

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**

**ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA
BIOSÍNTESIS DE LA PARED CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*.
CARACTERIZACIÓN DEL GEN *PST1*.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por:

M^a Mercedes Pardo Calvo

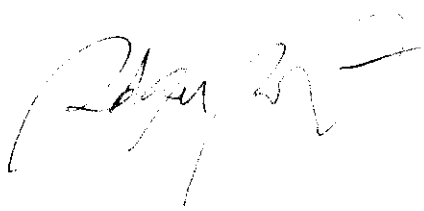
Directores: **Dr. César Nombela Cano**
Dra. Concepción Gil García

Madrid, Enero de 2000

DON RAFAEL ROTGER ANGLADA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que Dña. M^a Mercedes Pardo Calvo ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Dres. César Nombela Cano y Concepción Gil García, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia, con el título: “Análisis e identificación de proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Caracterización del gen *PST1*.”

Y para que conste firmo la presente certificación en Madrid, a 14 de Enero de 2000.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Rafael Rotger Anglada', with a stylized flourish at the end.

Fdo.: Dr. Rafael Rotger Anglada

A mis padres y a Bea

Y por fin, ya más tranquila, desde aquí quiero dar las gracias a todos aquéllos que me habéis acompañado y ayudado durante estos cuatro años.

Quiero agradecer al Dr. César Nombela haberme permitido formar parte del Departamento para realizar la Tesis Doctoral, dándome la oportunidad de trabajar en investigación, como siempre había deseado, y su consejo y apoyo en todo momento.

Gracias, Concha, porque además de directora has sido una amiga. Gracias por tu constante ilusión por este trabajo, por tu comprensión, por tu inagotable optimismo y ánimo, que me hacían seguir adelante incluso cuando todo parecía perdido. Gracias, porque sin tu don de gentes y capacidad para las relaciones sociales, gran parte de este trabajo no habría sido posible.

Lucía me introdujo en el difícil arte de los protoplastos y las bidimensionales. Muchas gracias por enseñarme ésas y muchas otras cosas, por tu constante interés y disponibilidad, por esos experimentos compartidos, y por tu simpatía.

Quiero agradecer también especialmente a los Dres. María Molina y Jesús Plá su interés e implicación en este trabajo. Gracias, Jesús, por esa idea peregrina que nos facilitó tantísimo las cosas. Gracias también a los Dres. Rafael Rotger, Miguel Sánchez y Javier Arroyo, por estar siempre disponibles para cualquier consulta.

El estupendo ambiente que he respirado durante estos años en la Unidad 3 va a ser difícil de superar. Hasta habéis conseguido que un duro día de "protoplastear" no fuera tan malo después de todo. Txema, por esas tardes (itardel!) de música clásica bien alta; Cris, que has conseguido arrancarme de la poyata para arrastrarme por cuevas, ríos y montañas; Paloma, porque contigo yo también aprendí muchísimo; Víctor, con su genial sentido del humor; Javi, mi invasivo compañero de mesa, a quien pronto estaré echando de menos un montón (¡espero disfrutar de alguna tapa en Salamanca!); Humber, por tener solución y consejo para todo; Inma, por tu dulzura y simpatía, y tu estupenda organización (¡desde que te fuiste estamos desmadrados!); Julio, con sus inacabables conocimientos sobre cualquier cosa; Marga, por tu ayuda discreta que nos facilita muchísimo la vida; María Soler, por esas escapadas de última hora al cine, siempre corriendo, tardes de ballet, exposiciones...; Aida, compañera de fatigas con los protoplastos; y cómo no, Marta, nueva socia del club e incansable instigadora de juergas de jueves (¡prometo apuntarme a alguna más a partir de ahora!). Y a las últimas generaciones, María, Raquel, e Isabel, por infundirnos nueva energía. También quiero recordar desde aquí con especial cariño a Christelle y a Lubi, que a pesar de su corta visita se convirtieron en excelentes amigas.

A nuestras vecinas de la Unidad 4, en recuerdo de nuestro infatigable intercambio de llamadas telefónicas: Rosa, Inma, Rosalía, Gloria (¡infinitas gracias por tu ayuda!), Carmina y Pilar.

A las "bacterias", Isabel, por estar siempre dispuesta para un ratito de charla; M^a Angeles, por aquellos "pensamientos del día"; Mada y Teresa.

Y en la Unidad 6, a las inmunólogas Gema, Maite y Mariví, que de vez en cuando nos recuerdan que el mundo científico no se reduce a las levaduras, y a los que, aunque no os tengamos en la Unidad 3, casi, casi sois hijos adoptivos: a Jose, sufridor como yo de la escondida función de una proteína de pared; y Javier (para bien o para mal, siempre hay alguien que está peor que nosotros!).

No puedo olvidarme de "los del piso de abajo", que me han acogido en los días de protoplastos, prestándome mechero, poyata, y sobre todo, ánimo y compañía: Fede, gracias por resolver incansable nuestros problemas informáticos, Anabel, Rebeca, Carmen, M^a Luisa, M^a Angeles, Blanca (la otra jueguista!), Ricardo, Elvira; y Mar (aunque ya no estés abajo), gracias por proveernos de todo lo que necesitamos y por aguantar todas nuestras peticiones.

Quiero dar las gracias también a otras profesoras de la casa, Angelines, Carmen y Conchita, por acercarnos de vez en cuando a la Microbiología clásica. Y a los Centros de Secuenciación y de Citometría, aunque no he tenido oportunidad de utilizar sus trabajos con frecuencia, sí he tenido ocasión de disfrutar de las sonrisas de sus miembros, Maribel y Rosita, y Amalia, Fernando, y Alberto, al que tengo que agradecer sus consejos en los experimentos de localización.

Tampoco quiero dejar de mencionar a otras personas sin cuya colaboración no sé qué haríamos: Benito, gracias por esos piropos matutinos, que me hacían empezar el día con ganas; Jose Alberto, por arreglar con paciencia todo lo que nosotros íbamos estropeando; y a Paqui, por su inagotable alegría.

I would also like to thank Dr. Walter Blackstock for collaborating in this work, for making available to us an extraordinarily powerful technology, and for welcoming me in his lab at GlaxoWellcome Research and Development (Stevenage). Many thanks to Malcom Ward, who taught me all I know on mass spectrometry, for dedicating to me and my work plenty of your time, and for all your efforts on our "resistant-to-identification" silver-stained spots! Thanks to Satty Bains for bringing hope back to us when you carried out the analysis on the first batch of spots. Many thanks also to the other members of the lab for your all their help.

And last, but not least, I would like to thank Dr. Howard Bussey for welcoming me in his lab at McGill University. The months I spent in Montreal have been incredibly enriching, both at the scientific and personal level, and some of the happiest times during my PhD. Many thanks specially to Marc (and María and Sam, of course) for treating me as part of your family, and for the gastronomic tour of the world (*J'espère vous faire le tour de la cuisine espagnole un jour!*); Peter, for all your teachings, advice and concern, and for being an incredible example of a great researcher, and Christine, to whom I owe my first experience with *sushi*; Troy, for your kidding, your slang lessons, and a wonderful last day in Montreal!; Robin, the warmest smile in the lab, and Dava, for all those Saturday evenings at the cinema or at your place; John (great birthday party!); Anne Marie, for all your help; Terry, for sharing with me your findings on "our" *PSTI*; Serge, Josh, Patrick, Steeve, and Pedro. Thank you guys for being real friends and making me feel at home! I still miss Fridays' breakfasts, Fridays' beers and Sundays' hockey games... Go Copaholics! I hope to see you all again some day.

No quiero dejar de mencionar a otras personas que desde fuera del laboratorio me han apoyado. A todas mis amigas, y especialmente a Julia, por acompañarme en los tiempos duros en tantas comidas, y a Ana, con quien, por estar en la misma situación, me he desahogado de las frustraciones de este trabajo, pero también he compartido muchas satisfacciones. Y cómo no, a mis padres, por su empeño en entender lo que estaba haciendo en el laboratorio (con seminario de pizarra incluido), por su confianza en todas mis decisiones y por aguantarme estos últimos días, y a Bea, por ser la mejor hermana del mundo. Gracias a todos por haberme hecho disfrutar estos cuatro años.

"My dear fellow", said Sherlock Holmes, "life is infinitely stranger than anything which the mind of man could invent. If we could fly out of that window and hover over this great city, gently remove the roofs, and peep in at the queer things which are going on, the strange coincidences, the plannings, the cross-purposes, the wonderful chain of events, working through generations, and leading to the most outré results, it would make all fiction with its conventionalities and foreseen conclusions most stale and unprofitable."

*Sir A. C. Doyle.
The Complete Sherlock Holmes. London, 1930.*

ABREVIATURAS

2D-PAGE	electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida
A	amperios
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
AMP	adenosín monofosfato
cAMP	adenosín monofosfato
CAPS	ácido 3-[ciclohexilamino]-1-propanosulfónico
CHAPS	3-[(3-colamidopropil) dimetilamonio]-1-propanosulfonato
CID	disociación inducida por colisión
cm	centímetros
D.O.	densidad óptica
Da	daltons
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTE	ditioeritritol
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etilén diamino tetracético
EM	espectrometría de masas
Endo-H	endo- <i>N</i> -acetilglucosaminidasa H
erg	ergios
ESI	ionización mediante electrospray
g	gramos
GAP	<i>GTPase activating protein</i>
GAPDH	gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
GDP	guanosín difosfato
GEF	<i>GDP/GTP exchange factor</i>
GPI	glicosilfosfatidil inositol
GTP	guanosín trifosfato
GTPasa	guanosín trifosfatasa
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IEF	isoelectroenfoque
IPG	gradiente de pH inmovilizado
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
kVh	kilovoltios hora
l	litros
LC	cromatografía líquida
M	molar
m	masa
mA	miliamperios
MALDI	ionización por desorción con láser asistida por matriz
MAP	proteína activada por mitógenos
MAPK	proteín kinasa de proteínas activadas por mitógenos
MetOX	metionina oxidada
mg	miligramos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
MS	espectrometría de masas
MS/MS	espectrometría de masas en tandem
Mw	peso molecular
µg	microgramos

μl	microlitros
μm	micrómetros
nm	nanómetros
nmol	nanomoles
ORF	marco abierto de lectura
p-	<i>para-</i>
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pI	punto isoelectrico
PMSF	fluoruro de fenil metil sulfonato
Pst1p-myc	Proteína Pst1p marcada con seis copias en tandem del epítopo c-myc
ppm	partes por millón
PVDF	difluoruro de polivinilideno
rpm	revoluciones por minuto
SBF	<i>SCB-binding factor</i>
SDS	dodecil sulfato sódico
TBS	tris borato salino
TFA	ácido trifluoroacético
TOF	tiempo de vuelo
UDP	uridín difosfato
UV	ultravioleta
V	voltios
Vh	voltios hora
z	carga
°C	grados centígrados

CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS

Ala	A	Alanina
Arg	R	Arginina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Ácido aspártico
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Ácido glutámico
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Ile	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	M	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Trp	W	Triptófano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

ÍNDICE

ÍNDICE

ÍNDICE	1
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	5
INTRODUCCIÓN	7
I. LA PARED CELULAR DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1. Introducción	9
2. Composición y organización molecular	9
2.1. β -1,3-glucano. Estructura y enzimología	10
2.2. β -1,6-glucano. Estructura y síntesis	13
2.3. Quitina. Estructura y enzimología	16
2.4. Manoproteínas	18
2.4.1. Proteínas extraíbles con SDS y agentes reductores	18
2.4.2. Proteínas unidas covalentemente a la pared celular	18
2.4.3. Regulación de la expresión de las proteínas de pared	22
3. Organización modular de la pared celular	22
4. Mecanismo compensatorio	23
5. Mantenimiento de la integridad celular. La ruta de MAP kinasas mediada por Pkc1p	24
II. PROTEOMA Y PROTEÓMICA	29
1. Introducción	29
2. Electroforesis bidimensional	29
3. Caracterización de proteínas	31
4. Análisis de proteínas mediante estrategias basadas en la espectrometría de masas	31
4.1. Espectrometría de masas (EM). Fundamentos técnicos	33
4.1.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF	33
4.1.2. Espectrometría de masas con ionización mediante electrospray (ESI MS)	34
4.2. Estrategias de identificación de proteínas mediante EM	34
4.2.1. "Huella" de masas peptídicas	34
4.2.2. Espectrometría de masas en tándem y su aplicación al análisis de secuencias peptídicas	35
5. Aplicaciones	37
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	45
2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO	46
2.1. <i>S. cerevisiae</i>	46
2.2. Adición de compuestos a los medios de cultivo	46
2.3. <i>Escherichia coli</i>	47
3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS	47
3.1. Determinación del crecimiento	47
3.1.1. Turbidimetría	47
3.1.2. Recuento de células	47
3.2. Genética clásica	47
3.2.1. Obtención de diploides	47
3.2.2. Esporulación	48
3.2.3. Disección de ascas	48
3.3. Técnicas de microscopía	48
3.3.1. Microscopía de contraste de fases	48
3.3.2. Microscopía electrónica de barrido	48
3.3.3. Inmunofluorescencia indirecta	49
3.4. Mutagénesis con radiación ultravioleta	49

3.5. Determinación de la sensibilidad a un compuesto mediante la siembra de diluciones en gotas.....	49
3.6. Determinación de la sensibilidad a toxina <i>killer</i>	49
4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	49
4.1. Plásmidos.....	50
4.2. PCR.....	50
4.3. Transformación de DNA.....	50
5. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	53
5.1. Obtención de extractos citoplasmáticos de <i>S. cerevisiae</i>	53
5.2. Obtención de productos de secreción de protoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	53
5.3. Obtención de proteínas de pared de <i>S. cerevisiae</i>	54
5.4. Obtención de proteínas del medio de cultivo.....	54
5.5. Aislamiento de proteínas integrales de membrana.....	54
5.6. Determinación cuantitativa de proteínas.....	54
5.7. Valoración cuantitativa de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo.....	55
5.8. Deglicosilación de proteínas con Endo-H.....	55
5.9. Electroforesis de proteínas.....	55
5.9.1. Electroforesis monodimensional en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).....	55
5.9.2. Electroforesis en condiciones nativas.....	55
5.9.3. Electroforesis bidimensional analítica en gel de poliacrilamida (2D-PAGE).....	56
5.9.4. Electroforesis bidimensional micropreparativa.....	56
5.10. Transferencia de proteínas.....	57
5.10.1. Transferencia en cubeta.....	57
5.10.2. Transferencia semiseca.....	57
5.11. Tinciones de proteínas.....	57
5.11.1. Tinción de geles con plata.....	57
5.11.2. Tinción de membranas con Azul Coomassie.....	58
5.12. Determinación de actividad invertasa en gel.....	58
6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.....	58
6.1. Secuenciación aminoterminal.....	58
6.2. Detección con anticuerpos.....	58
6.3. Espectrometría de masas.....	59
6.3.1. Reducción, alquilación y digestión proteolítica.....	59
6.3.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	60
6.3.3. Espectrometría de masas en tándem mediante nanoelectrospray.....	60
6.3.4. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida.....	61
RESULTADOS.....	63
I. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR PROTOPLASTOS DE <i>S. cerevisiae</i> EN REGENERACIÓN.....	65
1. Obtención de los productos de secreción de protoplastos de <i>S. cerevisiae</i> en regeneración.....	65
2. Control de la lisis celular.....	66
2.1. Valoración cuantitativa de la fosfatasa alcalina.....	66
2.2. Western-blotting con anticuerpos frente a Sec14p y proteínas ribosomales.....	66
3. Análisis de la glucosilación de las proteínas secretadas por protoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	67
4. Obtención de un mapa de proteínas secretadas por protoplastos en un gradiente no lineal de pH de 3 a 10.....	68
4.1. Identificación de las proteínas mediante secuenciación del extremo aminoterminal.....	71
4.2. Identificación de proteínas mediante detección con anticuerpos.....	74
4.3. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	75

5. Obtención de un mapa de proteínas secretadas por protoplastos en un gradiente de pH entre 4 y 7.....	81
5.1. Separación electroforética en un gradiente de pH de 4 a 7.....	81
5.2. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	81
5.2.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF.....	82
5.2.2. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC/MS/MS).....	82
5.2.3. Espectrometría de masas en tándem con ionización mediante nanoelectrospray (ESI/MS/MS).....	88
II. ESTUDIO FUNCIONAL DEL GEN YDR055w/ <i>PST1</i>	95
1. Características de la proteína codificada por el gen YDR055w/ <i>PST1</i>	95
2. Obtención de un mutante de <i>S. cerevisiae</i> delecionado en el gen YDR055w/ <i>PST1</i> ...	96
2.1. Delección del gen y obtención de mutantes <i>pst1Δ::kanMX4</i>	96
2.2. Comprobación de la delección del gen YDR055w en la cepa FY1679-28C.....	97
2.3. Obtención de diploides heterocigóticos y homocigóticos para <i>ydr055wΔ::kanMX4</i>	98
3. Caracterización fenotípica del mutante MY55.....	98
3.1. Crecimiento y morfología celular.....	98
3.2. Sensibilidad a sonicación y lisis a 37°C.....	98
3.3. Sensibilidad a choque térmico.....	99
3.4. Sensibilidad a choque osmótico.....	99
3.5. Sensibilidad a zimoliasa.....	99
3.6. Sensibilidad a calcoflúor y Rojo Congo.....	99
3.7. Sensibilidad a cafeína.....	100
3.8. Sensibilidad a toxina <i>killer</i>	100
3.9. Regeneración de protoplastos en medio sólido.....	100
4. Estudio de las interacciones genéticas entre <i>PST1</i> y genes implicados en la construcción de la pared celular.....	101
5. Estudio de la complementación de la mutación <i>ecm33Δ</i> por el gen <i>PST1</i>	102
6. Análisis fenotípico de los dobles mutantes <i>pst1Δ ecm33Δ</i>	103
6.1. Análisis de la glicosilación de proteínas.....	103
6.2. Análisis de la presencia de componentes de la pared celular en el medio de cultivo.....	103
7. Inmunolocalización de la proteína Pst1p.....	105
7.1. Construcción de Pst1p-myc.....	105
7.2. Análisis de la funcionalidad de Pst1p-myc.....	105
7.3. Localización de Pst1p-myc mediante fraccionamiento celular y Western-blotting.....	107
7.4. Localización de Pst1p-myc mediante inmunofluorescencia indirecta.....	108
III. ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE LA ENOLASA Y LA FRUCTOSA BIFOSFATO ALDOLASA A LA SUPERFICIE CELULAR.....	111
1. Construcción de las proteínas híbridas Eno2-Suc2 y Fba1-Suc2.....	111
2. Determinación de zonas implicadas en la secreción de la enolasa.....	113
3. Análisis de la glicosilación de las proteínas híbridas.....	114
4. Obtención de mutantes afectados en la secreción de la enolasa.....	115
DISCUSIÓN.....	117
I. EL ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR PROTOPLASTOS EN CONDICIONES DE REGENERACIÓN ES UNA HERRAMIENTA ÚTIL PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA PARED CELULAR.....	119
1. Proteínas de pared celular propiamente dichas.....	122
2. Presencia de enzimas glicolíticas en la superficie celular de <i>S. cerevisiae</i>	123
3. Otras proteínas de interés.....	127

II. EL GEN <i>PST1</i> /YDR055w ESTÁ IMPLICADO EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA PARED CELULAR.....	131
CONCLUSIONES	135
BIBLIOGRAFÍA	139
ANEXO	155

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Estructura y composición de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	10
Fig. 2. Ensamblaje de los componentes de la pared celular de <i>S. cerevisiae</i>	11
Fig. 3. Modelo propuesto para la biosíntesis del β -1,6-glucano a lo largo de la ruta de secreción.....	16
Fig. 4. Esquema de las uniones entre las proteínas GPI y Pir y los demás componentes de la pared celular.....	19
Fig. 5. Modelo de ensamblaje de las proteínas GPI a la pared celular.....	20
Fig. 6. Representación de los componentes principales de la ruta mediada por Pkc1p en levaduras.....	25
Fig. 7. Modelo propuesto para la ruta SVG de mantenimiento de la integridad de la pared celular.....	27
Fig. 8. Estrategia general para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas..	32
Fig. 9. Iones más comunes resultantes de la fragmentación de péptidos y su notación.....	36
Fig. 10. Identificación de proteínas mediante <i>sequence tag</i>	36
Fig. 11. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de protoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	66
Fig. 12. Análisis de las proteínas secretadas por protoplastos mediante Western-blotting con anticuerpos frente a Sec14p.....	67
Fig. 13. Análisis mediante Western-blotting de la glucosilación de las proteínas secretadas por protoplastos de <i>S. cerevisiae</i>	68
Fig. 14. Mapa bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos de <i>S. cerevisiae</i> en condiciones de regeneración en medio líquido.....	69
Fig. 15a. Separación electroforética bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos en un gel al 8% en la segunda dimensión.....	77
Fig. 15b. Mapa de referencia (pH 3-10) donde se muestran todas las identificaciones obtenidas.	79
Fig. 16. Separación bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos en un gradiente lineal de pH de 4 a 7.....	83
Fig. 17. Análisis de la mancha proteica nº 3 mediante EM.....	86
Fig. 18. Espectro MALDI-TOF de la mancha proteica nº 10.....	86
Fig. 19. Identificación de manchas proteicas mediante examen visual de los espectros MALDI-TOF.....	87
Fig. 20. Análisis de la mancha nº 27.....	89
Fig. 21. Análisis de la mancha proteica nº 22 mediante EM.....	90
Fig. 22. Identificación de la mancha proteica nº 48.....	91
Fig. 23. Análisis de la mancha nº 47 mediante EM.....	91
Fig. 24. Esquema de la delección del gen <i>PST1</i> con el módulo marcador <i>kanMX4</i>	96
Fig. 25. Comprobación de la correcta delección de <i>PST1</i> mediante PCR.....	97
Fig. 26. Análisis de la complementación de la hipersensibilidad a higromicina B del mutante <i>ecm33Δ</i> por la sobreexpresión de <i>PST1</i>	102
Fig. 27. Detección de la invertasa en gel nativo.....	104
Fig. 28. Análisis de la endoquitinasa Cts1p mediante Western-blotting.....	104
Fig. 29. Análisis de la liberación de componentes de la pared celular al medio de cultivo mediante Western-blotting.....	105
Fig. 30. Marcaje de la proteína Pst1p con el epítipo <i>c-myc</i>	106
Fig. 31. Análisis mediante Western-blotting de la fosforilación de la MAP quinasa Slt2p.....	106
Fig. 32. Análisis de la localización de Pst1p-myc en la pared celular mediante fraccionamiento y Western-blotting.....	107
Fig. 33. Análisis de la localización de Pst1p-myc en membranas mediante fraccionamiento y Western-blotting.....	108
Fig. 34. Localización de Pst1p-myc en la cepa MY55 (<i>pst1Δ</i>) mediante inmunofluorescencia indirecta.....	109
Fig. 35. Construcción de proteínas de fusión con la invertasa.....	112

Fig. 36. Análisis de la complementación de la cepa SS10 (<i>suc2Δ9</i>) por los plásmidos que llevan las distintas construcciones híbridas.....	113
Fig. 37. Esquema de las construcciones génicas utilizadas para acotar zonas necesarias para la exportación de la enolasa.....	114
Fig. 38. Análisis de la <i>N</i> -glicosilación de las proteínas de fusión mediante el tratamiento con EndoH y Western-blotting.....	115
Fig. 39. Esquema de la fermentación alcohólica.....	124

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Mutantes afectados en procesos relacionados con la pared celular que presentan niveles altos de quitina en esta estructura.....	23
Tabla II. Cepas de <i>S. cerevisiae</i> utilizadas en este trabajo.....	45
Tabla III. Plásmidos originales empleados en este trabajo.....	51
Tabla IV. Plásmidos obtenidos durante la realización de este trabajo.....	52
Tabla V. Oligonucleótidos utilizados en la PCR.....	53
Tabla VI. Anticuerpos policlonales empleados en este trabajo.....	59
Tabla VII. Identificación de proteínas mediante secuenciación del extremo aminoterminal.....	72
Tabla VIII. Identificación de proteínas secretadas por protoplastos de <i>S. cerevisiae</i> mediante detección con anticuerpos.....	75
Tabla IX. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.....	76
Tabla X. Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas separadas en un gradiente de pH 4-7.....	84
Tabla XI. Lista de las proteínas identificadas clasificadas de acuerdo a su función biológica.....	121

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. LA PARED CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Introducción.

La pared celular fúngica es una estructura rígida, situada entre la membrana plasmática y el medio extracelular, esencial para el mantenimiento de la integridad celular. Sin esta protección, las células se lisarían como consecuencia de cambios de osmolaridad en el medio en el que se encuentran. Además de proporcionar un soporte mecánico a la célula, la pared celular también determina su forma, tanto durante el ciclo vegetativo de la célula como durante los procesos de apareamiento, esporulación y formación de pseudohifas; modula la entrada selectiva de moléculas, actuando como un filtro, y media las interacciones entre células (Cid *et al.*, 1995). La importancia de esta estructura para la célula se pone de manifiesto en la gran inversión metabólica que supone para ésta, ya que la pared celular constituye hasta un 30% del peso seco de la célula (Orlean, 1997).

La pared celular no es una estructura inerte; muy al contrario, se trata de una estructura dinámica, que sufre modificaciones importantes, tanto en forma como en composición, a lo largo del ciclo celular y en respuesta a distintos estímulos, en procesos como la emergencia y crecimiento de la yema, crecimiento del *shmoo* y apareamiento, formación del septo, separación celular, esporulación, y transición dimórfica (Klis, 1994). Precisamente debido a estos cambios, la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* constituye un excelente modelo de morfogénesis celular (Cabib *et al.*, 1997; Orlean, 1997). Todas estas alteraciones requieren una fina regulación, de manera que la síntesis y degradación de los polímeros que constituyen la pared celular estén equilibradas, y el transporte de los componentes de la pared esté dirigido a los lugares donde éstos son requeridos. Así, los procesos de biosíntesis de la pared celular responden a controles de ciclo celular y a señales medioambientales (Cid *et al.*, 1995).

La biosíntesis y ensamblaje de la pared celular presentan un considerable interés desde el punto de vista farmacéutico. Debido a que se trata de una estructura esencial para las células, y dado que esta estructura no existe en eucariotas superiores, un conocimiento más profundo de la misma podría conducir a la identificación de potenciales dianas para el desarrollo de agentes antifúngicos de acción selectiva (Klis, 1994; Orlean, 1997). En este sentido, *S. cerevisiae* constituye un modelo de estudio de la pared celular de distintos hongos patógenos como *Candida albicans* y *Aspergillus*.

2. Composición y organización molecular.

La levadura *S. cerevisiae* es el principal modelo experimental utilizado en el estudio de la pared celular. Se conoce en profundidad la composición química de esta estructura, pero la comprensión de aspectos como la interacción de los distintos componentes y su ensamblaje es aún limitada.

La pared celular está constituida por tres macromoléculas: glucano, quitina y manoproteínas, todos ellos interconectados mediante enlaces covalentes (Kollár *et al.*, 1997) (fig. 1). Esta estructura está dispuesta en capas, según se observa mediante microscopía

electrónica de transmisión. La capa externa, densa al paso de los electrones, presenta fibras dispuestas perpendicularmente a la superficie; esta capa está principalmente compuesta por manoproteínas. La capa más interna, amorfa y transparente a los electrones, está asimismo constituida por dos zonas: una interna, próxima a la membrana plasmática, rica en proteínas y de estructura fibrosa, y otra externa, más amorfa, que contiene una alta proporción de β -1,6-glucano (Cid *et al.*, 1995).

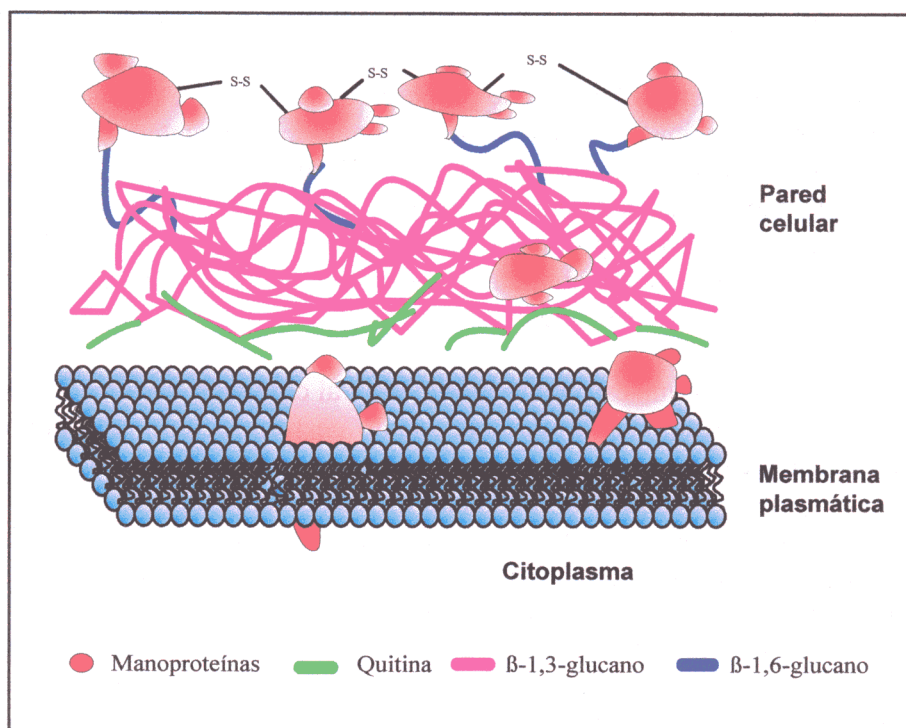


Fig. 1. Estructura y composición de la pared celular de *S. cerevisiae*.

2.1. β -1,3-glucano. Estructura y enzimología.

El β -1,3-glucano es el componente más abundante de la pared celular, constituyendo el 40% del peso seco de ésta. Forma parte de la capa interna citada anteriormente, y es el responsable, junto con la quitina, de mantener la rigidez e integridad de la pared celular (Cid *et al.*, 1995). Esta macromolécula consiste en un polisacárido lineal compuesto por unas 1500 unidades de glucosa, unidas mediante enlaces β -1,3. Contiene además en torno a un 3% de ramificaciones mediante enlaces β -1,6 (Lipke y Ovalle, 1998). La mayor parte del β -1,3-glucano presenta una conformación helicoidal, estando las fibras formadas por una cadena polisacáridica ó tres cadenas unidas mediante enlaces de hidrógeno. Estas fibrillas forman una red densamente interconectada que rodea a la célula (Orlean, 1997), en la que se anclan otros componentes de la pared celular (fig. 2). El β -1,3-glucano puede estar unido a través de sus extremos no reductores a β -1,6-glucano y/o a quitina (Kollár *et al.*, 1997; Kollár *et al.*, 1995). Cuando se produce la unión de la quitina al β -1,3-glucano, a través de un enlace β -1,4 entre el extremo reductor de las cadenas de quitina y el extremo no reductor de las cadenas de β -1,3-glucano, este polisacárido pasa a ser insoluble en álcali (Kollár *et al.*, 1995).

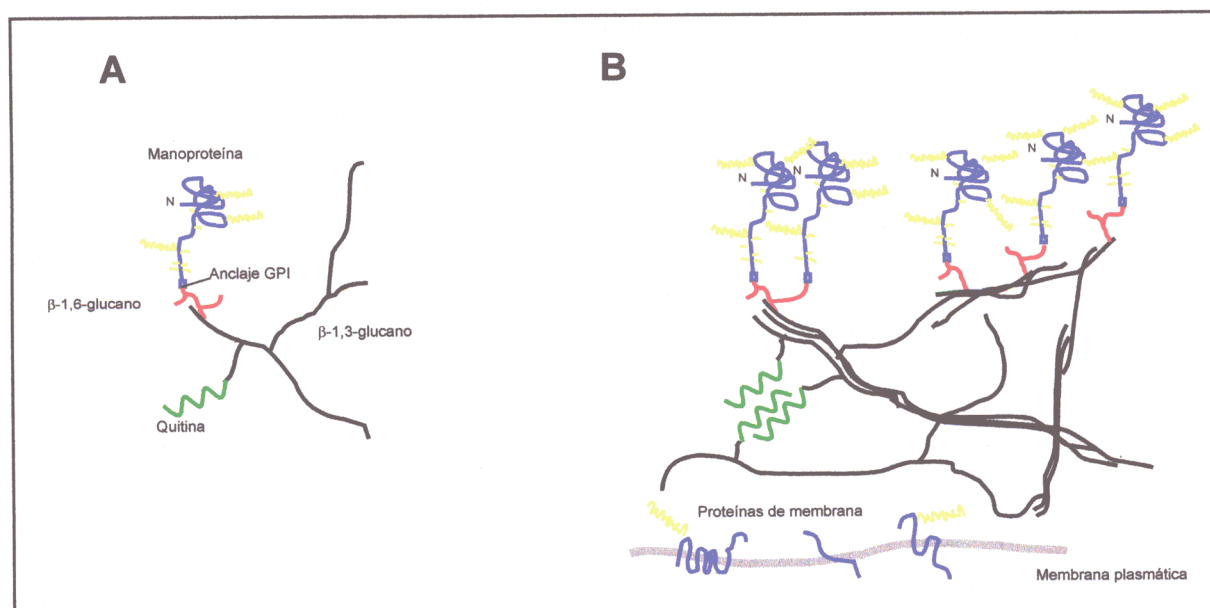


Fig. 2. Ensamblaje de los componentes de la pared celular de *S. cerevisiae*. (A) Módulo prototipo. La manoproteína se representa en azul, con la N- y O-glicosilación en amarillo. La quitina, representada en verde, también puede estar unida directamente al β-1,6-glucano, en rojo. El β-1,3-glucano se representa en negro. (B) Asociación de los módulos para formar la estructura de la pared celular. Las cadenas de glucano se asocian formando triples hélices. Reproducido de Lipke y Ovalle, 1998.

La enzima responsable de la síntesis del β-1,3-glucano, la β-1,3-glucán sintasa, cataliza la transferencia de residuos de glucosa a cadenas de glucosas unidas mediante enlaces β-1,3, utilizando como donador UDP-glucosa (revisado en Orlean, 1997). La actividad β-1,3-glucán sintasa está localizada en la membrana plasmática, y la síntesis del β-1,3-glucano podría tener lugar de forma vectorial, saliendo las cadenas formadas a través de ésta, como es el caso de la quitina.

La subunidad catalítica de la β-1,3-glucán sintasa está codificada por los genes *FKS1* y *FKS2*. El primero de ellos, *FKS1*, fue clonado simultáneamente por varios grupos empleando distintas estrategias, en rastreos de mutaciones que conferirían hipersensibilidad a distintos compuestos, y también a partir de la purificación de la actividad β-1,3-glucán sintasa (Orlean, 1997). Los mutantes afectados en *FKS1* presentan una disminución drástica en la actividad β-1,3-glucán sintasa y una reducción del 75% en los niveles de β-1,3-glucano (Douglas *et al.*, 1994; Inoue *et al.*, 1995). *FKS2* es el responsable de la actividad β-1,3-glucán sintasa residual que se observa en cepas *fks1Δ* (Mazur *et al.*, 1995). El gen *FKS2* codifica una proteína con un 88% de similitud con Fks1p. Fue clonado por hibridación cruzada con su homólogo *FKS1*, y además las proteínas codificadas por ambos genes copurifican. Los mutantes *fks2* no muestran ningún defecto cuando crecen de forma vegetativa, pero sí en esporulación, y la doble mutación *fks1 fks2* es letal. Por otra parte, la regulación de ambos genes es diferente. La expresión de *FKS1* predomina en condiciones óptimas de crecimiento, fluctuando sus niveles de mRNA a lo largo del ciclo celular (Mazur *et al.*, 1995; Ram *et al.*, 1995). La transcripción de *FKS1* aumenta al final de la fase G₁ y comienzo de la fase S. Sin embargo, la expresión de *FKS2* es inducida por calcio, por alta temperatura, por feromonas, o como consecuencia de la falta de Fks1p, y esta inducción depende de calcineurina, una proteína fosfatasa dependiente de calmodulina (Zhao *et al.*, 1998). En la inducción de *FKS2* por alta temperatura participa también la ruta de MAP kinasas que controla la integridad celular. *FKS2* también es inducido

en fuentes de carbono pobres, de manera independiente de calmodulina (Zhao *et al.*, 1998). Existe un tercer gen homólogo al que por similitud se ha denominado *FKS3*. Su delección no provoca un fenotipo apreciable en células silvestres, y no agrava la sensibilidad a calcofluor de los mutantes *fkslΔ* y *fk2Δ* (Ram *et al.*, 1996).

La subunidad regulatoria de la actividad β -1,3-glucán sintasa, que fue copurificada con la subunidad catalítica a partir de preparaciones de membrana, ha sido identificada como Rho1p (Orlean, 1997). Esta proteína pertenece a la familia de las GTPasas, y es esencial para el mantenimiento de la integridad celular. Además, Rho1p tiene otras dos funciones como regulador de la síntesis de la pared celular y de la morfogénesis. Rho1p activa la proteína quinasa C (Pkc1p), que a su vez forma parte de la ruta de transducción de señales que controla la integridad celular (véase el apartado 5 de este capítulo). Por otra parte, Rho1p también puede estar implicada en la organización del citoesqueleto de actina en la punta de la yema.

Se han identificado varios genes más implicados en la síntesis del β -1,3-glucano. *KNR4* fue clonado por complementación de un mutante *knr4*, seleccionado por su resistencia a la toxina killer K9 de *Hansenula mrakii*, un inhibidor selectivo de la síntesis de β -1,3-glucano (Hong *et al.*, 1994). La delección de este gen provoca una disminución en los niveles de β -1,3 y β -1,6-glucano y en la actividad β -1,3-glucán sintasa, además de un aumento en la cantidad de quitina. *KNR4/SMI1* codifica una proteína nuclear que podría estar implicada en la regulación de la síntesis de la pared celular. Recientemente este mismo gen ha sido clonado como supresor de mutantes hipersensibles a calcofluor *cwh*, demostrándose que el efecto supresor va acompañado de una reducción en los niveles de los mRNA correspondientes a las quitín sintasas Chs1p, Chs2p y Chs3p (Martin *et al.*, 1999). Estos datos sugieren que *KNR4* pueda tener un papel regulatorio en la deposición de quitina y en el ensamblaje de la pared celular. El uso de la toxina K9 de *H. mrakii* ha conducido a la clonación de otro gen relacionado con la síntesis del β -1,3-glucano. *HKR1* confiere resistencia a la citada toxina cuando es sobreexpresado (Yabe *et al.*, 1996). La eliminación del dominio de unión a calcio de Hkr1p, que se localiza en la membrana plasmática, origina un descenso en los niveles de β -1,3-glucano y en la actividad β -1,3-glucán sintasa.

GNS1 fue clonado por complementación de una mutación que confería resistencia a un análogo de papulacandina, un inhibidor de la síntesis de β -1,3-glucano (el-Sherbeini y Clemas, 1995). Los mutantes *gns1* muestran una reducción drástica de la actividad β -1,3-glucán sintasa, y además *GNS1* interacciona genéticamente con *FKS1*, por lo que se ha propuesto que Gns1p podría ser la subunidad de unión del citado inhibidor a la β -1,3-glucán sintasa.

Una vez sintetizadas, las cadenas lineales de β -1,3-glucano han de incorporarse a la pared celular en crecimiento, proceso que debe implicar a enzimas remodeladoras y ensambladoras. Bgl2p, una proteína de pared extraíble con agentes reductores (Cappellaro *et al.*, 1998; Klebl y Tanner, 1989), presenta actividad endo- β -1,3-glucanasa (Mrsa *et al.*, 1993), y recientemente se ha demostrado que es además una glicosil transferasa que cataliza la unión de dos cadenas de β -1,3-glucano mediante un enlace β -1,6 (Goldman *et al.*, 1995). Éste podría ser uno de los mecanismos de incorporación del β -1,3-glucano a los polisacáridos de la pared existente, permitiendo la expansión celular (Orlean, 1997).

Recientemente se ha descubierto el papel de la glicoproteína Gas1p en el ensamblaje del β -1,3-glucano de la pared celular. Esta enzima, localizada en la cara externa de la

membrana plasmática, presenta actividad β -1,3-glucanosil transferasa, catalizando la hidrólisis y posterior transferencia de una cadena de β -1,3-glucano al extremo reductor de otra cadena similar (Mouyna *et al.*, 1999; Popolo *et al.*, 1999a). La cadena transferida podría ser una cadena de β -1,3-glucano de nueva formación o proceder de los módulos constituyentes de la pared celular (Popolo y Vai, 1999b). A la vista de este descubrimiento se comprende la observación previa de la liberación de β -1,3-glucano y manoproteínas unidas a restos de β -1,6 y β -1,3-glucano al medio que tiene lugar en los mutantes *gas1* Δ (Ram *et al.*, 1998a).

2.2. β -1,6-glucano. Estructura y síntesis.

Este componente representa aproximadamente el 10% del peso seco de la pared celular. Se trata de un polisacárido muy ramificado, constituido por 140-350 unidades de glucosa unidas entre sí fundamentalmente mediante enlaces β -1,6, y con una pequeña proporción de uniones β -1,3. El β -1,6-glucano tiene un papel importante en la organización de la pared celular, siendo la molécula central que une o enlaza todos los componentes de la misma (Kapteyn *et al.*, 1996; Kapteyn *et al.*, 1997; Kollár *et al.*, 1997).

El β -1,6-glucano forma parte del receptor al que debe unirse la toxina *killer* K1 en la superficie celular para después ejercer su acción, mediante la formación de poros en la membrana que ocasionan en última instancia la muerte celular (Hutchins y Bussey, 1983). Esta observación fue la base de varios rastreos en busca de mutantes resistentes a esta toxina, los cuales han proporcionado gran cantidad de información sobre la biosíntesis de este polímero (Boone *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1993b). Los mutantes aislados, denominados *kre* (*Killer REsistant*), presentan defectos en la síntesis del β -1,6-glucano insoluble en álkalí y niveles anómalos de β -1,3 y β -1,6-glucano (Orlean, 1997). Algunos de los mutantes también presentan alteraciones en *N*- y *O*-glicosilación. Los genes *KRE*, y sus supresores extragenéticos y sintéticos letales, codifican diversas proteínas intra y extracelulares. La localización de éstas, muchas de ellas en compartimentos secretorios, junto con los fenotipos mostrados por los mutantes, sugieren que el proceso de biosíntesis del β -1,6-glucano tiene lugar en varias etapas intracelulares a lo largo de la ruta de secreción, y es completado en la superficie celular (Roemer *et al.*, 1994) (fig. 3). La función concreta de los genes *KRE* no ha sido aún caracterizada (con la excepción de *KRE2*), de modo que los pasos en los que se sintetiza el β -1,6-glucano son todavía desconocidos.

KRE5 parece tener su función en una etapa muy temprana de la síntesis de β -1,6-glucano. Los mutantes delecionados en este gen crecen de forma extremadamente lenta, y prácticamente no contienen β -1,6-glucano insoluble en álkalí (Meaden *et al.*, 1990). En algunos fondos genéticos esta delección es incluso letal. La proteína Kre5p posee un péptido señal y una secuencia HDEL de retención en el extremo C-terminal, por lo que es probable que se localice en el retículo endoplásmico. Kre5p presenta homología con la UDP-glucosa:glicoproteína glucosil transferasa, enzima que forma parte del "control de calidad" del plegamiento de proteínas en mamíferos (Helenius *et al.*, 1997). Sin embargo, la esencialidad de la función de Kre5p no está relacionada con esta actividad (Shahinian *et al.*, 1998).

El gen *KRE6* codifica una glicoproteína de membrana de tipo II que ha sido localizada en el aparato de Golgi. Los mutantes *kre6* presentan una disminución del 50% en los niveles de β -1,6-glucano (Roemer y Bussey, 1991). El gen *SKNI* fue aislado como supresor multicopia de un mutante *kre6*, y codifica una proteína con un 66% de homología con Kre6p

(Roemer *et al.*, 1993). La delección de *SKN1* no afecta a los niveles de β -1,6-glucano; sin embargo la doble delección *kre6 Δ skn1 Δ* es letal en algunos fondos genéticos, y presenta un crecimiento muy lento en otros, en los que provoca una reducción en los niveles de β -1,6-glucano de hasta el 90%. Se ha propuesto que se trate de genes redundantes que funcionen en rutas paralelas en la síntesis de este polímero (Roemer *et al.*, 1993). Tanto Kre6p como Skn1p son fosforiladas en su dominio citoplásmico, por lo que éste puede ser el mecanismo de su regulación. Kre6p presenta además interacciones genéticas con la ruta de MAP kinasas que controla la integridad celular; sin embargo, su fosforilación no depende de Pkc1p (Roemer *et al.*, 1994).

La interrupción de *KRE11* provoca un descenso del 50% en los niveles de β -1,6-glucano, aunque no un defecto en el crecimiento (Brown y Bussey, 1993a). Este glucano es además ligeramente más pequeño que el sintetizado por células silvestres. Kre11p es una proteína citoplásmica, que contiene una secuencia consenso RXGG de unión a UDP-glucosa, el probable donador en la síntesis del glucano. Esta proteína podría funcionar regulando la actividad de un complejo asociado a la membrana en la síntesis del β -1,6-glucano (Orlean, 1997).

KRE1 codifica una proteína extensamente *O*-manosilada, que presenta un péptido señal en su extremo N-terminal y un dominio de anclaje a GPI en el extremo C-terminal. Los mutantes *kre1* sintetizan un 40% de la cantidad de β -1,6-glucano encontrada en células silvestres. Este glucano presenta los puntos de ramificación con enlaces β -1,3, pero las ramificaciones no están alargadas con cadenas de β -1,6-glucano. Kre1p ha sido localizada en la superficie celular (Boone *et al.*, 1990), coincidiendo con la predicción que se deriva de su secuencia. Podría ser la enzima encargada de extender las ramificaciones, catalizando una reacción de transglucosilación (Orlean, 1997). La doble delección *kre1 Δ kre11 Δ* es letal; los experimentos de epistasis sugieren que Kre11p precedería a Kre1p en la síntesis del β -1,6-glucano (Brown y Bussey, 1993a).

La delección de *KRE9* provoca una disminución del 80% en los niveles de β -1,6-glucano, morfología aberrante y defectos en el crecimiento (Brown y Bussey, 1993a). El glucano residual presente en la célula es de tamaño pequeño y estructura alterada. Kre9p es una proteína rica en serinas y treoninas, que puede ser detectada en el medio de cultivo cuando es sobreexpresada. El mutante *kre9 Δ* es sintético letal con *kre1 Δ* , *kre6 Δ* y *kre11 Δ* . La doble delección *kre5 Δ kre9 Δ* no exacerba el fenotipo de los mutantes *kre5 Δ* , por lo que Kre9p debe funcionar por debajo de Kre5p. *KNH1* codifica una proteína que muestra un 46% de homología con Kre9p (Dijkgraaf *et al.*, 1996). La delección de *KNH1* no origina ningún efecto apreciable en la síntesis del β -1,6-glucano, sensibilidad a toxina *killer*, o crecimiento, ni agrava los fenotipos de los mutantes citados anteriormente. Sin embargo la delección simultánea de *KNH1* y *KRE9* es letal, y la sobreexpresión del primero suprime los defectos del mutante *kre9 Δ* , lo cual indica que se trata de homólogos funcionales (Dijkgraaf *et al.*, 1996). *SKN7* fue clonado como supresor en multicopia de un mutante *kre9 Δ* (Brown y Bussey, 1993a). No restaura los niveles de β -1,6-glucano; sin embargo, ejerce algún tipo de efecto en la pared, ya que corrige los defectos morfológicos y evita la liberación al medio de proteínas de pared. Skn7p presenta homología con los reguladores de dos componentes bacterianos, y se localiza en el núcleo (Brown y Bussey, 1993a). Esta proteína podría, pues, estar implicada en la regulación de la expresión de genes implicados en la síntesis de la pared celular (Orlean, 1997).

KRE2/MNT1 codifica la única proteína Kre a la que se ha asignado una actividad catalítica. Kre2p es una 1,2- α -manosil transferasa encargada de añadir el segundo y tercer residuos de manosa en la *O*-glicosilación, y también participa en la *N*-glicosilación (Hill *et al.*, 1992; Lussier *et al.*, 1999). Forma parte de una familia de proteínas de membrana (*KTR*, *Kre-Two-Related*) localizadas en el aparato de Golgi e implicadas en la manosilación de proteínas de pared. La delección de *KRE2* no afecta directamente a la síntesis de β -1,6-glucano. Sin embargo, da lugar a una glicosilación deficiente, que a su vez impide la correcta unión de las manoproteínas a los glucanos de la pared celular (Lussier *et al.*, 1999).

Estudios recientes han implicado a otra proteína del retículo endoplásmico, Cwh41p, en la biosíntesis de β -1,6-glucano (Jiang *et al.*, 1996), aunque se ha propuesto que su papel en este proceso sea indirecto (Abeijon y Yun Chen, 1998). Cwh41p es la glucosidasa I responsable del procesamiento de las cadenas de *N*-glicosilación (Romero *et al.*, 1997). El gen *CWH41* fue clonado tras una búsqueda de mutantes hipersensibles a calcoflúor (Ram *et al.*, 1994); los mutantes *cwh41 Δ* además son resistentes a toxina *killer* y presentan un descenso del 50% en los niveles de β -1,6-glucano (Jiang *et al.*, 1996). *CWH41* muestra interacciones genéticas con *KRE6* y *KRE1*. Recientemente Shahinian y colaboradores (Shahinian *et al.*, 1998) han demostrado que un procesamiento incorrecto de las cadenas de azúcares unidas a asparragina origina una deficiencia de β -1,6-glucano, estableciendo así una relación entre la *N*-glicosilación de proteínas y la biosíntesis de este polisacárido. Este autor propone la existencia de una unión entre las cadenas de β -1,6-glucano y las cadenas de *N*-glicosilación de las proteínas, mediante un enlace directo entre glucosa y manosa, o bien mediante un enlace indirecto. Resultados obtenidos por otros autores (Kollár *et al.*, 1997; Tkacz, 1984) también apoyan esta hipótesis.

Se podría, pues, proponer una ruta de biosíntesis del β -1,6-glucano, esbozada en la figura 3. La síntesis de este polímero se iniciaría en el retículo endoplásmico, paso en el que intervendría Kre5p, dada su localización en este compartimento y el hecho de que la ausencia de esta proteína provoque una falta casi absoluta de β -1,6-glucano insoluble en álcali. Cwh41p podría actuar por debajo de Kre5p, o en un complejo junto con ella. El polímero inicial formado en el retículo endoplásmico sería completado en el aparato de Golgi mediante la extensión de la cadena β -1,6 y la adición de ramificaciones en β -1,3. Kre6p podría ser una proteína reguladora, o sintetizar ella misma el glucano y ser a su vez regulada por Kre9p (en el lumen del aparato de Golgi) y/o Kre11p (en el citoplasma). Kre1p actuaría en un estadio posterior en la elongación de las cadenas de β -1,6-glucano, aunque se desconoce si esto ocurre en algún compartimento secretor tardío, o ya en la superficie celular, por fuera de la membrana plasmática. Kre9p también podría ejercer su acción a este nivel. Por su parte, Skn1p y Knh1p, los homólogos funcionales de Kre6p y Kre9p respectivamente, actuarían en una ruta alternativa minoritaria, o en determinadas condiciones de crecimiento de las células.

Recientemente se ha estudiado otra serie de mutantes implicados en la síntesis del β -1,6-glucano, que incluye a los mutantes *cwh41 Δ* , *gls2 Δ* y *cne1 Δ* (Shahinian *et al.*, 1998). Se trata de un grupo de mutantes que, a diferencia de los mutantes *kre*, crecen normalmente e incorporan proteínas a la pared, pero presentan igualmente niveles disminuidos de β -1,6-glucano. En el citado trabajo se sugiere que a nivel del retículo endoplásmico podrían existir dos rutas paralelas de biosíntesis de β -1,6-glucano. Una de ellas, correspondiente a este segundo grupo de mutantes, implicaría al proceso de *N*-glicosilación de proteínas. Es posible que algunas proteínas de pared se anclen a través de sus cadenas de *N*-glicosilación. Probablemente se trate éste de un mecanismo secundario para las células. La segunda ruta

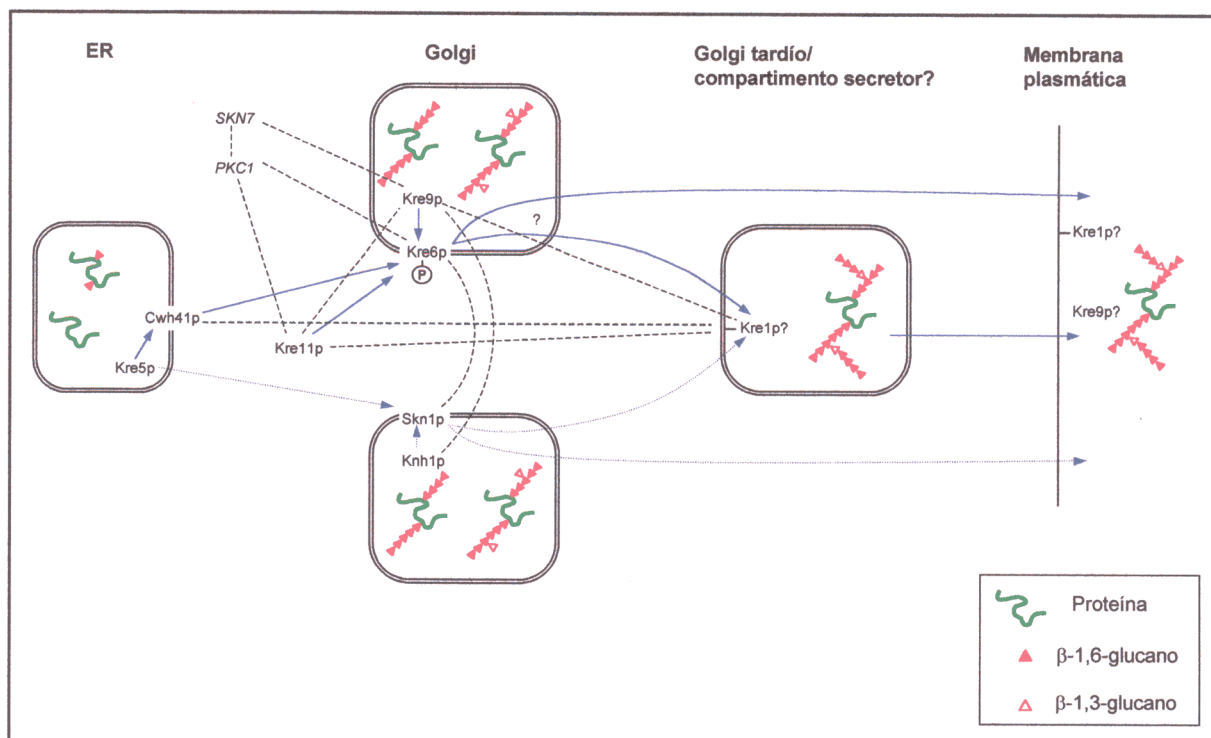


Fig. 3. Modelo propuesto para la biosíntesis del β -1,6-glucano a lo largo de la ruta de secreción, basado en las relaciones de epistasia entre los genes implicados y la localización subcelular de las proteínas por ellos codificadas. Las flechas azules continuas indican los pasos de la ruta mayoritaria o principal, o interacciones regulatorias en ésta. Las líneas de puntos indican interacciones genéticas, letalidad sintética o supresión en multicopia. Las flechas punteadas indican una posible ruta alternativa o minoritaria, que implicaría a las proteínas homólogas a Kre6p y Kre9p. Reproducido de Orlean, 1997.

depende del anclaje de las manoproteínas de la pared a GPI (véase el apartado 2.4.2 de este capítulo), proceso que resulta esencial para el anclaje de determinadas proteínas a la pared, para la integridad de esta estructura y para la viabilidad celular (Orlean, 1997).

2.3. Quitina. Estructura y enzimología.

La quitina es un polímero lineal de 100-120 residuos de *N*-acetilglucosamina con uniones β -1,4. Las cadenas se asocian de forma antiparalela mediante enlaces de hidrógeno, dando lugar a microfibrillas, y formando una estructura cristalina esencial para las células (Cid *et al.*, 1995). Las cadenas de quitina se localizan principalmente en la zona próxima a la membrana plasmática (Smits *et al.*, 1999a). Cuantitativamente, la quitina constituye únicamente un 1-2% de la pared celular (Fleet, 1991). La unión de la quitina a los glucanos es la responsable de la insolubilidad de éstos en álcali (Hartland *et al.*, 1994).

La síntesis de quitina tiene lugar de forma estrictamente regulada, tanto temporal como espacialmente (Orlean, 1997). En *S. cerevisiae* la quitina se localiza principalmente en las cicatrices de las yemas. Cuando la yema comienza a emerger se forma un anillo de quitina en el cuello entre las células madre e hija. Al invaginarse la membrana plasmática, el disco de quitina se extiende hacia el interior, cerrando eventualmente el espacio entre ambas células, y dando lugar a lo que se llama el septo primario. El septo secundario se forma por la deposición de glucano y manoproteínas en ambos lados del septo primario. Después de la

citoquinesis, el anillo y la mayor parte del septo primario quedan en la célula madre, constituyendo la cicatriz de gemación.

La actividad quitín sintasa utiliza UDP-*N*-acetilglucosamina como donador. Esta actividad está localizada en la membrana plasmática, y recientemente se ha demostrado que las quitín sintasas transitan por la ruta de secreción (Orlean, 1997). La síntesis de quitina es un proceso vectorial mediante el cual las cadenas de quitina nacientes salen a la superficie celular a través de la membrana plasmática (Cabib *et al.*, 1983). Se han identificado tres genes que codifican proteínas que catalizan la síntesis de quitina, y varios otros genes que afectan a este proceso.

La quitín sintasa I constituye el 90% de la actividad quitín sintasa de la célula detectable *in vitro*. La proteína responsable de esta actividad es Chs1p. Aparentemente, Chs1p es la enzima encargada de reparar daños en la pared al final de la citoquinesis, contrarrestando el efecto hidrolítico de la endoquitinasa Cts1p (Cid *et al.*, 1995).

La actividad quitín sintasa II puede ser detectada en mutantes *chs1Δ*, y es codificada por *CHS2*. La expresión de *CHS2* está regulada por el ciclo celular, mostrando un pico justo antes de la formación del septo primario (Orlean, 1997). La delección de *CHS2* es letal en algunos fondos genéticos, y en otros da lugar a células grandes y alargadas, con un defecto en separación. El septo en los mutantes *chs2Δ* está muy engrosado y carece de septo primario. En ocasiones estos mutantes son multinucleados. Estas observaciones sugieren que la función principal de Chs2p es la síntesis del septo primario, y también es posible que tenga algún otro papel en la citoquinesis. Chs2p se localiza en el cuello entre las células madre e hija sólo al final de la mitosis.

La quitín sintasa III es codificada por el gen *CHS3* (Orlean, 1997). Los niveles más altos de esta actividad se detectan en células en crecimiento exponencial, mientras que en la fase estacionaria esta actividad disminuye sensiblemente. Chs3p sintetiza el 90-95% de la quitina de la pared celular, formando el anillo de quitina tras la emergencia de la yema. Los niveles de Chs3p son constantes a lo largo del ciclo. Sin embargo, la proteína se localiza en los lugares de crecimiento polarizado de forma dependiente del ciclo celular. En primer lugar, aparece como un anillo en la superficie celular en el punto de emergencia de la yema, y se mantiene en el cuello de la célula hija cuando ésta es aún pequeña, para luego desaparecer. Vuelve a aparecer en el cuello entre las células madre e hija durante la citoquinesis. Chs3p también es la responsable de la síntesis de la quitina en las paredes laterales, que tiene lugar principalmente en los últimos estadios del ciclo celular (Klis, 1994).

La presencia de Chs2p o Chs3p es esencial para la viabilidad celular. Los dobles mutantes *chs1Δ chs2Δ* y *chs1Δ chs3Δ* son viables, pero el triple mutante no lo es, y además no es recuperable por la presencia de Chs1p.

Existen otros genes implicados en la síntesis de la quitina. *CHS4* y *CHS5* son necesarios para la actividad quitín sintasa III *in vivo*, pudiendo ser considerados moduladores o subunidades de dicha actividad (Orlean, 1997). La sobreexpresión de *CHS4* incrementa la actividad quitín sintasa III *in vitro*, mientras que Chs5p es requerida para la correcta localización de Chs3p. Chs4p también podría tener un papel en esta localización, puesto que interacciona con el anillo de septinas que se forma en el cuello de gemación.

2.4. Manoproteínas.

Las manoproteínas son uno de los componentes mayoritarios de la pared celular, constituyendo aproximadamente el 35% del peso seco de ésta. Son polipéptidos con un alto contenido en carbohidratos, de hasta el 95% (Lipke y Ovalle, 1998). Las manoproteínas pueden ser componentes estructurales de la pared celular, o bien enzimas localizadas en el espacio periplásmico o en la pared propiamente dicha, con alguna función trófica, funciones propias del metabolismo de esta estructura u otras funciones, por ejemplo en los procesos de floculación, adhesión, como receptores, etc. (Cid *et al.*, 1995). En su conjunto, las glicoproteínas limitan la porosidad de la pared a moléculas de alto peso molecular (Smits *et al.*, 1999a; de Nobel *et al.*, 1990).

Las manoproteínas son sintetizadas intracelularmente. La unión de los azúcares a las proteínas se produce a través de la *N*- y la *O*-glicosilación, que tienen lugar en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi durante el tránsito de estas proteínas a lo largo de la ruta de secreción. Algunas manoproteínas reciben además otro tipo de glicosilación, una molécula de GPI (glicosilfosfatidil inositol), en su extremo C-terminal. A estas proteínas se las conoce con el nombre de “proteínas GPI” (Caro *et al.*, 1997).

Las manoproteínas constituyen una especie de material de relleno, embebido en la red estructural de glucano y quitina. Estas proteínas pueden ser extraídas de la pared celular mediante diferentes métodos, con arreglo a los cuales han sido clasificadas.

2.4.1. Proteínas extraíbles con SDS y agentes reductores.

Estas proteínas están unidas de forma no covalente a componentes estructurales de la pared celular, o mediante puentes disulfuro a otras proteínas unidas covalentemente (Lipke y Ovalle, 1998). Mediante el tratamiento con SDS y agentes reductores en caliente se puede extraer un número variable de proteínas a partir de paredes celulares aisladas (Cappellaro *et al.*, 1998; Montijn *et al.*, 1994; Mrsa *et al.*, 1997; Valentín *et al.*, 1984). Sin embargo, gran parte de estas proteínas proceden en realidad de la membrana plasmática y no de la pared celular (Klis, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1996b). Con el fin de discernir entre ambas, Mrsa y colaboradores (Mrsa *et al.*, 1997) recurrieron a marcar las proteínas extracelulares con un reactivo no permeable, y posteriormente extraer las proteínas a partir de paredes celulares aisladas con SDS en condiciones reductoras, detectando nueve bandas proteicas. A partir de células intactas también se pueden extraer proteínas de la superficie celular mediante el tratamiento con agentes reductores (Cappellaro *et al.*, 1998; López-Ribot y Chaffin, 1996b). Entre las proteínas que identificaron Cappellaro y colaboradores en un extracto de este tipo, a las cuales llamaron Scw (de *Soluble Cell Wall protein*), se encuentran Exg1p, Bgl2p y Cts1p, enzimas hidrolíticas de la pared celular, y Scw8p/Ccw5p/Ccw11p, una proteína de la familia Pir (véase a continuación), que también se encuentra unida covalentemente a la pared. En el mismo estudio también se detectaron una serie de proteínas desconocidas, que presentan homología con glucanasas.

2.4.2. Proteínas unidas covalentemente a la pared celular.

La mayor parte de las proteínas de la pared celular resistentes a la extracción con SDS y agentes reductores pueden ser liberadas de la pared mediante el tratamiento con β -1,3 o β -1,6-glucanasas (Lipke y Ovalle, 1998; Orlean, 1997), lo cual indica que están unidas de forma covalente a los glucanos de la pared celular. El heteropolímero de β -1,6/ β -1,3-glucano o el β -

1,3-glucano son los responsables del anclaje de estas manoproteínas a la pared celular. Se pueden distinguir dos tipos de manoproteínas unidas de forma covalente a la pared celular en función del tipo de unión: proteínas GPI y proteínas Pir (fig. 4).

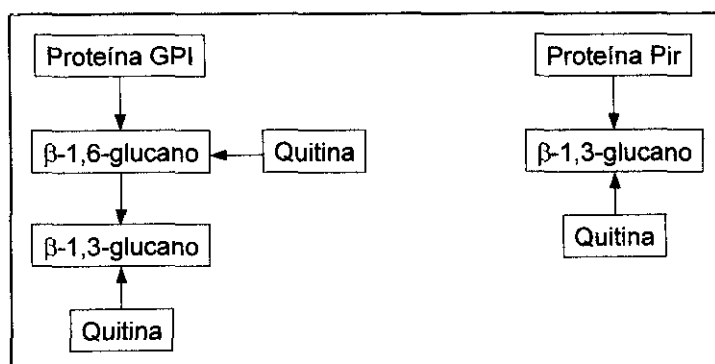


Fig. 4. Esquema de las uniones entre las proteínas GPI y Pir y los demás componentes de la pared celular. Las flechas indican los extremos reductores de las cadenas polisacáridicas.

A) Proteínas GPI.

Estas proteínas están unidas covalentemente al β -1,6-glucano, y pueden ser extraídas de la pared celular por digestión con β -1,6 o β -1,3-glucanasas (Kapteyn *et al.*, 1999a; Orlean, 1997). Mediante análisis informáticos se han identificado en el genoma de *S. cerevisiae* del orden de 50 genes que codifican proteínas de este tipo (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998a). Estas manoproteínas presentan tres características en común (Kapteyn *et al.*, 1999a):

- Poseen un péptido señal en el extremo N-terminal, que dirige su entrada en la ruta de secreción.
- Son ricas en serinas y treoninas, residuos susceptibles de recibir *O*-glicosilación, sobre todo en la mitad C-terminal de la proteína. La unión de gran cantidad de este tipo de cadenas cortas de azúcares confiere a las proteínas una conformación extendida y rígida, que permite a ciertos dominios de éstas sobresalir por encima de la superficie de membranas o paredes (Jentoft, 1990; Lipke y Ovalle, 1998).
- Presentan en su extremo C-terminal una señal de anclaje a GPI, que consta de un dominio de anclaje, una región espaciadora de 8-10 residuos, y una secuencia hidrofóbica de al menos 11 aminoácidos (Caro *et al.*, 1997). El punto de unión a GPI, llamado sitio ω , ha de ser un aminoácido pequeño, y los residuos en posiciones $\omega+1$ y $\omega+2$ deben ser también aminoácidos de cadena lateral corta (Nuoffer *et al.*, 1993; Nuoffer *et al.*, 1991). La unión a GPI ha sido confirmada bioquímicamente en las proteínas Ag α 1p, Gas1p, Cwp1p, Cwp2p y Tir1p (Caro *et al.*, 1997).

En el retículo endoplásmico, la secuencia señal de anclaje a GPI es eliminada y reemplazada por una molécula de GPI, que se une en el sitio ω (Orlean, 1997). La molécula de GPI tiene la siguiente estructura: fosfoetanolamina-6-Man- α -1,2-Man- α -1,6-Man- α -1,4-GlcN- α -1,6-mioinositol fosfolípido (fig. 5). La α -1,2-manosa está ramificada con una cadena de 2 ó 3 residuos más de manosa. Se ha propuesto que la transferencia del GPI a la proteína tiene lugar mediante una reacción de transamidación, en la que se forma un enlace amida entre la fosfoetanolamina del GPI y el nuevo extremo C-terminal. Tras la unión del GPI, estas proteínas transitan por la ruta secretora y acaban ancladas en la cara externa de la membrana plasmática.

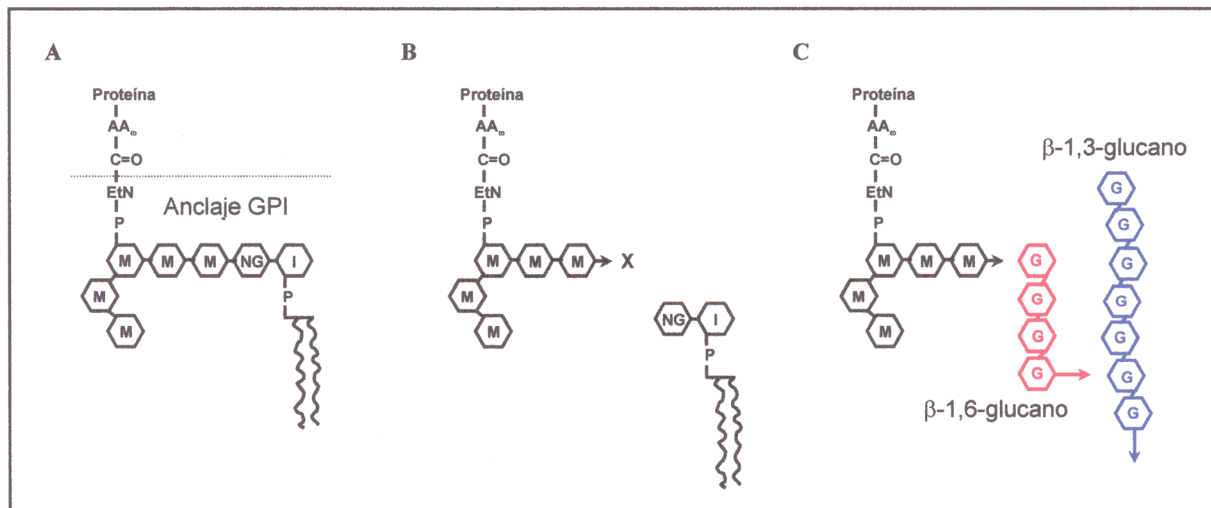


Fig. 5. Modelo de ensamblaje de las proteínas GPI a la pared celular. (A) Estructura del anclaje GPI: AA, aminoácido; EtN, etanolamina; P, fosfato; M, manosa; GN, glucosamina; I, mioinositol. En la zona inferior derecha está el fosfolípido. (B y C) Unión de las proteínas GPI al heteropolímero β -1,6/ β -1,3-glucano. La flecha indica el extremo reductor de la cadena azucarada; G, glucosa; X, hipotético activador. Reproducido de Lipke y Ovalle, 1998.

En *S. cerevisiae* las proteínas GPI no sólo se encuentran en la membrana plasmática, sino también en la pared celular (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998b), de donde pueden ser extraídas mediante el tratamiento con glucanasas como se ha comentado anteriormente, o con HF, que rompe el enlace fosfodiéster existente entre el extremo C-terminal de la proteína y la fosfoetanolamina del GPI. Se ha especulado que en algunos casos el anclaje a la membrana mediante GPI pueda representar un estadio intermedio, antes de que la unión a componentes de la pared tenga lugar (de Nobel y Lipke, 1994). Mientras que las proteínas GPI de la membrana plasmática contienen un anclaje GPI completo, las proteínas GPI de la pared sufren un procesamiento del GPI en la membrana antes de su incorporación a la pared celular (Lu *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1995; Muller *et al.*, 1996). Como resultado de este procesamiento, el inositol-fosfolípido es eliminado y las manoproteínas de este tipo quedan unidas covalentemente al β -1,6-glucano a través de un fragmento remanente del GPI (Kapteyn *et al.*, 1996; Van der Vaart *et al.*, 1996a) (fig. 5). Se ha demostrado que este fragmento del GPI contiene la cadena de manosas y la fosfoetanolamina (Kollár *et al.*, 1997). A su vez, el β -1,6-glucano está unido al β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1996), y la unión de las manoproteínas al heteropolímero β -1,6/ β -1,3-glucano es la responsable del anclaje de las proteínas GPI en la pared celular (Lipke y Ovalle, 1998; Orlean, 1997; Smits *et al.*, 1999a). Así, en mutantes *kreΔ*, que poseen niveles disminuidos de β -1,6-glucano, se ha observado un aumento de la liberación de este tipo de proteínas al medio de cultivo (Jiang *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1995). Una pequeña proporción de las proteínas GPI están unidas a la quitina a través únicamente del β -1,6-glucano. Se trata de una fracción minoritaria (2%), que es resistente a la extracción con β -1,3-glucanasa (Kapteyn *et al.*, 1997; Kollár *et al.*, 1997).

Las proteínas GPI de *S. cerevisiae* que no están unidas covalentemente a la pared celular, sino que están (presuntamente) localizadas en la membrana plasmática, como Gas1p, Kre1p o Yap3p, poseen un motivo dibásico, es decir, dos aminoácidos básicos, *upstream* del sitio ω de unión a GPI (Caro *et al.*, 1997; Vossen *et al.*, 1997). Por el contrario, las proteínas GPI localizadas en la pared celular, como Aga1p, Cwp1p, Cwp2p, Flo1p, Sed1p y Tip1p

entre otras, no presentan este motivo. Se ha propuesto que el motivo dibásico podría ser característico de las proteínas GPI localizadas en la membrana (Caro *et al.*, 1997) y constituir una señal negativa para la incorporación de estas proteínas en la pared celular (Hamada *et al.*, 1998a). Hamada y colaboradores también han sugerido que una región constituida por cinco residuos aminoacídicos *upstream* del sitio ω determina la localización subcelular de las proteínas unidas a GPI, de tal manera que la presencia de aminoácidos específicos en las posiciones $\omega-4$ u $\omega-5$ y $\omega-2$ sería la responsable de la incorporación de las proteínas en la pared celular (Hamada *et al.*, 1998b; Hamada *et al.*, 1999). En contraposición a este modelo, otros autores sugieren que el papel del anclaje GPI es dirigir la localización de las proteínas a la pared celular, basándose en la detección de Gas1p entre las proteínas de pared extraíbles con glucanasas (de Sampaio *et al.*, 1999).

B) Proteínas Pir.

Recientemente estas proteínas han sido inmunolocalizadas en la pared celular, donde confieren resistencia a osmotina, una proteína de plantas con acción antifúngica (Yun *et al.*, 1997). Las proteínas de la familia PIR comparten varias características (Kapteyn *et al.*, 1999a):

- Presentan un péptido señal en el extremo N-terminal.
- Contienen un punto de reconocimiento de la proteasa Kex2p tras los primeros 60-70 aminoácidos del extremo aminoterminal (Mrsa *et al.*, 1997).
- Su secuencia presenta varias repeticiones internas, de ahí su nombre (PIR, *Proteins with Internal Repeats*).

Las proteínas Pir pueden ser extraídas de la pared por digestión con β -1,3-glucanasas (Kapteyn *et al.*, 1999b) o mediante un tratamiento suave con álkalí (Mrsa *et al.*, 1997). Estas proteínas están muy O-glicosiladas, pero al contrario que las proteínas GPI, no presentan una señal de anclaje a GPI. El hecho de que estas proteínas puedan ser liberadas de la pared mediante la incubación en un álkalí débil, un tratamiento que conduce a la eliminación de la O-glicosilación en un proceso denominado beta-eliminación, podría indicar que la unión de las proteínas Pir a la pared celular se produce a través de sus cadenas de O-glicosilación (Mrsa *et al.*, 1997).

Recientemente se ha demostrado que Pir2p/Hsp150p/Ccw7p, una de las proteínas de esta familia, está unida directamente al β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1999b), ya que puede ser extraída de la pared mediante la digestión con β -1,3-glucanasa, pero es resistente a la extracción con β -1,6-glucanasa. Además, en cepas con niveles disminuidos de β -1,3-glucano, como es el caso de los mutantes *fks1* Δ y *gas1* Δ , se ha observado un incremento en la liberación de esta proteína al medio de cultivo.

El papel de las proteínas Pir es aún desconocido; la eliminación de alguna de ellas provoca sensibilidad a choque térmico (Toh-E *et al.*, 1993) o a la proteína antifúngica osmotina (Yun *et al.*, 1997), y la delección múltiple de varias de ellas origina una hipersensibilidad a calcoflúor y rojo congo, y afecta a la capacidad de apareamiento (Mrsa *et al.*, 1999a). Por otra parte, en mutantes deficientes en β -1,6-glucano, como los mutantes *kre* Δ , se ha detectado un aumento en el porcentaje de proteínas de pared extraíbles con β -1,3-glucanasa y resistentes a la extracción con β -1,6-glucanasa (Kapteyn *et al.*, 1999b). Mientras que en las cepas silvestres este porcentaje es del 16%, en los mutantes *kre* Δ aumenta hasta

más del 80%. Se ha propuesto que las proteínas Pir podrían formar parte de un mecanismo compensatorio, que se activaría en condiciones de niveles deficientes de β -1,6-glucano (véase el apartado 4 de este capítulo).

2.4.3. Regulación de la expresión de las proteínas de pared.

La expresión de numerosas proteínas de la pared celular se ve afectada por las condiciones ambientales y la disponibilidad de nutrientes (Kapteyn *et al.*, 1999a; Smits *et al.*, 1999a). El ejemplo más patente es el de las proteínas de adhesión sexual, Agalp y Ag α lp, cuya transcripción y expresión se inducen en presencia de la feromona de tipo sexual opuesto (Lipke y Kurjan, 1992). Flo1p, implicada en la floculación, es inducida por la depleción de nutrientes, y Sed1p es una de las proteínas mayoritarias en células en fase estacionaria. Cuando las células acometen la esporulación, se producen variaciones, tanto de aumento como de disminución, en la transcripción de varios genes codificantes de proteínas de la pared celular (Chu *et al.*, 1998). Estudios recientes de transcripción basados en la tecnología de los *microarrays* de DNA han mostrado que el patrón de proteínas expresadas en medio rico es distinto al de las proteínas expresadas en medio mínimo; por ejemplo, *UTR2*, un gen que codifica una presunta proteína de pared celular, es cinco veces más abundante en células crecidas en medio rico que en células incubadas en medio mínimo (Kapteyn *et al.*, 1999a).

Asimismo, la expresión de muchas de las proteínas de pared está regulada por el ciclo celular (Smits *et al.*, 1999a). Caro y colaboradores han analizado la transcripción de varios genes codificantes de proteínas de pared a lo largo del ciclo celular (Caro *et al.*, 1998), encontrando que en todos ellos ésta estaba regulada. *CWP1*, *CWP2* y *TIR1* se expresan en las fases S/G2, *SED1* en la fase M, y *TIP1* en la fase G1 temprana. *EGT2* se expresa entre el final de la mitosis y la fase G1 temprana, y en los mutantes *egt2* la separación celular está retrasada (Kovacech *et al.*, 1996), lo cual indica que Egt2p actúa después de la citoquinesis. Los estudios a gran escala de la transcripción en *S. cerevisiae* muestran que aproximadamente el 50% de los genes que codifican proteínas de pared están regulados de manera dependiente del ciclo celular (Smits *et al.*, 1999a). Aunque hay genes que se expresan específicamente en cada fase del ciclo, la mayoría de ellos se expresan al final de la fase M y principio de la fase G1. Además, algunas de las proteínas de la pared celular están localizadas en regiones específicas de esta estructura, lo cual contribuiría también a su regulación (Smits *et al.*, 1999b).

3. Organización modular de la pared celular.

Todos los componentes descritos se unen de forma covalente para formar complejos macromoleculares, que a su vez son ensamblados dando lugar a la estructura de la pared celular (fig. 2). Para estos complejos se ha venido utilizando la denominación de “módulo de construcción” (Lipke y Ovalle, 1998). El módulo estaría formado por una cadena de β -1,3-glucano, unida (al β -1,6-glucano y) a la manoproteína. La relación molar entre β -1,3-glucano, β -1,6-glucano y manoproteínas en la pared es de 1:1:1, lo cual concuerda con el concepto de los módulos (Klis *et al.*, 1997). La quitina está en una relación mucho menor, de manera que el número de cadenas de quitina es equivalente al número de cadenas de β -1,3-glucano soluble en álkalí (aproximadamente un 40%). Así pues, una fracción minoritaria de los módulos estaría también unida a la quitina a través del β -1,6 o del β -1,3-glucano (Lipke y Ovalle, 1998). Los módulos se asocian mediante interacciones no covalentes y enlaces covalentes.

4. Mecanismo compensatorio.

La pared celular fúngica es una estructura esencial para el mantenimiento de la integridad celular, y como tal, es lógico que las células posean mecanismos destinados a salvaguardar esta estructura. Por ejemplo, la mayoría de los genes que codifican proteínas implicadas en la biosíntesis de los componentes de la pared celular son redundantes, es decir, existen varias proteínas que pueden ejercer la misma función y sustituir así la falta de alguna de ellas en un determinado momento (Orlean, 1997).

Por otra parte, observaciones recientes han llevado a proponer la existencia de un mecanismo compensatorio que se activaría cuando la pared celular estuviera dañada, con el fin de asegurar la integridad celular. Este mecanismo fue descrito por primera vez por Popolo y colaboradores (Popolo *et al.*, 1997), que observaron un incremento en la cantidad de quitina en la pared celular de mutantes *gas1* Δ , los cuales presentan niveles disminuidos de β -1,6-glucano insoluble en álcali y de β -1,3-glucano. Este aumento de quitina resultaba además ser esencial para la viabilidad celular. Igualmente, la delección de *FKS1*, la subunidad catalítica de la β -1,3-glucán sintasa, provoca además de un descenso en los niveles de β -1,3-glucano, un marcado aumento en la deposición de quitina en la pared celular (Kapteyn *et al.*, 1997). Este cambio no afecta únicamente a los niveles de quitina, sino también a la arquitectura de la pared. Mientras que en células silvestres solamente el 2% de las proteínas unidas covalentemente a la pared están unidas directamente a la quitina a través del β -1,6-glucano, este porcentaje aumenta hasta el 40% en los mutantes *fkf1* Δ y *gas1* Δ (Kapteyn *et al.*, 1997). El aumento en los niveles de quitina ha sido observado en una amplia variedad de mutantes afectados en diversos procesos relacionados con la pared celular (tabla I) (Dallies *et al.*, 1998; Kapteyn *et al.*, 1999b), lo cual sugiere que el aumento de la deposición de quitina en las paredes laterales constituye un mecanismo de reparación generalizado, dirigido a compensar daños en la pared y asegurar así la integridad celular.

Tabla I. Mutantes afectados en procesos relacionados con la pared celular que presentan niveles altos de quitina en esta estructura (Kapteyn *et al.*, 1999a).

Mutante	Fenotipo relacionado con la pared	Referencia
<i>cwh6/gpi3</i>	Incorporación deficiente de proteínas de pared celular	(Ram <i>et al.</i> , 1994; Vossen <i>et al.</i> , 1997)
<i>fkf1</i> Δ	Niveles disminuidos de β -1,3-glucano	(Kapteyn <i>et al.</i> , 1997; Ram <i>et al.</i> , 1998a)
<i>gas1</i> Δ	Niveles disminuidos de β -1,3-glucano	(Popolo <i>et al.</i> , 1997)
<i>knr4</i> Δ	Niveles disminuidos de β -1,3-glucano	(Hong <i>et al.</i> , 1994)
<i>kre1</i> Δ	Niveles disminuidos de β -1,6-glucano	(Kapteyn <i>et al.</i> , 1999b)
<i>kre5</i> Δ	Niveles disminuidos de β -1,6-glucano	(Kapteyn <i>et al.</i> , 1999b)
<i>kre6</i> Δ	Niveles disminuidos de β -1,6-glucano	(Kapteyn <i>et al.</i> , 1999a; Ram <i>et al.</i> , 1994)
<i>mn9/cwh1</i>	Deficiencia en la N-glicosilación de proteínas de pared	(Lussier <i>et al.</i> , 1997; Ram <i>et al.</i> , 1994)
<i>pmt1 pmt2</i>	Deficiencia en la O-glicosilación de proteínas de pared	(Gentzsch y Tanner, 1996)

En los mutantes delecionados en los genes *GAS1* y *FKS1* se ha observado también una mayor cantidad de manano en la pared celular y un incremento de los niveles de Cwplp y

Fks2p, que podrían igualmente formar parte de reacciones compensatorias encaminadas a mantener la integridad celular (Ram *et al.*, 1998a). Por otra parte, como ya se ha comentado anteriormente, en los mutantes *kreΔ*, que liberan gran cantidad de proteínas GPI al medio por un fallo en el anclaje al β -1,6-glucano, se ha observado un incremento en los niveles de proteínas Pir, ancladas a través del β -1,3-glucano, en la pared celular, además de un aumento en la expresión de estas proteínas (Kapteyn *et al.*, 1999b). Los mutantes *kreΔ* también presentan un incremento en los niveles de β -1,3-glucano, además de un gran aumento en la transcripción de *FKS2* (Kapteyn *et al.*, 1999b). Todos estos fenómenos parecen formar parte de uno o varios mecanismos compensatorios, que se activan en condiciones de daño o debilitamiento de la pared celular.

5. Mantenimiento de la integridad celular. La ruta de MAP kinasas mediada por Pkc1p.

La biogénesis de la pared celular está regulada tanto por controles de ciclo celular, como por los programas de desarrollo celular o por las condiciones ambientales. La síntesis y ensamblaje de los componentes de esta estructura ha de estar muy controlada, de manera que en todo momento se mantenga la integridad celular. Algunos defectos muy graves en la síntesis de componentes específicos de la pared celular provocan una fragilidad osmótica, aunque, como ya se ha comentado, *S. cerevisiae* puede tolerar e incluso contrarrestar cambios considerables en la composición de su pared celular.

La ruta PKC está constituida por una cascada de MAP kinasas que comprende la MAPKKK Bck1p, las MAPKK redundantes Mkk1p y Mkk2p, y la MAPK Slt2p. Esta cascada es activada por Pkc1p, que probablemente fosforila residuos específicos de serina y treonina en Bck1p, conduciendo a la fosforilación secuencial de los demás componentes del módulo (Heinisch *et al.*, 1999) (fig. 6). Las mutaciones en los distintos componentes de la ruta de transducción de señales mediada por la proteína Slt2p provocan fragilidad osmótica, lo cual se pone de manifiesto ya que los mutantes deficientes en alguna de las proteínas que componen esta ruta lisan a temperatura no permisiva (37°C), y este defecto es remediable por la adición de una alta concentración de sales o sorbitol a concentración 1 M al medio de cultivo (Heinisch *et al.*, 1999). Estas observaciones indican que la ruta de MAP kinasas mediada por Pkc1p está implicada en el mantenimiento de la integridad celular, y que posee un papel regulador en la biosíntesis de la pared celular (Heinisch *et al.*, 1999; Orlean, 1997).

La ruta de integridad celular se induce en periodos de crecimiento polarizado, durante el crecimiento de la yema o la formación del *shmoo*, y también en respuesta a condiciones ambientales que atentan contra la estabilidad de la pared, como son la alta temperatura, el choque hipoosmótico, o una interferencia en la síntesis de dicha estructura (Gustin *et al.*, 1998). Recientemente se han descrito otros estímulos que provocan la activación de Slt2p, la MAPK de la ruta, como la cafeína y el vanadato (Martín *et al.*, 1999). Por otra parte, Slt2p también está activada de forma constitutiva a 24°C en diversos mutantes afectados en la pared celular, como *gas1Δ*, *fks1Δ* (de Nobel *et al.*) y *ecm33Δ* (Vázquez, 1999).

Numerosos mutantes afectados en los procesos de síntesis de componentes de la pared celular presentan letalidad sintética con mutantes de la ruta PKC. Además, en algunos casos, los alelos silvestres de dichos genes pueden suprimir la lisis de mutantes *pkc1Δ* (Orlean, 1997). Por ejemplo, los mutantes *kre2Δ*, *kre6Δ* y *kre11Δ* son sintéticos letales con *pkc1Δ*, y además *kre6Δ* es también sintético letal con *slt2Δ* y *mkk1Δ mkk2Δ* (Roemer *et al.*, 1994). Los

dobles mutantes *fks1Δ pkc1Δ* y *gas1Δ pkc1Δ* también son sintéticos letales (Garrett-Engele *et al.*, 1995; Popolo *et al.*, 1997). Por otra parte, el mutante *slt2Δ* presenta letalidad sintética con *fks1Δ* (Garrett-Engele *et al.*, 1995), con *gas1Δ* (L. Popolo, comunicación personal) y con *och1Δ* (Lee y Elion, 1999), y el doble mutante *slt2Δ mnn2Δ* muestra un crecimiento muy lento (Nakamura *et al.*, 1997; Rayner y Munro, 1998).

Entre los componentes que funcionan *upstream* o por encima de esta ruta se encuentra Rho1p (Heinisch *et al.*, 1999). Esta proteína pertenece a la familia de proteínas GTPasas pequeñas, y está a su vez regulada por los GEFs (factores de intercambio GDP/GTP) codificados por *ROM1* y *ROM2* (Ozaki *et al.*, 1996), y por dos GAPs (proteínas activadoras de la actividad GTPasa), codificadas por *BEM2* y *SAC7* (Peterson *et al.*, 1994; Schmidt *et al.*, 1997). Recientemente se ha demostrado el papel de Rom2p en el control de Rho1p en respuesta a alteraciones de la pared celular (Bickle *et al.*, 1998). Rho1p interviene en el mantenimiento de la integridad celular no sólo activando la ruta de MAP kinasas a través de Pkc1p, sino también por su función en la biosíntesis de la pared celular como subunidad reguladora del complejo de la β -1,3-glucán sintasa (Qadota *et al.*, 1996).

Se ha propuesto que la activación de la ruta PKC puede producirse en respuesta a alteraciones mecánicas en la membrana (Kamada *et al.*, 1995). En presencia de defectos en la pared celular, la membrana plasmática podría ser capaz de “estirarse” y detectar así el debilitamiento de la pared. De hecho, la ruta PKC se activa en respuesta al tratamiento con compuestos que producen un estiramiento de la membrana plasmática por insertarse en su

cara interna. Esta hipótesis también explicaría la activación de la ruta en respuesta a alta temperatura, ya que esto originaría un aumento en la fluidez de la membrana.

Independientemente de que éste sea el mecanismo que dispara la señalización a través de esta ruta, se han identificado posibles sensores de las perturbaciones en la superficie celular. Uno de estos sensores es la proteína Slg1p/Wsc1p/Hcs77p, que pertenece a una familia de proteínas homólogas constituida por cuatro componentes (Wsc1p-Wsc4p) (Verna *et al.*, 1997). Slg1p es una proteína de membrana de tipo I, que es necesaria para la activación de la cascada de MAP kinasas mediada por Slt2p en respuesta a estrés térmico. Sin embargo, no se conoce aún el mecanismo por el cual la señal es transmitida hacia Pkc1p. Otro de los posibles sensores extracelulares es Mid2p, que presenta semejanzas estructurales con Slg1p. Mid2p ha sido localizada en la membrana plasmática, y su presencia resulta esencial para que se produzca la fosforilación en tirosina de Slt2p tras la exposición a alta temperatura, calcoflúor y feromonas (Ketela *et al.*, 1999). Además, la delección de *MID2* reduce la activación de Slt2p en respuesta a vanadato y choque térmico, aunque no la que se produce en respuesta a cafeína (Martín *et al.*, 1999). Tampoco en este caso se conoce cómo la señal es transmitida hacia Pkc1p. Una posibilidad que se ha propuesto es que sean Rom2p, la GEF de Rho1p, y Tor2p, una fosfatidilinositol-4-kinasa activadora de Rom2p, las proteínas encargadas de transmitir la señal hacia Rho1p (Smits *et al.*, 1999a).

En cuanto a las dianas de esta ruta reguladora de la integridad celular, se han identificado varios genes cuya expresión depende de Slt2p (Igual *et al.*, 1996; Zhao *et al.*, 1998), que codifican enzimas implicadas en la biosíntesis de la pared celular: *FKS1* y *FKS2*, que codifican subunidades catalíticas de la β -1,3-glucán sintasa, *MNN1*, que codifica una α -1,3-manosil transferasa, *GAS1*, que codifica una β -1,3-glucanosil transferasa, *KRE6*, implicado en la síntesis del β -1,6-glucano, y *CHS3*, que codifica una quitín sintasa. No obstante, la base molecular de esta regulación es aún desconocida. Se han identificado dos dianas de fosforilación de Slt2p (revisado en Heinisch *et al.*, 1999). Una de ellas es el factor transcripcional SBF (de *SCB-binding factor*), un heterodímero compuesto por las proteínas Swi4p y Swi6p, que regula el ciclo celular y el crecimiento polarizado, principalmente en la transición de las fases G1 a S. Los mutantes *swi4 Δ* y *swi6 Δ* presentan una pared celular debilitada, y además, varios genes codificantes de proteínas relacionadas con la biosíntesis de la pared celular presentan elementos SCB en sus regiones promotoras (Horak *et al.*, 1999; Igual *et al.*, 1996). El factor SBF participa en la regulación por ciclo celular de genes implicados en la biosíntesis de la pared celular citados anteriormente (Igual *et al.*, 1996). La otra diana de Slt2p es Rlm1p, un activador transcripcional cuya delección no manifiesta un fenotipo tan severo como la mutación de otros componentes de la ruta (Watanabe *et al.*, 1995). El análisis, mediante *microarrays* de DNA, de la expresión de todo el genoma de *S. cerevisiae* en respuesta a la activación de la ruta PKC ha identificado 23 genes cuya transcripción está regulada por esta ruta de integridad celular (Jung y Levin, 1999). La mayoría de estos genes codifican proteínas localizadas en la pared celular o enzimas implicadas en su biosíntesis, y la regulación de todos ellos, a excepción de *FKS2*, es dependiente de Rlm1p.

Recientemente se ha propuesto que una segunda cascada de transducción de señales, a la que se ha denominado ruta SVG (de *STE-Vegetative Growth*) podría funcionar, en parte, en el mantenimiento de la integridad celular de forma paralela a la ruta PKC (Lee y Elion, 1999). Dicha ruta está constituida por las proteínas Ste20p, Ste11p, Ste7p, Kss1p y Ste12p (fig. 7), y regula la expresión de, entre otros genes, *FKS2*.

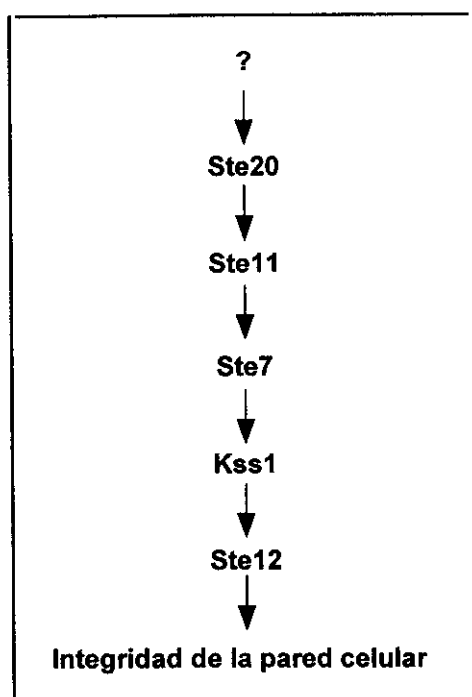


Fig. 7. Modelo propuesto para la ruta SVG (*STE-Vegetative Growth*) de mantenimiento de la integridad de la pared celular.

II. PROTEOMA Y PROTEÓMICA

1. Introducción.

Los rápidos avances conseguidos en la tecnología del DNA están permitiendo la secuenciación sistemática de los genomas de diversos organismos. En los últimos cuatro años se ha completado la secuenciación del genoma de varios procariotas, y también de dos organismos eucariotas (Wilkins *et al.*, 1997; Williams, 1999). La levadura *Saccharomyces cerevisiae* fue el primer eucariota unicelular cuyo genoma fue secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996b), y recientemente se completó la secuencia de un organismo eucariota pluricelular, el nematodo *Caenorhabditis elegans* (The *C. elegans* Sequencing Consortium, 1998). Actualmente están en proceso varias iniciativas adicionales de secuenciación de genomas; muy pronto veremos las secuencias completas de *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* y de otros organismos (Humphery-Smith *et al.*, 1997; Williams, 1999). Recientemente hemos asistido a un hito histórico, la secuenciación del primer cromosoma humano completo, el número 22, y se prevé que en el plazo de un año se complete la secuencia de todo el genoma humano.

Todos estos proyectos de secuenciación a gran escala de los genomas de diversas especies están proporcionando una ingente cantidad de secuencias de DNA con extraordinaria rapidez. Sin embargo, aún se desconoce la función biológica de la mayoría de las proteínas codificadas por los marcos abiertos de lectura detectados, e incluso si realmente éstos se expresan, en qué condiciones lo hacen, y si el producto génico sufre algún tipo de procesamiento (Dove, 1999; Humphery-Smith *et al.*, 1997). Así pues, el siguiente paso en la era post-genómica debe ser esclarecer estas cuestiones y asignar una función a los nuevos ORFs descubiertos.

La Proteómica es uno de los campos que puede ayudar a establecer una conexión entre las secuencias genómicas y su comportamiento biológico (Blackstock y Weir, 1999; Dove, 1999; Wilkins *et al.*, 1997), constituyendo una herramienta importante en el análisis funcional de genes de función desconocida. Su utilidad y aplicabilidad se han puesto de manifiesto por el extenso número de publicaciones y conferencias que han hecho referencia a esta nueva disciplina en los últimos años. El término “proteoma” apareció por primera vez en la literatura en 1995 (Wasinger *et al.*, 1995), y designa el conjunto de PROTEÍNAS expresadas por un genOMA, una célula o un tejido (Wilkins *et al.*, 1996). La Proteómica consiste, pues, en el estudio a gran escala de los productos génicos de un genoma desde un punto de vista dinámico -niveles de proteína, modificaciones post-traduccionales, interacciones entre proteínas, etc.- con el fin de obtener una visión global e integrada de los procesos celulares (Anderson y Anderson, 1998; Blackstock y Weir, 1999).

2. Electroforesis bidimensional.

La electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida (2D-PAGE) permite separar hasta miles de proteínas en un solo experimento, y constituye actualmente el método más eficiente para la separación de mezclas muy complejas de proteínas (Blackstock y Weir, 1999; Celis y Gromov, 1999; Wilkins *et al.*, 1997). Desde su desarrollo en 1975 (O'Farrell, 1975), la técnica ha experimentado importantes progresos que han hecho factible el análisis proteómico. La Proteómica se desarrolló a partir de la tecnología de la electroforesis

bidimensional, y ésta continúa y continuará desempeñando un papel clave en los proyectos proteómicos (Celis y Gromov, 1999; Humphery-Smith *et al.*, 1997).

La electroforesis bidimensional está basada en una separación de las proteínas en función de la carga, seguida de una separación en función de la masa molecular. La separación en la primera dimensión se realiza mediante isoelectroenfoque (IEF), durante el cual las proteínas son separadas en un gradiente de pH hasta que alcanzan una posición en la que su carga neta es cero, es decir, su punto isoelectrónico. En una segunda dimensión, las proteínas son separadas mediante electroforesis en presencia de SDS (Laemmli, 1970). La alta resolución de la técnica se debe a que las dos separaciones se basan en parámetros independientes.

La innovación clave para la electroforesis bidimensional fue el desarrollo de geles con un gradiente de pH inmovilizado (IPG) (Bjellqvist *et al.*, 1993a; Bjellqvist *et al.*, 1993b). El gradiente de pH inmovilizado elimina los problemas de inestabilidad del gradiente y baja capacidad de carga que iban asociados a los gradientes de pH preparados con anfólitos *carrier* (Celis y Gromov, 1999; Wilkins *et al.*, 1997). En los geles con IPG, el gradiente es generado por las llamadas “inmobilinas”, y está co-polimerizado con la matriz de acrilamida del gel. Este sistema ha permitido mejorar enormemente la resolución y reproducibilidad de los geles, así como aumentar la cantidad de proteína que puede ser cargada (Bjellqvist *et al.*, 1993a; Bjellqvist *et al.*, 1993b). La reproducibilidad conseguida con los IPGs ha hecho posible incluso la comparación de mapas entre distintos laboratorios, facilitando así el intercambio de información (Blomberg *et al.*, 1995; James, 1997). Por otra parte, la posibilidad de realizar separaciones preparativas aumenta las probabilidades de éxito en análisis posteriores (Humphery-Smith *et al.*, 1997).

Existen además otras áreas en las que también se han realizado avances importantes (Celis y Gromov, 1999; Wilkins *et al.*, 1997). La solubilización de las muestras es un proceso clave en la electroforesis bidimensional. La incorporación de nuevos aditivos ha mejorado la solubilización de las proteínas durante el isoelectroenfoque, facilitando la transferencia de las mismas al gel en la segunda dimensión (Herbert, 1999). El hecho de que los geles con IPG comerciales se suministren en forma deshidratada, y la posibilidad de aplicar la muestra en cualquier punto de los mismos permitieron la puesta a punto de un procedimiento para cargar ésta durante la rehidratación del gel, que evita la pérdida de muestra por precipitación en el pocillo, permitiendo cargar cantidades mucho mayores de proteína (Sánchez *et al.*, 1997). Por otra parte, se han desarrollado IPGs en intervalos estrechos de pH, con lo cual es posible aumentar la resolución en una zona determinada (Righetti y Bossi, 1997). La combinación de éstos con el procedimiento de carga anteriormente descrito incrementa aún más la capacidad de los geles.

Por último, parece claro que con el fin de reducir la complejidad de las separaciones bidimensionales de extractos celulares completos, existe una tendencia a realizar fraccionamientos subcelulares previos (Celis y Gromov, 1999; Herbert, 1999). Esta estrategia puede además facilitar la detección de proteínas presentes en bajo número de copias, como suele ser el caso de proteínas reguladoras.

En cuanto a la detección, tradicionalmente se ha venido empleando el marcaje radiactivo o la tinción con azul de Coomassie, o con plata, para conseguir mayor sensibilidad (Wilkins *et al.*, 1997). Recientemente se ha desarrollado un método de tinción de plata superficial compatible con la digestión proteica y la espectrometría de masas (Shevchenko *et*

al., 1996b), aunque el umbral de detección no es tan sensible como el conseguido con los protocolos más usuales. Asimismo se han comenzado a usar tinciones y marcajes fluorescentes, que presentan una sensibilidad comparable a la de la plata, y también permiten el análisis posterior de las proteínas mediante espectrometría de masas (Celis y Gromov, 1999; Fey *et al.*, 1997; Valdés *et al.*; Wilkins *et al.*, 1997).

3. Caracterización de proteínas.

En los proyectos proteómicos la identificación de proteínas es esencial. La identificación implica asignar un nombre o una entrada de una base de datos a cada proteína o mancha proteica de un gel, para de esta forma unir genoma y proteoma (Wilkins *et al.*, 1997). Es el primer paso para otros estudios que suponen en última instancia la caracterización funcional. Además, en el caso de los geles bidimensionales, la identificación de las manchas proteicas conduce a la creación de “mapas de referencia”, que definen las proteínas expresadas por un organismo o tejido en unas condiciones determinadas. En el ámbito molecular, la identificación de proteínas a partir de geles bidimensionales contribuye a verificar la información generada en los proyectos de secuenciación, permitiendo, por ejemplo, confirmar predicciones de marcos abiertos de lectura.

Las proteínas pueden ser identificadas por diversos procedimientos, entre los que se incluyen la secuenciación del extremo N-terminal, detección con anticuerpos específicos, composición de aminoácidos, comigración con proteínas conocidas, y sobreexpresión y delección de genes (Garrels *et al.*, 1994; Humphery-Smith *et al.*, 1997; Sagliocco *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1997). Todos estos métodos generalmente son lentos, trabajosos, o caros, y por tanto no resultan apropiados para su utilización como estrategias a gran escala.

Debido a su rapidez y elevada sensibilidad, y a los grandes avances conseguidos en su automatización (Patterson, 1998), la espectrometría de masas se ha convertido en el método de elección para la identificación de proteínas a gran escala, el primer paso en el estudio del proteoma de distintos organismos (Wilkins *et al.*, 1997), siendo también posible la caracterización de modificaciones post-traduccionales que pueden presentar relevancia fisiológica, tales como la glicosilación y la fosforilación (Blackstock y Weir, 1999; Wilkins *et al.*, 1997; Williams, 1999). La estrategia general empleada para la identificación a gran escala de proteínas mediante espectrometría de masas (Shevchenko *et al.*, 1996) se muestra en la figura 8.

4. Análisis de proteínas mediante estrategias basadas en la espectrometría de masas.

El propósito del presente apartado es realizar un breve resumen explicativo de una técnica que ha experimentado un gran auge en los últimos años, la espectrometría de masas, y sus aplicaciones en el análisis de proteínas. Se ha hecho énfasis en aquellas tecnologías dedicadas a la identificación de proteínas que han sido empleadas en este trabajo. Las referencias citadas son en su mayoría revisiones recientes que pueden proporcionar información más detallada.

Los últimos diez años han contemplado un avance espectacular en el campo de la espectrometría de masas respecto a su utilización como complemento al campo de la Biología. Más concretamente, en la actualidad la espectrometría de masas representa una

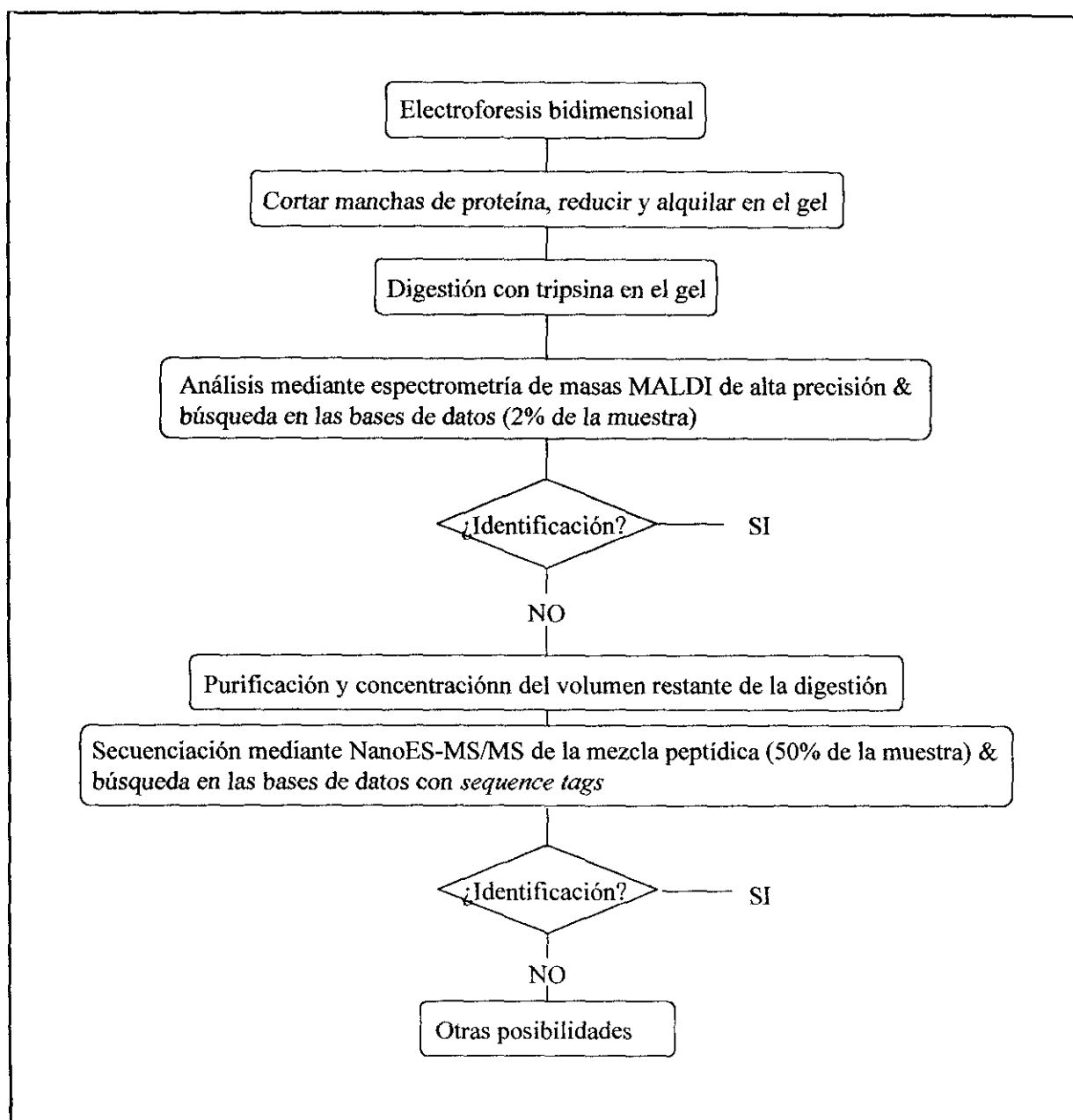


Fig. 8. Estrategia general para la identificación de proteínas mediante espectrometría de masas. Modificado de Shevchenko *et al.*, 1997.

herramienta de considerable interés para el análisis de la estructura primaria de péptidos y proteínas. Su uso se ha ido extendiendo en los últimos tiempos, debido a la capacidad de la técnica de solventar problemas no abordables mediante otras técnicas químicas tradicionales. La espectrometría de masas permite determinar la masa molecular de péptidos y proteínas con gran exactitud, usando una pequeñísima cantidad de muestra, del orden de femtomoles. Además, esta técnica es capaz de proporcionar secuencias aminoacídicas a partir de péptidos, incluso si éstos están presentes en una mezcla, e independientemente de que posean modificaciones, mostrando también en este análisis una elevada sensibilidad.

4.1. Espectrometría de masas. Fundamentos técnicos.

La espectrometría de masas es una técnica analítica que consiste en la formación de iones en fase gaseosa a partir de moléculas sin carga, y la determinación de sus masas moleculares. Los espectrómetros de masas están formados esencialmente por una fuente de ionización y un analizador/detector de masas. Los iones son separados en el analizador en función de la razón entre su masa y su carga (m/z), y detectados, obteniéndose un espectro de masas, que es la representación de la abundancia de los iones frente a sus valores de m/z .

En la última década se han desarrollado métodos de ionización suaves, que han hecho posible el análisis de grandes biomoléculas no volátiles (Roepstorff, 1997). Las técnicas más empleadas hoy en día para el análisis de proteínas y péptidos son la ionización mediante electrospray (ESI, *electrospray ionisation*) y la ionización por desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI, *matrix-assisted laser-desorption ionisation*), introducidas en 1988 (Carr y Annan, 1997). Además del desarrollo de estos dos procedimientos de ionización, otras tecnologías introducidas recientemente han contribuido a la mejora del funcionamiento y al incremento en la sensibilidad de las espectrometrías de masas ESI y MALDI. Entre estos avances cabe destacar, en primer lugar, el perfeccionamiento de procedimientos para la purificación de muestras en pequeña escala (microescala), tales como la extracción de péptidos procedentes de la digestión enzimática realizada en los propios geles, el uso de resinas empaquetadas en capilares, que permiten purificar entre 1 y 5 μ l de muestra, y la utilización de HPLC en pequeña escala, con columnas de diámetro interno menor de 1 mm. En segundo lugar, el desarrollo de fuentes de electrospray de flujo ultra-lento (< 50 nl/min.), que permiten prolongar el tiempo de análisis de la muestra, y por último, el diseño de diversas estrategias de búsqueda por ordenador, que conduzcan a la identificación de proteínas en las bases de datos de proteínas y DNA a partir de los datos proporcionados por la espectrometría de masas (revisado en Carr y Annan, 1997; Wilkins *et al.*, 1997).

4.1.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF.

En la espectrometría de masas de tipo MALDI los iones se originan a partir de una muestra sólida. Las moléculas de la muestra son co-cristalizadas con un exceso de una matriz, un compuesto orgánico que absorbe gran cantidad de radiación UV. Las moléculas de proteínas o péptidos son ionizadas mediante pulsos de un láser UV sobre la muestra. Normalmente la ionización de tipo MALDI se asocia en los espectrómetros de masas a detectores de tipo TOF (*Time-of-Flight*). Los iones formados son acelerados mediante un campo eléctrico muy intenso y se hacen pasar a un tubo, al final del cual se encuentra el detector. El tiempo que tarda un ion en llegar al detector depende de su masa, por lo que el valor m/z de cada ion puede ser calculado a partir de la medición del tiempo que tarda en llegar al detector (Patterson y Aebersold, 1995).

La espectrometría de masas MALDI-TOF es extremadamente útil para el análisis de péptidos. Este tipo de ionización produce principalmente iones con una sola carga. La fácil interpretación de los espectros, la rapidez del análisis, junto con la alta sensibilidad de la técnica y la tolerancia a la presencia de sales en la muestra, hacen de ésta una técnica de elección para el análisis de digestiones enzimáticas de proteínas (Carr y Annan, 1997).

4.1.2. Espectrometría de masas con ionización mediante electrospray (ESI MS).

En este tipo de espectrometría, los iones se forman a partir de una muestra en solución, que se vaporiza haciéndola pasar a través de una fina aguja a la que se aplica una alta diferencia de potencial. Las gotas cargadas pasan a una zona de potencial más bajo, y son desolvatadas, adquiriendo protones las moléculas de la muestra, y dando lugar a iones con carga múltiple. Los iones se dirigen hacia el analizador y detector de masas, que suele ser de tipo cuadrupolo o triple cuadrupolo. La sensibilidad de esta técnica es algo menor que cuando se emplea la ionización de tipo MALDI (Patterson y Aebersold, 1995). Sin embargo, la exactitud de las medidas en ESI-MS es superior, consiguiéndose de forma rutinaria una precisión del 0.01% (Carr y Annan, 1997).

Con frecuencia, los espectrómetros de masas de este tipo están conectados *on-line* a un equipo de cromatografía líquida (LC-MS). Ello es debido a que el disolvente de elección para las muestras destinadas a ser analizadas mediante espectrometría de masas son soluciones de solventes orgánicos volátiles en agua, con pequeñas cantidades de un ácido o una base volátil, es decir, los mismos con los que se consigue una separación óptima de péptidos o proteínas mediante cromatografía líquida en fase reversa. El hecho de conectar ambas técnicas reduce o elimina la necesidad de fraccionar mezclas complejas antes de su análisis, evitando pérdidas de muestra. Además, la columna de cromatografía puede optimizarse para que la muestra a analizar eluya con una concentración elevada a un flujo muy lento, incrementando enormemente la sensibilidad de la espectrometría de masas.

El último avance de la espectrometría de masas ESI-MS ha sido la introducción de microcapilares de borosilicato recubiertos de oro para la inyección de la muestra en el espectrómetro (Wilm *et al.*, 1996). Esta técnica, a la que se ha denominado “nanoelectrospray”, permite analizar volúmenes de muestra de 1-2 μ l durante un periodo de tiempo de unos 30 minutos. Ello resulta en una optimización de la señal por reducción del ruido, y la posibilidad de llevar a cabo espectrometría de masas en tándem en un equipo de tipo cuadrupolo, para determinar la secuencia aminoacídica de péptidos. La sensibilidad conseguida es del orden de femtomoles (Wilm *et al.*, 1996).

4.2. Estrategias de identificación de proteínas mediante EM.

4.2.1. “Huella” de masas peptídicas.

La “huella peptídica” de una proteína, es decir, el conjunto de masas peptídicas generadas tras la digestión específica de una proteína, constituye una de las estrategias para la identificación de proteínas. La proteína de interés, normalmente aislada o purificada mediante electroforesis, es fragmentada, bien química o enzimáticamente, y la mezcla de péptidos resultante es analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF para determinar sus masas. Se genera así un conjunto de masas peptídicas, que constituye una huella característica de esa proteína (Patterson y Aebersold, 1995). Se han desarrollado diversos algoritmos que comparan los conjuntos de masas peptídicas experimentales con las masas peptídicas teóricas calculadas para cada una de las proteínas presentes en una base de datos, muchos de los cuales están a disposición de la comunidad científica a través de Internet. La coincidencia de un número de masas peptídicas experimentales y teóricas conduce a la identificación de la proteína analizada. La base de este método para que la identificación sea fiable es la exactitud en la medida de las masas peptídicas. A mayor exactitud, mayor es la confianza en la identificación asignada. Para que una proteína sea identificada de forma concluyente, Mann y

colaboradores proponen que al menos cinco masas peptídicas experimentales tienen que coincidir con las teóricas, estableciendo un margen de error de 50 ppm, y siendo la cobertura de la secuencia un mínimo de un 15% (Mann *et al.*, 1993).

Como ya se ha comentado, la espectrometría de masas MALDI-TOF es la técnica de elección para la determinación de las masas de los péptidos procedentes de la digestión de una proteína. La tripsina es el reactivo más empleado en las digestiones enzimáticas, por su alto grado de especificidad. Esta enzima corta por detrás de aminoácidos básicos, lisina o arginina, siempre que el residuo inmediatamente posterior no sea prolina. Los productos de la autólisis de la tripsina pueden ser utilizados como patrones internos para calibrar el espectrómetro (M. Ward, comunicación personal). La exactitud que se consigue en la medida de las masas peptídicas utilizando esta técnica es muy grande, pudiendo llegar a ser del orden de 0.01-0.05% cuando se combinan la extracción retardada de iones y un detector de tipo TOF en modo reflector (Roepstorff, 1997). La sensibilidad de la técnica está en el nivel de sub-picomol; existen en la literatura trabajos que describen sensibilidades del orden de decenas de femtomoles (Shevchenko *et al.*, 1996a; Wilm *et al.*, 1996).

Entre los defectos que puede presentar esta estrategia de identificación están la falta de un número suficiente de péptidos que permitan una identificación concluyente, debida a pequeñas cantidades de muestra, y cambios no esperados en los valores de m/z , como consecuencia de modificaciones de las proteínas, como glicosilación o fosforilación (Dongré *et al.*, 1997). Por supuesto, el requisito fundamental para este análisis es que la proteína en cuestión esté presente en las bases de datos, por lo que este método es ideal para la identificación de proteínas procedentes de organismos cuyo genoma está totalmente secuenciado, o al menos, cuyas proteínas mayoritarias lo están. Desde la secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996b), algunos grupos han abordado la identificación sistemática del proteoma de esta levadura mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (Larsson *et al.*, 1997; Sagliocco *et al.*, 1996; Shevchenko *et al.*, 1996), demostrando su aplicabilidad para conectar genoma y proteoma. En otras ocasiones, sin embargo, la búsqueda en las bases de datos puede conducir a la identificación de una proteína homóloga procedente de otra especie, lo cual, si se verifica mediante otros datos, puede resultar muy útil en organismos poco caracterizados genéticamente (Cordwell *et al.*, 1995; Pardo *et al.*, 1999).

4.2.2. Espectrometría de masas en tándem y su aplicación al análisis de secuencias peptídicas.

El criterio más determinante para la identificación de proteínas es una secuencia aminoacídica. Esta información puede ser obtenida mediante la espectrometría de masas en tándem (MS/MS). Un espectrómetro de masas en tándem consiste en dos analizadores de masas separados por un dispositivo de activación de iones. Habitualmente el equipo empleado es un espectrómetro con fuente de ionización por electrospray y detector de tipo triple cuadrupolo. Este diseño permite separar un ion determinado usando el primer analizador, inducir su disociación, y analizar los productos resultantes en el segundo analizador (Patterson y Aebersold, 1995). La técnica más empleada para la fragmentación de iones peptídicos es la disociación inducida por colisión (CID, *collision-induced dissociation*), que supone el choque de los iones a baja velocidad con un gas inerte como el argón. En estas condiciones, el ion elegido (denominado ion precursor) se fragmenta por los enlaces peptídicos, dando lugar a una "escalera" de iones peptídicos, cuyas masas son detectadas en el segundo analizador (fig. 9). Éstas proporcionan información estructural de la secuencia del péptido. La diferencia

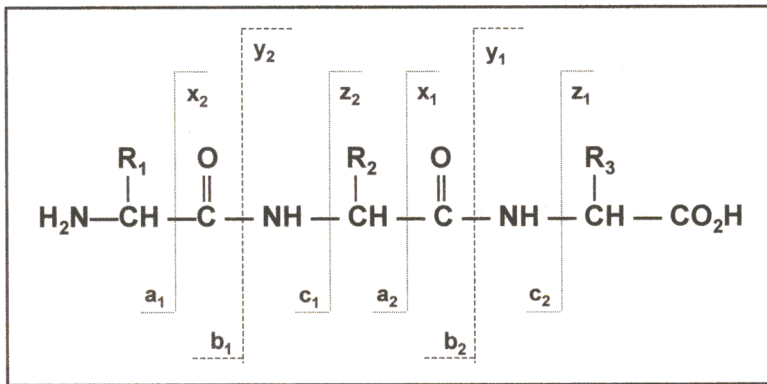


Fig. 9. Iones más comunes resultantes de la fragmentación de péptidos y su notación (reproducido de Wilkins *et al.*, 1997). En este caso se muestra la fragmentación de un péptido de tres aminoácidos en series de iones "hijos". La fragmentación de los enlaces peptídicos origina iones de la serie "y" si la carga positiva permanece en el extremo N-terminal del péptido, o iones de la serie "b" si la carga permanece en el extremo C-terminal. Sólo el fragmento cargado será detectado después de la fragmentación. Las series "b" o "y" resultantes de la fragmentación dan lugar a una escalera de péptidos, y la diferencia de masa entre éstos proporciona información de la secuencia, en función del aminoácido en el que difieran. También puede producirse la rotura de otros enlaces a lo largo del péptido, generándose los iones de las series "a", "c", "x" y "z".

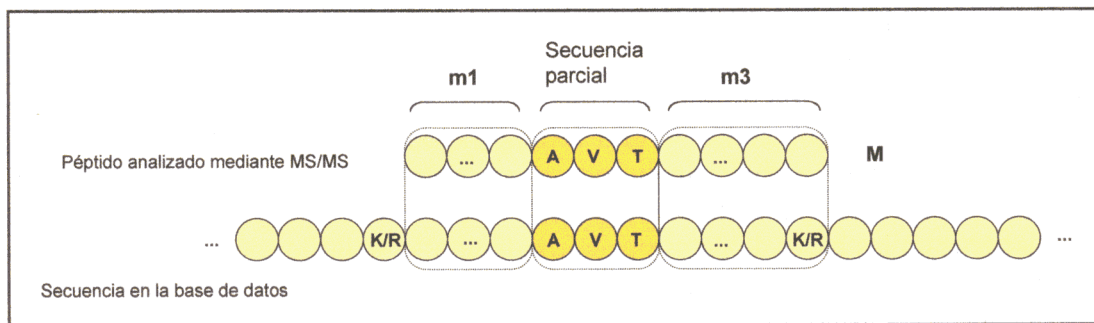


Fig. 10. Identificación de proteínas mediante *sequence tag* (Mann y Wilm, 1994). La secuencia parcial AVT es interpretada a partir del espectro MS/MS. M es el peso molecular del péptido analizado. m3 es la masa del ion más pequeño de la serie que define la secuencia parcial. m1 es la diferencia entre la masa del péptido y la masa del ion mayor que define la secuencia parcial. La especificidad de corte en este caso (digestión con tripsina) viene dada por la presencia de los residuos K o R en el extremo C-terminal de los péptidos.

de masa entre iones consecutivos define un residuo aminoacídico. La secuencia aminoacídica se deduce sustrayendo los valores de m/z de iones adyacentes (Dongré *et al.*, 1997).

Con frecuencia es difícil obtener la secuencia completa del péptido. Recientemente, Mann y colaboradores (Mann y Wilm, 1994) han descrito una estrategia para la identificación de proteínas que usa una secuencia parcial obtenida mediante MS/MS (u otro método), junto con la masa del péptido intacto. No es necesaria, por tanto, la interpretación del espectro completo; bastan incluso dos residuos aminoacídicos. La secuencia parcial, junto con la masa

del péptido del cual proviene, y la posición que ocupa dentro de éste (también deducible del espectro MS/MS), constituye lo que se ha llamado *sequence tag* (fig. 10). A estos tres criterios se puede añadir la especificidad de corte de la enzima. Esta “etiqueta de secuencia” es empleada para realizar las búsquedas en las bases de datos, que con frecuencia dan como resultado una única entrada (Shevchenko *et al.*, 1997), identificándose así la proteína de forma concluyente.

5. Aplicaciones.

En resumen, la Proteómica constituye un nuevo campo surgido de las sustanciales mejoras conseguidas en la separación de proteínas de forma semipreparativa y en la sensibilidad de los métodos de caracterización de proteínas. Son de destacar igualmente los avances en bioinformática, incluyendo el análisis de imagen, creación y conexión de bases de datos, e interpretación de los datos procedentes de espectrometría de masas, que están permitiendo analizar e integrar de manera mucho más eficaz toda la información generada.

Respecto a la aplicación de la Proteómica en el estudio de *S. cerevisiae*, se han publicado varios mapas bidimensionales de extractos citoplasmáticos (Garrels *et al.*, 1997; Perrot *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 1996), disponibles a través de Internet, en incluso se han realizado análisis proteómicos de la respuesta de este microorganismo a diversas condiciones de estrés (Godon *et al.*, 1998; Norbeck y Blomberg, 1997a). Está en marcha un proyecto europeo con base en el *Centre for Proteome Analysis* (Odense, Dinamarca), uno de cuyos objetivos es la creación de mapas bidimensionales e identificación de todas las proteínas de diversos orgánulos de esta levadura, como membrana plasmática, ribosomas, aparato de Golgi o núcleo. Asimismo, otra de las iniciativas del proyecto consiste en el análisis proteómico de los mutantes generados en el proyecto europeo de análisis funcional EUROFAN.

Además de proporcionar información básica molecular sobre el estado celular, la Proteómica tiene también aplicación en el ámbito clínico y biomédico (Blackstock y Weir, 1999; Celis y Gromov, 1999; Wilkins *et al.*, 1997). La posibilidad de visualizar de forma global las proteínas expresadas por un tejido o fluido corporal mediante 2-DE ha permitido la identificación de marcadores o patrones proteicos de diversas enfermedades (Aanstoot *et al.*, 1996; Celis y Gromov, 1999; Rasmussen *et al.*, 1996; Wilkins *et al.*, 1997; Young y Tracy, 1995; Zerr *et al.*, 1996), conduciendo en algunos casos al desarrollo de nuevas pruebas de diagnóstico. Asimismo, la estrategia proteómica también ha sido empleada en el campo de la investigación farmacéutica y la toxicología, ya que permite evaluar cambios cuantitativos en la expresión de proteínas o modificaciones post-traduccionales producidos como consecuencia de tratamientos con medicamentos, hormonas o tóxicos (Aicher *et al.*, 1998; Anderson *et al.*, 1995; Gravel *et al.*, 1996). Otra de las aplicaciones que se derivan de esta tecnología es la identificación de proteínas de agentes infecciosos que son reconocidas por el sistema inmune. El enfrentamiento de mapas 2-DE de un organismo infeccioso con sueros de pacientes infectados por el mismo conduce a la detección de proteínas inmunogénicas (Pitarch *et al.*, 1999; Sánchez-Campillo *et al.*, 1999; Wilkins *et al.*, 1997), que evidentemente pueden ser potenciales candidatos para el desarrollo de vacunas.

Parece claro, pues, el enorme potencial de la investigación proteómica en el análisis de los sistemas biológicos, a pesar de las limitaciones que aún presenta este campo (Blackstock y Weir, 1999; Celis y Gromov, 1999; Haynes *et al.*, 1998; Wilkins *et al.*, 1997). Los últimos años han asistido igualmente al desarrollo de herramientas enormemente sofisticadas para el

análisis de la expresión génica, como los *microarrays* de DNA, que permiten el estudio de los patrones de expresión del mRNA a gran escala, originando lo que se ha dado en llamar Transcriptómica, por analogía con Genómica y Proteómica. Dado que la correlación entre la expresión de mRNA y proteínas es escasa (Anderson y Seilhamer, 1997; Gygi *et al.*, 1999; Haynes *et al.*, 1998), ambas deben complementarse. La combinación e integración de todas estas nuevas tecnologías constituye una herramienta muy poderosa para avanzar en la comprensión de mecanismos celulares básicos, de la base molecular de la génesis y progresión de enfermedades, y en la identificación de dianas para un tratamiento farmacológico racional.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

Una de las líneas de investigación del Departamento es el estudio de la pared celular fúngica, con arreglo a lo cual el Departamento forma parte del Nodo de Pared Celular y Morfogénesis del proyecto europeo EUROFAN para el análisis funcional del genoma de *S. cerevisiae*. Dentro de este marco se engloba el trabajo expuesto en la presente memoria, para el que se plantearon los siguientes objetivos:

1. Análisis mediante electroforesis bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* en condiciones de regeneración en medio líquido, e identificación de las mismas para la obtención de un mapa de referencia que permita realizar análisis comparativos de mutantes afectados en la pared celular.
2. Caracterización funcional del gen *PST1* de *S. cerevisiae*, que codifica una proteína de función desconocida que es secretada por los protoplastos en condiciones de regeneración.
3. Estudio de la presencia de determinadas enzimas glicolíticas en la superficie celular de *S. cerevisiae*.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS.

Las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo se muestran en la tabla II. La cepa de *Escherichia coli* empleada en los trabajos de Biología Molecular fue DH5 α F' (Hanahan, 1983), cuyo genotipo es el siguiente: K-12 $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 *deoR supE44 thi-1 recA1 endA1 hsdR17 gyrA96 relA1* (ϕ 80*lacZ* Δ M15)F'.

Tabla II. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Procedencia o referencia
S288C	<i>MATα SUC2 mal mel gal2 CUP1</i>	YSGC Berkeley
FY1679	<i>MATα/a ura3-52/ura3-52 leu2Δ1/LEU2 his3Δ200/HIS3 trp1Δ63/TRP1 GAL2/GAL2</i>	(Winston <i>et al.</i> , 1995)
FY1679-28C	<i>MATa ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1 his3Δ200</i>	B. Dujon (Instituto Pasteur, Paris)
MY55	<i>MATa ura3-52 trp1Δ63 leu2Δ1 his3Δ200 pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
DME1	<i>MATα/a PST1/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
DME1-8c	<i>MATa URA3 LEU2 HIS3 trp1Δ63 pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
DME1-10c	<i>MATα ura3-52 LEU2 TRP1 HIS3 pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
DME1-11d	<i>MATα URA3 LEU2 trp1Δ63 his3Δ200 pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
DME1-13c	<i>MATa URA3 LEU2 TRP1 HIS3 pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
DMO11	<i>MATα/a pst1Δ::kanMX4/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
DMO21	<i>MATα/a pst1Δ::kanMX4/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
<i>ecm31</i>	<i>MATa cir^o leu2Δ1 ura3-52 his3-100 lys2-801a ade2-1^o gal3 ecm31</i>	(Lussier <i>et al.</i> , 1997)
FBEH041-01A(AL)	<i>MATα ura3-52 HIS3 leu2Δ1 LYS2 trp1Δ63 YBR078w::kanMX4</i>	EUROSCARF
YP1-1B	<i>MATα pst1Δ::kanMX4 ecm33Δ::kanMX4</i>	(Vázquez, 1999)
YP1-10C	<i>MATα pst1Δ::kanMX4 ecm33Δ::kanMX4</i>	(Vázquez, 1999)
YP1-11B	<i>MATα pst1Δ::kanMX4 ecm33Δ::kanMX4</i>	(Vázquez, 1999)
TR100	<i>MATa kre6Δ::HIS3 his3 leu2 can1</i>	(Roemer y Bussey, 1991)
FKLS002-09B(AL)	<i>MATα ura3-52 HIS3 leu2Δ1 LYS2 TRP1 YDR055w::kanMX4</i>	EUROSCARF
MP15	<i>MATα/a KRE6/kre6Δ::HIS3 PST1/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
AR100	<i>MATα.fks1Δ::HIS3 ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 trp1Δ63 lys2Δ202</i>	(Ram <i>et al.</i> , 1998a)
MP33	<i>MATα/a FKS1/fks1Δ::HIS3 PST1/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
MP36	<i>MATα/a FKS1/fks1Δ::HIS3 PST1/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
AR104	<i>MATa gas1Δ::LEU2 ura3-52 his3Δ200 leu2Δ1 trp1Δ63 lys2Δ202</i>	(Ram <i>et al.</i> , 1998)
MP22	<i>MATα/a GAS1/gas1Δ::LEU2 PST1/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
MP23	<i>MATα/a GAS1/gas1Δ::LEU2 PST1/pst1Δ::kanMX4</i>	Este trabajo
H23	<i>MATα.his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ade2-1 can1-100 hsp150Δ::URA3</i>	(Russo <i>et al.</i> , 1992)
SS10	<i>MATa suc2Δ9 ura3-52 leu2-3,112</i>	Dra. L. Monteoliva (Este Departamento)

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

2.1. *S. cerevisiae*.

Los medios empleados para el crecimiento de *S. cerevisiae* fueron los siguientes:

- YPD, medio rico empleado de forma rutinaria para el crecimiento de levaduras: 20 g/l de glucosa, 20 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura. Cuando se pretendía inducir la enzima invertasa, se disminuyó la concentración de glucosa a 0.5 g/l.
- SD, medio mínimo: 20 g/l de glucosa, 5 g/l de sulfato amónico, 1.7 g/l de base nitrogenada (Difco), 70 ml/l de mezcla concentrada de aminoácidos.
- MPE, medio de pre-esporulación: 50 g/l de glucosa, 10 g/l de extracto de levadura, 30 g/l de extracto de carne.
- ME, medio de esporulación: 10 g/l de acetato potásico, 1 g/l de extracto de levadura, 0.5 g/l de glucosa, suplementado con los aminoácidos requeridos por la cepa en las mismas concentraciones que en el medio SD. El medio de esporulación líquido llevaba 10 g/l de acetato potásico y 0.05 g/l de acetato de zinc, más los aminoácidos necesarios (Brachmann *et al.*, 1998).
- YPS-Antimicina A, medio rico con sacarosa como única fuente de carbono: 20 g/l de sacarosa, 20 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura. La sacarosa se preparó por separado, se esterilizó por filtración y se añadió al medio una vez atemperado. La antimicina se añadió a una concentración final de 1 mg/l, una vez esterilizado y atemperado el medio.
- MB, para determinar la sensibilidad a toxina *killer*: 30 g/l de glucosa, 10 g/l de peptona, 10 g/l de extracto de levadura, tamponado con citrato sódico al 3%, pH 4.7, y suplementado con azul de metileno a una concentración de 0.003%.

Para la preparación de estos medios en forma sólida se añadió 20 g/l de agar a su composición.

La mezcla concentrada de aminoácidos contiene 147 mg/ml de adenina, uracilo, L-triptófano, L-histidina, L-arginina y L-metionina; 221 mg/ml de L-tirosina, L-leucina, L-isoleucina y L-lisina; 368 mg/ml de fenilalanina; y 736 mg/ml de L-glutámico, L-aspartico, L-valina, L-treonina y L-serina. Esta mezcla puede variar según el experimento, eliminándose de su composición los aminoácidos utilizados en la selección de plásmidos transformantes.

Las cepas de *S. cerevisiae* se incubaron normalmente a 28°C.

2.2. Adición de compuestos a los medios de cultivo.

Para la realización de determinadas pruebas fenotípicas, en ocasiones fue necesario añadir diversos compuestos al medio de cultivo. Éstos fueron los siguientes:

- Blanco de Calcoflúor: Se preparó una solución madre de concentración 10 mg/ml, que se añadió al medio, una vez esterilizado y atemperado, para conseguir la concentración final deseada (hasta 40 µg/ml).
- Rojo Congo: Se añadió la cantidad necesaria de una solución madre a 10 mg/ml al medio esterilizado y atemperado, preparándose placas con 100 µg/ml.

- Cafeína: La cafeína se esterilizó por separado y se adicionó a un volumen equivalente de medio YPD preparado a concentración doble, para conseguir la concentración final deseada (de 1 a 1.75 mg/ml).
- Higromicina B: Se añadió la cantidad necesaria, disuelta en un pequeño volumen de agua estéril, al medio esterilizado y atemperado. Se prepararon placas con concentraciones de 75 y 100 µg/ml.

La geneticina empleada para la selección de clones que llevaban el marcador *kan^r* fue añadida al medio esterilizado y atemperado, a una concentración final de 200 mg/l.

2.3. *E. coli*.

Los medios empleados para el cultivo de *E. coli*, incubada de forma rutinaria a 37°C, fueron los siguientes:

- LB (Luria-Bertani): 10 g/l de triptona, 5 g/l de extracto de levadura, 5-10 g/l de cloruro sódico.
- 2xYT: 16 g/l de triptona, 10 g/l de extracto de levadura, 5 g/l de cloruro sódico.

Al igual que en el caso anterior, se añadió 20 g/l de agar para obtener estos medios en forma sólida. Cuando fue necesario para la selección de plásmidos, se añadió al medio ampicilina o kanamicina a concentración final de 100 mg/l.

3. MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS.

3.1. Determinación del crecimiento.

3.1.1. Turbidimetría.

El crecimiento de los cultivos se determinó mediante la medida de la turbidez de los mismos, por lectura de la densidad óptica a 600 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640. Las muestras se diluían convenientemente de manera que su absorbancia se encontrara en un intervalo de valores tal que existiera linealidad entre la lectura de densidad óptica y el número de células.

3.1.2. Recuento de células.

La determinación de la concentración de células de *S. cerevisiae* en un cultivo se llevó a cabo por recuento en una cámara Neubauer mediante observación microscópica directa en un microscopio de contraste de fases. La concentración de células se obtenía tras multiplicar el número de células contado en los 16 cuadrados de un cuadrante (0.1 mm³) por la dilución contada y por 10⁴.

3.2. Genética clásica.

3.2.1. Obtención de diploides.

Se empleó la técnica descrita por Fink (Fink, 1971). Cuando los marcadores de las dos cepas cruzadas lo hicieron posible, el aislamiento de los diploides se realizó estriando la

mezcla de ambas cepas, al cabo de al menos 5 horas de contacto, en un medio selectivo, de forma que sólo fuera posible el crecimiento de las células diploides, pero no el de las haploides. En aquellos casos en que esto no fue posible, el aislamiento de diploides se realizó mediante micromanipulación, utilizando un micromanipulador Leitz acoplado a un microscopio Wild de contraste de fases. La micromanipulación se llevó a cabo sobre láminas de medio sólido YPD, que posteriormente fueron incubadas sobre placas del mismo medio a 28°C durante 3 días, tras lo cual las colonias de los diploides se hacían visibles.

3.2.2. Esporulación.

Cuando se requería la esporulación de algún diploide, éste se sembró en placas de medio de pre-esporulación y se incubó a 28°C durante un día. Una vez crecido, se pasó a medio de esporulación sólido, incubándose a 4°C durante 24 horas. Al cabo de este tiempo, la placa se pasó a 28°C, incubándose a esta temperatura durante un periodo de tiempo variable entre 4 y 10 días. La presencia de ascas se puso de manifiesto mediante observación microscópica en un microscopio de contraste de fases. Dada la baja frecuencia de esporulación de las cepas FY1679 y TA405, en ocasiones fue necesario realizar la esporulación en medio líquido (Brachmann *et al.*, 1998).

3.2.3. Disección de ascas.

La disección de ascas se llevó a cabo con arreglo al método descrito por Johnston y Mortimer (Johnston y Mortimer, 1959). La digestión de las paredes de las ascas se realizó con Glusulasa® a una concentración del 10% durante un tiempo comprendido entre 10 y 15 minutos. En la separación de ascosporas se utilizó el micromanipulador citado anteriormente.

3.3. Técnicas de microscopía.

3.3.1. Microscopía de contraste de fases.

Las muestras de levaduras se observaron en montaje húmedo, en un microscopio Nikon Optiphot, empleando un objetivo de contraste de fases 40 X y un ocular 10 X.

3.3.2. Microscopía electrónica de barrido.

Las muestras de células enteras, protoplastos recién preparados o protoplastos en regeneración (preparados según se describe en el apartado 5.2.) fueron fijadas añadiendo un volumen igual de una solución de glutaraldehído al 10% en cacodilato sódico 0.4 M, pH 7.2, de manera que la concentración final fuera de glutaraldehído al 5% y cacodilato sódico 0.2 M (Tiedt *et al.*, 1987; Williams y Veldkamp, 1974). La fijación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 90 minutos. A continuación las muestras fueron filtradas a través de un filtro Fluoropore de 0.2 µm (Millipore) y lavadas con sorbitol 1 M. Las células fueron deshidratadas mediante incubaciones sucesivas en soluciones de concentraciones crecientes de etanol (20, 30, 50, 70, 80, 90 y 100%). El etanol fue reemplazado por CO₂ puro y las muestras fueron recubiertas con oro. Las muestras fueron examinadas y fotografiadas en un microscopio electrónico JEOL JSM-6400, en el Centro de Microscopía Electrónica "Luis Bru", de la Universidad Complutense de Madrid.

3.3.3. Inmunofluorescencia indirecta.

Para la preparación de muestras se siguió básicamente el protocolo descrito originalmente por Pringle (Pringle *et al.*, 1991). Las células fueron fijadas con formaldehído al 3.7% durante 2 horas, y los esferoplastos se prepararon mediante el tratamiento con 300 µg de zimoliasa en una solución de fosfato potásico 50 mM, pH 6.8, con sorbitol 1.2 M. Pst1p-myc fue detectada mediante la incubación con el anticuerpo monoclonal anti-c-myc 9E10 (BAbCo, Richmond, CA) a dilución 1:5000 durante 2 horas, y la incubación sucesiva con un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón marcado con Cy3 (Sigma), a dilución 1:1000. Las muestras fueron observadas en un microscopio confocal MRC-1024 (Bio-Rad, Hempstead, Reino Unido), en el Centro de Citometría de Flujo de la Universidad Complutense de Madrid.

3.4. Mutagénesis con radiación ultravioleta.

La cepa a mutagenizar se incubó en medio selectivo a 30°C durante 48 horas. A continuación se hicieron las diluciones convenientes del cultivo, y se sembraron 1000 células por placa. Esta siembra se realizó por extensión en placas de medio selectivo (medio mínimo sin leucina). Las placas fueron irradiadas con una lámpara de luz UV de longitud de onda 254 nm, aplicándose una dosis de 1200 erg/mm². Tras la irradiación las placas fueron incubadas en oscuridad a 24°C hasta la aparición de colonias de tamaño suficiente para ser replicadas.

3.5. Determinación de la sensibilidad a un compuesto mediante la siembra de diluciones en gotas.

Los cultivos se crecieron durante 16 horas, transcurridas las cuales se midió su densidad óptica, y se realizaron las diluciones necesarias para igualar todos los cultivos a ensayar a una densidad óptica de 0,5. A partir de esta dilución se realizaron tres diluciones sucesivas al 10% de cada cultivo. A continuación se colocaron gotas de 3 µl de cada una de las diluciones preparadas en las placas suplementadas con los compuestos a ensayar. En todos los casos se sembró una placa control de YPD o SC. Las placas se incubaron durante 48 horas, transcurridas las cuales se observaron los resultados.

3.6. Determinación de la sensibilidad a toxina *killer*.

Las cepas *killer* empleadas fueron *S. cerevisiae* T158C/S14a, productora de toxina K1, y *Pichia mrakii*, productora de toxina K9. Las cepas a ensayar y las cepas *killer* fueron incubadas en YPD durante 18 horas, hasta alcanzar la fase estacionaria. A continuación se inocularon 15 µl de los cultivos de las cepas a ensayar en tubos con 20 ml de medio MB, atemperado a 45°C, vertiéndose inmediatamente en placas Petri. Una vez solidificadas las placas, se colocaron sobre ellas tres gotas por placa de 5 µl de la cepa productora de toxina. Las placas fueron incubadas a 20°C durante 4 días, transcurridos los cuales se midió el halo de inhibición provocado por la cepa *killer* alrededor de cada gota.

4. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.

En las manipulaciones de DNA se han seguido los protocolos convencionales para extracción de DNA plasmídico de *E. coli* y su purificación, restricción y ligación de DNA, así como en la preparación de geles de agarosa para su visualización (Ausubel *et al.*, 1993;

Sambrook *et al.*, 1989). Las enzimas de restricción, DNA ligasa, T4 DNA polimerasa, fosfatasa alcalina y Klenow proceden de la casa Boehringer Mannheim. Como patrón de pesos moleculares se empleó 1 Kb Plus DNA Ladder (Gibco).

Para la elución de fragmentos de DNA a partir de los geles de agarosa se utilizaron los kits Sephaglas (Pharmacia Biotech) o Gene Clean (Bio101). Cuando el tamaño de los fragmentos era muy pequeño (≤ 300 pb), el DNA se purificó utilizando lana de vidrio.

4.1. Plásmidos.

Los plásmidos originales empleados para la realización de este trabajo se describen en la tabla III. Los plásmidos construídos durante la misma se describen en la tabla IV.

4.2. PCR.

La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un aparato DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer), de acuerdo a los protocolos básicos descritos en los manuales de Biología Molecular (Ausubel *et al.*, 1993; Sambrook *et al.*, 1989). En ocasiones la PCR se llevó a cabo sobre células, según el protocolo descrito por Huxley (Huxley *et al.*, 1990).

Los desoxinucleótidos provenían de Boehringer Mannheim, así como el tampón de reacción y el cloruro magnésico. Para la amplificación se empleó la enzima Taq polimerasa de BioTools en reacciones analíticas, y el producto Expand High Fidelity System (Boehringer Mannheim) en aquellas en las que no eran deseables las mutaciones. Los oligonucleótidos fueron proporcionados por las casas Cruachem o Boehringer Mannheim. Las condiciones de amplificación se adaptaron a las necesidades de cada experimento. La temperatura de hibridación de los oligonucleótidos fue calculada mediante el programa OLIGO 4.0 y ajustada empíricamente. En la tabla V se describen los oligonucleótidos empleados.

4.3. Transformación de DNA.

La transformación rutinaria de plásmidos y ligaciones en *E. coli* se realizó por el método de Hanahan (Hanahan, 1983).

La transformación rutinaria de plásmidos en *S. cerevisiae* se llevó a cabo por el método del acetato de litio (Ito *et al.*, 1983). La transformación de DNA con el fin de conseguir la integración de éste en el genoma se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Gietz (Gietz *et al.*, 1995). Para la selección de los clones resistentes a geneticina se siguieron las indicaciones del protocolo descrito por Wach (Wach *et al.*, 1994).

Tabla III. Plásmidos originales empleados en este trabajo.

Nombre	Huésped ^a	Características	Fuente o referencia
pGEM®-T	Ec	Vector para la clonación de productos de PCR.	Promega
pUC19	Ec	Vector de clonación.	(Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pSC1	Ec/Sc	Derivado de YCplac33 que contiene un alelo <i>suc2_{lc}</i> . Marcador <i>URA3</i> .	Dra. L. Monteoliva (Este Departamento)
pLC1	Ec/Sc	Derivado de YCp50. Contiene el gen <i>SUC2</i> con su promotor. Marcador <i>URA3</i> .	Dr. L. del Castillo (U. Valencia)
YEplac181	Ec/Sc	Vector de expresión episómico. Marcador <i>LEU2</i> .	(Gietz y Sugino, 1988)
YCplac111	Ec/Sc	Vector de expresión centromérico. Marcador <i>LEU2</i> .	(Gietz y Sugino, 1988)
3291	Ec	Contiene 6x <i>c-myc</i> entre dos puntos <i>NotI</i> .	Dr. H. Martín (Este Departamento)
YEp352	Ec/Sc	Vector de expresión episómico. Marcador <i>URA3</i> .	(Hill <i>et al.</i> , 1986)
pFA6a-kanMX4	Ec	Módulo marcador <i>kanMX4</i> .	(Wach <i>et al.</i> , 1994)

^a Ec, *Escherichia coli*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*.

Tabla IV. Plásmidos obtenidos durante la realización de este trabajo.

Plásmido	Vector	Descripción
pMUD55	pUC19	Inserción en <i>Sma</i> I del producto de PCR que contiene <i>PST1</i> con sus secuencias flanqueantes.
pMUD2i	pUC19	Derivado de pMUD55 por eliminación del fragmento <i>Sty</i> I- <i>Sty</i> I de <i>PST1</i> y sustitución con el módulo <i>kanMX4</i> .
pMGD55	pGEM [®] -T	Inserción del producto de PCR que contiene <i>PST1</i> con sus secuencias flanqueantes.
YEp352-PST1	YEp352	Inserción del fragmento <i>Sac</i> I- <i>Sph</i> I de pMGD55 que contiene <i>PST1</i> con sus secuencias flanqueantes.
p55NOT2b	pGEM [®] -T	Inserción del producto de PCR que contiene <i>pst1</i> (con una diana <i>Not</i> I insertada), con sus secuencias flanqueantes.
pMIL1	YCplac111	Inserción en <i>Pst</i> II del fragmento <i>Pst</i> II- <i>Pst</i> II que contiene <i>pst1</i> (con una diana <i>Not</i> I insertada), con sus secuencias flanqueantes.
pMIL4	YCplac111	Derivado de pMIL1 por inserción en el punto <i>Not</i> I del fragmento <i>Not</i> I- <i>Not</i> I que contiene 6x <i>c-myc</i> .
pGENO	pGEM [®] -T	Inserción del producto de PCR que contiene <i>ENO2</i> con su promotor.
pGFBA	pGEM [®] -T	Inserción del producto de PCR que contiene <i>FBA1</i> con su promotor.
pENO2S	YCplac33	Derivado de pSC1 por inserción en <i>Bgl</i> III del fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI de pGENO que contiene <i>ENO2</i> con su promotor, fusionado en fase con <i>suc2_{ic}</i> ^b .
pFBA1S	YCplac33	Derivado de pSC1 por inserción en <i>Bgl</i> III del fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bgl</i> III de pGFBA que contiene <i>FBA1</i> con su promotor, fusionado en fase con <i>suc2_{ic}</i> .
pGENOΔ <i>Eco</i> RI	pGEM [®] -T	Derivado de pGENO por eliminación del fragmento <i>Eco</i> RI- <i>Eco</i> RI de <i>ENO2</i> y religación.
pGENOΔ <i>Kpn</i> I	pGEM [®] -T	Derivado de pGENO por eliminación del fragmento <i>Kpn</i> I- <i>Kpn</i> I de <i>ENO2</i> y religación.
pGE44	pGEM [®] -T	Derivado de pGENO por eliminación del fragmento <i>Hind</i> III- <i>Hind</i> III de 540 pb de <i>ENO2</i> y religación.
pENO2Sde	YCplac33	Derivado de pSC1 por inserción en <i>Bgl</i> III del fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI procedente de pGENOΔ <i>Eco</i> RI.
pENO2Sdk	YCplac33	Derivado de pSC1 por inserción en <i>Bgl</i> III del fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI procedente de pGENOΔ <i>Kpn</i> I.
pENO2SΔHN	YCplac33	Derivado de pSC1 por inserción en <i>Bgl</i> III del fragmento <i>Bam</i> HI- <i>Bam</i> HI procedente de pGE44.
pLE1	YEplac181	Inserción del fragmento <i>Pst</i> II- <i>Sac</i> I de pENO2S que contiene <i>ENO2</i> con su promotor, fusionado en fase con <i>suc2_{ic}</i> .

^b *suc2_{ic}* indica un alelo del gen *SUC2* al que se ha eliminado la secuencia codificante del péptido señal y la metionina inmediatamente posterior.

Tabla V. Oligonucleótidos utilizados en la PCR.

Nombre	Secuencia
UPA1	TGCCCCGCTTTTCTTTTCTTC
LOA4	GGAGGTGTCTTGGTTTCAAA
K2	ATTTTGATGGCCGCACGGC
K3	CTTAACCTTCGCATCTGGGC
KREUP	GCTGCAAGTGCTCGAGAAAG
KREDW	TCCCTGACTAATGCCGTGTT
UP-PST1	CTGCAGTCAGCGGCAGAGAGTATA
LO-PST1	CTGCAGGCTGAGGACACCACTAAA
MYC-UP3	AACATTTATATTAGCGGCCGCGACACTTCGTTA
MYC-UP4	TAACGAAGTGTCTCGGCCGCTAATATAAATGTT
UPENO	CTGGATCCGCTGATTGAATACATTAGC
LOENO	AGGGATCCTTGTACCGTGGTGGAAG
UP-FBA1	TGGGATCCGAATAACAATACTGACA
LO-FBA1	ACAGATCTAAAGTGTTAGTGGTACG

5. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.

5.1. Obtención de extractos citoplasmáticos de *S. cerevisiae*.

Los extractos celulares se obtuvieron por rotura mecánica de las células con bolas de vidrio (0.45 mm) en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 150 mM, DTT 1 mM) con inhibidores de proteasas (leupeptina, pepstatina y antipaina, 5 µg/ml, y PMSF 0.5 mM). La rotura se llevó a cabo por agitación en vortex o en un aparato Fast Prep (Bio101 Savant). El lisado se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C, para separar células enteras y restos celulares. Los sobrenadantes se guardaron a -20°C. Cuando iban destinados al análisis de la fosforilación de la proteína Slt2p, los extractos fueron preparados en tampón de lisis al cual se adicionaron inhibidores de fosfatasas (fluoruro sódico 50 mM, ortovanadato sódico 1 mM, β-glicerol fosfato 50 mM, pirofosfato sódico 5 mM).

5.2. Obtención de productos de secreción de protoplastos de *S. cerevisiae*.

Para la obtención de protoplastos se siguió el método descrito por Gil (Gil *et al.*, 1988), con ligeras modificaciones. La cepa S288C de *S. cerevisiae* se creció en medio YPD a 28°C hasta una densidad óptica de 4. Después de lavar las células, éstas se incubaron a 28°C durante 30 minutos en una solución de pretratamiento (Tris-HCl 10 mM, pH 9, EDTA 5 mM, β-mercaptoetanol al 1%) con agitación suave (80 rpm). A continuación las células fueron resuspendidas a una concentración de 5×10^8 células por ml en sorbitol 1 M, y se añadió Glusulasa® (Du Pont) a una concentración final de 30 µl/ml. El tiempo de incubación con Glusulasa®, a 28°C y con agitación muy suave, necesario para la obtención de un 95-100% de protoplastos fue de 45 a 60 minutos. Los protoplastos se recogieron por centrifugación suave (600 x g). Después de tres lavados con sorbitol 1 M, las células se resuspendieron en medio mínimo suplementado con todos los aminoácidos y con sorbitol 1 M, y se incubaron a 28°C con agitación muy suave durante 2 horas, para que tuviera lugar la regeneración de los protoplastos. Transcurrido este tiempo se sedimentaron las células a 600 x g, y al sobrenadante se le añadieron inhibidores de proteasas: PMSF (Fluka) 0.1 mM, leupeptina (Sigma) 0.2 µg/ml, antipaina (Sigma) 0.2 µg/ml, y pepstatina A (Sigma) 0.1 µg/ml. Éste fue

filtrado a través de una membrana de nitrocelulosa de 0.22 µm de tamaño de poro (Millipore), para eliminar completamente las células. El medio filtrado fue concentrado por ultrafiltración en una célula de la casa comercial Amicon, empleando una membrana con un límite de exclusión de 10000 Da (Diaflo® YM10, Amicon). El sorbitol fue eliminado mediante tres lavados con 10 volúmenes de agua MilliQ, reduciéndose finalmente la muestra hasta un volumen de 10-15 ml. Por último, la muestra fue liofilizada. En algunos casos la muestra fue concentrada hasta un volumen final de 200 µl por ultrafiltración en filtros Ultrafree-15 con membrana Biomax 10K (Millipore).

5.3. Obtención de proteínas de pared de *S. cerevisiae*.

Las proteínas de pared se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Klis (Klis *et al.*, 1998), con ligeras modificaciones. En ocasiones se incrementó el número de lavados de las paredes aisladas, con el fin de eliminar cualquier posibilidad de contaminación con proteínas intracelulares. Las paredes fueron tratadas con SDS en condiciones reductoras en caliente dos veces, desechándose el segundo extracto. Para la digestión de las paredes con glucanasa se empleó zimoliasa 20T (ICN Biomedicals, Inc.), a una concentración de 500 µg/ml, realizándose el tratamiento durante 2-3 horas.

5.4. Obtención de proteínas del medio de cultivo.

Tras el crecimiento de las células en YPD hasta una densidad óptica entre 1 y 2, el medio de cultivo fue separado mediante centrifugación. A partir del sobrenadante correspondiente a 800 µl del cultivo a una densidad óptica 2, las proteínas fueron precipitadas con ácido tricloroacético al 14%, y resuspendidas en 20 µl de NaOH 0.1 N. Tras la adición de 20 µl de tampón de carga para electroforesis, se añadió NaOH 1 N hasta viraje del indicador a azul. Para el análisis de las proteínas del medio mediante SDS-PAGE se cargó la cantidad equivalente a 400 µl de medio de cultivo a densidad óptica 2.

5.5. Aislamiento de proteínas integrales de membrana.

El aislamiento de las proteínas integrales de membrana se llevó a cabo mediante solubilización de éstas con el detergente Triton X-114 (Serva, Alemania) y posterior separación de fases acuosa y detergente (Bordier, 1981). El procedimiento seguido fue el descrito por Conzelmann (Conzelmann *et al.*, 1988; Conzelmann *et al.*, 1986), realizándose tres extracciones sucesivas en cada una de las fases con el fin de obtener una purificación adecuada. Después de la separación se añadió Triton X-114 y tampón de lisis a las fases acuosa y detergente respectivamente, con el fin de obtener volúmenes y contenido en sales y detergente equivalentes en ambas muestras (Bordier, 1981).

5.6. Determinación cuantitativa de proteínas.

La cantidad de proteína en las muestras de productos de secreción de protoplastos se determinó siguiendo el método de Bradford (Bradford, 1976). Para realizar la recta patrón se utilizaron soluciones de albúmina bovina de concentración conocida (entre 0.75 y 25 µg/ml). El reactivo de Bradford fue suministrado por la casa Bio-Rad.

En ocasiones la estimación de la concentración de proteína de una muestra se llevó a cabo midiendo su absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro Beckman DU 640,

considerando que 1 unidad de absorbancia a dicha longitud de onda corresponde aproximadamente a una concentración de 1 mg/ml de proteína.

5.7. Valoración cuantitativa de fosfatasa alcalina en el medio de cultivo.

La solución enzimática a valorar procedía del medio de regeneración de los protoplastos de *S. cerevisiae*, después de la filtración. La mezcla de reacción contenía 500 µl de una solución del sustrato *para*-nitrofenilfosfato disódico 20 mM en tampón glicina-cloruro sódico 0.1 M, pH 9.8 (ajustado con sosa), a los cuales se añadían 500 µl del medio a analizar. La reacción se incubaba a 37°C en la oscuridad durante 30 minutos. La valoración del *p*-nitrofenol liberado se realizó espectrofotométricamente, determinando la absorbancia a una longitud de onda de 420 nm. Las lecturas obtenidas se referían a una recta patrón de *p*-nitrofenol de concentraciones comprendidas entre 10 y 100 µg/ml. La unidad enzimática (U.E.) se definió como la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 nanomol de *p*-nitrofenol por ml y por minuto en las condiciones de reacción, determinándose en función de la siguiente ecuación:

$$\text{U.E.} = [\mu\text{g/ml}] / 139.11 \times 2000/t \quad (\text{siendo } t \text{ el tiempo de reacción en minutos})$$

5.8. Deglicosilación de proteínas con Endo-H.

La eliminación de la N-glicosilación de proteínas se llevó a cabo mediante el tratamiento de las muestras con Endo-H (recombinante, Boehringer Mannheim). El protocolo seguido fue el descrito por Klis y colaboradores (Klis *et al.*, 1998). El tratamiento se realizó a 200 µg de proteína, cargándose posteriormente 50 µg en un gel de poliacrilamida para la visualización de las proteínas deseadas mediante Western-blot.

5.9. Electroforesis de proteínas.

5.9.1. Electroforesis monodimensional en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE).

La electroforesis de proteínas en condiciones disociantes se llevó a cabo en geles de poliacrilamida, según el método descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Los geles separadores se prepararon con concentraciones de poliacrilamida del 6, 8, 10 ó 12%, según la(s) proteína(s) a resolver, y con SDS al 0.1%. La electroforesis se desarrolló en cubetas Protean II (Bio-Rad), a una intensidad constante de 40 mA por gel, o bien a voltaje constante de 60 V. También se emplearon cubetas Mini Protean II o Ready Gel Cell (ambas de Bio-Rad), desarrollándose la carrera a 150 V. Como marcadores de peso molecular se emplearon patrones coloreados de la casa Amersham (Rainbow™ coloured protein molecular weight markers) o Gibco (BenchMark™ Prestained Protein Ladder).

5.9.2. Electroforesis en condiciones nativas.

La electroforesis de proteínas en condiciones nativas se realizó en geles de poliacrilamida al 5% preparados sin SDS (Bollag *et al.*, 1996). La separación electroforética se llevó a cabo en tampón Laemmli sin SDS, el cual también fue eliminado del tampón de carga. La electroforesis se llevó a cabo a temperatura ambiente.

5.9.3. Electroforesis bidimensional analítica en gel de poliacrilamida (2D-PAGE).

La electroforesis bidimensional se realizó según el método descrito por O'Farrell (O'Farrell, 1975), con algunas modificaciones. El isoelectroenfoco se llevó a cabo en un gradiente de pH inmovilizado (IPG) (Bjellqvist *et al.*, 1993b). Los gradientes empleados fueron de pH 3-10 no lineal y de pH 4-7 lineal (Immobiline DryStrip, 18 cm; Pharmacia Biotech).

Los geles fueron rehidratados entre dos cristales (Reswelling Cassette, Pharmacia Biotech) en una solución que contenía urea 8 M (USB), CHAPS 2% (Sigma), DTE 10 mM (Merck), anfolitos 0.8% (Pharmalyte pH 3-10, Pharmacia Biotech) y trazas de Azul de Bromofenol, durante 18 horas. Las muestras liofilizadas (200 µg) fueron resuspendidas en tampón de carga (urea 8 M, CHAPS 4%, Tris 40 mM, DTE 65 mM, Azul de Bromofenol) y cargadas para la primera dimensión según las instrucciones del fabricante. El isoelectroenfoco se desarrolló en una cubeta Multiphor II (Pharmacia Biotech), a una temperatura constante de 15°C, con el siguiente programa: De 0 a 500 V en 1 minuto, 500 V durante 5 horas, de 500 a 3500 V en 5 horas, y 3500 V durante 12.5 horas, hasta dar un total de 56250 Vh.

Después de la primera dimensión, los geles fueron equilibrados con el fin de resolubilizar las proteínas y reducir los puentes disulfuro. El equilibrio se realizó en una solución que contenía Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, DTE 2%, durante 12 minutos, y en Tris-HCl 50 mM, pH 6.8, urea 6 M, glicerol 30%, SDS 2%, iodoacetamida 2.5% (Sigma) durante 5 minutos. Tras el equilibrio los geles fueron cortados para ajustarlos al tamaño de la cubeta, y se cargaron en la parte superior del gel vertical de poliacrilamida. Para cubrirlos se empleó una solución de agarosa al 0.5% en tampón Laemmli (Laemmli, 1970). La segunda dimensión se realizó en geles de poliacrilamida al 8 ó 10%, de 1.5 mm de grosor, sin gel concentrador, preparados con ligeras modificaciones. Como *crosslinker* se empleó PDA (Bio-Rad), ya que se consigue mejor resolución y menos bloqueo N-terminal de las proteínas (Hochstrasser *et al.*, 1988a; Hochstrasser *et al.*, 1988c). Además se añadió tiosulfato sódico (Fluka) a concentración final de 5 mM, para disminuir el fondo, eliminar la tinción negativa y optimizar la reproducibilidad en la tinción de plata (Hochstrasser y Merrill, 1988b). Antes de añadir el SDS y los catalizadores, los geles fueron desaireados en baño de ultrasonido durante 30 minutos. Los geles fueron preparados el día anterior a su uso, para conseguir una polimerización lo más completa posible. Como marcadores internos de peso molecular y punto isoeléctrico se emplearon los patrones 2-D SDS-PAGE Standards (Bio-Rad).

5.9.4. Electroforesis bidimensional micropreparativa.

Inicialmente se realizó de la misma manera que la electroforesis bidimensional analítica, con la única diferencia de que se alargó la última fase del programa de isoelectroenfoco a 44.5 horas, para dar un voltaje total de 168250 Vh.

Posteriormente, la aplicación de la muestra se realizó durante la rehidratación de los geles IPG (Sánchez *et al.*, 1997). La muestra (0.5-1 mg de proteína) se mezcló con tampón de carga y se dispuso en los huecos de una bandeja de metacrilato construida especialmente para este propósito en el taller de la Facultad de Ciencias Físicas de la Universidad Complutense de Madrid. La rehidratación se llevó a cabo durante 6 horas. El isoelectroenfoco se realizó con el programa descrito, prolongando la última fase hasta dar un total de 126 kVh. Cuando la

segunda dimensión no se iba a correr inmediatamente después de la primera, los geles se guardaron a -70°C .

5.10. Transferencia de proteínas.

5.10.1. Transferencia en cubeta.

Después de una electroforesis SDS o 2D-PAGE las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Hybond ECL, Amersham) o PVDF (Trans-Blot Transfer Medium, $0.2\ \mu\text{m}$, Bio-Rad) en tampón Towbin (Towbin *et al.*, 1979). Las transferencias se llevaron a cabo en una cubeta de transferencia Trans-Blot Cell (Bio-Rad) a una intensidad constante de 50 mA durante 14 horas, o a 250 mA durante 3 horas. En ocasiones se empleó una cubeta Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad), realizándose la transferencia a un voltaje constante de 100 V durante 1 hora.

5.10.2. Transferencia semiseca.

Este tipo de transferencia se empleó cuando se pretendía identificar las proteínas transferidas mediante secuenciación aminoterminal. Después de la electroforesis bidimensional micropreparativa, los geles se lavaron en agua MilliQ brevemente y se equilibraron en el tampón de transferencia CAPS 10 mM (Sigma), pH 11, MeOH al 10% (Matsudaira, 1987) durante 30 minutos. Las membranas de PVDF (Trans-Blot Transfer Medium, $0.2\ \mu\text{m}$, Bio-Rad) fueron equilibradas en el mismo tampón durante 15 minutos. La transferencia se llevó a cabo en un aparato de transferencia semiseca (Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell, Bio-Rad), a 15 V durante 1 hora, estableciendo un límite de corriente de 0.68 A. Para facilitar la transferencia se añadió SDS al 0.1% por encima del *sandwich*.

5.11. Tinciones de proteínas.

5.11.1. Tinción de geles con plata.

Se han utilizado tres procedimientos distintos de tinción de geles con plata:

I) *Tinción de plata según el método de Merril* (Merril *et al.*, 1982), utilizando el kit de tinción Silver Stain Kit de Bio-Rad. Este procedimiento se empleó de forma rutinaria para la tinción de geles analíticos.

II) *Tinción de plata amoniacal*. Se empleó para conseguir una mayor sensibilidad en la tinción de geles bidimensionales. El procedimiento empleado fue el descrito por Bjellqvist (Bjellqvist *et al.*, 1993a), con ligeras modificaciones. Después de la segunda dimensión, los geles fueron lavados en agua desionizada durante 5 minutos. A continuación se incubaron en etanol:ácido acético:agua (40:10:50) durante 1 hora, y posteriormente en etanol:ácido acético:agua (5:5:90) durante 2 horas (o alternativamente toda la noche). Los geles se lavaron entonces con ácido acético al 7.5% tres veces durante 30 minutos. Después se incubaron en glutaraldehído a una concentración final del 2.5% durante 30 minutos, y se lavaron extensivamente con agua MilliQ. Los geles fueron teñidos en una solución de nitrato de plata amoniacal recién preparada durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se lavaron con agua varias veces y se revelaron en una solución de ácido cítrico al 0.01% y formaldehído al 0.1%, hasta que las manchas alcanzaron la intensidad deseada. La fijación se realizó en una solución de Tris al 5% y ácido acético al 2%.

III) *Tinción de plata según el método de Schevchenko* (Shevchenko *et al.*, 1996b), con ligeras modificaciones. Este procedimiento se utilizó cuando el destino del gel era la identificación de manchas proteicas mediante espectrometría de masas. Todos los tiempos de tratamiento fueron aumentados levemente, ya que los geles que pretendíamos teñir eran más gruesos que aquellos para los que el método fue descrito. Tras la electroforesis, los geles fueron fijados en una solución de metanol al 50% y ácido acético al 5% durante 30 minutos. Después se lavaron con metanol al 50% durante 15 minutos, y con agua durante otros 15 minutos. A continuación se incubaron en una solución de tiosulfato sódico al 0.02% durante 2 minutos. Después de lavarlos con agua, los geles fueron incubados a 4°C en una solución de nitrato de plata al 0.1% durante 20 minutos. Tras lavarlos con agua, los geles fueron revelados con una solución de carbonato sódico al 2% en formalina al 0.04%. La fijación se realizó en ácido acético al 5% y los geles fueron conservados en ácido acético al 1% a 4°C hasta su análisis.

5.11.2. Tinción de membranas con Azul Coomassie.

Las proteínas inmovilizadas en membranas de PVDF destinadas a la determinación de su secuencia aminoterminal fueron teñidas con Azul Coomassie. Las membranas fueron incubadas en una solución de Azul Coomassie R-250 (Merck) al 0.1% en metanol al 50% durante 5 minutos, tras lo cual se destiñeron en metanol al 50% durante 15 minutos. Después se aclararon con agua MilliQ y se dejaron secar al aire.

5.12. Determinación de actividad invertasa en gel.

Las cepas a analizar se crecieron en YPD (2% de glucosa) durante 18 horas. La síntesis de invertasa fue inducida mediante la incubación de las células en YPD con sólo un 0.05% de glucosa durante 3 horas (Carlson *et al.*, 1981). Los extractos preparados (100 µg de proteína) fueron separados por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 5%, en condiciones nativas. La actividad invertasa fue detectada incubando primero el gel en una solución de sacarosa 100 mM en acetato sódico 100 mM, pH 4.5, a 37°C durante 90 minutos. La glucosa liberada fue teñida sumergiendo el gel en una solución de cloruro de 2,3,5-fenil tetrazolio al 0.1% en sosa 0.5 M, a 90°C (Gabrial y Wang, 1969).

6. IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

6.1. Secuenciación aminoterminal.

Las manchas proteicas detectadas en las membranas de PVDF con Azul Coomassie fueron cortadas y sometidas a degradación de Edman, empleando un secuenciador Beckman LF 3000, equipado con un analizador de feniltiohidantoin-aminoácidos (System Gold, Beckman). Este análisis fue realizado por el Dr. Enrique Méndez en el C.N.B. (Madrid), y por Francisco Canals, en el Servicio de Secuenciación de Proteínas del Instituto de Biología Fundamental "Vicent Villar Palasí", en la Universidad Autónoma de Barcelona.

6.2. Detección con anticuerpos.

Las membranas con las proteínas inmovilizadas fueron procesadas siguiendo los protocolos habituales, descritos en el manual de laboratorio *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, 1993). Para la detección en determinados casos (Cwp1, β -1,3-

glucano), las membranas fueron tratadas con periodato sódico 50 mM, acetato sódico 100 mM, pH 4.5, durante 30 minutos antes de bloquearlas, con el fin de eliminar reacciones cruzadas (Montijn *et al.*, 1994). Todos los pasos de la hibridación en el caso de los anticuerpos frente a Ssa1-2p y Ssb1-2p se llevaron a cabo en TBS a pH 9, Tween-20 al 0.5%, para minimizar las uniones inespecíficas. Los anticuerpos policlonales utilizados, proporcionados por distintos laboratorios, y las diluciones a las que fueron empleados, se describen en la tabla. Las manchas proteicas reactivas fueron detectadas con IgGs anti-conejo conjugadas con peroxidasa (Amersham Pharmacia Biotech), utilizando un sistema de quimioluminiscencia (ECL, Amersham Pharmacia Biotech).

Tabla VI. Anticuerpos policlonales empleados en este trabajo.

Anticuerpo frente a:	Dilución	Referencia o procedencia
β -1,3-glucano	1:75000	(Kapteyn <i>et al.</i> , 1995)
β -1,6-glucano	1:5000	(Montijn <i>et al.</i> , 1994)
Cts1p	1:3000	(Immervoll <i>et al.</i> , 1995)
Cwp1p	1:1000	(Vossen <i>et al.</i> , 1997)
Exg1p	1:1000	(Ramirez <i>et al.</i> , 1989)
Flo1p	1:3000	(Bidard <i>et al.</i> , 1995)
Gas1p	1:3000	(Popolo <i>et al.</i> , 1988)
Hkr1p	1:200	(Yabe <i>et al.</i> , 1996)
Kre9p	1:1000	(Brown y Bussey, 1993a)
Proteínas ácidas ribosomales	1:1000	Dr. M. Remacha
Sec14p	1:1600	(Bankaitis <i>et al.</i> , 1989)
Ssa1-2p	1:600	Dra. E. A. Craig
Ssb1-2p	1:600	Dra. E. A. Craig
Pir2p	1:5000	(Russo <i>et al.</i> , 1992)
GAPDH	1:1000	Dra. M.L. Gil
Suc2p	1:150	(Ferro-Novick <i>et al.</i> , 1984)

6.3. Espectrometría de masas

La identificación de las proteínas detectadas en los geles de intervalo de pH de 4 a 7 mediante espectrometría de masas se realizó en el laboratorio del Dr. Walter Blackstock (Cell Mapping Project), en el Medicines Research Centre (GlaxoWellcome, Stevenage, Reino Unido), bajo la supervisión y con la ayuda de Malcolm Ward.

6.3.1. Reducción, alquilación y digestión proteolítica.

Las manchas proteicas fueron cortadas de los geles bidimensionales manualmente con una cuchilla y transferidas a una placa de 96 pocillos, en los cuales se había añadido 100 μ l de agua. Así preparadas, las manchas se conservaron en nevera hasta su análisis.

Las reacciones de reducción, alquilación y digestión proteolítica se llevaron a cabo en la placa multipocillo, añadiendo y eliminando reactivos con una pipeta multicanal. En primer lugar las muestras se lavaron con 100 μ l de acetonitrilo. Este tratamiento deshidrata los fragmentos de gel, permitiendo que absorban mejor el siguiente reactivo añadido, con lo cual éste llega a toda la proteína, aumentando así la eficacia de las reacciones. Se añadió a

continuación 100 µl de DTT (Sigma), a una concentración de 1 mg/ml en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.5, y se incubó la placa a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se eliminó el DTT y se lavaron los fragmentos de gel con acetonitrilo. A continuación se añadió 100 µl de iodoacetamida (Sigma) a una concentración de 10 mg/ml en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.5, incubándose la placa a temperatura ambiente durante 30 minutos. Después de eliminar la iodoacetamida se realizaron cuatro lavados con acetonitrilo y bicarbonato amónico de forma alternativa. Por último se añadió acetonitrilo para deshidratar el gel, se eliminó, y se secaron las muestras completamente en un aparato Speed Vac (Savant).

La digestión proteolítica se realizó con tripsina (Boehringer Mannheim, para secuenciación). Se añadió a cada pocillo 10 ó 20 µl de una solución de tripsina de concentración 14 ng/µl en bicarbonato amónico 50 mM, pH 8.5, preparada a partir de una solución madre a 0.1 µg/µl en TFA al 0.1%. El volumen de solución de tripsina debe ser suficiente para permitir la rehidratación del fragmento de gel. La incubación se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 18 horas en una bolsa de plástico sellada para evitar la evaporación. A las 2 horas se tomaron alícuotas de varios pocillos y se analizaron mediante MALDITOF-MS, comprobándose que se había producido ya la liberación de péptidos.

6.3.2. Espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las muestras se dispusieron en una placa metálica con 384 pocillos siguiendo este procedimiento. En primer lugar se añadió la matriz (unos 0.2 µl por pocillo), que forma una película sobre la placa. La matriz se preparó mezclando 4 partes de ácido α -ciano-4-hidroxycinámico (Aldrich) a concentración de 5 mg/ml en agua (acidificado con TFA al 0.1%) con 1 parte de nitrocelulosa (Trans-Blot Transfer Medium, Bio-Rad) a concentración de 10 mg/ml en acetona y 2-propanol (1:1) (Jensen *et al.*, 1997). Sobre la matriz se añadió 0.5 µl de ácido fórmico al 5% en forma de gota. Sobre ésta se dispensó 0.5 µl de la muestra, es decir, de la solución resultante de la digestión triptica. Una vez secas, las muestras se lavaron depositando una gota de ácido fórmico al 5% sobre ellas y retirándola inmediatamente, con el fin de eliminar sales precipitadas. Las muestras así cargadas se analizaron mediante espectrometría de masas de tipo DE-MALDI-TOF (*Delayed Extraction Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight*) en un espectrómetro de masas Tof-Spec SE (Micromass, Reino Unido), en modo reflector. La adquisición de los espectros se realizó de forma automática, así como el procesamiento de los mismos para obtener la huella peptídica correspondiente a cada muestra.

6.3.3. Espectrometría de masas en tándem mediante nanoelectrospray.

Para la realización de esta técnica se procedió a la eliminación de sales de las soluciones de digestión. Cada una de las muestras se hizo pasar por una minicolumna de resina Poros R2 (Perceptive Biosystems, MA) empaquetada en un capilar, se lavó con ácido fórmico al 0.5%, y fue eluida con una mezcla de metanol al 50% y ácido fórmico al 1% en un volumen de 3 µl. Una alícuota de 1 µl de este volumen se introdujo en un capilar de borosilicato recubierto con oro, se inyectó en un espectrómetro Sciex API III (Applied Biosystems) de triple cuadrupolo equipado con una fuente de ionización de tipo nanoelectrospray, y se analizó por espectrometría de masas en tándem. Una vez que se detectaban picos correspondientes a péptidos con doble carga se procedía a su fragmentación inducida por colisión (CID, *Collision-Induced Dissociation*). Los espectros resultantes fueron interpretados manualmente.

6.3.4. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida.

Las soluciones de digestión se inyectaron en un equipo de cromatografía líquida capilar en fase reversa acoplado a un espectrómetro de masas con detector de tipo Q-Tof. Se empleó una columna PepMap de 180 μm de diámetro, con un flujo de 1 $\mu\text{l}/\text{min}$. La muestra fue eluida con un gradiente de acetonitrilo que varía desde 99% acuoso hasta 40% acuoso en una hora, e inyectada directamente mediante spray en un espectrómetro de masas Q-Tof (Micromass, Reino Unido). Éste está provisto de un dispositivo llamado *automatic function switching* (cambio de función automático), recogiendo los datos en dos canales diferentes. El equipo trabaja primero en modo TOF-MS, recogiendo los valores de m/z entre 400 y 2000, y cuando un péptido alcanza una determinada intensidad cambia automáticamente a modo MS/MS (por CID, *collision-induced dissociation*), recogiendo los valores de m/z entre 60 y 2000 durante 10 segundos o hasta alcanzar una determinada intensidad. El procesamiento de los datos obtenidos se realizó de manera automática, obteniéndose una lista de las masas peptídicas de todos los iones detectados por el aparato. Esta información fue comparada con una base de datos de proteínas no redundante utilizando el programa MASCOT (Matrix Science Ltd., Londres; <http://www.matrixscience.com>).

RESULTADOS

RESULTADOS

I. ANÁLISIS E IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR PROTOPLASTOS DE *S. cerevisiae* EN REGENERACIÓN.

La eliminación de la pared celular de las células de levadura en un medio isosmótico, y posterior incubación de los protoplastos en condiciones de regeneración permite la expresión de genes implicados en los procesos de construcción de la pared celular. En condiciones de regeneración, muchas proteínas son secretadas al medio de cultivo. Entre éstas se encontrarán probablemente no sólo proteínas estructurales de la pared celular, sino también enzimas implicadas en los procesos de construcción y ensamblaje. En el presente trabajo se han analizado las proteínas secretadas por protoplastos en condiciones de regeneración de la pared celular, como estrategia para identificar proteínas implicadas en procesos relacionados con la construcción de esta estructura, así como para obtener un mapa de referencia de las proteínas secretadas en dichas condiciones.

1. Obtención de los productos de secreción de protoplastos de *S. cerevisiae* en regeneración.

Con el fin de obtener las proteínas secretadas por *S. cerevisiae* durante la regeneración activa de la pared celular, en cantidad elevada y en las condiciones adecuadas para su posterior análisis, se procedió como a continuación se describe. Los detalles del protocolo se describen en Materiales y métodos. La cepa S288C se incubó hasta alcanzar una densidad óptica adecuada (elegida como 4), para conseguir un elevado número de células, sin que el cultivo llegara a la fase estacionaria. Después de lavar las células, éstas fueron incubadas en una solución de pretratamiento que contenía β -mercaptoetanol, con el fin de desorganizar ligeramente la pared y facilitar la posterior actuación de las enzimas líticas (Guthrie y Fink, 1991). Los protoplastos se prepararon mediante el tratamiento con Glusulasa[®], una mezcla de glucanasas, proteasas y sulfatasas que digiere la pared celular de la levadura, en un medio estabilizado osmóticamente, sorbitol a concentración 1 M, con agitación suave. El tiempo de tratamiento necesario para la obtención de un 95-100% de protoplastos fue de 45 a 60 minutos.

Una vez obtenidos los protoplastos, se lavaron con sorbitol 1 M tres veces para eliminar completamente la Glusulasa[®]. Posteriormente se incubaron con agitación suave en un medio mínimo suplementado con todos los aminoácidos y estabilizado con sorbitol 1 M, para permitir la regeneración de su pared celular. Este medio fue elegido por ser un medio rico y definido, de manera que en su composición no hubiera sustancias que pudieran interferir con el posterior análisis electroforético de las muestras. Después de dos horas de incubación, se recogió el medio, se filtró para eliminar completamente las células y se concentró por ultrafiltración. Con el fin de eliminar el sorbitol, el medio fue lavado tres veces con diez volúmenes de agua mediante ultrafiltración, y finalmente se liofilizó, obteniéndose así una muestra en las condiciones adecuadas para su posterior análisis. En algunos casos, el medio fue concentrado hasta un volumen final de unos 200 μ l, para evitar la liofilización.

Los protoplastos, recién preparados y tras dos horas de regeneración, fueron observados mediante microscopía electrónica de transmisión (fig. 11). Los protoplastos recién preparados aparecían como células redondas, de superficie suave, con arrugas o canales

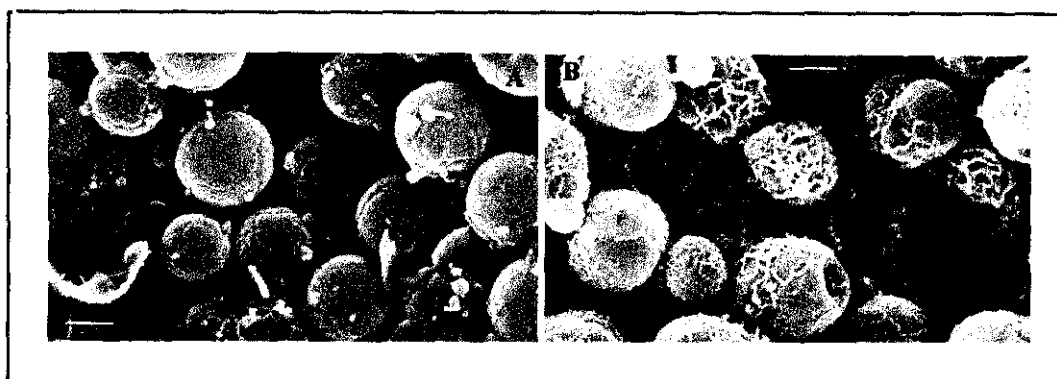


Fig. 11. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de protoplastos de *S. cerevisiae*. (A) Protoplastos recién preparados. (B) Protoplastos tras dos horas de incubación en condiciones de regeneración. La barra corresponde a 1 μm .

distribuidos de forma irregular. También se observaron unas formas globulares, menores que las células, que corresponden a sustancias secretadas por los protoplastos (Miegeville y Morin, 1977). Después de dos horas de incubación en condiciones de regeneración, los protoplastos presentaban una red de fibras gruesas, componentes de la nueva pared en formación, distribuidas de forma irregular por toda la superficie.

2. Control de la lisis celular.

Con el fin de comprobar que los protoplastos no se habían lisado durante la preparación de las muestras, lo cual hubiera llevado a la contaminación de éstas con proteínas intracelulares, llevamos a cabo varios controles de la lisis celular.

2.1. Valoración cuantitativa de la fosfatasa alcalina.

La fosfatasa alcalina es una enzima intracelular, y únicamente se libera al medio de cultivo en caso de lisis celular. La actividad fosfatasa alcalina se pone de manifiesto mediante la reacción con un sustrato cromogénico, el *p*-nitrofenilfosfato disódico, en la cual se libera *p*-nitrofenol, de color amarillo a pH básico. La determinación de esta actividad se realizó siguiendo el método de Cabib y Durán (Cabib y Durán, 1975). El ensayo de valoración de fosfatasa alcalina se realizó en el medio de regeneración de los protoplastos, después de la eliminación total de las células por filtración, en todas las muestras obtenidas. Como control positivo de la reacción se empleó un lisado de una alícuota de protoplastos (100 U.E.). Los valores de actividad fosfatasa alcalina de las muestras utilizadas estuvieron entre 1.3 y 2.12 U.E. (definiéndose una U.E. como la cantidad de enzima que libera 1 nmol de *p*-nitrofenol por ml y por minuto). Todas aquellas muestras con un valor de absorbancia, a una longitud de onda de 420 nm, superior a 0.1 (equivalente a 4 U.E.) fueron rechazadas.

2.2. Western-blotting con anticuerpos frente a Sec14p y proteínas ribosomales.

Sec14p es una proteína soluble citoplásmica, y su uso como control de la lisis celular ha sido descrito previamente (Cleves *et al.*, 1996). Para determinar si en la preparación de las muestras se había producido la lisis de los protoplastos, se decidió intentar detectar la

presencia de esta proteína en las mismas empleando anticuerpos policlonales frente a Sec14p (Bankaitis *et al.*, 1989), cedidos por el laboratorio del Dr. Bankaitis. Varias diluciones de un extracto citoplasmático, así como distintas cantidades de una muestra de proteínas secretadas por protoplastos, fueron separadas mediante electroforesis y analizadas mediante Western-blotting con anticuerpos frente a Sec14p (fig. 12). La película fue analizada utilizando el programa Molecular Analyst (Bio-Rad). La densitometría realizada mostró que la intensidad de las bandas de los carriles A y B correspondía a 1.2×10^6 y 6.25×10^5 células lisadas respectivamente. El porcentaje de lisis celular existente en la muestra fue calculado teniendo en cuenta la cantidad de proteína cargada en el gel, el total de proteína secretada de la muestra y el número total de protoplastos en ésta. Este experimento permitió concluir que el porcentaje de lisis celular en las muestras de proteínas secretadas por protoplastos en regeneración, preparadas tal y como se ha descrito anteriormente y, por tanto, la contaminación de estas muestras con proteínas intracelulares, es menor del 0.1%. Al llevar a cabo un experimento similar empleando anticuerpos frente a proteínas ribosomales de levadura se obtuvieron resultados análogos. Como control adicional, cuando los anticuerpos anti-Sec14p fueron ensayados frente a una membrana correspondiente a la separación electroforética bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos, no se detectó Sec14p.

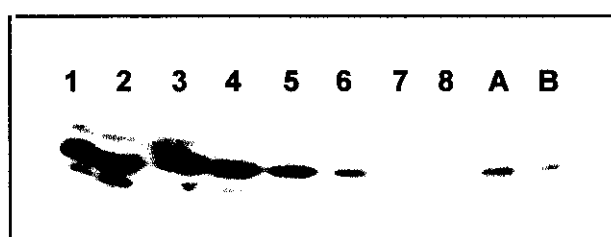


Fig. 12. Análisis de las proteínas secretadas por protoplastos mediante Western-blot con anticuerpos frente a Sec14p. Los carriles 1-8 contienen varias diluciones de un extracto citoplasmático, correspondientes a 6×10^7 , 3×10^7 , 1.2×10^7 , 6×10^6 , 3×10^6 , 1.2×10^6 , 6×10^5 y 3×10^5 células rotas respectivamente. Los carriles A y B contienen distintas cantidades de una muestra de proteínas secretadas por protoplastos.

3. Análisis de la glucosilación de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae*.

Algunas de las manoproteínas de la pared celular están unidas a una cadena de β -1,6-glucano con un enlace fosfodiéster (a través de un resto de un resto de GPI). Mediante esta cadena, estas proteínas se anclan a la matriz de β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1994; Kapteyn *et al.*, 1995; Kapteyn *et al.*, 1996; Montijn *et al.*, 1994). Hay otras manoproteínas de la pared celular, las llamadas proteínas Pir, que están unidas directamente al β -1,3-glucano, aunque no se conoce el tipo de enlace entre las dos macromoléculas (Kapteyn *et al.*, 1999b). En este trabajo se ha investigado la glucosilación de las proteínas secretadas por protoplastos mediante Western-blotting, utilizando anticuerpos policlonales frente a β -1,6-glucano y β -1,3-glucano, cedidos por el Dr. Klis. Como muestra la figura 13, el suero anti- β -1,6-glucano detectó una banda muy tenue a 160 kDa y otra en la parte superior de la membrana, muy por encima de 250 kDa (carril d). Como control positivo se empleó una muestra de proteínas de pared extraídas con zimoliasa, ya que éstas llevan unida una cadena de residuos de glucosa unidos mediante enlaces β -1,6 (Montijn *et al.*, 1994). Este resultado indica que algunas de las proteínas secretadas por protoplastos durante las dos primeras horas de regeneración están unidas a β -1,6-glucano. El suero anti- β -1,3-glucano también detectó una banda muy tenue por

encima de 250 kDa. Esta banda desapareció al realizar un experimento de competición con laminarina, un polímero de β -1,3-glucosa. Por tanto, algunas de las proteínas secretadas por protoplastos también parecen estar β -1,3-glucosiladas. Sin embargo, ninguno de estos dos polisacáridos fue detectado en membranas procedentes de separaciones electroforéticas bidimensionales, probablemente debido a la pequeñísima cantidad presente en la muestra.

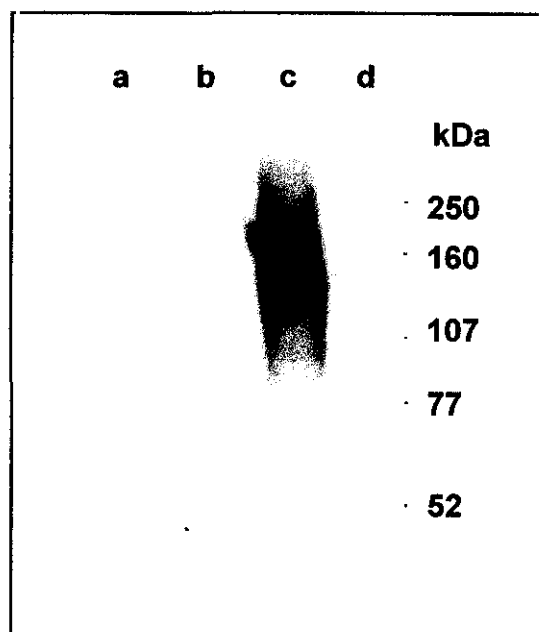


Fig. 13. Análisis mediante Western-blotting de la glucosilación de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae*.

(a) extracto citoplasmático; (b) proteínas de pared extraídas con SDS; (c) proteínas de pared extraídas con zimoliasa; (d) proteínas secretadas por protoplastos. Las muestras fueron analizadas con un suero anti- β -1,6-glucano purificado por afinidad.

4. Obtención de un mapa de proteínas secretadas por protoplastos en un gradiente no lineal de pH de 3 a 10.

Las muestras obtenidas según se describe anteriormente fueron separadas mediante electroforesis bidimensional (Bjellqvist *et al.*, 1993a). La separación mediante isoelectroenfoque se llevó a cabo en un gradiente inmovilizado de pH (IPG), sistema que aumenta la resolución y reproducibilidad de los geles respecto al sistema clásico, que empleaba anfolitos, permitiendo además cargar mayor cantidad de muestra (Bjellqvist *et al.*, 1993b). Para la separación mediante isoelectroenfoque se empleó un gradiente no lineal de pH entre 3 y 10. Se eligió un gradiente no lineal en el intervalo de pH entre 5 y 7 para conseguir una mejor resolución de las proteínas con valores de pI comprendidos en él. En la figura 14 se muestra la separación electroforética bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* en regeneración, en los intervalos de Mr 10-200 y pI 3.5-9, en un gel teñido con plata. Los geles preparados fueron analizados utilizando el programa MELANIE (versión 2.1, Bio-Rad), detectándose del orden de 700 manchas proteicas. Los valores de peso molecular y punto isoelectrico de las manchas fueron extrapolados a partir de

Fig. 14 (página siguiente). Mapa bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* en condiciones de regeneración de la pared celular. Las identificaciones se describen en el texto y en las tablas VII y VIII.

SDS



Mw
($\times 10^{-3}$)

← IEF

146

m9

m53

m17

m16

m50

m51

69

m25

m52

42

m10

m45

m20

m21

m14

m11

30

m23

14

4

4.5

5

5.5

6

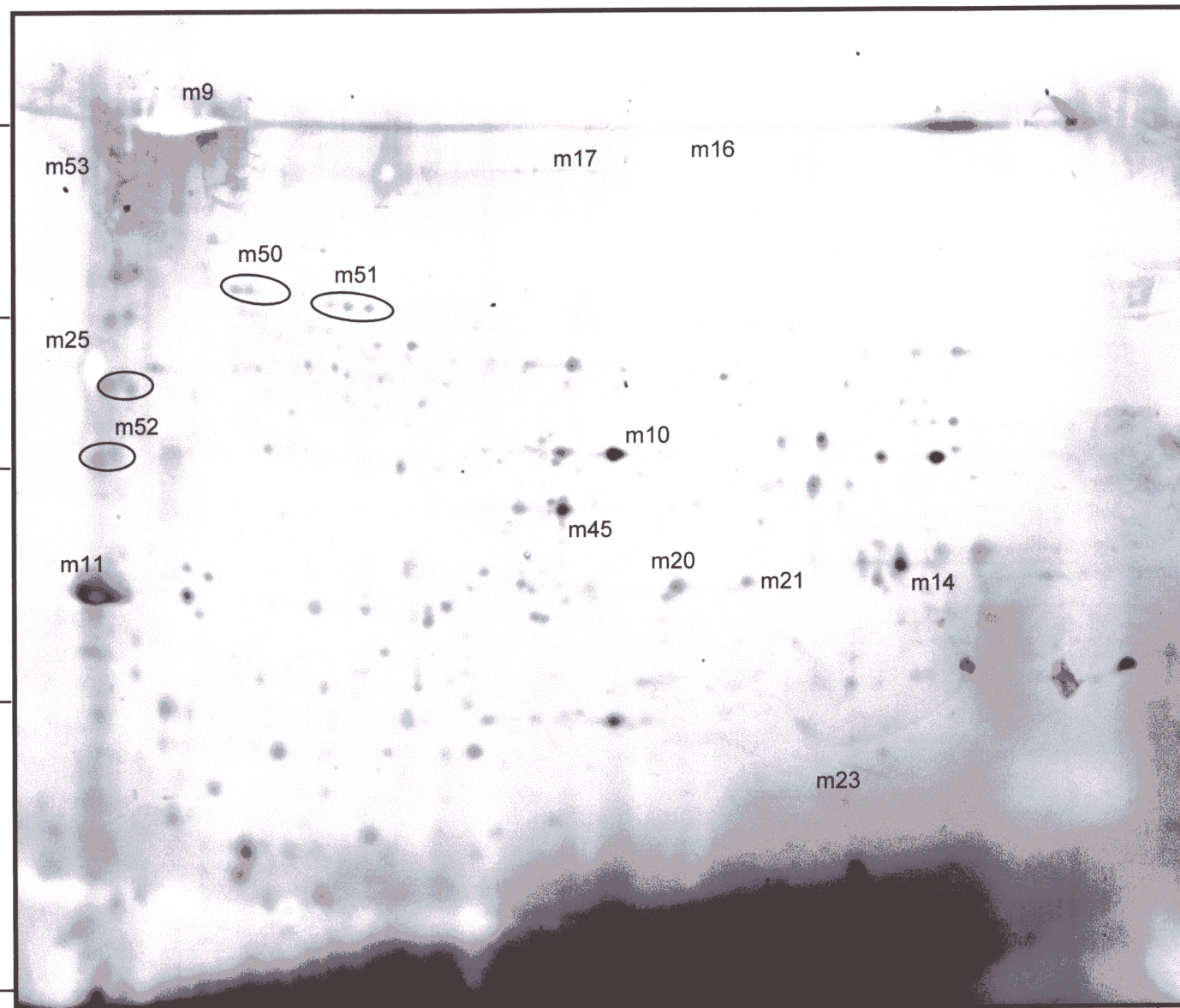
6.5

7

8

9

pI



los valores de patrones proteicos internos, utilizando el programa citado. La resolución conseguida fue buena, excepto en la parte superior del gel, donde aparecía una línea horizontal no resuelta, y en la zona ácida. La técnica se reveló altamente reproducible.

4.1. Identificación de las proteínas mediante secuenciación del extremo aminoterminal.

La primera estrategia empleada para la identificación de las proteínas fue la secuenciación del extremo aminoterminal. Para la obtención de proteínas aisladas se procedió a realizar la electroforesis bidimensional preparativa de las muestras de productos de secreción de protoplastos. Los geles resultantes de la separación bidimensional fueron transferidos a membranas de PVDF, utilizando un sistema de transferencia semiseca. El tampón de transferencia fue CAPS 10 mM a pH 11, con metanol al 10%, para evitar la contaminación de las membranas con glicina (Matsudaira, 1987). Las manchas proteicas detectadas con Azul Coomassie fueron sometidas a degradación de Edman para determinar su secuencia N-terminal. Este análisis fue realizado por el Dr. Enrique Méndez, en el C.N.B. de Madrid, y por Francisco Canals, en el Servicio de Secuenciación de Proteínas del Instituto de Biología Fundamental "Vicent Villar Palasí", en la Universidad Autónoma de Barcelona. Las secuencias aminoterminales obtenidas se muestran en la tabla VII. Estas secuencias fueron comparadas con la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (<http://genome-www.stanford.edu>) mediante el programa BLAST, resultando en la identificación de las manchas proteicas analizadas. La comparación se realizó frente a la traducción de todos los ORFs del genoma de *S. cerevisiae* secuenciados hasta aquel momento. Posteriormente, después de finalizarse la secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae* (Goffeau, 1996a), estas identificaciones fueron revisadas y, en el caso de la mancha proteica m9, corregidas. A continuación se describen las identificaciones obtenidas.

La secuencia determinada para m9 se encontró en los productos génicos de tres ORFs: YJL158w, YJL159w e YKL163w. YJL159w codifica la proteína Pir2p/Hsp150p, YKL163w codifica Pir3p e YKL163w codifica Cis3p. Se trata de tres proteínas homólogas, que pertenecen a la familia Pir1/Hsp150/Pir3. En los tres casos la secuencia determinada para m9 se encontraba inmediatamente detrás de un punto de procesamiento de la proteasa Kex2p. Está descrito en la literatura que durante el proceso de secreción, Hsp150p es procesada por la proteasa Kex2p, siendo la subunidad II la secretada al medio (Russo *et al.*, 1992). Lo mismo podría estar ocurriendo en el caso de Pir3p o Cis3p. Teniendo en cuenta los puntos isoeléctricos teóricos de las supuestas subunidades II de cada una de estas tres proteínas, parecería probable que m9 fuera Hsp150p/Pir2p o bien Pir3p, o incluso una mezcla de ambas. Resultados posteriores obtenidos mediante espectrometría de masas han confirmado la presencia de estas dos proteínas en la zona del gel correspondiente a m9 (véanse los apartados 4.3 y 5.2.3). Recientemente se ha descrito que Hsp150p/Pir2p, además de ser secretada al medio de cultivo, también está unida a la pared celular de *S. cerevisiae* mediante un enlace covalente al β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1999b). Pir3p, también denominada Ccw8p, es otro componente de la pared celular, de donde puede ser extraída mediante el tratamiento suave con álcali (Mrsa *et al.*, 1997).

La secuencia N-terminal determinada para m10 se encontró también en los productos de dos ORFs, YGR254w e YHR174w, que codifican respectivamente Eno1p y Eno2p. Ambas proteínas son idénticas hasta el aminoácido nº 52 y tienen el mismo tamaño. Para la identificación definitiva se recurrió a la comparación del valor experimental de pI con los valores calculados a partir de las secuencias de ambas proteínas. Eno1p tiene un pI de 6.39,

Tabla VII. Identificación de proteínas mediante secuenciación del extremo aminoterminal.

Mancha proteica	Secuencia N-terminal determinada	Secuencia SGD ^a	pI ^b	Mw (kDa) ^b	Identificación
m9	AAXQIGDG(G/L)QV	AASQIGDGQV	4.44	180	Pir2/Hsp150p, Pir3p
m10	AVSKVYARSV	AVSKVYARSV	5.76	43	Eno2p
m11	IGELNXXXXX(K/V)(N/D)(N/D)X(G/D)TXK	IGELAFNLGVKNNDGTCK	4.11	35	Bgl2p
m14	VRVAINGFGRI	VRVAINGFGRI	6.62	36	Tdh2p, Tdh3p
m15	ATSSSSSIPSS_XIX_HA_A_AQSDL	ATSSSSSIPSSCTISSHATATAQSDL	6.78	48	Ydr055p
m16	ATSSSSSIPSS	ATSSSSSIPSS	6.33	150	Ydr055p
m17	(S/Q/A)IKSPVE(I/T)V(S/Q)	SIKSPVETVS	5.6	150	Ydr055p
m20	IALSRPNVEVV LSRPNVEVVAL	IALSRPNVEVV LSRPNVEVVAL	5.95	35	Tdh3p
m21	RIALSRPNVE	RIALSRPNVE	6.16	35	Tdh3p
m23	RPNVEVVALND	RPNVEVVALND	6.45	23	Tdh3p
m25	FSHFDTEKPIV	FSHFDTEKPIV	4.09	57	Ygp1p
m45	GVEQILKXKTG	GVEQILKRKTG	5.72	39	Fba1p

^a *Saccharomyces Genome Database*^b Valores experimentales (MELANIE 2.1)

mientras que el de Eno2p es de 5.82. El valor de pI estimado para la mancha proteica m10 mediante el programa MELANIE fue de 5.76, concluyéndose que m10 corresponde a Eno2p. La enolasa es una enzima de la ruta glucolítica, que realiza la conversión de 2-fosfoglicerato a fosfoenolpiruvato. Varios autores han descrito la presencia de esta enzima, así como de otras enzimas glucolíticas, en la pared celular de levaduras y en la superficie celular de otros microorganismos (revisado en Chaffin *et al.*, 1998).

La búsqueda de la secuencia N-terminal de m11 dio como resultado el ORF YGR286c. Este gen codifica Bgl2p, una proteína que se localiza en la pared celular de la levadura (Klebl y Tanner, 1989). Otros datos que apoyan esta identificación son los valores experimentales de pI y Mw, que coinciden con el pI calculado a partir de la secuencia y con el peso molecular aparente de la proteína madura respectivamente. Por último, la secuencia N-terminal determinada para m11 coincide con la secuencia N-terminal de la proteína Bgl2 madura (una vez eliminado el péptido señal), excepto en el aminoácido nº 5. A partir de este residuo hubo un problema con el secuenciador, lo cual hace pensar que la quinta determinación no sea muy fiable. Por todo esto se puede concluir que m11 corresponde a Bgl2p. Esta proteína fue originalmente descrita como exo- β -1,3-glucanasa (Klebl y Tanner, 1989), aunque posteriormente se demostró que se trataba de una endo- β -1,3-glucanasa, con un posible papel en la expansión celular durante el crecimiento, en el apareamiento y en la liberación de las esporas (Mrsa *et al.*, 1993). Recientemente se ha descrito que Bgl2p posee una actividad β -1,3-glucosiltransferasa (Goldman *et al.*, 1995).

En la II Reunión de Electroforesis-2D en Siena (Septiembre, 1996) se describió un nuevo sistema de aplicación de la muestra en los geles IPG empleados para la primera dimensión, desarrollado por Sánchez y colaboradores (Sánchez *et al.*, 1997). El sistema consistía en realizar la aplicación de la muestra durante la rehidratación del gel, la cual se llevaba a cabo en una bandeja especialmente diseñada para ello. Al emplear este método en la electroforesis bidimensional micropreparativa se consiguió cargar una mayor cantidad de proteína, y, además, evitar la precipitación de la muestra en el punto de aplicación de ésta. Ello permitió detectar un mayor número de manchas proteicas en las membranas después de la tinción con Azul Coomassie, y realizar la secuenciación aminoterminal de las mayoritarias. Los datos obtenidos se muestran en la tabla VII.

La mancha m14 corresponde a la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa. Sin embargo, no fue posible distinguir entre las isoformas Tdh2p y Tdh3p, ya que ambas presentan una secuencia aminoterminal idéntica hasta el aminoácido 21, y sus valores de peso molecular y punto isoelectrico son muy similares. Se trata de otra enzima de la glucolisis, que cataliza la conversión del gliceraldehido-3-fosfato en 1,3-difosfoglicerato. También se detectaron formas truncadas de Tdh3p (manchas 20, 21 y 23). La mancha proteica m20 correspondía a una mezcla de dos polipéptidos procedentes de esta proteína, comenzando en los aminoácidos Ile-18 y Leu-20. Para la mancha m21 se determinó una secuencia que coincidía con la de Tdh3p a partir de la Arg-20. La mancha m23 presenta una cuarta forma, que comienza en Arg-22.

La mancha m45 resultó ser otra de las enzimas de la glucolisis, la fructosa bifosfato aldolasa. Ésta cataliza la hidrólisis de la fructosa-1,6-bifosfato para dar lugar a dihidroxiacetofosfato y gliceraldehido-3-fosfato.

Al analizar la mancha m25 se obtuvo una secuencia N-terminal que resultó corresponder a la proteína Ygp1p, a partir del residuo Phe-145; es decir, se trataría de una

forma truncada de esta proteína. Ygp1p es una proteína glicosilada, que es sintetizada y secretada al medio de cultivo en condiciones de falta de nutrientes (Destruelle *et al.*, 1994).

Para la mancha m15 se obtuvo una secuencia N-terminal discontinua de 22 residuos. Al realizar la búsqueda en las bases de datos, esta secuencia se localizó en la proteína traducida a partir del ORF YDR055w. La secuencia N-terminal determinada comenzaba en el aminoácido n° 20 de la hipotética proteína. El programa Psignal, que emplea el algoritmo de Von Heijne para la detección de péptidos señal que dirijan la secreción de proteínas (Nielsen *et al.*, 1997), predice la existencia de un péptido señal en la secuencia de la proteína codificada por YDR055w. El punto de procesamiento más probable está entre los aminoácidos Ala-19 y Ala-20. Es decir, la secuencia N-terminal determinada experimentalmente coincide con la teórica. La mancha m16 presentó la misma secuencia aminoterminal. Cuando se analizó la mancha m17 se obtuvo una secuencia N-terminal que también localizamos como procedente de YDR055w, aunque ésta comenzaba en el aminoácido Ser-177 de la proteína. Esta mancha podría pues ser un producto de degradación de dicha proteína. La mancha m15 no ha podido ser asignada a ninguna mancha en el gel ya que no fue detectada mediante la tinción con plata, y la posición de las manchas m16 y m17 mostrada en el gel es aproximada (fig. 14).

Al ser Ydr055w la primera proteína de función desconocida identificada en nuestras muestras, y dadas las características típicas de proteínas de pared que presentaba, decidimos profundizar en su estudio (Capítulo II de Resultados de esta memoria). El ORF YDR055w fue registrado en la base de datos *Saccharomyces Genome Database*, denominándosele *PST1* (de *Protoplasts-Secreted protein*).

4.2. Identificación de proteínas mediante detección con anticuerpos.

Dado que la identificación de manchas proteicas mediante secuenciación aminoterminal requería una considerable cantidad de proteína, se decidió recurrir a otra estrategia. Abordamos, pues, la localización de proteínas de pared conocidas en el patrón bidimensional mediante Western-blotting, usando anticuerpos policlonales específicos. Las identificaciones obtenidas se muestran en la tabla. Todos los anticuerpos utilizados fueron ensayados primero en Western-blots monodimensionales, con el fin de comprobar que reconocían alguna proteína en la muestra de proteínas secretadas por protoplastos.

Los anticuerpos frente a la familia SSA reconocen tanto a Ssa1p como a Ssa2p; sin embargo se desconoce si también reaccionan con Ssa3p y Ssa4p, que se inducen en condiciones de estrés (E. A. Craig, comunicación personal). Al llevar a cabo el Western-blot, estos anticuerpos reconocieron un grupo de proteínas a 76 kDa, siendo la identificación asignada al grupo correspondiente en el gel (fig. 14). Los anticuerpos frente a la familia SSB también reconocen dos proteínas, Ssb1p y Ssb2p. Éstos detectaron otro grupo de manchas de un peso molecular ligeramente inferior al anterior.

Los anticuerpos frente a Cwp1p, una proteína de pared unida covalentemente al β -1,6-glucano (Kapteyn *et al.*, 1996), no dieron ninguna señal al ser ensayados en Western-blot monodimensional. Sin embargo, posteriormente esta proteína fue identificada entre las proteínas secretadas por protoplastos mediante espectrometría de masas (véase el apartado 5.2.2. de este capítulo).

Los anticuerpos frente a Gas1p, una proteína de membrana con anclaje a GPI (Benghezal *et al.*, 1995; Nuoffer *et al.*, 1991), reconocieron un rastro no resuelto en la parte superior y ácida de la membrana bidimensional. Esto indicaba que Gas1p, o alguna proteína homóloga, estaba presente en las muestras de proteínas secretadas por protoplastos. Estos anticuerpos policlonales empleados son capaces de reconocer alguna(s) proteína(s) homóloga(s) a Gas1p (L. Popolo, comunicación personal). La familia GAS en *S. cerevisiae* está compuesta por cinco proteínas homólogas (Caro *et al.*, 1997). Resultados obtenidos posteriormente mediante espectrometría de masas confirmaron la presencia tanto de Gas1p como de su homólogo Gas3p, en la región reconocida por los anticuerpos (véanse los apartados 4.3 y 5.2.3 de este capítulo).

Se han ensayado también anticuerpos frente a Hkr1p, Kre9p y Flo1p, todos ellos con resultado negativo. Esto no es extraño, ya que no esperábamos encontrar ninguna de estas proteínas. Hkr1p es una proteína de membrana plasmática de tipo I, únicamente detectada en sobreexpresión (Yabe *et al.*, 1996), Kre9p sólo es detectada en el medio de cultivo cuando es sobreexpresada (Brown y Bussey, 1993a), y Flo1p no se expresa en cepas no floculantes (Bidard *et al.*, 1995), como es el caso de la S288C.

Tabla VIII. Identificación de proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* mediante detección con anticuerpos policlonales.

Mancha proteica	pI ^a	Mw (kDa) ^a	Identificación
m50	4.63-4.67	76	Ssa1,2,(3,4)p
m51	4.90-5.02	71	Ssb1,2p
m52	4.23-4.27	42, 55	Exg1p
m53	4.1-4.6	126	Gasp

^a Valores experimentales (MELANIE 2.1).

4.3. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

La muestra de proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* (aproximadamente 150 µg de proteína) fue separada mediante electroforesis bidimensional analítica. La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8% (fig. 15). Esta concentración de acrilamida origina un tamaño de poro en la malla del gel tal que permite la salida de los péptidos de ésta después de la digestión proteolítica (S. Bains, comunicación personal). Los geles así obtenidos fueron teñidos con plata siguiendo el procedimiento descrito por Schevchenko y colaboradores (Shevchenko *et al.*, 1996b). Este procedimiento no es tan agresivo para las proteínas como los empleados tradicionalmente, y fue diseñado para ser compatible con el posterior análisis de las manchas detectadas mediante espectrometría de masas. Las manchas proteicas detectadas fueron cortadas manualmente con una cuchilla y transferidas a tubos eppendorf. El análisis de estas manchas mediante espectrometría de masas fue realizado por Malcolm Ward y Satty Bains (*Biomolecular Structure Unit*), en el *Medicines Research Centre* de GlaxoWellcome Research and Development (Stevenage, Reino Unido).

La estrategia seguida para la identificación consistió en la digestión con tripsina de las manchas proteicas, y la obtención de una “huella peptídica” mediante el análisis de la mezcla resultante por espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF. Las búsquedas en las bases de

Tabla IX. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

Mancha proteica ^a	Mw (kDa) ^b	pI ^b	Péptidos coincidentes	Identificación
1 (m9)	125	4.57	MS/MS ^d	Hsp150p Suc2p Gas3
2	110	4.42	5	Kel1p
3	88	4.37	7	Kel1p
5	64	4.44	MS/MS ^d	Prp46p
15	44	5.25	7	Prp46p
16 (m11)	31	4.36	5	Bgl2p ^c
17	32	4.62	7	Bmh1p ^c
19	27	5.20	7	Eno2p
20	27	5.31	12	Eno2p
21	22	4.71	7	Ahp1p
22	34	5.26	5	Ipp1p ^c
25	46	7.75	17	Pgk1p
26	46	6.51	6	Pgk1p
28	49	7.12	MS/MS ^d	Glr1p
29	58	8.35	8	Pyk1p
30	58	7.38	4	Pyk1p ^c
31	33	5.39	8	Eno2p
34	35	5.67	10	Eno2p
45	57	5.69	18	Dcp1p
46	46	5.67	15	Eno2p
47	45	5.68	12	Eno2p
57	24	5.74	12	Tpi1p
59	28	7.40	10	Eno2p
60	23	5.95	5	Tdh3p ^c
63	24	8.37	5	Eno2p ^c
65	26	9.00	15	Pmg1p
66	22	8.97	6	Eno2p
67 (m20)	33	5.80	13	Tdh3p
68 (m21)	34	5.89	MS/MS	Tdh1,2 ó 3p
70 (m14)	35	7.08	9	Tdh3p
71	41	5.97	5	Adh1p ^c
79	39	5.66	15	Eno2p
82	48	5.97	13	Eno1p

^a El número se refiere al gel representado en la figura 15a. Entre paréntesis se indican manchas identificadas previamente por otro método.

^b Valores experimentales (MELANIE 2.1).

^c Confirmado mediante NanoES-MS/MS.

^d Identificada mediante NanoES-MS/MS.

Fig. 15a (página siguiente). Separación electroforética bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos en un gel al 8% en la segunda dimensión. Los números de las manchas corresponden a las identificaciones de la tabla IX.

Fig. 15b (pág. 79). Mapa de referencia (pH 3-10) donde se muestran todas las identificaciones obtenidas.

SDS Mw
($\times 10^{-3}$)

← IEF

110

46

31

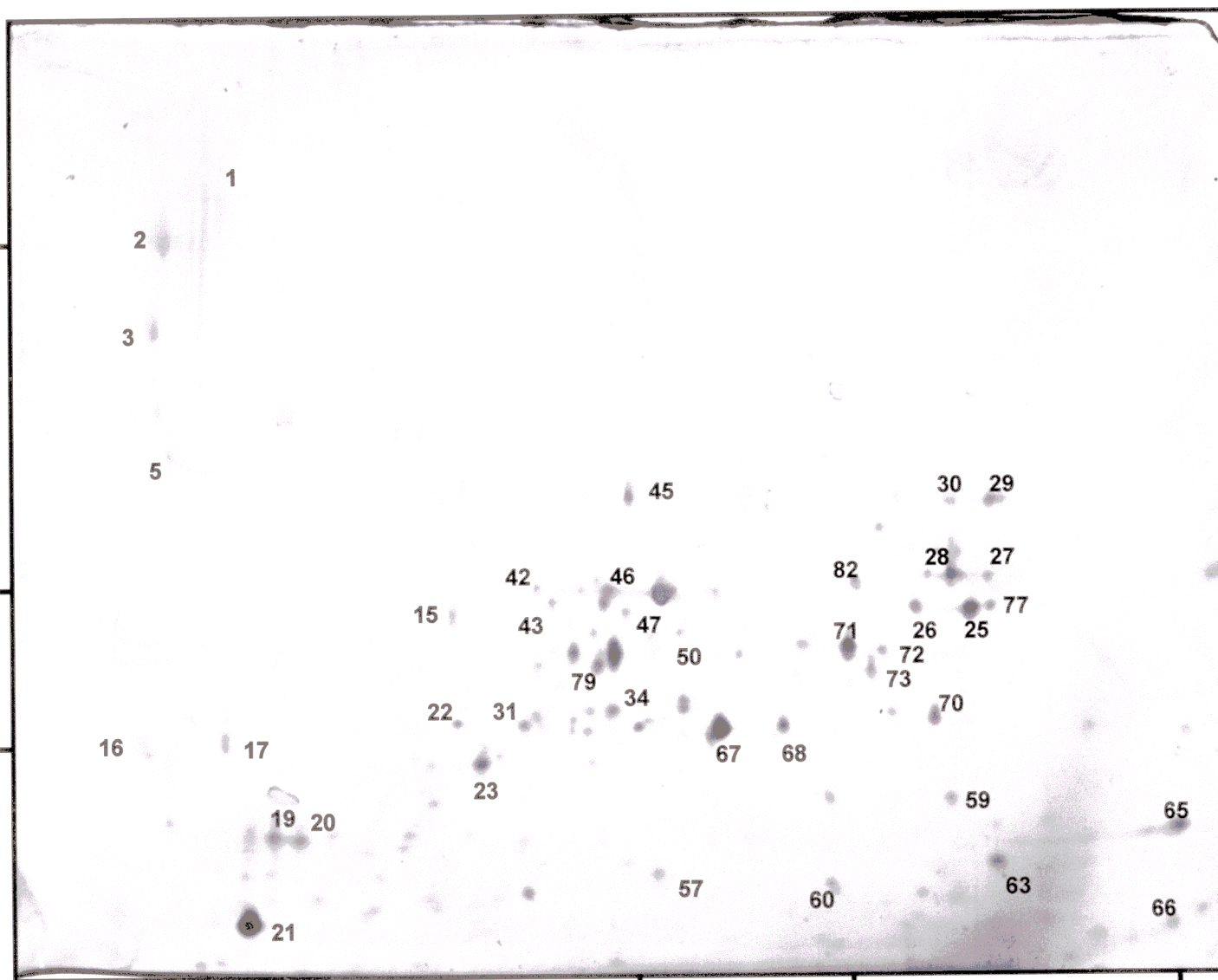
4.7

5.7

6.5

9

pI



SDS



Mw
($\times 10^{-3}$)

IEF



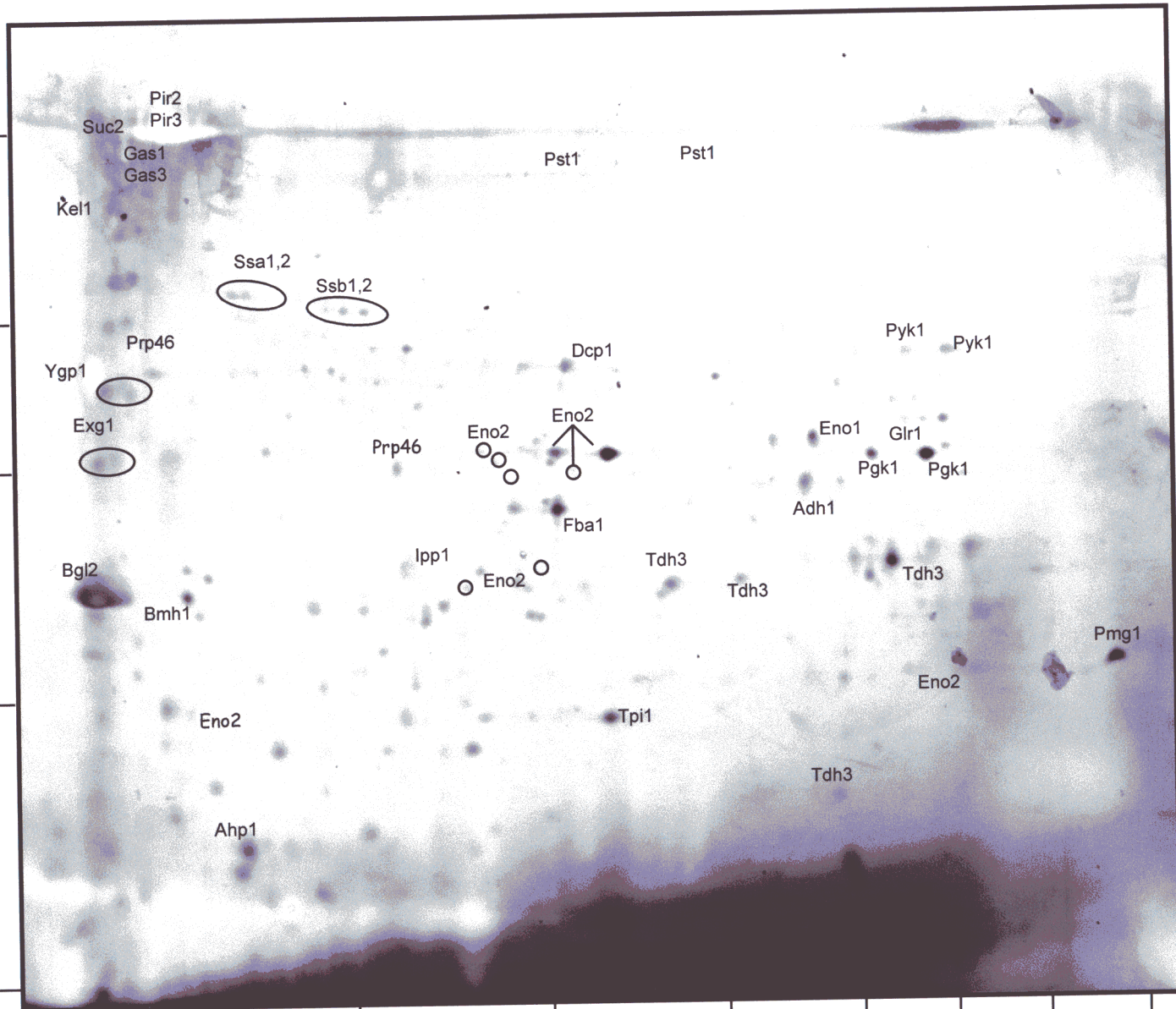
146

69

42

30

14



pI

datos se llevaron a cabo utilizando el programa PeptideSearch™ (Shevchenko *et al.*, 1996), en una base de datos no redundante que contenía entradas de SwissProt, TREMBL y Genbank. Los parámetros utilizados en la búsqueda fueron los siguientes: intervalo de error de ± 100 ppm, considerar modificaciones (Cys como cisteín-acrilamida y Met como MetOx), mínimo de 4 péptidos coincidentes, permitir 1 corte parcial, peso molecular restringido (hasta 300 kDa) y especie no restringida. En aquellos casos en los que este análisis no dio lugar a una identificación concluyente, se recurrió a la secuenciación mediante espectrometría de masas en tándem. Se han analizado 70 manchas proteicas, de las cuales 33 fueron identificadas, correspondientes a 19 proteínas diferentes. La tabla IX muestra estos resultados. Todas las identificaciones obtenidas hasta el momento se han señalado en la figura 15b.

Varias de las manchas corresponden a enzimas glicolíticas o de la fermentación, cuya presencia en la superficie celular, como se ha comentado anteriormente, ya ha sido descrita (Chaffin *et al.*, 1998; Edwards *et al.*, 1999). Por otra parte, el análisis mediante espectrometría de masas ha permitido determinar que la mancha proteica detectada por los anticuerpos frente a Gas1p contiene al menos un homólogo de ésta, Gas3p. Resultados obtenidos posteriormente también han confirmado la presencia de Gas1p en esta zona (véase el apartado 5.2.3 de este capítulo). Además, se han detectado una serie de proteínas implicadas en procesos diversos. Ahp1p y Grl1p son respectivamente una alquil hidroperóxido reductasa (Lee *et al.*, 1999) y la glutathione reductasa (Collinson y Dawes, 1995), dos enzimas detoxificadoras. Ipp1p es una fosfatasa inorgánica (Kolakowski *et al.*, 1988). Bmh1p es homóloga a las proteínas 14-3-3 de mamíferos (Gelperin *et al.*, 1995). Kellp ha sido descrita recientemente como una proteína implicada en fusión celular y morfogénesis (Philips y Herskowitz, 1998) y Prp46p es una proteína que presenta dominios WD-40, supuestamente implicados en interacciones entre proteínas (Smith *et al.*, 1999).

5. Obtención de un mapa de proteínas secretadas por protoplastos en un gradiente de pH entre 4 y 7.

5.1. Separación electroforética en un gradiente de pH de 4 a 7.

Puesto que se había observado que la mayoría de las proteínas de pared conocidas habían sido detectadas en la zona ácida de los geles bidimensionales de pH 3-10, se decidió estrechar el intervalo de pH y ampliar así esta zona, con el fin de mejorar la resolución de las manchas de proteína y facilitar su identificación. Esto se consiguió empleando un gradiente lineal de pH entre 4 y 7 en la separación mediante isoelectroenfoque. Puesto que se iba a realizar la identificación de las manchas proteicas mediante espectrometría de masas, la separación en la segunda dimensión se llevó a cabo en geles de poliacrilamida al 8%. Los geles preparados fueron teñidos con plata siguiendo el procedimiento descrito por Shevchenko y colaboradores (Shevchenko *et al.*, 1996b). Mediante observación visual se detectaron del orden de 50 manchas proteicas. La figura 16 muestra la imagen de uno de los geles obtenidos.

5.2. Identificación de proteínas mediante espectrometría de masas.

La identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas detectadas en los geles de intervalo de pH entre 4 y 7 se realizó en el laboratorio del Dr. Walter Blackstock (*Cell Mapping Project*), en el *Medicines Research Centre* (GlaxoWellcome, Stevenage, Reino Unido), bajo la supervisión y con la ayuda de Malcolm Ward.

5.2.1. Espectrometría de masas MALDI-TOF.

Las manchas proteicas fueron procesadas como se describe en Materiales y métodos. Una alícuota de 1/20 de los volúmenes de digestión correspondientes a cada una de las manchas fue analizada mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Se obtuvo así un espectro asociado a cada una de las manchas, que constituye su “huella peptídica”. A este tipo de espectro se le denominará “espectro MALDI-TOF” de ahora en adelante. Los espectros fueron procesados de forma automática mediante el programa MassLynx (Micromass, Reino Unido), obteniéndose una lista de masas peptídicas para cada una de las manchas. La huella peptídica de cada mancha proteica fue comparada automáticamente con la base de datos SwissProt 35.0 por el programa Protein Probe (Micromass, Reino Unido). En el caso de aquellas manchas que presentaban un espectro de calidad, es decir, con varios picos peptídicos intensos, también se realizó la comparación de la huella peptídica con la base de datos *nrprep* (actualizada al 14/7/99) de forma individualizada empleando el algoritmo PepSea (Protana, Dinamarca). Para que la identificación sea concluyente tienen que coincidir al menos cinco péptidos, con un intervalo de error de 50 ppm, representando una cobertura mínima de la secuencia del 15% (Mann *et al.*, 1993). Ninguna de estas búsquedas dio lugar a una identificación concluyente para ninguna de las manchas proteicas, por lo que se decidió recurrir a otras técnicas espectrométricas.

5.2.2. Espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida (LC/MS/MS).

Dado el limitado tiempo de que se disponía para realizar las identificaciones mediante espectrometría de masas, se empleó la siguiente estrategia. Se eligieron cinco manchas que presentaban un buen espectro MALDI-TOF (números 3, 10, 12, 19 y 29) y se mezclaron los volúmenes restantes de las soluciones de digestión correspondientes en un vial. La mezcla resultante fue analizada mediante espectrometría de masas en tándem acoplada a cromatografía líquida. Esta técnica es utilizada por el grupo del Dr. Blackstock de forma rutinaria para la identificación de bandas de proteína teñidas con Azul Coomassie procedentes de electroforesis monodimensional. Con frecuencia una sola banda contiene varias proteínas diferentes, y esta técnica es capaz de identificar todas ellas. El razonamiento seguido fue que si era posible identificar varias proteínas a partir de la digestión de una única banda proteica, probablemente también sería posible identificar las proteínas presentes en una mezcla formada por las soluciones de digestión de varias manchas proteicas, que previsiblemente contendrían una proteína cada una.

La mezcla fue inyectada en un equipo de cromatografía líquida capilar de fase inversa, conectado en línea con un espectrómetro de masas de tipo Q-Tof, siendo eluída directamente hacia éste con un gradiente acuoso-orgánico durante una hora. Los espectros obtenidos fueron procesados de forma automática, dando lugar a una lista de las masas de todos los iones detectados. Para la identificación de las proteínas presentes en la mezcla se empleó el algoritmo del programa MASCOT (Matrix Science Ltd., Reino Unido; <http://www.matrixscience.com>), y la comparación se realizó frente a la base de datos *nrprep*. La forma de realizar esta búsqueda consiste en, una vez que el programa ha identificado la proteína mayoritaria presente en la mezcla -que es aquella de la cual existe el mayor número de masas peptídicas experimentales coincidentes con las masas peptídicas teóricas- eliminar todos estos valores de la búsqueda y volver a realizar la comparación con la base de datos. Entonces otra proteína es identificada, y se vuelve a repetir el proceso, y así sucesivamente

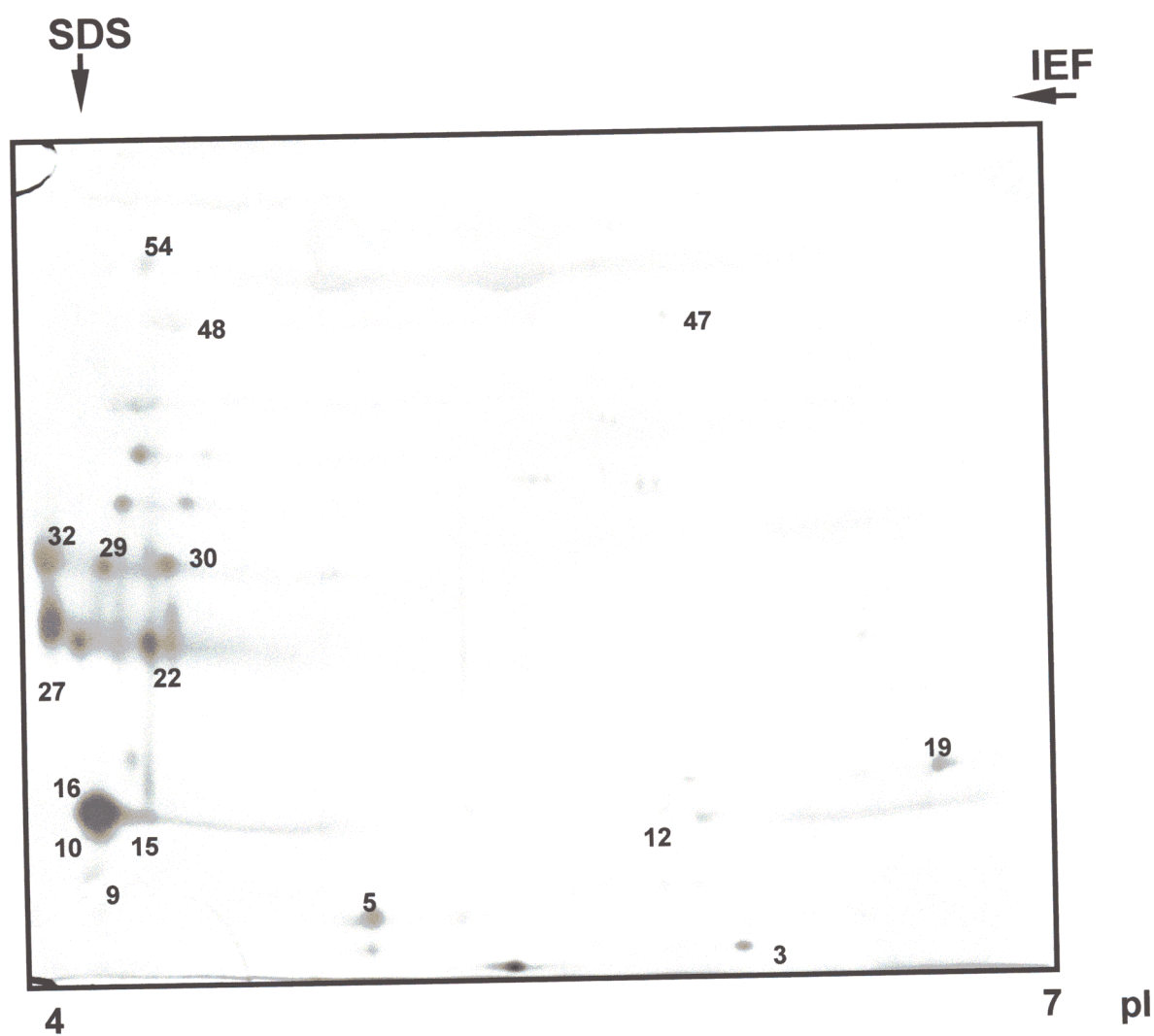


Fig.16. Separación bidimensional de las proteínas secretadas por protoplastos en un gradiente lineal de pH de 4 a 7. Los números corresponden a las identificaciones descritas en el texto, listadas en la tabla X.

hasta que todos los iones detectados hayan sido asignados a alguna proteína. Este análisis se realiza de forma tan exhaustiva porque, como ya se ha comentado, en las bandas proteicas procedentes de electroforesis monodimensional es muy frecuente la comigración de varias proteínas del mismo peso molecular aparente.

La primera proteína identificada fue Bgl2p, de la cual se encontraron 18 iones peptídicos. A continuación apareció Cwp1p, detectándose 14 iones. Después fueron identificadas Tdh3p (5 iones peptídicos) y el producto del gen YDR032c (4 iones peptídicos). Por último se detectó Hsp150p, localizándose 3 iones peptídicos. De esta manera se consiguió identificar las cinco proteínas presentes en la mezcla, y, además, la búsqueda rindió una sexta identificación. Únicamente se detectó un péptido de la última de las proteínas identificadas, la espermidina sintasa, probablemente un contaminante de alguna de las manchas, que fue puesto de manifiesto gracias a la gran sensibilidad de la técnica. En la mezcla también se detectó la presencia de tripsina (6 péptidos) y queratinas (13 péptidos), procedentes de contaminación durante la manipulación de las muestras.

El siguiente paso fue asignar cada una de las identificaciones obtenidas a una mancha proteica determinada. La estrategia seguida fue comparar de forma manual las listas de masas peptídicas experimentales asociadas a cada una de las proteínas identificadas, con los espectros MALDI-TOF de las manchas que habían sido incluidas en la mezcla, tratando de encontrar en éstos los péptidos detectados por MS/MS específicos de cada proteína identificada (véase un ejemplo en la figura 17).

La figura 17 muestra el espectro MALDI-TOF de la mancha proteica 3. En él se localizó un ion peptídico $[MH]^+1$ con un valor m/z de 2462.1. En la lista de iones peptídicos correspondiente a la proteína Ydr032p se encontraron los valores m/z de los iones peptídicos $[MH_2]^+2$ y $[MH_3]^+3$ correspondientes al mismo péptido, 1231.46 y 821.33 respectivamente. Es decir, este péptido de peso molecular 2461.1 Da procede de Ydr032p. Así, los datos obtenidos mediante espectrometría de masas MALDI-TOF confirmaron la identificación de la mancha 3 como el producto del gen YDR032c. YDR032c codifica una proteína de función desconocida, que presenta homología con otras dos proteínas de *S. cerevisiae* (Ycp4p y el producto del gen YBR052c) y con la proteína obr1 de resistencia a brefeldina A de *Schizosaccharomyces pombe*.

En el espectro MALDI-TOF de la mancha proteica 10 se encontraron los iones $[MH]^+1$ con valores de m/z 1699.1, 1940.1 y 1485, correspondientes a los péptidos de peso molecular 1698.1, 1939.1 y 1484 Da respectivamente (fig. 18). En la lista de masas experimentales correspondientes a Bgl2p se localizaron los siguientes iones: $[MH_2]^+2$ con m/z 849.84, correspondiente al péptido de peso molecular 1697.68 Da, $[MH_3]^+3$ a m/z 647.27, correspondiente al péptido de 1938.8 Da, y $[MH_2]^+2$ a m/z 742.75, correspondiente al péptido de 1483.5 Da. Esto confirma la identificación de la mancha 10 como Bgl2p. La observación de que en el espectro MALDI-TOF de la mancha proteica 19 aparecían los iones correspondientes a los mismos péptidos condujo a identificarla también como Bgl2p. El hecho de que dos de las manchas presentes en la mezcla analizada sean la misma proteína implica que alguna de las manchas es una mezcla de al menos dos proteínas.

La mancha proteica 29 fue identificada como Cwp1p, al encontrar en su espectro MALDI-TOF tres iones peptídicos cuyas masas coincidían con las calculadas para la digestión con tripsina de esta proteína. Probablemente esta mancha contenga también Hsp150p, ya que esta proteína migra en la misma región de pH y, además, es minoritaria en la

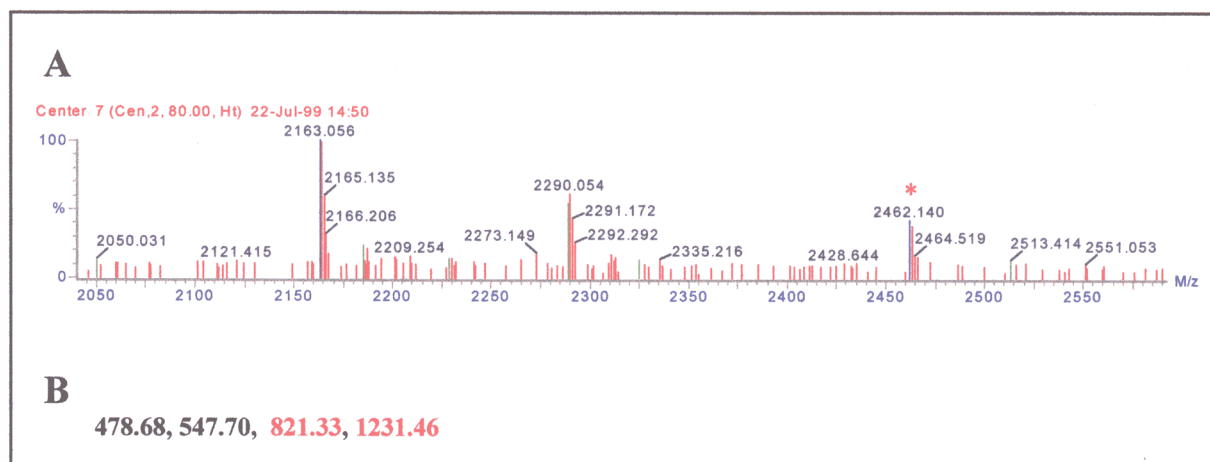


Fig. 17. Análisis de la mancha proteica n° 3 mediante EM. (A) Espectro MALDI-TOF de la digestión con tripsina. El asterisco señala el pico isotópico correspondiente a un péptido de 2461.1 Da. (B) Lista de los iones peptídicos detectados mediante LC/MS/MS pertenecientes a Ydr032p. En rojo aparecen los iones $[MH_2]^{2+}$ y $[MH_3]^{3+}$ correspondientes a un péptido de 2460.9 Da.

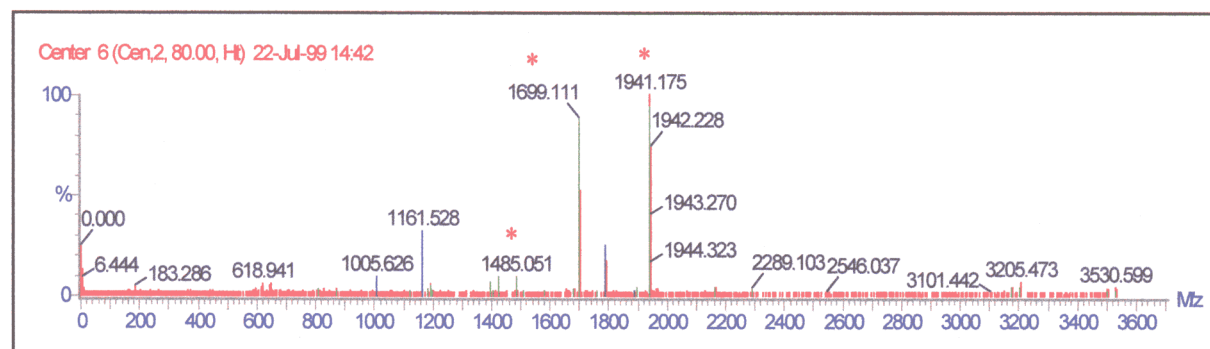


Fig. 18. Espectro MALDI-TOF de la mancha proteica n° 10. Los asteriscos indican los péptidos pertenecientes a Bgl2p cuyos iones $[MH_2]^{2+}$ o $[MH_3]^{3+}$ fueron detectados mediante LC/MS/MS.

mezcla. La proteína Tdh3p es la única identificación restante, y debe de corresponder por eliminación a la mancha proteica 12, aunque no fue posible confirmarlo con los datos procedentes de la espectrometría de masa MALDI-TOF.

Los resultados obtenidos hasta el momento apuntaban a que la identificación de las manchas no había podido realizarse a partir únicamente de la huella peptídica obtenida mediante espectrometría de masas MALDI-TOF ya que el número de péptidos detectados era muy pequeño, y por ello insuficiente para una identificación concluyente. Sin embargo, era posible localizar en los espectros algunos iones peptídicos característicos de las proteínas, que permitían realizar la identificación de la mancha correspondiente. Un análisis más minucioso del resto de los espectros MALDI-TOF obtenidos inicialmente reveló que en algunos de ellos aparecían péptidos característicos de dos de las proteínas identificadas, Bgl2p y Cwp1p. Esto permitió asignar una identidad a siete manchas proteicas más. Las manchas proteicas 5, 9, 15, 16 y 54 fueron identificadas como Bgl2p, por presentar en sus espectros MALDI-TOF de dos a cuatro péptidos característicos de esta proteína (comparar los espectros de la figura 19A). Del mismo modo, las manchas 30 y 32 fueron identificadas como Cwp1p. La figura 19B

muestra el espectro MALDI-TOF de la mancha 32, en el cual se encontraron cuatro péptidos característicos de Cwp1p.

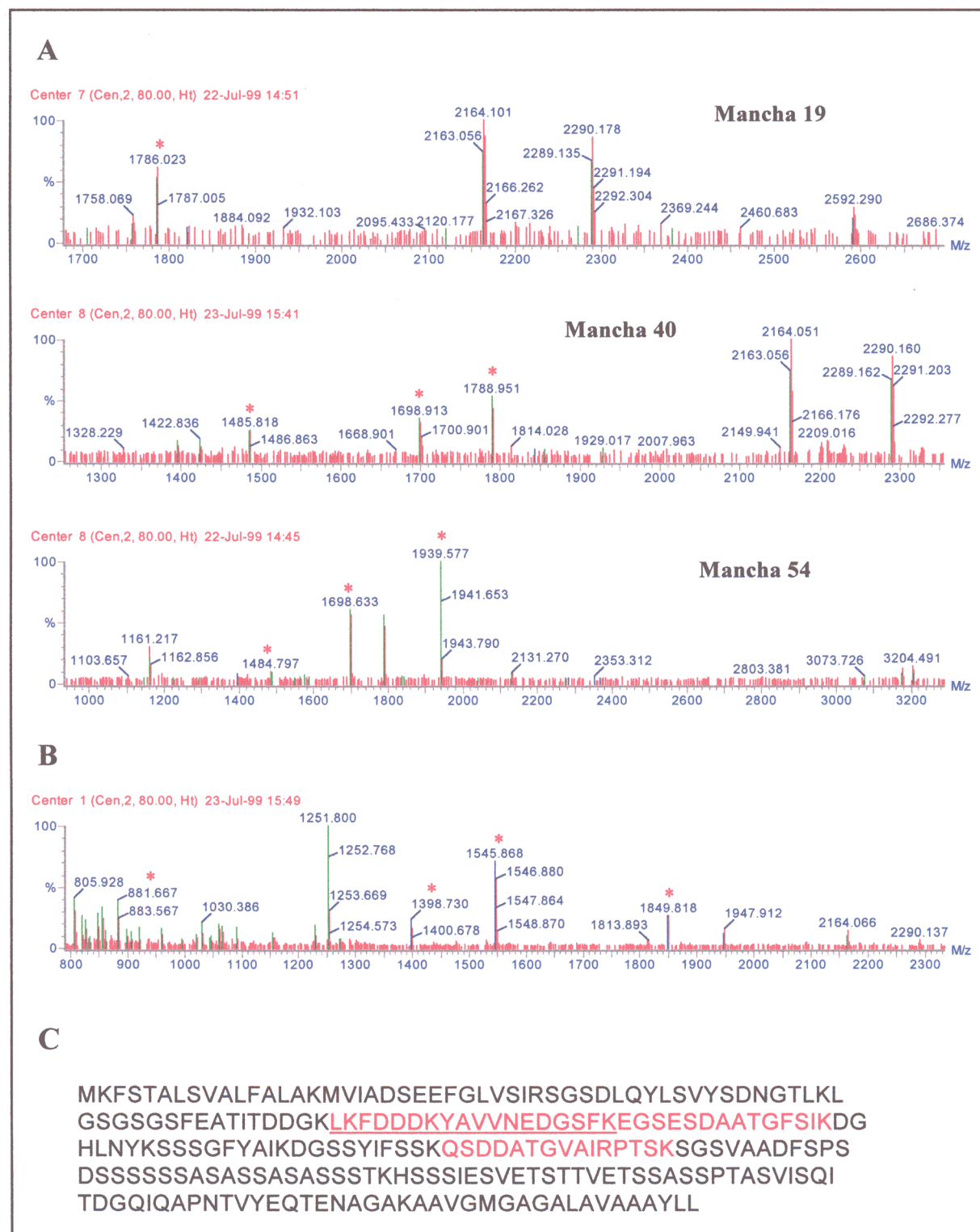


Fig. 19. Identificación de manchas proteicas mediante examen visual de los espectros MALDI-TOF. (A) Espectros MALDI-TOF de las manchas 19, 40 y 54, identificadas como Bgl2p por comparación con la mancha nº 10 (véase la figura 17). (B) Espectro MALDI-TOF de la mancha nº 32. Los asteriscos señalan los péptidos originados a partir de Cwp1p. (C) Secuencia de la proteína Cwp1p. En rojo se señalan los péptidos detectados en el espectro MALDI-TOF de la mancha proteica nº 32. La secuencia subrayada corresponde a uno de los péptidos, procedente de una digestión parcial.

5.2.3. Espectrometría de masas en tándem con ionización mediante nanoelectrospray (ESI/MS/MS).

Para continuar con la identificación de manchas proteicas decidimos utilizar la espectrometría de masas en tándem con ionización mediante nanoelectrospray y detector de tipo cuadrupolo. Esta técnica permite elegir un péptido concreto en una mezcla y fragmentarlo, para así determinar su secuencia aminoacídica.

Para llevar a cabo esta técnica se eligieron cuatro manchas proteicas que presentaban un espectro MALDI-TOF de muy buena calidad, es decir, con varios picos peptídicos intensos, con el fin de asegurar que habría péptidos en cantidad suficiente para ser analizados. Las manchas elegidas fueron las siguientes: 22, 27, 47 y 48. Las figuras 20 a 23 muestran los espectros MALDI-TOF de las manchas citadas. El volumen restante de las soluciones de digestión con tripsina de cada una de estas manchas fue purificado para eliminar las sales y concentrado. Una fracción de éste fue inyectada en el espectrómetro mediante nanoelectrospray y analizada por espectrometría de masas en tándem. Una vez que se detectaban picos peptídicos con doble carga, se procedía a su disociación inducida por colisión. A estos espectros resultantes de la fragmentación de un péptido se les denominará “espectros MS/MS”. Los espectros MS/MS obtenidos fueron interpretados manualmente, deduciéndose de ellos secuencias aminoacídicas cortas y su posición dentro del péptido (lo que se denomina *sequence tags*, literalmente “etiquetas de secuencia”) (Mann y Wilm, 1994). Estas secuencias cortas, junto con el peso molecular del péptido correspondiente, fueron comparadas con las bases de datos *nrprep* utilizando el algoritmo PepSea.

Al analizar la mancha proteica nº 27 se obtuvieron las siguientes secuencias cortas: (360)VL/ISG(716) en el péptido de 828.8 Da (fig. 20B), (505)VL/ITG(875) en el péptido de 1075.2 Da y (946)L/IT(1160) en el péptido de 1875.6 Da. La búsqueda de estas tres secuencias en las bases de datos de forma independiente resultó en la identificación de una misma proteína, Cis3p. Así pues, la mancha 27 fue identificada como Cis3p. Esta proteína, a la que también se ha denominado Pir4p/Ccw5p/Ccw11p/Scw8p (Moukadiri *et al.*, 1999; Mrsa *et al.*, 1997), pertenece a la familia de las proteínas Pir presentes en la pared celular. Cis3p puede ser extraída de paredes celulares aisladas mediante el tratamiento con SDS en condiciones reductoras (Mrsa *et al.*, 1997) o con laminarinasa (Cappellaro *et al.*, 1998). La proteína se localiza preferentemente en la superficie de yemas en crecimiento (Moukadiri *et al.*, 1999). Únicamente la delección múltiple de varias proteínas de la familia Pir provoca fenotipos característicos de daños en la pared celular (Mrsa y Tanner, 1999a).

En el caso de la mancha 22, se observó que se trataba de una mezcla de dos proteínas. La secuencia (621)QL/I(862) en el péptido de 1003 Da se encuentra en la proteína Bgl2p. La secuencia (650)L/ITG(921) en el péptido de 1108.8 Da procede de Hsp150p (fig. 21B).

El análisis de la mancha proteica 48 dio lugar a las siguientes secuencias cortas: (652)SYAG(1030) en el péptido de 1192.6 Da, (808)AFY(1190) en el péptido de 1535.6 Da y (645)L/IAPV(1025) en el péptido de 1254.8 Da (N-terminal) (fig. 22). La comparación con las bases de datos identificó la mancha como Gas1p en los tres casos.

Al analizar la mancha 47 se determinó la secuencia corta (460)L/ISG(716) en el péptido de 829.2 Da. La búsqueda en las bases de datos originó cuatro posibles identificaciones: Cis3p, Hsp150p, Pir1p y Pir3p, todas ellas proteínas homólogas, que comparten este péptido procedente de la digestión con tripsina (IGSIVANR). Al revisar el

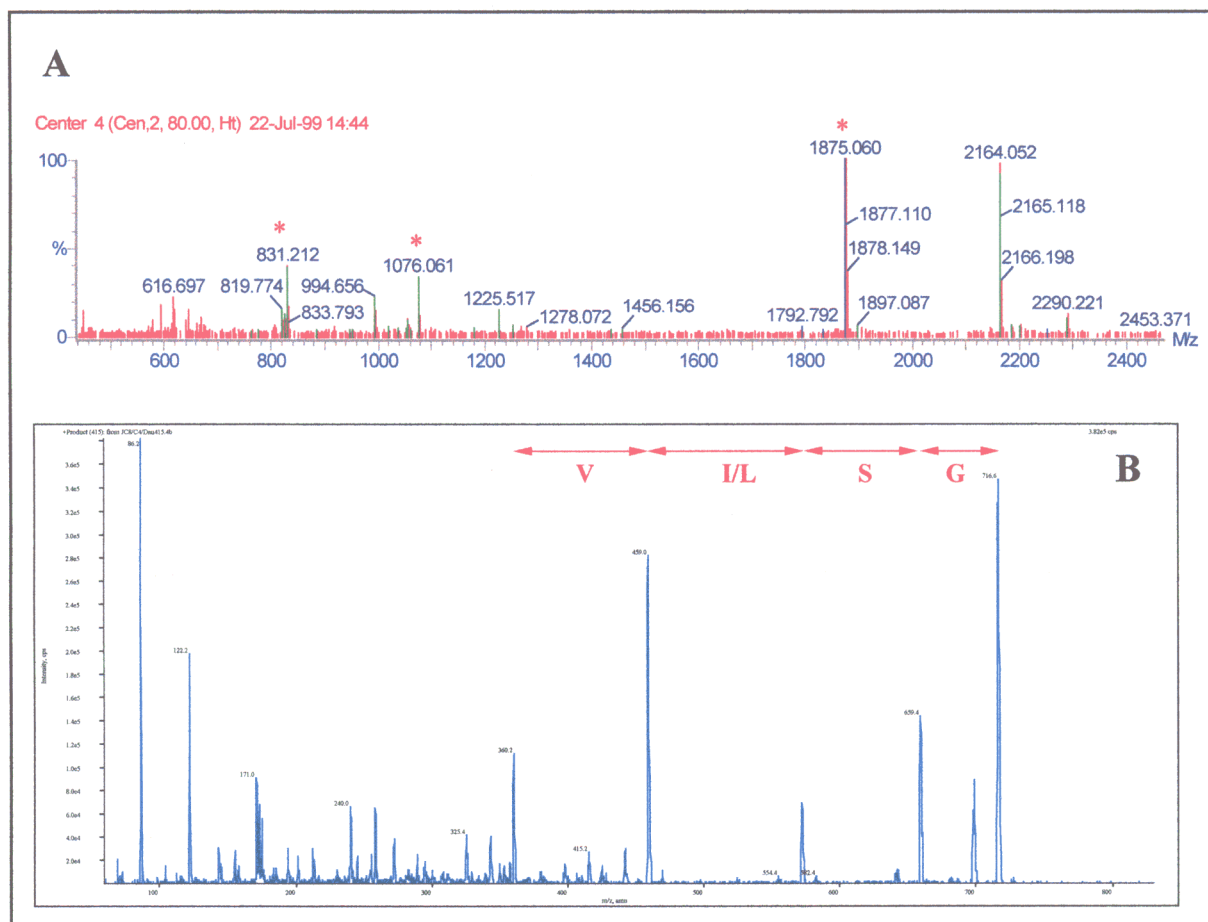


Fig. 20. Análisis de la mancha nº 27. (A) Espectro MALDI-TOF. Los asteriscos señalan los péptidos que fueron analizados mediante ESI/MS/MS, que resultaron pertenecer a Cis3p. (B) Espectro MS/MS del ion $[MH_2]^{2+}$ a m/z 415.4, correspondiente a un péptido de 828.8 Da. La secuencia deducida se muestra en la parte superior.

espectro MALDI-TOF de esta mancha se observó la presencia de un péptido de 2132 Da, que sólo podía provenir de la digestión con tripsina de Pir3p (fig. 23A), por lo que se asignó esta identificación. Sin embargo, en el espectro se observó también un péptido de 1584 Da, que no procedía de Pir3p ni de ninguna de las otras proteínas homólogas. Así pues, esta mancha contenía también dos proteínas.

Para intentar identificar la otra proteína presente en la mancha 47 se utilizó un equipo que estaba siendo desarrollado en aquel momento en el laboratorio del Dr. Blackstock. Se trata de un espectrómetro de masas con detector de tipo Q-ToF, al cual se le había instalado un dispositivo que permitiera la infusión automática de las muestras a partir de una placa multipocillo. El equipo se programó para que al analizar la muestra mediante espectrometría de masas en tándem eligiera de forma automática el ion $[MH_2]^{2+}$ correspondiente al péptido de 1584 Da no identificado, y lo fragmentara. El espectro MS/MS obtenido se interpretó de forma manual, deduciéndose la secuencia completa del péptido TPPACLLACVAQVGK (23B). La búsqueda de esta secuencia en la base de datos *nrprep* con el programa PepSea identificó a la proteína Icwplp/Ssr1p, una manoproteína con señal de anclaje mediante GPI localizada en la capa interna de la pared celular (Moukadiri *et al.*, 1997). Además, el péptido

analizado resultó ser el extremo N-terminal de la citada proteína. Este dato ha permitido definir la secuencia aminoterminal de la proteína Icwp madura, y delimitar el péptido señal que dirige su entrada en la ruta de secreción. Éste coincide con el péptido señal teórico calculado mediante el algoritmo de Von Heijne (Von Heijne, 1986).

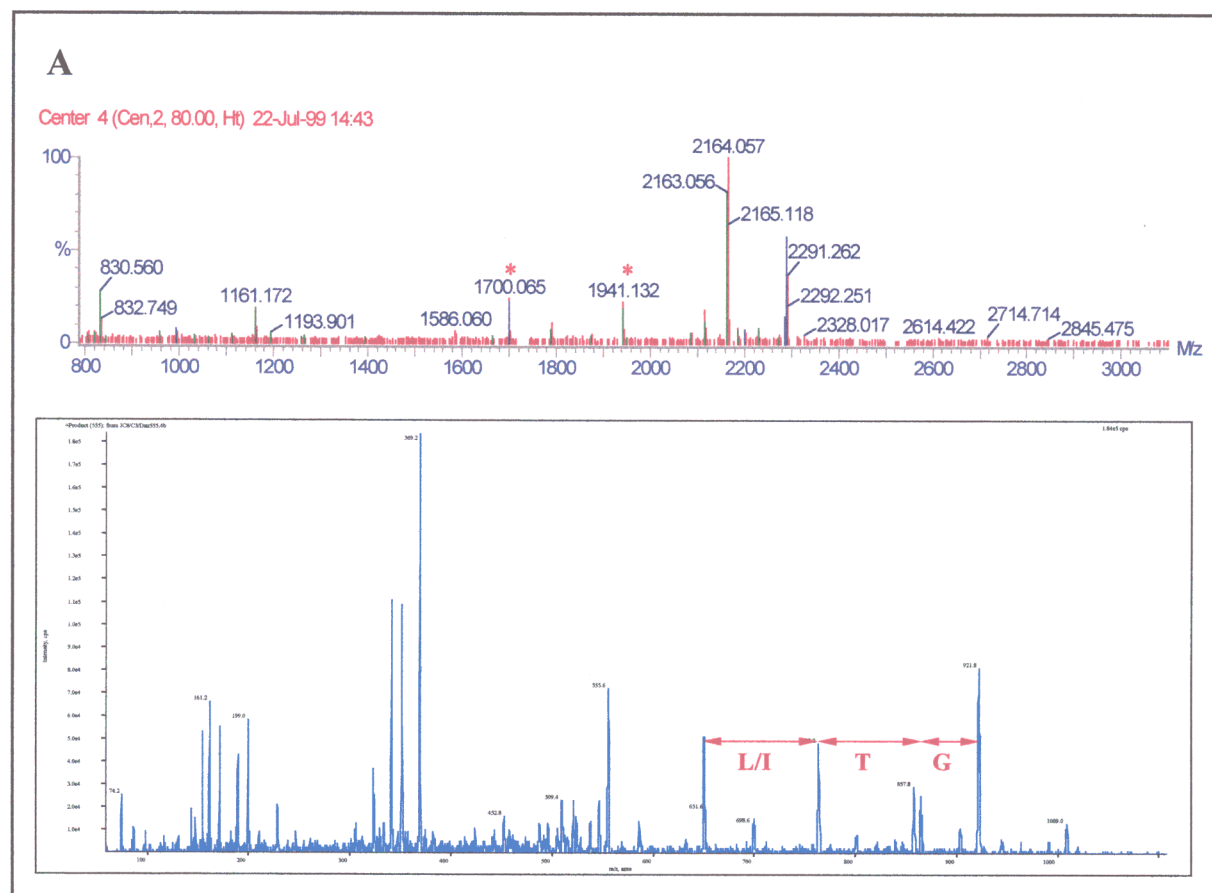


Fig. 21. Análisis de la mancha proteica nº 22 mediante EM. (A) Espectro MALDI-TOF asociado la mancha 22. Los asteriscos indican los péptidos originados a partir de Bgl2p. (B) Espectro MS/MS del ion $[MH_2]^{2+}$ a m/z 555.4, correspondiente a un péptido de 1108.8 Da. La secuencia corta deducida se identificó como perteneciente a la proteína Hsp150p.

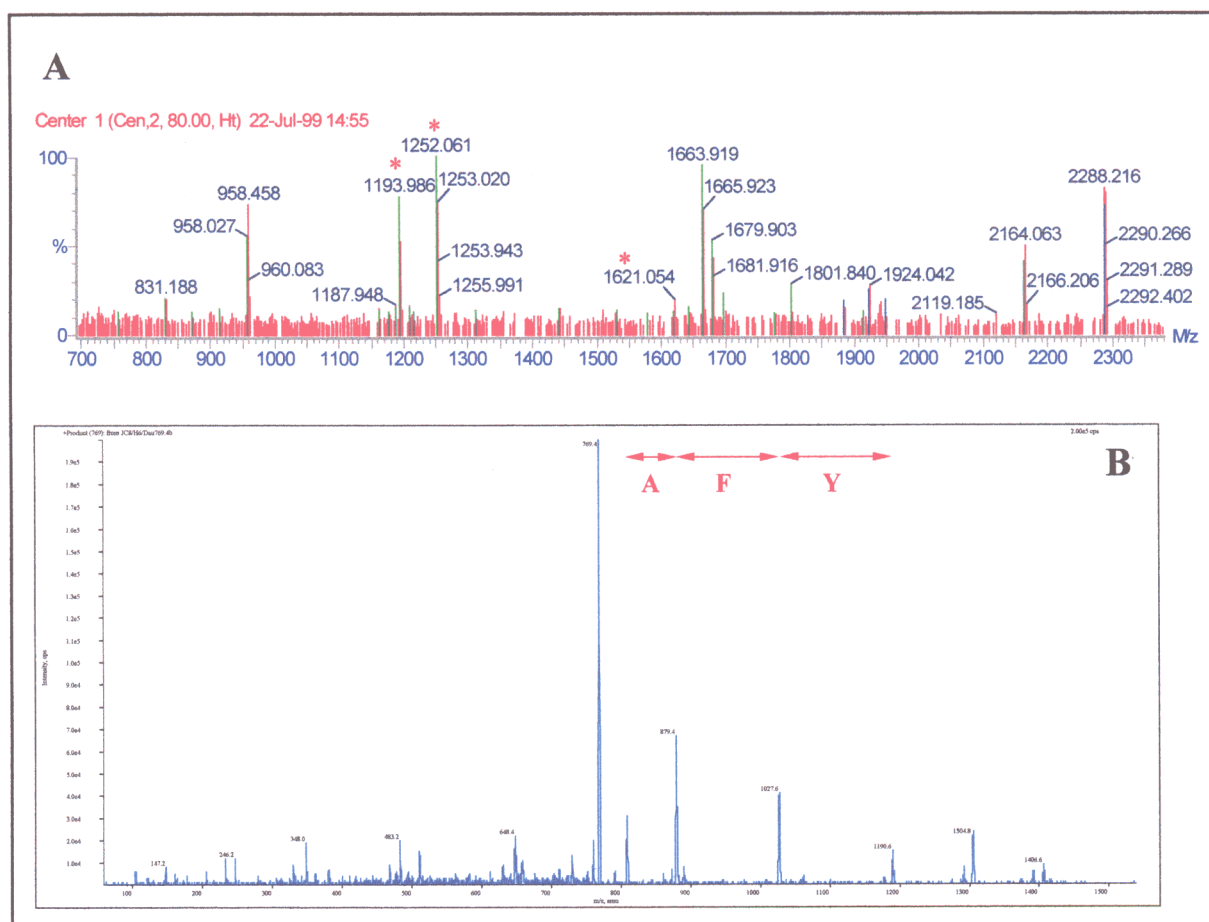


Fig. 22. Identificación de la mancha proteica n° 48. (A) Espectro MALDI-TOF correspondiente. Los péptidos señalados fueron analizados mediante ESI/MS/MS. (B) Espectro MS/MS del ion $[MH_2]^{2+}$ a m/z 769.4, correspondiente a un péptido de peso molecular 1536.8 Da. La secuencia deducida resultó proceder de Gas1p.

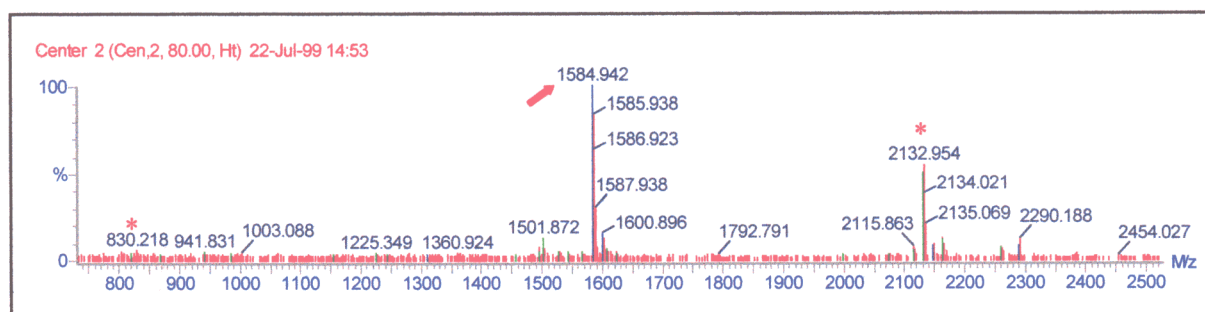


Fig. 23. Análisis de la mancha n° 47 mediante EM. Espectro MALDI-TOF. Los asteriscos indican los péptidos procedentes de la digestión con tripsina de Pir3p. La flecha señala el péptido secuenciado por MS/MS.

Tabla X. Identificación mediante espectrometría de masas de las proteínas separadas en gradiente de pH 4-7.

Mancha proteica	Identidad	Método de identificación	Péptidos detectados (Da) ^a		Secuencia ^b
3	Ydr032p	LC/MS/MS	957.36 1093.4 2461.1		n.d.
5	Bgl2p	MALDI-TOF	1698.1 1939.1		n.d.
9	Bgl2p	MALDI-TOF	1484 1698.1 1939.1		n.d.
10	Bgl2p	LC/MS/MS	1003.5 1190.4 1191.4 1389.4 1483.5	1697.7 1713.6 1787.6 1938.8 2249.8	n.d.
12	Tdh3p ^c	LC/MS/MS	879.3 882.4 1125.4 1373.5 1470.5		n.d.
15	Bgl2p	MALDI-TOF	1484 1698.1 1939.1		n.d.
16	Bgl2p	MALDI-TOF	1698.1 1939.1		n.d.
19	Bgl2p	LC/MS/MS	*		n.d.
22	Bgl2p	NanoES/MS/MS	1003		AALQTYLPK
	Hsp150p		1108.8 ^d		TSGTLEMNLK
27	Cis3p	NanoES/MS/MS	828.8 1075.2 1875.6		IGSIVANR NSGTLELTLK NSGTLELTLKDGVLTDAK
29	Cwp1p	LC/MS/MS	958.4 1089.3 1227.4 1397.4 1544.6	1640.5 1847.6 1881.7 1945.7 2224.7	n.d.
	Hsp150		828.4	1092.4	
30	Cwp1p	MALDI-TOF	1397.7 1544.8 1847.8		n.d.

32	Cwp1p	MALDI-TOF	879.6 1397.7 1544.8 1847.8	n.d.
47	Pir3p	MS/MS y MALDI-TOF	829.2 2132	IGSIVANR n.d.
	Icwp	MS/MS	1584	TPPACLLACVAQVGK
48	Gas1p	NanoES/MS/MS	1192.6 1254.8 1535.6	YGAYSFCTPK DDVPAIEVVGNK MTDYFACGDDDDVK
54	Bgl2p	MALDI-TOF	1484 1698.1 1939.1	n.d.

^a Los péptidos señalados en **negrita** fueron localizados en los espectros MALDI-TOF.

^b Las secuencias señaladas en **rojo** fueron determinadas mediante ESI/MS/MS.

^c Identificación probable, sin confirmar.

^d Contiene una metionina oxidada.

n.d.: No determinada.

* Como en la mancha nº 10

II. ESTUDIO FUNCIONAL DEL GEN YDR055w/*PST1*.

1. Características de la proteína codificada por el gen YDR055w/*PST1*.

El gen *PST1* codifica una proteína de 444 aminoácidos, con un peso molecular teórico de 45.7 kDa. Esta proteína presenta en el extremo N-terminal de su secuencia aminoacídica un posible péptido señal, estando el punto de procesamiento más probable entre los aminoácidos Ala-19 y Ala-20, según el algoritmo de Von Heijne (Von Heijne, 1986). Nuestras observaciones coinciden con esta predicción (véase el apartado 4.1. del capítulo I de Resultados). Asimismo, en el extremo C-terminal hay una posible señal de anclaje a GPI (Caro *et al.*, 1997). El sitio ω de unión a la molécula de GPI correspondería al residuo Asn-419. Además, la secuencia de Pst1p es muy rica en serinas y treoninas (un 29% en toda la proteína), aminoácidos susceptibles de ser *O*-glicosilados durante el proceso de secreción. Todas estas características son comunes a proteínas de la pared celular de *S. cerevisiae* extraíbles con glucanasas, y también a algunas proteínas de membrana (Caro *et al.*, 1997). A lo largo de toda la secuencia hay 15 sitios potenciales de *N*-glicosilación.

Pst1p presenta una homología considerable con las proteínas codificadas por otros tres ORFs del genoma de *S. cerevisiae*, de manera que las cuatro proteínas han sido agrupadas en una familia a la que se ha denominado “familia Sps2” (Caro *et al.*, 1997), por ser *SPS2* el primer gen de la misma que fue estudiado. Las cuatro proteínas de la familia presentan las características citadas anteriormente: presencia de péptido señal en el extremo N-terminal, señal de anclaje a GPI, y alto porcentaje de serinas y treoninas. La secuencia aminoacídica deducida a partir de la secuencia del gen *PST1* presenta un 58% de similitud con la deducida a partir del ORF YBR078w/*ECM33*. El mutante generado por integración de un transposón en este ORF presenta una serie de fenotipos que indican una alteración clara de la pared celular: hipersensibilidad a zimoliasa, a toxina *killer* K1, a higromicina B y a Blanco de Calcoflúor, y una proporción manosa:glucosa en la pared celular disminuida (Lussier *et al.*, 1997). El mutante delecionado en este gen en el fondo genético FY1679 comparte todos estos fenotipos de hipersensibilidad y además presenta una morfología aberrante (Vázquez, 1999). Las otras dos proteínas de la familia Sps2 son las codificadas por los genes YDR522c/*SPS2* e YCL048w. La homología de Pst1p con éstas es menor, del 31 y 29% respectivamente, pero sin embargo éstas están más próximas entre sí, presentando entre ellas una semejanza del 43%.

Las proteínas con anclaje a GPI en *S. cerevisiae* forman parte de la membrana plasmática o de la pared celular (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998a). En todas aquellas que no están unidas covalentemente a la pared existe lo que se ha llamado un “motivo dibásico”, es decir, dos residuos aminoacídicos básicos juntos inmediatamente por delante del sitio ω . Este motivo no aparece en las proteínas con anclaje a GPI unidas covalentemente a la pared. No se conoce la función de este motivo, aunque se han propuesto varias posibilidades (Caro *et al.*, 1997). La secuencia de Pst1p no presenta el motivo dibásico por delante del sitio ω , lo cual la asemeja a las proteínas unidas covalentemente a la pared, mientras que todas las demás proteínas de la familia Sps2 sí presentan el citado motivo. Sin embargo, la secuencia de Pst1p sí presenta dos residuos básicos por delante del sitio ω , en las posiciones ω -2 y ω -5, aunque no están contiguos. Hamada y colaboradores han propuesto que la presencia de estos residuos podría constituir una señal negativa para la incorporación de proteínas con anclaje a GPI a la pared celular (Hamada *et al.*, 1998b).

La posibilidad de que estuviésemos ante una nueva proteína, posiblemente implicada en procesos relacionados con la pared celular, nos llevó a profundizar en su estudio.

2. Obtención de un mutante de *S. cerevisiae* deleciónado en el gen YDR055w/*PST1*.

2.1. Deleción del gen y obtención de mutantes *pst1Δ::kanMX4*.

Para la obtención de mutantes deleciónados en el ORF YDR055w se utilizó la técnica del reemplazamiento génico (Rothstein, 1983). La estrategia empleada para conseguir este objetivo fue la amplificación por PCR del ORF junto con sus secuencias flanqueantes, y la clonación del producto de PCR en el punto *SmaI* del vector pUC19. La amplificación por PCR se realizó empleando los oligos UPA1 y LOA4, y utilizando como molde DNA genómico de la cepa FY1679. El fragmento de DNA amplificado contenía el gen en cuestión, más 671 pb por delante de éste y 288 pb de zona terminadora. El plásmido así obtenido se denominó pMUD55. A continuación el fragmento *StyI-StyI* de 843 pb, que contiene la mayor parte del gen estructural, fue eliminado y sustituido por el módulo *kanMX4* (Wach *et al.*, 1994), que incluye el gen marcador *kan^r* (fig. 24). El gen *kan^r* confiere resistencia a kanamicina en *E. coli*, y resistencia al antibiótico geneticina en *S. cerevisiae*. El plásmido resultante pMUD2i fue digerido con las enzimas de restricción *ApaI* y *StuI*, y empleado para transformar la cepa diploide FY1679.

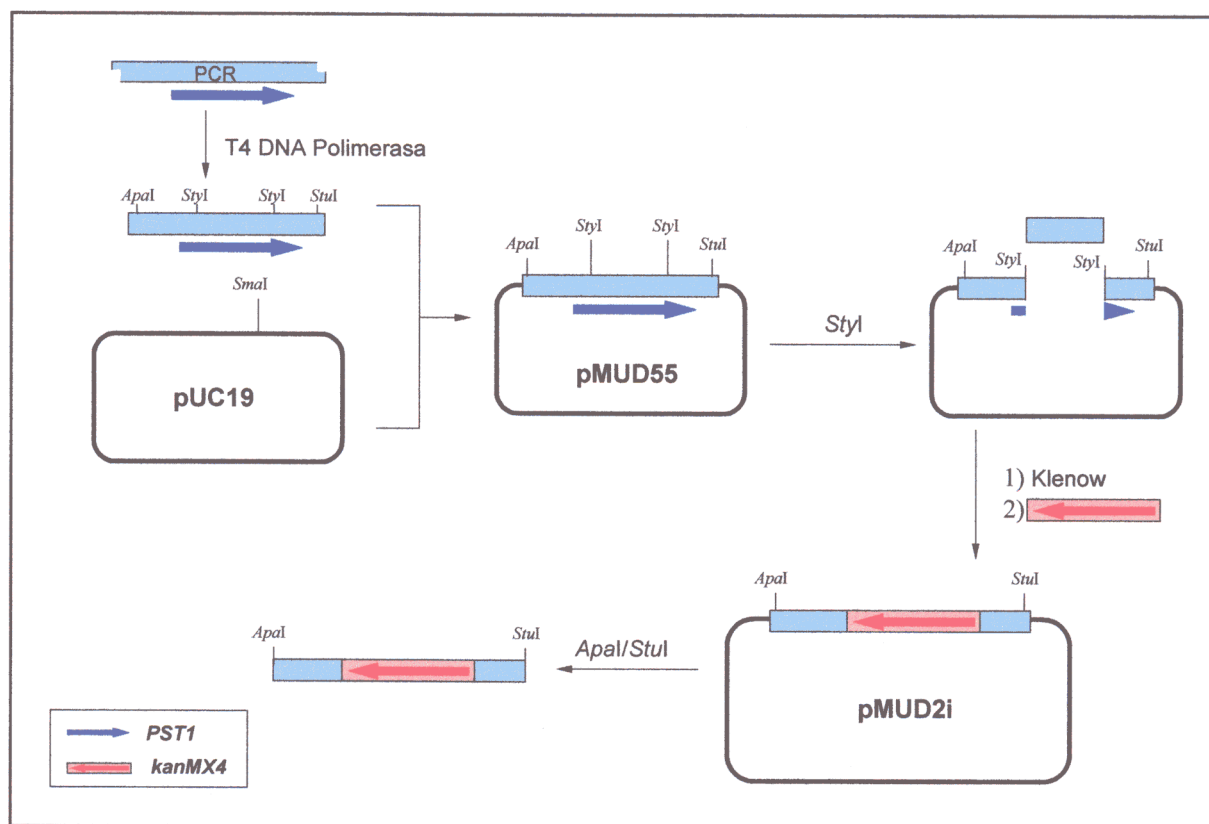


Fig. 24. Esquema de la deleción del gen *PST1* con el módulo marcador *kanMX4*.

De dicha transformación se obtuvieron dos transformantes, en los cuales se verificó la delección del gen YDR055w mediante PCR. Con el fin de determinar si dicho gen era esencial para la levadura, y, en caso de que no lo fuera, obtener mutantes de delección haploides, se procedió a la esporulación de los mutantes obtenidos. Sin embargo, ninguno de los dos mutantes fue capaz de esporular. Ante esta situación nos planteamos la obtención del mutante delecionado directamente en la cepa haploide. Con este fin se volvió a emplear la digestión con *ApaI* y *StuI* del plásmido pMUD2i para realizar la transformación, esta vez en la cepa haploide FY1679-28C. Los transformantes que aparecieron como colonias grandes fueron estríados en placas de YPD con 200 mg/l de geneticina para eliminar falsos positivos.

2.2. Comprobación de la delección del gen YDR055w en la cepa FY1679-28C.

La verificación de la interrupción correcta del gen se realizó mediante PCR. Se emplearon dos oligonucleótidos externos, que hibridaban a ambos lados de la secuencia diana (UPA1 y LOA4, respectivamente), y dos oligonucleótidos internos, que hibridaban con el módulo marcador (K2 y K3), según se muestra en la figura 25A. Se realizaron dos PCRs independientes, una de cada extremo de la construcción, empleando como cebadores en cada una de ellas un oligonucleótido externo y uno interno (UPA1 y K3, en el extremo 5', y LOA4 y K2 en el extremo 3'). La correcta integración de la *cassette* de interrupción se comprobó por la amplificación de bandas del tamaño esperado (fig. 25B). A la cepa mutante FY1679-28C *ydr055wΔ::kanMX4* obtenida se la denominó MY55.

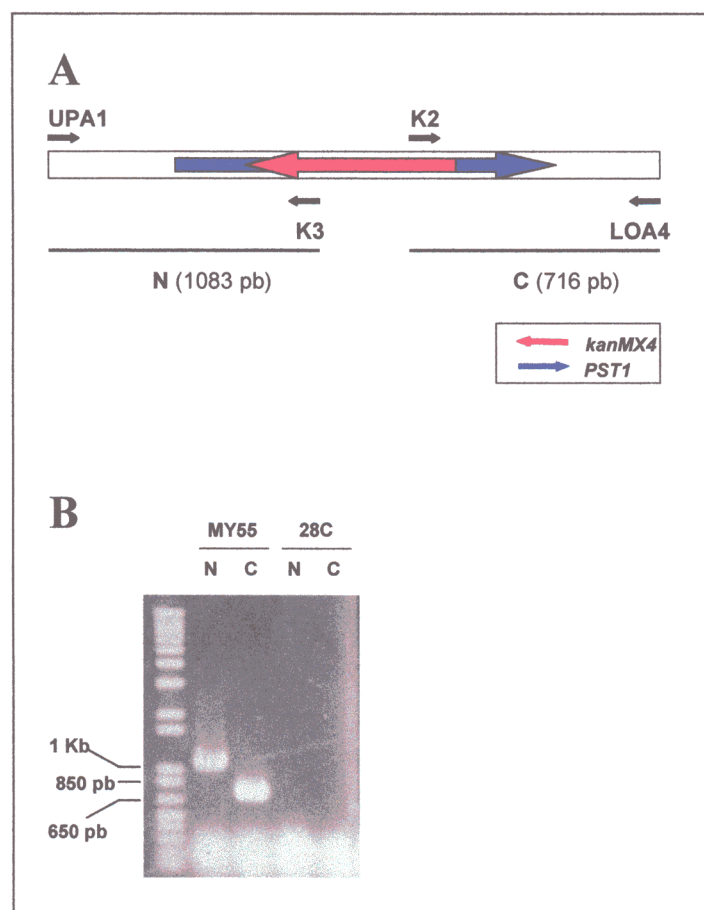


Fig. 25. Comprobación de la correcta delección de *PST1* mediante PCR. (A) Esquema que muestra el fundamento de la verificación por PCR. (B) Análisis mediante PCR de la cepa MY55. N es la banda de 1083 pb amplificada con los oligonucleótidos UPA1/K3. C es la banda de 716 pb amplificada con los nucleótidos LOA4/K2. Como control negativo se empleó la cepa parental FY1679-28C. La amplificación se realizó sobre células enteras tratadas con zimoliasa. Las condiciones de la amplificación fueron en ambos casos: 97°C, 5 min; 28 x [94°C, 30 sg; 50°C, 30 sg; 72°C, 90 sg]; 72°C, 4 min.

2.3. Obtención de diploides heterozigóticos y homozigóticos para *pst1Δ::kanMX4*.

El hecho de no haber sido capaces de hacer esporular al diploide FY1679 con un alelo del gen *PST1* interrumpido, y la semejanza de la proteína Pst1p con Sps2p, una proteína implicada en la esporulación (Percival-Smith y Segall, 1987), podría indicar que quizás la delección de *PST1* tenía algún efecto sobre este proceso. Con el fin de comprobar esto, se construyeron cepas diploides con el gen *PST1* deleccionado en heterozigosis y en homozigosis. Para ello, el mutante MY55 obtenido se cruzó con la cepa isogénica silvestre S288C, obteniéndose 5 diploides heterozigóticos para la interrupción del gen, a los que se denominó DME1-5. Todos ellos fueron capaces de esporular, tanto en medio sólido como en medio líquido, con frecuencias de esporulación semejantes a la cepa silvestre.

Las ascas procedentes de la esporulación del diploide DME1 fueron disecadas, y tras la germinación de las esporas se comprobaron las auxotrofías, tipo sexual y resistencia a geneticina. Se seleccionaron varias de las cepas haploides deleccionadas en el gen *PST1*, de tipo sexual opuesto. Con estas cepas se realizaron dos cruces para la obtención de diploides con el gen *PST1* deleccionado en homozigosis, prestando atención a que los diploides contruídos no tuvieran los dos alelos *HIS3* deleccionados, ya que la delección *his3Δ200* presente en la cepa FY1679 afecta a la capacidad de esporulación. La cepa DME1-8c se cruzó con la DME-10c, seleccionándose dos de los diploides obtenidos, a los que se denominó DMO11 y DMO12. A los diploides obtenidos a partir del cruce de DME1-11d y DME1-13c se les llamó DMO21 y DMO22. Estos cuatro diploides, junto con el diploide heterozigótico DME1 y la cepa diploide silvestre FY1679 se incubaron en medio de pre-esporulación durante 16 horas, tras lo cual se indujo la entrada en el ciclo meiótico por incubación en medio de esporulación. Todas las cepas fueron capaces de esporular, tanto en medio líquido como en medio sólido. Esto demuestra que la delección del gen *PST1* no impide la esporulación.

3. Caracterización fenotípica del mutante MY55.

Con el fin de averiguar si la delección del gen *PST1* afectaba de alguna manera a la cepa FY1679-28C se realizaron diversos ensayos fenotípicos.

3.1. Crecimiento y morfología celular.

En primer lugar se comprobó que la falta del gen *PST1* no tenía ningún efecto sobre el crecimiento de la cepa mutante en glucosa a 28°C. La velocidad de crecimiento de las cepas silvestre y mutante en medio rico YPD y en medio mínimo fue similar. La morfología de ambas cepas fue observada por microscopía de contraste de fases durante su crecimiento, no apreciándose ningún tipo de defecto morfológico en la cepa MY55.

Se ha ensayado también el crecimiento en otras fuentes de carbono, galactosa y glicerol, sin encontrar diferencias entre las cepas ensayadas. Tampoco se han encontrado diferencias en cuanto al crecimiento a distintas temperaturas (18 y 37°C).

3.2. Sensibilidad a sonicación y lisis a 37°C.

La prueba de sensibilidad a sonicación es empleada como *screening* primario en el Nodo de Pared Celular y Morfogénesis del proyecto EUROFAN, para la detección de

mutantes de levadura afectados en la pared celular. Su validez fue demostrada en nuestro Departamento (Ruíz *et al.*, 1999) sobre una colección de mutantes con una sensibilidad a Blanco de Calcoflúor alterada (Lussier *et al.*, 1997). La sonicación constituye una agresión mecánica a la pared, de manera que aquellos mutantes que poseen una pared celular debilitada presentan una mayor sensibilidad a este tratamiento. Las cepas FY1679-28C y MY55 fueron sometidas a un tratamiento de sonicación de 30 segundos a una intensidad de 4 micrones, tras lo cual se determinó el porcentaje de células iódulo de propidio positivas mediante citometría de flujo (Ruíz *et al.*, 1999), empleándose como control positivo la cepa *ecm31* (Lussier *et al.*, 1997). No se han detectado diferencias en la sensibilidad a la sonicación entre ambas cepas.

Los mutantes afectados en la ruta de transducción de señales mediada por la MAP kinasa Slt2p, que controla la integridad celular, son líticos a 37°C (Heinisch *et al.*, 1999). Una alícuota de los cultivos empleados en el experimento anterior fue incubada a 37°C durante 5 horas, determinándose igualmente la lisis celular, sin encontrar tampoco diferencias entre las cepas silvestre y mutante.

3.3. Sensibilidad a choque térmico.

Las cepas FY1679-28C y MY55 fueron sometidas a un choque térmico de 5 minutos a 52°C, y posteriormente se determinó su viabilidad por el recuento de células en placa. La supervivencia en ambos casos estuvo en torno al 5%.

3.4. Sensibilidad a choque osmótico.

Un crecimiento deficiente en condiciones de elevada osmolaridad está asociado con frecuencia a defectos en la pared celular o en componentes del citoesqueleto (revisado en (Hampsey, 1997)). Se ha analizado la sensibilidad de la cepa MY55 a altas concentraciones salinas, empleando concentraciones de cloruro sódico desde 0.8 M hasta 1.6 M. El ensayo se realizó mediante el procedimiento de siembra en gotas, descrito en Materiales y métodos. No se han observado diferencias de sensibilidad entre las cepas silvestre y mutante a ninguna de las concentraciones ensayadas.

3.5. Sensibilidad a zimoliasa.

La zimoliasa es una mezcla de enzimas hidrolíticas, constituida principalmente por β -1,3-glucanasas y proteasas, que digiere la pared celular de las levaduras, provocando en última instancia la lisis celular. La diferente sensibilidad de las levaduras a esta preparación ha sido ampliamente utilizada para detectar cambios en la composición y organización de la pared celular (de Nobel *et al.*, 1990; Lussier *et al.*, 1997; Ovalle *et al.*, 1998; Ram *et al.*, 1994). El ensayo de sensibilidad a zimoliasa se realizó observando el descenso en la densidad óptica de una suspensión de células de *S. cerevisiae* en presencia de zimoliasa 20T a una concentración de 12.5 $\mu\text{g/ml}$, según el protocolo descrito por Lussier y colaboradores (Lussier *et al.*, 1997), no apreciándose diferencias de sensibilidad a zimoliasa entre la cepa mutante MY55 y la cepa parental.

3.6. Sensibilidad a Calcoflúor y Rojo Congo.

El Blanco de Calcoflúor es un fluorocromo que se une a las cadenas en formación de quitina, y de β -1,3-glucano en menor medida, impidiendo la cristalización y el ensamblaje de las microfibrillas (Elorza *et al.*, 1983; Murgui *et al.*, 1985; Roncero y Duran, 1985). Interfiere

así en la organización supramolecular de la pared celular, de manera que una pared celular debilitada no resiste concentraciones de estos agentes que normalmente no afectan a células silvestres. El Rojo Congo, otro compuesto de características similares, afecta al ensamblaje de las cadenas de β -1,3-glucano (Kopecka y Gabriel, 1992). La sensibilidad a ambos compuestos ha sido empleada en diversos rastreos para la identificación de genes implicados en la biosíntesis y arquitectura de la pared celular (Lussier *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1994).

Con el fin de examinar si existía una alteración en la pared del mutante MY55, se estudió su sensibilidad a los dos compuestos citados, mediante la siembra de diluciones en gota. Se han ensayado concentraciones de hasta 40 μ g/ml de Blanco de Calcoflúor y 100 μ g/ml de Rojo Congo, sin observar diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *pst1* Δ .

3.7. Sensibilidad a cafeína.

La cafeína, un inhibidor de la fosfodiesterasa de AMP cíclico, provoca un incremento en los niveles de cAMP, activando así la proteína quinasa dependiente de cAMP. Los mutantes afectados en la ruta de transducción de señales mediada por la MAP quinasa Slt2p, que controla la integridad celular, son sensibles a cafeína (Heinisch *et al.*, 1999). Ya que estos mutantes presentan una pared celular debilitada, decidimos ensayar la sensibilidad de nuestro mutante a este compuesto. El ensayo se realizó igualmente mediante la siembra en gotas, utilizándose concentraciones de cafeína en un intervalo que fue desde 0.75 mg/ml hasta 1.5 mg/ml. No se ha observado hipersensibilidad de la cepa mutante MY55 a cafeína en las condiciones ensayadas.

3.8. Sensibilidad a toxina *killer*.

La toxina *killer* K1 producida por algunas cepas de levadura es una toxina formadora de poros en la membrana, que requiere un paso inicial de unión a un receptor en la pared celular para ejercer su acción (Bussey, 1991). Este receptor es probablemente el β -1,6-glucano, ya que se ha demostrado su unión a la toxina *in vitro* y que puede actuar como inhibidor competitivo *in vivo* (Hutchins y Bussey, 1983). Los mutantes resistentes a la toxina *killer* K1 presentan niveles disminuidos de β -1,6-glucano álcali-insoluble, y también en ocasiones defectos en la glicosilación (Orlean, 1997). La alteración en la sensibilidad a la toxina *killer* K1 constituye una buena herramienta para detectar defectos de la pared celular, y ha sido por ello empleada en diversos rastreos para la búsqueda de mutantes afectados en esta estructura (Lussier *et al.*, 1997; Ram *et al.*, 1994). Se ha ensayado la sensibilidad de la cepa mutante MY55 a la toxina *killer* K1, no detectándose ninguna diferencia respecto a la cepa parental.

La toxina *killer* K9 producida por *Pichia mrakii* es un inhibidor de la síntesis de la pared celular y de la actividad β -1,3-glucán sintasa en varios hongos (Hong *et al.*, 1994). Se ha analizado también la sensibilidad a esta toxina, sin encontrar diferencias entre las cepas silvestre y mutante.

3.9. Regeneración de protoplastos en medio sólido.

La incubación de los protoplastos de *S. cerevisiae* en condiciones adecuadas conduce a la regeneración de la pared celular. Una incapacidad parcial o total de la cepa mutante para regenerar esta estructura indicaría que la proteína estudiada es necesaria o imprescindible en procesos de construcción o reparación de la pared celular. Sin embargo, tanto la cepa silvestre

FY1679-28C como la mutante MY55 presentaron idéntico porcentaje de viabilidad en la regeneración de protoplastos. Este experimento permitió también comprobar que no existen diferencias de sensibilidad al mercaptoetanol, un agente reductor que libera proteínas de la pared celular.

4. Estudio de las interacciones genéticas entre *PST1* y genes implicados en la construcción de la pared celular.

La expresión del gen *PST1* se encuentra inducida en los mutantes *kre6Δ* (T. Roemer, comunicación personal) y *fks1Δ* (Terashima *et al.*, 1999), ambos afectados en procesos de biosíntesis de la pared celular (Orlean, 1997). Estos datos nos sugirieron explorar la relación existente entre el gen objeto de este trabajo y los genes *KRE6* y *FKS1*, y comprobar si existía una letalidad sintética entre el mutante *pst1Δ* y los dos mutantes mencionados. Ya que además disponíamos de un mutante interrumpido en el gen *GAS1*, que también presenta una pared celular alterada, se decidió emplearlo también en este análisis. Para lograr este objetivo se procedió a la construcción de cepas diploides heterozigóticas *pst1Δ kre6Δ*, *pst1Δ fks1Δ* y *pst1Δ gas1Δ*, para después de su esporulación analizar la progenie resultante.

La cepa diploide *pst1Δ kre6Δ* se obtuvo mediante el cruce de las cepas TA405 *kre6Δ::HIS3* y FKLS002-09B (*pst1Δ::kanMX4*). Por micromanipulación se aislaron cinco cigotos, en los cuales se indujo la esporulación. Se disecó un total de 24 ascas del diploide MP15, en 16 de las cuales germinaron las cuatro esporas. En las 8 ascas restantes germinaron 3 esporas. Al estar el gen *KRE6* interrumpido con el marcador *HIS3*, y ser la cepa FKLS002-09B protótrofa para histidina, no se pudo comprobar mediante la presencia del marcador cuáles de las esporas germinadas portaban la delección en dicho gen. Sin embargo, el genotipo *kre6Δ* se reconoció por el tamaño pequeño de las colonias que llevaban dicha mutación (Roemer y Bussey, 1991). Tras determinar cuáles de las esporas germinadas eran resistentes a geneticina, y tenían por tanto el gen *PST1* deleccionado, se observó que existían varias colonias en las cuales coincidían los fenotipos de tamaño pequeño de colonia y resistencia a geneticina. Es decir, se han obtenido dobles mutantes *pst1Δ kre6Δ*, lo cual indica que la doble delección no es letal para la célula. Con posterioridad se ha comprobado por PCR la delección del gen *KRE6* en seis de los supuestos dobles mutantes obtenidos. Para ello se emplearon los oligos KREUP, que hibridaba *upstream* del gen *KRE6*, y KREDW, que hibridaba con la secuencia del marcador *HIS3*. En todos los dobles mutantes analizados se confirmó la interrupción por la amplificación de la banda de 832 pb esperada.

La cepa diploide heterozigótica *pst1Δ fks1Δ* se construyó cruzando las cepas AR100 (*fks1Δ::HIS3*) y MY55 (*pst1Δ::kanMX4*) y aislando los cigotos por micromanipulación. Después de inducir la esporulación, se disecaron 12 ascas procedentes del diploide MP33 y 9 ascas procedentes del diploide MP36, y se analizaron las esporas germinadas. En ambos casos se encontraron colonias haploides protótrofas para histidina y resistentes a geneticina, y, por tanto, delecionadas en los genes *PST1* y *FKS1*, no siendo pues la doble delección sintética letal.

La cepa diploide heterozigótica *pst1Δ gas1Δ* se obtuvo mediante el cruce de las cepas AR104 (*gas1Δ::LEU2*) con FKLS002-09B (*pst1Δ::kanMX4*), aislándose los diploides en medio selectivo. Tras la esporulación de éstos se disecaron ascas procedentes de los diploides MP22 y MP23, y una vez germinadas las esporas, se comprobó la existencia de clones

haploides protótrofos para leucina y resistentes a geneticina, es decir, dobles mutantes *pst1Δ gas1Δ*. Se concluyó, por tanto, que la doble delección de *PST1* y *GAS1* no es letal.

5. Estudio de la complementación de la mutación *ecm33Δ* por el gen *PST1*.

Como se ha comentado anteriormente, el gen *ECM33* codifica una proteína que presenta una alta similitud con Pst1p. La implicación del gen *ECM33* en procesos relacionados con la pared celular fue puesta de manifiesto en estudios realizados en nuestro Departamento. El mutante de delección *ecm33Δ* presenta una serie de fenotipos que indican que posee una pared celular alterada, como son morfología aberrante, hipersensibilidad a sonicación, a zimoliasa, a Calcoflúor y Rojo Congo, a higromicina B, a toxina *killer* e hipersensibilidad a cafeína remediable por sorbitol (Vázquez, 1999). Ya que la doble delección de los genes *PST1* y *ECM33* agrava algunos de los fenotipos mostrados por el mutante sencillo *ecm33Δ* (Vázquez, 1999), y dada la alta homología existente entre las proteínas por ellos codificadas, decidimos comprobar si la presencia de un elevado número de copias del gen *PST1* era capaz de complementar los fenotipos mostrados por el mutante sencillo *ecm33Δ*. Con este objetivo se eligió el vector episómico YEp352. El producto de PCR que contenía el ORF junto con sus secuencias flanqueantes (descrito en el apartado 2 de este capítulo) fue subclonado en el vector pGEM[®]-T, obteniéndose el plásmido pMGD55. Tras la digestión de dicho plásmido con las enzimas de restricción *SacI* y *SphI* se obtuvo un fragmento de 2.1 Kb, que contenía el gen *PST1* con sus zonas promotora y terminadora. Este fragmento fue subclonado en el vector YEp352, originándose el plásmido YEp352-PST1.

El plásmido YEp352-PST1 fue transformado en las cepas FY1679-28C y *ecm33Δ*, y los transformantes fueron analizados para determinar si existía complementación. Se llevaron a cabo los experimentos de sensibilidad a cafeína, higromicina B, Blanco de Calcoflúor, Rojo Congo y toxina *killer* K1. No se observó complementación alguna en el caso de la cafeína, el Calcoflúor y el Rojo Congo. En cuanto a la sensibilidad a higromicina B y toxina *killer* K1, se apreció una ligerísima complementación (fig. 26).

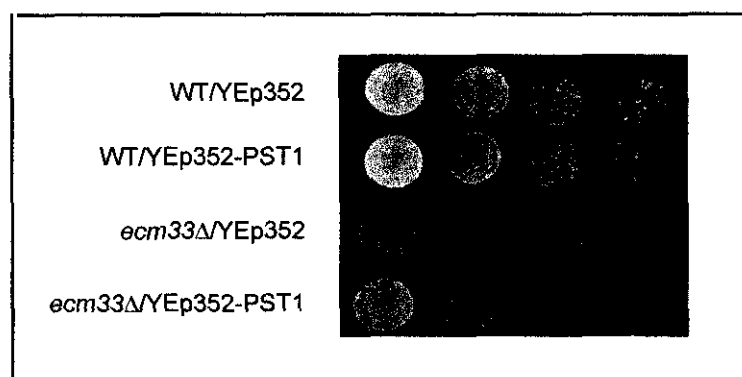


Fig. 26. Análisis de la complementación de la hipersensibilidad a higromicina B del mutante *ecm33Δ* por la sobreexpresión de *PST1*. Las cepas silvestre FY1679-28C y mutante *ecm33Δ* fueron transformadas con el plásmido episómico YEp352-PST1. Como control negativo de la complementación se empleó el mutante *ecm33Δ* transformado con el vector YEp352.

6. Análisis fenotípico de los dobles mutantes *pst1Δ ecm33Δ*.

Dado que la interrupción del gen *PST1* en un fondo deleciónado en este gen agravaba algunos de los fenotipos presentados por el mutante sencillo *ecm33Δ*, y ya que el análisis fenotípico del mutante *pst1Δ* no había proporcionado ninguna pista sobre la posible función de Pst1p, decidimos continuar con el análisis de los dobles mutantes *pst1Δ ecm33Δ*.

6.1. Análisis de la glicosilación de proteínas.

Los dobles mutantes *pst1Δ ecm33Δ* presentan una hipersensibilidad a la higromicina B, que es más acusada que la presentada por el mutante sencillo *ecm33Δ* (Vázquez, 1999). Está descrito en la literatura que la mayoría de los mutantes que tienen algún defecto en la glicosilación de proteínas, ya sea *N*- u *O*-glicosilación, o en la formación del GPI, presentan una hipersensibilidad a este antibiótico (Ballou *et al.*, 1991; Dean, 1995). Además, la hipersensibilidad a toxina *killer* K1 de los dobles mutantes *pst1Δ ecm33Δ* y la baja proporción de manosa en la pared celular del mutante de transposición *ecm33* (Lussier *et al.*, 1997) también podían apuntar a una alteración las manoproteínas de la pared.

Con el fin de descubrir si el proceso de *N*-glicosilación de proteínas estaba afectado en los dobles mutantes, se utilizó la invertasa como modelo. La invertasa secretada es una glicoproteína que contiene entre 9 y 10 cadenas de azúcares unidas a través de residuos de asparagina (*N*-glicosilación) (Reddy *et al.*, 1988), y no presenta *O*-glicosilación. Se ha empleado por ello como modelo para el análisis de la *N*-glicosilación. En un gel de poliacrilamida, la invertasa glicosilada silvestre migra como una banda difusa. En cepas con defectos en la *N*-glicosilación, la forma glicosilada de la invertasa migra a mayor velocidad, y forma una banda más discreta. Con el objetivo de determinar si existían defectos en este proceso, se analizó la invertasa producida por los dobles mutantes *pst1Δ ecm33Δ*. La invertasa fue detectada poniendo de manifiesto su actividad en un gel de poliacrilamida corrido en condiciones nativas, como se describe en Materiales y métodos. La figura 27 muestra que no existía diferencia en el tamaño de la invertasa glicosilada producida por las diferentes cepas analizadas, indicando que los mutantes *pst1Δ*, *ecm33Δ* y *pst1Δ ecm33Δ* no presentan defectos apreciables en el proceso de *N*-glicosilación.

Para analizar si existía algún defecto en la *O*-glicosilación de proteínas, se empleó como modelo la endoquitinasa Cts1p, una proteína de pared que también es secretada al medio. Esta proteína está exclusivamente *O*-glicosilada (Kuranda y Robbins, 1991), y se considera un buen indicador de la actividad glucosilante *in vivo* (Gentzsch y Tanner, 1996). La endoquitinasa presente en la fracción de proteínas de pared extraíbles con SDS en condiciones reductoras fue analizada mediante Western-blotting con anticuerpos policlonales específicos (fig. 28). No se ha detectado una variación de tamaño de la endoquitinasa entre la cepa silvestre, los mutantes sencillos *pst1Δ* y *ecm33Δ*, y los dobles mutantes *pst1Δ ecm33Δ*, lo cual indica que el proceso de *O*-glicosilación no está afectado en los citados mutantes.

6.2. Análisis de la presencia de componentes de la pared celular en el medio de cultivo.

En algunos mutantes afectados en la pared celular se produce una mayor liberación de algunos componentes de esta estructura al medio de cultivo, siendo este fenómeno indicativo de un posible defecto en el ensamblaje de los mismos en la pared celular (Kapteyn *et al.*, 1999b). El tipo de componente liberado al medio puede dar una idea del enlace que está

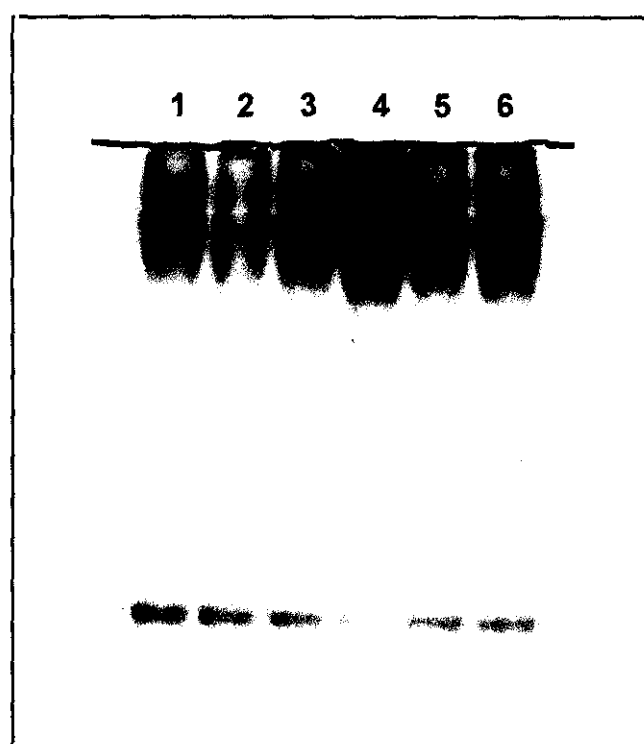


Fig. 27. Detección de la invertasa en gel nativo. La producción de invertasa glicosilada fue inducida en un medio pobre en glucosa durante 3 horas. La invertasa glicosilada aparece en la parte superior del gel. La banda inferior corresponde a la forma constitutiva intracelular de la invertasa.

- (1) WT
- (2) *pst1Δ*
- (3) *ecm33Δ*
- (4) *pst1Δ ecm33Δ* (1B)
- (5) *pst1Δ ecm33Δ* (10C)
- (6) *pst1Δ ecm33Δ* (11B)

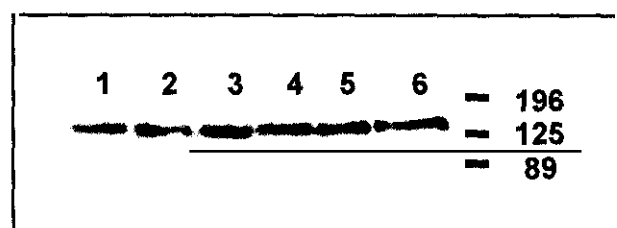
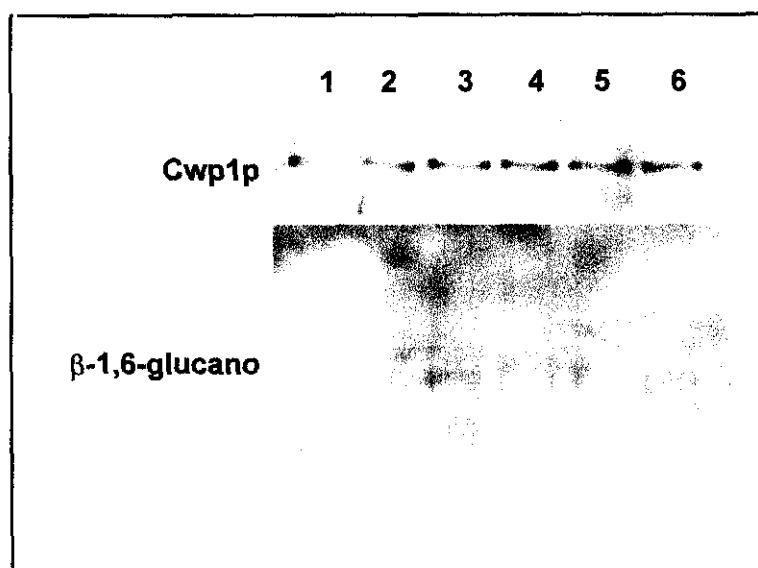


Fig. 28. Análisis de la endoquitinasa Cts1p mediante Western-blotting. A la derecha se indican los pesos moleculares en kDa. Los números de los carriles coinciden con los de la figura 27.

fallando en cada caso. Así, un enriquecimiento del medio de cultivo en proteínas GPI indicaría un defecto en la unión entre estas proteínas y el β -1,6-glucano, mientras que un aumento en la liberación de proteínas Pir implicaría un fallo en el enlace de éstas al β -1,3-glucano. Con el fin de determinar si existía algún defecto de este tipo en los mutantes objeto de este estudio, se analizó la presencia de varios componentes de la pared celular en el medio de cultivo de los mismos mediante Western-blotting. Los componentes analizados han sido los siguientes: β -1,6-glucano, β -1,3-glucano, Cwp1p, como modelo de proteínas ancladas mediante GPI, y Pir2/Hsp150, como modelo de las proteínas Pir, ancladas a la pared directamente a través del β -1,3-glucano.

No se ha observado ninguna diferencia en la cantidad de Cwp1p liberada al medio por las cepas silvestre, *pst1Δ*, *ecm33Δ* y *pst1Δ ecm33Δ* (fig. 29). Tampoco se ha apreciado variación en la cantidad de Pir2p liberada al medio por estas cepas, aunque sí se han observado diferencias cualitativas. Mientras que en la cepa silvestre y el mutante *pst1Δ* se observa una banda mayoritaria de unos 150 kDa, en el mutante sencillo *ecm33Δ* y en los dobles mutantes *pst1Δ ecm33Δ*, es mayoritaria una banda superior (fig. 29). En los mutantes *ecm33Δ* y *pst1Δ ecm33Δ* se aprecia asimismo un incremento en la liberación al medio de β -1,6-glucano unido a proteínas (fig. 29).

Fig. 29. Análisis de la liberación de componentes de la pared celular al medio de cultivo mediante Western-blotting. Para la leyenda de los carriles, véase la figura 27.



7. Inmunolocalización de la proteína Pst1p.

7.1. Construcción de Pst1p-myc.

Con el fin de estudiar su localización subcelular, la proteína Pst1p fue marcada mediante la inserción de seis copias del epítipo *c-myc* en tándem, entre los residuos 148 y 149 de su secuencia (fig. 30B). Para conseguir este objetivo se introdujo la diana de restricción *NotI* en la secuencia del gen *PST1* mediante una PCR solapante. Los oligos UP-PST1 y MYC-LO4 se emplearon para amplificar una banda de 1,6 Kb que contenía el extremo 5' del gen junto con su zona promotora, introduciendo la diana de restricción *NotI* tras la base 442 de la secuencia de *PST1*. Los oligos MYC-UP3 y LO-PST1 amplificaron una banda de 1,4 Kb que contenía el extremo 3' del gen, con una diana *NotI* tras la base 442 de su secuencia, más la zona terminadora. Posteriormente se realizó una PCR solapante, empleando como DNA molde las dos bandas de 1,6 y 1,4 Kb amplificadas anteriormente, y como cebadores los oligonucleótidos UP-PST1 y LO-PST1 (fig. 30A). El producto de la PCR, que contenía el gen *PST1* con un punto *NotI* insertado, junto con sus zonas promotora y terminadora, fue subclonado en el vector pGEM®-T, dando lugar al plásmido p55NOT2b. La correcta inserción de la diana *NotI* fue confirmada por secuenciación. Mediante digestión con *PstI* se obtuvo un fragmento de 3 Kb, que contenía el gen *PST1* (con el punto *NotI* insertado) junto con sus zonas promotora y terminadora. Este fragmento fue subclonado en el punto *PstI* del vector centromérico YCplac111, originándose el plásmido pMIL1. El plásmido pMIL4 se obtuvo mediante la inserción en pMIL1 de un fragmento *NotI-NotI* de 300 pb, que contenía seis copias de la secuencia codificante del epítipo *c-myc* en tándem.

7.2. Análisis de la funcionalidad de Pst1p-myc.

Con el fin de comprobar la funcionalidad de la proteína marcada Pst1p-myc, analizamos su capacidad para complementar alguno de los fenotipos mostrados por el doble mutante *pst1Δ ecm33Δ*. En el doble mutante se ha observado un elevado grado de doble fosforilación en treonina y tirosina de la MAP quinasa Slt2p, en condiciones en las que el nivel de activación de esta proteína en una cepa silvestre es basal. Este grado de fosforilación es muy superior al mostrado por los mutantes sencillos *pst1Δ* y *ecm33Δ* (Vázquez, 1999). La

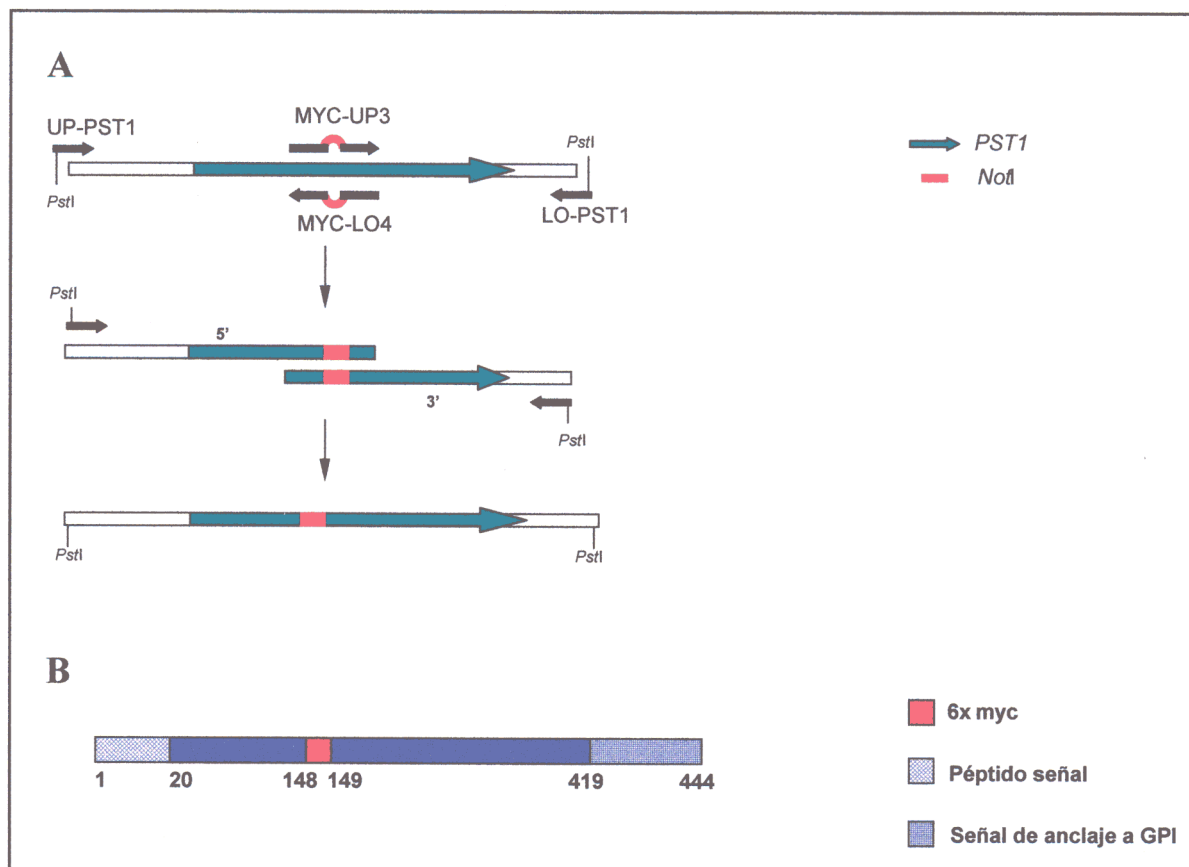
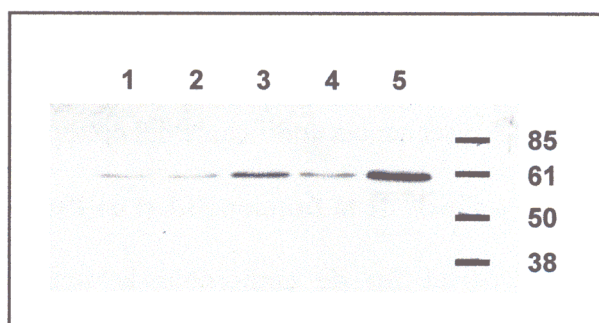


Fig. 30. Marcaje de la proteína Pst1p con el epítipo *c-myc*. (A) Esquema de la inserción de un punto *NoI* en la secuencia de *PST1* mediante PCR, para la construcción de la proteína marcada Pst1p-myc. (B) Representación esquemática de la proteína Pst1p-myc. Los números mostrados corresponden a los residuos de la proteína sin marcar Pst1p. El residuo 419 es el sitio ω de unión a GPI.

funcionalidad de la proteína Pst1p-myc se demostró por la capacidad del plásmido pMIL4 para disminuir el nivel de activación de Slt2p en el doble mutante *pst1Δ ecm33Δ* a niveles comparables a los del mutante sencillo *ecm33Δ* (fig. 31).

Fig. 31. Análisis mediante Western-blotting de la fosforilación de la MAP kinasa Slt2p empleando anticuerpos policlonales anti-fosfo p42/p44 MAP kinasa (New England Biolabs). Como control de la activación se empleó el mutante *gas1Δ*. La igualdad en los niveles de proteína en todos los carriles se comprobó mediante tinción de la membrana con Rojo Ponceau. (1) FY1679-28C/YCplac111, (2) *ecm33Δ*/YCplac111, (3) YP1-10C/YCplac111, (4) YP1-10C/pMIL4, (5) *gas1Δ*/YCplac111.



7.3. Localización de Pst1p-myc mediante fraccionamiento celular y Western-blotting.

Para estudiar la localización de la proteína Pst1p marcada con el epítipo *c-myc*, el plásmido pMIL4 fue transformado en la cepa MY55. Siguiendo el procedimiento descrito en Materiales y métodos, a partir de los transformantes se obtuvieron las proteínas secretadas al medio de cultivo, las proteínas de pared extraíbles con SDS en condiciones reductoras, y las extraíbles con glucanasas. El análisis de estas muestras mediante Western-blotting empleando anticuerpos monoclonales frente al epítipo *c-myc* mostró que la proteína Pst1p-myc aparece en la fracción de proteínas de pared extraíbles con SDS (fig. 32). No se observó ninguna señal en la fracción de proteínas extraíbles con zimoliasa. Como control interno se empleó la proteína Cwp1p, que puede ser extraída de la pared mediante el tratamiento con glucanasas. Además, la proteína Pst1p-myc fue detectada en el medio de cultivo, apareciendo como una banda de peso molecular superior a la banda correspondiente a Pst1p-myc detectada en la fracción de proteínas de pared extraíbles con SDS. La especificidad de los anticuerpos se comprobó empleando como control negativo la cepa MY55 transformada con el plásmido pMIL1, que lleva el gen *PST1* con la diana *NotI* insertada, sin la secuencia codificante del epítipo.

Debido a que en la fracción de proteínas de pared extraíbles con SDS en condiciones reductoras en ocasiones aparecen como contaminantes proteínas de la membrana plasmática, decidimos investigar la presencia de la proteína Pst1p-myc en las membranas celulares. Con este objetivo, las proteínas integrales de membrana fueron solubilizadas con Triton X-114 y aisladas del resto de proteínas mediante separación de fases (Bordier, 1981). Las fases acuosa y detergente fueron analizadas mediante Western-blotting con los anticuerpos frente al epítipo *c-myc*, detectándose la proteína Pst1p-myc en ambas fases en proporción semejante (fig. 33). El correcto aislamiento de las proteínas integrales de membrana se comprobó con anticuerpos frente a Gas1p, una proteína con anclaje mediante GPI que se localiza en la membrana plasmática, y que ha sido empleada como marcador de dicho orgánulo (Schneiter *et al.*, 1999), y con anticuerpos frente a la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa, una proteína citosólica. Gas1p fue detectada únicamente en la fase detergente, como corresponde a una proteína de sus características, mientras que la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa aparecía en la fase acuosa (fig. 33).

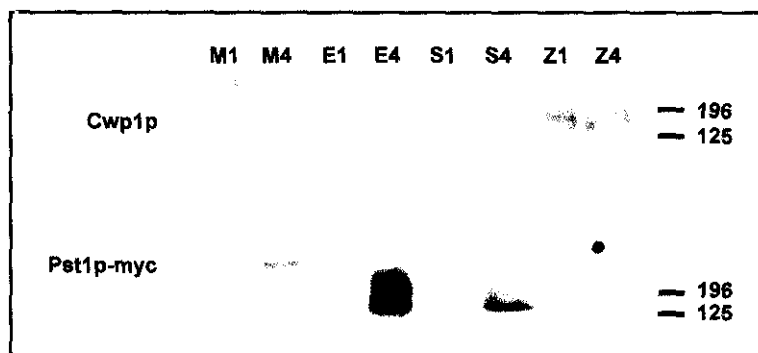


Fig. 32. Análisis de la localización de Pst1p-myc en la pared celular mediante fraccionamiento y Western-blotting con anticuerpos monoclonales frente al epítipo *c-myc*. (M) medio de cultivo; (E) extracto citoplasmático; (S) proteínas de pared extraídas con SDS; (Z) proteínas de pared extraídas con zimoliasa. La especificidad de la señal se comprobó empleando como control negativo la cepa MY55 transformada con pMIL1 (carriles 1). Los carriles 4 corresponden a MY55/pMIL4. A la derecha se indican los pesos moleculares en kDa.

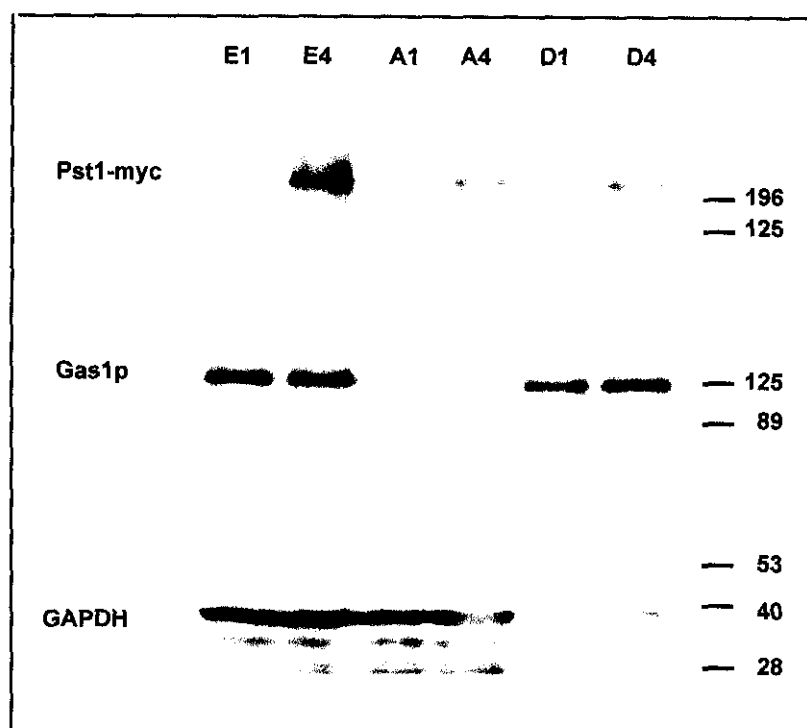


Fig. 33. Análisis de la localización de Pst1p-myc en membranas mediante fraccionamiento y Western-blotting con anticuerpos monoclonales frente al epítipo *c-myc*. E) extracto total; A) fracción acuosa; D) fracción detergente. La especificidad de la señal se comprobó empleando como control negativo la cepa MY55 transformada con pMIL1 (carriles 1). Los carriles 4 corresponden a MY55/pMIL4. Como controles del fraccionamiento se emplearon la proteína de membrana Gas1p y la proteína citosólica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH). A la derecha se indican los pesos moleculares en kDa.

7.4. Localización de Pst1p-myc mediante inmunofluorescencia indirecta.

La localización subcelular de Pst1p-myc fue analizada mediante inmunofluorescencia indirecta y microscopía confocal, con el fin de examinar su presencia en la superficie celular. El ensayo se realizó sobre la cepa MY55 (*pst1*Δ) transformada con el plásmido pMIL4, que lleva la proteína de fusión Pst1p-myc, empleándose como control negativo la misma cepa transformada con el vector pMIL1.

Los datos obtenidos mediante microscopía confocal muestran que la proteína Pst1p-myc se localiza preferentemente en la superficie celular, como se observa en la figura 34. Pst1p-myc también aparece en el citoplasma, de forma compartimentalizada, con aspecto de gránulos, como si se tratase de vesículas de secreción. Estos resultados son además concordantes con los obtenidos mediante fraccionamiento subcelular.

Para conseguir la detección de la proteína marcada Pst1p-myc fue necesaria la formación de esferoplastos, ya que tras la incubación de las células intactas con los anticuerpos primario y secundario no se observó señal alguna. Ello indica que la proteína Pst1p-myc no es accesible para los anticuerpos si previamente no se desorganiza la pared celular ligeramente, sugiriendo que no se encuentre expuesta en la capa más externa de ésta.

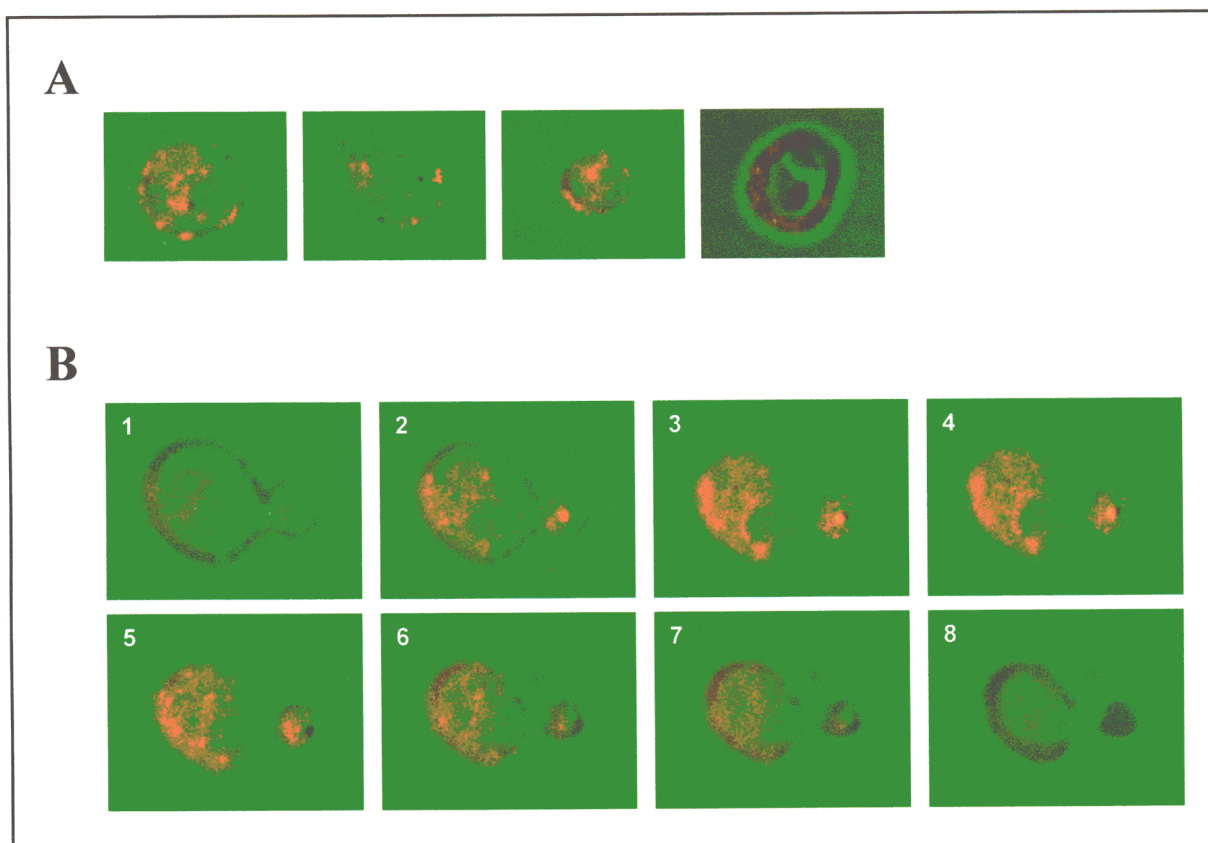


Fig. 34. Localización de Pst1p-myc en la cepa MY55 (*pst1Δ*) mediante inmunofluorescencia indirecta. A) Imágenes de microscopía de fluorescencia. B) Imágenes de microscopía confocal. Los números indican la secuencia de planos tomados de una misma célula. La separación entre los mismos es de 0.5 μm .

III. ESTUDIO DE LA SECRECIÓN DE LA ENOLASA Y LA FRUCTOSA BIFOSFATO ALDOLASA A LA SUPERFICIE CELULAR.

La presencia de enzimas glucolíticas en la superficie celular de diversos microorganismos, incluyendo la levadura *S. cerevisiae*, está descrita en la literatura (revisado en Chaffin *et al.*, 1998). Sin embargo, la controversia originada por la identificación de algunas de estas enzimas entre las proteínas secretadas por protoplastos (ver tablas de identificación) nos llevó a comprobar por métodos genéticos que realmente estas enzimas glucolíticas eran capaces de llegar a la superficie celular. La estrategia seguida fue emplear como gen marcador un alelo del gen *SUC2* de *S. cerevisiae* que codifica una forma intracelular de la invertasa. El gen *SUC2* en *S. cerevisiae* da lugar a dos mRNAs regulados de forma diferente. El mRNA mayor codifica una forma de la invertasa que es secretada y glicosilada, mientras que el mRNA menor codifica una forma intracelular, no glicosilada, de dicha enzima (Carlson *et al.*, 1983). La secreción de la invertasa al espacio periplásmico es necesaria para el crecimiento de *S. cerevisiae* en sacarosa como única fuente de carbono, y, por tanto, los mutantes *suc2Δ* no son capaces de crecer en dichas condiciones. El razonamiento fue que si la enolasa (u otra proteína) era capaz de alcanzar la superficie celular, podría dirigir la salida de la forma intracelular de la invertasa fusionada a ella. Esto se pondría de manifiesto por la capacidad de una cepa *suc2Δ* transformada con la proteína de fusión de crecer en sacarosa como única fuente de carbono.

1. Construcción de las proteínas híbridas Eno2-Suc2 y Fba1-Suc2.

Decidimos elegir dos de las enzimas glucolíticas detectadas, la enolasa y la fructosa bifosfato aldolasa, para comprobar esta hipótesis. Los genes *ENO2* y *FBA1* fueron amplificados mediante PCR a partir de DNA genómico de la cepa S288C de *S. cerevisiae*. El gen *ENO2* sin los dos últimos codones, con una zona promotora de 700 pb, y flanqueado por las dianas de restricción *Bam*HI-*Bam*HI, fue amplificado con los oligonucleótidos UP-ENO y LO-ENO. El gen *FBA1* sin su codon de terminación, con una zona promotora de 630 bp, y flanqueado por las dianas de restricción *Bam*HI-*Bgl*II, fue amplificado utilizando los oligos UP-FBA y LO-FBA. Ambos productos de PCR fueron subclonados en el vector pGEM®-T, dando lugar a los plásmidos pGENO y pGFBA respectivamente. A partir de estos plásmidos se obtuvieron los fragmentos *Bam*HI-*Bam*HI y *Bam*HI-*Bgl*II, que contenían los genes *ENO2* y *FBA1* respectivamente. Ambos fragmentos fueron subclonados en el punto *Bgl*II del plásmido pSC1, un derivado del vector centromérico YCplac33 que contiene un alelo *suc2*, sin la secuencia codificante del péptido señal ni de la metionina nº 21 de la invertasa, tras la citada diana de restricción. El mantenimiento de la fase en las fusiones se comprobó mediante secuenciación. Los plásmidos centroméricos que contenían las construcciones híbridas *ENO2-suc2* y *FBA1-suc2* fueron denominados pENO2S y pFBA1S respectivamente (fig. 35A). Estos plásmidos fueron transformados en la cepa de *S. cerevisiae* SS10 (*suc2Δ9*). En ambos casos se obtuvieron transformantes que, tras ser replicados a YPS, mostraron su capacidad de crecer en sacarosa como única fuente de carbono (fig. 36). Estos resultados indican que tanto la enolasa como la fructosa bifosfato aldolasa son capaces de dirigir la salida/exportación de la forma intracelular de la invertasa a la superficie celular. Además, se comprobó que la presencia de las proteínas híbridas en la superficie celular no se debía a la lisis celular, ya que los transformantes que llevaban el plásmido pSC1, que únicamente contiene el alelo *suc2* codificante de la forma intracelular de la invertasa, fueron incapaces de crecer en las mismas condiciones.

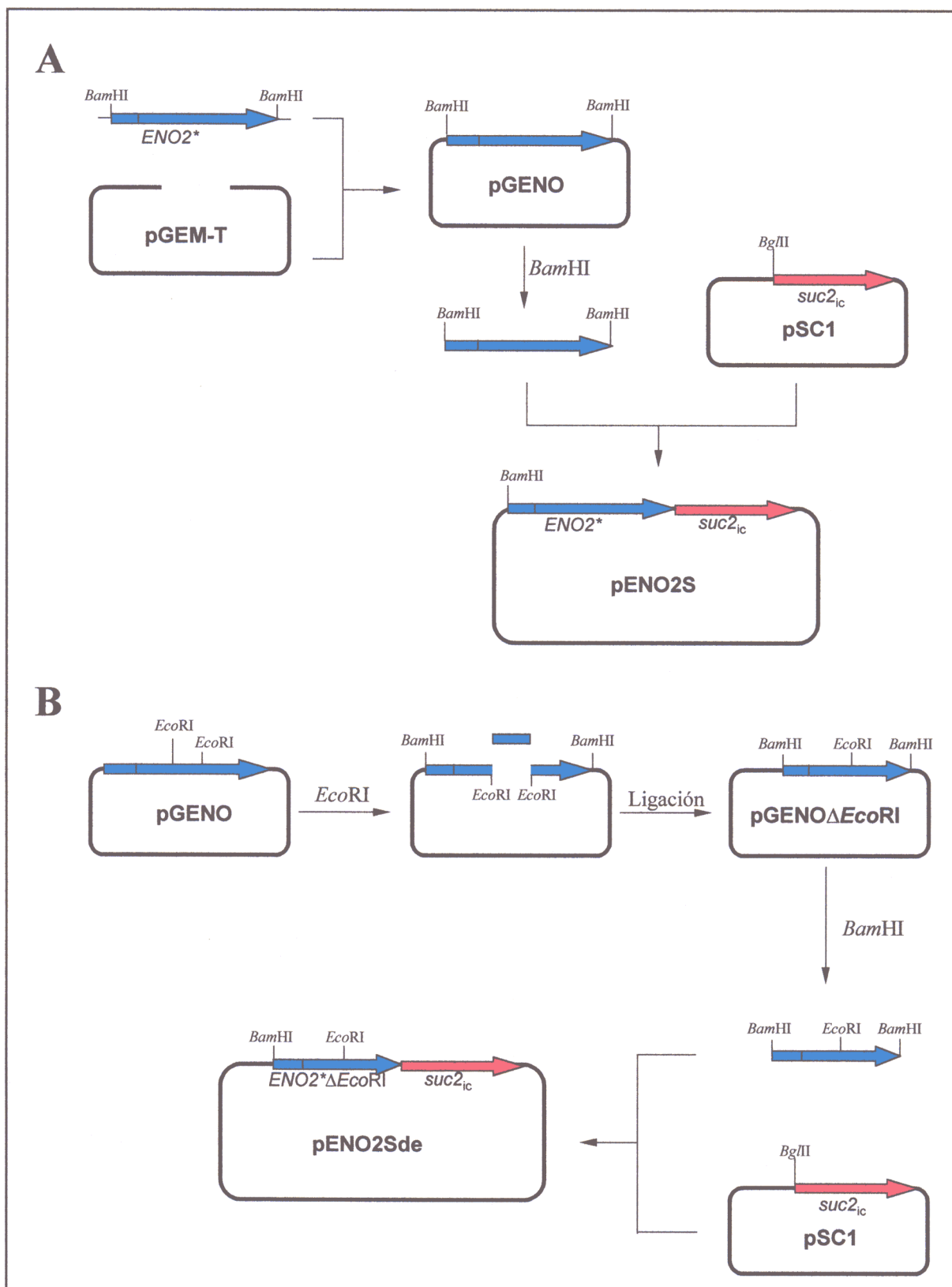
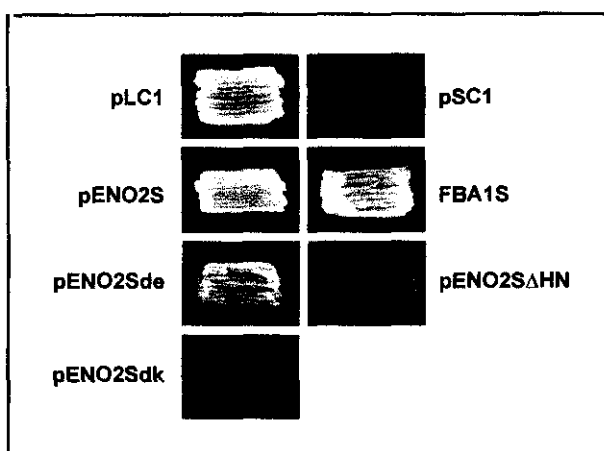


Fig. 35. Construcción de proteínas de fusión con la invertasa. (A) Construcción génica de la proteína de fusión Eno2-Suc2. Para la construcción de la proteína híbrida Fba1-Suc2 se siguió el mismo esquema. (B) Construcción génica de la proteína truncada Eno2ΔEcoRI-Suc2. * Al gen *ENO2* le faltan las bases que codifican los dos últimos aminoácidos. *suc2_{ic}* indica el alelo que codifica una forma intracelular de la invertasa.

Fig. 36. Análisis de la complementación de la cepa SS10 (*suc2Δ9*) por los plásmidos que llevan las distintas construcciones híbridas. La cepa SS10 fue transformada con los plásmidos indicados. Los transformantes obtenidos en medio selectivo sin uracilo fueron estríados en el mismo medio, y posteriormente replicados a YPS-antimicina, evaluándose al cabo de 48 horas su capacidad para crecer en un medio con sacarosa como única fuente de carbono. Como control positivo se empleó la cepa transformada con pLC1, un plásmido centromérico que lleva el alelo *SUC2* silvestre.



2. Determinación de zonas implicadas en la secreción de la enolasa.

Con el fin de determinar si existían en la enolasa regiones implicadas en su exportación, decidimos estudiar la secreción de proteínas híbridas como en el caso anterior, empleando formas truncadas de la enolasa. Para la construcción de éstas aprovechamos las dianas de restricción *EcoRI*, *KpnI* y *HindIII* presentes en la secuencia del gen *ENO2*.

Este gen tiene dos dianas de restricción *EcoRI* y otras dos dianas *KpnI* en su secuencia, de forma que al eliminar los fragmentos *EcoRI-EcoRI* o *KpnI-KpnI* y religar el gen, se mantiene en ambos casos el marco de lectura, resultando así dos formas truncadas de la enolasa (para la situación de las dianas, véase la figura 37). El plásmido pGENO fue digerido con *EcoRI*, eliminándose un fragmento *EcoRI-EcoRI* de 250 bp, y religado, para dar lugar al plásmido pGENOΔ*EcoRI*. El plásmido pGENOΔ*KpnI* se obtuvo tras digerir pGENO con *KpnI*, y religarlo eliminando un fragmento *KpnI-KpnI* de 700 bp. A partir de estos dos plásmidos se obtuvieron los fragmentos *BamHI-BamHI* que contenían las formas truncadas del gen *ENO2*, y de igual manera que en las construcciones iniciales, se subclonaron en el punto *BglII* del plásmido pSC1. A los plásmidos obtenidos se les denominó respectivamente pENO2Sde y pENO2Sdk (fig. 35B). Ambos fueron transformados en la cepa SS10 (*suc2Δ9*). Los transformantes que llevaban el plásmido pENO2Sdk no fueron capaces de crecer en sacarosa como única fuente de carbono. Los transformantes que llevaban el plásmido pENO2Sde sí crecieron en estas condiciones, aunque más lentamente que los transformantes que expresaban la proteína híbrida con la forma silvestre de la enolasa (fig. 36). Es decir, la eliminación de los aminoácidos 101 a 352 en la secuencia de la enolasa (correspondientes al fragmento *KpnI-KpnI* de 700 bp de *ENO2*) impide la salida de la proteína híbrida Eno2Δ*KpnI*-Suc2 a la superficie celular. Por otra parte, la eliminación de los residuos 169 a 251 (correspondientes al fragmento *EcoRI-EcoRI* de 250 bp) afecta negativamente a la secreción de la proteína híbrida Eno2Δ*EcoRI*-Suc2.

La secuencia del gen *ENO2* presenta tres dianas de restricción *HindIII*. Mediante digestión parcial del plásmido pGENO con esta enzima se eliminó el fragmento *HindIII-HindIII* de 540 pb. Tras la religación se obtuvo el plásmido pGE44. Al igual que en los casos anteriores, se mantenía la fase de lectura dentro del gen truncado. A partir de pGE44 se obtuvo el fragmento *BamHI-BamHI* que contenía la tercera forma truncada del gen *ENO2*, el cual fue igualmente subclonado en el punto *BglII* del plásmido pSC1. El plásmido resultante pENO2SΔHN fue transformado en la cepa SS10. Los transformantes obtenidos no fueron capaces de crecer en sacarosa como única fuente de carbono (fig. 36). Este resultado indica

que la eliminación de los aminoácidos 46 a 224 de la secuencia de la enolasa impiden la salida de la proteína híbrida Eno2 Δ HindIIIIN-Suc2 a la superficie celular.

La figura 37 muestra un esquema de las construcciones truncadas utilizadas y los resultados obtenidos. La expresión de todas las formas truncadas se comprobó más tarde mediante Western-blotting con anticuerpos frente a Suc2p (véase el apartado 3 de este capítulo).

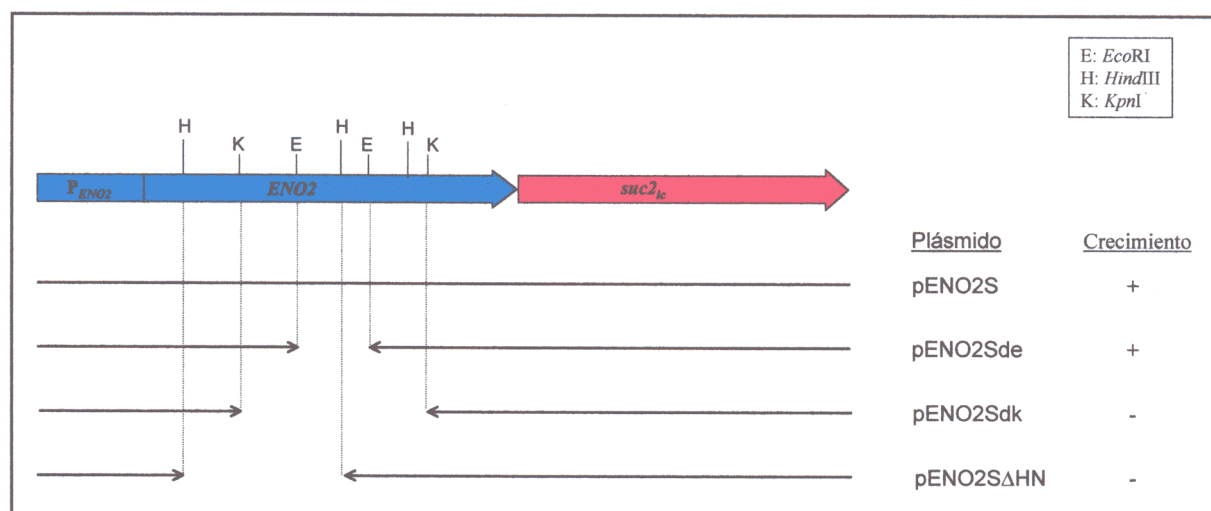


Fig. 37. Esquema de las construcciones genéticas utilizadas para acotar zonas necesarias para la exportación de la enolasa. La discontinuidad marcada por las flechas muestra el fragmento que fue eliminado. Se indica asimismo el plásmido que contiene cada construcción y la complementación de la incapacidad para crecer en sacarosa como única fuente de carbono de la cepa SS10.

3. Análisis de la glicosilación de las proteínas híbridas.

Una vez comprobada la salida de la enolasa hacia la superficie celular, decidimos estudiar si ésta se producía a través de la ruta clásica de secreción, ya que la enolasa carece de un péptido señal que dirija su translocación al retículo endoplásmico y, por tanto, su entrada en dicha ruta.

Durante el proceso de secreción por la llamada ruta clásica tiene lugar la glicosilación de las proteínas. Tanto la *N*- como la *O*-glicosilación comienzan en el retículo endoplásmico y continúan en el aparato de Golgi (Orlean, 1997). La invertasa secretada de *S. cerevisiae* contiene entre 9 y 11 cadenas de azúcares unidas en sitios de *N*-glicosilación, presentando un peso molecular entre 100 y 150 kDa (Reddy *et al.*, 1988). Para determinar si la enolasa era secretada a través de la ruta clásica de secreción, decidimos estudiar la *N*-glicosilación de las proteínas híbridas construídas usando endo-beta-*N*-acetilglucosaminidasa H (Orlean *et al.*, 1991). Este experimento se realizó mediante Western-blotting con anticuerpos frente a Suc2p, cedidos por la Dra. Ferro-Novick. Se obtuvieron extractos citoplasmáticos de los transformantes de la cepa SS10 que contenían los plásmidos descritos. Una alícuota de cada uno de estos extractos fue tratada con Endo-H para eliminar la *N*-glicosilación. De forma paralela se llevó una segunda serie de alícuotas de los extractos, a las cuales no se añadió la

enzima. Después de la electroforesis y la transferencia, las membranas fueron incubadas con el anticuerpo anti-Suc2p en presencia de un extracto citoplasmático de la cepa *suc2Δ9* SS10 (5 mg de proteína), con el fin de eliminar uniones inespecíficas. El tamaño de las proteínas híbridas resultó ser el mismo tanto en las muestras tratadas con Endo-H como en los controles sin tratar (fig. 38). Como control positivo de la reacción se empleó un extracto de la cepa silvestre FY1679-28C (carril 7). La invertasa glicosilada apareció como un rastro difuso entre 115 y 182 kDa, mientras que la forma deglicosilada migró como una banda definida de unos 62 kDa, coincidiendo con resultados descritos previamente (Guthrie y Fink, 1991). Esto demuestra que las proteínas de fusión Eno2-Suc2, Eno2Δ*EcoRI*-Suc2, Eno2Δ*KpnI*-Suc2 y Eno2Δ*HindIII*N-Suc2 no están *N*-glicosiladas. Además, este resultado sugiere que la salida de la enolasa a la superficie celular no tiene lugar a través de la ruta clásica de secreción.

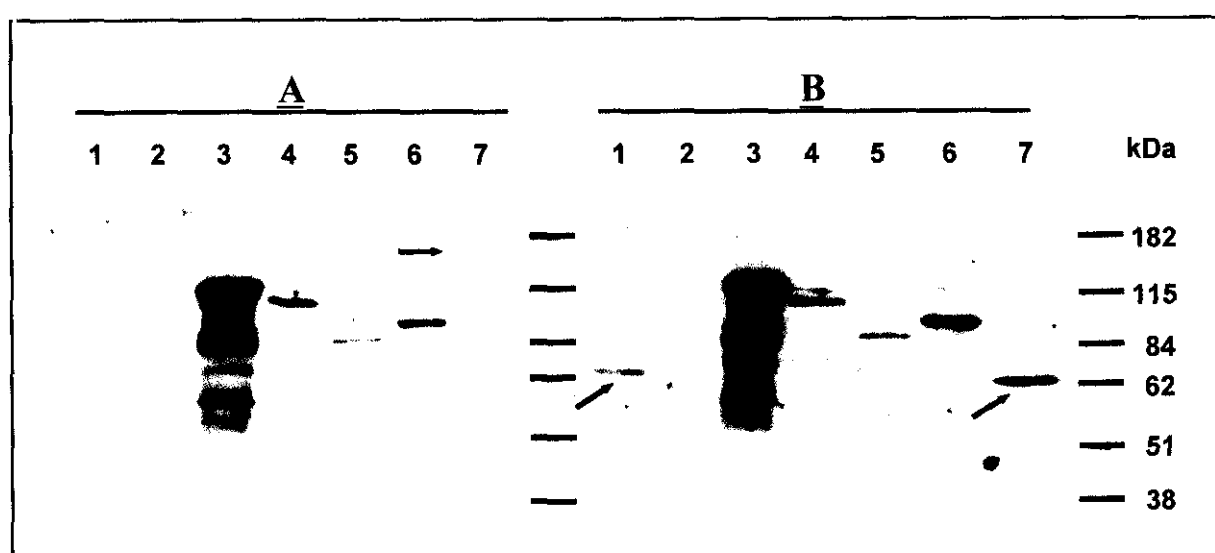


Fig. 38. Análisis de la *N*-glicosilación de las proteínas de fusión mediante el tratamiento con EndoH y Western-blotting. (A) Muestras no tratadas. (B) Muestras tratadas con Endo-H. Los carriles 1-6 corresponden a la cepa SS10 transformada con los plásmidos 1) pLC1; 2) pSC1; 3) pENO2s; 4) pENO2Sde; 5) pENO2Sdk; 6) pENO2SAHN. El carril 7 corresponde a la cepa silvestre FY1679-28C. Las barras azules indican los marcadores de peso molecular. La flecha roja señala la invertasa silvestre.

4. Obtención de mutantes afectados en la secreción de la enolasa.

Con el fin de estudiar la existencia de genes implicados en la secreción de la enolasa se decidió obtener mutantes afectados en este proceso. La estrategia empleada fue la mutagénesis al azar, mediante radiación ultravioleta, de la cepa SS10 transformada con un plásmido episómico que llevaba la construcción génica codificante de la proteína de fusión Eno2-Suc2. Con vistas a poder clonar en un futuro, a partir de genotecas con marcador *URA3*, el o los genes en cuestión, si es que los hubiera, se eligió el vector YCplac181, que lleva como marcador el gen *LEU2*. A partir del plásmido pENO2S se obtuvo un fragmento *PstI*-*SacI* de 4 Kb, que contenía el gen *ENO2* con su promotor, fusionado en fase por delante del alelo *suc2* al que se aludía anteriormente. Este fragmento fue subclonado en el vector YCplac181,

construyéndose así el plásmido pLE1. Dicho plásmido fue transformado en la cepa SS10. La funcionalidad de la proteína híbrida se comprobó mediante la complementación de la incapacidad de crecer en sacarosa como única fuente de carbono de esta cepa.

De forma preliminar se realizó una curva de viabilidad de la cepa a mutagenizar, empleando distintos tiempos de irradiación, para determinar la dosis de radiación necesaria para conseguir una supervivencia en torno al 20%. La cepa SS10 transformada con el plásmido pLE1 fue mutagenizada con radiación ultravioleta de longitud de onda 254 nm, aplicándose una dosis de 1200 erg/mm² y obteniéndose una viabilidad del 5 al 10%. Las placas fueron incubadas a 24°C en oscuridad durante seis días, transcurridos los cuales se replicaron a YPS-Antimicina por duplicado. Una de las series de réplicas se incubó a 24°C, con el fin de detectar mutantes totalmente incapaces de secretar la enolasa. La otra serie se incubó a 37°C, para localizar mutantes termosensibles, incapaces de secretar la enolasa a dicha temperatura, pero capaces de hacerlo a 24°C. Tras tres días de incubación, las placas fueron revisadas y se seleccionaron las colonias de interés. De las 4000 colonias rastreadas elegimos inicialmente 163 clones incapaces de crecer en sacarosa a 37°C, y 33 que no fueron capaces de crecer en sacarosa ni a 24°C ni a 37°C. Tras tres rondas de comprobación, los clones mutantes seleccionados quedaron finalmente reducidos a 15. Se obtuvieron 4 mutantes incapaces de crecer en sacarosa a 24°C ni a 37°C, y 11 mutantes capaces de hacerlo a 24°C, pero no a 37°C. Estos clones han sido conservados para estudios posteriores.

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

I. EL ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS SECRETADAS POR PROTOPLASTOS EN CONDICIONES DE REGENERACIÓN ES UNA HERRAMIENTA ÚTIL PARA EL ESTUDIO DE LAS PROTEÍNAS IMPLICADAS EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA PARED CELULAR.

La pared celular fúngica es una estructura esencial para el mantenimiento de la forma y la integridad celular, además de participar en otros procesos importantes como adhesión y patogenicidad. Su composición se conoce con bastante detalle, así como su organización estructural. Sin embargo, otros aspectos como el ensamblaje y la reorganización de los distintos componentes para dar lugar a esta estructura no están del todo esclarecidos (Lipke y Ovalle, 1998).

Con el objeto de profundizar en el estudio de la construcción de la pared celular e identificar nuevas proteínas implicadas en el proceso, la estrategia seguida en este trabajo ha consistido en estudiar las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* en condiciones de regeneración en medio líquido. La eliminación de la pared celular mediante digestión enzimática en un medio estabilizado osmóticamente, seguida de la incubación de las células en condiciones de regeneración, resulta en la secreción al medio de cultivo de numerosas proteínas, y en la construcción activa de la pared celular (Klis, 1994). Entre las proteínas secretadas pueden encontrarse no sólo proteínas estructurales de la pared celular, sino también enzimas implicadas en su biosíntesis, y en procesos de ensamblaje de componentes y remodelación de la estructura.

El uso de esta estrategia para el estudio de las proteínas de la pared celular permite evitar algunos de los problemas que presentan los distintos procedimientos de extracción de proteínas de pared. En primer lugar, durante las primeras horas de la regeneración, las proteínas destinadas a formar parte de la pared celular no quedan retenidas en la nueva pared en formación, sino que son secretadas al medio de cultivo. Por tanto, no es necesario recurrir a tratamientos químicos o enzimáticos para su extracción, que podrían provocar modificaciones en las mismas. Por otra parte, las proteínas de pared extraídas mediante procedimientos químicos o enzimáticos llevan unidas cadenas laterales de glucano y quitina, lo cual dificulta su resolución mediante electroforesis y su posterior análisis. Además, durante el proceso de regeneración de la pared las células se encuentran en un estado de construcción activa de esta estructura, por lo que los genes implicados se encontrarán inducidos.

En el presente trabajo, la electroforesis bidimensional ha sido la técnica empleada como primer paso para el análisis de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae*. La electroforesis bidimensional constituye actualmente el método más eficaz para la separación de mezclas complejas de proteínas, permitiendo purificar hasta miles de proteínas en un solo paso de forma adecuada para su posterior análisis (Celis y Gromov, 1999; Wilkins *et al.*, 1997). Con el desarrollo de los gradientes de pH inmovilizados, la técnica ha experimentado un gran avance, lo cual, unido al espectacular desarrollo de la espectrometría de masas durante los últimos años, ha hecho de la combinación de ambas técnicas la herramienta más adecuada para los análisis de proteínas a gran escala (Blackstock y Weir, 1999; Wilkins *et al.*, 1997). Es de destacar la aparición cada vez más frecuente de mapas de referencia de los proteomas de distintas especies o tejidos celulares, como una forma de visualizar el conjunto de proteínas que están siendo producidas por un organismo (o tejido) en

unas condiciones determinadas. Recientemente se han publicado las últimas actualizaciones del mapa bidimensional de las proteínas de *S. cerevisiae* (Garrels *et al.*, 1997; Perrot *et al.*, 1999; Sánchez *et al.*, 1996).

Con el fin de cubrir la mayor parte del intervalo de pH posible, en la separación electroforética de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* se emplearon IPGs con un intervalo de pH entre 3 y 10. Sin embargo, la observación de que la mayoría de las proteínas reconocidas como “de pared” identificadas aparecían en la región ácida de los geles bidimensionales condujo a la utilización de un intervalo de pH en la primera dimensión distinto al que se había venido utilizando. Está descrito en la literatura que el uso de intervalos estrechos de pH en los geles IPG aumenta la resolución de la separación, además de permitir cargar una cantidad de proteína mayor (Righetti y Bossi, 1997). Ambas circunstancias facilitan además la posterior identificación de las manchas proteicas.

Efectivamente, cuando se empleó un gradiente de pH lineal en el intervalo entre 4 y 7, se consiguió aumentar considerablemente la resolución en la región más ácida del gel. Aunque se trataba de un experimento preliminar, fue posible realizar la identificación de varias de las manchas proteicas observadas mediante espectrometría de masas. De las 54 manchas proteicas detectadas mediante tinción con plata y analizadas, se identificaron 16, correspondientes a 9 proteínas. Todas ellas salvo dos han sido descritas como proteínas de pared o implicadas en su construcción.

Estos resultados demuestran que la estrategia de estrechamiento del intervalo de pH en la región ácida para la separación electroforética en la primera dimensión contribuye a mejorar de forma sustancial la detección e identificación de proteínas de pared. La disponibilidad de geles IPG comerciales en intervalos de pH más estrechos (hasta de una unidad de pH en 11 cm de longitud) permitirá aumentar aún más la resolución del sistema. Sin embargo, con el fin de que la identificación de las proteínas presentes en esta muestra sea lo más completa posible, sería conveniente realizar mapas que cubrieran todo el intervalo de pH. Probablemente la estrategia más adecuada fuera la alineación de varios geles realizados en varios intervalos de pH. Además, recientemente se han comercializado unos geles IPG en el intervalo de pH de 3 a 12, que permiten la resolución de proteínas muy básicas.

Así pues, el uso de la electroforesis bidimensional en el estudio de las proteínas secretadas por protoplastos ha permitido obtener una visión integrada de muchos de los genes que son expresados durante la regeneración de la pared celular. La combinación de esta técnica junto con diversas estrategias de análisis, como la secuenciación aminoterminal, la detección con anticuerpos específicos y especialmente la espectrometría de masas, ha conducido a la identificación de varias proteínas posiblemente implicadas en los procesos de biosíntesis de la pared celular. La espectrometría de masas está actualmente considerada como la técnica más adecuada para la caracterización de proteínas a gran escala, y su utilidad ha quedado puesta de manifiesto en el presente trabajo. Es de destacar que ésta es la primera vez que la espectrometría de masas ha sido empleada por un grupo de investigación español en un estudio de este tipo.

Las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* identificadas en este trabajo pueden ser incluidas en diversos grupos atendiendo a su función biológica (tabla XII).

Tabla XI. Lista de las proteínas identificadas clasificadas de acuerdo a su función biológica.

Proteínas de pared celular o implicadas en su biosíntesis

Bgl2p	β -1,3-glucosil transferasa
Cwp1p	Proteína de pared, estructural
Exg1p	Exoglucanasa
Gas1p	β -1,3-glucanosil transferasa
Gas3p	Anclaje a GPI
Icwp	Proteína de pared, cara interna
Pir2p/Hsp150p	Proteína de pared, estructural
Pir3p	Proteína de pared, estructural
Pir4p/Cis3p	Proteína de pared, estructural
Pst1p/Ydr055p	Anclaje a GPI

Enzimas glicolíticas o de la fermentación

Adh1p	Alcohol deshidrogenasa
Eno1p	Enolasa
Eno2p	Enolasa
Fba1p	Fructosa bifosfato aldolasa
Pdc1p	Piruvato descarboxilasa
Pgk1p	Fosfoglicerato kinasa
Pmg1p	Fosfoglicerato mutasa
Pyk1p	Piruvato kinasa
Tdh2p	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
Tdh3p	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
Tpi1p	Triosa fosfato isomerasa

Proteínas de choque térmico

Pir2p/Hsp150p	Familia Pir
Pir3p	Familia Pir
Ssa1,2p	Familia Hsp70
Ssb1,2p	Familia Hsp70

Otras funciones

Bmh1p	Familia 14-3-3; chaperonina
Glr1p	Glutation reductasa
Ipp1p	Pirofosfatasa inorgánica
Kel1p	Morfogénesis y fusión celular
Ygp1p	Glicoproteína secretada
Ahp1p	Peroxidasa dependiente de tiorredoxina

Función desconocida

Ydr032p	Similar a Ycp4p y a obr1p (<i>S. pombe</i>)
Ydr055p/Pst1p	Anclaje a GPI
Ypl151p/Prp46p	Repeticiones WD-40

1. Proteínas de pared celular propiamente dichas.

Entre las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* se han identificado varias proteínas reconocidas como proteínas de pared, o con una función definida en su construcción.

- **Bgl2p** es una β -1,3-glucosil transferasa que cataliza la transferencia de una cadena de β -1,3-glucano a otra cadena semejante, a través de un enlace β -1,6 en el extremo no reductor de la cadena aceptora (Goldman *et al.*, 1995), y se ha propuesto que podría tener un papel en la expansión celular durante el crecimiento y en el apareamiento, y también en la liberación de las esporas (Klebl y Tanner, 1989). Esta proteína está unida a la pared de manera no covalente, ya que puede ser extraída mediante el tratamiento de las paredes celulares aisladas con calor, y también a partir de células intactas con DTT (Cappellaro *et al.*, 1998; Mrsa *et al.*, 1993). Su abundancia en las muestras de proteínas secretadas por protoplastos sugiere que se trate de una enzima con un papel importante en los primeros estadios de la regeneración de la pared celular.

- **Exg1p** es una exo- β -1,3-glucanasa (Vázquez de Aldana *et al.*, 1991) que ha sido implicada en el metabolismo del glucano de la pared celular (Cid *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1995), papel con el que su detección en este trabajo es consistente.

Proteínas Pir. Como ya se ha comentado en la Introducción, estas proteínas están unidas covalentemente al β -1,3-glucano de la pared celular en *S. cerevisiae*, probablemente mediante un enlace O-glicosídico (Kapteyn *et al.*, 1999b; Mrsa *et al.*, 1997), aunque algunas de ellas también pueden ser extraídas mediante el tratamiento con agentes reductores (Cappellaro *et al.*, 1998; Moukadiri *et al.*, 1999). Entre las proteínas secretadas por protoplastos se han detectado tres de los miembros descritos de dicha familia, **Pir2p/Hsp150p**, **Pir3p** y **Pir4p/Cis3p** (Moukadiri *et al.*, 1999; Russo *et al.*, 1992; Toh-E *et al.*, 1993), de los cuales Pir2p aparece de forma mayoritaria. Aunque parece que tienen un papel en la estabilidad de la pared celular y su eliminación altera la movilidad de componentes de la misma (Mrsa *et al.*, 1999a; Mrsa *et al.*, 1999b), no se conoce aún la función exacta de estas proteínas. La expresión de las proteínas Pir identificadas en este trabajo está aumentada en mutantes con una pared celular debilitada debido a una deficiencia en β -1,6-glucano, como parte de un mecanismo compensatorio, según se ha propuesto (Kapteyn *et al.*, 1999b). Del mismo modo, durante la regeneración de la pared celular, podrían constituir un mecanismo de refuerzo o protección de la nueva pared en formación.

Proteínas GPI. Las proteínas GPI quedan inmovilizadas en la pared celular mediante un enlace al β -1,6-glucano (Montijn *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995; Van der Vaart *et al.*, 1996a), que a su vez está unido al β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1996; Kollár *et al.*, 1997), o a la quitina (Kapteyn *et al.*, 1997; Kollár *et al.*, 1997). Únicamente se conoce la función fisiológica de algunas de estas proteínas, los receptores de feromonas Agalp y Ag α lp (Lipke *et al.*, 1989; Roy *et al.*, 1991), y Flo1p, implicada en floculación (Bony *et al.*, 1997).

- **Cwp1p** es una proteína GPI extraíble con laminarinasa de la pared celular (Van der Vaart *et al.*, 1995), y se localiza preferentemente en la superficie de yemas de pequeño tamaño y en el septo (Ram *et al.*, 1998b). La expresión de *CWPI* está regulada por ciclo, presentando un máximo en S/G2 (Caro *et al.*, 1998), cuando la mayoría de las células presentan yemas pequeñas, coincidente con su localización. Estos datos sugieren que Cwp1p

podría tener un papel en la formación de la pared de la nueva célula. De forma similar, podría actuar en la regeneración de la nueva pared por parte de los protoplastos.

- **Icwp/Ssr1p** ha sido localizada en la capa interna de la pared celular (Moukadiri *et al.*, 1997). Esta manoproteína ya había sido detectada en los sobrenadantes de cultivos de esferoplastos, tras 4-6 horas de regeneración. En este trabajo se ha puesto de manifiesto que tras dos horas de regeneración de los protoplastos, Icwp/Ssr1p ya está presente en el medio.

- **Gas1p** es una proteína con anclaje a GPI que ha sido localizada en la cara externa de la membrana plasmática (Popolo y Vai, 1999b). Sin embargo, recientemente se ha descrito que esta proteína también está unida de forma covalente a la pared celular, de donde puede ser extraída mediante el tratamiento con β -1,3-glucanasa (de Sampaio *et al.*, 1999). Su presencia entre las proteínas secretadas por protoplastos podría representar el estadio intermedio entre el anclaje a la membrana y la unión a la pared celular. La función catalítica de Gas1p ha sido descrita en los últimos meses; se trata, al igual que Bgl2p, de una β -1,3-glucosil transferasa, aunque Gas1p cataliza la unión de las dos cadenas a través de un enlace β -1,3 (Mouyna *et al.*, 1999; Popolo *et al.*, 1999a).

Entre las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* también se ha identificado Gas3p, un homólogo de Gas1p. Ambas proteínas presentan una identidad del 43% a lo largo de 241 aminoácidos, y al igual que Gas1p, Gas3p presenta las características típicas de las proteínas GPI. Sin embargo, a diferencia de ella, Gas3p no presenta el motivo dibásico por delante del sitio ω , por lo que su destino final supuestamente sería la pared celular (Caro *et al.*, 1997). La función de Gas3p es aún desconocida, aunque probablemente esté también implicada en procesos relacionados con la biosíntesis de la pared. El hecho de que la delección de *GAS3* provoca hipersensibilidad a Calcoflúor (Caro *et al.*, 1997) apoya esta posibilidad. Además, la secuencia de Gas3p, al igual que la de Gas1p, presenta homología con el dominio catalítico de endo- β -1,3-glucanasas de plantas (Popolo y Vai, 1999b), lo cual sugiere que podría ejercer una función similar o relacionada, o incluso la misma función en distintos momentos del ciclo celular, ya que la transcripción de *GAS3* está inducida en la fase G2, mientras que la de *GAS1* tiene su máximo en G1/S (Spellman *et al.*, 1998).

- **Pst1p/Ydr055w** fue la primera proteína de función desconocida identificada en las muestras de proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae*. Ello, unido al hecho de que presentara las características típicas de proteínas GPI de pared, condujo a que se profundizara en su estudio. Los resultados obtenidos se han discutido en el apartado II del presente capítulo.

2. Presencia de enzimas glicolíticas en la superficie celular de *S. cerevisiae*.

Entre las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* se han detectado numerosas enzimas glicolíticas (fig. 39, tabla XII), proteínas muy caracterizadas cuya localización supuestamente se restringía al citoplasma.

La presencia de enzimas glicolíticas en la superficie celular de diversos microorganismos está documentada en la literatura (Chaffin *et al.*, 1998). Varios grupos han descrito la presencia de la enolasa en la pared celular de *C. albicans* (Angiolella *et al.*, 1996; Eroles *et al.*, 1997). La gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa es una de las proteínas de superficie mayoritarias en los estreptococos del grupo A (Pancholi y Fischetti, 1992), y

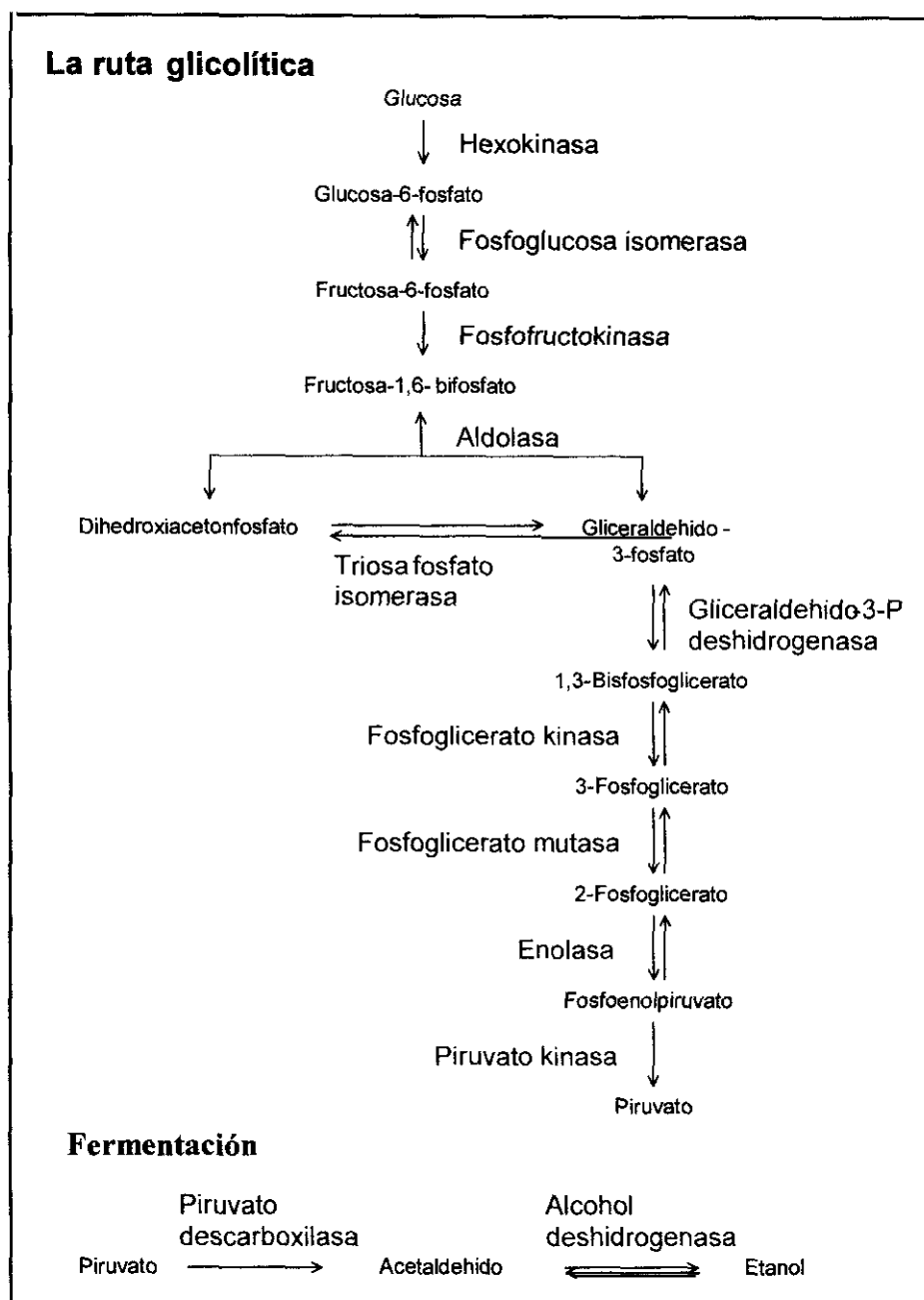


Fig. 39. Esquema de la fermentación alcohólica. (A) La ruta glicolítica. (B) Destino del piruvato en *S. cerevisiae*, cuyo metabolismo es eminentemente fermentativo. Se han representado en rojo las enzimas detectadas entre las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae*.

también ha sido localizada en la pared celular de *C. albicans* y *K. marxianus* (Fernandes *et al.*, 1992; Gil-Navarro *et al.*, 1997). En esta localización, la citada enzima mantiene su actividad catalítica (Gil-Navarro *et al.*, 1997), y además en *C. albicans* actúa como receptor para laminina y fibronectina, por lo que se ha sugerido que pudiera tener un papel en la patogenicidad de esta levadura (Gozalbo *et al.*, 1998). La 3-fosfoglicerato kinasa ha sido detectada en la pared celular, tanto por microscopía inmunoelectrónica como mediante el marcaje con un reactivo de biotinilación que no es capaz de atravesar la membrana (Alloush

et al., 1997) Otras enzimas glicolíticas como la alcohol deshidrogenasa podrían estar asimismo localizadas en la pared celular de *C. albicans* (Pendrak y Klotz, 1995). Algunas de éstas también han sido encontradas en la superficie de *Entamoeba histolytica* y *Schistosoma mansoni*. En el caso de *S. cerevisiae*, el análisis de las proteínas extraídas con SDS en condiciones reductoras a partir de paredes celulares aisladas ha conducido sistemáticamente a la identificación de varias enzimas glicolíticas (Cappellaro *et al.*, 1998), aunque los autores alegan que se trata de un artefacto provocado por la contaminación con proteínas citoplásmicas. Nuestras observaciones indican que estas enzimas también pueden ser extraídas a partir de células intactas mediante el tratamiento con agentes reductores (datos no mostrados), lo cual coincide con resultados publicados recientemente que describen la presencia de la enolasa en la pared celular de *S. cerevisiae* (Edwards *et al.*, 1999).

Como contrapartida, algunos autores han demostrado que la pared celular de *C. albicans* es capaz de incorporar o unir a la pared celular proteínas añadidas de forma exógena, y señalan que la presencia de la enolasa, las proteínas de choque térmico de la familia Hsp70, y algunas otras, podrían encontrarse en la pared celular como resultado de la lisis celular o de algún otro mecanismo aún desconocido (Eroles *et al.*, 1997). Si bien no es completamente descartable la posibilidad de que se produzca la lisis de protoplastos durante la obtención de las proteínas secretadas por protoplastos, los experimentos de control realizados demuestran que la lisis celular, y por tanto la contaminación con proteínas citoplásmicas, es menor del 0.1%. Es más, los resultados obtenidos en el presente trabajo con las proteínas de fusión (Eno2p y Fba1p con la invertasa) demuestran que dos proteínas consideradas tradicionalmente como citoplásmicas, la enolasa y la fructosa bifosfato aldolasa, son capaces de dirigir la salida de un péptido intracelular a la superficie celular. Ésta es la primera vez que se demuestra genéticamente que estas dos enzimas son capaces de alcanzar el espacio periplásmico en *S. cerevisiae*. Es más, se ha demostrado que ello no es debido a la lisis celular, y eliminado la posibilidad de que la exportación de dichas proteínas se deba al elevado nivel de expresión de estas enzimas (Norbeck y Blomberg, 1997b), ya que una versión delecionada de la proteína de fusión Eno2p-invertasa, que carece de parte de la secuencia de la enolasa pero conserva su región promotora, no es capaz de complementar a un mutante *suc2*.

Las enzimas glicolíticas carecen de un péptido señal que dirija su translocación hacia la ruta clásica de secreción, como tampoco lo tienen las proteínas de la familia Hsp70 (Ssa y Ssb), también identificadas en este trabajo y cuya presencia en la pared celular ya había sido descrita (López-Ribot *et al.*, 1996a). Los resultados obtenidos apuntan a que la exportación de las dos enzimas glicolíticas analizadas no se produce a través de la ruta clásica de secreción, ya que la proteína de fusión Eno2p-invertasa carece de *N*-glicosilación. Ello sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de exportación para estas proteínas. De hecho, en mamíferos existen varias proteínas que carecen de péptido señal, y sin embargo son transportadas al exterior celular mediante un mecanismo diferente del transporte vesicular (Cleves, 1997; Cleves *et al.*, 1996). Como ejemplos cabría citar el factor de crecimiento de fibroblastos 1 y 2, la interleukina 1, la galectina-1, la proteína Tat del virus VIH-1, y la proteína VP22 del virus herpes. La galectina-1 es exportada a través de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* en un proceso que no requiere la ruta de secreción (Cleves *et al.*, 1996). Así, se ha propuesto en *S. cerevisiae* la existencia de un mecanismo de exportación de proteínas que se ha dado en llamar “no clásico”, habiéndose identificado tres genes implicados en el mismo (Cleves *et al.*, 1996).

Uno de los potenciales candidatos para la secreción no clásica en *S. cerevisiae* podría ser la proteína Ste6p, un miembro de la superfamilia de transportadores ABC, que es responsable de la secreción del factor α directamente desde el citosol al periplasma (Kuchler, 1989). Sin embargo, los experimentos de exportación de las proteínas de fusión se llevaron a cabo en una cepa de tipo sexual α , en la cual no se expresa *STE6*, lo cual demuestra que Ste6p no es necesaria para que tenga lugar la salida de la enolasa y la fructosa bifosfato aldolasa a la superficie celular. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Cleves y colaboradores (Cleves *et al.*, 1996) para la proteína galectina-1.

Rubartelli y Sitia (Rubartelli y Sitia, 1991) han sugerido que el estrés celular puede causar un incremento en la secreción no clásica. Dado que el estrés provoca también un incremento en la expresión de las proteínas de choque térmico, éstas podrían estar implicadas en la exportación no convencional (Cleves *et al.*, 1996). Las proteínas de la familia Hsp70 son chaperonas que participan en el plegamiento de proteínas y en la translocación de proteínas a través de las membranas (Alder *et al.*, 1990; Becker, 1994; Jensen y Johnson, 1999). Estas proteínas tampoco poseen péptido señal, y su localización se consideraba limitada al citoplasma. Sin embargo, López Ribot y colaboradores (López-Ribot *et al.*, 1996a; Lopez-Ribot y Chaffin, 1996b) han demostrado la presencia de algunos miembros de esta familia (Ssa1p y Ssa2p) en la pared celular tanto de *S. cerevisiae* como de *C. albicans*, y sugieren que podrían jugar algún papel en los procesos de biosíntesis, secreción y ensamblaje de los componentes de la misma. Varias proteínas pertenecientes a esta familia, entre ellas Ssa1p, Ssa2p, Ssb1p y Ssb2p, aparecen también entre las proteínas secretadas por protoplastos, en concordancia con los resultados anteriores.

Con el fin de investigar las bases moleculares del mecanismo de exportación no clásica de las enzimas glicolíticas se ha realizado una mutagénesis con luz UV de la cepa SS10 (*suc2 Δ 9*) transformada con un plásmido episómico que lleva la construcción génica de la proteína de fusión Eno2p-invertasa. La obtención de mutantes de *S. cerevisiae* incapaces de exportar la enolasa podría permitir la identificación de genes implicados en la secreción no clásica de ésta en particular, y en general de las enzimas glicolíticas, suponiendo que todas alcancen la superficie celular por el mismo mecanismo. Además, estos mutantes pueden ser empleados para examinar si dichas enzimas tienen algún papel en los procesos de construcción de la pared celular, ya que en ellos se ha eliminado de manera selectiva la presencia de las mismas en dicha estructura.

Por el momento se desconoce si las enzimas glicolíticas localizadas en la pared celular ejercen alguna función en esta localización, y si su actividad es la misma que presentan en el citoplasma. Hasta ahora solamente se ha demostrado actividad catalítica para la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa de la pared celular de *C. albicans* (Gil-Navarro *et al.*, 1997). Sin embargo existen numerosas proteínas, a las que se ha dado el nombre de *moonlighting proteins*, que ejercen varias funciones diferentes según su localización subcelular o extracelular, expresión en distintos tipos celulares, oligomerización, y/o concentración de ligando, cofactor o sustrato (Jeffery, 1999). Un ejemplo de este tipo de proteínas es la fosfoglucosa isomerasa, una enzima citosólica que cataliza el segundo paso de la glicólisis. Sin embargo, esta proteína también es secretada por células de mamífero, y tiene al menos otras cuatro funciones: se trata de una neuroleucina, que actúa como citoquina o como factor de crecimiento de nervios, es el factor autocrino de motilidad (AMF), y actúa como mediador de la diferenciación y maduración de células en la leucemia mieloide humana.

3. Otras proteínas de interés.

Entre las proteínas secretadas por protoplastos se han identificado otras proteínas que consideramos interesante comentar aquí.

- **Kellp.** *KEL1* fue identificado como un gen supresor en multicopia del defecto de apareamiento que provoca la activación constitutiva de *PKC1* (Philips y Herskowitz, 1998). La eliminación de *KEL1* provoca un defecto en la fusión celular durante el apareamiento, y además los mutantes *kel1Δ* son alargados y de forma heterogénea, lo cual indica que Kellp también juega un papel en la morfogénesis. Kellp está localizada en las regiones de crecimiento polarizado, tanto en el apareamiento como en la gemación (Philips y Herskowitz, 1998). Tras el tratamiento con feromonas, Kellp aparece en la periferia de la punta del *shmoo*. Durante la gemación, Kellp se localiza en la punta de la yema en células con yemas pequeñas o medianas, y en el cuello entre la madre y la hija en células con yema grande.

La secuencia aminoacídica de Kellp presenta un dominio llamado *kelch*, formado por 6 repeticiones internas. Basándose en homologías de secuencias, se piensa que estas repeticiones podrían formar las aspas de una estructura que se conoce con el nombre de “propulsor β” (Bork y Doolittle, 1994). Existen proteínas con dominios *kelch* en diversos organismos, incluyendo virus, *Drosophila*, *C. elegans* y mamíferos, y varias de ellas están implicadas en interacciones con actina (Philips y Herskowitz, 1998). Se ha especulado que Kellp podría ser importante para dirigir o mantener las vesículas de secreción en la zona de fusión celular a través de interacciones con el citoesqueleto. Basándose en los resultados obtenidos en este trabajo, se podría postular para Kellp un papel semejante durante la regeneración de la pared celular.

- **Prp46p.** El gen *PRP46/YPL151c* codifica una proteína de función desconocida, que muestra similitud con las proteínas Prl1p y Prl2p de *Arabidopsis thaliana*, reguladores de fosfatasa (Xia *et al.*, 1996). Al igual que ellas, Prp46p presenta en su secuencia varias repeticiones Trp-Asp (normalmente llamadas WD-40). Los dominios WD-40 consisten en repeticiones en tándem de unos 50 residuos, cada una de las cuales contiene un motivo central Trp-Asp (Smith *et al.*, 1999). Prp46p presenta siete repeticiones de este tipo.

Por esta característica estructural, Prp46p ha sido englobada en la familia de la beta-transducina (Base de datos mips; <http://speedy.mips.biochem.mpg.de>). Se denomina beta-transducina a la subunidad β de las proteínas G triméricas, que intervienen en la transducción de señales generadas por receptores transmembrana (Gilman, 1987). Las funciones de las subunidades β y γ no están del todo claras, pero parecen ser necesarias para el intercambio de GDP por GTP, así como para el anclaje a membrana y reconocimiento del receptor. Existen en *S. cerevisiae* varias proteínas más pertenecientes a esta familia, entre las que se encuentran las siguientes: Ste4p, la proteína G de la ruta de respuesta a feromonas (Hirschman *et al.*, 1997), Crn1p, una proteína que se une a actina y tubulina (Goode *et al.*, 1999), Cop1p, Sec13p, Sec27p y Sec31p, componentes de las vesículas de la ruta de secreción (Duden *et al.*, 1994; Roberg *et al.*, 1997; Salama *et al.*, 1997; Sutterlin *et al.*, 1997), Lst8p, necesaria para el transporte de permeasas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática (Roberg *et al.*, 1997) y Sni2, una proteína que interacciona con Sec9p (Lehman *et al.*, 1999).

Curiosamente, las repeticiones WD en la proteína G también forman una estructura circular de “propulsor β”, con siete láminas beta antiparalelas constituyendo las aspas de la misma (Sondek *et al.*, 1996; Wall *et al.*, 1995), y se ha propuesto que todas las proteínas que

presentan estos motivos se pliegan adoptando una estructura semejante (Garcia-Higuera *et al.*, 1996). La superficie superior de esta estructura podría coordinar interacciones entre proteínas (Smith *et al.*, 1999).

• **Bmh1p.** Se trata de una proteína homóloga a las proteínas 14-3-3 de mamíferos, implicadas en diversos procesos celulares. En *S. cerevisiae*, Bmh1p y su homólogo Bmh2p son necesarias para la transducción de señales durante el crecimiento pseudohifal (Roberts *et al.*, 1997). En concordancia, Bmh1p interacciona in vivo con Ste20p, la MAPKKKK de las rutas de aparamiento, alta osmolaridad y crecimiento invasivo (Gustin *et al.*, 1998), y de la ruta SVG descrita recientemente (Lee y Elion, 1999). Por otra parte, *BMH2* y en menor medida *BMH1* son supresores en multicopia de la inviabilidad de un mutante *chc1Δ*, que carece de la cadena pesada de la clatrina (Gelperin *et al.*, 1995), una proteína que forma parte del revestimiento de vesículas, por lo que se ha propuesto que las proteínas 14-3-3 en *S. cerevisiae* podrían además intervenir en el transporte vesicular.

En vista de estas observaciones, una hipótesis atractiva supondría que estas tres proteínas, Bmh1p, Prp46p y Kellp, estuvieran implicadas en el transporte y la secreción de otras proteínas destinadas a la regeneración de la pared celular.

Enzimas detoxificadoras. Glr1p y Ahp1p son la glutatión reductasa y la alquil peróxido reductasa respectivamente, dos enzimas detoxificadoras necesarias para la protección frente al estrés oxidativo (Collinson y Dawes, 1995; Lee *et al.*, 1999). Evidentemente los protoplastos se encuentran sometidos a una situación de estrés, en la que pudiera requerirse la presencia de este tipo de enzimas.

Proteínas desconocidas. Además de la ya mencionada Pst1p/Ydr055w, se ha conseguido identificar una nueva proteína de función desconocida, codificada por el ORF YDR032c. La proteína **Ydr032p** presenta homología con la proteína obr1 de *S. pombe*, una proteína que está sobreexpresada en mutantes resistentes a brefeldina A (Turi *et al.*, 1994).

Así pues, los resultados obtenidos demuestran que el análisis de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* en condiciones de regeneración en medio líquido constituye una estrategia adecuada para la identificación de proteínas de pared celular o implicadas en su biosíntesis. Asimismo, la aproximación resulta válida para la identificación de nuevas proteínas posiblemente implicadas en el proceso de construcción de la pared. Una de estas proteínas, de función hasta el momento desconocida, ha sido el objeto de estudio de la segunda parte del trabajo descrito en esta memoria, ya que sus características estructurales apuntaban a que podía tratarse de una proteína de la pared celular.

Por otra parte, tras la secuenciación del genoma completo de *S. cerevisiae* en 1996 (Goffeau *et al.*, 1996b), el siguiente paso a dar fue el análisis funcional de todos los genes de función desconocida identificados durante el proyecto de secuenciación. Para ello se desarrolló el proyecto EUROFAN (*EUROpean Functional ANalysis*), en el cual participa nuestro Departamento. En una primera fase, se procedió a la delección sistemática de todos los genes de función desconocida detectados, dedicándose la segunda fase al análisis de los mutantes generados. El propósito del Nodo de Pared Celular y Morfogénesis, al cual pertenece nuestro laboratorio, está en identificar aquellos genes implicados en procesos

relacionados con la pared celular y la morfogénesis. Con este fin se han realizado diversos ensayos que han permitido ir acotando la colección de mutantes y seleccionar varios de ellos posiblemente afectados en la pared celular. Uno de los ensayos más específicos del citado Nodo, a llevar a cabo sobre los mutantes seleccionados, consiste en el análisis de las proteínas secretadas por protoplastos en condiciones de regeneración de la pared celular. La obtención de un mapa de referencia de éstas puede constituir una buena herramienta para el análisis funcional de mutantes afectados en la pared, ya que la comparación del patrón de proteínas secretadas por los mutantes con el patrón silvestre podría proporcionar información sobre las consecuencias que la delección génica tiene sobre la construcción de la pared celular.

La estrategia proteómica empleada en el presente trabajo podría ser complementada con estudios a nivel transcripcional, usando la tecnología de los *microarrays* de DNA. De hecho, ya se ha realizado un análisis parcial de este tipo (Braley y Chaffin, 1999), detectándose un incremento en los niveles de mRNA correspondientes a varios genes codificantes de proteínas GPI de pared, proteínas de estrés, y proteínas implicadas en la biosíntesis de la pared celular. La disponibilidad, a través del proyecto EUROFAN, de membranas en las que se encuentra representado todo el genoma de *S. cerevisiae* nos permitirá completar el estudio de la regeneración de la pared celular y comparar los datos obtenidos mediante ambas estrategias.

II. EL GEN *PST1*/YDR055w ESTÁ IMPLICADO EN LA CONSTRUCCIÓN DE LA PARED CELULAR.

Con el objetivo de caracterizar la función de *PST1* en *S. cerevisiae* se procedió a la obtención de un mutante deleciónado en dicho gen. Una vez obtenida la cepa mutante *pst1Δ*, a la que se denominó MY55, se llevaron a cabo diversos ensayos fenotípicos encaminados a determinar si el mutante *pst1Δ* mostraba algún defecto en el crecimiento o, más concretamente, alguna alteración en la pared celular. Sin embargo estos experimentos no han aportado ninguna información acerca de la posible implicación de la proteína Pst1p en fenómenos relacionados con la pared celular, ya que el mutante *pst1Δ* se ha comportado en todo momento de manera semejante a la cepa silvestre. Los resultados concuerdan con los obtenidos en las pruebas fenotípicas primarias realizadas a un mutante *pst1Δ* procedente de EUROSCARF dentro del proyecto EUROFAN.

Observaciones recientes muestran que la expresión del gen *PST1* se encuentra inducida unas tres veces en mutantes deleciónados en el gen *FKS1*, que codifica la subunidad catalítica de la β -1,3-glucán sintasa (Terashima *et al.*, 1999). Igualmente, en mutantes *kre6Δ*, afectados en la síntesis del β -1,6-glucano, también se ha observado un incremento en la transcripción de *PST1*, siendo éste el gen más inducido en dichos mutantes (T. Roemer, comunicación personal). Esto parece indicar que el gen *PST1* ejerce alguna función importante en los mismos. Contrariamente a lo que pudiera pensarse, la deleción de *PST1* en los fondos genéticos *fks1Δ* y *kre6Δ* no es letal, como tampoco lo es en el fondo *gas1Δ*. Sin embargo, sería interesante comprobar de qué modo afecta la carencia de Pst1p cuando dichos mutantes son sometidos a condiciones que afectan a la integridad celular. Como ya se ha comprobado en el caso del mutante *ecm33Δ*, la eliminación simultánea de *PST1* provoca un incremento de la sensibilidad a toxina *killer* K1, a zimoliasa y a higromicina B, además de un considerable aumento en la activación de Slt2p, indicativo de una afectación grave de la pared celular (Vázquez, 1999).

Dada la elevada similitud existente entre las proteínas codificadas por los genes *PST1* y *ECM33*, y puesto que la deleción simultánea de ambos provoca un fenotipo más acusado que la eliminación de uno solo de los genes, cabría pensar que las proteínas Pst1p y Ecm33p tuvieran funciones semejantes. Con el fin de comprobarlo se investigó si la presencia de Pst1p en un elevado número de copias era capaz de suplir la falta de Ecm33p. La sobreexpresión de *PST1* no suprime la hipersensibilidad del mutante *ecm33Δ* a cafeína y calcoflúor, y sólo alivia ligerísimamente la sensibilidad a toxina *killer* K1 y a higromicina B. Ahora bien, hay que resaltar que mientras que la expresión de *ECM33* no está regulada por el ciclo celular, la de *PST1* sí lo está según los estudios de transcripción en *microarrays* de DNA (Spellman *et al.*, 1998). Dado que la sobreexpresión de *PST1* se realizó bajo el control de su propio promotor desde un plásmido episómico, si Ecm33p es necesaria a lo largo de todo el ciclo celular, es posible que la falta de complementación se deba a que Pst1p se esté expresando sólo en determinados momentos del ciclo celular, y no durante todo él, como es el caso de Ecm33p. Por otra parte, se ha propuesto que la expresión dependiente de ciclo celular de algunas proteínas de pared es la responsable de la correcta localización de las mismas en la superficie celular (Smits *et al.*, 1999b). Pudiera ser, por tanto, que la causa de que no se produzca la complementación sea una “incorrecta” localización de Pst1p para suplir la falta de Ecm33p. Experimentos de expresión de *PST1* bajo el control de un promotor constitutivo o regulable, o del promotor de *ECM33*, contribuirían a comprobar o rechazar estas hipótesis, ya que también cabe la posibilidad de que la sobreexpresión de *PST1* no sea capaz, en ningún caso, de complementar a un mutante *ecm33Δ*.

Cuando se producen fallos en el ensamblaje de los distintos componentes de la pared celular, dichos componentes son liberados al medio de cultivo. En los mutantes *ecm33Δ* y *ecm33Δ pst1Δ* se ha observado una liberación al medio de cultivo de β -1,6-glucano. Éste glucano liberado está unido a proteínas, ya que su presencia se puso de manifiesto tras una electroforesis de proteínas seguida de Western-blotting. Por el contrario, estas proteínas con restos de β -1,6-glucano no están unidas a β -1,3-glucano, ya que cuando la membrana se hibridó con anticuerpos frente a este polímero la señal correspondiente al β -1,3-glucano no coincidió con la correspondiente al β -1,6-glucano. Estos resultados indicarían que existe un fallo en el anclaje de algunas de las proteínas GPI, las cuales se unen a la estructura de la pared a través del heteropolímero β -1,6-glucano/ β -1,3-glucano, y que dicho defecto estaría en el enlace entre el β -1,6-glucano y el β -1,3-glucano. Ahora bien, debe de tratarse únicamente de un subconjunto de este tipo de proteínas, ya que no se ha observado un aumento en la liberación al medio de Cwplp, utilizada como modelo de las proteínas de pared celular con anclaje a GPI (Jiang *et al.*, 1996; Kapteyn *et al.*, 1999a).

Al analizar la liberación al medio de cultivo de Pir2p, proteína anclada a la pared celular a través del β -1,3-glucano (Kapteyn *et al.*, 1999b) se observó una diferencia cualitativa entre la proteína Pir2p liberada al medio por las cepas silvestre y MY55, y la liberada por el mutante sencillo *ecm33Δ* y los dobles mutantes *ecm33Δ pst1Δ*. Sería interesante averiguar si la banda superior, que aparece incrementada en éstos, se debe a una mayor glicosilación, o a un defecto en el procesamiento de la proteína.

Las características de la secuencia aminoacídica de Pst1p hacían pensar que pudiera estar localizada en la pared celular, o según observaciones recientes, en la membrana plasmática (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998a).

Pst1p-myc puede ser extraída a partir de paredes celulares aisladas mediante el tratamiento con SDS en condiciones reductoras. Sin embargo, la digestión con zimoliasa de las paredes celulares resultantes de esta extracción no condujo a la solubilización adicional de Pst1p-myc. Esto indica que Pst1p-myc no está unida de forma covalente al glucano de la pared celular, sino que se une a esta estructura de forma laxa, o mediante puentes disulfuro con otras proteínas de la misma. Tampoco puede descartarse la posibilidad de que se trate de una proteína de la membrana plasmática.

Con el fin de investigar la presencia de la proteína marcada Pst1p-myc en la membrana plasmática, se analizó la partición de Pst1p-myc en la separación de fases de una solución de Triton X-114. Las proteínas hidrofílicas aparecen exclusivamente en la fase acuosa, mientras que las proteínas integrales de membrana, de naturaleza anfipática, se recuperan en la fase detergente (Bordier, 1981). Pst1p-myc puede ser parcialmente solubilizada en Triton X-114, apareciendo en proporción semejante en las fases acuosa y detergente. Este resultado sugiere que al menos una fracción de Pst1p-myc está anclada en la membrana. Estas observaciones coinciden con los resultados obtenidos por Hamada y colaboradores (Hamada *et al.*, 1998a), quienes han descrito una localización en la membrana plasmática para una proteína marcadora quimérica que lleva los últimos 40 aminoácidos de Pst1p –donde se encuentran el punto de unión a GPI y los residuos que supuestamente contienen la información necesaria para la incorporación de estas proteínas en la membrana plasmática o la pared celular (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998a; Hamada *et al.*, 1998b).

Probablemente sea una fracción de Pst1p-myc que mantiene el anclaje a GPI intacto, y que por tanto está unida a la membrana, la que aparece en la fase detergente. No obstante, para comprobar esta hipótesis sería necesario analizar si el tratamiento con fosfatidil inositol fosfolipasa C es capaz de solubilizar la fracción hidrofóbica de Pst1p-myc en la fase acuosa, como ocurre en el caso de Gas1p (Conzelmann *et al.*, 1988). Por otra parte, la fracción soluble de Pst1p-myc podría corresponder a una forma periplásmica de dicha proteína.

Las imágenes de inmunofluorescencia indirecta muestran que Pst1p-myc se localiza preferentemente en zonas concretas de la superficie celular. Sin embargo, en las condiciones en que se realizó el experimento, no todas las células presentaban este patrón. Ello podría ser debido a la regulación por ciclo celular de *PST1*, puesto que el ensayo se realizó sobre un cultivo asincrónico.

De los resultados expuestos a lo largo de la presente memoria se puede concluir que el análisis a gran escala de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* ha permitido la identificación de varias proteínas de la pared celular o implicadas en su construcción. Asimismo ha sido posible identificar varias proteínas de función desconocida hasta el momento, que pudieran jugar un papel en dicho proceso, una de las cuales ha sido estudiada en el transcurso de este trabajo. Para ello ha resultado especialmente útil el poder acceder al empleo de la espectrometría de masas, una tecnología puntera en la caracterización de la estructura primaria de proteínas que se encuentra actualmente en desarrollo en España. La obtención del mapa de referencia de las proteínas secretadas por protoplastos puede resultar una herramienta muy adecuada para el análisis funcional de mutantes afectados en la pared celular que se está llevando a cabo dentro del proyecto europeo EUROFAN para el análisis funcional del genoma de *S. cerevisiae*.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El análisis de las proteínas secretadas por protoplastos mediante electroforesis bidimensional, junto con secuenciación aminoterminal, detección con anticuerpos o espectrometría de masas, ha conducido a la identificación de 34 proteínas posiblemente implicadas, directa o indirectamente, en la regeneración de la pared celular.

2. Las proteínas identificadas pueden ser agrupadas funcionalmente en varias categorías: proteínas de pared propiamente dichas o implicadas en su construcción, enzimas glicolíticas, proteínas de choque térmico y un grupo heterogéneo en el que se incluyen proteínas con funciones diversas.

3. Dos enzimas glicolíticas, la enolasa y la fructosa bifosfato aldolasa, son capaces de dirigir la salida de una forma intracelular de la invertasa a la superficie celular. La eliminación de los residuos 169 a 251 de la enolasa afecta de forma negativa a su salida a la superficie, mientras que la eliminación de los residuos 101 a 352 ó 46 a 224 impide esta exportación.

4. El gen *PST1* codifica una proteína que está implicada en la construcción de la pared celular. La proteína de fusión Pst1p-myc se localiza preferentemente en la superficie celular, en la pared celular y/o en la membrana plasmática.

5. La ausencia de Ecm33p, una proteína homóloga a Pst1p, provoca una liberación al medio de cultivo de β -1,6-glucano unido a proteínas, indicativo de que existe un defecto en el anclaje de algunas proteínas GPI a la pared celular. Este defecto no se ve agravado por la eliminación simultánea de Ecm33p y Pst1p.

6. La sobreexpresión de Pst1p bajo el control de su propio promotor alivia sólo ligeramente determinados fenotipos del mutante *ecm33 Δ* , como la hipersensibilidad a higromicina B y a toxina *killer* K1.

7. El análisis a gran escala de las proteínas secretadas por protoplastos de *S. cerevisiae* en condiciones de regeneración en medio líquido constituye una estrategia adecuada para la identificación de proteínas de pared celular o implicadas en su biosíntesis. La obtención de un mapa de referencia de las mismas puede, por tanto, resultar una herramienta muy útil para el análisis funcional de mutantes afectados en la pared celular.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

- Aanstoot, H.J., Kang, S.M., Kim, J., Lindsay, L.A., Roll, U., Knip, M., Atkinson, M., Mose-Larsen, P., Fey, S., y Ludvigsson, J. (1996) Identification and characterization of glima 38, a glycosylated islet cell membrane antigen, which together with GAD65 and IA2 marks the early phases of autoimmune response in type 1 diabetes. *J.Clin.Invest.* **97**(12), 2772-2783.
- Abeijon, C. y Yun Chen, L. (1998) The role of glucosidase I (Cwh41p) in the biosynthesis of cell wall β -1,6-glucan is indirect. *Mol.Biol.Cell* **9**, 2729-2738.
- Aicher, L., Wahl, D., Arce, A., Grenet, O., y Steiner, S. (1998) New insights into cyclosporine A nephrotoxicity by proteome analysis. *Electrophoresis* **19**(11), 1998-2003.
- Alder, G.M., Austen, B.M., Bashford, C.L., Mehlert, A., y Pasternak, C.A. (1990) Heat shock proteins induce pores in membranes. *Bioscience Reports* **10**(6), 509-518.
- Alloush, H.M., López-Ribot, J.L., Masten, B.J., y Chaffin, W.L. (1997) 3-phosphoglycerate kinase: a glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology*. **143**(Pt 2), 321-330.
- Anderson, L. y Seilhamer, J. (1997) A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver. *Electrophoresis* **18**, 533-537.
- Anderson, N.L. y Anderson, N.G. (1998) Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* **19**(11), 1853-1861.
- Anderson, N.L., Esquer-Blasco, R., Hofmann, J.P., Meheus, L., Raymackers, J., Steiner, S., Witzmann, F., y Anderson, N.G. (1995) An updated two-dimensional gel database of rat liver proteins useful in gene regulation and drug effect studies. *Electrophoresis* **16**, 1977-1981.
- Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N., y Cassone, A. (1996) Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J.Infect.Dis.* **173**(3), 684-690.
- Ausubel, F.M., Kingston, R.E., Brent, R., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1993) *Current protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, Nueva York.
- Ballou, L., Hitzeman, R.A., Lewis, M.S., y Ballou, C.E. (1991) Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**(8), 3209-3212.
- Bankaitis, V.A., Malehorn, D.E., Emr, S.D., y Greene, R. (1989) The *Saccharomyces cerevisiae* SEC14 gene encodes a cytosolic factor that is required for transport of secretory proteins from the yeast Golgi complex. *J.Cell Biol.* **108**, 1271-1281.
- Becker, J. y Craig, E.A. (1994) Heat-shock proteins as molecular chaperones. *Eur.J.Biochem.* **219**, 11-23.
- Benghezal, M., Lipke, P.N., y Conzelmann, A. (1995) Identification of six complementation classes involved in the biosynthesis of glycosylphosphatidylinositol anchors in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **130**(6), 1333-1344.
- Bickle, M., Delley, P.A., Schmidt, A., y Hall, M.N. (1998) Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.* **17**(8), 2235-2245.
- Bidard, F., Bony, M., Blondin, B., Dequin, S., y Barre, P. (1995) The *Saccharomyces cerevisiae* FLO1 flocculation gene encodes for a cell surface protein. *Yeast* **11**(9), 809-822.
- Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sánchez, J.C., y Hochstrasser, D. (1993a) A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* **14**(12), 1357-1365.
- Bjellqvist, B., Sánchez, J.C., Pasquali, C., Ravier, F., Paquet, N., Frutiger, S., Hughes, G.J., y Hochstrasser, D. (1993b) Micropreparative two-dimensional electrophoresis allowing the separation of samples containing milligram amounts of proteins. *Electrophoresis* **14**(12), 1375-1378.
- Blackstock, W.P. y Weir, M.P. (1999) Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins. *Trends Biotechnol.* **17**(3), 121-127.
- Blomberg, A., Blomberg, L., Norbeck, J., Fey, S.J., Larsen, P.M., Larsen, M., Roepstorff, P., Degand, H., Boutry, M., y Posch, A. (1995) Interlaboratory reproducibility of yeast protein

- patterns analyzed by immobilized pH gradient two-dimensional gel electrophoresis. *Electrophoresis* **16**(10), 1935-1945.
- Bollag, D.M., Rozycki, M.D., y Edelstein, S.J.** (1996) *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc, Nueva York.
- Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P., y Blondin, B.** (1997) Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J.Bacteriol.* **179**(15), 4929-4936.
- Boone, C., Sommer, S.S., Hensel, A., y Bussey, H.** (1990) Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J.Cell Biol.* **110**(5), 1833-1843.
- Bordier, C.** (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J.Biol.Chem.* **256**(4), 1604-1607.
- Bork, P. y Doolittle, R.F.** (1994) Drosophila kelch motif is derived from a common enzyme fold. *J.Mol.Biol.* **236**(5), 1277-1282.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., y Boeke, J.D.** (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**(2), 115.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* **72**, 248-254.
- Braley, R. y Chaffin, W.L.** (1999) Variations in mRNA transcript levels of cell wall-associated genes of *Saccharomyces cerevisiae* following spheroplasting. *FEMS Microbiol.Lett.* **181**(1), 177-185.
- Brown, J.L. y Bussey, H.** (1993a) The yeast *KRE9* gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol.Cell Biol.* **13**(10), 6346-6356.
- Brown, J.L., Kossaczka, Z., Jiang, B., y Bussey, H.** (1993b) A mutational analysis of killer toxin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* identifies new genes involved in cell wall (1-->6)-beta- glucan synthesis. *Genetics* **133**(4), 837-849.
- Bussey, H.** (1991) K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol.Microbiol.* **5**, 2339-2343.
- Cabib, E. y Durán, A.** (1975) Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at nonpermissive temperatures. *J.Bacteriol.* **124**(3), 1604-1606.
- Cabib, E., Bowers, B., y Roberts, R.L.** (1983) Vectorial synthesis of a polysaccharide by isolated plasma membranes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **80**, 3318-3321.
- Cabib, E., Drgon, T., Drgonova, J., Ford, R.A., y Kollár, R.** (1997) The yeast cell wall, a dynamic structure engaged in growth and morphogenesis. *Biochem.Soc.Trans.* **25**, 200-204.
- Cappellaro, C., Mrsa, V., y Tanner, W.** (1998) New potential cell wall glucanases of *Saccharomyces cerevisiae* and their involvement in mating. *J.Bacteriol.* **180**(19), 5030-5037.
- Carlson, M., Osmond, B.C., y Botstein, D.** (1981) Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics* **98**, 25-40.
- Carlson, M., Taussig, R., Kustu, S., y Botstein, D.** (1983) The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol.Cell Biol.* **3**(3), 439-447.
- Caro, L.H., Smits, G.J., van Egmond, P., Chapman, J.W., y Klis, F.M.** (1998) Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiol.Lett.* **161**(2), 345-349.
- Caro, L.H.P., Tettelin, H., Vossen, J.H., Ram, A.F.J., Van den Ende, H., y Klis, F.M.** (1997) *In silicio* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(15), 1477-1489.
- Carr, S.A. y Annan, R.S.** (1997) Overview of peptide and protein analysis by mass spectrometry. En *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., N.Y. Cap. 10.21.
- Celis, J.E. y Gromov, P.** (1999) 2D protein electrophoresis: can it be perfected? *Curr.Opin.Biotech.* **10**, 16-21.
- Chaffin, W.L., López-Ribot, J.L., Casanova, M., Gozalbo, D., y Martínez, J.P.** (1998) Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: Identification, function, and expression. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**(1), 130-180.

- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P.O., y Herskowitz, I. (1998) The transcriptional program of sporulation in budding yeast. *Science* **282**, 699-705.
- Cid, V.J., Durán, A., del Rey, F., Snyder, M.P., Nombela, C., y Sánchez, M. (1995) Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**(3), 345-386.
- Cleves, A.E. (1997) Protein transport: The nonclassical ins and outs. *Current Biology* **7**, R318-R320.
- Cleves, A.E., Cooper, D.N., Barondes, S.H., y Kelly, R.B. (1996) A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **133**(5), 1017-1026.
- Collinson, L.P. y Dawes, I.W. (1995) Isolation, characterization and overexpression of the yeast gene, *GLR1*, encoding glutathione reductase. *Gene* **156**(1), 123-127.
- Conzelmann, A., Riezman, H., Desponds, C., y Bron, C. (1988) A major 125-kd membrane glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae* is attached to the lipid bilayer through an inositol-containing phospholipid. *EMBO J.* **7**(7), 2233-2240.
- Conzelmann, A., Spiazzi, A., Hyman, R., y Bron, C. (1986) Anchoring of membrane proteins via phosphatidylinositol is deficient in two classes of Thy-1 negative mutant lymphoma cells. *EMBO J.* **5**(12), 3291-3296.
- Cordwell, S.J., Wilkins, M.R., Cerpa-Poljak, A., Gooley, A.A., Duncan, M., Williams, K.L., y Humphery-Smith, I. (1995) Cross-species identification of proteins separated by two-dimensional gel electrophoresis using matrix-assisted laser desorption/ionisation/time-of-flight mass spectrometry and amino acid composition. *Electrophoresis* **16**, 438-443.
- Dallies, N., Francois, J., y Paquet, V. (1998) A new method for quantitative determination of polysaccharides in the yeast cell wall. Application to the cell wall defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**(14), 1297-1306.
- de Nobel, H. y Lipke, P.N. (1994) Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly? *Trends in cell biology* **4**, 42-45.
- De Nobel, H., Ruíz, C., Martín, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M. y Klis, F. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in Fks2 expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Mol. Microbiol.*, enviado para su publicación.
- de Nobel, J.G., Klis, F.M., Priem, J., Munnik, T., y Van den Ende, H. (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**(6), 491-499.
- de Sampaio, G., Bourdineaud, J.P., y Lauquin, G.J.M. (1999) A constitutive role for GPI anchors in *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall targeting. *Mol. Microbiol.* **34**(2), 247-256.
- Dean, N. (1995) Yeast glycosylation mutants are sensitive to aminoglycosides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 1287-1291.
- Destruelle, M., Holzer, H., y Klionsky, D.J. (1994) Identification and characterization of a novel yeast gene: the *YGPI* gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation. *Mol. Cell Biol.* **14**(4), 2740-2754.
- Dijkgraaf, G.J.P., Brown, J.L., y Bussey, H. (1996) The *KNH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* is a functional homolog of *KRE9*. *Yeast* **12**, 683-692.
- Dongré, A.R., Eng, J.K., y Yates III, J.R. (1997) Emerging tandem-mass-spectrometry techniques for the rapid identification of proteins. *Trends in Biotechnology* **15**, 418-425.
- Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., y el-Sherbeini, M. (1994) The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**(26), 12907-12911.
- Dove, A. (1999) Proteomics: translating genomics into products? *Nat. Biotechnol.* **17**(3), 233-236.
- Duden, R., Hosobuchi, M., Hamamoto, S., Winey, M., Byers, B., y Schekman, R. (1994) Yeast beta- and beta'-coat proteins (COP). Two coatomer subunits essential for endoplasmic reticulum-to-Golgi protein traffic. *J. Biol. Chem.* **269**(39), 24486-24495.
- Edwards, S.R., Braley, R., y Chaffin, W.L. (1999) Enolase is present in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **177**(2), 211-216.
- Elorza, M.V., Rico, H., y Sentandreu, R. (1983) Calcofluor white alters the assembly of chitin fibrils in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* cells. *J. Gen. Microbiol.* **129**, 1577-1582.

- el-Sherbeini, M. y Clemas, J.A. (1995) Cloning and characterization of *GNS1*: a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in synthesis of 1,3-beta-glucan in vitro. *J.Bacteriol.* **177**(11), 3227-3234.
- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M.V., y Sentandreu, R. (1997) The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology*. **143**(Pt 2), 313-320.
- Fernandes, P.A., Keen, J.N., Findlay, J.B., y Moradas-Ferreira, P. (1992) A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim.Biophys.Acta* **1159**(1), 67-73.
- Ferro-Novick, S., Novick, P., Field, C., y Schekman, R. (1984) Yeast secretory mutants that block the formation of active cell surface enzymes. *J.Cell Biol.* **98**(1), 35-43.
- Fey, S.J., Nawrocki, A., Larsen, M.R., Görg, A., Roepstorff, P., Skews, G.N., Williams, R., y Larsen, P.M. (1997) Proteome analysis of *Saccharomyces cerevisiae*: A methodological outline. *Electrophoresis* **18**, 1361-1372.
- Fink, G.R. (1971) *Methods in enzymology*. Academic Press, Nueva York.
- Fleet, G.H. (1991) Cell walls. En *The yeasts* (Eds. Rose, A.H. y Harrison, J.S.). Academic Press, Nueva York.
- Gabrial, O. y Wang, S.F. (1969) Determination of enzymatic activity in polyacrylamide gels. I. Enzymes catalyzing the conversion of nonreducing substrates to reducing products. *Anal.Biochem.* **27**, 545-554.
- Garcia-Higuera, I., Fenoglio, J., Li, Y., Lewis, C., Panchenko, M.P., Reiner, O., Smith, T.F., y Neer, E.J. (1996) Folding of proteins with WD-repeats: comparison of six members of the WD-repeat superfamily to the G protein beta subunit. *Biochemistry* **35**(44), 13985-13994.
- Garrels, J.I., Futcher, B., Kobayashi, R., Latter, G.I., Schwender, B., Volpe, T., Warner, J.R., y McLaughlin, C.S. (1994) Protein identifications for a *Saccharomyces cerevisiae* protein database. *Electrophoresis* **15**(11), 1466-1486.
- Garrels, J.I., McLaughlin, C.S., Warner, J.R., Futcher, B., Latter, G.I., Kobayashi, R., Schwender, B., Volpe, T., Anderson, D.S., Mesquita-Fuentes, R., y Payne, W.E. (1997) Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: Identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis* **18**, 1347-1360.
- Garrett-Engele, P., Moilanen, B., y Cyert, M.S. (1995) Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H(+)-ATPase. *Mol.Cell Biol.* **15**, 4103-4114.
- Gelperin, D., Weigle, J., Nelson, K., Roseboom, P., Irie, K., Matsumoto, K., y Lemmon, S. (1995) 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signalling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **92**(25), 11539-11543.
- Gentsch, M. y Tanner, W. (1996) The *PMT* gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital. *EMBO J.* **15**(21), 5752-5759.
- Gietz y Sugino (1988) New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene* **74**, 527-534.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., y Woods, R.A. (1995) Studies of the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360.
- Gil, C., Pomes, R., y Nombela, C. (1988) A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J.Gen.Microbiol.* **134**, 1587-1595.
- Gilman, A.G. (1987) G Proteins: Transducers of receptor-generated signals. *Annu.Rev.Biochem.* **56**, 615-649.
- Gil-Navarro, I., Gil, M.L., Casanova, M., O'Connor, J.E., Martinez, J.P., y Gozalbo, D. (1997) The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J.Bacteriol.* **179**(16), 4992-4999.
- Godon, C., Lagniel, G., Lee, J., Buhler, J.M., Kieffer, S., Perrot, M., Boucherie, H., Toledano, M.B., y Labarre, J. (1998) The H₂O₂ stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**, 22480-22489.
- Goffeau, A. (1996a) 1996: a vintage year for yeast and Yeast. *Yeast* **12**(16), 1603-1605.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y.,

- Philippesen, P., Tettelin, H., y Oliver, S.G. (1996b) Life with 6000 genes. *Science* **274**(5287), 546, 563-7.
- Goldman, R.C., Sullivan, P.A., Zakula, D., y Capobianco, J.O. (1995) Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *Eur.J.Biochem.* **227**(1-2), 372-378.
- Goode, B.L., Wong, J.J., Butty, A.C., Peter, M., McCormack, A.L., Yates, J.R., Drubin, D.G., y Barnes, G. (1999) Coronin promotes the rapid assembly and cross-linking of actin filaments and may link the actin and microtubule cytoskeletons in yeast. *J.Cell Biol.* **144**(1), 83-98.
- Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorin, I., Renau-Piqueras, J., Martinez, J.P., y Gil, M.L. (1998) The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect.Immun.* **66**(5), 2052-2059.
- Gravel, P., Walzer, C., Aubry, C., Balant, L.P., Yersin, B., Hochstrasser, D.F., y Guimon, J. (1996) New alterations of serum glycoproteins in alcoholic and cirrhotic patients revealed by high resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **220**, 78-85.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., y Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**(4), 1264-1300.
- Guthrie, C. y Fink, G.R. (1991) *Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods in Enzymology*, 194. Academic Press, Inc., Londres.
- Gygi, S.P., Rochon, Y., Franza, B.R., y Aebersold, R. (1999) Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol.Cell Biol.* **19**(3), 1720-1730.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M., y Kitada, K. (1998a) Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **258**(1-2), 53-59.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., y Kitada, K. (1998b) Amino acid sequence requirement for efficient incorporation of glycosylphosphatidylinositol-associated proteins into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**(41), 26946-26953.
- Hamada, K., Terashima, H., Arisawa, M., Yabuki, N., y Kitada, K. (1999) Amino acid residues in the omega-minus region participate in cellular localization of yeast glycosylphosphatidylinositol-attached proteins. *J.Bacteriol.* **181**(13), 3886-3889.
- Hampsey, M. (1997) A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**, 1099-1133.
- Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**, 557-580.
- Hartland, R.P., Vermeulen, C.A., Klis, F.M., Sietsma, J.H., y Wessels, J.G. (1994) The linkage of (1-3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**(12), 1591-1599.
- Haynes, P.A., Gygi, S.P., Figeys, D., y Aebersold, R. (1998) Proteome analysis: biological assay or data archive? *Electrophoresis* **19**(11), 1862-1871.
- Heinisch, J.J., Lorberg, A., Schmitz, H.P., y Jacoby, J.J. (1999) The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **32** (4), 671-680.
- Helenius, A., Trombetta, E.S., Hebert, D.H., y Simons, F. (1997) Calnexin, calreticulin and the folding of glycoproteins. *Trends in cell biology* **7**, 193-200.
- Herbert, B. (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* **20**(4-5), 660-663.
- Hill, J.E., Myers, A.M., Koemer, T.J., y Tzagoloff, A. (1986) Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**, 163-167.
- Hill, K., Boone, C., Goebel, M., Puccia, R., Sdicu, A.M., y Bussey, H. (1992) Yeast *KRE2* defines a new gene family encoding probable secretory proteins, and is required for the correct N-glycosylation of proteins. *Genetics* **130**(2), 273-283.
- Hirschman, J.E., De, Z.G., Simonds, W.F., y Jenness, D.D. (1997) The G beta gamma complex of the yeast pheromone response pathway. Subcellular fractionation and protein-protein interactions. *J.Biol.Chem.* **272**(1), 240-248.
- Hochstrasser, D.F. y Merrill, C.R. (1988b) 'Catalysts' for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining. *Appl.Theor.Electrophor.* **1**(1), 35-40.

- Hochstrasser, D.F., Harrington, M.G., Hochstrasser, A.C., Miller, M.J., y Merrill, C.R. (1988a) Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis. *Anal.Biochem.* **173**(2), 424-435.
- Hochstrasser, D.F., Patchornik, A., y Merrill, C.R. (1988c) Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. *Anal.Biochem.* **173**(2), 412-423.
- Hong, Z., Mann, P., Brown, N.H., Tran, L.E., Shaw, K.J., Hare, R.S., y DiDomenico, B. (1994) Cloning and characterization of *KNR4*, a yeast gene involved in (1,3)- β -glucan synthesis. *Mol.Cell Biol.* **14**(2), 1017-1025.
- Horak, C.E., Iyer, V.R., Brown, P.O., y Snyder, M.P. (1999) Identification of the gene targets of the transcription factor SBF. Abstract. *Meeting on Yeast Cell Biology*, Cold Spring Harbor, Nueva York.
- Humphery-Smith, I., Cordwell, S.J., y Blackstock, W.P. (1997) Proteome research: Complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* **18**, 1217-1242.
- Hutchins, K. y Bussey, H. (1983) Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 $\rightarrow$ 6)-beta-D-glucan. *J.Bacteriol.* **154**(1), 161-169.
- Huxley, C., Green, E.D., y Dunham, I. (1990) Rapid assessment of *Saccharomyces cerevisiae* mating type by PCR. *Trends Genet.* **6**, 236.
- Igual, J.C., Johnson, A.L., y Johnston, L.H. (1996) Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor *SWI4* and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* **15**(18), 5001-5013.
- Immervoll, T., Gentzsch, M., y Tanner, W. (1995) PMT3 and PMT4, two new members of the protein-O-mannosyltransferase gene family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **11**(14), 1345-1351.
- Inoue, S.B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., Miyamoto, C., Arisawa, M., Furuichi, Y., y Watanabe, T. (1995) Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur.J.Biochem.* **231**(3), 845-854.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., y Kimura, A. (1983) Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* **153**, 163-168.
- James, P. (1997) Of genomes and proteomes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **231**(1), 1-6.
- Jeffery, C.J. (1999) Moonlighting proteins. *Trends Biochem.Sci.* **24**(1), 8-11.
- Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., y Mann, M. (1997) Identification of the components of simple protein mixtures by high-accuracy peptide mass mapping and database searching. *Anal.Chem.* **69**, 4741-4750.
- Jensen, R.E. y Johnson, A.E. (1999) Is Hsp70s pulling my chain? *Current Biology* **9**, R779-R782.
- Jentoft, N. (1990) Why are proteins O-glycosylated?. *Trends Biochem.Sci.* **15**(8), 291-294.
- Jiang, B., Ram, A.F., Sheraton, J., Klis, F.M., y Bussey, H. (1995) Regulation of cell wall beta-glucan assembly: *PTC1* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. *Mol.Gen.Genet.* **248**(3), 260-269.
- Jiang, B., Sheraton, J., Ram, A.F., Dijkgraaf, G.J., Klis, F.M., y Bussey, H. (1996) *CWH41* encodes a novel endoplasmic reticulum membrane N-glycoprotein involved in beta 1,6-glucan assembly. *J.Bacteriol.* **178**(4), 1162-1171.
- Johnston, J.R. y Mortimer, R.K. (1959) Use of snail digestive juice in isolation of yeast spore tetrads. *J.Bacteriol.* **78**, 292.
- Jung, U.S. y Levin, D.E. (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol.Microbiol.* **34**(5), 1049-1057.
- Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., y 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**(13), 1559-1571.
- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Dijkgraaf, G.J., Van den Ende, H., y Klis, F.M. (1995) Covalent association of beta-1,3-glucan with beta-1,6- glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J.Bacteriol.* **177**(13), 3788-3792.

- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Dijkgraaf, G.J., y Klis, F.M. (1994) Identification of beta-1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur.J.Cell Biol.* **65**(2), 402-407.
- Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J.E., Shimoi, H., Lipke, P.N., y Klis, F.M. (1996) Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology*. **6**(3), 337-345.
- Kapteyn, J.C., Ram, A.F., Groos, E.M., Kollár, R., Montijn, R.C., Van den Ende, H., Llobell, A., Cabib, E., y Klis, F.M. (1997) Altered extent of cross-linking of beta1,6-glucosylated mannoproteins to chitin in *Saccharomyces cerevisiae* mutants with reduced cell wall beta1,3-glucan content. *J.Bacteriol.* **179**(20), 6279-6284.
- Kapteyn, J.C., Van den Ende, H., y Klis, F.M. (1999a) The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim.Biophys.Acta* **1426**(2), 373-383.
- Kapteyn, J.C., van Egmond, P., Sievi, E., Van den Ende, H., Makarow, M., y Klis, F.M. (1999b) The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6- glucan-deficient mutants. *Mol.Microbiol.* **31**(6), 1835-1844.
- Ketela, T., Green, R., y 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**(11), 3330-3340.
- Klebl, F. y Tanner, W. (1989) Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **171**(11), 6259-6264.
- Klis, F.M. (1994) Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**(7), 851-869.
- Klis, F.M., Caro, L.H.P., Vossen, J.H., Kapteyn, J.C., Ram, A.F.J., Montijn, R.C., Van Berkel, M.A.A., y Van den Ende, H. (1997) Identification and characterization of a major building block in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.Soc.Trans.* **25**, 856-860.
- Klis, F.M., Ram, A.F.J., Montijn, R.C., Kapteyn, J.C., Caro, L.H.P., Vossen, J.H., Van Berkel, M.A.A., Brekelmans, S.S.C., y Van den Ende, H. (1998) Posttranslational modifications of secretory proteins. En *Yeast gene analysis*. (Eds. Brown, A.J.P. y Tuite, M.F.) Academic Press, Londres. Cap. 13, pp. 223-238.
- Kolakowski, L.F.J., Schloesser, M., y Cooperman, B.S. (1988) Cloning, molecular characterization and chromosome localization of the inorganic pyrophosphatase (PPA) gene from *S. cerevisiae*. *Nucleic.Acids.Res.* **16**(22), 10441-10452.
- Kollár, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P.W., y Cabib, E. (1995) Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1->3)-glucan. *J.Biol.Chem.* **270**(3), 1170-1178.
- Kollár, R., Reinhold, B.B., Petrakova, E., Yeh, H.J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J.C., Klis, F.M., y Cabib, E. (1997) Architecture of the yeast cell wall. Beta(1->6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1->3)-glucan, and chitin. *J.Biol.Chem.* **272**(28), 17762-17775.
- Kopecka, M. y Gabriel, M. (1992) The influence of congo red on the cell wall and (1->3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* **158**(2), 115-126.
- Kovacech, B., Nasmyth, K., y Schuster, T. (1996) *EGT2* gene transcription is induced predominantly by Swi5 in early G1. *Mol.Cell Biol.* **16**(7), 3264-3274.
- Kuchler, K., Sterne, R.E., Thorner, J. (1989) *Saccharomyces cerevisiae STE6* gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO J.* **8**, 3973-3984.
- Kuranda, M.J. y Robbins, P.W. (1991) Chitinase is required for cell separation during growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **266**(29), 19758-19767.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 777-785.
- Larsson, T., Norbeck, J., Karlsson, H., Karlsson, K.A., y Blomberg, A. (1997) Identification of two-dimensional gel electrophoresis resolved yeast proteins by matrix-assisted laser desorption ionization mass spectrometry. *Electrophoresis* **18**(3-4), 418-423.
- Lee, B.N. y Elion, E.A. (1999) The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **96**(22), 12679-12684.

- Lee, J., Spector, D., Godon, C., Labarre, J., y Toledano, M.B. (1999) A new antioxidant with alkyl hydroperoxide defense properties in yeast. *J.Biol.Chem.* **274**(8), 4537-4544.
- Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J.E., y Brennwald, P. (1999) Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J.Cell Biol.* **146**(1), 125-140.
- Lipke, P.N. y Kurjan, J. (1992) Sexual agglutination in budding yeasts: structure, function, and regulation of adhesion glycoproteins. *Microbiol.Rev.* **56**(1), 180-194.
- Lipke, P.N. y Ovalle, R. (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J.Bacteriol.* **180**(15), 3735-3740.
- Lipke, P.N., Wojciechowicz, D., y Kurjan, J. (1989) *AGal* is the structural gene for the *Saccharomyces cerevisiae* alpha-agglutinin, a cell surface glycoprotein involved in cell-cell interactions during mating. *Mol.Cell Biol.* **9**(8), 3155-3165.
- López-Ribot, J.L. y Chaffin, W.L. (1996b) Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **178**(15), 4724-4726.
- López-Ribot, J.L., Alloush, H.M., Masten, B.J., y Chaffin, W.L. (1996a) Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infect.Immun.* **64**(8), 3333-3340.
- Lu, C.F., Kurjan, J., y Lipke, P.N. (1994) A pathway for cell wall anchorage of *Saccharomyces cerevisiae* β -agglutinin. *Mol.Cell Biol.* **14**(7), 4825-4833.
- Lu, C.F., Montijn, R.C., Brown, J.L., Klis, F., Kurjan, J., Bussey, H., y Lipke, P.N. (1995) Glycosyl phosphatidylinositol-dependent cross-linking of alpha- agglutinin and beta 1,6-glucan in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J.Cell Biol.* **128**(3), 333-340.
- Lussier, M., Sdicu, A.M., y Bussey, H. (1999) The *KTR* and *MNN1* mannosyltransferase families of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim.Biophys.Acta* **1426**, 323-334.
- Lussier, M., White, A.M., Sheraton, J., di Paolo, T., Treadwell, J., Southard, S.B., Horenstein, C.I., Chen-Weiner, J., Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C., Roemer, T.W., Vo, D.H., Bondoc, D.C., Hall, J., Zhong, W.W., Sdicu, A.M., Davies, J., Klis, F.M., Robbins, P.W., y Bussey, H. (1997) Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**, 435-450.
- Mann, M. y Wilm, M. (1994) Error-tolerant identification of peptides in sequence databases by peptide sequence tags. *Anal.Chem.* **66**(24), 4390-4399.
- Mann, M., Hojrup, P., y Roepstorff, P. (1993) Use of mass spectrometric molecular weight information to identify proteins in sequence databases. *Biol.Mass Spectrom.* **22**, 338-345.
- Martin, H., Dagkessamanskaia, A., Satchanska, G., Dallies, N., y Francois, J. (1999) *KNR4*, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* *cwh* mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes. *Microbiology* **145**(Pt 1), 249-258.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., y Molina, M. (1999) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.*, en prensa.
- Matsudaira, P. (1987) Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J.Biol.Chem.* **262**(21), 10035-10038.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B., y Foor, F. (1995) Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol.Cell Biol.* **15**(10), 5671-5681.
- Meaden, P., Hill, K., Wagner, J., Slipetz, D., Sommer, S.S., y Bussey, H. (1990) The yeast *KRE5* gene encodes a probable endoplasmic reticulum protein required for (1→6)- β -D-glucan synthesis and normal cell growth. *Mol.Cell Biol.* **10**, 3013-3019.
- Merril, C.R., Goldman, D., y Van Keuren, M.L. (1982) Simplified protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **3**, 17-21.
- Miegeville, M. y Morin, O. (1977) New scanning electron microscopy contribution to the study of yeast protoplasts. *C.R.Acad.Sci.Hebd.Seances.Acad.Sci.D.* **284**(19), 1935-1938.
- Montijn, R.C., van Rinsum, J., van Schagen, F.A., y Klis, F.M. (1994) Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J.Biol.Chem.* **269**(30), 19338-19342.

- Moukadiri, I., Armero, J., Abad, A., Sentandreu, R., y Zueco, J. (1997) Identification of a mannoprotein present in the inner layer of the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **179**(7), 2154-2162.
- Moukadiri, I., Jaafar, L., y Zueco, J. (1999) Identification of two mannoproteins released from cell walls of a *Saccharomyces cerevisiae* *mn1 mn9* double mutant by reducing agents. *J.Bacteriol.* **181**(16), 4741-4745.
- Mouyna, I., Vai, M., Fontaine, T., Monod, M., Fonzi, W.A., Diaquin, M., Popolo, L., Henrissat, B., Hartland, R.P., y Latge, J.P. (1999) The protein encoded by *GAS1* of *Saccharomyces cerevisiae* displays the same enzymatic activity as Gellp of *Aspergillus fumigatus* and correspond to a β (1-3)glucanosyltransferase. Abstract. *Curr.Genet.* **35**(3-4), p. 440.
- Mrsa, V. y Tanner, W. (1999a) Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast* **15**, 813-820.
- Mrsa, V., Ecker, M., Strahl-Bolsinger, S., Nimtz, M., Lehle, L., y Tanner, W. (1999b) Deletion of new covalently linked cell wall glycoproteins alters the electrophoretic mobility of phosphorylated wall components of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **181**(10), 3076-3086.
- Mrsa, V., Klebl, F., y Tanner, W. (1993) Purification and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *BGL2* gene product, a cell wall endo-beta-1,3-glucanase. *J.Bacteriol.* **175**(7), 2102-2106.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsh, M., y Tanner, W. (1997) Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(12), 1145-1154.
- Muller, G., Gross, E., Wied, S., y Bandlow, W. (1996) Glucose-induced sequential processing of a glycosyl- phosphatidylinositol-anchored ectoprotein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**(1), 442-456.
- Murgui, A., Elorza, M.V., y Sentandreu, R. (1985) Effect of papulacandin B and calcofluor white on the incorporation of mannoproteins in the wall of *Candida albicans* blastospores. *Biochim.Biophys.Acta* **841**, 215-222.
- Nakamura, T., Ohmoto, T., Hirata, D., Tsuchiya, E., y Miyakawa, T. (1997) Yeast Crv4/Ttp1, a predicted type II membrane protein, is involved in an event important for growth, functionally overlapping with the event regulated by calcineurin- and Mpk1-mediated pathways. *Mol.Gen.Genet.* **256**(5), 481-487.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., y von Heijne, G. (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering* **10**, 1-6.
- Norbeck, J. y Blomberg, A. (1997a) Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J.Biol.Chem.* **272**(9), 5544-5554.
- Norbeck, J. y Blomberg, A. (1997b) Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3-10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pH>7) proteins. *Yeast* **13**(16), 1519-1534.
- Nuoffer, C., Horvath, A., y Riezman, H. (1993) Analysis of the sequence requirements for glycosylphosphatidylinositol anchoring of *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein. *J.Biol.Chem.* **268**(14), 10558-10563.
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A., y Riezman, H. (1991) Determinants for glycopospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* Gas1 protein to the plasma membrane. *Mol.Cell Biol.* **11**(1), 27-37.
- O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J.Biol.Chem.* **250**(10), 4007-4021.
- Orlean, P. (1997) Biogenesis of yeast cell wall and surface components. En *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. Cell cycle and biology (Eds. Pringle, J.R.; Broach, J.R. y Jones, E.W.). Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY. Cap. 3, pp. 229-362.
- Orlean, P., Kuranda, M.J., y Albright, C.F. (1991) Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**, 682-697.

- Ovalle, R., Lim, S.T., Holder, B., Jue, C.K., Moore, C.W., y Lipke, P.N. (1998) A spheroplast rate assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* **14**, 1159-1166.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y., y Takai, Y. (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**(9), 2196-2207.
- Pancholi, V. y Fischetti, V.A. (1992) A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J.Exp.Med.* **176**(2), 415-426.
- Pardo, M., Ward, M., Pitarch, A., Sánchez, M., Nombela, C., Blackstock, W.P., y Gil, C. (1999) Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of 2D-PAGE and mass spectrometry. *Electrophoresis*, enviado para su publicación.
- Patterson, S.D. (1998) Protein identification and characterization by mass spectrometry. En *Current protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., N.Y. Cap. 10.22.
- Patterson, S.D. y Aebersold, R. (1995) Mass spectrometric approaches for the identification of gel-separated proteins. *Electrophoresis* **16**, 1791-1814.
- Pendrak, M.L. y Klotz, S.A. (1995) Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol.Lett.* **129**(2-3), 103-113.
- Percival-Smith, A. y Segall, I. (1987) Increased copy number of the 5' end of the *SPS2* gene inhibits sporulation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **7**, 2484-2490.
- Perrot, M., Sagliocco, F., Mini, T., Monribot, C., Schneider, U., Shevchenko, A., Mann, M., Jenö, P., y Boucherie, H. (1999) Two-dimensional gel protein database of *Saccharomyces cerevisiae* (update 1999). *Electrophoresis* **20**(11), 2280-2298.
- Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R., y Bender, A. (1994) Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J.Cell Biol.* **127**, 1395-1406.
- Philips, J. y Herskowitz, I. (1998) Identification of Kellp, a kelch domain-containing protein involved in cell fusion and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **143**(2), 375-389.
- Pitarch, A., Pardo, M., Jimenez, A., Pla, J., Gil, C., Sánchez, M., y Nombela, C. (1999) Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis* **20**(4-5), 1001-1010.
- Popolo, L. y Vai, M. (1999b) The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim.Biophys.Acta* **1426**(2), 385-400.
- Popolo, L., Ferrario, L., Turchini, A., y Vai, M. (1999a) The Gas1 glycoprotein of *Saccharomyces cerevisiae*: A model for the molecular analysis of the role of Gas family in the biogenesis of the cell wall. Abstract. *Human fungal pathogens. Fungal dimorphism and disease. European Research Conferences*. Granada, España.
- Popolo, L., Gilardelli, D., Bonfante, P., y Vai, M. (1997) Increase in chitin as an essential response to defects in assembly of cell wall polymers in the *ggp1Δ* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **179**(2), 463-469.
- Popolo, L., Grandori, R., Vai, M., Lacana, E., y Alberghina, L. (1988) Immunochemical characterization of gp115, a yeast glycoprotein modulated by the cell cycle. *Eur.J.Cell Biol.* **47**(2), 173-180.
- Pringle, J.R., Adams, A.E.M., Drubin, D.G., y Haarer, B.K. (1991) Immunofluorescence methods for yeast. En *Guide to yeast genetics and molecular biology*. (Eds. Guthrie, C. y Fink, G.R.) Academic Press, Inc., Londres. pp. 565-602.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., y Ohya, Y. (1996) Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**(5259), 279-281.
- Ram, A.F., Brekelmans, S.S., Oehlen, L.J., y Klis, F.M. (1995) Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3- glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**(2), 165-170.
- Ram, A.F., Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Caro, L.H., Douwes, J.E., Baginsky, W., Mazur, P., Van den Ende, H., y Klis, F.M. (1998a) Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p

- in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of beta1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *J.Bacteriol.* **180**(6), 1418-1424.
- Ram, A.F., Van den Ende, H., y Klis, F.M. (1998b) Green fluorescent protein-cell wall fusion proteins are covalently incorporated into the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.* **162**(2), 249-255.
- Ram, A.F., Wolters, A., Ten Hoopen, R., y 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.
- Ram, A.F.J., Kapteyn, J.C., Montijn, R.C., Douwes, J.E., Caro, L.H.P., Mazur, P., y Klis, F. (1996) Pleiotropic effects due to the loss of the major GPI anchored plasma membrane protein (Gas1p/Cwh52p) in yeast. A possible role for Gas1p in cell wall construction. En *Isolation and characterization of Calcofluor White hypersensitive mutants involved in the synthesis of β -glucan in Saccharomyces cerevisiae*. Tesis Doctoral. Cap. 4.
- Ramírez, M., Muñoz, M.D., y Larriba, G. (1989) The major yeast exoglucanase: an extracellular glycoprotein lacking the carbohydrate outer chain. *Biochim.Biophys.Acta* **990**(2), 206-210.
- Rasmussen, H.H., Orntoft, T.F., Wolf, H., y Celis, J.E. (1996) Towards a comprehensive database of proteins from the urine of patients with bladder cancer. *J.Urol.* **155**, 2113-2119.
- Rayner, J.C. y Munro, S. (1998) Identification of the MNN2 and MNN5 mannosyltransferases required for forming and extending the mannose branches of the outer chain mannans of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**(41), 26836-26843.
- Reddy, V.A., Johnson, R.S., Biemann, K., Williams, R.S., Ziegler, F.D., Trimble, R.B., y Maley, F. (1988) Characterization of the glycosylation sites in yeast external invertase. I. N-linked oligosaccharide content of the individual sequons. *J.Biol.Chem.* **263**(15), 6978-6985.
- Righetti, P.G. y Bossi, A. (1997) Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: an update. *J.Chromatogr.B.Biomed.Sci.Appl.* **699**(1-2), 77-89.
- Roberg, K.J., Bickel, S., Rowley, N., y Kaiser, C.A. (1997) Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by *SEC13*, *LST4*, *LST7* and *LST8*. *Genetics* **147**(4), 1569-1584.
- Roberts, R.L., Mösch, H.U., y Fink, G.R. (1997) 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**, 1055-1065.
- Roemer, T. y Bussey, H. (1991) Yeast beta-glucan synthesis: *KRE6* encodes a predicted type II membrane protein required for glucan synthesis in vivo and for glucan synthase activity in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **88**(24), 11295-11299.
- Roemer, T., Delaney, S., y Bussey, H. (1993) *SKN1* and *KRE6* define a pair of functional homologs encoding putative membrane proteins involved in beta-glucan synthesis. *Mol.Cell Biol.* **13**(7), 4039-4048.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M.A., y Bussey, H. (1994) Characterization of the yeast (1 $\rightarrow$ 6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the *PKC1* pathway and extracellular matrix assembly. *J.Cell Biol.* **127**(2), 567-579.
- Roepstorff, P. (1997) Mass spectrometry in protein studies from genome to function. *Curr.Opin.Biotech.* **8**, 6-13.
- Romero, P.A., Dijkgraaf, G.J., Shahinian, S., Herscovics, A., y Bussey, H. (1997) The yeast *CWH41* gene encodes glucosidase I. *Glycobiology.* **7**(7), 997-1004.
- Roncero, C. y Durán, A. (1985) Effect of Calcofluor White and Congo Red on fungal cell wall morphogenesis: In vivo activation of chitin polymerization. *J.Bacteriol.* **163**(3), 1180-1185.
- Rothstein, R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202-211.
- Roy, A., Lu, C.F., Marykwas, D.L., Lipke, P.N., y Kurjan, J. (1991) The *AGA1* product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol.Cell Biol.* **11**(8), 4196-4206.
- Rubartelli, A. y Sitia, R. (1991) Interleukin-1 β and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion. *Biochem.Soc.Trans.* **19**, 255-259.
- Ruiz, C., Cid, V.J., Lussier, M., Molina, M., y Nombela, C. (1999) A large-scale sonication assay for cell wall mutant analysis in yeast. *Yeast* **15**, 1001-1008.

- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J., y Makarow, M. (1992) A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein [errata publicada en *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992, Sep 15;89(18):8857]. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 89(9), 3671-3675.
- Sagliocco, F., Guillemot, J.C., Monribot, C., Capdevielle, J., Perrot, M., Ferran, E., Ferrara, P., y Boucherie, H. (1996) Identification of proteins of the yeast protein map using genetically manipulated strains and peptide-mass fingerprinting. *Yeast* 12(15), 1519-1533.
- Salama, N.R., Chuang, J.S., y Schekman, R.W. (1997) *SEC31* encodes an essential component of the COPII coat required for transport vesicle budding from the endoplasmic reticulum. *Mol.Biol.Cell* 8(2), 205-217.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., y Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Sánchez, J.C., Golaz, O., Frutiger, S., Schaller, D., Appel, R.D., Bairoch, A., Hughes, G.J., y Hochstrasser, D.F. (1996) The yeast SWISS-2DPAGE database. *Electrophoresis* 17(3), 556-565.
- Sánchez, J.C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M.R., y Hochstrasser, D.F. (1997) Improved and simplified in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18(3-4), 324-327.
- Sánchez-Campillo, M., Bini, L., Comanducci, M., Raggiaschi, R., Marzocchi, B., Pallini, V., y Ratti, G. (1999) Identification of immunoreactive proteins of *Chlamydia trachomatis* by Western blot analysis of a two-dimensional electrophoresis map with patient sera. *Electrophoresis* 20(11), 2269-2279.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., y Hall, M.N. (1997) The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531-542.
- Schneider, R., Brugger, B., Sandhoff, R., Zellnig, G., Leber, A., Lampl, M., Athenstaedt, K., Hrstnik, C., Eder, S., Daum, G., Paltauf, F., Wieland, F.T., y Kohlwein, S.D. (1999) Electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-MS/MS) analysis of the lipid molecular species composition of yeast subcellular membranes reveals acyl chain-based sorting/remodeling of distinct molecular species en route to the plasma membrane. *J.Cell Biol.* 146(4), 741-754.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G.J., Sdicu, A.M., Thomas, D.Y., Jakob, C.A., Aebi, M., y Bussey, H. (1998) Involvement of protein *N*-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 149(2), 843-856.
- Shevchenko, A., Jensen, O.N., Podtelejnikov, A.V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H., y Mann, M. (1996a) Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93(25), 14440-14445.
- Shevchenko, A., Wilm, M., Vorm, O. y Mann, M. (1996b) Mass spectrometric sequencing of proteins from silver-stained polyacrylamide gels. *Anal.Chem.* 68, 850-858.
- Shevchenko, A., Wilm, M., y Mann, M. (1997) Peptide sequencing by mass spectrometry for homology searches and cloning of genes. *J.Prot.Chem.* 16(5), 481-490.
- Smith, T.F., Gaitatzes, C., Saxena, K., y Neer, E.J. (1999) The WD repeat: a common architecture for diverse functions. *Trends Biochem.Sci.* 24(5), 181-185.
- Smits, G.J., Kapteyn, J.C., Van den Ende, H., y Klis, F.M. (1999a) Cell wall dynamics in yeast. *Curr.Opin.Microbiol.* 2(4), 348-352.
- Smits, G.J., Kedde, M.J., Ram, A.F.J., y Klis, F.M. (1999b) Cell cycle dependent expression of a cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* es sufficient for its asymmetric incorporation in the wall. Abstract. *Meeting on Yeast Cell Biology*, Cold Spring Harbor, NY. p. 23.
- Sondek, J., Böhm, A., Lambright, D.G., Hamm, H.E., y Sigler, P.B. (1996) Crystal structure of a G-protein beta gamma dimer at 2.1 Å resolution. *Nature* 379(6563), 369-374.
- Spellman, P.T., Sherlock, G., Zhang, M.Q., Iyer, V.R., Anders, K., Eisen, M.B., Brown, P.O., Botstein, D., y Futcher, B. (1998) Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol.Biol.Cell* 9, 3273-3297.

- Sutterlin, C., Doering, T.L., Schimmoller, F., Schroder, S., y Riezman, H. (1997) Specific requirements for the ER to Golgi transport of GPI-anchored proteins in yeast. *J.Cell Sci.* **110**, 2703-2714.
- Terashima, H., Yabuki, N., Fukuchi, S., Hamada, K., Arisawa, M., y Kitada, K. (1999) Yeast genes induced by defects of the glucan biosynthesis. Abstract. *Curr.Genet.* **35**(3-4), p. 444.
- The *C. elegans* Sequencing Consortium (1998) Genome sequence of the nematode *C. elegans*: a platform for investigating biology. [errata publicada en *Science* (1999) Jan 1;283(5398):35 and (1999) Mar 26;283(5410):2103]. *Science* **282**(5396), 2012-2018.
- Tiedt, L.R., Jooste, W.R., y Hamilton-Attwell, W.L. (1987) Technique for preserving aerial fungus structure for scanning electron microscopy. *Trans.British Mycology* **88**, 420-422.
- Tkacz, J.S. (1984) *In vivo* synthesis of β -1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. En *Microbial cell wall synthesis and autolysis* (Eds. Nombela, C.). Elsevier, Amsterdam. pp. 287-295.
- Toh-E, A., Yasunaga, S., Nisogi, H., Tanaka, K., Oguchi, T., y Matsui, Y. (1993) Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast* **9**, 481-494.
- Towbin, H., Staehelin, T., y Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* **76**, 4350-4354.
- Turi, T.G., Webster, P., y Rose, J.K. (1994) Brefeldin A sensitivity and resistance in *Schizosaccharomyces pombe*. Isolation of multiple genes conferring resistance. *J.Biol.Chem.* **269**(39), 24229-24236.
- Valdés, I., Pitarch, A., Gil, C., Bermúdez, A., Llorente, M., Nombela, C. y Méndez, E. A novel procedure for identification of proteins by mass fingerprinting combining two-dimensional electrophoresis with fluorescent SYPRO Red staining. *Journal of Mass Spectrometry*, enviado para su publicación.
- Valentín, E., Herrero, E., Pastor, J.F.I., y Sentandreu, R. (1984) Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* **130**, 1419-1428.
- Van der Vaart, J.M., Caro, L.H., Chapman, J.W., Klis, F.M., y Verrips, C.T. (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **177**(11), 3104-3110.
- Van der Vaart, J.M., te Biesebeke, R., Chapman, J.W., Klis, F.M., y Verrips, C.T. (1996a) The beta-1,6-glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* is bound to the glycan core of the GPI moiety. *FEMS Microbiol.Lett.* **145**(3), 401-407.
- Van der Vaart, J.M., van Schagen, F.S., Mooren, A.T., Chapman, J.W., Klis, F.M., y Verrips, C.T. (1996b) The retention mechanism of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. Wall-bound Cwp2p is beta-1,6-glucosylated. *Biochim.Biophys.Acta* **1291**(3), 206-214.
- Vázquez de Aldana, C.R., Correa, J., San Segundo, P., Bueno, A., Nebreda, A.R., Méndez, E., y del Rey, F. (1991) Nucleotide sequence of the exo-1,3-beta-glucanase-encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **97**(2), 173-182.
- Vázquez, P. (1999) Caracterización del gen YBR078w de *Saccharomyces cerevisiae* implicado en la integridad celular. Tesina de Licenciatura.
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., y 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**(25), 13804-13809.
- Von Heijne, G. (1986) A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic.Acids.Res.* **14**(11), 4683-4690.
- Vossen, J.H., Muller, W.H., Lipke, P.N., y Klis, F.M. (1997) Restrictive glycosylphosphatidylinositol anchor synthesis in *cwh6/gpi3* yeast cells causes aberrant biogenesis of cell wall proteins. *J.Bacteriol.* **179**(7), 2202-2209.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., y Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-band gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808.
- Wall, M.A., Coleman, D.E., Lee, E., Iniguez-Lluhi, J.A., Posner, B.A., Gilman, A.G., y Sprang, S.R. (1995) The structure of the G protein heterotrimer Gi alpha 1 beta 1 gamma 2. *Cell* **83**(6), 1047-1058.

- Wasinger, V.C., Cordwell, S.J., Cerpa-Poljak, A., Yan, J.X., Gooley, A.A., Wilkins, M.R., Duncan, M.W., Harris, R., Williams, K.L., y Humphery-Smith, I. (1995) Progress with gene-product mapping of the Mollicutes: *Mycoplasma genitalium*. *Electrophoresis* **16**(7), 1090-1094.
- Watanabe, Y., Irie, K., y Matsumoto, K. (1995) Yeast *RLM1* encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.* **15**, 5740-5749.
- Wilkins, M.R., Pasquali, C., Appel, R.D., Ou, K., Golaz, O., Sánchez, J.C., Yan, J.X., Gooley, A.A., Hughes, G.J., Humphery-Smith, I., Williams, K.L., y Hochstrasser, D.F. (1996) From proteins to proteomes. Large-scale protein identification by two-dimensional electrophoresis and amino acid analysis. *Bio/Technology* **14**, 61-65.
- Wilkins, M.R., Williams, K.L., Appel, R.D., y Hochstrasser, D.F. (1997) *Proteome research: new frontiers in functional genomics*. Springer-Verlag, Berlin.
- Williams, K.L. (1999) Genomes and proteomes: towards a multidimensional view of biology. *Electrophoresis* **20**(4-5), 678-688.
- Williams, S. y Veldkamp, C. (1974) Preparation of fungi for scanning electron microscopy. *Trans. British Mycology* **63**, 409-412.
- Wilm, M., Shevchenko, A., Houthaeve, T., Breit, S., Schweigerer, L., Fotsis, T., y Mann, M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* **379**(6564), 466-469.
- Winston, F., Dollard, C., y Ricupero-Hovasse, S.L. (1995) Construction of a set of convenient *Saccharomyces cerevisiae* strains that are isogenic to S288C. *Yeast* **11**, 53-55.
- Xia, G., Ramachandran, S., Hong, Y., Chan, Y.S., Simanis, V., y Chua, N.H. (1996) Identification of plant cytoskeletal, cell cycle-related and polarity-related proteins using *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant J.* **10**(4), 761-769.
- Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Kasahara, S., Furuichi, Y., Nakajima, T., Ichishima, E., Arisawa, M., y Yamada-Okabe, H. (1996) *HKR1* encodes a cell surface protein that regulates both cell wall beta-glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**(2), 477-483.
- Yanisch-Perron, C., Vieira, J., y Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**(1), 103-119.
- Young, D.S. y Tracy, R.P. (1995) Clinical applications of two-dimensional electrophoresis. *J. Chromatogr. A.* **698**, 163-179.
- Yun, D.-J., Zhao, Y., Pardo, J.M., Narasimhan, M.L., Damsz, B., Lee, H., Abad, L.R., Paino D'Urzo, M., Hasegawa, P.M., y Bressan, R.A. (1997) Stress proteins on the yeast cell surface determine resistance to osmotin, a plant antifungal protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 7082-7087.
- Zerr, I., Bodemer, M., Otto, M., Poser, S., Windl, O., Kretzschmar, H.A., Gefeller, O., y Weber, T. (1996) Diagnosis of Creutzfeldt-Jacob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. *Lancet* **348**, 846-849.
- Zhao, C., Jung, U.S., Garrett-Engle, P., Roe, T., Cyert, M.S., y 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**(2), 1013-1022.

ANEXO

ANEXO

El trabajo realizado durante el transcurso de esta Tesis Doctoral ha sido incluido en las siguientes publicaciones:

Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sánchez, M., Gil, C., y Nombela, C. (1999) Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast* **15**(6), 459-472.

Pitarch, A., Pardo, M., Jiménez, A., Pla, J., Gil, C., Sánchez, M., y Nombela, C. (1999) Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins. *Electrophoresis* **20**(4-5), 1001-1010.

Pardo, M., Ward, M., Pitarch, A., Sánchez, M., Nombela, C., Blackstock, W.P., y Gil, C. Cross-species identification of novel *Candida albicans* immunogenic proteins by combination of 2D-PAGE and mass spectrometry. *Electrophoresis*, enviado para su publicación.

Two-Dimensional Analysis of Proteins Secreted by *Saccharomyces cerevisiae* Regenerating Protoplasts: A Novel Approach to Study the Cell Wall

MERCEDES PARDO, LUCÍA MONTEOLIVA, JESÚS PLA, MIGUEL SÁNCHEZ, CONCHA GIL* AND CÉSAR NOMBELA

Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae* incubated in regenerating conditions secrete cell wall components in order to allow the biosynthesis of this structure. During the first hours of incubation, many of these are not retained in the forming cell wall but remain in the medium. We have developed a method for collecting the secreted proteins and have analysed these by two-dimensional electrophoresis to obtain a reference map of putative cell wall proteins. Several proteins were identified by microsequencing or immunoblotting; namely, cell wall hydrolytic enzymes, heat shock proteins, glycolytic enzymes and others. Some β -1,3- and β -1,6-glucosylation was detected in the proteins secreted by regenerating protoplasts. Copyright © 1999 John Wiley & Sons, Ltd.

KEY WORDS — cell wall; 2D-PAGE; protoplasts

INTRODUCTION

Fungal cell walls are rigid structures required for maintaining cellular shape and integrity by protecting cells against osmotic changes in the environment. They also act as filters, permitting the passage of some molecules while excluding others. The cell wall is not an inert structure and undergoes profound changes as a consequence of processes such as budding, apical extension of hypha, dimorphic transitions and mating. The details of wall composition are known for many species but aspects such as the assembly and interaction of individual components involved in the generation of wall architecture are more difficult to establish. Since this structure is not present in higher eukaryotes, a better understanding of its generation could lead to the development of new selective antifungal drugs.

*Correspondence to: C. Gil, Dpto. de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain. Tel: 34 1 394 17 44/48; fax: 34 1 394 17 45; e-mail: gilmifa@euemax.sim.ucm.es.

Contract/grant sponsor: EUROFAN Programme of the EC. Contract/grant sponsor: CICYT, Spain; Contract/grant number: BIO95-0303.

Contract/grant sponsor: Ministerio de Educación y Ciencia, Spain (Fellowship).

The yeast *Saccharomyces cerevisiae* has been the major experimental model used to address cell wall structure and organization. The main components of its cell wall are mannoproteins and β -linked glucans; some chitin is also present (reviewed in Cid *et al.*, 1995; Klis, 1994; Orlean *et al.*, 1997). Synthesis of *S. cerevisiae* cell wall components could take place in two steps. First, chitin and β -1,3-glucan are synthesized by plasma membrane-bound enzyme complexes through a vectorial process in which the formed chains are extruded through the plasma membrane (Cabib *et al.*, 1987, 1982; Douglas *et al.*, 1994; Mol *et al.*, 1994). Mannoproteins are synthesized and secreted through the secretory pathway. Part of β -1,6-glucan synthesis may take place in the endoplasmic reticulum or Golgi (Roemer *et al.*, 1994; Shahinian *et al.*, 1998). Following this, all these components would then interact and assemble to form a functional cell wall.

Mannoproteins can be divided into two groups according to the method used for their extraction from the cell wall; those extractable with sodium dodecyl sulphate (SDS) (Valentin *et al.*, 1984), which are loosely associated with the cell wall, and covalently-linked mannoproteins, which are solubilized by mild alkali treatment (Mrsa *et al.*,

1997), reducing agents such as dithiothreitol or β -mercaptoethanol (Lopez-Ribot *et al.*, 1996a) or glucanase digestion of the glucan layer (Montijn *et al.*, 1994; Valentin *et al.*, 1984). The glucanase-extractable mannoproteins have three characteristics in common: (a) their sequence shows a signal peptide at the N-terminus; (b) they are rich in serine and/or threonine; and (c) they have a putative glycosyl phosphatidyl-inositol (GPI) attachment signal (Van der Vaart *et al.*, 1996). A few of these glucanase-extractable mannoproteins have been identified and several are involved in cell surface phenomena. In yeasts, GPI-anchored proteins are also components of the plasma membrane (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998). It has been speculated that the GPI-anchorage of some proteins to the membrane might represent an intermediate stage after which cross-linking with other cell wall components is finally achieved (de Nobel and Lipke, 1994). Recently, it has been shown that some cell wall proteins form a complex with β -1,3-glucan through a β -1,6-glucan moiety and that the attachment to this β -1,3/ β -1,6-glucan heteropolymer, probably through a GPI remnant, is responsible for anchoring cell wall proteins (Kapteyn *et al.*, 1996; Kollár *et al.*, 1997). β -1,3-glucan is also covalently bound to chitin in the cell wall (Hartland *et al.*, 1994; Kollár *et al.*, 1995). With the complete genome of *S. cerevisiae* sequenced (Goffeau, 1996), more than 50 putative cell surface proteins containing a potential GPI-attachment signal have been identified (Caro *et al.*, 1997; Hamada *et al.*, 1998).

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE) appears to be a very useful tool for the analysis of complex mixtures of proteins. This technique, originally described by O'Farrell (1975), separates proteins on the basis of their differences in isoelectric point (pI) in the first dimension and apparent molecular mass in the second dimension. This methodology has been greatly improved during the last few years. The introduction of commercially manufactured immobilized pH gradients (IPGs) has rendered this technique highly reproducible and therefore allows interlaboratory comparison (Wilkins *et al.*, 1997). 2D gels of *S. cerevisiae* cellular extracts separate several hundred proteins. Different groups are now systematically identifying the yeast extract proteins separated by 2D-PAGE (Bataille *et al.*, 1987; Boucherie *et al.*, 1995; Garrels *et al.*, 1994, 1997; Maillet *et al.*, 1996; Norbeck and Blomberg, 1995; Sagliocco *et al.*, 1996; Sanchez *et al.*, 1996;

Shevchenko *et al.*, 1996). Protein identification is achieved by antibody staining, comparison of two-dimensional gel positions, Edman degradation, the use of genetically manipulated strains, amino acid composition and, recently, mass spectrometry. This technique thus affords an overall and integrated view of the expression of a large number of genes of the yeast genome.

One strategy for studying the *de novo* generation of yeast cell wall is to completely eliminate the wall by enzymatic digestion in an isotonic medium and then allow the expression of genes involved in cell wall regeneration (Klis, 1994). Under these conditions, many proteins are secreted into the medium. These would comprise not only structural proteins but also remodelling and probably cross-linking enzymes. In this paper we describe a method for obtaining proteins secreted from cells in active cell wall regeneration. These proteins were analysed by 2D-PAGE, a reference map was obtained, and some proteins were identified. The map should serve as a picture of the genes expressed to contribute to cell wall synthesis.

MATERIALS AND METHODS

Sample preparation

Strain S288C (*Mata SUC2 mal mel gal2 CUP1*) was used because it is the reference strain for genome sequencing. Cells were grown in 500 ml of YPD medium (Ausubel *et al.*, 1995) at 28°C to an optical density of 4 at 600 nm, harvested and washed once with water. Cells ($1-2 \times 10^9$ cells/ml) were incubated in a pre-treatment solution (10 mM HCl Tris, pH 9, 5 mM EDTA, 1% v/v 2-mercaptoethanol) at 28°C with shaking at 80 rpm for 30 min. After washing with 1 M sorbitol they were resuspended in 1 M sorbitol to a density of 5×10^8 cells/ml. 30 μ l/ml Glusulase[®] (Du Pont) was added. Cells were incubated with very gentle shaking until more than 90% were protoplasts (Gil *et al.*, 1988), which were then pelleted by gentle centrifugation ($600 \times g$). Protoplasts were washed three times with 1 M sorbitol by gently swirling liquid across surface of pellet, to eliminate any trace of Glusulase[®]. Protoplast regeneration was induced in complete minimal medium (Ausubel *et al.*, 1995) containing 1 M sorbitol at 28°C, with very gentle shaking. After a 2 h incubation, cells were pelleted at $600 \times g$ and the medium was filtered without any external device through a 0.22 μ m pore-size nitrocellulose filter (Millipore)

after the addition of protease inhibitors (0.1 mM phenyl methyl sulphonate fluoride [PMSF; Fluka], 2 µg/ml leupeptin and antipain, and 1 µg/ml pepstatin A [Sigma]). The medium was concentrated by ultrafiltration using a pore-size of 10 000 Da (Diaflo[®], Amicon), diluted with water, concentrated a further three times and lyophilized. Cell lysis was controlled by quantitative determination of alkaline phosphatase (Cabib and Duran, 1975). Protein quantitation was performed by the Bradford assay (Bradford, 1976).

Scanning electron microscopy

Cells were prepared as described elsewhere (Tiedt *et al.*, 1987; Williams and Veldkamp, 1974), with slight modifications. Log-phase cells in YPD medium, fresh protoplasts in osmotic stabilizer and regenerating protoplasts in liquid regeneration medium were fixed with 5% glutaraldehyde in 0.2 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at room temperature for 90 min. After fixation, cells were washed with 1 M sorbitol and dehydrated in a graded ethanol series. Ethanol was replaced by pure CO₂ and samples were coated with gold. Samples were examined and photographed under a JEOL JSM-6400 scanning electron microscope, belonging to the 'Centro de Microscopía Electrónica Luis Bru' at the Universidad Complutense de Madrid.

Analytical 2D-PAGE

Two-dimensional electrophoresis was performed using an immobilized pH gradient (IPG) system, as described by Bjellqvist *et al.* (1993). Immobililine Dry Strips (pH 3–10 NL, 18 cm long, Pharmacia) were rehydrated overnight in 8 M urea, 2% w/v 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), 10 mM dithioerythritol (DTE), 0.8% v/v Resolytes (Pharmalyte pH 3–10, Pharmacia) and a trace of bromophenol blue. Lyophilized samples (ca. 200 µg) were resuspended in sample buffer (8 M urea, 4% w/v CHAPS, 40 mM Tris, 65 mM DTE, bromophenol blue) and loaded for the first dimension. Isoelectric focusing was carried out in a Multiphor II Electrophoresis unit (Pharmacia) at 15°C with the following programme: 0 to 500 V in 1 min, 500 V for 5 h, 500 to 3500 V in 5 h, and 3500 V for 12.5 h (total 56 250 Vh).

After focusing, IPG strips were equilibrated for 12 min in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 2% w/v DTE, and for

5 min in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 2.5% w/v iodoacetamide, and were loaded onto a polyacrylamide slab gel with a 0.5% w/v agarose solution in Laemmli buffer (Laemmli, 1970). The second-dimensional run (SDS-PAGE) was carried out on homogeneous running gels (10% T) without a stacking gel. Piperazine diacrylamide (1.6% C) was used as cross-linker. SDS-PAGE was conducted at 40 mA/gel constant current for 6 h in a Protean II cell (Bio-Rad). Analytical gels were silver-stained according to Merrill *et al.* (1982) with the Bio-Rad Silver Stain Kit.

Electrophoretogram images were obtained with the GS-690 Imaging Densitometer and processed with the MELANIE II software (Bio-Rad). Mr and pI values were estimated using internal 2D SDS-PAGE standards (Bio-Rad).

Micropreparative 2D-PAGE

Sample application was done on the entire IPG gel during its rehydration, as proposed by Sánchez *et al.* (1997). The sample (0.5–1 mg) was mixed with 500 µl of a solution containing 8 M urea, 4% w/v CHAPS, 65 mM DTE and 0.8% v/v Resolytes (Pharmalyte pH 3–10, Pharmacia), and layed into the grooves of a reswelling chamber specially built for the purpose. Gels were applied upside-down onto it and covered with paraffin oil. Reswelling was accomplished over 6 h. Focusing was carried out according to the above programme, extending the last phase to give a total of 126 kVh. If the second dimension was not to be run immediately after focusing, IPG strips were kept at –70°C. The second-dimensional run was performed at 60 V constant voltage overnight.

Protein microsequencing

After micropreparative 2D-PAGE, the gels were soaked in MilliQ water for 3 min and equilibrated in transfer buffer (10 mM 3-[cyclohexylamino]-1-propanesulphonic acid [CAPS], pH 11, 10% v/v methanol). Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes (0.2 µm pore-size, Bio-Rad) were equilibrated in transfer buffer for 15 min. Blotting was carried out in a semi-dry trans-blot cell (Bio-Rad). 0.1% w/v SDS was added onto the sandwich to facilitate transfer. Conditions used were 0.68 A current limit, 15 V, 1 h.

After transfer, membranes were rinsed with MilliQ water and stained with 0.1% w/v Coomassie blue R-250 in 50% v/v methanol for 5 min.

Destaining was achieved in 50% v/v methanol for 15 min, after which the membranes were rinsed with MilliQ water and air-dried. Membranes were kept at -20°C .

Protein spots were excised and subjected to Edman degradation using a Beckman LF 3000 Sequencer connected to a phenylthiohydantoin-amino acid analyser (System Gold, Beckman). Searches for identity between microsequencing data and protein sequences were performed with BLAST on the *Saccharomyces* Genome Database.

Immunoblot analysis

Cell extracts were prepared as follows: log-phase cells were harvested, and washed with ice-cold water. Cells were disrupted with glass beads in 200 μl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM dithiothreitol (DTT), 0.5 mM PMSF and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of leupeptin, pepstatin and antipain) by vortexing. After the beads had settled, the broken-cell suspension was transferred to other tubes and centrifuged for 15 min at 13 000 rpm. Supernatants were again transferred to other tubes and recentrifuged. The supernatants were kept at -20°C .

After the samples had been subjected to analytical 2D-PAGE or SDS-PAGE, gels were electroblotted onto PVDF or nitrocellulose membranes in Towbin buffer at 50 mA overnight (Towbin *et al.*, 1979). Blots were processed following standard protocols (Ausubel *et al.*, 1995). In some cases (Cwp1p, β -1,3-glucan) filters were treated with 50 mM periodate, 100 mM sodium acetate, pH 4.5, for 30 min before blocking (Montijn *et al.*, 1994). Polyclonal antibodies against several yeast ribosomal proteins (dilution 1:1000), Ssa1-2p (dilution 1:600), Ssb1-2p (dilution 1:600), Exg1p (dilution 1:10 000), Hkr1p (dilution 1:200), Kre9p (dilution 1:1000), Flo1p (dilution 1:3000), Sec14p (dilution 1:1600), Gas1p (dilution 1:3000), β -1,6-glucan (dilution 1:5000) and β -1,3-glucan (dilution 1:75 000) were used. Immunoreactive spots were detected using horseradish peroxidase-labelled anti-rabbit IgGs and an enhanced chemiluminescence detection system (ECL, Amersham).

Genetic constructions and molecular biology techniques

Molecular biology techniques were carried out using standard protocols (Ausubel *et al.*, 1995). Fusion proteins were constructed in the following way. First, two pairs of oligonucleotides,

UP-ENO/LO-ENO and UP-FBA1/LO-FBA1, that amplified the promoter region and the entire ORF without the stop codon of *S. cerevisiae* ENO2 and FBA1 genes, respectively, were designed (UP-ENO: CTGGATCCGCTGATTGAATACA TTAGC/LO-ENO: AGGGATCCTTGTCACCG TGGTGAAG and UP-FBA1: TGGGATCCG AATAACAATACTGACA/LO-FBA1: ACAGAT CTAAAGTGTTAGTGGTACG). PCR amplification with *S. cerevisiae* S288C genomic DNA as template rendered ENO2 and FBA1 genes flanked by BamHI–BamHI or BamHI–BglII restriction sites, respectively. These PCR products were ligated with pGEM[®]-T vector (Promega) to yield pGENO and pGFBA1 plasmids. The BamHI–BamHI fragment carrying ENO2 was excised from pGENO as well as the BamHI–BglII fragment comprising FBA1 was obtained from pGFBA1. Both of them were subcloned into the BglII site of plasmid pSC1 (a centromeric YCplac33 derivative which contains a *S. cerevisiae* *suc2* allele that lacks its signal sequence as well as the initiator methionine after a BglII restriction site) to obtain pENO2S and pFBA1S plasmids.

Yeast transformation and growth

Plasmids containing fusion constructs were transformed in *S. cerevisiae* SS10 (*MATa suc2 Δ 9 ura3-52 leu2-3, –112*) by the lithium acetate method (Ito *et al.*, 1983). Transformants were selected by growth on SD minimal medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 2% glucose) supplemented with the appropriate amino acids, transferred to solid sucrose medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% sucrose, 2% agar, 1 μg of antimycin A per ml) and grown at 28°C .

RESULTS

Collection and analysis of proteins secreted by regenerating protoplasts

Our approach to studying the cell wall proteins of *S. cerevisiae* was based on the analysis of proteins secreted by regenerating protoplasts. Initially, regenerating protoplasts secrete many of their cell wall components into the medium. These include structural proteins, remodelling and probably cross-linking enzymes. We have set up a method to obtain the proteins secreted by regenerating protoplasts under suitable conditions for analysis and identification. Cells were treated

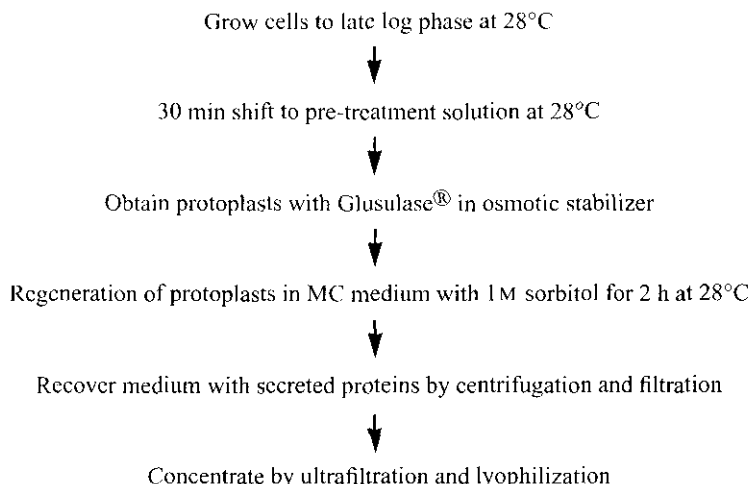


Figure 1. Protocol for collecting proteins secreted by regenerating protoplasts of *S. cerevisiae*.

with Glusulase[®] to obtain more than 90% protoplasts, and these were incubated in regenerating conditions for 2 h to allow the secretion of putative cell wall components. After this time, the medium was recovered and diluted several times to eliminate sorbitol. Samples were then concentrated by ultrafiltration and lyophilization (Figure 1). Cell lysis was controlled by: (a) quantitative determination of alkaline phosphatase, being this enzyme undetectable in the samples analysed; and (b) Western blot analysis using antibodies against yeast ribosomal proteins and Sec14p, a soluble cytoplasmic protein which has previously been used as control for cell lysis (Cleves *et al.*, 1996). Several dilutions of a cell extract (Figure 2, lanes 1–8), together with different amounts of proteins secreted by protoplasts (Figure 2, lanes A and B) were electrophoresed and immunodetected with anti-Sec14p antibodies. Computer-assisted comparison (Molecular Analyst software, Bio-Rad) showed that the intensity of bands in lanes A and

B (Figure 2) corresponded to 1.2×10^6 and 6.25×10^5 broken cells, respectively. Taking into account the amount of protein loaded, the total amount of protein secreted and the total number of protoplasts used, the percentage of cell lysis was estimated. This experiment allowed us to conclude that cell lysis in the samples of proteins secreted by protoplasts prepared as described above, and thus contamination by intracellular proteins, was less than 0.1%. Similar results were obtained when antibodies against yeast ribosomal proteins were used (data not shown). Furthermore, Sec14p could not be detected on a two-dimensional immunoblot of protoplast-secreted proteins (data not shown).

Fresh and regenerating protoplasts were examined by scanning electron microscopy (Figure 3). Fresh protoplasts appeared as round cells with a smooth surface, but with irregularly distributed wrinkles. Globular forms, corresponding to substances secreted by the protoplasts (Miegeville and Morin, 1977), could also be observed. After 2 h of regeneration, protoplasts had a net of thick fibrils irregularly distributed over their surfaces.

Proteins secreted by regenerating *S. cerevisiae* protoplasts in liquid medium were separated by high resolution two-dimensional electrophoresis using an immobilized pH gradient (Bjellqvist *et al.*, 1993). Figure 4 shows the map of these proteins, within the Mr 10–200 kDa and pI 3.5–9 experimental window, which were visualized by silver staining. About 200 protein spots were detected on

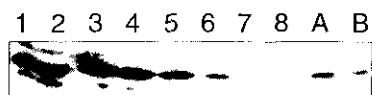


Figure 2. Western blot analysis of cell extracts and proteins secreted by protoplasts using antibodies against Sec14p. Several dilutions of a cell extract, corresponding to 6.2×10^7 , 3.1×10^7 , 1.2×10^7 , 6.2×10^6 , 3.1×10^6 , 1.2×10^6 , 6.25×10^5 and 3.1×10^5 broken cells (lanes 1–8, respectively) and different amounts of proteins secreted by protoplasts (lanes A and B) were electrophoresed, blotted and immunodetected with anti-Sec14p.

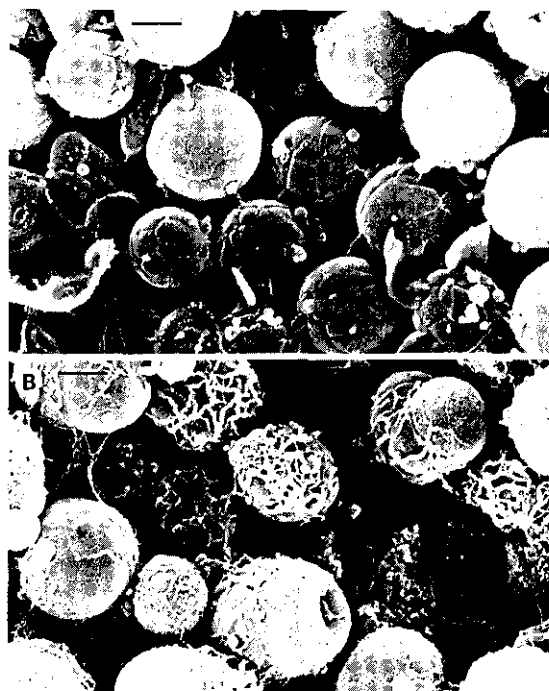


Figure 3. Scanning electron microscopy of protoplasts of *S. cerevisiae*. (A) Fresh protoplasts. (B) Protoplasts after 2 h in regenerating conditions. Bar corresponds to 1 μ m.

this map using the MELANIE II software. Resolution was good and the technique was highly reproducible. The gels were superimposable, even when samples from different experiments were used.

Identification of proteins

The use of a novel loading method on IPG in the first dimension (Sanchez *et al.*, 1997) allowed higher sample loading, and hence N-terminal sequencing of the most abundant blotted proteins could be achieved. The N-terminal sequence data on selected spots are summarized in Table I.

The N-terminal sequence determined for spot 1 could correspond to the products of the genes *ENO1* and *ENO2*. Comparing the experimental Mr and pI values with the theoretical values of these two gene products, the spot was identified as Eno2. The identities of spots 2 and 3 were assigned directly to proteins Hsp150 (subunit II) and Bgl2, respectively. The N-terminal sequence determined for spots 4 and 6 corresponded to the YDR055w gene product and protein Ygp1, respectively, although starting at positions 144 and 148. This

could be due to post-translational processing, as occurs in the case of Hsp150 (Russo *et al.*, 1992). For spot 5, it was not possible to distinguish between the two isoenzymes (Tdh2 and Tdh3), since their N-terminal sequence is identical and their Mr and pI values are very similar.

Since identification of protein spots by micro-sequencing required a considerable amount of protein, we undertook the identification of known *S. cerevisiae* cell wall proteins in the 2D pattern by immunoblotting with polyclonal antibodies. The identifications obtained in this study are listed in Table I. All antibodies were first tested in one-dimensional Western blots to check that they were indeed recognizing the corresponding protein in the sample of proteins secreted by regenerating protoplasts.

Antibodies against the SSA family recognize both Ssa1 and Ssa2; it is not known whether they also react with Ssa3 and Ssa4, which are expressed under stress-induced conditions. A major cluster of several spots was detected at 76 kDa; this was assigned to the corresponding cluster in the gel. We also assayed antibodies against the SSB family, that recognize both Ssb1 and Ssb2. One cluster of spots was recognized by these antibodies. Its pattern made it easily recognizable in the silver-stained gel (Figure 4).

Antibodies against Cwp1, a known cell wall protein, did not recognize any protein in our sample, while a protein band was detected in a cell extract and in 2-mercaptoethanol-extracted cell wall proteins (data not shown). This protein could be secreted or exported to the cell wall in a later stage of cell wall regeneration. mRNA levels of Cwp1 have recently been reported to peak in S/G2 phase (Brul *et al.*, 1997).

Antibodies raised against Hkr1, Kre9 and Flo1 proteins were also assayed, with negative results. This was not surprising, since Hkr1 is a type I membrane protein (Yabe *et al.*, 1996). Kre9 is only detected in the extracellular medium when over-produced (Brown and Bussey, 1993) and Flo1 is not produced in non-flocculent strains (Bidard *et al.*, 1995).

Antibodies against Gas1, a GPI-anchored protein localized in the plasma membrane, recognized a streak in the acidic part of the bidimensional blot, indicating the presence of this protein or another member of the Gas family in the protoplast-secreted proteins (Caro *et al.*, 1997). In recent work we have identified this streak as Gas3 (M. Pardo, unpublished results).

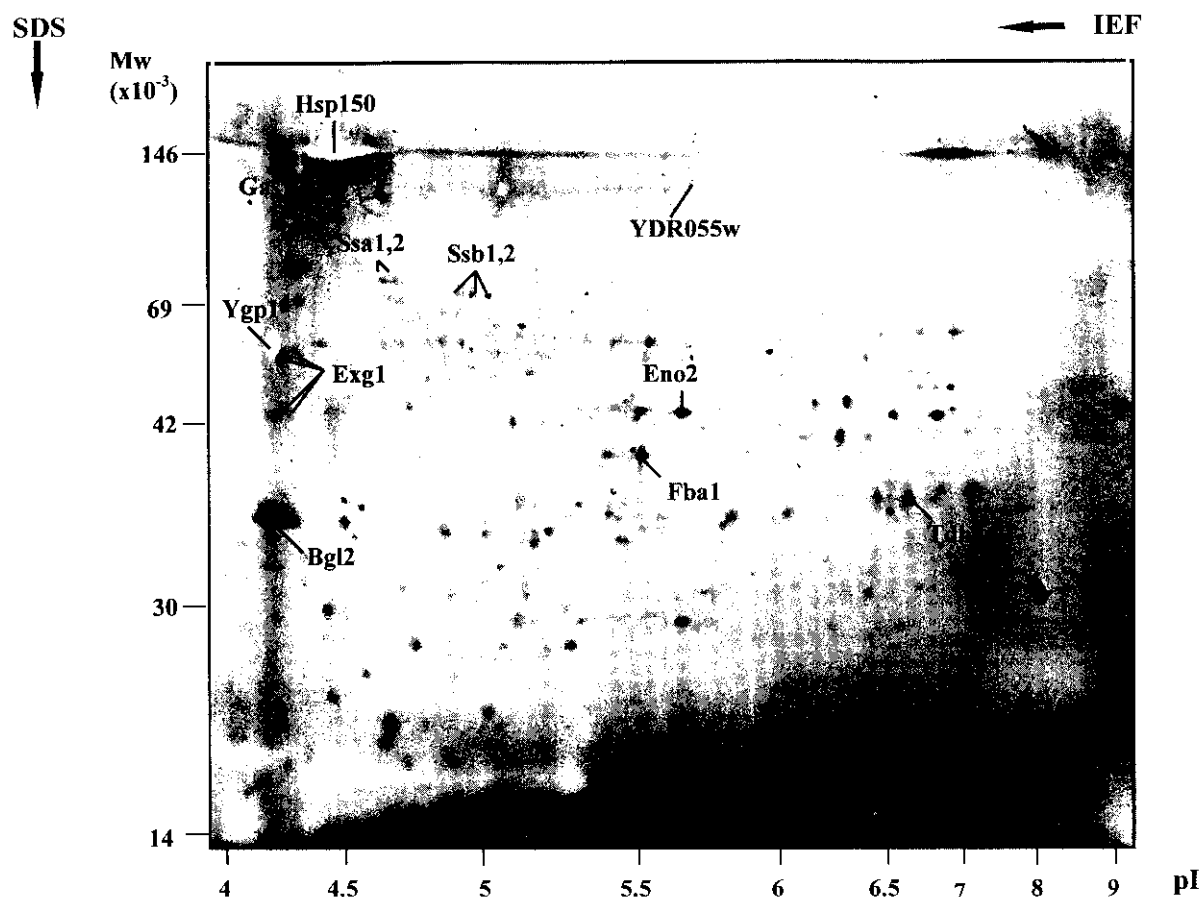


Figure 4. Two-dimensional silver-stained map of proteins secreted by *S. cerevisiae* protoplasts regenerating their cell wall. Identified proteins are shown. *Spot recognized by polyclonal antibodies against Gas1p.

Glucosylation of proteins secreted by regenerating protoplasts

Some cell wall mannoproteins have recently been shown to contain a phosphodiester-linked side-chain of β -1,6-linked residues by which these proteins are attached to the β -1,3-glucan matrix (Kapteyn *et al.*, 1994, 1995, 1996; Montijn *et al.*, 1994). We investigated the glucosylation of the proteins secreted by regenerating protoplasts using polyclonal affinity-purified anti- β -1,3-glucan and anti- β -1,6-glucan antisera. β -1,6-glucan-containing material was detected as faint bands at 160 kDa and at the top of the filter, far above 250 kDa (Figure 5, lane d). This indicates that some proteins secreted by protoplasts within 2 h of regeneration are β -1,6-glucosylated. Zymolyase-extracted cell wall proteins (Figure 5, lane c) were used as a positive control because they carry a

carbohydrate side-chain containing β -1,6-linked glucose residues (Montijn *et al.*, 1994). The β -1,3-glucan antiserum also detected a faint band above 250 kDa. This band disappeared when competitive Western analysis with 200 μ M laminarin (a 1,3- β -glucose polymer) was carried out (data not shown). Some of the proteins secreted by regenerating protoplasts thus seem to be β -1,3-glucosylated. However, neither of these two materials was detected in two-dimensional blots, probably due to the very low amount present in the sample.

Genetic study of the export of *Eno2* and *Fba1* to the cell surface

Although the presence of some glycolytic enzymes in the cell wall or surface of some microorganisms has been previously reported (see

Table 1. Identification of proteins secreted by *S. cerevisiae* regenerating protoplasts by N-terminal sequencing and immunoblotting with polyclonal antibodies.

Spot no.	Mr (kDa)	pI	N-terminal sequence	Immuno-identification	Protein name
1	43	5.69	AVSKVYARSV		Eno2
2	150	4.72	AAXQIGDG/LQV		Hsp150
3	35	4.21	IGELXXXXXXK/VN/DN/DXG/DTXK		Bgl2
4	123	5.6	SIKSPVETVS		YDR055w
5	36	6.62	VRVAINGFGRI		Tdh2-3
6	58	4.22	FSIIFDTEKPIV		Ygp1
7	76	4.63-4.67	n.d.*	+	Ssa1,2(3,4)
8	71	4.90-5.02	n.d.	+	Ssb1,2
9	39	5.54	GVEQILKXKTG		Fba1
10	55, 42	4.23-4.27	n.d.	+	Exg1
11	126	4.1-4.6	n.d.	+	Gas†

*n.d., not determined; †spot recognized by polyclonal antibodies against Gas1p.

discussion), the finding of some of these enzymes in the proteins secreted by regenerating protoplasts led us to check their ability to reach the cell surface in *S. cerevisiae*. For that purpose, an intracellular form of *S. cerevisiae* invertase was used as reporter gene. The *SUC2* gene of yeast encodes two

differently regulated mRNAs. The larger RNA encodes a secreted, glycosylated form of invertase while the smaller RNA encodes an intracellular, non-glycosylated form (Carlson *et al.*, 1983). Invertase secretion into periplasmic space is required for growth on sucrose as sole carbon source, and therefore *suc2* mutants (*S. cerevisiae* strain SS10) are not able to grow under these conditions. pENO2S and pFBA1S plasmids carry *ENO2* and *FBA1* genes fused in frame with a *suc2* allele without signal peptide (which is, therefore, unable to be secreted and remains intracellular). pENO2S and pFBA1S were transformed into *S. cerevisiae* SS10 and in both cases transformants were able to grow on sucrose showing that these two proteins are able to direct the *suc2* intracellular allele outside the plasma membrane (Figure 6). The presence of the hybrid proteins at the cell surface was not due to cell lysis, since cells

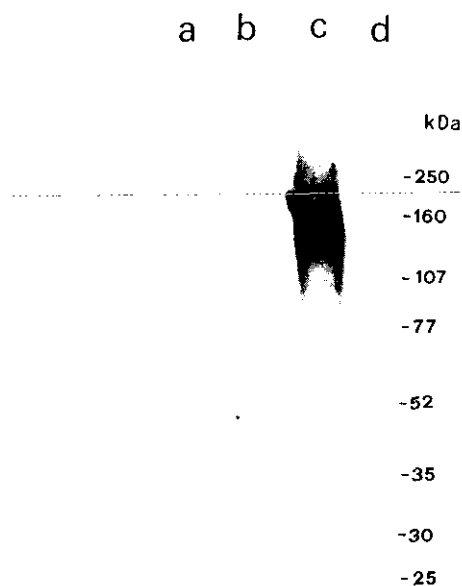


Figure 5. Western blot showing glucosylation of proteins secreted by *S. cerevisiae* regenerating protoplasts. Lane a, cell extract; lane b, SDS-extracted cell wall proteins; lane c, Zymolyase-extracted cell wall proteins; lane d, proteins secreted by regenerating protoplasts. Samples were analysed using affinity-purified anti- β -1,6-glucan antiserum.

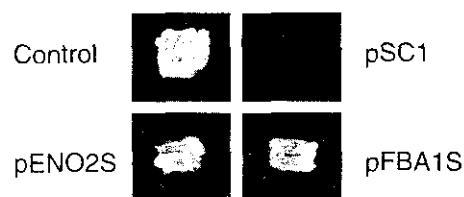


Figure 6. Complementation of *S. cerevisiae* *suc2* strains with different gene constructions. Strain SS10 (*suc2A9*) was transformed with the indicated plasmids, streaked onto sucrose medium (see Material and Methods) and incubated for 3 days at 28°C. Control indicates a centromeric plasmid carrying the wild-type *SUC2* gene.

transformed with pSC1, which carries the *suc2* allele alone, could not grow under the same conditions.

DISCUSSION

The fungal cell wall is a very important structure responsible for cellular shape and cellular integrity and it also acts as a filter, permitting the passage of some molecules while excluding others. It is also involved in other important processes such as flocculation and infectiousness. Since this structure is absent from mammalian cells, the fungal cell wall seems to be a good target in the development of selective antifungal drugs. The completion of the *S. cerevisiae* genome sequence (Goffeau, 1996) as well as the similarity in cell wall construction in Ascomycetes, including medically important fungi such as *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus* (Brul *et al.*, 1997; Chaffin *et al.*, 1998; Kapteyn *et al.*, 1994), renders this yeast an optimal candidate for cell wall studies. It is estimated that several hundred genes are involved in cell wall construction, including some newly discovered ORFs. The Cell Wall Node of the EUROFAN (European Functional Analysis) programme is currently carrying out different screens to identify genes involved in cell wall synthesis and morphogenesis. One of these screens involves the study of the proteins secreted by regenerating protoplasts by means of high resolution two-dimensional electrophoresis, as described here.

Elimination of the yeast cell wall by enzymatic digestion in an isotonic medium, followed by incubation in regenerating conditions, results in the secretion of numerous proteins into the medium and active regeneration of the cell wall (Klis, 1994). These secreted proteins could be structural proteins as well as remodelling and probably cross-linking enzymes. The use of protoplasts to study cell wall proteins allows problems normally encountered in cell wall proteins extraction procedures to be overcome: (a) the proteins secreted during the first hours are not retained in the nascent cell wall, but remain in the medium. Thus, it is not necessary to carry out chemical or enzymatic extractions, which could modify such proteins in some way; (b) chemically or enzymatically-extracted cell wall proteins carry glucan and chitin side-chains, which hampers their resolution by electrophoresis and subsequent identification. In addition, most of the genes

involved in cell wall synthesis are being highly expressed. Summing up, the study of proteins secreted by regenerating protoplasts could give useful information about cell wall biosynthesis.

We have set up a method (Figure 1) to obtain the proteins secreted by regenerating protoplasts (Figure 3) under suitable conditions for analysis and identification. These proteins were analysed by two-dimensional gel electrophoresis and a map of the proteins secreted was obtained (Figure 4).

We have identified different proteins by Edman degradation or by immunoblot analysis. These proteins can be included in different groups: (a) proteins involved in cell wall construction; (b) heat shock proteins; and (c) other proteins.

Proteins involved in cell wall construction

Two glycoproteins with enzymatic activity, Bgl2 and Exg1, were detected. Bgl2 was present in high amounts in the proteins secreted by protoplasts, possibly suggesting its importance in cell wall biogenesis. This protein is an endo- β -1,3-glucanase that may play a role in cell expansion during growth, in mating and in spore release (Klebl and Tanner, 1989). Goldman *et al.* (1995) proposed that it could have 1,3- β -glucosyltransferase activity. Exg1 is an exo- β -1,3-glucanase (Vazquez de Aldana *et al.*, 1991) that has been implicated in cell wall β -glucan assembly (Cid *et al.*, 1995; Jiang *et al.*, 1995).

Interestingly, antibodies against Gas1, a glycoprotein containing a GPI-anchor for plasma membrane attachment (Nuoffer *et al.*, 1991; Ram *et al.*, 1995; Vai *et al.*, 1991), detected a Gas1 homologue. With the complete genome of *S. cerevisiae* sequenced, four homologues of this protein have been described (Gas1–Gas5). Recently, the immunodetected spot has been identified as Gas3. This protein does not contain a dibasic residue N-terminal to the ω -site for GPI-attachment, as has been suggested for cell wall GPI-proteins (Caro *et al.*, 1997).

In the present study, we have also detected a hitherto unknown protein, the product encoded by YDR055w (Brandt *et al.*, 1996). This protein shows similarity to members of the Sps2 family (Caro *et al.*, 1997). It is a typical glucanase-extractable cell wall protein, rich in serine and threonine, and has a putative GPI-attachment signal. It also has multiple potential sites for N-glycosylation. This protein must undergo post-translational modifications since its experimental

Mr is much higher than the predicted weight. The N-terminal sequence determined by us started at position 144 and therefore the putative precursor would contain an N-terminal extended peptide that must be cleaved off during the process of protein externalization.

Heat shock proteins (Hsps)

Hsps belonging to two families were detected: Pir proteins (Pir1/Hsp150/Pir3) and Hsp70s. The heat shock response is one of the most conserved attributes of living organisms along evolution. Hsps have been implicated in the protection and damage repair of cells under stress conditions (Mager and Varela, 1993). The presence of these proteins in our samples was not surprising because protoplasts are highly stressed cells. Hsp150 (Russo *et al.*, 1992) was the major spot in our samples and therefore seems to play an important role in allowing cell wall regeneration by protoplasts.

Proteins of the Hsp70 family were also detected (Ssa1,2 and Ssb1,2). These have been implicated in protein folding and the translocation of proteins across membranes (Craig *et al.*, 1993; Georgopoulos and Welch, 1993). They do not have a signal sequence and their localization was originally thought to be restricted to the cell interior. Recently, López-Ribot and colleagues (Lopez-Ribot *et al.*, 1996a; Lopez-Ribot and Chaffin, 1996b) have shown in both *S. cerevisiae* and *C. albicans* that some proteins belonging to the Hsp70 family (Ssa1p and Ssa2p) are also present in the cell wall, and have suggested that such proteins might play a role in the overall process of the biosynthesis, secretion, and assembly of cell wall components, and also in the generation of the cell wall structure. Our results are in agreement with these findings. In our samples we were able to detect not only Ssa1 and Ssa2, but also Ssb1 and Ssb2 (Figure 4).

Other proteins

We have also identified three glycolytic enzymes: Eno2 (enolase), Fba1 (fructose biphosphate aldolase) and Tdh2-3 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase). The presence of this type of proteins in the cell surface of several micro-organisms has been described previously. Different groups have reported the presence of enolase in the cell wall of *C. albicans* (Angiolella *et al.*, 1996; Eroles *et al.*, 1997). Glyceraldehyde-3-phosphate

dehydrogenase has been reported as a major surface protein in group A streptococci (Pancholi and Fischetti, 1992) and is also present in the *C. albicans* cell wall (Gil-Navarro *et al.*, 1997; Gozalbo *et al.*, 1998). In *Kluyveromyces marxianus*, the same enzyme has been identified as a constitutive protein of the cell wall (Fernandes *et al.*, 1992). Other glycolytic enzymes, such as 3-phosphoglycerate kinase or alcohol dehydrogenase, have also been suggested to be present on the surface of *C. albicans* (Alloush *et al.*, 1997; Pendrak and Klotz, 1995). However, other authors have shown that the cell wall of *C. albicans* incorporated exogenously added proteins and they pointed out that enolase, Hsp70p and other cytoplasmic proteins could be found in the cell wall as a result of cell lysis or any other unknown mechanism (Eroles *et al.*, 1997). Although we can not exclude absolutely the possibility of some leakage of cytoplasmic proteins occurring (less than 0.1%), the results obtained with the fusion proteins (Eno2p or Fba1p with invertase) showed for the first time and using a genetic approach that two classical cytoplasmic proteins are able to reach *S. cerevisiae* periplasmic space. Furthermore, we have demonstrated that this is not due to cell lysis, since cells carrying the *suc2* allele without any peptide or protein directing its export to the cell surface could not grow on sucrose as a sole carbon source (Figure 6, pSC1). In addition, we have discarded the possibility that the fusion proteins export might be due to the high expression of these glycolytic enzymes (Norbeck and Blomberg, 1997) because a deleted version of Eno2p-invertase fusion protein, lacking part of the enolase sequence but still bearing the promoter region, is not able to complement a *S. cerevisiae* *suc2* mutant (data not shown). None of these glycolytic proteins has a conventional N-terminal signal sequence, as occurs in the case of Ssa and Ssb proteins, which would suggest a non-conventional secretory pathway for these proteins. Such a distinct pathway for protein export has, in fact, already been described in yeast (Cleves *et al.*, 1996). In recent reviews these glycolytic enzymes have been included among cell wall proteins (Chaffin *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 1998). A possible role for them in the cell wall should be investigated in future research.

CONCLUSION

The use of 2D electrophoresis to study putative cell wall proteins secreted by regenerating protoplasts

affords an integrated view of the many genes expressed during cell wall regeneration. It was possible to identify different types of proteins, such as typical cell wall proteins (structural or/and enzymatic proteins) together with other proteins possibly involved in the overall process of cell wall biosynthesis. Further identification by mass spectrometry of more proteins secreted by regenerating protoplasts is under way. A 2D reference map of proteins secreted by protoplasts could be a powerful tool for functional analysis of cell wall mutants. Comparison of maps of mutants with a reference map should afford information about the different consequences that gene deletion may elicit in cell wall construction. In addition, we are currently implementing the identification of the proteins secreted by protoplasts of *C. albicans*, making use of the techniques here described. Such studies could shed further light on new targets for the development of antifungal drugs.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the colleagues who provided us with the antibodies used here for protein identification: V. Bankaitis (Sec14), B. Blondin (Flo1), H. Bussey (Kre9), E. A. Craig (Ssa1,2 and Ssb1,2), J. P. García-Ballesta (yeast ribosomal proteins), H. Kapteyn (Cwp1, β -1,6-glucan and β -1,3-glucan), G. Larriba (Exg1), L. Popolo (Gas1) and H. Yamada-Okabe (Hkr1). Many thanks to E. Méndez and F. Canals for expert sequencing technical support. We also thank F. Klis and M. Molina for encouragement and critical discussions for improvement of the manuscript. This work was supported by the Commission of the European Union within the framework of the EUROFAN programme and by Grant BIO95-0303 from CICYT (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain). M.P. was the recipient of a Fellowship from Ministerio de Educación y Ciencia, Spain.

NOTE ADDED IN PROOF

The ORF YDROSSw, described in this paper, has been registered in the *Saccharomyces* Genome Database (<http://genome-www.stanford.edu>), with the name PST1, standing for protoplasts-secreted.

REFERENCES

Alloush, H. M., Lopez-Ribot, J. L., Masten, B. J. and Chaffin, W. L. (1997). 3-phosphoglycerate kinase: a

- glycolytic enzyme protein present in the cell wall of *Candida albicans*. *Microbiology*, **143**(2), 321–330.
- Angiolella, L., Facchin, M., Stringaro, A., Maras, B., Simonetti, N. and Cassone, A. (1996). Identification of a glucan-associated enolase as a main cell wall protein of *Candida albicans* and an indirect target of lipopeptide antimycotics. *J. Infect. Dis.* **173**(3), 684–690.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E. and Moore, D. D. *et al.* (Eds) (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York.
- Bataille, N., Peypouquet, M. F. and Boucherie, H. (1987). Identification of polypeptides of the carbon metabolism machinery on the two-dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*. Location of 23 additional polypeptides. *Yeast* **3**(1), 11–21.
- Bidard, F., Bony, M., Blondin, B., Dequin, S. and Barre, P. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* FLO1 flocculation gene encodes for a cell surface protein. *Yeast* **11**(9), 809–822.
- Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J. C. and Hochstrasser, D. (1993). A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. *Electrophoresis* **14**(12), 1357–1365.
- Boucherie, H., Dujardin, G., Kermorgant, M., Monribot, C., Slonimski, P. and Perrot, M. (1995). Two-dimensional protein map of *Saccharomyces cerevisiae*: construction of a gene–protein index. *Yeast* **11**(7), 601–613.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brandt, P., Ramlow, S., Otto, B. and Bloecker, H. (1996). Nucleotide sequence analysis of a 32,500 bp region of the right arm of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome IV. *Yeast* **12**(1), 85–90.
- Brown, J. L. and Bussey, H. (1993). The yeast *KRE9* gene encodes an O glycoprotein involved in cell surface beta-glucan assembly. *Mol. Cell. Biol.* **13**(10), 6346–6356.
- Brul, S., King, A., Van der Vaart, J. M., Chapman, J., Klis, F. and Verrips, C. T. (1997). The incorporation of mannoproteins in the cell wall of *S. cerevisiae* and filamentous Ascomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek* **72**(3), 229–237.
- Cabib, E. and Duran, A. (1975). Simple and sensitive procedure for screening yeast mutants that lyse at nonpermissive temperatures. *J. Bacteriol.* **124**(3), 1604–1606.
- Cabib, E., Kang, M. S. and Au-Young, J. (1987). Chitin synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **138**, 643–649.
- Cabib, E., Roberts, R. and Bowers, B. (1982). Synthesis of the yeast cell wall and its regulation. *Ann. Rev. Biochem.* **51**, 763–793.

- Carlson, M., Taussig, R., Kustu, S. and Botstein, D. (1983). The secreted form of invertase in *Saccharomyces cerevisiae* is synthesized from mRNA encoding a signal sequence. *Mol. Cell Biol.* **3**(3), 439–447.
- Caro, L. H. P., Tettelin, H., Vossen, J. H., Ram, A. F. J., Van den Ende, H. and Klis, F. M. (1997). *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(15), 1477–1489.
- Chaffin, W. L., Lopez-Ribot, J. L., Casanova, M., Gozalbo, D. and Martinez, J. P. (1998). Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function, and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**(1), 130–180.
- Cid, V. J., Duran, A., del Rey, F., Snyder, M. P., Nombela, C. and Sanchez, M. (1995). Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* **59**(3), 345–386.
- Cleves, A. E., Cooper, D. N., Barondes, S. H. and Kelly, R. B. (1996). A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **133**(5), 1017–1026.
- Craig, E. A., Gambill, B. D. and Nelson, R. J. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**(2), 402–414.
- de Nobel, H. and Lipke, P. N. (1994). Is there a role for GPIs in yeast cell-wall assembly? *Trends Cell Biol.* **4**, 42–45.
- Douglas, C. M., Foor, F., Marrinan, J. A., Morin, N., Nielsen, J. B., Dahl, A. M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W. and el-Sherbeini, M. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* *FKSI* (*ETG1*) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A.* **91**(26), 12 907–12 911.
- Eroles, P., Sentandreu, M., Elorza, M. V. and Sentandreu, R. (1997). The highly immunogenic enolase and Hsp70p are adventitious *Candida albicans* cell wall proteins. *Microbiology* **143**(Pt 2), 313–320.
- Fernandes, P. A., Keen, J. N., Findlay, J. B. and Moradas-Ferreira, P. (1992). A protein homologous to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is induced in the cell wall of a flocculent *Kluyveromyces marxianus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1159**(1), 67–73.
- Garrels, J. I., Futcher, B., Kobayashi, R., Latter, G. I., Schwender, B., Volpe, T., Warner, J. R. and McLaughlin, C. S. (1994). Protein identifications for a *Saccharomyces cerevisiae* protein database. *Electrophoresis* **15**(11), 1466–1486.
- Garrels, J. I., McLaughlin, C. S., Warner, J. R., Futcher, B., Latter, G. I., Kobayashi, R., Schwender, B., Volpe, T., Anderson, D. S. and Mesquita-Fuentes, R. (1997). Proteome studies of *Saccharomyces cerevisiae*: identification and characterization of abundant proteins. *Electrophoresis* **18**(8), 1347–1360.
- Georgopoulos, C. and Welch, W. J. (1993). Role of the major heat shock proteins as molecular chaperones. *Ann. Rev. Cell Biol.* **9**, 601–634.
- Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P. and Gozalbo, D. (1997). The glycolytic enzyme glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is a surface antigen. *J. Bacteriol.* **179**(16), 4992–4999.
- Gil, C., Pomes, R. and Nombela, C. (1988). A complementation analysis by parasexual recombination of *Candida albicans* morphological mutants. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 1587–1595.
- Goffeau, A. (1996). 1996: a vintage year for yeast and *Yeast*. *Yeast* **12**(16), 1603–1605.
- Goldman, R. C., Sullivan, P. A., Zakula, D. and Capobianco, J. O. (1995). Kinetics of beta-1,3 glucan interaction at the donor and acceptor sites of the fungal glucosyltransferase encoded by the *BGL2* gene. *Eur. J. Biochem.* **227**, 372–378.
- Gozalbo, D., Gil-Navarro, I., Azorin, I., Renau-Piqueras, J., Martinez, J. P. and Gil, M. L. (1998). The cell wall-associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Candida albicans* is also a fibronectin and laminin binding protein. *Infect. Immun.* **66**(5), 2052–2059.
- Hamada, K., Fukuchi, S., Arisawa, M., Baba, M. and Kitada, K. (1998). Screening for glycosylphosphatidylinositol (GPI)-dependent cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **258**(1–2), 53–59.
- Hartland, R. P., Vermeulen, C. A., Klis, F. M., Sietsma, J. H. and Wessels, J. G. (1994). The linkage of (1–3)-beta-glucan to chitin during cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**(12), 1591–1599.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkalis. *J. Bacteriol.* **153**(1), 163–168.
- Jiang, B., Ram, A. F., Sheraton, J., Klis, F. M. and Bussey, H. (1995). Regulation of cell wall beta-glucan assembly: *PTC1* negatively affects *PBS2* action in a pathway that includes modulation of *EXG1* transcription. *Mol. Gen. Genet.* **248**(3), 260–269.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J. and Klis, F. M. (1994). Identification of beta-1,6-glucosylated cell wall proteins in yeast and hyphal forms of *Candida albicans*. *Eur. J. Cell Biol.* **65**(2), 402–407.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Dijkgraaf, G. J., Van den Ende, H. and Klis, F. M. (1995). Covalent association of beta-1,3-glucan with beta-1,6-glucosylated mannoproteins in cell walls of *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* **177**(13), 3788–3792.
- Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Vink, E., de la Cruz, J., Llobell, A., Douwes, J. E., Shimoi, H., Lipke, P. N. and Klis, F. M. (1996). Retention of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins through a phosphodiester-linked beta-1,3-/beta-1,6-glucan heteropolymer. *Glycobiology* **6**(3), 337–345.
- Klebl, F. and Tanner, W. (1989). Molecular cloning of a cell wall exo-beta-1,3-glucanase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **171**(11), 6259–6264.

- Klis, F. M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* **10**(7), 851–869.
- Kollár, R., Reinhold, B. B., Petrakova, E., Yeh, H. J., Ashwell, G., Drgonova, J., Kapteyn, J. C., Klis, F. M. and Cabib, E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1→6)-glucan interconnects mannoprotein, beta(1→3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* **272**(28), 17 762–17 775.
- Kollár, R., Petrakova, E., Ashwell, G., Robbins, P. W. and Cabib, E. (1995). Architecture of the yeast cell wall. The linkage between chitin and beta(1→3)-glucan. *J. Biol. Chem.* **270**(3), 1170–1178.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* **227**, 777–785.
- Lopez-Ribot, J. L., Alloush, H. M., Masten, B. J. and Chaffin, W. L. (1996a). Evidence for presence in the cell wall of *Candida albicans* of a protein related to the hsp70 family. *Infect. Immun.* **64**(8), 3333–3340.
- Lopez-Ribot, J. L. and Chaffin, W. L. (1996b). Members of the Hsp70 family of proteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**(15), 4724–4726.
- Mager, W. H. and Varela, J. C. (1993). Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Mol. Microbiol.* **10**(2), 253–258.
- Maillet, I., Lagniel, G., Perrot, M., Boucherie, H. and Labarre, J. (1996). Rapid identification of yeast proteins on two-dimensional gels. *J. Biol. Chem.* **271**(17), 10 263–10 270.
- Martinez, J. P., Gil, M. L., Lopez-Ribot, J. L. and Chaffin, W. L. (1998). Serologic response to cell wall mannoproteins and proteins of *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**(1), 121–141.
- Merril, C. R., Goldman, D. and Van Keuren, M. L. (1982). Simplified protein detection and image enhancement methods in polyacrylamide gels. *Electrophoresis*, **3**, 17–21.
- Miegeville, M. and Morin, O. (1977). New scanning electron microscopy contribution to the study of yeast protoplasts. *C. R. Acad. Sci. Hebd. Seances Acad. Sci. D.* **284**(19), 1935–1938.
- Mol, P. C., Park, H. M., Mullins, J. T. and Cabib, E. (1994). A GTP-binding protein regulates the activity of (1→3)-beta-glucan synthase, an enzyme directly involved in yeast cell wall morphogenesis. *J. Biol. Chem.* **269**(49), 31 267–31 274.
- Montijn, R. C., van Rinsum, J., van Schagen, F. A. and Klis, F. M. (1994). Glucomannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* contain a novel type of carbohydrate side chain. *J. Biol. Chem.* **269**(30), 19 338–19 342.
- Mrsa, V., Seidl, T., Gentzsh, M. and Tanner, W. (1997). Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**(12), 1145–1154.
- Norbeck, J. and Blomberg, A. (1995). Gene linkage of two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis resolved proteins from isogene families in *Saccharomyces cerevisiae* by microsequencing of in-gel trypsin generated peptides. *Electrophoresis* **16**(1), 149–156.
- Norbeck, J. and Blomberg, A. (1997). Two-dimensional electrophoretic separation of yeast proteins using a non-linear wide range (pH 3–10) immobilized pH gradient in the first dimension; reproducibility and evidence for isoelectric focusing of alkaline (pH>7) proteins. *Yeast* **13**(16), 1519–1534.
- Nuoffer, C., Jenö, P., Conzelmann, A. and Riezman, H. (1991). Determinants for glycosphospholipid anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* *GAS1* protein to the plasma membrane. *Mol. Cell. Biol.* **11**(1), 27–37.
- O'Farrell, P. H. (1975). High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* **250**(10), 4007–4021.
- Orlean, P., Pringle, J. R., Broach, J. R. and Jones, E. W. (eds) (1997). *Cell Cycle and Cell Biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Pancholi, V. and Fischetti, V. A. (1992). A major surface protein on group A streptococci is a glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase with multiple binding activity. *J. Exp. Med.* **176**(2), 415–426.
- Pendrak, M. L. and Klotz, S. A. (1995). Adherence of *Candida albicans* to host cells. *FEMS Microbiol. Lett.* **129**(2–3), 103–113.
- Ram, A. F., Brekelmans, S. S., Oehlen, L. J. and Klis, F. M. (1995). Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta-1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**(2), 165–170.
- Roemer, T., Paravicini, G., Payton, M. A. and Bussey, H. (1994). Characterization of the yeast (1-6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the *PKC1* pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell Biol.* **127**, 567–579.
- Russo, P., Kalkkinen, N., Sareneva, H., Paakkola, J. and Makarow, M. (1992). A heat shock gene from *Saccharomyces cerevisiae* encoding a secretory glycoprotein [published erratum appears in *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 1992, Sep 15; **89**(18), 8857]. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **89**(9), 3671–3675.
- Sagliocco, F., Guillemot, J. C., Monribot, C., Capdevielle, J., Perrot, M., Ferran, E., Ferrara, P. and Boucherie, H. (1996). Identification of proteins of the yeast protein map using genetically manipulated strains and peptide-mass fingerprinting. *Yeast* **12**(15), 1519–1533.
- Sanchez, J. C., Golaz, O., Frutiger, S., Schaller, D., Appel, R. D., Bairoch, A., Hughes, G. J. and Hochstrasser, D. F. (1996). The yeast SWISS-2D PAGE database. *Electrophoresis* **17**(3), 556–565.
- Sanchez, J. C., Rouge, V., Pisteur, M., Ravier, F., Tonella, L., Moosmayer, M., Wilkins, M. R. and Hochstrasser, D. F. (1997). Improved and simplified

- in-gel sample application using reswelling of dry immobilized pH gradients. *Electrophoresis* **18**(3-4), 324-327.
- Shahinian, S., Dijkgraaf, G. J., Sdicu, A. M., Thomas, D. Y., Jakob, C. A., Acbi, M. and Bussey, H. (1998). Involvement of protein N-glycosyl chain glucosylation and processing in the biosynthesis of cell wall beta-1,6-glucan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **149**(2), 843-856.
- Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Boucherie, H. and Mann, M. (1996). Linking genome and proteome by mass spectrometry: large-scale identification of yeast proteins from two dimensional gels. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **93**(25), 14 440-14 445.
- Tiedt, L. R., Jooste, W. R. and Hamilton-Attwell, W. L. (1987). Technique for preserving aerial fungus structure for scanning electron microscopy. *Trans. Br. Mycology* **88**, 420-422.
- Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **76**, 4350-4354.
- Vai, M., Gatti, E., Lacana, E., Popolo, L. and Alberghina, L. (1991). Isolation and deduced amino acid sequence of the gene encoding gp115, a yeast glycopospholipid-anchored protein containing a serine-rich region. *J. Biol. Chem.* **266**(19), 12 242-12 248.
- Valentin, E., Herrero, E., Pastor, J. F. I. and Sentandreu, R. (1984). Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.* **130**, 1419-1428.
- Van der Vaart, J. M., te Biesebeke, R., Chapman, J. W., Klis, F. M. and Verrips, C. T. (1996). The beta-1, 6-glucan containing side-chain of cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae* is bound to the glycan core of the GPI moiety. *FEMS Microbiol. Lett.* **145**(3), 401-407.
- Vazquez de Aldana, C. R., Correa, J., San Segundo, P., Bueno, A., Nebreda, A. R., Mendez, E. and del Rey, F. (1991). Nucleotide sequence of the exo-1,3-beta-glucanase-encoding gene, *EXG1*, of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **97**(2), 173-182.
- Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D. and Hochstrasser, D. F. (eds) (1997). *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*. Springer-Verlag, Berlin.
- Williams, S. and Veldkamp, C. (1974). Preparation of fungi for scanning electron microscopy. *Trans. Br. Mycology* **63**, 409-412.
- Yabe, T., Yamada-Okabe, T., Kasahara, S., Furuichi, Y., Nakajima, T., Ichishima, E., Arisawa, M. and Yamada-Okabe, H. (1996). *HKR1* encodes a cell surface protein that regulates both cell wall beta-glucan synthesis and budding pattern in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **178**(2), 477-483.

Aida Pitarch¹
Mercedes Pardo¹
Antonio Jiménez²
Jesús Pla¹
Concha Gil¹
Miguel Sánchez¹
César Nombela¹

¹Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

²Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Salamanca, Spain

Two-dimensional gel electrophoresis as analytical tool for identifying *Candida albicans* immunogenic proteins

This paper reports the usefulness of two-dimensional gel electrophoresis followed by Western blotting with sera from patients with systemic candidiasis in the identification of the major *Candida albicans* antigens. In order to have different patterns of protein expression and subcellular localization, three types of protein preparations were obtained: cytoplasmic extracts, protoplast lysates and proteins secreted by protoplasts regenerating their cell wall. These proteins were separated by high-resolution two-dimensional electrophoresis using an immobilized pH gradient. Western blotting with sera from patients with systemic candidiasis allowed the detection of more than 18 immunoreactive proteins. Some of these proteins had different isoforms. All sera reacted with at least three *C. albicans* proteins and the most reactive serum detected up to eleven proteins. Some of these antigens, e.g., enolase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), have been identified on the 2-D map. The most reactive proteins were enolase and a 34 kDa protein in the acidic part of the gel (pI 4–4.4) that was only detected in regenerating protoplast-secreted proteins. The identification of all these antigens would be useful for the development of diagnostic strategies.

Keywords: *Candida albicans* / Proteins / Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis / Antigens / Immune response / Candidiasis / Immune sera

EL 3360

1 Introduction

The dimorphic fungus *Candida albicans* is both a commensal and a human pathogen and is the most common cause of opportunistic fungal diseases. *C. albicans* infections have increased dramatically during the last two decades due to several predisposing factors such as immunosuppressive, cytotoxic and antibiotic treatments, long-term catheterization and longer survival of immunologically compromised individuals. Candidiasis can take many forms, ranging from asymptomatic colonization, through superficial mucocutaneous infections, to disseminated systemic disease, often with multiple organ involvement [1–3]. To understand the pathogenicity and clinical impact of *C. albicans*, it is important to have knowledge of the host-fungus interaction. Host defense mechanisms against *C. albicans* infections are highly complex and several studies have demonstrated the essential role of phagocytic cells, cell-mediated immunity, and even humoral immune responses in the resolution of *C. albicans* infections [4–6]. The importance of the cellular or humoral immune response seems to depend on the type of infection. The high incidence of mucosal candidiasis in individ-

uals with deficiencies in cell-mediated immunity (CMI) emphasizes the important role of CMI in protection against *C. albicans* mucosal infections [7]. By contrast, antibodies probably play an important part in the defense of the host against disseminated candidiasis [8]. Despite this, the role of antibodies in resistance to candidiasis is still poorly understood and deeper insight into the humoral immune response to *C. albicans* would be useful not only for the development of diagnostic strategies but also for alternative forms of treatment of candidiasis [4]. Several immunogenic *C. albicans* proteins have already been identified: heat shock proteins (Hsp90, Hsp70), enolase, glycolytic enzymes and aspartyl proteinases [9–16]. All these works are analyzed in an excellent review [17]. Another important issue is the diagnosis of systemic candidiasis. Immunological tests are lacking in sufficient specificity and/or sensitivity, and do not permit a distinction between colonization and disseminated infection [18–20]. It would therefore be of great use to have simple and sensitive tests. In light of all the above, the detection and identification of *C. albicans* immunogenic proteins would be valuable.

Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) appears to be a useful tool for the analysis of complex mixtures of proteins. This technique, originally described by O'Farrell [21] separates proteins on the basis of their differences in isoelectric point (pI) in the first dimension and apparent molecular mass in the second

Correspondence: Dr. Miguel Sánchez, Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040-Madrid, Spain

E-mail: gilmifa@eucmax.sim.ucm.es

Fax: +34-91-3941745

dimension. Over the last few years, with the advent of commercially manufactured immobilized pH gradients (IPGs) [22] this methodology has been greatly improved. After separation, protein identification can be achieved in many ways, such as through specific antibodies, by comparison of two-dimensional gel positions, Edman degradation, analysis of amino acid composition and, more recently, mass spectrometry. Owing to the need to identify *C. albicans* antigens, we have combined here 2-D PAGE with Western blotting with sera from patients with systemic candidiasis. With this approach, many immunoreactive proteins were detected and some were identified. In the present report, we show the usefulness of this integrated strategy for the identification of *C. albicans* antigens.

2 Materials and methods

2.1 Organism, growth conditions and sample preparation

C. albicans strain SC5314 (a clinical isolate) [23] was used because it is a reference strain used by many researchers and most virulence studies have been carried out with disruptant mutants in this genetic background [24]. This strain was maintained on solid YED medium (1% w/v D-glucose, 1% w/v Difco yeast extract and 2% w/v agar) and incubated at 30°C for at least 2 days. Three different types of samples were obtained: cytoplasmic extracts, protoplast lysates, and proteins secreted by protoplasts.

2.1.1 Cytoplasmic extracts

C. albicans cells were grown in liquid YED medium at 30°C up to an optical density of 4 at 600 nm. Yeast cells (10^9) were pelleted by centrifugation and washed once with ice-cold water. The cell pellet was resuspended in 200 µL of lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, 0.5 mM PMSF and 5 µg/mL of leupeptin, pepstatin and antipain). An equal volume of 0.5 mm diameter glass beads was added to the cell suspension. Cells were vortexed for 1 min and cooled on ice for 1 min. This procedure was repeated until at least 80% of the cells had been lysed as determined by phase-contrast microscopic examination. After the beads had settled, the cell extracts were transferred to other tubes and centrifuged for 15 min at 13 000 rpm. Supernatants were again transferred to other tubes, centrifuged once again and stored at –20°C.

2.1.2 Protoplast lysates

Cells were grown in liquid YED medium at 28°C up to an optical density of 4 at 600 nm, harvested and washed

once with water. Cells ($1\text{--}2 \times 10^9$ cells/mL) were then incubated in a pretreatment solution (10 mM Tris-HCl, pH 9, 5 mM EDTA, 1% v/v 2-mercaptoethanol) at 28°C with shaking at 80 rpm for 30 min. After washing with 1 M sorbitol, they were resuspended in 1 M sorbitol up to a density of 5×10^8 cells/mL. Thirty µL/mL Glusulase[®] (Du Pont) was added. Cells were then incubated with gentle shaking until more than 90% were protoplasts [25], which were then pelleted by gentle centrifugation ($600 \times g$). Protoplasts were washed three times with 1 M sorbitol by gently swirling liquid across the surface of the pellet, to eliminate any trace of Glusulase. The cell pellet was resuspended in 200 µL of lysis buffer, vortexed for 1 min and cooled on ice for 1 min. This suspension was centrifuged for 15 min at 13 000 rpm. Supernatants were again transferred to other tubes and centrifuged. The supernatants were kept at –20°C.

2.1.3 Proteins secreted by protoplasts

Proteins secreted by protoplasts were obtained as previously described [26]. Briefly, protoplasts obtained as above were induced to regenerate the cell walls in Lee medium [27] containing 1 M sorbitol as osmotic stabilizer at 28°C, with gentle shaking. After a 2 h incubation, cells were pelleted at $600 \times g$ and the medium was filtered through a 0.22 µm pore size after the addition of protease inhibitors: 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF; Fluka, Buchs, Switzerland), 2 µg/mL leupeptin and antipain, and 1 µg/mL pepstatin A (Sigma, St. Louis, MO, USA). The medium was concentrated by ultrafiltration using a pore size of 10 000 Da (Diaflo; Amicon, Witten, Germany) diluted with water, concentrated a further three times and lyophilized. Cell lysis was controlled by quantitative determination of alkaline phosphatase [28]. Protein quantitation was performed by the Bradford assay [29].

2.2 Two-dimensional gel electrophoresis

Two-dimensional electrophoresis was performed using an IPG system, as described by Bjellqvist *et al.* [30]. Immobilized Dry Strips (pH 3–10 NL, 18 cm long; Pharmacia, Uppsala, Sweden) were rehydrated overnight in 8 M urea, 2% w/v CHAPS, 10 mM dithioerythritol (DTE), 0.8% v/v Resolytes (Pharmalyte pH 3–10; Pharmacia) and a trace of bromophenol blue. Samples (approximately 200 µg of protein) were resuspended in sample buffer (8 M urea, 4% w/v CHAPS, 40 mM Tris, 65 mM DTE, bromophenol blue) and loaded for the first dimension. Isoelectric focusing was carried out on a Multiphor II electrophoresis unit (Pharmacia) at 15°C with the following program: 0–500 V in 1 min, 500 V for 5 h, 500–3500 V in 5 h, and 3500 V for 12.5 h (total 56250 Vh). After focusing, IPG strips were

equilibrated for 12 min in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 2% w/v DTE, and for 5 min in 50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 6 M urea, 30% v/v glycerol, 2% w/v SDS, 2.5% w/v iodoacetamide, and a trace of bromophenol blue, and were loaded onto a slab gel with a 0.5% w/v agarose solution in Laemmli buffer [31]. The second-dimensional run (SDS-PAGE) was carried out on homogeneous running gels (10%T) without a stacking gel. Piperazine diacrylamide (1.6%C) was used as cross-linker. Electrophoresis was conducted at 40 mA/gel constant current for 5 h in a Protean II cell (Bio-Rad, Richmond, CA, USA). Analytical gels were silver-stained according to Merrill *et al.* [32] with the Bio-Rad Silver Stain Kit. Electropherogram images were obtained with the GS-690 Imaging Densitometer and processed with the Melanie II software (Bio-Rad). M_r and pI values were estimated using internal 2-D SDS-PAGE standards (Bio-Rad).

2.3 Human sera samples

Six sera from patients with culture-confirmed disseminated *C. albicans* infection were used. Five of the patients had hematologic tumors: leukemias (sera number 2, 3 and 5) or myelodysplastic syndromes (sera number 1 and 6). One serum (number 4) was from a patient with a solid tumor. Four sera from healthy subjects were used as controls.

2.4 Immunoblot analysis

After the samples had been subjected to analytical 2-D PAGE, the gels were electroblotted onto nitrocellulose membranes in Towbin buffer at 50 mA overnight [33]. Blots were processed following standard protocols [34]. Monoclonal antibody A2C7 (ATCC) against *C. albicans* enolase (Eno; dilution 1:6000) was used for immunodetection. Polyclonal antibodies against *C. albicans* Hsp70 (dilution 1:10 000), *C. albicans* endoglucanase (Bgl2; dilution 1:5000) and *Saccharomyces cerevisiae* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; dilution 1:10 000) were used for immunodetection. Human sera were diluted 1:50 or 1:100. Immunoreactive spots were detected using horseradish peroxidase-labeled anti-mouse, anti-rabbit or anti-human IgGs (depending on the first antibody used) and an enhanced chemiluminescence detection system (ECL; Amersham, Uppsala, Sweden).

3 Results and discussion

This study is a preliminary step in the determination of the usefulness of 2-D PAGE for defining immunogenic proteins that induce antibody production in patients with systemic candidiasis. Below we report the results corresponding to the different phases involved.

3.1 Collection of different *C. albicans* protein preparations: cytoplasmic extracts, proteins secreted by protoplasts and protoplast lysates

In order to identify several *C. albicans* antigens, we obtained different *C. albicans* protein preparations. First, we collected a typical crude extract containing mainly cytoplasmic proteins (cytoplasmic extract). In this type of preparation, cell walls were removed by centrifugation, although some soluble cell wall proteins may also have been present. Since the yeast cell wall is the structure that mediates the initial interaction between the microorganism and the host, we employed a previously described approach used with *Saccharomyces cerevisiae* [26]. This is based on the analysis of proteins secreted by regenerating protoplasts. Initially, regenerating protoplasts secrete many of their cell wall components into the medium. In the case of *C. albicans*, cells were treated with Glusulase to obtain more than 90% protoplasts, and these were incubated under regenerating conditions for 2 h to allow the secretion of putative cell wall components. Because removal of the yeast cell wall is a stressful condition for the cells, crude extracts from cells without their cell wall were also obtained (protoplast lysates). This allowed us to compare soluble cytoplasmic proteins with proteins secreted by protoplasts from yeast cells under the same stressful conditions.

3.2 Two-dimensional protein maps of *C. albicans*

C. albicans proteins from the three different preparations were separated by high-resolution two-dimensional electrophoresis using an immobilized pH gradient [30]. Six gels (three different experiments carried out in duplicate) of each type of sample were run. Figures 1, 2 and 3 show the maps of these proteins, in the M_r 10–200 kDa and pI 3.5–9 experimental window, which were visualized by silver staining. Figure 1 shows the 2-D gel electrophoresis pattern of the soluble proteins of *C. albicans* SC5314. To our knowledge, this is the first *C. albicans* 2-D map obtained with IPGs. Using the Melanie II software, about 600–700 protein spots were detected in cytoplasmic extracts. The resolution was good and the technique was highly reproducible. Figure 2 shows the 2-D map of *C. albicans* protoplast lysates, in which about 600–700 protein spots were also detected. On comparing the maps of soluble proteins from exponentially growing cells with those from cells without cell walls, an important change in the protein pattern was observed. The most relevant finding was the higher expression of certain proteins (M_r range between 30–50 kDa) in the protoplast lysates.

Some of these were later identified as glycolytic enzymes (see below). The 2-D map of proteins secreted by protoplasts regenerating their cell walls is shown in Fig. 3; in this case about 350 proteins were detected.

In the early 1980s two-dimensional gel electrophoresis was used for separating *C. albicans* cytoplasmic proteins in order to investigate different protein expression during the morphological transition (yeast-hyphae) of this organism [35–38]. In these studies, proteins were radioactively labeled and about 200–400 spots were resolved. Finney *et al.* [38] reported the limitations of 2-D PAGE analysis, particularly in the detection of low-abundance regulatory proteins that might be critical to the establishment of alternative morphologies. However, at that time, apart from the problem involved in reproducing the technique, detected spots that were specific to each morphology could

not be identified. More recently, Niimi *et al.* [39] have again addressed this issue using 2-D PAGE with carrier ampholytes but failed to detect polypeptides unique to either morphology. Fractionation of *C. albicans* preparations by affinity chromatography in order to detect DNA-binding proteins followed by SDS-PAGE revealed novel polypeptides preferentially synthesized in germ tube-forming cells. Here, using 2-D PAGE with IPGs, we show it is possible to detect more spots than in all previous studies carried out with *C. albicans* protein preparations and that resolution is clearly enhanced. Moreover, the possibility of identifying proteins directly from the silver-stained spots in the gel, by mass spectrometry [40], would allow *C. albicans* researchers to successfully resolve interesting approaches attempted previously but hampered by technical problems that could not be solved with the solutions then available.

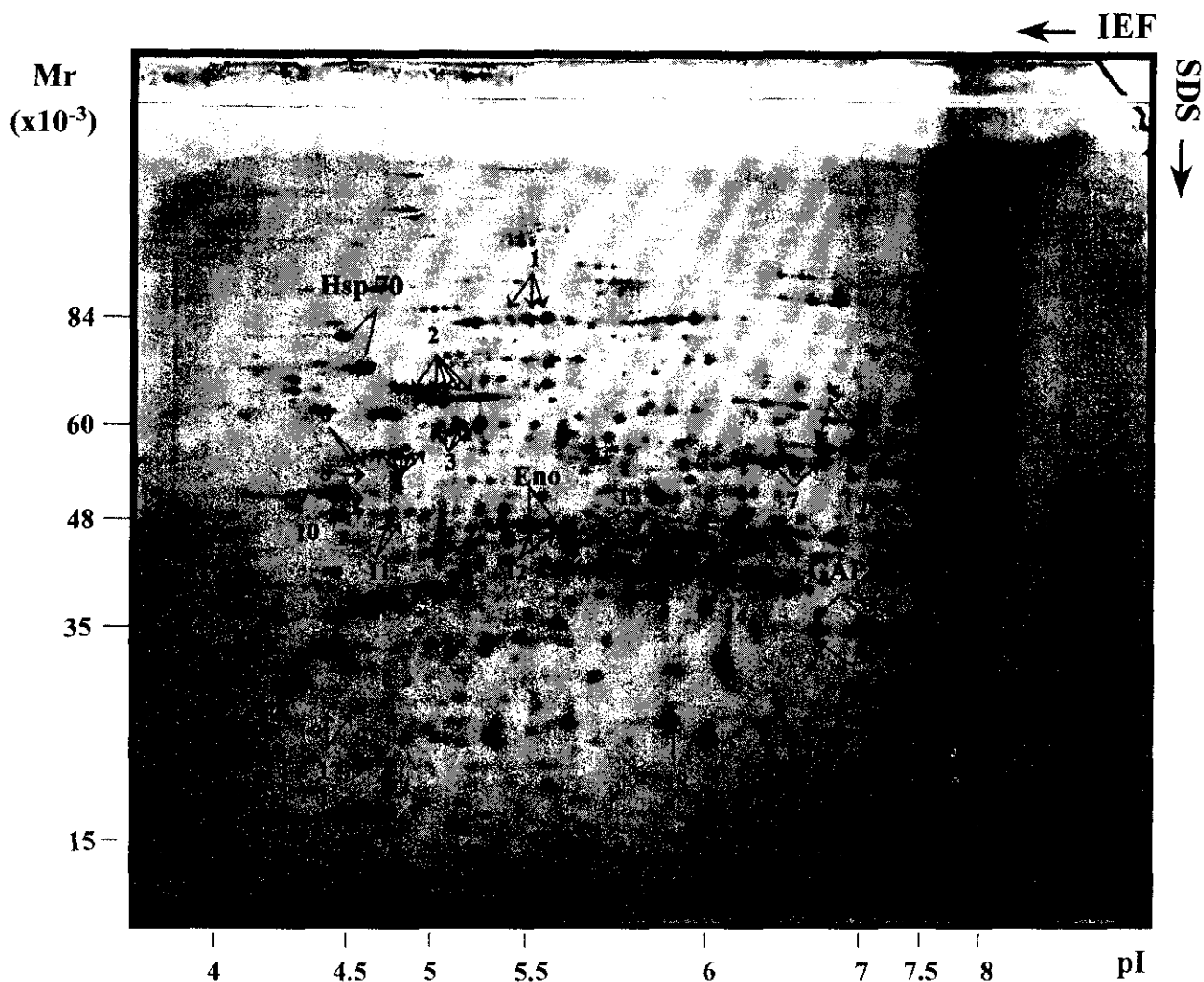


Figure 1. Two-dimensional silver-stained map of *C. albicans* cytoplasmic extracts. Eno, Hsp70 and GAPDH were identified by immunodetection. Arrows indicate antigenic proteins recognized with sera from patients with systemic candidiasis.

3.3 Immunodetection of *C. albicans* proteins

Some previously described *C. albicans* antigens include heat shock proteins and glycolytic enzymes [17]. Antibodies against Eno, Hsp70 and GAPDH were used for immunodetection. Monoclonal antibodies against Eno recognized several isoforms of enolase with slightly different pIs. A cluster of two spots at 48 kDa was immunodetected in cytoplasmic extracts. However, clusters of four and three spots at 48 kDa were detected in protoplast lysates and in protoplasts-secreted proteins, respectively. These were assigned to the corresponding clusters in the gels (Figs. 1–3). Summing up, these results showed that different Eno isoforms with different levels of expression were present in our protein preparations. Using a polyclonal antibody against Hsp70 (a protein with high homology

with the *S. cerevisiae* SSA family), two spots were detected at 70 kDa and at 78 kDa in both cytoplasmic extracts and protoplast lysates which were assigned to the corresponding spots in the gels. In the protoplast-secreted proteins, this protein was immunodetected in the membrane but was undetectable in the silver-stained gel. We also assayed antibodies against *S. cerevisiae* GAPDH and one cluster of three and four spots was recognized by these antibodies in cell extracts and protoplast lysates, respectively. In the protoplasts-secreted proteins only two spots were recognized and their pattern rendered them easily recognizable in silver-stained gels. Finally, we used antibodies against *S. cerevisiae* Bgl2 (β -1,3-glucan transferase); this protein is strongly expressed in *S. cerevisiae* when protoplasts are regenerating their cell walls [26]. This protein was detected at 34 kDa and pI 4.3 in proteins

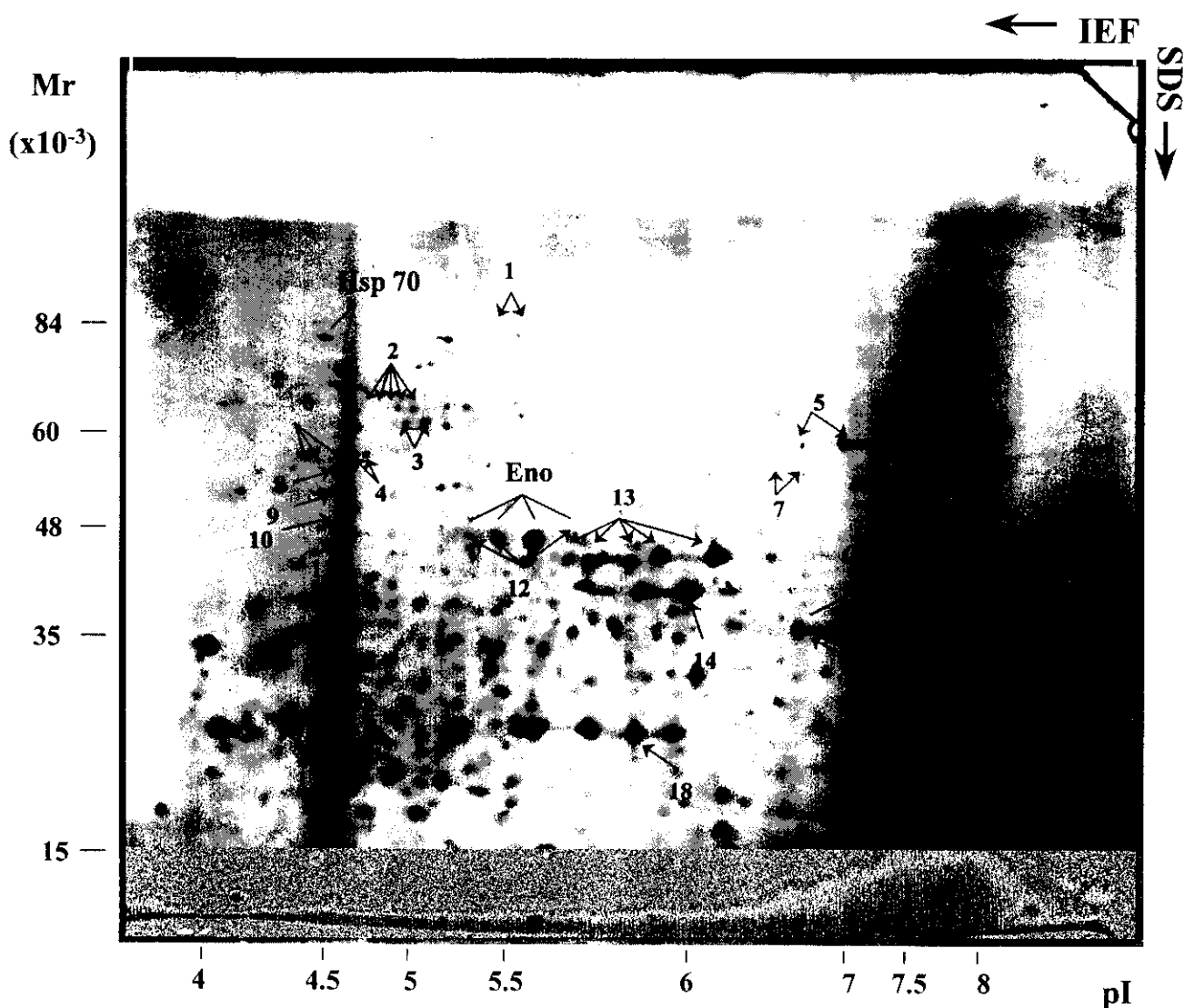


Figure 2. Two-dimensional silver-stained map of *C. albicans* protoplast lysates. Identified proteins are shown. Arrows indicate antigenic proteins recognized with sera from patients with systemic candidiasis.

secreted by protoplasts (Fig. 3). Bgl2 was undetectable by Western blotting in the other protein preparations (cytoplasmic extracts and protoplasts lysates). To summarize, Eno, GAPDH, Hsp70 and Bgl2 were identified with antibodies on the 2-D maps of different *C. albicans* protein preparations.

3.4 Detection of *C. albicans* proteins strongly reactive with sera from patients with systemic candidiasis

Six sera from patients with systemic candidiasis and four sera from healthy individuals were assayed. In preliminary assays using dot blots, tests were performed with sera from patients in order to determine which serum dilution

was the most appropriate. Serum dilutions of 1:10–1:10 000 were immunoreactive by dot blot. However, when we used the sera for immunodetection in protein preparations separated by 2-D PAGE, better results were obtained using lower dilutions (1:50 or 1:100). All sera were therefore used at a dilution of 1:50. More than 18 different proteins were immunodetected (Tables 1, 2 and 3; and Figs. 1, 2 and 3), and important conclusions could be obtained from the different protein preparations used. When *C. albicans* cytoplasmic extracts were analyzed, several spots with a molecular mass ranging between 30 and 84 kDa were immunodetected (Table 1 summarizes these results.) Proteins with the same molecular mass and small differences in *pI* are considered to be isoforms. Thus, in this sample it was possible to immunodetect at

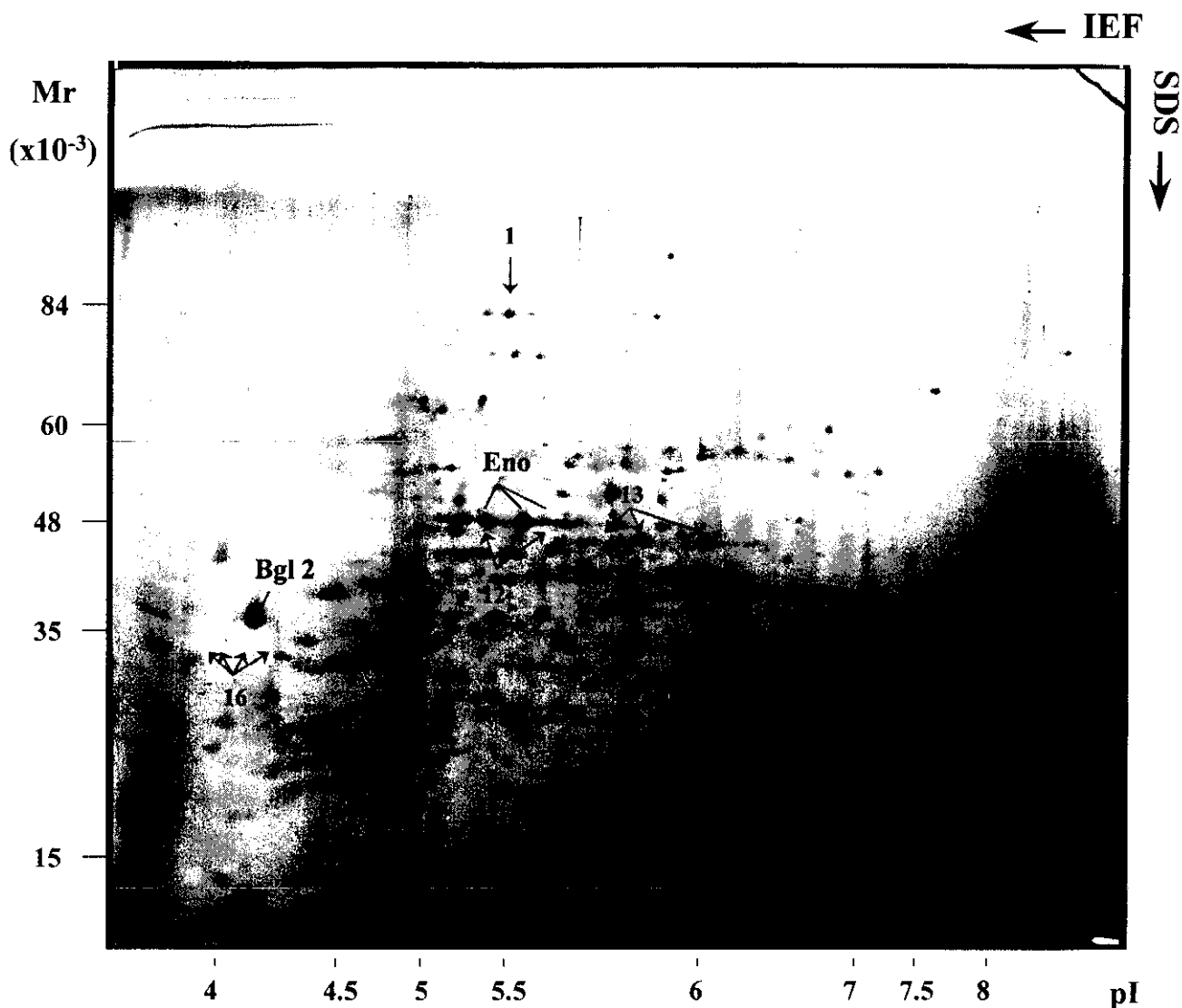


Figure 3. Two-dimensional silver-stained map of proteins secreted by *C. albicans* protoplasts undergoing cell wall regeneration. Identified proteins are shown. Arrows indicate antigenic proteins recognized in sera from patients with systemic candidiasis.

Table 1. *C. albicans* proteins of cytoplasmic extracts detected by sera from patients with systemic candidiasis

Number	Proteins		Sera					
	$M_r (\times 10^{-3})$	pI	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
1	84	5.4–5.7	+	–	±	–	–	+
2	67	4.7–5	+	±	–	+	–	–
3	60–61	4.9–5.1	+	–	–	–	±	–
4	57–58	4.5–4.7	+	±	–	±	–	–
5	58	6.7–7	–	±	–	–	–	–
6	56–57	4.2–4.5	+	–	–	+	–	–
7	56	6.4–6.7	–	±	–	–	–	–
8–10	51–55	4.3–4.4	+	–	–	–	–	–
11	48–50	4.5–4.8	+	–	+	+	–	+
12 Eno	48	5.6–5.8	+	+	+	±	+	+
13	44–46	5.6–6.2	–	+	+	+	–	+
14	42	6	–	–	±	–	–	–
15 GAPDH	35	6.7–7.5	–	±	–	–	–	±
16	34	4–4.4	–	–	–	–	–	–
17	30–32	4.2–4.4	–	±	±	–	–	+
18	30	5.9	–	–	–	–	–	+

Table 2. *C. albicans* proteins from protoplast lysates detected in sera from patients with systemic candidiasis

Number	Proteins		Sera					
	$M_r (\times 10^{-3})$	pI	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
1	84	5.4–5.7	±	–	±	–	–	+
2	67	4.7–5	+	±	±	±	–	–
3	60–61	4.9–5.1	+	–	–	–	+	–
4	57–58	4.5–4.7	+	–	–	–	–	–
5	58	6.7–7	–	±	–	–	–	–
6	56–57	4.2–4.5	+	–	–	+	–	–
7	56	6.4–6.7	–	–	–	–	–	–
8–10	51–55	4.3–4.4	+	–	–	–	–	–
11	48–50	4.5–4.8	+	–	+	+	–	+/-
12 Eno	48	5.6–5.8	+	+	+	+	+	+
13	44–46	5.6–6.2	–	+	+	+	–	+
14	42	6	–	±	±	–	–	–
15 GAPDH	35	6.7–7.5	–	±	–	–	–	+/-
16	34	4–4.4	–	–	–	–	–	–
17	30–32	4.2–4.4	–	+	–	–	–	+/-
18	30	5.9	–	–	–	–	–	+

Table 3. *C. albicans* protoplast-secreted proteins detected by sera from patients with systemic candidiasis

Number	Proteins		Sera					
	$M_r (\times 10^{-3})$	pI	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
1	84	5.4–5.7	–	–	±	–	–	–
12 Eno	48	5.6–5.8	+	+	+	±	±	+
13	44–46	5.6–6.2	–	±	+	+	–	±
16	34	4–4.4	+	+	+	+	±	+

least 17 different proteins (including Eno and GAPDH). All sera reacted with at least two different proteins and the most immunoreactive serum detected at least ten proteins (Fig. 4 shows the immunoblot with serum from the

most immune reactive patient). All sera recognized Eno. Another highly immunogenic protein has a molecular mass of 49 kDa and a pI range of 4.5–4.8. When sera from uninfected subjects were assayed, a faint reaction

with Eno was observed (data not shown). This can be explained in terms of the notion that *C. albicans* is a commensal organism.

The same spots were immunodetected when protoplast lysates were used (Fig. 2). However, the intensity of the immunodetection (in the gel region corresponding to a molecular mass ranging between 30 and 55 kDa) was higher than when cytoplasmic extracts were used, a fact that simplified the immunodetection. Figure 5 shows a protoplast lysate immunoblot detected with serum from patient number 1. The least reactive protein preparation involved the proteins secreted by protoplasts; only four proteins were immunodetected. Again, Eno was immunodetected. A new protein that was not present in the other samples was recognized. This protein has a molecular mass of 34 kDa and a *pI* between 4–4.4 (Fig. 6). Angioletti *et al.* [41] have described a 34 kDa cell wall mannoprotein, which was recognized by a rabbit anti-*Candida* serum. Further research is necessary in order to know whether these proteins are related. The identification of this protein could be important and is currently ongoing.

In conclusion, this work is the first attempt at a large-scale identification of *C. albicans* antigens by combining 2-DE and Western blotting with sera from patients with systemic candidiasis. A similar approach is currently being used to identify *Haemophilus influenzae* immunogenic proteins [42]. We show the presence of at least 18 immunogenic proteins, some of them glycolytic enzymes. The identification of all these proteins is now underway. Although preliminary, the finding of the presence of different antibodies in the sera of patients and the study of different risk

groups with systemic candidiasis would allow the identification of specific immunodominant antigens in order to design improved serologic tests for the diagnosis of candidiasis.

4 Concluding remarks

Two-dimensional gel electrophoresis of *C. albicans* protein preparations followed by Western blotting with sera from patients with systemic candidiasis provides a powerful tool for the identification of immunoreactive proteins. In the present study, we used different *C. albicans* protein preparations (cytoplasmic extracts, protoplast lysates and proteins secreted by protoplasts). The use of different samples with different patterns of protein expression reveals a useful approach for identifying more immunoreactive proteins as well as achieving better immunodetection. Protoplast lysates allowed easier immunodetection because some of the immunogenic proteins are highly expressed in this sample. Moreover, the use of a sample enriched in cell wall components also allowed the immunodetection of another antigen that was not present in the other samples. This antigen (*M_r* 34 and *pI* 4–4.4) was the most immunoreactive protein but, unlike Eno, it was not detected in sera from healthy subjects. The identification of all the immunodetected *C. albicans* proteins in this work is currently being addressed at our laboratory. Similar studies with patients with systemic candidiasis belonging to different risk groups (*i.e.*, diabetics, patients with AIDS, with solid or hematologic tumors) could help in understanding the role of the humoral response in *C. albicans* infections. The overall view of the different *Candida* antibodies that are being produced in a patient could be

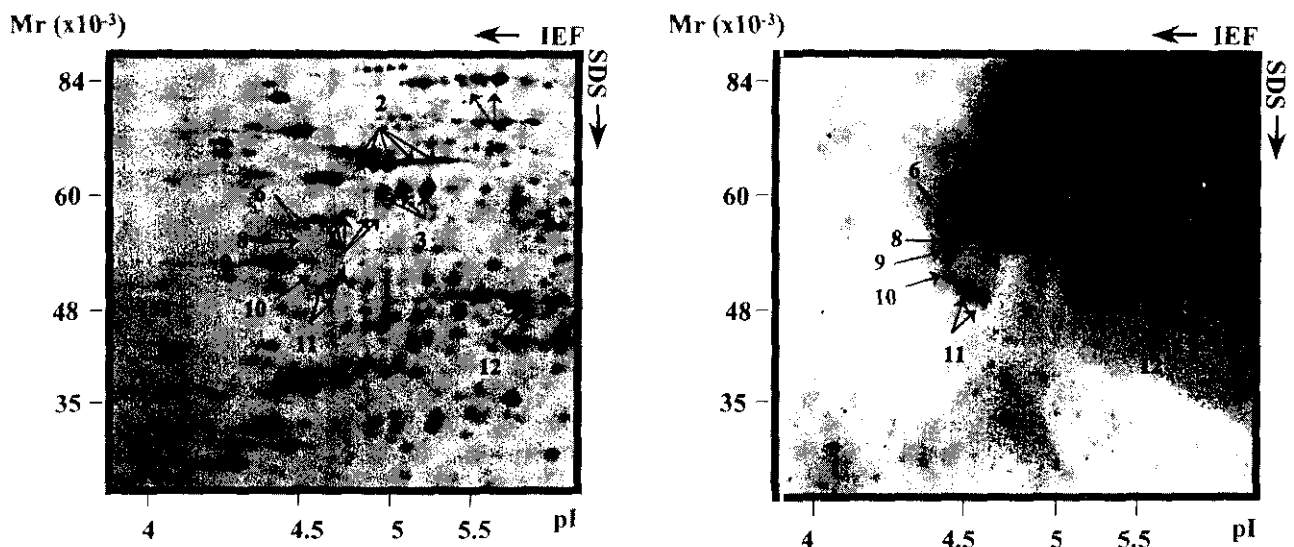


Figure 4. Left: Detail of the two-dimensional silver-stained electropherograms of *C. albicans* cytoplasmic extracts. Arrows indicate spots matching with immunoreactive spots in Western blots with serum from a patient with systemic candidiasis (number 1). Right: Western blots of similar electropherograms with serum from patient number 1.

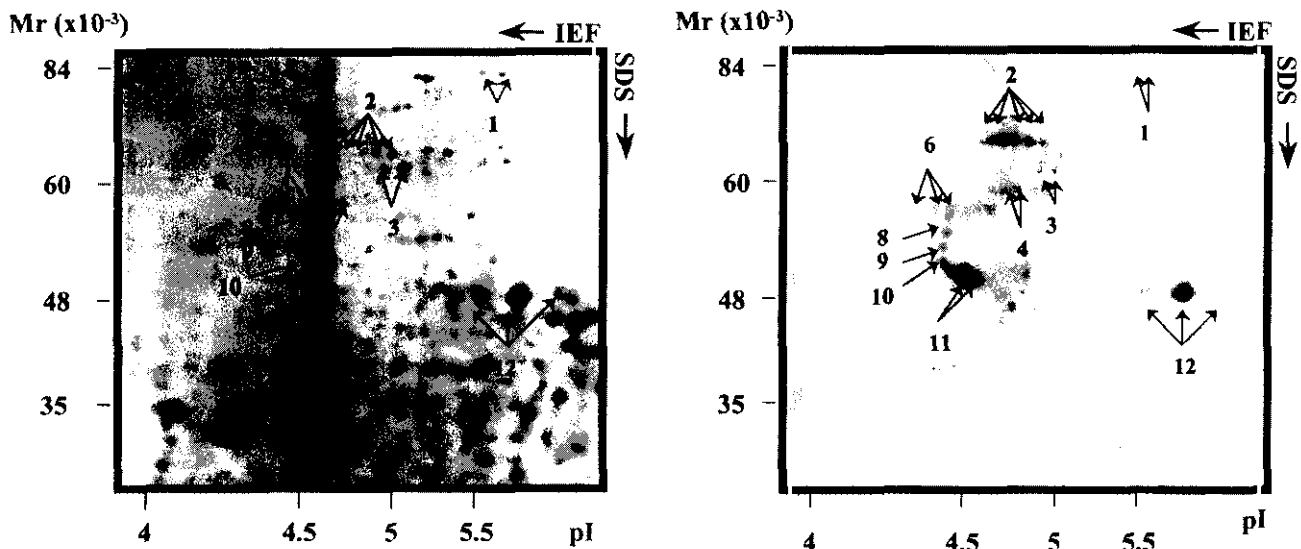


Figure 5. Left: Detail of the two-dimensional silver-stained electropherograms of *C. albicans* protoplast lysates. Arrows indicate spots matching with immunoreactive spots in Western blots with serum from a patient with systemic candidiasis (number 1). Right: Western blots of similar electropherograms with serum from patient number 1.

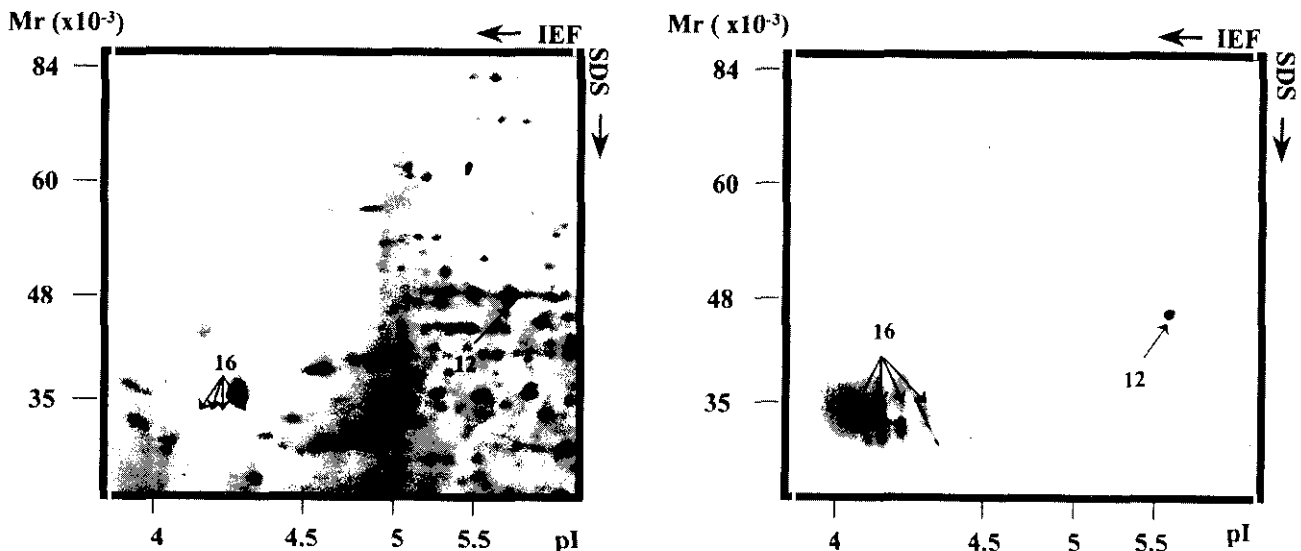


Figure 6. Left: Detail of the two-dimensional silver-stained electropherograms of *C. albicans* protoplasts-secreted proteins. Arrows indicate spots matching with immunoreactive spots in Western blot with serum from a patient with systemic candidiasis (number 1). Right: Western blots of similar electropherograms with serum from patient number 1.

useful for the diagnosis as well as monitoring the evolution of the disease.

We thank the colleagues who provided us with the antibodies used here for protein identification: J. P. Martínez and M. L. Gil (anti-GAPDH), A. Cassone, R. La Valle and C. Bromuro (anti-Hsp70), and P. Sullivan (anti-Bg12). We also thank W. H. Goessens and J. Pontón for supplying several reagents and M. Molina for encouragement and

critical discussions for improvement of the manuscript. We are grateful to Nicholas Skinner for revising the English manuscript. This work was supported by grants SAF96-1540 and FIS 97/0047-01. A. Pitarch and M. Pardo were the recipients of fellowships from Fundación Ramón Areces and from the Ministerio de Educación y Ciencia of Spain, respectively.

Received November 16, 1998

5 References

- [1] Anaissie, E. J., *Clin. Infect. Dis.* 1992, 14, 43–53.
- [2] Fox, J. L., *ASM News* 1993, 10, 515–518.
- [3] Dixon, D. M., McNeil, M. M., Cohen, M. L., Gellin, B. G., La, M. J., *Public Health Rep.* 1996, 111, 226–235.
- [4] Casadevall, A., *Infect. Immunol.* 1995, 63, 4211–4218.
- [5] Fukazawa, Y., Cassone, A., Bistoni, F., Howard, D. H., Kagaya, K., Murphy, J. W., Cenci, E., Lane, T. E., Mencacci, A., Puccetti, P., *J. Med. Vet. Mycol.* 1994, 32, 123–131.
- [6] Levitz, S. M., *Clin. Infect. Dis.* 1992, 14, S37–S42.
- [7] Fidel, Jr., P. L., Sobel, J. D., *Clin. Microbiol. Rev.* 1996, 9, 335–348.
- [8] Matthews, R., Burnie, J., *Trends Microbiol.* 1996, 4, 354–358.
- [9] Alloush, H. M., Lopez-Ribot, J. L., Masten, B. J., Chaffin, W. L., *Microbiology* 1997, 143, 321–330.
- [10] Matthews, R., Burnie, J., *FEMS Microbiol. Lett.* 1989, 51, 25–30.
- [11] La Valle, R., Bromuro, C., Ranucci, L., Muller, H. M., Crisanti, A., Cassone, A., *Infect. Immunol.* 1995, 63, 4039–4045.
- [12] Gil-Navarro, I., Gil, M. L., Casanova, M., O'Connor, J. E., Martinez, J. P., Gozalbo, D., *J. Bacteriol.* 1997, 179, 4992–4999.
- [13] Macdonald, F., Odds, F. C., *JAMA* 1980, 243, 2409–2411.
- [14] Strockbine, N. A., Largen, M. T., Zweibel, S. M., Buckley, H. R., *Infect. Immunol.* 1984, 43, 715–721.
- [15] Shen, H. D., Choo, K. B., Lee, H. H., Hsieh, J. C., Lin, W. L., Lee, W. R., Han, S. H., *Clin. Exp. Allergy* 1991, 21, 675–681.
- [16] Swoboda, R. K., Bertram, G., Hollander, H., Greenspan, D., Greenspan, J. S., Gow, N. A., Gooday, G. W., Brown, A. J., *Infect. Immunol.* 1993, 61, 4263–4271.
- [17] Martinez, J. P., Gil, M. L., Lopez-Ribot, J. L., Chaffin, W. L., *Clin. Microbiol. Rev.* 1998, 11, 121–141.
- [18] Jones, J. M., *Clin. Microbiol. Rev.* 1990, 3, 32–45.
- [19] van Deventer, A. J., van Vliet, H. J., Hop, W. C., Goessens, W. H., *J. Clin. Microbiol.* 1994, 32, 17–23.
- [20] Mitsutake, K., Miyazaki, T., Tashiro, T., Yamamoto, Y., Kakeya, H., Otsubo, T., Kawamura, S., Hossain, M. A., Noda, T., Hirakata, Y., Kohno, S., *J. Clin. Microbiol.* 1996, 34, 1918–1921.
- [21] O'Farrell, P. H., *J. Biol. Chem.* 1975, 250, 4007–4021.
- [22] Wilkins, M. R., Williams, K. L., Appel, R. D., Hochstrasser, D. F. (Eds.), *Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics*, Springer-Verlag, Berlin 1997.
- [23] Gillum, A. M., Tsay, E. Y. H., Kirsch, D. R., *Mol. Gen. Genet.* 1984, 198, 179–182.
- [24] Pla, J., Gil, C., Monteoliva, L., Navarro-García, F., Sánchez, M., Nombela, C., *Yeast* 1996, 12, 1677–1702.
- [25] Gil, C., Pomés, R., Nombela, C., *J. Gen. Microbiol.* 1988, 134, 1587–1595.
- [26] Pardo, M., Monteoliva, L., Pla, J., Sánchez, M., Gil, C., Nombela, C., *Yeast* 1999, in press.
- [27] Soll, D. R., Mitchell, L. H., *J. Cell Biol.* 1983, 96, 486–493.
- [28] Cabib, E., Duran, A., *J. Bacteriol.* 1975, 124, 1604–1606.
- [29] Bradford, M. M., *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- [30] Bjellqvist, B., Pasquali, C., Ravier, F., Sanchez, J.-C., Hochstrasser, D. F., *Electrophoresis* 1993, 14, 1357–1365.
- [31] Laemmli, U. K., *Nature* 1970, 227, 680–685.
- [32] Merrill, C. R., Goldman, D., Van Keuren, M. L., *Electrophoresis* 1982, 3, 17–21.
- [33] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979, 76, 4350–4354.
- [34] Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (Eds.), *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, New York 1995.
- [35] Manning, M., Mitchell, T. G., *J. Bacteriol.* 1980, 144, 258–273.
- [36] Manning, M., Mitchell, T. G., *Infect. Immun.* 1980, 30, 484–495.
- [37] Brown, L. A., Chaffin, W. L., *Can. J. Microbiol.* 1981, 27, 580–585.
- [38] Finney, R., Langtimm, C. J., Soll, D. R., *Mycopathologia* 1985, 91, 3–15.
- [39] Niimi, M., Shepherd, M. G., Monk, B. C., *Arch. Microbiol.* 1996, 166, 260–268.
- [40] Shevchenko, A., Jensen, O. N., Podtelejnikov, A. V., Sagliocco, F., Wilm, M., Vorm, O., Mortensen, P., Bouche-rie, H., Mann, M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996, 93, 14440–14445.
- [41] Angioletti, L., Simonetti, N., Cassone, A., *J. Antimicrob. Chemother.* 1994, 33, 1137–1146.
- [42] Marzocchi, B., Bini, L., Liberatori, S., Raggiaschi, R., Cellesi, C., Pallini, V., Rossoloni, A., *3rd Siena 2-D Electrophoresis Meeting* 1998, Abstract.