*, **275**, 867-882.
484. Takekawa,M., Adachi,M., Nakahata,A., Nakayama,I., Itoh,F., Tsukuda,H., Taya,Y., and Imai,K. (2000). p53-inducible wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J.*, **19**, 6517-6526.
485. Takekawa,M., Maeda,T., and Saito,H. (1998). Protein phosphatase 2C $\alpha$  inhibits the human stress-responsive p38 and JNK MAPK pathways. *EMBO J.*, **17**, 4744-4752.
486. Tamura,S., Hanada,M., Ohnishi,M., Katsura,K., Sasaki,M., and Kobayashi,T. (2002). Regulation of stress-activated protein kinase signaling pathways by protein phosphatases. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 1060-1066.
487. Tan,S.X., Teo,M., Lam,Y.T., Dawes,I.W., and Perrone,G.G. (2009). Cu, Zn superoxide dismutase and NADP(H) homeostasis are required for tolerance of endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.*, **20**, 1493-1508.
488. Tan-Wong,S.M., Zaugg,J.B., Camblong,J., Xu,Z., Zhang,D.W., Mischo,H.E., Ansari,A.Z., Luscombe,N.M., Steinmetz,L.M., and Proudfoot,N.J. (2012). Gene loops enhance transcriptional directionality. *Science.*, **338**, 671-675.
489. Tanigawa,M., Kihara,A., Terashima,M., Takahara,T., and Maeda,T. (2012). Sphingolipids regulate the yeast high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol. Cell Biol.*, **32**, 2861-2870.
490. Tanoue,T., Adachi,M., Moriguchi,T., and Nishida,E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.*, **2**, 110-116.
491. Tanoue,T., Maeda,R., Adachi,M., and Nishida,E. (2001). Identification of a docking groove on ERK and p38 MAP kinases that regulates the specificity of docking interactions. *EMBO J.*, **20**, 466-479.
492. Tanoue,T., Moriguchi,T., and Nishida,E. (1999). Molecular cloning and characterization of a novel dual specificity phosphatase, MKP-5. *J. Biol. Chem.*, **274**, 19949-19956.
493. Tanoue,T. and Nishida,E. (2002). Docking interactions in the mitogen-activated protein kinase cascades. *Pharmacol. Ther.*, **93**, 193-202.
494. Tanoue,T. and Nishida,E. (2003). Molecular recognitions in the MAP kinase cascades. *Cell Signal.*, **15**, 455-462.
495. Tatebayashi,K., Takekawa,M., and Saito,H. (2003). A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J.*, **22**, 3624-3634.
496. Tatebayashi,K., Tanaka,K., Yang,H.Y., Yamamoto,K., Matsushita,Y., Tomida,T., Imai,M., and Saito,H. (2007). Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J.*, **26**, 3521-3533.
497. Tatebayashi,K., Yamamoto,K., Tanaka,K., Tomida,T., Maruoka,T., Kasukawa,E., and Saito,H. (2006). Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.*, **25**, 3033-3044.
498. Tautz,L., Pellecchia,M., and Mustelin,T. (2006). Targeting the PTPome in human disease. *Expert. Opin. Ther. Targets.*, **10**, 157-177.
499. Theodosiou,A. and Ashworth,A. (2002). MAP kinase phosphatases. *Genome Biol.*, **3**, REVIEWS3009.
500. Thorsen,M., Di,Y., Tangemo,C., Morillas,M., Ahmadvour,D., Van der,D.C., Wagner,A., Johansson,E., Boman,J., Posas,F., Wysocki,R., and Tamas,M.J. (2006). The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Mol. Biol. Cell.*, **17**, 4400-4410.
501. Todd,J.L., Rigas,J.D., Rafty,L.A., and Denu,J.M. (2002). Dual-specificity protein tyrosine phosphatase VHR down-regulates c-Jun N-terminal kinase (JNK). *Oncogene.*, **21**, 2573-2583.
502. Todd,J.L., Tanner,K.G., and Denu,J.M. (1999). Extracellular regulated kinases (ERK) 1 and ERK2 are authentic substrates for the dual-specificity protein-tyrosine phosphatase VHR. A novel role in down-regulating the ERK pathway. *J. Biol. Chem.*, **274**, 13271-13280.
503. Tonks,N.K. and Neel,B.G. (1996). From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases. *Cell*, **87**, 365-368.
504. Tonks,N.K. and Neel,B.G. (2001). Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 182-195.

505. 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.
506. Truckses,D.M., Bloomekatz,J.E., and Thorner,J. (2006). The RA domain of Ste50 adaptor protein is required for delivery of Ste11 to the plasma membrane in the filamentous growth signaling pathway of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 912-928.
507. Truckses,D.M., Garrenton,L.S., and Thorner,J. (2004). Jekyll and Hyde in the microbial world. *Science.*, **306**, 1509-1511.
508. Trueheart,J., Boeke,J.D., and Fink,G.R. (1987). Two genes required for cell fusion during yeast conjugation: evidence for a pheromone-induced surface protein. *Mol. Cell Biol.*, **7**, 2316-2328.
509. Truman,A.W., Kim,K.Y., and Levin,D.E. (2009). Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol. Cell Biol.*, **29**, 6449-6461.
510. Truman,A.W., Millson,S.H., Nuttall,J.M., King,V., Mollapour,M., Prodromou,C., Pearl,L.H., and Piper,P.W. (2006). Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of the Hsp90 chaperone that complements loss of the Sit2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot. Cell*, **5**, 1914-1924.
511. Uetz,P., Giot,L., Cagney,G., Mansfield,T.A., Judson,R.S., Knight,J.R., Lockshon,D., Narayan,V., Srinivasan,M., Pochart,P., Qureshi-Emili,A., Li,Y., Godwin,B., Conover,D., Kalbfleisch,T., Vijayadmodar,G., Yang,M., Johnston,M., Fields,S., and Rothberg,J.M. (2000). A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-627.
512. Vadaie,N., Dionne,H., Akajagbor,D.S., Nickerson,S.R., Krysan,D.J., and Cullen,P.J. (2008). Cleavage of the signaling mucin Msb2 by the aspartyl protease Yps1 is required for MAPK activation in yeast. *J. Cell Biol.*, **181**, 1073-1081.
513. van Drogen,F. and Peter,M. (2002). Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr. Biol.*, **12**, 1698-1703.
514. van Drogen,F., Stucke,V.M., Jorritsma,G., and Peter,M. (2001). MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 1051-1059.
515. van Zyl,W., Huang,W., Sneddon,A.A., Stark,M., Camier,S., Werner,M., Marck,C., Sentenac,A., and Broach,J.R. (1992). Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 4946-4959.
516. van,W.S., Kemmeren,P., Lijnzaad,P., Margaritis,T., Benschop,J.J., de,C., I, van,L.D., Groot Koerkamp,M.J., Ko,C.W., Miles,A.J., Brabers,N., Brok,M.O., Lenstra,T.L., Fiedler,D., Fokkens,L., Aldecoa,R., Apweiler,E., Taliadouros,V., Sameith,K., van de Pasch,L.A., van,H., Sr., Bakker,L.V., Krogan,N.J., Snel,B., and Holstege,F.C. (2010). Functional overlap and regulatory links shape genetic interactions between signaling pathways. *Cell*, **143**, 991-1004.
517. Vaughan,C.K., Mollapour,M., Smith,J.R., Truman,A., Hu,B., Good,V.M., Panaretou,B., Neckers,L., Clarke,P.A., Workman,P., Piper,P.W., Prodromou,C., and Pearl,L.H. (2008). Hsp90-dependent activation of protein kinases is regulated by chaperone-targeted dephosphorylation of Cdc37. *Mol. Cell.*, **31**, 886-895.
518. 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.
519. Vicent,S., Garayoa,M., Lopez-Picazo,J.M., Lozano,M.D., Toledo,G., Thunnissen,F.B., Manzano,R.G., and Montuenga,L.M. (2004). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is overexpressed in non-small cell lung cancer and is an independent predictor of outcome in patients. *Clin. Cancer Res.*, **10**, 3639-3649.
520. 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.
521. Vincent,A., Newnam,G., and Liebman,S.W. (1994). The yeast translational allosuppressor, SAL6: a new member of the PP1-like phosphatase family with a long serine-rich N-terminal extension. *Genetics.*, **138**, 597-608.
522. Virshup,D.M. and Shenolikar,S. (2009). From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover. *Mol. Cell.*, **33**, 537-545.
523. Vogelsberg-Ragaglia,V., Schuck,T., Trojanowski,J.Q., and Lee,V.M. (2001). PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp. Neurol.*, **168**, 402-412.
524. Wai,S.C., Gerber,S.A., and Li,R. (2009). Multisite phosphorylation of the guanine nucleotide exchange factor Cdc24 during yeast cell polarization. *PLoS. One.*, **4**, e6563.
525. Wandinger,S.K., Suhre,M.H., Wegele,H., and Buchner,J. (2006). The phosphatase Ppt1 is a dedicated regulator of the molecular chaperone Hsp90. *EMBO J.*, **25**, 367-376.

526. Wang,S., Tabernero,L., Zhang,M., Harms,E., Van Etten,R.L., and Stauffacher,C.V. (2000). Crystal structures of a low-molecular weight protein tyrosine phosphatase from *Saccharomyces cerevisiae* and its complex with the substrate p-nitrophenyl phosphate. *Biochemistry*, **39**, 1903-1914.
527. Wang,W. and Malcolm,B.A. (1999). Two-stage PCR protocol allowing introduction of multiple mutations, deletions and insertions using QuikChange Site-Directed Mutagenesis. *Biotechniques*, **26**, 680-682.
528. Wang,W.Q., Sun,J.P., and Zhang,Z.Y. (2003). An overview of the protein tyrosine phosphatase superfamily. *Curr. Top. Med. Chem.*, **3**, 739-748.
529. Wang,Y., Abu,I.A., Ayalew,M., and Suntay,K. (2009). Sumoylation of transcription factor Tec1 regulates signaling of mitogen-activated protein kinase pathways in yeast. *PLoS. One.*, **4**, e7456.
530. Wang,Y., Chen,W., Simpson,D.M., and Elion,E.A. (2005). Cdc24 regulates nuclear shuttling and recruitment of the Ste5 scaffold to a heterotrimeric G protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **280**, 13084-13096.
531. Wang,Z., Xu,J., Zhou,J.Y., Liu,Y., and Wu,G.S. (2006). Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 is required for cisplatin resistance. *Cancer Res.*, **66**, 8870-8877.
532. 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.
533. Watanabe,Y., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995). Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Sit2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 5740-5749.
534. 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 (Sit2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 2615-2623.
535. Westfall,P.J., Patterson,J.C., Chen,R.E., and Thorner,J. (2008). Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **105**, 12212-12217.
536. Westfall,P.J. and Thorner,J. (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. *Eukaryot. Cell.*, **5**, 1215-1228.
537. Whelan,J.T., Hollis,S.E., Cha,D.S., Asch,A.S., and Lee,M.H. (2012). Post-transcriptional regulation of the Ras-ERK/MAPK signaling pathway. *J. Cell Physiol.*, **227**, 1235-1241.
538. Whinston,E., Omerza,G., Singh,A., Tio,C.W., and Winter,E. (2013). Activation of the Smk1 mitogen-activated protein kinase by developmentally regulated autophosphorylation. *Mol. Cell Biol.*, **33**, 688-700.
539. Whisenant,T.C., Ho,D.T., Benz,R.W., Rogers,J.S., Kaake,R.M., Gordon,E.A., Huang,L., Baldi,P., and Bardwell,L. (2010). Computational prediction and experimental verification of new MAP kinase docking sites and substrates including Gli transcription factors. *PLoS. Comput. Biol.*, **6**, e1000908.
540. Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.*, **79**, 143-180.
541. Wiget,P., Shimada,Y., Butty,A.C., Bi,E., and Peter,M. (2004). Site-specific regulation of the GEF Cdc24p by the scaffold protein Far1p during yeast mating. *EMBO J.*, **23**, 1063-1074.
542. Williams-Hart,T., Wu,X., and Tatchell,K. (2002). Protein phosphatase type 1 regulates ion homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **160**, 1423-1437.
543. Wilsbacher,J.L., Juang,Y.C., Khokhlatchev,A.V., Gallagher,E., Binns,D., Goldsmith,E.J., and Cobb,M.H. (2006). Characterization of mitogen-activated protein kinase (MAPK) dimers. *Biochemistry*, **45**, 13175-13182.
544. 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.
545. Winters,M.J., Lamson,R.E., Nakanishi,H., Neiman,A.M., and Pryciak,P.M. (2005). A membrane binding domain in the ste5 scaffold synergizes with gbetagamma binding to control localization and signaling in pheromone response. *Mol. Cell*, **20**, 21-32.
546. Withee,J.L., Mulholland,J., Jeng,R., and Cyert,M.S. (1997). An essential role of the yeast pheromone-induced Ca<sup>2+</sup> signal is to activate calcineurin. *Mol. Biol. Cell.*, **8**, 263-277.
547. Witzel,F., Maddison,L., and Bluthgen,N. (2012). How scaffolds shape MAPK signaling: what we know and opportunities for systems approaches. *Front Physiol.*, **3**, 475.
548. Wu,C., Jansen,G., Zhang,J., Thomas,D.Y., and Whiteway,M. (2006a). Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev.*, **20**, 734-746.
549. Wu,Q., Huang,S., Sun,Y., Gu,S., Lu,F., Dai,J., Yin,G., Sun,L., Zheng,D., Dou,C., Feng,C., Ji,C., Xie,Y., and Mao,Y. (2006b). Dual specificity phosphatase 18, interacting with SAPK, dephosphorylates SAPK and inhibits SAPK/JNK signal pathway in vivo. *Front Biosci.*, **11**, 2714-2724.
550. Wurgler-Murphy,S.M., Maeda,T., Witten,E.A., and Saito,H. (1997). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Mol. Cell Biol.*, **17**, 1289-1297.

551. Xu,B., Wilsbacher,J.L., Collisson,T., and Cobb,M.H. (1999). The N-terminal ERK-binding site of MEK1 is required for efficient feedback phosphorylation by ERK2 in vitro and ERK activation in vivo. *J. Biol. Chem.*, **274**, 34029-34035.
552. Yamamoto,K., Tatebayashi,K., Tanaka,K., and Saito,H. (2010). Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol. Cell.*, **40**, 87-98.
553. Yang,H.Y., Tatebayashi,K., Yamamoto,K., and Saito,H. (2009). Glycosylation defects activate filamentous growth Kss1 MAPK and inhibit osmoregulatory Hog1 MAPK. *EMBO J.*, **28**, 1380-1391.
554. Yano,K., Uesono,Y., Yoshida,S., Kikuchi,A., Kashiwazaki,J., Mabuchi,I., and Kikuchi,Y. (2013). Mih1/Cdc25 is negatively regulated by Pkc1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Cells.*, **18**, 425-441.
555. Yenush,L., Mulet,J.M., Ariño,J., and Serrano,R. (2002). The Ppz protein phosphatases are key regulators of K<sup>+</sup> and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.*, **21**, 920-929.
556. Yeo,H.K. and Lee,J.Y. (2009). Crystal structure of *Saccharomyces cerevisiae* Ygr203w, a homolog of single-domain rhodanese and Cdc25 phosphatase catalytic domain. *Proteins.*, **76**, 520-524.
557. Yoon,S. and Seger,R. (2006). The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth Factors.*, **24**, 21-44.
558. Young,C., Mapes,J., Hanneman,J., Al Zarban,S., and Ota,I. (2002). Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryot. Cell*, **1**, 1032-1040.
559. Yu,L., Qi,M., Sheff,M.A., and Elion,E.A. (2008). Counteractive control of polarized morphogenesis during mating by mitogen-activated protein kinase Fus3 and G1 cyclin-dependent kinase. *Mol. Biol. Cell.*, **19**, 1739-1752.
560. Yuzyuk,T., Foehr,M., and Amberg,D.C. (2002). The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2869-2880.
561. Zabrocki,P., Van Hoof,C., Goris,J., Thevelein,J.M., Winderickx,J., and Wera,S. (2002). Protein phosphatase 2A on track for nutrient-induced signalling in yeast. *Mol. Microbiol.*, **43**, 835-842.
562. Zalatan,J.G., Coyle,S.M., Rajan,S., Sidhu,S.S., and Lim,W.A. (2012). Conformational control of the Ste5 scaffold protein insulates against MAP kinase misactivation. *Science.*, **337**, 1218-1222.
563. Zarrinpar,A., Bhattacharyya,R.P., Nittler,M.P., and Lim,W.A. (2004). Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol. Cell.*, **14**, 825-832.
564. Zarzov,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.
565. Zhan,X.L., Deschenes,R.J., and Guan,K.L. (1997). Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, **11**, 1690-1702.
566. Zhan,X.L. and Guan,K.L. (1999). A specific protein-protein interaction accounts for the in vivo substrate selectivity of Ptp3 towards the Fus3 MAP kinase. *Genes Dev.*, **13**, 2811-2827.
567. Zhang,D.W., Mosley,A.L., Ramisetty,S.R., Rodriguez-Molina,J.B., Washburn,M.P., and Ansari,A.Z. (2012). Ssu72 phosphatase-dependent erasure of phospho-Ser7 marks on the RNA polymerase II C-terminal domain is essential for viability and transcription termination. *J. Biol. Chem.*, **287**, 8541-8551.
568. Zhang,J., Zhou,B., Zheng,C.F., and Zhang,Z.Y. (2003). A bipartite mechanism for ERK2 recognition by its cognate regulators and substrates. *J. Biol. Chem.*, **278**, 29901-29912.
569. Zhang,Y. and Dong,C. (2007). Regulatory mechanisms of mitogen-activated kinase signaling. *Cell Mol. Life Sci.*, **64**, 2771-2789.
570. Zhang,Y.Y., Wu,J.W., and Wang,Z.X. (2011). A distinct interaction mode revealed by the crystal structure of the kinase p38alpha with the MAPK binding domain of the phosphatase MKP5. *Sci. Signal.*, **4**, ra88.
571. Zhang,Z.Y., Wang,Y., and Dixon,J.E. (1994). Dissecting the catalytic mechanism of protein-tyrosine phosphatases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 1624-1627.
572. Zhao,C., Jung,U.S., Garrett-Engele,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.
573. Zhao,Z.S., Leung,T., Manser,E., and Lim,L. (1995). Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 5246-5257.
574. Zhou,B., Wang,Z.X., Zhao,Y., Brautigan,D.L., and Zhang,Z.Y. (2002). The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases. *J. Biol. Chem.*, **277**, 31818-31825.
575. Zhou,B., Zhang,J., Liu,S., Reddy,S., Wang,F., and Zhang,Z.Y. (2006). Mapping ERK2-MKP3 binding interfaces by hydrogen/deuterium exchange mass spectrometry. *J. Biol. Chem.*, **281**, 38834-38844.
576. Zuñiga,A., Torres,J., Ubeda,J., and Pulido,R. (1999). Interaction of mitogen-activated protein kinases with the kinase interaction motif of the tyrosine phosphatase PTP-SL provides substrate specificity and retains ERK2 in the cytoplasm. *J. Biol. Chem.*, **274**, 21900-21907.



# Anexo

---



Los siguientes artículos publicados se han derivado del trabajo experimental realizado en esta Tesis Doctoral:

- Palacios,L., Dickinson,R.J., **Sacristan-Reviriego,A.**, Didmon,M.P., Marin,M.J., Martin,H., Keyse,S.M., and Molina,M. (2011). Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, 286, 42037-42050.
- **Sacristan-Reviriego,A.**, Madrid,M., Cansado,J., Martin,H., and Molina,M. (2014). A conserved non-canonical docking mechanism regulates the binding of dual specificity phosphatases to cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in budding and fission yeasts. *PLoS. One.*, 9, e85390.

Los siguientes manuscritos enviados a publicación se han derivado del trabajo experimental realizado en esta tesis:

- **Sacristán-Reviriego,A.**, Martin,H., and Molina,M. Identification of putative negative regulators of yeast signaling through a screening for protein phosphatases acting on Cell Wall Integrity and Mating MAPKs pathways.
- Tatjer,L., **Sacristán-Reviriego,A.**, Casado,C., González,A., Rodríguez-Porrata,B., Palacios,L., Martin,H., Molina,M., and Ariño,A. The yeast Ptc1 protein phosphatase regulates a variety of cellular functions by targeting the Mkk1 kinase.

Otros artículos publicados:

- Roma-Mateo,C., **Sacristan-Reviriego,A.**, Beresford,N.J., Caparros-Martin,J.A., Culiñez-Macia,F.A., Martin,H., Molina,M., Tabernero,L., and Pulido,R. (2011). Phylogenetic and genetic linkage between novel atypical dual-specificity phosphatases from non-metazoan organisms. *Mol. Genet. Genomics.*, **285**, 341-354.