







# Análisis de los mecanismos de respuesta a bajas temperaturas y a estrés del retículo endoplásmico

Memoria presentada por Sara García Marqués para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Valencia.

Programa de doctorado de Biotecnología.

Valencia, Octubre 2013



El Dr. José Antonio Prieto Alamán, Investigador Científico del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos de Valencia y la Dra. Francisca Randez Gil, Científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos de Valencia,

Certifican:

Que D<sup>a</sup>. Sara García Marqués, licenciada en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Análisis de los mecanismos de respuesta a bajas temperaturas y a estrés del retículo endoplásmico” que presenta para optar al grado de Doctora en Biología por la Universidad de Valencia.

Valencia, Octubre de 2013

Dr. José Antonio Prieto Alamán

Dra. Francisca Randez Gil



## **Agradecimientos**

Cuando comencé como becaria predoctoral en el IATA, veía muy lejos este momento y ahora, estoy escribiendo los agradecimientos de mi tesis. En general, ha sido un gran reto personal que no hubiera podido superar sin el apoyo de todas las personas que me han ayudado, espero no dejarme a nadie...

En primer lugar, quiero agradecerles a Paqui y José la oportunidad que me dieron de realizar esta tesis y lo que me han enseñado a lo largo de todo el proceso, desde el trabajo de bancada hasta la redacción de este trabajo.

También, a todos los investigadores que aportaron cepas, plásmidos, anticuerpos o aparatos necesarios para la realización de experimentos que, sin su colaboración, no hubieran sido posibles.

A todos los amigos de la tercera planta que he hecho durante estos años y espero mantener, gracias por hacer más divertidos los días. En especial a mis compañeros de laboratorio: Lidia, Isaac, Lorena, Roberto, Elena, Paco, Rocío... por esas cenas caseras y las escapadas a las fiestas de Fleix (también a ti, Antonio). Y a María, mi compi de máster y piso por estar ahí desde el principio.

Por último y más importante, gracias a mi familia: José Luis, Andrea, María, Chema y Cristóbal por vuestro apoyo y cariño.



**A mi padre.**



<b>INDICE</b>	11
<b>ABREVIATURAS</b>	15
<b>INTRODUCCIÓN</b>	17
1.- Uso de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como cepa industrial	19
1.1.- Necesidades de mejora de cepas industriales	20
2.- Estrés por frío y congelación	22
2.1.- La respuesta a frío y congelación	24
2.2.- La función crioprotectora de la respuesta a frío	27
3.- Percepción y transducción de la señal	28
3.1.- La ruta HOG	28
4.- Regulación del repertorio de proteínas de membrana en respuesta a frío	33
4.1.- Control de calidad de las proteínas: el retículo endoplásmico	34
4.2.- Homeostasis de la abundancia de proteínas y su importancia en la membrana plasmática	38
5.- La funcionalidad de la membrana plasmática: asimetría y flipasas	41
<b>JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS</b>	49
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	55
1.- Cepas	57
2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	57
2.1.- Bacterias	57
2.2.- Levaduras	58
3.- Métodos de manipulación de microorganismos	59
3.1.- Transformación de bacterias	59
3.2.- Transformación de levaduras	59
3.3.- Análisis de la inserción del casete de interrupción	60
4.- Métodos de manipulación del ADN	60
4.1.- Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	60

4.2.- Obtención de ADN plasmídico de levadura	60
4.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	61
4.4.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa	62
4.5.- Aislamiento de fragmentos de ADN en geles de agarosa	62
4.6.- Clonación	62
4.7.- Rastreo de supresores en multicopia	63
4.8.- Secuenciación y análisis de las secuencias	63
5.- Métodos de manipulación de ARN	64
5.1. Extracción de ARN	64
5.2. Transferencia de ARN a filtros de nylon (Northern-blot)	65
5.3. Perfiles de polisomas	66
6.- Determinación de actividades enzimáticas	67
6.1.- Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa	67
6.2.- Ensayo de Anexina V	67
6.3.- Ensayo de secreción de invertasa	68
6.4.- Determinación de la concentración de proteínas	69
6.5.- Cuantificación de glicerol	69
7.- Técnicas de análisis de proteínas.	70
7.1.- Geles bidimensionales de proteínas	70
7.2.- SDS-PAGE	72
7.3.- Transferencia a membranas de nitrocelulosa	73
7.4.- Inmunodetección	73
7.5.- Aislamiento de proteínas asociadas a "rafts"	74
7.6.- Purificación de afinidad en tándem (TAP)	75
8.- Técnicas de microscopía	76
8.1.- Microscopía de fluorescencia	76
8.2.- Cuantificación de quitina	77
9.- Determinación de la capacidad fermentativa	77
10.- Medidas de anisotropía	78
TABLAS	79

<b>RESULTADOS</b>	91
1.- Las MAP quinasas Pbs2p y Hog1p juegan un papel importante en la supervivencia de <i>S. cerevisiae</i> a estrés del retículo endoplásmico	91
2.- La resistencia a Tunicamicina depende de la rama <i>Sn1</i> de la ruta HOG	93
3.- La actividad de la ruta HOG determina el nivel de sensibilidad a estrés del RE	93
4.- Fosforilación de Hog1p y su translocación al núcleo	96
5.- La actividad de la ruta HOG no altera la señalización de la UPR	99
6.- La proteína Hog1p participa en la respuesta transcripcional durante estrés del RE	101
7.- La producción de glicerol en respuesta a tunicamicina proporciona protección frente a los efectos tóxicos de la droga	103
8.- La exclusión de Hog1p del núcleo no afecta al crecimiento en presencia de tunicamicina	106
9.- La producción de glicerol en respuesta a tunicamicina es independiente de la translocación al núcleo de Hog1p	108
10.- Hog1p participa en la fosforilación de Tdh3p en respuesta a tunicamicina	112
11.- Hog1p es necesaria para recuperar la actividad traduccional durante la adaptación al estrés del RE	114
<b>DISCUSIÓN</b>	116

<b>RESULTADOS</b>	128
1.- Aislamiento de supresores en multicopia	128
2.- Caracterización de los plásmidos aislados	130
3.- Endocitosis: un proceso regulado a baja temperatura	133
3.1.- Aly2p como adaptador de endocitosis	133
3.2.- Caracterización fenotípica de la proteína J Caj1	135

3.3.- <i>UBP13</i> : la hidrolasa en C-terminal de la ubiquitina	138
3.4.- Regulación de los transportadores de membrana y papel funcional de Rsp5p	139
3.5.- La sobreexpresión de <i>ALY2</i> aumenta la abundancia de Tat2p, una proteína esencial para el crecimiento en frío de <i>S. cerevisiae</i> .	142
3.6.- Mejora del crecimiento a bajas temperaturas de cepas industriales	144
4.- Caracterización del papel funcional de Sng1p en la tolerancia a bajas temperaturas	147
4.1.- La proteína Sng1p se localiza en estructuras de la membrana plasmática interaccionando con rafts lipídicos.	147
4.2.- La sobreexpresión de <i>SNG1</i> altera la actividad de proteínas de membrana	150
4.3.- Sng1p afecta a la fluidez de membrana	154
4.4.- La sobreexpresión de <i>SNG1</i> alivia el defecto de crecimiento en frío del mutante <i>drs2Δ</i>	155
4.5.- La sobreexpresión de <i>SNG1</i> no altera significativamente el transporte de proteínas en la ruta de secreción	157
4.6.- La actividad de Sng1p afecta a la translocación de los fosfolípidos de la membrana	159
4.7.- Identificación de proteínas que interaccionan con <i>SNG1</i>	162
4.8.- Estudio de la dependencia del efecto de <i>SNG1</i> sobre la funcionalidad del módulo de señalización Pkh-Fpk	164
4.9.- La delección combinada de los genes <i>NCE102</i> y <i>SNG1</i> revela una interacción genética del tipo sintético-enferma	169
<b>DISCUSIÓN</b>	172
<b>PERSPECTIVAS</b>	179
<b>CONCLUSIONES GENERALES</b>	183
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	187

## ABREVIATURAS

**2D:** Electroforesis bidimensional

**A:** Absorbancia

**ADN:** Ácido desoxirribonucleico

**ARN:** Ácido ribonucleico

**ART:** Arrestin-related trafficking adaptors

**ATP:** Adenosine triphosphate

**CDD:** Conserved domains database

**CFW:** Calcofluor white

**CWI:** Cell wall integrity

**DMSO:** Dimetilsulfóxido

**dNTPS:** Deoxyribonucleotide

**DO:** Densidad óptica

**DPH:** 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene

**DTT:** Ditioneitol

**Dubs:** Enzimas de desubcutilación

**dw:** Dry weight

**ERAD:** Endoplasmic reticulum associated protein degradation

**G6PDH:** Glucose 6-phosphate deshidrogenase

**GA3P:** Glycerinaldehyde-3-phosphate

**GFP:** Green fluorescent protein

**h:** hora

**HA:** Hemaglutinina

**HOG:** High osmolarity glycerol

**HSP:** Heat shock protein

**IgG:** Inmunoglobulina G

**Kb:** Kilobases

**MAP:** Mitogen-activated protein

**MAPK:** MAP kinase

**MAPKK:** MAPK kinase

**MAPKKK:** MAPKK kinase

**mARN:** ARN mensajero

**MCC:** Membrane compartment of Can1

**MCP:** Membrane compartment of Pma1

**MIPC:** Mannosylinositol phosphorylceramide

**MIPS:** Munich information center for protein information

**Myr:** Myriocine

**NCBI:** National center for biotechnology information

**o-NPG:** ortho-Nitrophenyl- $\beta$ -galactoside

**ORF:** Open reading frame

**PCR:** Polymerase chain reaction

**PE:** Phosphatidylethanolamine

**PHS:** Phytosphingosine

**PS:** Phosphatidylserine

**F:** Fosfato

**p/v:** peso/volumen

**RE:** Retículo endoplásmico

**rpm:** revoluciones por minuto

**ROS:** Reactive oxygen species

**SDS-PAGE:** Sodium dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis

**SIB:** Swiss Institute of Bioinformatics

**TAP:** Tandem affinity purification

**tARN:** ARN de transferencia

**Tn:** tunicamicina

**UPR:** Unfolded protein response

**UPRE:** UPR element

**v/v:** volumen/volumen

# **INTRODUCCIÓN**

---



## 1.- Uso de *Saccharomyces cerevisiae* como cepa industrial

Desde hace miles de años la levadura *Saccharomyces cerevisiae* ha sido utilizada por el hombre para la transformación y elaboración de alimentos como el pan y bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza. Además, su clasificación como organismo GRAS y sus características de crecimiento, la han convertido en un microorganismo importante para la producción industrial de compuestos de alto valor añadido como glicerol, propanodiol, ácidos orgánicos, esteroides o isoprenoides entre otros (Nevoigt, 2008), así como, para la obtención de proteínas heterólogas de uso farmacéutico (Porro y col., 2005).

Por otro lado, *S. cerevisiae* está en el centro de la actividad investigadora de grupos de todo el mundo, debido a su facilidad de transformación, de análisis genético y por ser el primer organismo eucariota cuyo genoma fue completamente secuenciado (Goffeau y col., 1997). Estas características hacen que sea una levadura modelo para la investigación, tanto básica como aplicada. Así, después de más de una década de investigación post-genómica, *S. cerevisiae* es el centro del desarrollo de herramientas de alto rendimiento “high-throughput” como proteómica, genómica, metabolómica, etc., que han permitido iniciar el estudio a nivel global de la respuesta a diferentes estreses (Teixeira y col., 2011). También, se ha establecido como modelo eucariótico para el estudio de procesos biológicos fundamentales como el envejecimiento, transporte de mensajeros, ciclo celular y de enfermedades humanas como el cáncer (Spradling y col., 2006).

A pesar de todo esto, aún estamos lejos de conocer en profundidad las bases moleculares que determinan el comportamiento de este

organismo en diferentes condiciones y en particular, en aquellas que cobran importancia a nivel industrial. Debido al continuo empeño del ser humano por seleccionar las cepas más adaptadas a cada proceso y a la demanda de nuevas aplicaciones biotecnológicas, se ha hecho patente la necesidad de un mayor conocimiento de este organismo, sobretodo de aquellos mecanismos que intervienen en la respuesta y adaptación a los diferentes ambientes y estreses a los que se enfrenta en la industria.

### **1.1.- Necesidades de mejora de cepas industriales**

En España el sector panadero mueve casi 4000 millones de Euros al año, lo que supone más del 30% de la industria alimentaria del país. Debido a la proliferación de los denominados “puntos calientes”, en los que el consumidor puede encontrar productos de panadería recién hechos, este sector está afrontando una gran reestructuración por la aparición de productos semielaborados, como las masas congeladas que ya constituyen el 80% de la producción total (Ministerio de Agricultura, Alimentación y Medio Ambiente, 2012. [www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es)).

Se entiende por masa congelada, aquella que una vez realizado el formado de la pieza, es sometida a ultracongelación, se almacena a -20°C hasta su utilización cuando es descongelada, se fermenta y se hornea. El principal problema para conseguir un producto de buena calidad, es la disminución de la capacidad de producir y retener el CO<sub>2</sub> durante el proceso de fermentación de la masa. Esto se debe principalmente a los daños en la red de gluten, la pérdida de viabilidad y de capacidad fermentativa de la levadura producidos durante la congelación (Randez-Gil y col., 1999).

Con el fin de paliar los efectos que causa el almacenamiento en congelación sobre la calidad del producto final, la industria ha tenido que realizar modificaciones sobre el proceso tradicional de panificación, dirigidas principalmente a aumentar la capacidad de retención de CO<sub>2</sub> por la masa y preservar la viabilidad de las levaduras. Sin embargo, estos cambios no son suficientes para obtener un producto de calidad, por lo que la cantidad de levadura debe aumentarse en las formulaciones (entre un 2 a un 8% base harina), lo que supone un mayor coste. Aún así, el producto final es de menor volumen y están afectadas tanto sus características organolépticas como de calidad.

En la industria vínica, se ha producido un aumento en la demanda de cepas para usos específicos (Pretorius, 2000). La tendencia de elaborar vinos blancos y rosados a bajas temperaturas (13°C), para desarrollar un aroma y sabor diferentes a los producidos tradicionalmente, se ha incrementado en los últimos años (Beltrán y col., 2006). En estas condiciones aumenta el grado de retención de los metabolitos que constituyen los sabores varietales del vino, pero también se incrementa la concentración de aromas secundarios derivados de la actividad de la levadura. El crecimiento a baja temperatura reduce la producción de alcoholes superiores y compuestos no deseados, como ácido acético y acetato etílico, mientras que la cantidad de ésteres afrutados es mayor.

Sin embargo, este descenso de la temperatura también tiene sus desventajas, ya que supone un incremento de la fase de latencia (lag), aumentando la duración del proceso y por tanto, los riesgos de contaminación o parada de la fermentación, además de reducir la relación coste-eficiencia. Por todo ello, la fermentación del mosto y la calidad del vino dependen directamente de la capacidad de la levadura para

responder y adaptarse a las bajas temperaturas. Mientras que cierto grado de adaptación se puede abordar pre-incubando la levadura en determinadas condiciones, lo más determinante para la tolerancia a estrés, es la constitución genética de la cepa utilizada. En este contexto, el desarrollo de cepas de levadura de panadería con mejor resistencia a la congelación y de cepas vínicas bien adaptadas a la fermentación a bajas temperaturas es de gran interés económico. La aplicación de procesos de mejora y selección mediante técnicas de genética clásica, ha constituido una valiosa herramienta para mejorar las características de las levaduras industriales. Sin embargo, estas técnicas carecen de la especificidad necesaria para modificar una propiedad sin alterar otras de importancia.

## **2.- Estrés por frío y congelación**

Las bajas temperaturas influyen negativamente sobre las propiedades estructurales y funcionales de los componentes celulares. Alteran el correcto funcionamiento de la maquinaria transcripcional y traduccional, ya que, estabilizan las estructuras secundarias de ADN y ARN, afectando a la síntesis de proteínas. Por otro lado, se produce una reducción en la fluidez de la membrana plasmática modificando su funcionamiento (Los y Murata, 2004). Un descenso en la temperatura, provoca una transición en la membrana plasmática de su estado líquido-cristalino habitual, a estado gel. Este aumento de la rigidez de la membrana, es sumamente importante para la fisiología de la célula, ya que afecta a su función, por ejemplo, induciendo la agregación de proteínas, disminuyendo la tasa de fusión lateral, aumentando la permeabilidad a

cationes y agua y reduciendo la actividad de enzimas y transportadores asociados a la membrana (Inouye y Phadtare, 2004).

En cuanto a este último caso, es ampliamente conocido que la toma de triptófano constituye un factor limitante del crecimiento de la levadura en condiciones de estrés (Abe y Iida, 2003). Por lo tanto, la sensibilidad de las permeasas de triptófano a los cambios en la fluidez de membrana podría determinar el perfil de crecimiento de *S. cerevisiae* a baja temperatura (Abe y Horikoshi, 2000).

Cuando la temperatura desciende por debajo de cero grados, pasamos a hablar de estrés por congelación. Se sabe que es un proceso complejo y multifactorial, en el cual se producen varias situaciones de estrés para las levaduras. Mientras que el frío reduce o detiene el crecimiento, la congelación es letal para la célula.

La formación y crecimiento de cristales de hielo supone un estrés mecánico para la célula. Los daños producidos dependen de la velocidad de congelación. Si ésta se produce rápidamente, da lugar a cristales intracelulares de hielo que rompen membranas internas, orgánulos y desnaturalizan macromoléculas. Sin embargo, si el enfriamiento es lento, la formación de cristales es principalmente extracelular lo que supone un flujo de agua hacia el exterior de la célula, con el consiguiente estrés osmótico y pérdida de turgencia. En ambos casos, una congelación de larga duración aumenta el tamaño de los cristales y acaba por producir daños en la membrana plasmática y la pared celular pudiendo derivar en lisis (Todorova y col., 2012).

También se asocia al proceso de congelación/descongelación la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS), suponiendo un estrés oxidativo para la célula. Se crean a partir de radicales superóxido y

electrones liberados de la cadena de transporte de electrones de la mitocondria. Las ROS causan, entre otros, inactivación de proteínas y daño en el ADN (Park y col., 1997).

Por otro lado, de manera similar a lo descrito para los cristales de hielo, las ROS producen daños en macromoléculas como las proteínas. Éstos pueden inducir un mal plegamiento de las mismas debido a la desnaturalización de sus estructuras, ya sea por daño mecánico u oxidativo. Además, cuando las células están expuestas a estrés ambiental, se produce acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplásmico (RE). Entonces, la levadura se ve sometida a la toxicidad del llamado estrés por proteínas mal plegadas (Kohno, 2007), el cual conlleva la agregación y/o interacción incorrecta de las mismas, impidiendo su óptimo funcionamiento, lo que afecta a la viabilidad de la célula y en ocasiones produce muerte celular (Stefani y Dobson, 2003).

Debido a la participación de tantos y tan dispares estreses, es lógico pensar que la célula debe desencadenar diversos tipos de respuestas para contrarrestarlos y además, parece evidente que estas respuestas puedan estar interconectadas. Así, es probable que la adquisición de tolerancia a la congelación implique el funcionamiento coordinado de varios mecanismos.

## **2.1.- La respuesta a frío y congelación**

Ya sea en la naturaleza, debido a los ciclos estacionales o en la industria alimentaria, *S. cerevisiae* está expuesta a variaciones de temperatura y parece evidente, que este organismo disponga de la

maquinaria molecular necesaria para sobrevivir y adaptarse. El estudio de esta respuesta molecular ha recibido poca atención, pero el auge de las técnicas analíticas de alto rendimiento, ha dado lugar a estudios recientes que aportan información sobre la respuesta de la levadura a un descenso brusco de la temperatura (“cold-shock”) y su significado fisiológico.

Un método para analizar la respuesta a frío, es la identificación de mutantes sensibles a dicho estrés. De los 106 identificados ([mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast](https://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast)), gran cantidad están afectados en proteínas ribosomales y de traducción, proteínas involucradas en el procesado del ARN y biogénesis de ribosomas o en el plegamiento de proteínas (Aguilera y col., 2007). Estos resultados revelan la importancia de la reorganización de la maquinaria de síntesis de proteínas, ya sea a nivel de transcripción y traducción, o del procesamiento posterior.

Por otro lado, el estudio del patrón de expresión génica tras un descenso de la temperatura, revela una variación del mismo en función de la duración e intensidad del estrés. Así, la respuesta temprana (<2 horas) supone la inducción de genes asociados a la maquinaria de transcripción y de genes relacionados con la composición y fluidez de la membrana plasmática, como por ejemplo: *INO1* o *OPI3* implicados en la síntesis de fosfolípidos (Donahue y Henry, 1981; McGraw y Henry, 1989) y *OLE1* la única desaturasa de ácidos grasos de *S. cerevisiae* (Stukey y col., 1990). Sin embargo, muchos de estos genes sufren una fuerte represión en situaciones de estrés prolongado (>12 horas). En este caso, se observa la inducción de genes que codifican proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos, como la trehalosa (*TPS1,2*, *TSL1*) y de proteínas relacionadas con la resistencia a otras situaciones de estrés,

como choque térmico (familia HSP) o estrés oxidativo (*CTT1*), entre otros (Schade y col., 2004; Murata y col., 2006).

En cuanto a la respuesta a congelación, el análisis de la expresión génica revela la inducción de genes de choque térmico (HSP), de genes relacionados con la resistencia a estrés oxidativo y con el metabolismo de la glucosa (Odani y col., 2003). Al analizar una colección de mutantes, se identificaron 58 genes cuya ausencia genera sensibilidad a congelación, de los cuales, la mayoría eran componentes de la ATPasa de protones vacuolar encargada de regular la homeostasis del pH y genes necesarios para mantener la integridad de la pared celular o que codifican proteínas ribosomales (Shima y Takagi, 2009).

No es de extrañar, que puesto que la membrana es la primera barrera que separa la célula del medio, sea la diana primaria del daño por frío y congelación, por lo que, sus características influyen en la tolerancia de la levadura a este estrés. El principal mecanismo de la levadura para contrarrestar el aumento de rigidez de la membrana en respuesta a un descenso de la temperatura, es la insaturación de sus ácidos grasos. Se ha demostrado que el aumento del grado de insaturación de los fosfolípidos de esta estructura, reduce su punto de fusión e incrementa su flexibilidad y a su vez, la fluidez de la membrana (Rodríguez-Vargas y col., 2007). También se han descrito otras estrategias como el acortamiento de las cadenas de ácidos grasos, como método para aumentar la fluidez de membrana (López-Malo y col., 2013).

Hasta hace poco se pensaba en la membrana como una estructura simétrica, sin embargo, se ha demostrado que no lo es, puesto que contiene microdominios como los denominados “rafts”. Éstos son estructuras formadas por esfíngolípidos y ergosterol con las que se

asocian determinadas proteínas (Bagnat y col., 2000), creando microambientes. Estudios recientes muestran que los rafts son importantes para el tráfico y secreción de proteínas, como la protón ATPasa Pma1p, varias permeasas como la de uracilo Fur4p, la permeasa general de aminoácidos Gap1p o la permeasa de alta afinidad de triptófano Tat2p (Daicho y col., 2009).

## **2.2.- La función crioprotectora de la respuesta a frío**

Un análisis pormenorizado de la expresión génica a baja temperatura, pone de manifiesto que muchos de los genes inducidos no suponen ninguna ventaja para el crecimiento, pero sí para la resistencia a la congelación. Estas evidencias sugieren que el objetivo de la respuesta a frío es, en parte, la inducción de mecanismos de protección celular contra el daño por congelación. Por ejemplo, la sobreexpresión de *OLE1* no mejora el crecimiento a 10°C, incluso tiene efectos negativos sobre el crecimiento a 30°C (Stukey y col., 1990; Nakagawa y col., 2002). Además, la producción en levadura de  $\Delta^{12}$ -desaturasas de girasol reduce el crecimiento a baja temperatura, pero influye positivamente en la resistencia a congelación (Rodríguez-Vargas y col., 2007). Otro caso es el de *GPD1*, que codifica para la primera enzima de la ruta de síntesis de glicerol. Su inducción tras una bajada de la temperatura, supone la acumulación de dicho osmolito en la célula; sin embargo, se ha descrito que la sobreproducción de glicerol confiere crioprotección pero no mejora el crecimiento de *S. cerevisiae* a 12°C (Panadero y col., 2006).

Estos y otros resultados, indican que existe una relación entre la exposición a bajas temperaturas y la resistencia a congelación, aunque se requiere más conocimiento sobre la respuesta a frío para esclarecer su papel en el crecimiento a baja temperatura y como mecanismo protector contra la congelación.

### **3.- Percepción y transducción de la señal**

Para minimizar los efectos nocivos de los estreses a los que se ve sometida, tanto en la naturaleza como en la industria, la levadura ha desarrollado mecanismos de respuesta y adaptación a estas condiciones desfavorables. Aunque no se conoce bien como *S. cerevisiae* es capaz de percibirlos, se sabe que la respuesta consiste, entre otros, en la activación de rutas de transducción de la señal que desencadenan la síntesis de proteínas de estrés, a través de determinados factores de transcripción.

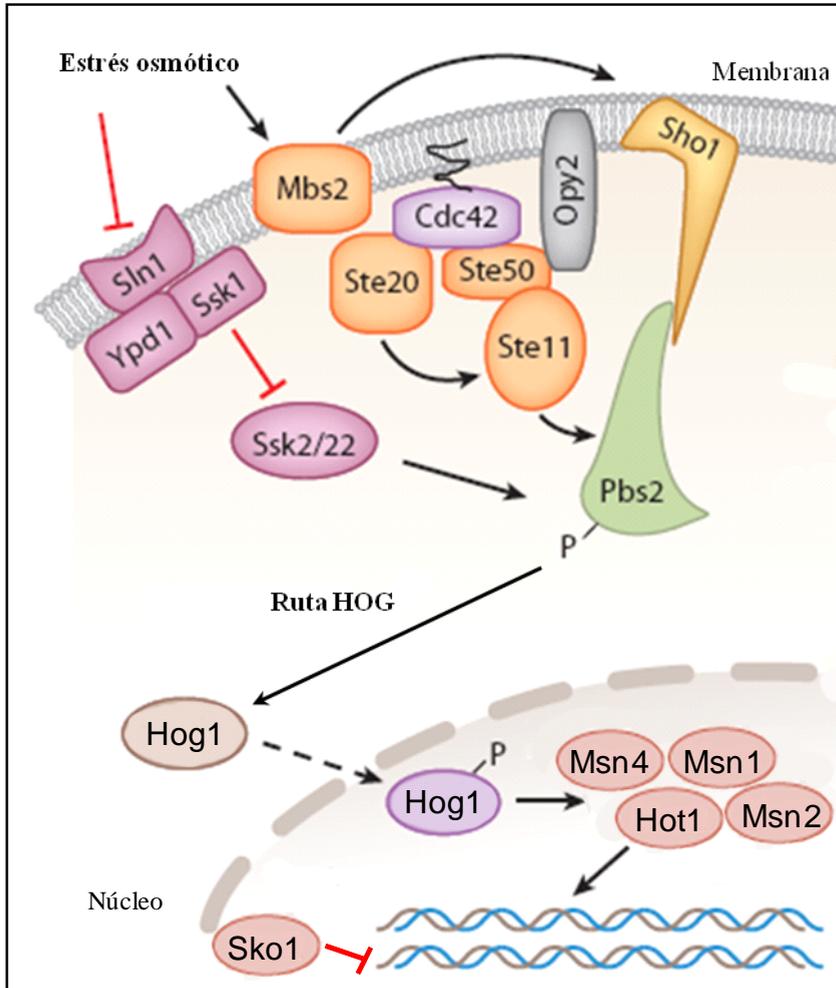
#### **3.1.- La ruta HOG:**

La ruta HOG es una de las cinco rutas de MAP (“Mitogen Activated Protein”) quinasas (MAPK) caracterizadas en *S. cerevisiae* (Gustin y col., 1998) y la principal responsable de la activación transcripcional durante la adaptación a estrés osmótico. En levaduras, las rutas de MAPK consisten en una cascada de fosforilación entre tres quinasas, la MAPKKK, la MAPKK y la MAPK. En el caso de la ruta HOG, la señal se puede iniciar mediante dos mecanismos independientes, ambos basados en un sistema sensor y la MAPKKK. Las dos vías son redundantes, ya que los mutantes

para cada una muestran una activación completa de la ruta y no son osmosensibles. Como se detalla en la Fig.1, en una situación de estrés osmótico los osmosensores (Sln1p/Sho1p) inician una transducción de la señal que culmina con la activación transcripcional, dependiente de Hog1p, por diferentes vías. Por un lado, la MAPK está involucrada en desactivar al represor Sko1p, el cual en condiciones óptimas de crecimiento, recluta al complejo Ssn6p-Tup1p para reprimir la transcripción (Proft y Serrano, 1999). Genes como *ENA1*, la ATPasa de sodio, son inducidos de este modo. Otra situación diferente es la activación de Msn1p y Hot1p, dos factores dependientes de Hog1p, que son requeridos para la transcripción de *GPD1* y otros genes relacionados con la osmoadaptación (Rep y col., 2000). Finalmente, la activación parece depender de los factores transcripcionales Msn2p y Msn4p (Martínez-Pastor y col., 1996). Además, Hog1p ha sido incluida, junto a dichos factores, en el complejo de activación transcripcional de *CTT1*, el cual codifica para catalasas citosólicas (Alepuz y col., 2001). Actualmente, no está clara la necesidad de la entrada al núcleo de Hog1p para la activación de mecanismos de respuesta a estrés osmótico. Recientemente se ha descrito que la MAPK tiene un papel citosólico, estableciendo las condiciones necesarias para la producción de glicerol (Westfall y col., 2008). Sin embargo, las dianas citosólicas reguladas por Hog1p están poco caracterizadas.

La ruta HOG tiene funciones adicionales a la osmoregulación. Varios estudios indican que la ruta es esencial para la adaptación al ácido cítrico (Lawrence y col., 2004), estrés por calor (Winkler y col., 2002) y por bajas temperaturas (Panadero y col., 2006). La actividad basal de HOG también está involucrada en la resistencia a metilglioxal (Aguilera y col., 2005), la distribución de proteínas a través del Golgi (Reynolds y col.,

1998) y el mantenimiento de la pared celular (García-Rodríguez y col., 2000).



(Modificado de Randez-Gil y col., 2013)

**Fig. 1. Esquema de la ruta HOG en *S. cerevisiae*.** Cuando la presión osmótica del medio aumenta, la señal puede transmitirse mediante dos mecanismos independientes, la rama de Sln1p y la de Sho1p. La cascada iniciada

por cada vía converge en una MAPKK común, Pbs2p, que es el activador específico de la MAPK Hog1p. En el primer caso, Sln1p actúa de osmosensor formando un sistema de dos componentes junto con Ypd1p y Ssk1p, el cual activa a las MAPKKs redundantes Ssk2p y Ssk22p encargadas de fosforilar a Pbs2p. La otra rama comienza con la proteína transmembrana Sho1p, descrita inicialmente como un osmosensor específico. Bajo condiciones de estrés, su función es reclutar a Pbs2p que será activado por la MAPKK Ste11p mediante un proceso complejo y no bien caracterizado, que requiere de la participación de otros factores (Saito y Posas, 2012). Una vez activado, Pbs2p transmite la señal a Hog1p que migra al núcleo e inicia la activación transcripcional de genes necesarios para la respuesta adaptativa.

En cuanto a la activación de Hog1p por frío, se ha observado su fosforilación y translocación al núcleo en respuesta a una bajada de la temperatura. Ocurre de forma específica a través de la rama de Sln1p de la ruta, lo que, sugiere que este estrés es percibido por la célula de forma diferente al osmótico. Como hemos dicho, la membrana plasmática sufre una rigidificación en frío. De acuerdo a esto, la fosforilación de Hog1p se estimula a 30°C, también de forma específica por Sln1p, al exponer las células a dimetil sulfóxido (DMSO) un agente rigidificante de la membrana. Esto sugiere que Sln1p podría detectar cambios en la fluidez de membrana (Panadero y col., 2006).

Además, la activación de Hog1p a bajas temperaturas afecta a la respuesta transcripcional, ya que su ausencia, altera la expresión inducida por frío de distintos genes. En particular, la inducción de *GPD1* dependiente de Hog1p, aumenta la producción de glicerol a 12°C y es aún mayor a temperaturas próximas a la congelación (4°C). Aunque mutantes *hog1Δ* no presentan defectos de crecimiento a 12°C, la delección de la

MAPK o de *GPD1* disminuye la tolerancia a congelación de células preincubadas a baja temperatura. Así, una exposición a frío inicia, de forma dependiente de Hog1p, la acumulación de glicerol, que también es esencial para la protección frente a estrés por congelación.

El estudio de Panadero y col. (2006), muestra que la ruta HOG sólo es requerida para la expresión de un conjunto de genes inducidos a 12°C. Esto sugiere que en *S. cerevisiae* existen rutas de señalización inducidas por frío que difieren en dianas y funciones. Estos genes independientes de Hog1p pueden ser importantes para el crecimiento a baja temperatura. Por otro lado, parece probable que Hog1p controle mecanismos adicionales de protección a 12°C diferentes de la ya mencionada sobreproducción de glicerol.

Aunque el conocimiento sobre los mecanismos que permiten a la célula adaptarse y sobrevivir en condiciones de estrés es cada vez más extenso, éste debe continuar, ya sea para aclarar qué rutas de señalización participan en la respuesta a frío, como para profundizar en todos los aspectos del papel de la ruta HOG. A este respecto cabe señalar que, aunque la adaptación a nivel transcripcional ha sido la más estudiada debido a la facilidad y rapidez de las técnicas de análisis disponibles, no hay que olvidar la importancia de la regulación traduccional, ya que en *S. cerevisiae*, igual que en muchos organismos eucarióticos, la rápida inhibición de la síntesis de proteínas forma parte de la respuesta a estrés. En un estudio de Warringer y col. (2010), se analiza la regulación de la respuesta traduccional a estrés osmótico y se establece su dependencia de la ruta HOG. Así, tras una exposición a estrés osmótico suave (0,4 M de NaCl) se observa una rápida parada en la traducción, que se recupera poco después. Sin embargo, esta recuperación no ocurre en ausencia de

Hog1p (Warringer y col., 2010). En consecuencia, la respuesta traduccional constituye un nuevo campo en la investigación del papel funcional de la ruta HOG y de su implicación en la regulación de la adaptación a otras situaciones de estrés.

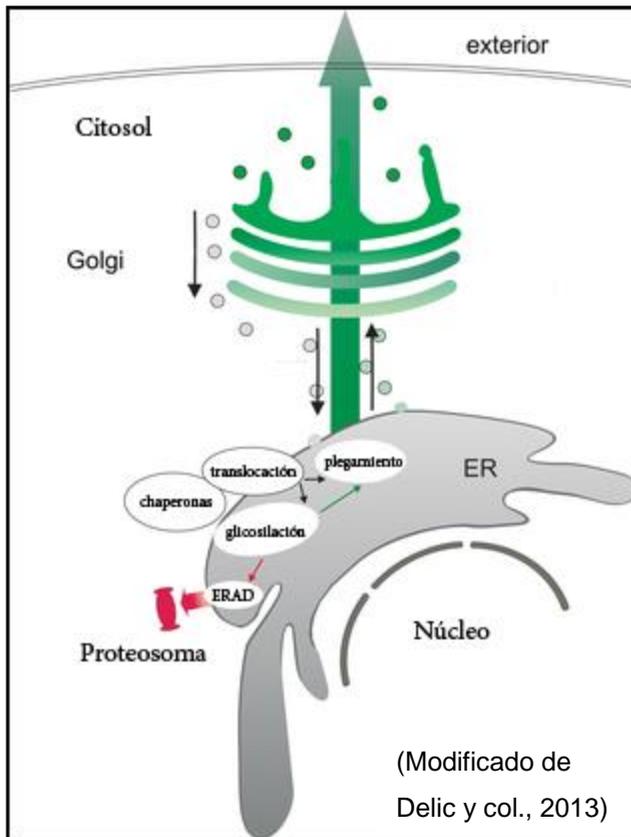
#### **4.- Regulación del repertorio de proteínas de membrana en respuesta a frío**

El frío paraliza o ralentiza el crecimiento y así, la célula deberá adecuar su capacidad biosintética y de generación de energía, para ajustarlas a la menor demanda a bajas temperaturas. En esta regulación, son importantes los mecanismos de control del repertorio de proteínas a nivel de la membrana plasmática, puesto que ésta es la primera barrera en sufrir los efectos del frío. En concreto, los transportadores y enzimas embebidos en ella, son clave para el crecimiento a bajas temperaturas. También los cambios en el entorno de estas proteínas puede afectar a su actividad y/o disparar su endocitosis. Por esto la célula debe llevar a cabo un control de calidad de las proteínas que van a ser transportadas a la membrana y regular su abundancia y actividad.

#### **4.1.-Control de calidad de las proteínas: el retículo endoplásmico**

Las proteínas cuyo destino final es la membrana plasmática o su secreción al espacio extracelular son transportadas por la ruta de secreción. Ésta comienza con la translocación al interior del RE y termina cuando son escretadas a la membrana plasmática a través del aparato de Golgi por transporte mediado por vesículas (Delic y col., 2013). Durante el trayecto, las proteínas deben ser plegadas correctamente para su funcionamiento, proceso que se lleva a cabo en el interior del RE, por lo que este orgánulo contiene numerosas chaperonas y enzimas relacionadas con el plegamiento de proteínas (Fig. 2). Las proteínas que aún así, permanecen mal plegadas son reconocidas y ubicuitiladas en el lumen del RE y llevadas al proteasoma para posteriormente ser degradadas. Este proceso se conoce como ERAD (“ER-Associated Degradation”) (Delic y col., 2013).

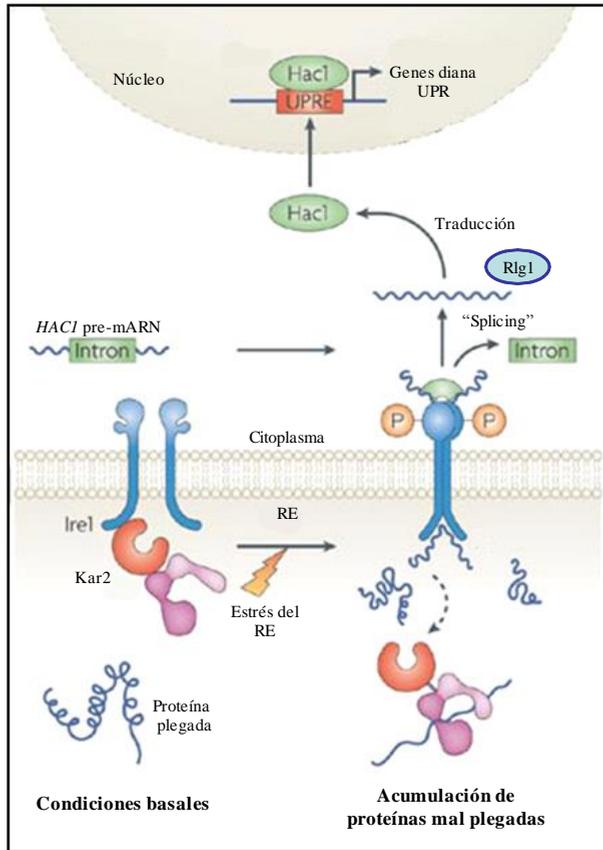
Sin embargo, la homeostasis del RE puede verse comprometida cuando se produce una acumulación de proteínas mal plegadas, por ejemplo, si la célula se ve sometida a estrés. Entonces, pasamos a hablar de estrés del RE y se inicia un mecanismo de defensa llamado respuesta a estrés por proteínas mal plegadas (UPR: “Unfolded Protein Response”). Ésta consiste en la transducción de una señal desde el RE hasta el núcleo, donde las proteínas efectoras activan la expresión de determinados genes (Travers y col., 2000) que permiten la supervivencia de la célula.



**Fig. 2. Esquema de la ruta de secreción de *S. cerevisiae*.** Tras su síntesis o durante ésta, las proteínas son translocadas al interior del retículo endoplásmico (RE) donde deben ser glicosiladas. Aquí, su correcto plegamiento está asistido por chaperonas y enzimas. Aquellas proteínas mal plegadas son diana de la ruta de degradación asociada al RE (ERAD). Una vez procesadas las proteínas son transportadas mediante vesículas al Golgi o al exterior.

En mamíferos, la presencia de proteínas mal plegadas, activa al menos tres rutas de señalización controladas por las proteínas ancladas a membrana: Ire1p (Inositol-requiring protein 1), Atf6p (Activating

transcription factor 6) o Perkp (Protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase), que colaboran en activar un conjunto de genes diana de la UPR (Travers y col., 2000). En *S. cerevisiae* se requieren 3 proteínas para la transducción de la señal en esta situación de estrés: Ire1p, la proteína sensora; Hac1p, que activa la transcripción de los genes diana; y Rlg1p, una tARN ligasa que juega un doble papel en el procesado del pre-mARN de Hac1p: ligando sus exones tras el “splicing” y en la regulación de su traducción (Mori y col., 2010). La proteína sensora es una serina/treonina quinasa transmembrana, con tres dominios funcionales (Fig. 3). El dominio amino-terminal se sitúa en el lumen del RE y podría detectar los niveles elevados de proteínas mal plegadas, en cuyo caso se autofosforila a través de su dominio quinasa citosólico. De esta forma se activa su dominio C-terminal con actividad endonucleasa que tiene como único sustrato conocido el pre-mARN de *HAC1*. Una vez eliminado su intrón, se trasloca al núcleo donde activa la transcripción de los genes diana de la UPR (Mori y col., 2000). Como resultado, la síntesis de nuevas proteínas desciende y la capacidad del RE para plegar proteínas aumenta. Cuando la situación de estrés persiste, la UPR activa el proceso de apoptosis (Lin y col., 2007). Así, se combinan respuestas a corto y largo plazo que determinan la supervivencia o muerte celular. El mecanismo de transmisión de la señal del RE al núcleo está bien caracterizado. Sin embargo, la regulación y control de estas señales y cómo su actividad determina la respuesta celular a estrés del RE está menos clara.



(Modificado de Vembar y Brodsky, 2008)

**Fig. 3. Esquema de la UPR en *S. cerevisiae*.** En condiciones óptimas de crecimiento, Ire1p se encuentra en estado inactivo unida a Kar2p. En una situación de estrés del RE, Kar2p que actúa como chaperona de proteínas mal plegadas se separa de Ire1p uniéndose a sustratos mal plegados. Al mismo tiempo Ire1p activada se dimeriza y une también estas proteínas. Su activación implica la fosforilación de su dominio citoplasmático encargado de procesar el pre-mRNA de *HAC1* gracias a su actividad endoribonucleasa. Una vez terminado el “splicing” y la traducción, Hac1p se une a secuencias consenso (UPRE) localizadas en los promotores de sus genes diana.

El conjunto de genes activados por la UPR incluye chaperonas del RE como *KAR2*, *PDI1* o *FKB2* y proteínas implicadas en las diversas etapas de la ruta de endocitosis, así como en el plegamiento o degradación de proteínas. Sin embargo, esta respuesta a estrés puede verse influida también por efectores de rutas de señalización tradicionalmente asociadas a otros estreses, como por ejemplo la ruta HOG. Un estudio de Chen y col. (2005), reveló la necesidad de una proteína Hog1 funcional para la supervivencia de la célula durante estrés del RE. Además, la transcripción de *HOG1* se vio aumentada al exponer las células a tunicamicina (Chen y col., 2005).

Una vez más, queda en evidencia la complejidad de la respuesta a estrés en *S. cerevisiae*. En concreto, la cantidad de mecanismos de regulación en los que parece estar involucrada la ruta HOG y que permanecen sin analizar.

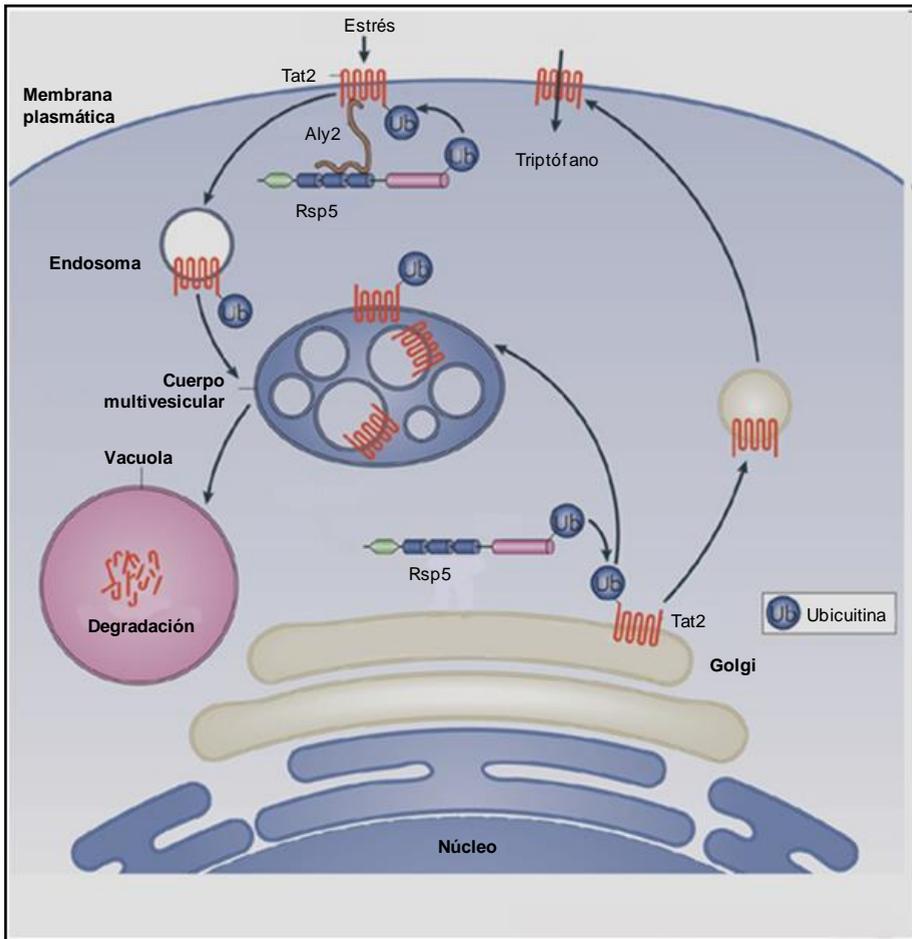
#### **4.2.- Homeostasis de la abundancia de proteínas y su importancia en la membrana plasmática**

Como hemos comentado, la actividad de los transportadores de membrana es de vital importancia para la supervivencia en frío, en concreto el transporte de triptófano es un factor limitante del crecimiento de la levadura a bajas temperaturas (Abe y Iida, 2003). Los transportadores de alta afinidad como el de histidina (Hip1) o el de triptófano (Tat2p), que importan aminoácidos para la síntesis de proteínas, no están regulados a nivel transcripcional en situaciones de estrés, sino que son eliminados de la membrana plasmática por endocitosis y dirigidos a la vacuola para su

degradación (Beck y col., 1999). En este sentido, el marcaje con ubiquitina es la única señal conocida que promueve la internalización de las permeasas desde la membrana plasmática (Lauwers y col., 2010).

La ubiquitilación es una modificación post-traducciona reversible de las proteínas. La ubiquitina es una proteína altamente conservada de 76 aminoácidos, que se une covalentemente a los residuos de lisina de las proteínas diana, a través del extremo C-terminal de su residuo de glicina (Fig. 4). El proceso de ubiquitilación es catalizado por la actuación secuencial de 3 enzimas: la enzima activadora de ubiquitina (E1), la enzima conjugadora de ubiquitina (E2) y la ubiquitin ligasa (E3). Este evento se denomina poliubiquitilación cuando las proteínas son dianas para la unión de más de un residuo de ubiquitina.

La función de la ubiquitina es servir como señal para la entrada de su proteína diana, en la ruta de endocitosis. Las proteínas de membrana ubiquitiladas entran en vesículas de endocitosis primarias, que se forman como invaginaciones de la membrana plasmática y son llevadas hasta un endosoma temprano. Desde aquí existen rutas divergentes: pueden ser recicladas y llevadas de nuevo a la superficie celular; o ser transportadas a un endosoma tardío y proteolizadas en la vacuola. En levadura, tanto las permeasas de aminoácidos, los transportadores de péptidos, como los transportadores de azúcares, utilizan la ubiquitilación como señal para su entrada regulada en este proceso (Hicke y Dunn, 2003).



(Modificado de Rotin y Kumar, 2009)

**Fig. 4. Esquema del proceso de ubiquitilación del transportador de triptófano Tat2p de *S. cerevisiae*.** Ante una situación de estrés, la permeasa Tat2p es ubiquitinada en la membrana plasmática. En este proceso participa la ubiquitín ligasa Rsp5p y otras proteínas adaptadoras como Aly2p. Posteriormente, la proteína marcada es transportada mediante un endosoma temprano hasta un cuerpo multivesicular, desde donde pasa a la vacuola para su degradación. En condiciones de baja disponibilidad de nutrientes, también puede ser ubiquitinada

por Rsp5p en el aparato de Golgi, para su traslado a un cuerpo multivesicular a la espera de su localización en la membrana plasmática.

En todos los casos el proceso depende de Rsp5p, miembro de la familia de las ubiquitín ligasas. Las mutaciones en el gen *RSP5* afectan a procesos celulares como la transcripción (Huibregtse y col., 1995), la inactivación de la permeasa general de aminoácidos Gap1p (Hein y col., 1995) y a la endocitosis de la permeasa de uracilo Fur4p. En el caso del transporte de triptófano, Rsp5p podría tener un papel esencial en la degradación de Tat2p en respuesta a frío. Se ha descrito que la exposición a altas presiones o bajas temperaturas desencadena la degradación de Tat2p mediada por ubiquitilación (Abe y Iida, 2003; Nagayama y col., 2004). Este evento también se ha observado en células de levadura en condiciones de ayuno de nutrientes (Beck y col., 1999). De acuerdo a esto, la mutación en genes de proteasas específicas de ubiquitina confiere un aumento en el crecimiento a bajas temperaturas (Miura y Abe, 2004).

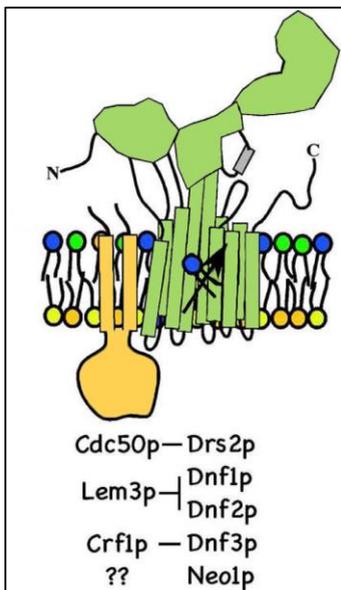
Debido a su relevancia en la regulación del repertorio de proteínas de membrana, la ubiquitilación y en general, la endocitosis constituyen otro punto clave en el estudio de la respuesta celular a estrés por frío que hasta el momento, ha sido poco analizado.

## **5.- La funcionalidad de la membrana plasmática: asimetría y flipasas**

Tradicionalmente se pensaba en la membrana plasmática como una estructura simétrica, sin embargo, en la actualidad se sabe que exhibe una segregación lateral de sus componentes formando dominios aislados (Simons y Sampaio, 2011), así como una composición lipídica diferente

entre ambas caras de la membrana (fosfolípidos, esfingolípidos y esteroides).

La membrana es asimétrica en fosfolípidos, con un enriquecimiento en fosfatidilserina (PS) y fosfatidiletanolamina (PE) en la cara interna (Chen y col., 2006). Esta asimetría es una característica fundamental y tiene un papel en señalización, así como en citoquinesis (Emoto y Umeda, 2000). Las ATPasas tipo IV (P4-ATPasas), una familia de translocasas de lípidos (más conocidas como flipasas), son las responsables de establecer y mantener la asimetría, bombeando PS y PE desde la cara externa a la cara interna de la bicapa lipídica. *S. cerevisiae* presenta cinco P4-ATPasas codificadas por los genes *DRS2*, *NEO1*, *DNF1*, *DNF2* y *DNF3* (Graham, 2004). Forman complejos con miembros de la familia de proteínas Cdc50, incluyendo Lem3p y Crf1p, que actúan como chaperonas (Fig. 5) (Muthusamy y col., 2009).



**Fig.5. P4-ATPasas de *S. cerevisiae*.** Las 5 flipasas descritas (representadas en verde) siempre van unidas a su correspondiente chaperona (representadas en naranja). Aún no se ha descrito la chaperona de Neo1p.

(Modificado de Muthusamy y col., 2009)

Cabe resaltar, que la pérdida de función de Drs2p causa un defecto severo de crecimiento a temperaturas por debajo de 23°C y la disrupción de los genes *DNF* en una cepa *drs2Δ* exacerba el fenotipo de sensibilidad a frío (Hua y col., 2002). En concordancia, la ausencia de Cdc50p, chaperona de Drs2p, también causa un defecto de crecimiento a bajas temperaturas (Saito y col., 2004). Estas observaciones sugieren que la translocación de fosfolípidos y la asimetría de la membrana tienen un papel fundamental en la adaptación a frío. Sin embargo, estamos lejos de conocer cómo la organización de la membrana en dominios y el establecimiento y regulación de su asimetría lipídica, afecta a procesos clave para el crecimiento a bajas temperaturas y quiénes son los efectores involucrados.

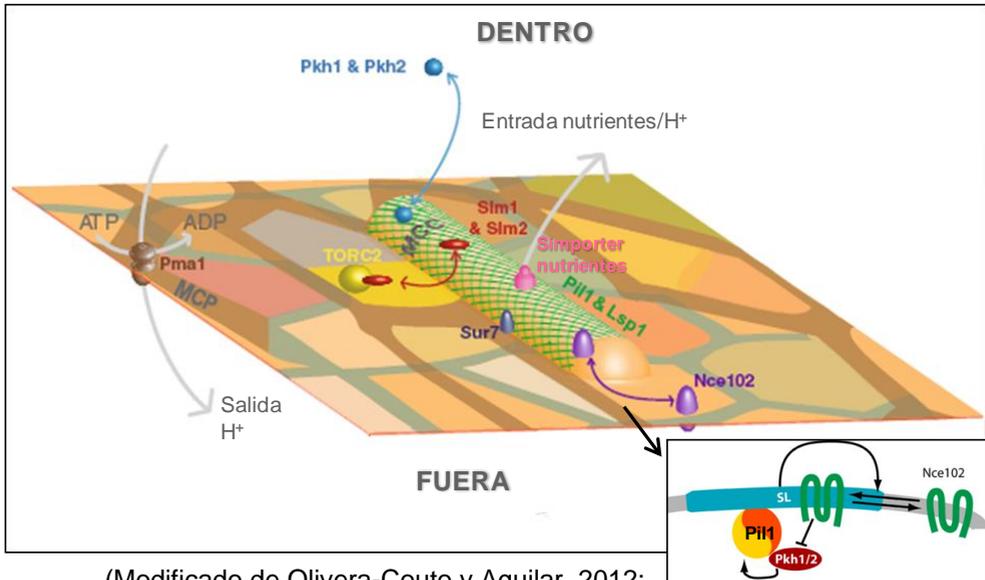
Los estudios realizados sobre la segregación lateral de la membrana han llevado a la definición de los subdominios llamados rafts, que se caracterizan por su insolubilidad en detergentes a baja temperatura (Bagnat y col., 2000; Malinska y col., 2003; 2004). Como ya hemos comentado, son estructuras formadas por esfíngolípidos y ergosterol asociados con proteínas específicas creando así microambientes (Simons y Sampaio, 2011). Estos complejos tienen funciones importantes en diferentes procesos celulares (Lingwood y Simons, 2010) incluyendo el tráfico y secreción de proteínas asociadas a la membrana como la protón ATPasa Pma1p y las permeasas de aminoácidos Fur4p (uracilo), Can1p (arginina), Gap1p y Tat2p (Daicho y col., 2009). Más aún, los rafts lipídicos pueden interactuar con proteínas dentro de la membrana y así, modular su plegamiento, abundancia y actividad (Contreras y col., 2011).

Recientemente, estos dominios se han clasificado como agrupaciones de rafts, en MCCs (compartimentos de membrana ocupados

por Can1p) y MCPs (compartimentos de membrana ocupados por Pma1p), entre otros (Grossmann y col., 2007). Los MCPs constituyen una red casi continua que puede coincidir con otros microdomios, pero nunca con los MCCs (Fig. 6). Éstos están distribuidos en puntos concretos de la membrana y están formados por miembros de la familia Sur7p/Pal1p y varios simporters de nutrientes y protones, como Tat2p y Fur4p (Young y col., 2002). En el lado citoplasmático de cada MCC, aparecen miles de unidades de las proteínas parálogas Pil1p y Lsp1p, que constituyen complejos asociados a la membrana llamados eisosomas (Walther y col., 2006). Éstas son las mayoritarias y están implicadas en su estabilidad, siendo Pil1p la principal organizadora, ya que cuando se deleta, se produce el colapso de los eisosomas. También se ha observado la desestructuración de los MCCs, por lo que parece que los eisosomas participan en la estabilidad de éstos (Walther y col., 2006).

En total se han descrito 22 proteínas presentes en los eisosomas (Olivera-Couto y Aguilar, 2012). Entre ellas aparecen proteínas asociadas a la membrana, como las quinasas Pkh1p y Pkh2p encargadas de fosforilar a Pil1p y Lsp1p (Walther y col., 2007). Cuando Pil1p está hiperfosforilada, se produce la desestructuración de los eisosomas mientras que, cuando está hipofosforilada permanecen estables. Este control a su vez, está regulado por la concentración de esfingolípidos, a través de la proteína transmembrana Nce102p, que actúa como sensor. Nce102p se co-localiza en el eisosoma asociado al compartimento MCC si la concentración de esfingolípidos es elevada o en el resto de la membrana si es baja (Frohlich y col., 2009) (Fig. 6; panel inferior derecho). De esta manera puede inhibir a las proteína quinasas Pkh1,2 localizadas también en el eisosoma y con ello evitar la fosforilación de Pil1p estabilizándolo.

Así, Nce102p actúa como un sensor que determina la funcionalidad de la membrana (Frohlich y col., 2009).



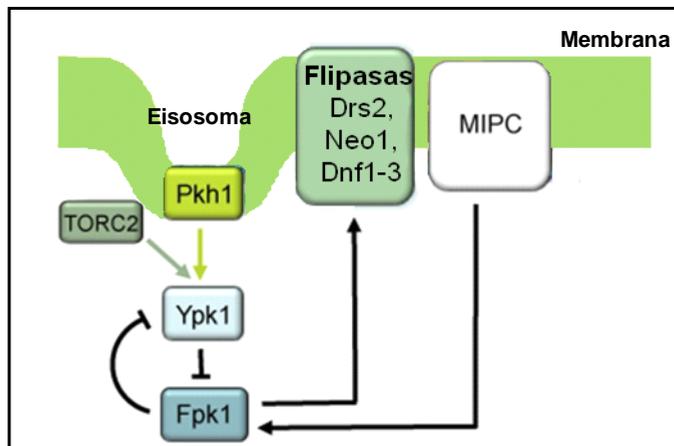
(Modificado de Olivera-Couto y Aguilar, 2012; Frohlich y col., 2009)

**Fig. 6. Representación de dominios definidos en la membrana plasmática de *S. cerevisiae*.** Entre ellos encontramos los MCPs (marrón) que se distribuyen prácticamente por toda la superficie y los MCCs (verde) que se localizan en zonas concretas. Los primeros incluyen a la ATPasa de protones Pma1p, mientras que los segundos están asociados a complejos llamados eisosomas que engloban gran variedad de proteínas diferentes siendo Pil1p y Lsp1p las mayoritarias. Además, están implicadas en la estabilidad del eisosoma mediante un sistema regulado por la proteína Nce102p (panel inferior derecho).

En cuanto a las funciones que desempeñan los eisosomas en la célula, se les relaciona con endocitosis y señalización (Walther y col., 2006; Roelants y col., 2010). El mecanismo mediante el cual se inicia el proceso de endocitosis en sitios concretos de la membrana plasmática permanece sin aclarar. A este respecto, en un estudio de Walther y col. (2006) se propone a Pil1p como marcador de estos puntos. Esta hipótesis se basa principalmente en la colocalización de Pil1p y el marcador de endocitosis FM4-64, así como, en la existencia de interacciones genéticas entre *SUR7*, *PIL1*, *LSP1* y varios mediadores de endocitosis (Walther y col., 2006). A pesar de éstas y otras evidencias, la relación entre eisosomas y endocitosis sigue siendo un tema controvertido. También se postula un papel protector del eisosoma, aportando estabilidad a las proteínas localizadas en él, por ejemplo, en células sin Pil1p la proteína Can1 se disipa a lo largo de la membrana y es endocitada más rápidamente (Grossman y col., 2008).

Sobre su papel en señalización, se sabe que, algunos componentes de los eisosomas están involucrados en la activación de las flipasas de aminofosfolípidos (Roelants y col., 2010). Las proteína quinasas asociadas a la membrana Fpk1,2, actúan como activadores de flipasas, fosforilando a las aminofosfolípido translocasas Dnf1,2 (Nakano y col., 2008). A su vez, la actividad de Fpk1,2p está regulada por un módulo de quinasas complejo (Fig. 7). La fosforilación, mediada por TORC2 de Ypk1p, permite que su sitio de activación esté accesible a la fosforilación por las proteína quinasas Pkh1,2 (localizadas en los eisosomas). La activación de Ypk1p causa la fosforilación de Fpk1,2p y su inhibición, reduciendo su capacidad de estimular la actividad flipasa. A su vez, Fpk1p fosforila e inactiva a Ypk1p en respuesta a la presencia de esfingolípidos complejos (MIPC)

(Roelants y col., 2010). Este circuito de regulación, es un mecanismo de homeostasis para ajustar la tasa de translocación de aminofosfolípidos con el nivel de esfingolípidos disponible, manteniendo una organización apropiada de la membrana. Mantener este balance es crucial para la funcionalidad de la membrana, ya que defectos en la actividad flipasa causan, entre otros, problemas en las rutas de endocitosis y exocitosis (Hua y col., 2002; Muthusamy y col., 2009). Sin embargo, aún no se conoce el papel concreto que desempeñan los eisosomas en esta ruta.



(Modificado de Roelants y col., 2010)

**Fig. 7. Esquema de la regulación de la actividad de las flipasas de fosfolípidos por parte de algunos componentes de los eisosomas.** Las proteína quinasas asociadas a eisosomas Pkh1 y Pkh2 activan a Ypk1p que a su vez fosforila al activador de flipasas Fpk1p, inhibiéndolo. Este sistema a su vez está controlado por la cantidad de esfingolípidos complejos como la manosilinositol fosfoceramida (MIPC). La presencia de MIPC estimula la actividad de Fpk1p permitiendo que inhiba a Ypk1p.



# **JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

---



A lo largo de los años, la levadura *S. cerevisiae* se ha convertido en organismo modelo tanto en la industria, como en el campo de la investigación básica, debido a sus características metabólicas y su fácil manipulación. Es conocido que, cuando la célula se enfrenta a una situación de estrés, debe modificar su fisiología para mantener la homeostasis celular. Esta adaptación incluye la regulación del repertorio de proteínas, eliminando aquellas que ya no son necesarias o sintetizando otras nuevas. En este proceso, un orgánulo crucial es el retículo endoplásmico, que establece un punto de control en la calidad de las proteínas, ya que es el responsable de su glicosilación y correcto plegamiento.

Cuando se acumulan proteínas mal plegadas, se produce el así llamado estrés del RE y la supervivencia de la célula se ve comprometida. En esta situación se sabe que se activan mecanismos de respuesta específicos como la UPR, pero hay evidencias de la existencia de un sistema más complejo, en el que participan otras rutas, como es el caso de la ruta de integridad de la pared celular (Scrimale y col., 2009) o la ruta HOG (Chen y col., 2005), aunque la implicación de esta última no se ha analizado en profundidad.

En el ámbito industrial, el aumento en la demanda de levaduras con características especiales, ha hecho patente la necesidad de nuevas cepas que se adecuen a los requerimientos y necesidades del consumidor. En esta línea, las estrategias de mejora y selección de cepas industriales se ven limitadas por el escaso conocimiento que disponemos de la respuesta de la levadura a condiciones de estrés, por lo que, un mejor entendimiento de la fisiología y de los determinantes genéticos y moleculares

responsables de la respuesta de *S. cerevisiae*, es crucial para establecer las estrategias a seguir.

En concreto, la industria panadera ha experimentado un aumento en la producción de masas congeladas, dejando en evidencia la falta de levaduras resistentes a congelación, mientras que en el caso de las levaduras vínicas, urge el desarrollo de cepas capaces de fermentar a bajas temperaturas para la elaboración de vinos blancos y rosados. Sin embargo, *S. cerevisiae* no fermenta bien en dichas condiciones, por lo que es importante aumentar su adaptación a frío y tolerancia a congelación.

El estrés generado por bajas temperaturas es complejo y multifactorial y está relacionado con otros estreses. Estudios anteriores, demuestran que la exposición de la levadura a bajas temperaturas, activa mecanismos de señalización y de transducción, que determinan la capacidad de la célula para adaptarse y sobrevivir. Es el caso de la ruta HOG, cuya activación en frío es necesaria para la producción de glicerol, el cual actúa como crioprotector.

Aunque los mecanismos sensores encargados de percibir el descenso de la temperatura no están bien establecidos, todos los datos apuntan a cambios físicos en la membrana plasmática. Al ser ésta la primera barrera de la célula, es importante conocer las bases moleculares de su funcionalidad y en qué modo su estructura y composición influye en la adaptación celular a bajas temperaturas. Actualmente, ya no se concibe a la membrana como simétrica, sino como una red de subdominios, que establecen microambientes para las proteínas embebidas en ella y que están relacionados entre sí o con complejos proteicos asociados a ellos. Es el caso de los MCCs y los eisosomas; éstos últimos implicados en procesos de endocitosis y señalización. Sin embargo, puesto que este es

un campo de investigación relativamente reciente, aún quedan muchos aspectos de su regulación que permanecen sin esclarecer.

Por todo esto, el objetivo general de este trabajo fue aumentar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de respuesta a estrés en *S. cerevisiae*, concretándose en los siguientes objetivos específicos:

1.- Analizar las rutas de señalización encargadas de la transducción de la señal en respuesta a estrés, con especial énfasis en la ruta HOG y la UPR.

2.- Aislar supresores en multicopia del fenotipo de sensibilidad a bajas temperaturas.

3.- Estudiar la regulación de la asimetría de la membrana.



# MATERIALES Y MÉTODOS

---



## 1.- Cepas

Las cepas de *Saccaromyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo están listadas en la Tabla 1. Para la construcción de plásmidos se usó la cepa de *Escherichia coli* DH10B.

## 2.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

### 2.1.- Bacterias

Los cultivos de *E. coli* se incubaron a 37°C. Cuando las bacterias se crecieron en medios líquidos, se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. en un arcón orbital.

Los medios utilizados fueron:

LB (Luria Bertani): 0,5% de extracto de levadura, 1% de peptona, 1% de NaCl y 2% de Agar (para medio sólido). Si se añade al medio LB 50 µg/ml de ampicilina tenemos LBA, que se utiliza para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos que contienen el gen de resistencia a ampicilina *Amp<sup>R</sup>*. Para la selección de plásmidos en los que se ha clonado un fragmento de ADN y llevan como marcador de selección el gen *lacZ*, se añaden 50 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido) (Promega).

SOC: 0,5% de extracto de levadura, 2% de peptona, 10 mM de NaCl, 2,5 mM de KCl, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 20 mM de MgSO<sub>4</sub> y 20 mM de glucosa que se adiciona después de haber esterilizado el medio. Se utiliza para recuperar a las bacterias después de haber sido transformadas mediante electroporación.

## 2.2.- Levaduras

Los cultivos de *S. cerevisiae* se incubaron a 30°C. Los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. en un arcón orbital.

Para comparar la resistencia de distintas cepas a condiciones de estrés, las células se crecieron en medio líquido hasta fase estacionaria. Se recogió una alícuota y se llevó hasta una  $DO_{600}$  de 1. A partir de ésta, se realizaron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ . Se depositaron gotas de 3  $\mu$ l de las distintas diluciones sobre placas de cultivo.

Los medios utilizados fueron:

YP: 1% de extracto de levadura y 2% de bactopectona. Este medio ha sido suplementado con 2% de glucosa: YPD, de maltosa: YPM o de galactosa: YPG para cepas con plásmidos portadores de genes con promotores inducibles por esta fuente de carbono.

En el caso del YPD, también se le ha adicionado el antibiótico nourseotricina (ClonNat 50  $\mu$ g/ml), genéticina (200  $\mu$ g/ml) o hygromicina (300  $\mu$ g/ml) cuando era necesario como medio de selección en la obtención de cepas con genes interrumpidos.

SCD (medio sintético completo): 0,17% de Yeast Nitrogen Base (sin aminoácidos ni sulfato amónico), 0,5% de  $(NH_4)_2SO_4$ , 2% de glucosa y los aminoácidos requeridos por cada cepa usando el Drop-out correspondiente (Fermentas). En algunos casos se modificó utilizando galactosa al 2% como fuente de carbono (SCG) o maltosa (SCM).

En todos los casos los medios sólidos se prepararon añadiendo 2% de agar.

### **3.- Métodos de manipulación de microorganismos**

#### **3.1.- Transformación de bacterias**

Células de *E. coli* fueron previamente convertidas en competentes mediante el protocolo indicado por la casa comercial (Eppendorf) y conservadas a - 80°C. La electroporación se realizó a un voltaje constante de 1.700V en un electroporador Eppendorf 2510 con cubetas de 1 mm de separación de electrodos (Eppendorf). Posteriormente se recuperaron las células en medio SOC, para luego ser sembradas en medio LBA sólido, conteniendo 1 µg de X-Gal (Promega) por placa en el caso de selección por color.

#### **3.2.- Transformación de levaduras**

La transformación de levaduras se realizó mediante el protocolo (LiAc/ss.-ADN/PEG) descrito por Gietz y Sugino (1988). El método está basado en la utilización de acetato de litio, ADN “carrier” y polietilenglicol. Cuando se trataba de transformaciones con plásmidos móviles, las levaduras fueron sembradas en los medios de selección adecuados posteriormente al choque térmico a 42°C, mientras que se sometieron a un proceso de recuperación en YPD a 30°C durante 2-3 horas en el caso de integraciones en el genoma.

Para las cepas auxótrofas, las placas de selección fueron suplementadas con los aminoácidos o nucleósidos necesarios. En el caso de transformaciones en las que se utilizaron casetes de interrupción, las levaduras fueron sembradas en placas con el antibiótico para la selección dominante.

### **3.3.- Análisis de la inserción del casete de interrupción**

Los transformantes no abortivos fueron analizados mediante PCR para comprobar si había tenido lugar la inserción en el lugar correcto del genoma y por lo tanto, la eliminación de la secuencia elegida. Se utilizan oligonucleótidos del interior del casete combinados con otros diseñados en la región del promotor o terminador, tras la PCR, sólo en los transformantes en los que el casete esté en el sitio correcto veremos un amplificado. Los oligonucleótidos utilizados están listados en la Tabla 2.

En el caso del marcaje de Tat1p, Tat2p, Pil1p y Sng1p en su extremo C-terminal con 3HA o 13Myc, se amplificó la etiqueta por PCR utilizando los plásmidos pFA6a-13Myc-KanMX6 o pFA6a-3HA-KanMX6 (Longtine y col., 1998) y el correspondiente par de cebadores específicos para cada gen (Tabla 2).

## **4.- Métodos de manipulación del ADN**

### **4.1.- Obtención de ADN plasmídico de *E. coli***

Se crecieron las células transformadas de *E. coli* en 2 ml de medio LBA durante la noche y se extrajo el plásmido mediante el método de la lisis alcalina, descrito por Birnboim y Doly (1979). Para obtener una cantidad de plásmido mayor, se utilizó un procedimiento derivado de éste, descrito en Sambrook y col. (1989), reajustando las cantidades de las soluciones y tampones utilizados al volumen de cultivo empleado (50 ml).

### **4.2.- Obtención de ADN plasmídico de levadura**

Para la extracción de plásmidos de levadura, se siguió el método descrito por Robzyk y Kassir (1992) partiendo de 1,5 ml de un cultivo

saturado en SCD selectivo. En todos los casos, el ADN plasmídico obtenido se resuspendió en un volumen adecuado, generalmente 20-50 µl de agua estéril y se procedió a transformar *E. coli*, para disponer de cantidad suficiente de plásmido para posteriores manipulaciones.

#### **4.3.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

La amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevó a cabo según procedimientos estándar (Sambrook y col., 1989). Esta metodología se ha empleado para la clonación y subclonación de algunos genes y para la comprobación de deleciones. El volumen final de la reacción fue de 50 µl usando 100 ng de ADN genómico o plasmídico como molde, o una pequeña cantidad de biomasa en el caso de PCR a partir de colonia. Por otro lado se añadía 1 µl de cada oligonucleótido (25 µM), 1 µl de dNTP (10 µM), 2 µl de MgCl<sub>2</sub> (50mM), 5 µl de tampón (10X) y 0,5 unidades de enzima Taq polimerasa (Bioline) proporcionados por la casa comercial. En el caso de PCR de colonia la enzima se añadió tras realizar un ciclo de desnaturalización inicial de 15 min a 95°C.

El número de ciclos, así como el tiempo y temperatura utilizados en la separación de las hebras, unión de los oligonucleótidos y elongación, varía según el fragmento a amplificar. En todos los casos se realiza una elongación final de 10 min a 72°C. El resultado de la PCR es posteriormente analizado mediante electroforesis en geles de agarosa. En la Tabla 2 se describen los distintos cebadores utilizados para las amplificaciones.

#### **4.4.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa**

La separación de fragmentos de ADN se realizó en geles de agarosa a una concentración del 1%. Los geles se prepararon en tampón TAE (40 mM Tris; 4 M ácido acético glacial; 1 mM EDTA; pH 8,0) que también fue usado como tampón de electroforesis. A las muestras se les añadió 1/10 volumen de tampón de carga (20% Ficoll 400; 0,1 M EDTA pH 8,0; 1% SDS; 0,25% azul de bromofenol) y se usó un patrón de tamaño molecular de escala 1 kb (Fermentas #SM0311). El voltaje utilizado fue de entre 5-10 V/cm.

#### **4.5.- Aislamiento de fragmentos de ADN en geles de agarosa**

Los fragmentos de ADN se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión a una concentración del 1% y con tampón TAE. Una vez separado el bloque del resto del gel, se realiza la extracción y purificación siguiendo el protocolo del kit de la casa comercial (Invitrogen).

#### **4.6.- Clonación**

Para la construcción de los plásmidos YEpALY2, YEpCAJ1 y YEpUBP13, los fragmentos de ADN obtenidos mediante PCR se digirieron con los enzimas apropiados: KpnI/PstI (*ALY2*), EcoRI/PstI (*CAJ1*) o XbaI/PstI (*UBP13*) utilizando el tampón y las indicaciones sobre condiciones óptimas de reacción, proporcionadas por la casa comercial para cada enzima. Posteriormente se clonaron en el plásmido YEp/*lacZ*195 (Tabla 3) digerido con el mismo par de enzimas en cada caso. Para la construcción de los plásmidos YEp181ALY2 y YEp181UBP13 se siguió el mismo proceso pero utilizando el plásmido YEplac181.

El plásmido pSNG1-SNG1 se construyó a partir del plásmido pBG1805-SNG1 reemplazando el promotor de galactosa con el fragmento de su promotor propio generado por PCR (Tabla 2), ambos digeridos con el mismo par de enzimas BamHI/XbaI.

Para la reacción de ligación se mezclan 50 ng del vector, al menos tres veces más cantidad de inserto, 1 µl del tampón 10x proporcionado por el proveedor y 1 µl de ADN ligasa en un volumen final de 10 µl. La reacción se deja durante la noche a 16°C. La relación de plásmidos utilizados se encuentra en la Tabla 3.

#### **4.7.- Rastreo de supresores en multicopia**

Para el aislamiento de supresores en multicopia del fenotipo de crecimiento a baja temperatura en *S. cerevisiae* utilizamos una librería genómica construida en el vector YEp24 (Tabla 3). Los transformantes obtenidos se seleccionaron de dos formas: en medio YPD añadiendo 25 µM de fitoesfingosina (PHS) y en medio SCD-Ura ambos a 12°C. Los plásmidos fueron extraídos, amplificados en *E.coli* y establecidos los grupos de complementación tras su digestión con los enzimas de restricción EcoRI o HindIII (Sambrook y col., 1989). Un plásmido representante de cada grupo se utilizó para la retransformación de la levadura y confirmamos el fenotipo observado.

#### **4.8.- Secuenciación y análisis de las secuencias**

El inserto de cada plásmido responsable del fenotipo en frío, se secuenció utilizando los cebadores directo y reverso de YEp24 (Tabla 2). La secuenciación se realizó con el método de terminación de cadenas dideoxi (Sanger y col., 1977) en el servicio de secuenciación de la

Universidad de Valencia. El análisis de las secuencias se realizó usando el programa de análisis de secuencias DNAMAN (Lynnon Biosoft). Para el análisis de similitud se utilizó el programa BLAST del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul y col., 1997). Se realizaron búsquedas de dominios conservados alineando las secuencias frente a bases de datos de dominios conservados (CDD) en el NCBI (Marchler-Bauer y col., 2009). De forma alternativa, se analizaron dominios de proteínas frente a la base de datos de familias de proteínas PROSITE (Sigrist y col., 2002) del SIB (“Swiss Institute of Bioinformatics”; <http://www.isb-sib.ch>).

## **5.- Métodos de manipulación de ARN**

### **5.1. Extracción de ARN**

Se recogieron 50ml de muestra de cultivo mediante centrifugación (5,500 × g, 5 min, 4 °C) y tras lavarlo con tampón LETS, se almacenaron a -80°C hasta su utilización. Para procesar las muestras, se resuspendieron en 0,5ml de tampón LETS (200 mM LiCl, 20 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,4% SDS) transfiriéndolo a tubos de rosca Eppendorf a los que previamente se les añadió 0,5ml de fenol y 0,5ml de bolas de vidrio (0,4 mm de diámetro). La suspensión se agitó durante 4 ciclos de 45 segundos en un homogeneizador Mini Bead-Beater (BioSpec, Bartlesville, OK) alternando con el mismo periodo de tiempo en hielo. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 14.000 rpm durante 10 minutos a 4°C. La fase acuosa se pasó a un tubo nuevo añadiendo 25 µl de 40% de acetato potásico y 0,5ml de fenol-cloroformo e isoamiloalcohol (25:24:1) y se volvió a centrifugar a 14.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Una vez más se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo con 1 ml de 100% de etanol y se

almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Posteriormente, se obtuvo el pellet de ARN centrifugando a 14.000 rpm durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .

## **5.2. Transferencia de ARN a filtros de nylon (Northern-blot)**

Una vez purificado, el ARN se resuspendió en 30  $\mu\text{l}$  agua estéril. Tras cuantificar las muestras, éstas se diluyeron 5  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  en tampón de carga y fueron separadas en geles de agarosa al 1% (p/v) con 2,5% de formaldehído (v/v). Posteriormente, se transfirieron a una membrana de nilón por capilaridad y se hibridaron con sondas no radioactivas marcadas con digoxigenina. Las sondas se obtuvieron por PCR con cebadores específicos de cada gen a visualizar obtenidas de la base de datos del MIPS ([mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast](http://mips.helmholtz-muenchen.de/genre/proj/yeast)) (Tabla 2). El marcaje de las sondas de ADN, la pre-hibridación de las membranas y las hibridaciones se realizaron con el kit Easy Hyb de Roche (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Tras los lavados correspondientes, las membranas fueron sometidas a detección inmunológica utilizando un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics) y el sustrato quimioluminiscente CDP-Star (Roche Diagnostics). Las imágenes se capturaron con el sistema Las-1000 Plus (Fuji, Kyoto, Japan). La intensidad de las bandas se cuantificó utilizando el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). En todos los casos los valores de intensidad se corrigieron respecto al nivel del mARN de *ACT1* y representados como valores relativos.

### 5.3. Perfiles de polisomas

Las preparaciones de polisomas se realizaron según el método de Foiani y col. (1991), con algunas modificaciones. Los cultivos se crecieron en YPD hasta una densidad óptica a 600nm de 0,5. Tras la adición de tunicamicina (concentración final de 2µg/ml), se recogieron 80 ml de muestra a diferentes tiempos. Se añadió cicloheximida a una concentración de 0,1mg/ml para inhibir el desensamblaje, y se enfrió la muestra en hielo durante 5 minutos. Las células se recogieron y lavaron dos veces con 2 ml de tampón de rotura a 4°C (20 mM Tris-HCl [pH 8,0], 140 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT 0,1 mg/ml cycloheximida, 0,5 mg/ml de heparina, 1% Triton X-100), posteriormente se centrifugaron a 5.900 x g durante 5 minutos y se resuspendieron en 700 µl de tampón de rotura. Tras la adición de 0,5 g de bolas de vidrio, se realizaron 8 ciclos de rotura en el vórtex de 30 segundos cada uno, intercalados con intervalos de 30 segundos en hielo. Los extractos se clarificaron mediante 3 pasos de centrifugación consecutivos: 5 minutos a 5.000 rpm y 2 veces 5 minutos a 8.000rpm. Posteriormente, se colocaron 20 unidades de A<sub>260</sub> de cada muestra, sobre un gradiente lineal del 10 al 50% de sacarosa de 12 ml de volumen final conteniendo: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 140 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM dithiothreitol 0,1 mg/ml of cycloheximida y 0,5 mg/ml de heparina. Los gradientes se centrifugaron con un rotor SW41Ti de Beckman a 35.000 rpm durante 2 horas y 40 minutos. Finalmente, las muestras se escanearon a 254 nm en un Fraccionador de Gradientes (Teledyne ISCO).

## **6.- Determinación de actividades enzimáticas**

### **6.1.- Determinación de actividad $\beta$ -galactosidasa**

Para medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa, se recogieron 10 unidades de  $DO_{600}$  de cultivo, se lavaron con agua y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Una vez recogidas todas las muestras, se añadió 500  $\mu\text{l}$  de tampón Z (60 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 40 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM KCl, 1 mM  $\text{MgSO}_4$ ) y 500  $\mu\text{l}$  de bolas de vidrio de 0,4 mm de diámetro y se lisaron las células en un vórtex a velocidad máxima, durante 4 ciclos de 30 segundos con alternancia en hielo. El sobrenadante obtenido fue centrifugado a 12.000 rpm. para eliminar los restos celulares y el extracto conservado en hielo hasta su utilización.

El substrato utilizado para medir la actividad  $\beta$ -galactosidasa fue el o-NPG (o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactopiranosido). Tras mezclar 100  $\mu\text{l}$  de este substrato con 100  $\mu\text{l}$  de extracto crudo y 400  $\mu\text{l}$  de tampón Z con una concentración de 40 mM de  $\beta$ -mercaptoetanol, se mantuvo la mezcla de reacción durante 10 min a  $30^{\circ}\text{C}$ . La reacción se paró con la adición de 250  $\mu\text{l}$  de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M. Se midió la absorbancia a 420 nm. La actividad específica (U/mg proteína) refleja los nanomoles de substrato hidrolizado por min y mg de proteína. (El coeficiente de extinción molar del o-NPG a 420 nm es de  $4,5 \text{ cm}^2/\text{mM}$ ).

### **6.2.- Ensayo de Anexina V**

La presencia de fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática se midió utilizando el kit de Anexina V y Muerte Celular (cat# MCH100105; Millipore, Hayward, CA). Las células de levadura se cultivaron durante la noche en SCD-Ura a  $30^{\circ}\text{C}$ , se refrescaron

en YPD ( $DO_{600} = 0,25$ ) y se recogieron por centrifugación en fase logarítmica ( $DO_{600} = 0,5$ ) lavándolas dos veces con una solución de azida de sodio a 4°C. Posteriormente, se obtuvieron esferoplastos mediante un tratamiento con zimoliasa (Gregg y col., 2009). Para ello, una unidad de  $DO_{600}$  se resuspendió en 30  $\mu$ l de tampón DTT (100 mM Tris- $H_2SO_4$  [pH 9,4], 10 mM dithiothreitol) incubando a 30°C en un agitador durante 20 minutos. Las células fueron recogidas por centrifugación (3,000 x g, 5 minutos a temperatura ambiente), lavadas con tampón zimoliasa (20 mM fosfato de potasio [pH 7,4], 1,2 M sorbitol) y resuspendidas en 50  $\mu$ l del mismo tampón con 2,5  $\mu$ g de Zimoliasa-100T (Seikagaku Corp., Tokyo, Japan) e incubadas durante 1 hora. Los esferoplastos se lavaron dos veces con tampón Anexina (10 mM Na HEPES [pH 7,4], 140 mM NaCl, 2,5 mM  $CaCl_2$ , 1,2 M sorbitol) y se resuspendieron en 50-100  $\mu$ l del mismo tampón. Un  $\mu$ l de la suspensión de esferoplastos ( $\sim 7 \times 10^4 - 2 \times 10^5$  células) se añadió a un tubo conteniendo 100  $\mu$ l del reactivo de Anexina V (Millipore) y 100  $\mu$ l de tampón Anexina 2x, la mezcla se incubó a temperatura ambiente en oscuridad durante 10 minutos.

La cantidad de PS expuesta en la cara externa de la membrana se estimó mediante citometría de flujo utilizando el Muse Cell Analyzer (Millipore). Los datos se expresaron como el porcentaje de células viables marcadas con anexina V. En todos los casos corresponde a la media de al menos 3 experimentos independientes.

### **6.3.- Ensayo de secreción de invertasa**

La secreción de invertasa se siguió calculando el ratio entre invertasa externa total como se describe en Hua y col., 2002. Los transformantes de levadura se incubaron durante la noche en SCD-Ura

con 5% de glucosa, se refrescaron ( $OD_{600} = 0,25$ ) en YPD con la misma cantidad de fuente de carbono y se recogieron las células por centrifugación a  $OD_{600} = 0,5$ . Tras lavarlas con agua, se resuspendieron en YPD con 0,1% de glucosa y se incubaron de nuevo a 30°C. Se recogieron muestras a diferentes tiempos, centrifugando alícuotas de 1,5ml, lavando dos veces con 10 mM de azida de sodio a 4°C y resuspendiendo en 150  $\mu$ l de la misma solución adicionada con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche).

La invertasa externa se analizó en 20  $\mu$ l de suspensión de células mediante el procedimiento peroxidasa-ABTS descrito por Niederacher y Entian (1987). La invertasa total se obtuvo con el lisado celular completo, obtenido por rotura mecánica con bolas de vidrio como se describe previamente. La cantidad de actividad detectada en células inactivadas por calor, en cada tiempo de recogida de muestra, se utilizó como blanco.

#### **6.4.- Determinación de la concentración de proteínas**

Para determinar la concentración de proteínas en los extractos celulares, se siguió el método de Bradford, utilizando el reactivo comercial BioRad Protein Assay y la proteína inmunoglobulina para la obtención de una recta patrón.

#### **6.5.- Cuantificación de glicerol**

Para determinar el contenido total de glicerol de las células bajo diferentes condiciones de estrés, se recogieron por centrifugación células crecidas en YPD ( $A_{600}=0,5$ ) y se resuspendieron en el mismo medio suplementado con 2  $\mu$ g/ml de tunicamicina, 20  $\mu$ l de DMSO (14,7 M), 1 M de NaCl o 1 M de sorbitol. Se recogieron muestras de 1 ml a diferentes

tiempos, se hirvieron durante 10 minutos, se centrifugaron a  $15.300 \times g$  durante 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se analizó el contenido en glicerol de los sobrenadantes. La cantidad de glicerol se determinó colorimétricamente con un kit comercial (BEN Biochemical Enterprise, Code TG9940), siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores obtenidos se expresan como  $\mu\text{g}$  de glicerol por  $\text{mg}$  de célula de levadura en peso seco, este parámetro se estimó con la relación:  $A_{600}=1$  corresponde a  $0,3 \text{ mg}$  células peso seco/ml. En el caso de muestras tratadas con tunicamicina, el incremento en el contenido de glicerol se estimó tras la substracción de los valores obtenidos para la muestra control con DMSO. En todos los casos, los valores corresponden a la media de tres experimentos independientes.

## **7.- Técnicas de análisis de proteínas.**

### **7.1.- Geles bidimensionales de proteínas.**

Los geles bidimensionales se realizaron siguiendo el protocolo descrito por Blomberg (2002).

- Extractos de proteínas:

Se recogieron 25 unidades de DO por muestra, se lavaron con agua destilada fría y fueron congeladas hasta su procesado. La obtención de proteínas se realizó rompiendo las células con perlas de vidrio. Posteriormente se traspasó la muestra a un tubo de 2 ml con 0,5 g de perlas de vidrio y 300  $\mu\text{l}$  de tampón de lisis (25 mM MES, 0,1 M NaCl, 0,25% Nonidet P40) adicionando en el momento 1/100 de inhibidores de proteasas (Roche) y 1/100 de inhibidores de fosfatasas (Roche). Las células se lisaron mediante 3 ciclos de 45 segundos a 5 m/s en el

FastPrep®-24 Instrument (MP Biomedicals, France). Posteriormente a la rotura, las muestras fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 20 segundos a 4°C y se recogió el sobrenadante.

- Preparación muestras:

Las muestras se prepararon en un volumen final de 125 µl de una mezcla que contiene: 50 µg de proteínas, 1/100 de anfolitos (GE Healthcare), azul de bromofenol y solución de rehidratación (8M urea, 4% Nonidet P40, 50 mM DTT).

- Isoelectroenfoque:

La primera dimensión de los geles se realizó en tiras “*immobiline (IPG) DryStrips*” de 7 cm con un gradiente no lineal de 3 a 11 (Amersham). Las tiras se rehidrataron durante la noche en la preparación antes mencionada, cubiertas con aceite mineral para evitar la evaporación, a temperatura ambiente. El isoelectroenfoque se llevó a cabo en un aparato Ettan IPGphor (Amersham Biosciences) a 50 mA por tira. En un primer paso el voltaje se mantuvo a 300 V durante 30 minutos, posteriormente se subió progresivamente hasta 1000 V durante 30 minutos, después hasta 5000 V durante 1,5 horas y se mantuvo constante 1 hora más. En este punto es posible continuar con la segunda dimensión o congelar las tiras de la primera dimensión a -80°C.

- Separación en SDS-PAGE:

Las tiras se equilibraron durante 2 ciclos de 15 minutos a temperatura ambiente en tampón de equilibrado: Tris HCl 50 mM pH 8,8,

SDS 2%, Urea 6 M, Glicerol 30%. Añadiendo DTT 1% para el primer lavado y IAA 2,5% para el segundo; coloreados con azul de bromofenol.

La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de acrilamida al 11%. La electroforesis se desarrolló a amperaje constante de 20 mA por gel en la cubeta (Mini-PROTEAN Tetra System).

## **7.2.- SDS-PAGE**

- Preparación de los extractos de proteínas:

Para la preparación de extractos crudos, se recogieron 10 unidades de DO<sub>600</sub> mediante centrifugación a 1.090 x g y se resuspendieron en 300 µl de tampón de lisis TNE (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA; pH 7,5) suplementado con un coctel de inhibidores de proteasas (cat# 1861278; Roche). Posteriormente, se añadieron 500 µl de bolas de vidrio (0,4 mm). Las células se lisaron mediante cuatro ciclos de 1 minuto con el vórtex intercalando con 1 minuto en hielo. Los restos celulares se eliminaron mediante centrifugación a 500 x g durante 5 minutos a 4°C. El sobrenadante fue separado y se adicionó tampón de carga 5x (cat# R0891; Fermentas, Ontario, Canada).

- Separación en función del peso molecular de las proteínas: SDS-PAGE:

Finalmente, se cargaron 10 µl de cada muestra en geles de acrilamida al 8% formados en un “gel caster” (Biorad) y la electroforesis se desarrolló a amperaje constante de 20 mA por gel en la cubeta (Mini-PROTEAN Tetra System).

### **7.3.- Transferencia a membranas de nitrocelulosa:**

Se transfirió a membranas de nitrocelulosa por capilaridad. Posteriormente, se utilizó como solución de bloqueo leche al 5% en TBST (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 150 mM NaCl, 0,1% Tween 20).

### **7.4.- Inmunodetección**

La proteína Hog1p doblemente fosforilada se detectó utilizando el anticuerpo específico contra la proteína p38 fosforilada (cat#. 9215, Cell Signaling, Beverly, MA). Como control de carga se usó un anticuerpo policlonal de conejo (cat#. 7074, Cell Signaling) producido contra el extremo carboxilo terminal-(221-435) de Hog1p de *S. cerevisiae*. Los antisueros se aplicaron en diluciones 1:1000 para Hog1p fosforilado, y 1:6000 para Hog1p total.

Para la detección de la isoenzima Tdh3p se utilizó el anticuerpo de ratón, cedido por Dr. Gozalbo (Dpto. Bioquímica, Facultad Farmacia U.V.), que reconoce específicamente dicha proteína. Como control de la posición horizontal relativa de Tdh3p, se utilizó un suero anti-Hxk2p (Randez-Gil y col., 1998). Ambos antiserums se aplicaron en diluciones 1:3000.

La proteína Gap1-GFP se detectó utilizando un anticuerpo monoclonal anti-GFP (Roche Diagnostics). Tat1p-HA y Tat2p-HA se visualizaron usando un anticuerpo policlonal de conejo anti-hemaglutinina en dilución 1:2000 (cat# sc-805; Santa Cruz Biotechnology). Como control de carga se utilizó el mismo anticuerpo anti-Hxk2p que en el caso anterior en dilución 1:3000.

La proteína Sng1 con etiqueta triple, se detectó utilizando un anticuerpo policlonal de conejo anti-hemaglutinina en dilución 1:2000 (cat#

sc-805; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) o un anticuerpo soluble peroxidasa-anti-peroxidasa ( $\alpha$ -PAP) producido en conejo, a dilución 1:1000 (cat# P1291; Sigma-Aldrich). En el caso de Sng1-yEGFP se usó un anticuerpo monoclonal anti-GFP en dilución 1:3000 (cat# 11814460001; Roche Diagnostics). Tat1-myc y Tat2-myc se visualizaron utilizando un anticuerpo monoclonal de ratón contra la proteína c-Myc en dilución 1:1000 (cat# sc-40; Santa Cruz Biotechnology). Como control de carga se usó el mismo anticuerpo anti-Hxk2 que en el caso anterior en dilución 1:3000. Como marcador de proteínas asociadas a rafts se utilizó un anticuerpo de conejo anti-Pma1 en dilución 1:10000 cedido por el Dr. Serrano (IBMCP UPV).

Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anti-conejo, conjugado con la enzima peroxidasa de rábano, en dilución 1:2000 (referencia no. 7074, Cell Signaling) o un anticuerpo de conejo anti-ratón en dilución 1:5000 (Dako, cat# P0260).

En todos los casos se reveló con el kit de detección para Western blot ECL Pierce (Thermo Scientific, cat# 32106) o ECL Select (GE Healthcare, cat# RPN2235). La señal quimioluminiscente se capturó con el sistema de imagen Las-1000 Plus (Fuji, Kyoto, Japan).

## **7.5.- Aislamiento de proteínas asociadas a “rafts”**

El análisis de las proteínas asociadas a rafts lipídicos se desarrolló mediante el procedimiento en flotación de optiprep (Bagnat y col., 2000), con ligeras modificaciones. Las células se cultivaron en medio líquido, YPD o SCD-Ura, a 30°C ( $DO_{600}=0,5$ ) y posteriormente se transfirieron a 12°C durante el tiempo indicado en cada experimento. Veinte unidades de  $DO_{600}$  fueron recogidas y lavadas con agua fría. Las células se lisaron como se

describe en el apartado 7.2. Los extractos totales de las muestras (180  $\mu$ l) fueron mezclados con 20  $\mu$ l de 10% de Triton X-100 e incubados a 4°C durante 1 hora. Posteriormente, se añadieron 500  $\mu$ l de solución de Optiprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norway) y la mezcla se transfirió a un tubo de ultracentrífuga de 2 ml. Superpuesta a la muestra se colocaron 1,2 ml de Optiprep al 30% preparado con TXNE (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,1% Triton X-100) y 200  $\mu$ l de TXNE; cada una de las soluciones fue suplementada con un coctel de inhibidores de proteasas (Roche).

Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 55.000 rpm durante 2 horas a 4°C en un rotor Beckman TLS55. Tras la centrifugación, se recogieron seis fracciones desde la parte superior del tubo, de 500  $\mu$ l cada una y las proteínas se precipitaron por adición de 1 ml de 15% de ácido tricloroacético, seguida de la incubación en hielo durante 45 minutos. Los precipitados resultantes se recogieron por centrifugación a 13.000 rpm a 4°C, 15 minutos y se lavaron dos veces con 200  $\mu$ l de acetona fría, tras lo cual, se resuspendieron en 100  $\mu$ l de un tampón con 5% de SDS y 0,1 M de Tris base.

Las muestras finales se analizaron mediante SDS-PAGE como se describe previamente.

### **7.6.- Purificación de afinidad en tándem (TAP)**

Para aislar las proteínas asociadas *in vivo* con Sng1p se realizó una purificación de afinidad en tándem (TAP) a pequeña escala, a partir de extractos de células de pSNG1-Gal expuestas a 12°C. Para la inducción con galactosa, las células fueron incubadas toda la noche en SCD-Ura a 30°C y refrescadas ( $DO_{600}=0,25$ ) en medio SCG-Ura. Tras 90 minutos, se

paró la inducción añadiendo glucosa al 2% y se transfirió el cultivo a 12°C. Para la extracción de proteínas se recogieron por centrifugación 25 unidades de  $DO_{600}$  de células y se resuspendieron en 300  $\mu$ l de tampón de lisis (50 mM Na HEPES [pH 7,4], 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% Na deoxicolato) suplementado con coctel de inhibidores de proteasas (Roche) y se procesaron como se describe previamente (apartado 7.3). Tras una centrifugación a  $17.900 \times g$  a 4°C durante 10 minutos, 200  $\mu$ l del sobrenadante se incubaron en rotación durante 2 horas con 100  $\mu$ l de Ni-sefarosa 6 Fast Flow (GE Healthcare) equilibrada con tampón de lisis a 4°C. Tras la unión, la resina se lavó cuatro veces con 150  $\mu$ l de tampón de lisis, seguidos por un paso de elución, que se realizó utilizando el mismo tampón con 300 mM de imidazol. Finalmente, la muestra se mezcló con 50  $\mu$ l de IgG-sefarosa y se incubaron y lavaron como se ha descrito. Los complejos proteicos se eluyeron con tampón (50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 10 mM EDTA, 1% SDS).

Las proteínas se visualizaron tras su separación en geles SDS-PAGE. Posteriormente, fueron identificadas mediante espectrometría de masas, en el servicio del Centro de Investigación Príncipe Felipe.

## **8.- Técnicas de microscopia**

### **8.1.- Microscopía de fluorescencia**

Las células fueron cultivadas durante la noche en SCD o SCD-Ura, dependiendo de la cepa, a 30°C y refrescadas a  $DO_{600}=0,25$ . En el caso de tratamientos con 2  $\mu$ g/ml de tunicamicina ó 0,5 M de NaCl, se recogieron muestras de 1 ml a diferentes tiempos. Para la observación de pSNG1-CFP la muestra se recogió en fase log ( $DO_{600}=0,5$ ). Tras una centrifugación de 5 minutos a  $500 \times g$ , las células se resuspendieron en 20 mM de

tampón PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) y 1 µl de cada una se observó directamente, utilizando un microscopio Zeiss 510 Meta de fluorescencia equipado con un objetivo 100x utilizando los filtros para fluorescencia de GFP y mCherry.

## **8.2.- Cuantificación de quitina**

Para visualizar la cantidad de quitina, la pared celular se tiñó con blanco de calcofluor (CFW, Fluorescent Brightener 28 #cat.F3543, Sigma). Para ello, se incubó 1 ml de células en fase exponencial ( $DO_{600}=0,5$ ) con para-formaldehído a concentración final del 4% durante 10 minutos, se lavaron con 1 ml de PBS-formaldehído (PBS, 4% paraformaldehído, pH 7,4) y se almacenó en seco durante la noche a 4°C. Posteriormente, se lavó con dietanolamina al 0,06% y dos veces con PBS. Tras la resuspensión en 50 µl de PBS se incubó a 4°C en oscuridad durante la noche con 5 µl de CFW a 1 mg/ml. Después de lavar cinco veces con PBS y resuspender las muestras en solución de montaje inmunofluorescente, se conservaron a 4°C para su posterior observación con un microscopio Zeiss 510 Meta de fluorescencia, equipado con un objetivo 100x utilizando el filtro para DAPI.

El análisis cuantitativo de las muestras se realizó con el programa Image J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

## **9.- Determinación de la capacidad fermentativa**

La capacidad fermentativa de las levaduras se llevó a cabo midiendo la producción de CO<sub>2</sub> con el equipo Fermograph II (Atto Co., Ltd., Tokyo, Japan). La biomasa necesaria para los ensayos, se preparó cultivando las células durante la noche a 30°C en medio SCD-Ura líquido.

Las muestras se recogieron por centrifugación, se lavaron con agua y se resuspendieron en medio YPM pre-enfriado a 12°C. La producción de CO<sub>2</sub> se registró durante 42 horas. Los valores se expresaron como mililitros de CO<sub>2</sub> y representan el volumen total de gas producido tras la fermentación. En todos los casos, los valores corresponden a la media, de al menos, tres experimentos independientes.

## **10.- Medidas de anisotropía**

Para analizar los efectos de *SNG1* en la fluidez de la membrana plasmática a diferentes temperaturas, se utilizó la sonda fluorescente DPH [1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno] (Invitrogen SARL, Cergy Pontoise, France). Las células se cultivaron en SCD-Ura a 30°C hasta fase logarítmica ( $DO_{600}=0,5$ ), se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS pH 7,4 y se resuspendieron en el mismo tampón. Posteriormente, se mezclaron 3 ml con 4 µl de una solución de DPH 1 mM en tetrahidrofurano y se colocaron en una cubeta de cuarzo en un termostato. La temperatura fue descendiendo linealmente ( $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) de 30 a 0°C utilizando un sistema Peltier (Wavelength Electronics, Bozeman, MT). La temperatura de la muestra se monitorizó con un sistema T-thermocouple colocado en el interior. Las variaciones se registraron cada 8 segundos utilizando el aparato PicoLog Recorder (Pico Technology, Cambridgeshire, UK) como se ha descrito previamente (Cao-Hoang y col., 2008). Las medidas de anisotropía ( $r$ ) se realizaron con un espectrofluorómetro (Fluorolog-3, Horiva Jobin Yvon, Edison, NJ). La intensidad de fluorescencia y la anisotropía, se midieron cada 8 segundos a 430 nm y excitando a 360 nm. Este parámetro es inversamente proporcional a la fluidez de membrana: a mayor valor de la anisotropía, mayor rigidez de la membrana.

**TABLA 1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este estudio**

Cepa	Genotipo	Fuente
W303-1A	<i>MATa ade2-1 his3-11,15 leu-2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 GAL mal SUC2</i>	Thomas y Rothstein, 1989
W303-1A <i>hog1Δ</i> (Trp <sup>-</sup> )	<i>MATa hog1Δ::kanMX3</i>	C. Pallotti
W303-1A <i>pbs2Δ</i>	<i>MATa pbs2Δ::kanMX3</i>	C. Pallotti
W303-1A <i>ssk1Δ</i>	<i>MATa ssk1Δ::kanMX3</i>	C. Pallotti
W303-1A <i>sho1Δ</i>	<i>MATa sho1Δ::kanMX3</i>	C. Pallotti
W303-1A <i>hog1Δ</i> (Trp <sup>+</sup> )	<i>MATa hog1Δ::TRP1</i>	Cvrcková y col., 1995
W303-1A <i>ptp2Δ</i>	<i>MATa ptp2Δ::LEU2</i>	Rep y col., 1999
W303-1A <i>ptp3Δ</i>	<i>MATa ptp3Δ::URA3</i>	Rep y col., 1999
W303-1A <i>ptp2Δ ptp3Δ</i>	<i>MATa ptp2Δ::LEU2 ptp3Δ::URA3</i>	Rep y col., 1999
W303-1A <i>hog1Δ ptp2Δ</i>	<i>MATa hog1Δ::TRP1 ptp2Δ::LEU2</i>	Rep y col., 1999
W303-1A <i>hog1Δ ptp2Δ ptp3Δ</i>	<i>MATa hog1Δ::TRP1 MATa ptp2Δ::LEU2 ptp3Δ::URA3</i>	Rep y col., 1999
W303-1A <i>ire1Δ</i>	<i>MATa ire1Δ::kanMX3</i>	Este estudio
W303-1A <i>hog1Δ ire1Δ</i>	<i>MATa hog1Δ::kanMX3 ire1Δ::natMX4</i>	Este estudio
S0329	<i>MATa trp1-1 leu2-3,112 ura3-52 his4 can1 FUS1::lacZ::LEU2</i>	O'Rourke y Herskowitz, 1998
PW014	S0329 <i>hog1::URA3</i>	Westfall y Thorner, 2006
PW350	S0329 <i>nmd5::URA3</i>	Westfall y col., 2008
PW355	S0329 <i>hog1::ura3::HOG1-GFP-CCAAX</i>	Westfall y col., 2008
PW357	S0329 <i>HOG1-GFP-Kan<sup>R</sup></i>	Westfall y col., 2008
PW420	S0329 <i>HOG1-GFP-Kan<sup>R</sup> HTB2-mCherry-URA3</i>	Westfall y col., 2008
PW369	PW355 <i>gpd1::URA3</i>	Westfall y col., 2008
PW401	S0329 <i>gpd1::URA3</i>	Westfall y col., 2008
<i>gpd1Δ pTEF1-GPD2</i>	PW401 <i>pGPD2::kanMX-pTEF1mut4</i>	Este estudio
<i>CCAAX gpd1Δ pTEF1-GPD2</i>	PW369 <i>pGPD2::kanMX-pTEF1mut4</i>	Este estudio
BY4741	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	Euroscarf
BY4741 <i>aly2Δ</i>	<i>MATa aly2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>caj1Δ</i>	<i>MATa caj1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>ubp13Δ</i>	<i>MATa ubp13Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>hog1Δ</i>	<i>MATa hog1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>pbs2Δ</i>	<i>MATa pbs2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>hac1Δ</i>	<i>MATa hac1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>gpd1Δ</i>	<i>MATa gpd1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>gpd2Δ</i>	<i>MATa gpd2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>gpd2Δ gpd1Δ</i>	<i>MATa gpd2Δ::kanMX4 gpd1Δ::natMX4</i>	Este estudio
BY4741 <i>hog1Δ gpd1Δ</i>	<i>MATa hog1Δ::kanMX4 gpd1Δ::natMX4</i>	Este estudio

BY4741 <i>hot1Δ</i>	<i>MATa hot1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>msn1Δ</i>	<i>MATa msn1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>sko1Δ</i>	<i>MATa sko1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>smp1Δ</i>	<i>MATa smp1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>tdh3Δ</i>	<i>MATa tdh3::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 Pil1-HA	<i>BY4741 PIL1-3HA::KanMX6</i>	Este estudio
BY4741 <i>sng1Δ</i>	<i>BY4741 sng1Δ::kanMX4</i>	Este estudio
BY4741 <i>sng1Δ Pil1-HA</i>	<i>BY4741 sng1Δ::kanMX4 PIL1-3HA::HIS3MX6</i>	Este estudio
BY4741 <i>drs2Δ</i>	<i>BY4741 drs2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>drs2Δsng1Δ</i>	<i>BY4741 drs2Δ::kanMX4 sng1Δ::natMX4</i>	Este estudio
BY4741 <i>dnf1Δ</i>	<i>BY4741 dnf1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>dnf2Δ</i>	<i>BY4741 dnf2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>dnf3Δ</i>	<i>BY4741 dnf3Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>pkh1Δ</i>	<i>BY4741 pkh1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>pkh1Δsng1Δ</i>	<i>BY4741 pkh1Δ::kanMX4 sng1Δ::natMX4</i>	Este estudio
BY4741 <i>pkh2Δ</i>	<i>BY4741 pkh2Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>pkh2Δsng1Δ</i>	<i>BY4741 pkh2Δ::kanMX4 sng1Δ::natMX4</i>	Este estudio
BY4741 <i>cdc50Δ</i>	<i>BY4741 cdc50Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>fpk1Δ</i>	<i>BY4741 fpk1Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>nce102Δ</i>	<i>BY4741 nce102Δ::kanMX4</i>	Euroscarf
BY4741 <i>nce102Δ Pil1-HA</i>	<i>BY4741 nce102Δ::kanMX4 PIL1-3HA::HIS3MX6</i>	Este estudio
BY4741 <i>nce102Δsng1Δ</i>	<i>BY4741 nce102Δ::kanMX4 sng1Δ::natMX4</i>	Este estudio
BY4741 <i>nce102Δ sng1Δ Pil1-HA</i>	<i>BY4741 nce102Δ::kanMX4 sng1Δ::natMX4 PIL1-3HA::HIS3MX6</i>	Este estudio
CENPK2-1C	<i>MATa ura3-52 his3Δ1 leu2-3,112 trp1-289 MAL 2-8<sup>c</sup> SUC2</i>	Entian y Kötter, 1998
CENPK2-1C <i>aly2Δ</i>	<i>MATa aly2Δ::kanMX4</i>	Este estudio
CENPK2-1C <i>tat1Δ</i>	<i>MATa tat1Δ::kanMX4</i>	Este estudio
CENPK2-1C <i>tat2Δ</i>	<i>MATa tat2Δ::kanMX4</i>	Este estudio
CEN.PK2-1C Tat1-myc	<i>CEN.PK2-1C TAT1-13myc::KanMX6</i>	Este estudio
CEN.PK2-1C Tat2-myc	<i>CEN.PK2-1C TAT2-13myc::KanMX6</i>	Este estudio
CEN.PK2-1C <i>chs3Δ</i>	<i>CEN.PK2-1C chs3Δ::kanMX4</i>	Este estudio
CEN.PK2-1C <i>sng1Δ</i>	<i>CEN.PK2-1C sng1Δ::kanMX4</i>	Este estudio
CEN.PK2-1C Sng1-myc	<i>CEN.PK2-1C SNG1-13myc::KanMX6</i>	Este estudio
YPH499	<i>MATa ura3-52 lys2-801 ade2-101 trp-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1</i>	Sikorski y Hieter, 1989
DD12	YPH499, <i>cnb1::hisG</i>	Cyert y Thorner, 1992
ASY472	YPH499, <i>crz1::loxP-kanMX-loxP</i>	Stathopoulos y Cyert, 1997
MCY300	YPH499, <i>cna1Δ1::hisG cna2Δ1::HIS3</i>	Cyert y col., 1991
Σ1278b	<i>MATa ura3</i>	Bechet y col., 1970

---

<i>rsp5</i>	27064b MATa <i>npi1 ura3 trp1</i>	Galan y col., 1996
<i>ho</i> QA23	QA23 <i>hoΔ::loxP</i>	Salvadó y col., 2012
MJHL201	QA23 <i>ho</i> , 5-FOA <sup>+</sup> Ura <sup>-</sup>	Este estudio
MJHL213	QA23 <i>ho</i> , 5-FOA <sup>+</sup> Ura <sup>-</sup> FAA <sup>+</sup> Trp <sup>-</sup>	Este estudio
KKT342	MATa LYS2 <i>ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 MET15 DNF2-3HA::HIS3MX6</i>	Nakano y col., 2008
KKT344	MATa LYS2 <i>ura3Δ0 his3Δ1 leu2Δ0 MET15 DNF2-3HA::HIS3MX6 fpk1Δ ::HphMX4 fpk2Δ ::KanMX6</i>	Nakano y col., 2008
CML476	MATa <i>ura3-52 leu2Δ1 his3Δ200 GAL2 CMVp(tetR<sup>-</sup>-SSN6)::LEU2 trp1::tTA</i>	Yen y col., 2003
YMB005	CML476 <i>kanMX4-(tetO7):PKH2 pkh1::HIS3</i>	Pastor-Flores y col., 2013
SDP8	CML476 <i>kanMX4-(tetO7):PKH2 pkh1::HIS3 pkh3::natMX4</i>	Pastor-Flores y col., 2013

---

**Tabla 2. Cebadores**

Nombre	Secuencia	Uso
HAC1-5'	ACAACCTCCTCCTCCCCACCTACGACAACAACCGCCACTCG TACGCTGCAGGTGCGAC	Delección <i>HAC1</i>
HAC1-3'	TATGAAAAGAAAAAACCCACCAGCGATAATAACGAGAAATCGA TGAATTCGAGCTCG	Delección <i>HAC1</i>
HAC1-800	GTTGTAAGGCAAAGTGGC	Verificación delección <i>HAC1</i>
HAC1+200	GCCAGTCTTGCTCCTTGC	Verificación delección <i>HAC1</i>
IRE1-5'	ACAGCATATCTGAGGAATTAATATTTTAGCACTTTGAAAACGTA CGCTGCAGGTGCGAC	Delección <i>IRE1</i>
IRE1-3'	ATGCAATAATCAACCAAGAAGCAGAGGGGCATGAACATATCG ATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>IRE1</i>
IRE1-300	AAGACGGAGAGTAAGCC	Verificación delección <i>IRE1</i>
IRE1+200	ATAACTGGAGTAGTATG	Verificación delección <i>IRE1</i>
HOG-K1	AAGGGAAACAGGGAAAACACTACAACATATCGTATATAATAGCATA GGCCACTAGTGGATCTG	Delección <i>HOG1</i>
HOG-K1	AAGTAAGAATGAGTGGTTAGGGACATTAACAAAAACACGTTTAC AGCTGAAGCTTCGTACGC	Delección <i>HOG1</i>
HOG-V1	CTCCAAGACTTTGCCCTG	Verificación delección <i>HOG1</i>
HAC1-F	TGAACTAAGTAGTAATTCGC	Sonda <i>HAC1</i>
HAC1-R	ATTACGCCAATTGTCAAG	Sonda <i>HAC1</i>
KAR2-F	ACTGTTATCGGTATTGAC	Sonda <i>KAR2</i>
KAR2-R	ATAGACAATAGAGAGACATC	Sonda <i>KAR2</i>
GPD1-K1	ATCCAACCTAATTCGCACGTAGACTGGCTTGGTATTGGCAGTT TCGCGTACGCTGCAGGTGCGAC	Delección <i>GPD1</i>
GPD1-K2	AACTGTGCCGACAGCTCTTGAATGAGTGGTGTGTAACCACC CTCATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>GPD1</i>
GPD1-V1	ACTTGAATGCTGGTAGAAAG	Verificación delección <i>GPD1</i>
GPD1-V2	ATGCGGAAGAGGTGTACAGC	Verificación delección <i>GPD1</i>
GPD1-F	TTGAATGCTGGTAGAAAG	Sonda <i>GPD1</i>
GPD1-R	TGACCGAATCTGATGATC	Sonda <i>GPD1</i>
ACT1-F	GGTATGTTCTAGCGCTTG	Sonda <i>ACT1</i>
ACT1-R	TCTGGGGCTCTGAATCTT	Sonda <i>ACT1</i>
ALY2-F	TTCGGTACCCATTCTCCATG	Construcción YEpALY2
ALY2-R	CTACTGCAGATATAAAGACTCTTTC	Construcción YEpALY2

CAJ1-F	GAAGTGCAGCCTTTATTATTACC	Construcción YEpCAJ1
CAJ1-R	GTGAATTCTATAACGTCGGGAG	Construcción YEpCAJ1
UBP13-F	GCAACTGCAGTAATGATGAC	Construcción YEpUBP13
UBP13-R	ATTCTAGATTGCTTGCATGCC	Construcción YEpUBP13
ALY2-K1	ATGCCCATGGACCAATCTATCTCATCTCCATTGTTTCCCCGTA CGCTGCAGGTCG	Delección <i>ALY2</i>
ALY2-K2	TTGATTGTTGTCATGCAACACAGTATCCTTATAAGATGGATCG ATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>ALY2</i>
ALY2-V1	GTGTCGACTCTGTGAGAGGG	Verificación delección <i>ALY2</i>
TAT1-K1	AGGTGCCTTTACCACCGTAGCTACCTAATATAGTTTCTCGCGT ACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>TAT1</i>
TAT1-K2	TGAATGGAATTGCTGTTAGCACCAGAAATTGGTCATCCTCATC GATGAATTCGAGCTC	Delección <i>TAT1</i>
TAT1-V1	ATACATAGAACCAAGCTG	Verificación delección <i>TAT1</i>
TAT2-K1	CTGAAGAACATAAGCTAAGCAAATTACGCAACACACTCTCCGT ACGCTCAGGTCGAC	Delección <i>TAT2</i>
TAT2-K2	TCTTCGGTATTAACACCAGAAATGGAAGTGTCTCACGTACATC GATGAATTCGAGCTC	Delección <i>TAT2</i>
TAT2-V1	ACTGACTTTCTCAACACG	Verificación delección <i>TAT2</i>
M3R	CACGTCAAGACTGTCAAG	Verificación delección
SNG1-P1	CGGATAGTCATTGAGCTCCTCC	Promotor <i>SNG1</i>
SNG1-P2	GAGCGATACACACACACAAGC	Promotor <i>SNG1</i>
SNG1-K1	TAGCGTCTGTCCCCGGGACATGGCATATATACAACGCAACCG TACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>SNG1</i>
SNG1-K2	ACCATTGGGTAGAATGAAGCAGAAATATTTAATATGATCCATC GATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>SNG1</i>
SNG1-V1	GACTATCGGCCTCCTGATG	Verificación delección <i>SNG1</i>
PIL1-V1	CCTGAACAAGAAGAAGG	Verificación etiquetado HA
PIL1-R1	TTTCAGAGTGAGGGAACAGAAATGATTATCTGTCCACGCAGAA TTCGAGCTCGTTTAAAC	Etiquetado HA
PIL1-R2	ACACCAAGCAAAGTGAGTCTCTTCCCCAACAAACAACAGCTCG GATCCCCGGGTTAATTA	Etiquetado HA
SNG1-myc- F2	AGAGGCCAATACTGATAAAAATAACAACCCGCCCGGAAATCG GATCCCCGGG	Etiquetado 13Myc
SNG1-myc- R1	GTATTAAGTGTATATATGAATAAGCTATTAACCCCTACCCAGAAT TCGAGCTCGTTTAAAC	Etiquetado 13Myc
SNG1-myc-V	GCTATGCAAGCAGCAGAAGC	Verificación 13Myc
TAT1-myc- F2	TTCAAGAAAGTTTTTTAAGAGGATGACCAATTTCTGGTGCCGG ATCCCCGGGTTAATTA	Etiquetado 13Myc

---

TAT1-myc-R1	AAGCCCGATGAAGCCAAGCGGAAAATGAATGGAATTGCTGGA ATTCGAGCTCGTTTAAAC	Etiquetado 13Myc
TAT1-myc-V	AAGTTGACGATAACGATG	Verificación 13Myc
TAT2-myc-F2	TTCCCGTCCATGGTACGTGAGACAGTTCCATTTCTGGTGTCTG GATCCCCGGGTTAATTA	13Myc tagging
TAT2-myc-R1	AAATATTCTACAAAAATAAATTGAACTTGTTTCTTCGGTAGAAT TCGAGCTCGTTTAAAC	13Myc tagging
TAT2-myc-V	GTCAAGCAAGAAATTGCC	13Myc tagging verification
CHS3-K1	CATCAAGTACCGGTGTAAACCCAAATGCAACTCGTCGGAGCG TACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>CHS3</i>
CHS3-K2	GTA CTCAAACACTTGAATTGCAGTTACCCAAGATTGTGCCATC GATGAATTTCGAGCTC	Delección <i>CHS3</i>
CHS3-V1	GTTACCGAACC GAAGACAG	Verificación delección <i>CHS3</i>
Yep24-F	ACTCGCGATCAATCAATC	Secuenciación Yep24
Yep24-R	CACTTGTTAATCATATTG	Secuenciación Yep24

---

**TABLA 3. Plásmidos**

Plásmido	Características	Fuente o referencia
YEplac195	<i>URA3</i>	Gietz y Sugino, 1988
YEplac 181	<i>LEU2</i>	Gietz y Sugino, 1988
YIplac 204	<i>TRP1</i>	Gietz y Sugino, 1988
YCplac33	<i>URA3</i>	Gietz y Sugino, 1988
pMCZ-Y	2 $\mu$ <i>URA3 amp<sup>R</sup></i> , UPRE fusionado con <i>lacZ</i>	Mori y col., 1996
pRS426-HA-HOG1	pRS426 con el gen <i>HOG1</i> fusionado con 3x HA	Bell y Engelberg, 2003
pRS426-HA-HOG1nP	pRS426 con el alelo de <i>HOG1</i> no fosforilable	Thorsen y col., 2006
pRS426-HA-HOG1KD	pRS426 con el alelo de <i>HOG1</i> sin actividad quinasa	Thorsen y col., 2006
YEpGPD1	YEplac195 con el gen <i>GPD1</i>	Albertyn y col., 1994
pVRS3	YCplac111 con el gen <i>HOG1</i> marcado con 3x HA	Alepuz y col., 2001
pVRS3-NLS	pVRS3 con el gen <i>HOG1</i> de localización nuclear	Alepuz y col., 2001
p3HA-TAT1c	YCplac33 ( <i>URA3</i> ), <i>TAT1</i> fusionado con HA	Abe y Iida, 2003
p3HA-TAT2c	YCplac33 ( <i>URA3</i> ), <i>TAT2</i> fusionado con HA	Abe y Iida, 2003
YCpJ25	<i>URA3</i> , <i>GAP1</i> fusionado con GFP	De Craene y col., 2001
YEp24	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	Carlson y Botstein, 1982
pSGM-2	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	Este estudio
pSGM-4	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	Este estudio
pSGM-10	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	Este estudio
pSGM-25	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	Este estudio
pSGM-SD9	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	Este estudio
pSGM-SD14	<i>URA3</i> , 2 $\mu$	Este estudio
pUL9	Cambio marcador de selección de <i>URA3</i> a <i>LEU2</i>	Cross, 1997
pFa6A	kanMX4	Wach y col., 1994
pAG25	natMx4	Goldstein y McCusker, 1999
pAG28	hphMX4	Goldstein y McCusker, 1999
YEpALY2	YEplac195 fusionado con el gen <i>ALY2</i>	Este estudio
YEpCAJ1	YEplac195 fusionado con el gen <i>CAJ1</i>	Este estudio
YEpUPB13	YEplac195 fusionado con el gen <i>UPB13</i>	Este estudio
YEp181ALY2	YEplac181 fusionado con el gen <i>ALY2</i>	Este estudio
YEp181UBP13	YEplac181 fusionado con el gen <i>UPB13</i>	Este estudio
pFA6a-13Myc-KanMX6	13x <i>Myc::kanMX3</i>	Longtine y col., 1998
pFA6a-3HA-KanMX6	3x HA:: <i>kanMX3</i>	Longtine y col., 1998
pBG1805	<i>URA3</i> , pGAL	Open Biosystems

---

pBG1805-SNG1	pBG1805 con el gen <i>SNG1</i> etiquitado con 6xHIS, HA y Proteina A	Open Biosystems
pSNG1-SNG1	pBG1805-SNG1 con su promotor propio	Este estudio
<i>pFL44</i>	<i>URA3</i>	García-López y col., 2010
<i>pFL44-SNG1yECFP</i>	<i>pFL44</i> con el gen <i>SNG1</i> marcado con yECFP	García-López y col., 2010

---

# **CAPÍTULO 1**

---

**La actividad citosólica de la MAPK Hog1 es necesaria para la respuesta a estrés del retículo endoplásmico inducido por exposición a Tunicamicina.**



Las células han desarrollado mecanismos para el correcto plegamiento de proteínas y para asegurar que solo éstas alcancen su destino final. Este control de calidad ocurre a nivel del retículo endoplásmico (RE), compartimento en el que las proteínas de secreción y de membrana se pliegan y maduran. Cuando las condiciones ambientales aumentan el nivel de proteínas mal plegadas hablamos de estrés del RE y se desencadenan respuestas adaptativas, entre otras la mediada por la UPR. Aunque ha sido ampliamente estudiado, parte del programa de expresión génica que se inicia, no está relacionado con funciones del RE o de la ruta de secreción. Esto sugiere que, bajo estas condiciones, la viabilidad celular podría estar influida por efectores adicionales o rutas de señalización tradicionalmente asociadas a otros estreses. Un ejemplo sería la ruta HOG que ha sido identificada como necesaria para la supervivencia durante estrés del RE (Chen y col., 2005), si bien su papel funcional no ha sido caracterizado.

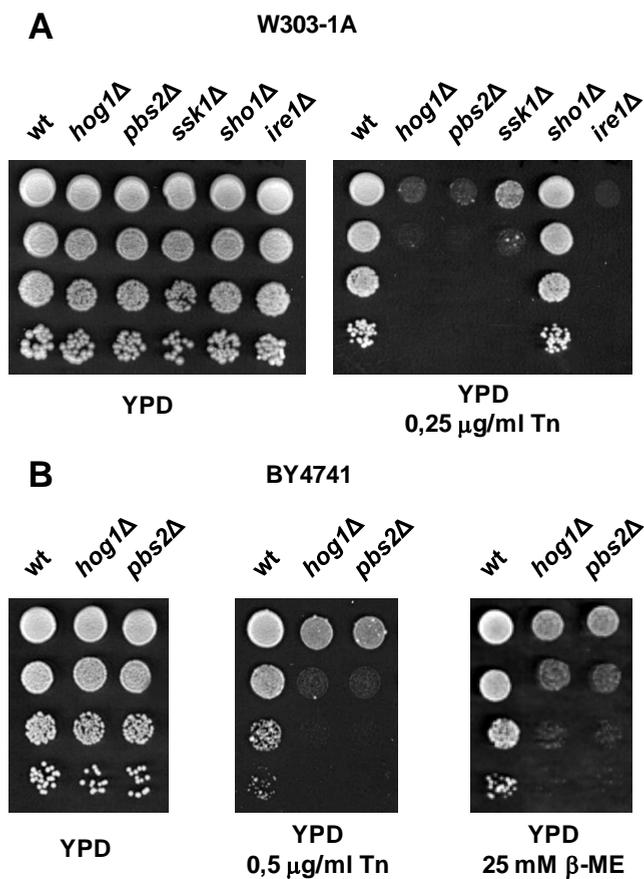
Como se mencionó en el capítulo de Introducción, varios estudios indican que la ruta HOG participa en diferentes estreses como hiperosmolaridad (Gustin y col., 1998), adaptación a ácido cítrico (Lawrence y col., 2004), estrés térmico (Winkler y col., 2002) y baja temperatura (Panadero y col., 2006), entre otros. Aunque está aceptada la translocación al núcleo de Hog1p en respuesta a estrés osmótico, un estudio reciente descarta la necesidad de la activación transcripcional dependiente de esta MAPK como crítica para la adaptación (Westfall y col., 2008). En cambio, Hog1p jugaría un papel citosólico estableciendo las condiciones metabólicas para una elevada producción de glicerol. Esta función podría ser también importante en respuesta a otras señales ambientales en las que la MAPK juega un papel. Es el caso de la

respuesta a estrés térmico en la que no se observa la acumulación nuclear de Hog1p (Winkler y col., 2002), o la respuesta a metilglioxal que ocurre sin su fosforilación (Aguilera y col., 2005), evento necesario para su entrada al núcleo. Sin embargo, la actividad citosólica de esta MAPK ha recibido poca atención, por lo que, es necesario esclarecer su papel funcional, así como, las dianas citosólicas que regula en cada situación y en particular, en respuesta a un estrés del RE.

## RESULTADOS

### 1.- Las MAP quinasas Pbs2p y Hog1p juegan un papel importante en la supervivencia de *S. cerevisiae* a estrés del retículo endoplásmico.

En primer lugar, se confirmó la implicación de la ruta HOG en la supervivencia y adaptación de las células de levadura a estrés del RE. Para ello, se examinó el crecimiento de diversos mutantes en elementos de esta ruta, en presencia de agentes inductores de la UPR como la tunicamicina (Tn), un inhibidor natural de la N-glicosilación, o el  $\beta$ -mercaptoetanol, un agente reductor que impide la formación de puentes disulfuro (Back y col., 2005). Como cabría esperar, la delección de *HOG1* en la cepa silvestre W303-1A dio como resultado un fenotipo de sensibilidad a tunicamicina (Fig. 8A). En el caso de una cepa sin Pbs2p, la MAPKK de la ruta HOG, se observó un fenotipo similar (Fig. 8A). También se comprobó que estos efectos no dependían del fondo genético analizado, puesto que los derivados *hog1 $\Delta$  y *pbs2 $\Delta$  de la cepa BY4741, mostraron el mismo resultado (Fig. 8B), aunque a concentraciones más elevadas de la droga (0,5  $\mu$ g/ml). Además, estas mismas cepas mutantes fueron también sensibles a la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Fig. 8B), descartando un efecto exclusivo de la tunicamicina.**



**Fig. 8. La ruta HOG tiene un papel en la supervivencia de *S. cerevisiae* a estrés del RE.** Crecimiento de mutantes de la ruta HOG en presencia de tunicamicina (Tn) o  $\beta$ - mercaptoetanol ( $\beta\text{-ME}$ ). A) W303-1A y sus correspondientes mutantes *hog1Δ*, *pbs2Δ*, *sho1Δ* y *ssk1Δ*. Como control se utilizó el mutante de la UPR *ire1Δ*. B) BY4741 y sus correspondientes mutantes *hog1Δ* y *pbs2Δ*. Las células se inocularon y cultivaron como se indica previamente (ver Materiales y Métodos). En todos los casos, se muestra un experimento representativo. En los análisis con tunicamicina, se comprobó previamente que la presencia de DMSO, utilizado para disolver la droga, no tiene efecto en el crecimiento (ver Fig. 9 para experimento control, YPD+DMSO).

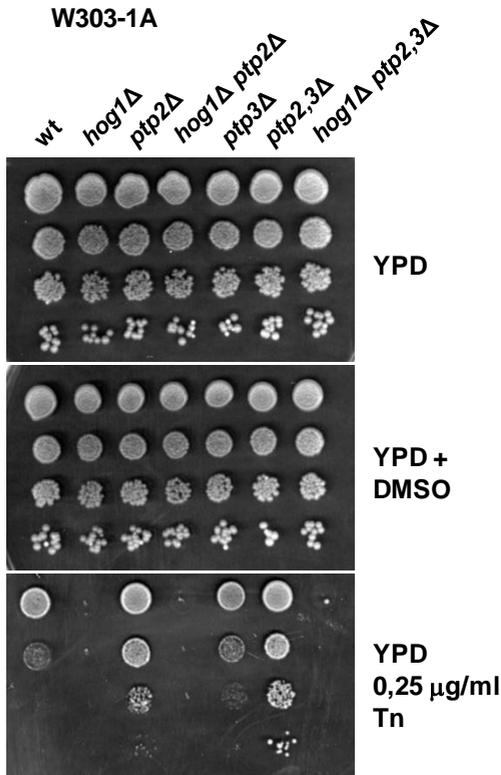
## **2.- La resistencia a Tunicamicina depende de la rama *Sln1* de la ruta HOG.**

Como ya hemos mencionado, la señalización a través de la ruta HOG puede activarse mediante dos mecanismos independientes, iniciados por la proteína de membrana Sho1 o por el sistema de fosforilación Sln1p-Ypd1p-Ssk1p. Por lo tanto, analizamos cuál de las dos ramas estaba implicada en la percepción y señalización de la presencia de tunicamicina. Debido a que la interrupción de *SLN1* es letal (Maeda y col., 1994), este sistema sensor sólo puede bloquearse mediante la disrupción de *SSK1*. Como se muestra en la Fig. 8A, el mutante *ssk1Δ* es sensible a tunicamicina mientras que, el mutante *sho1Δ* no, indicando que sólo la rama de Sln1p parece estar involucrada en la activación de la ruta HOG en estas condiciones.

## **3.- La actividad de la ruta HOG determina el nivel de sensibilidad a estrés del RE.**

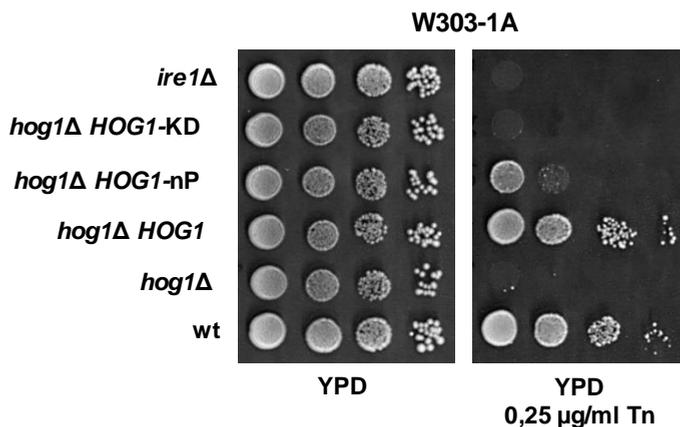
Las fosfatasa Ptp2p y Ptp3p se han descrito como inhibidoras de la ruta HOG, ya que defosforilan a la MAPK (Wurgler-Murphy y col., 1997; Jacoby y col., 1997) regulando también de esta forma su localización subcelular (Mattison y Ota, 2000). En consecuencia, la delección de los genes *PTP2* y *PTP3* conlleva una sobreactivación de Hog1p. Analizamos el efecto de la presencia de tunicamicina en el crecimiento de células de las cepas mutantes *ptp2Δ*, *ptp3Δ* y *ptp2Δ ptp3Δ*. Como se observa en la Fig. 9, la cepa *ptp2Δ* es más tolerante a tunicamicina que la cepa silvestre, mientras que la delección de *PTP3* no tiene ningún efecto en la sensibilidad a esta droga. Sin embargo, las células con la doble disrupción de *PTP2* y

*PTP3* fueron más resistentes que el mutante simple *ptp2Δ* (Fig. 9). Estos resultados concuerdan con estudios previos que demuestran un papel menor de Ptp3p en la regulación del estado de fosforilación de Hog1p (Jacoby y col., 1997; Mattison y Ota, 2000). Por último, al eliminar *PTP2*, individualmente o en combinación con *PTP3*, sobre un fondo *hog1Δ*, se obtuvo un fenotipo de sensibilidad similar al de la cepa sin la MAPK (Fig. 9). Por lo tanto, el fenotipo de resistencia a estrés del RE de las cepas mutantes *ptp2Δ* y *ptp2Δ ptp3Δ* es totalmente dependiente de la presencia de una proteína Hog1 funcional.



**Fig. 9 La actividad de la ruta HOG participa en la tolerancia de las células de *S. cerevisiae* a tunicamicina.** Crecimiento en presencia de tunicamicina (Tn) de células de la cepa parental W303-1A (wt) y sus correspondientes mutantes sin la MAPK Hog1p (*hog1Δ*) y/o las proteína fosfatasas Ptp2p y Ptp3p. Las cepas fueron transformadas con los plásmidos integrativos YIplac 204 (*TRP1*), YIplac211 (*URA3*) y/o YIplac128 (*LEU2*) con el objeto de que fueran isogénicas para los marcadores auxotróficos. Como control, se utilizó placas de YPD con DMSO, compuesto utilizado para solubilizar la droga.

Con el objeto de comprobar si la actividad quinasa de Hog1p participa en la respuesta a estrés del RE, se examinó la sensibilidad a tunicamicina de células mutantes *hog1Δ* que expresan un alelo del gen nativo o alelos mutados en K52R (*HOG1-KD*) o T174A/Y176 (*HOG1-nP*) que dan lugar a una proteína sin actividad quinasa o infosforilable, respectivamente (Thorsen y col., 2006). Como se muestra en la Fig. 10, el alelo *HOG1-KD* fue incapaz de aliviar la sensibilidad de *hog1Δ* a tunicamicina, mientras que los transformantes expresando un *HOG1* nativo mostraron un crecimiento similar al de la cepa parental. La expresión del alelo *HOG1-nP* mejoró el crecimiento de las células *hog1Δ* en presencia de tunicamicina (Fig. 10), aunque éste fue muy inferior al mostrado por la cepa silvestre.



**Fig. 10. Sensibilidad a tunicamicina de células del mutante *hog1Δ* que expresan diferentes alelos mutados de *HOG1*.** Células carentes de Hog1p se transformaron con plásmidos conteniendo un alelo de *HOG1* nativo (*HOG1*), infosforilable (*HOG1-nP*) o sin actividad quinasa (*HOG1-kD*) y se examinó su crecimiento en presencia de tunicamicina (Tn). Como control se utilizaron células de la cepa silvestre (wt) y del mutante *ire1Δ* transformadas con un plásmido vacío.

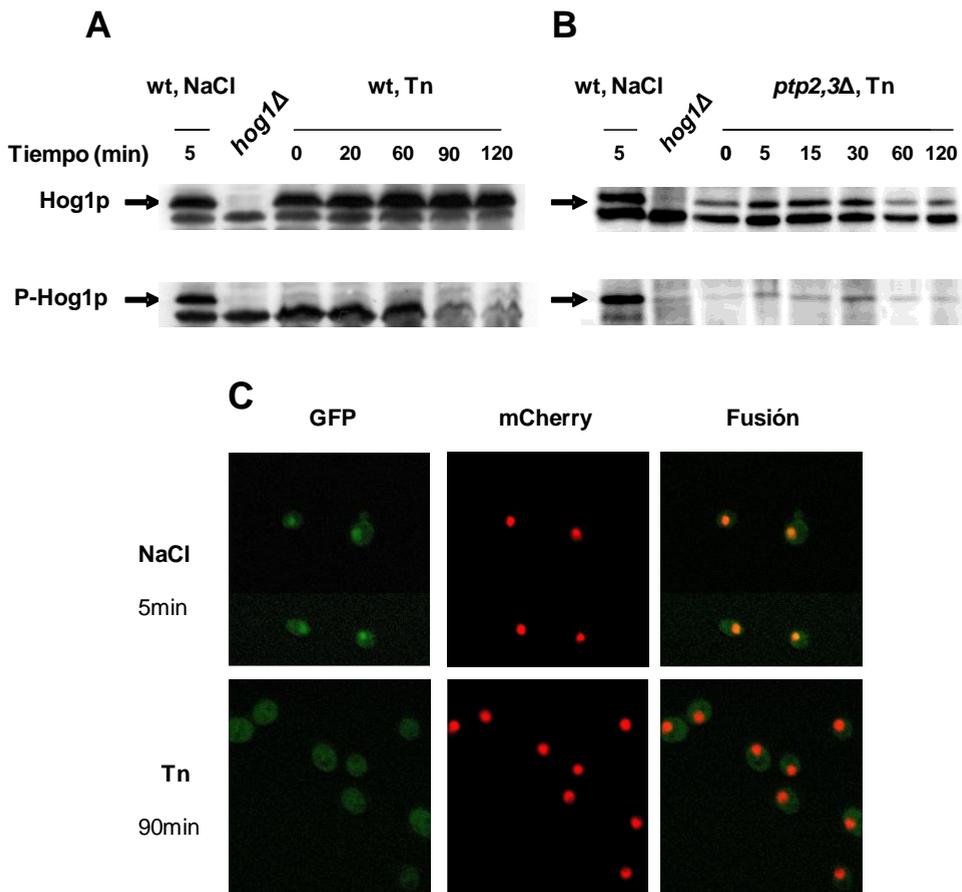
Estas diferencias no fueron consecuencia de la abundancia de Hog1p, puesto que mediante Western blot comprobamos que en todos los casos había niveles similares de la proteína (datos no mostrados). De esta forma, nuestros resultados indican que se requiere la actividad quinasa de Hog1p para hacer frente a los defectos en la N-glicosilación promovidos por exposición a tunicamicina.

#### **4.- Fosforilación de Hog1p y su translocación al núcleo.**

Con el objeto de analizar la localización subcelular de Hog1p, en primer lugar examinamos su estado de fosforilación en presencia de tunicamicina. Para ello, extractos proteicos de células expuestas a tunicamicina se separaron en geles SDS-PAGE y tras su transferencia a membranas de nitrocelulosa, se hibridaron con un anticuerpo anti-fosfo p38 que reconoce también la forma fosforilada de Hog1p, o un anticuerpo anti-Hog1 que permite visualizar todas las isoformas de la MAPK. Durante los 120 minutos de tratamiento de las células de levadura con 2 µg/ml de tunicamicina, no se detectó fosforilación de la MAPK (Fig. 11A, panel inferior). Al exponer las células a tunicamicina durante periodos más largos o concentraciones mayores, ej. 20 µg/ml, los resultados fueron similares (datos no mostrados). Sólo en el caso del doble mutante *ptp2Δ ptp3Δ*, observamos un mayor nivel de fosforilación de Hog1p tras el tratamiento con tunicamicina (Fig. 11B).

Otra estrategia utilizada para determinar la translocación al núcleo de la MAPK en respuesta a estrés del RE, fue monitorizar la distribución de la proteína de fusión Hog1-GFP y la histona nuclear Htb2-mCherry (Westfall y col., 2008) en células tratadas con tunicamicina o con NaCl

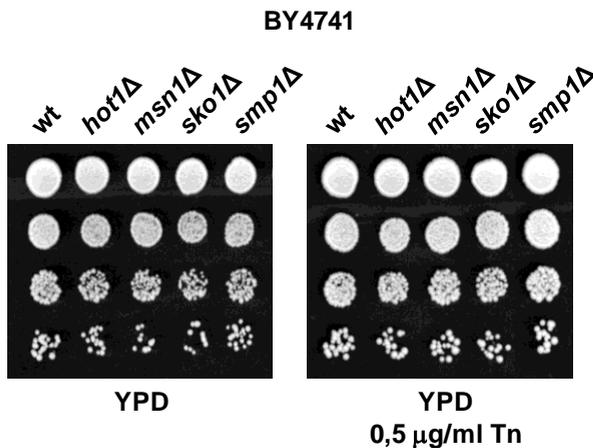
como control. Como puede observarse en la Fig. 11C, la exposición a tunicamicina no alteró la localización citosólica de Hog1-GFP. Por el contrario, el tratamiento con NaCl disparó su acumulación en el núcleo, como se desprende de su co-localización con la histona H2B a los 5 min de haber iniciado el experimento.



**Fig. 11 Fosforilación y translocación al núcleo de Hog1p en células de *S. cerevisiae* expuestas a tunicamicina.** A) se examinó el nivel de fosfo-Hog1p en células de la cepa silvestre W303-1A (wt) o B) células del doble mutante

*ptp2Δ ptp3Δ*, expuestas a 2 µg/ml de tunicamicina (Tn). Como controles negativo y positivo, respectivamente, se utilizaron células de la cepa *hog1Δ* o de la cepa parental crecidas a 30°C y tratadas con 0,5 M de NaCl durante 5 min. C) Células de la cepa PW420, que contiene una proteína de fusión Hog1p-GFP y la histona nuclear Htb2p-mCherry, se cultivaron en YPD ( $OD_{600} = 0,3-0,4$ ). Posteriormente, se añadió tunicamicina (Tn) a una concentración final de 2 µg/ml y se recogieron muestras a distintos tiempos. Como control positivo se utilizó células tratadas durante 5 min con 0,5 M de NaCl.

Así, en estos resultados Hog1p parece no migrar al núcleo en presencia de tunicamicina. En consonancia, cuando analizamos la sensibilidad a tunicamicina de mutantes, en diferentes factores de transcripción dependientes de Hog1p, no se observó defecto de crecimiento en estas condiciones de estrés en ninguna de las cepas ensayadas (Fig. 12).

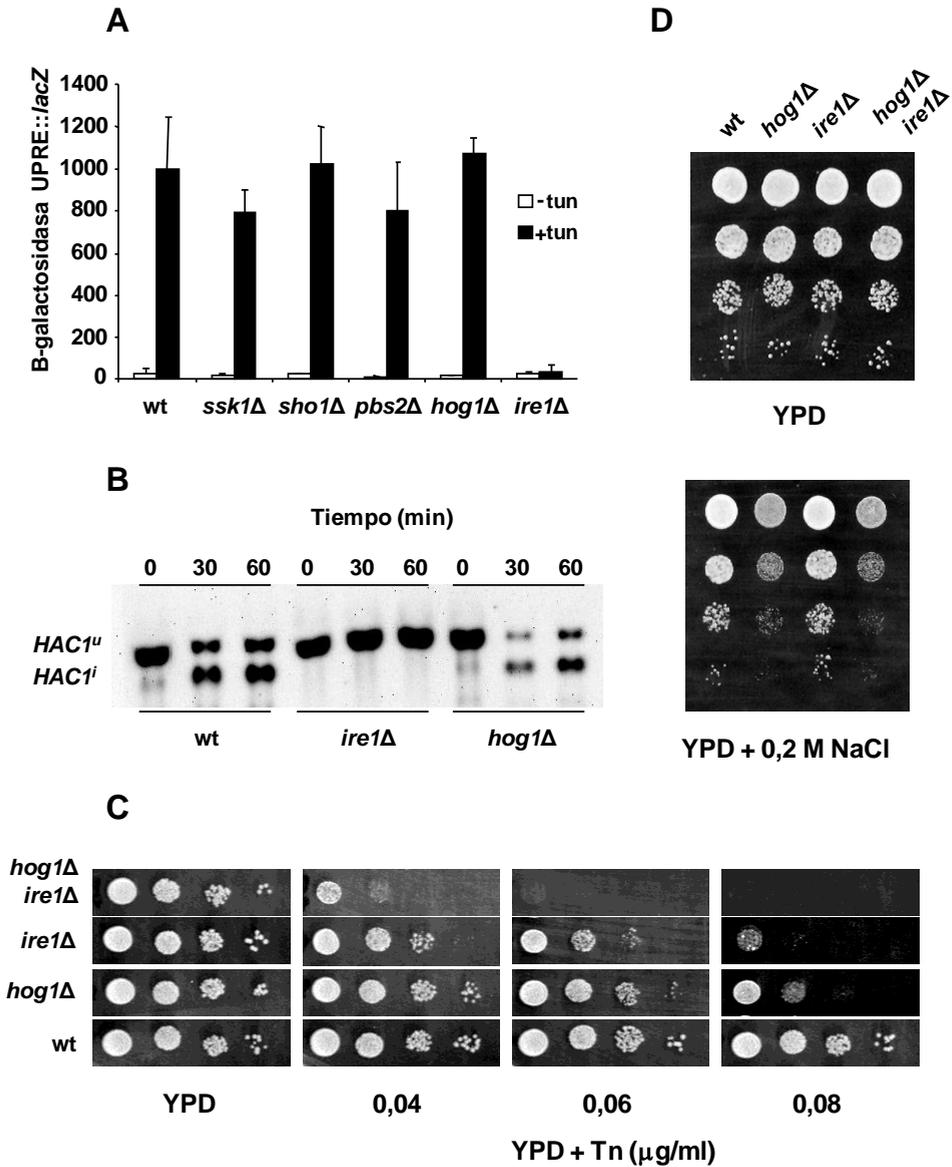


**Fig. 12. Sensibilidad a tunicamicina de células mutantes de factores de transcripción de la ruta HOG.** Crecimiento de células de la cepa silvestre BY4741 y sus correspondientes mutantes *hot1Δ*, *msn1Δ*, *sko1Δ* y *smp1Δ* en presencia de tunicamicina.

## 5.- La actividad de la ruta HOG no altera la señalización de la UPR.

Llegados a este punto decidimos analizar si la ruta HOG afecta a la respuesta mediada por la UPR. En primer lugar, se analizó la activación del chivato UPR::*lacZ*, que contiene la secuencia CAGCGTG correspondiente al UPR (“Unfolded Protein Response Element”) fusionado con el gen *lacZ* de *E. coli* (Mori y col., 1996) en células de la cepa parental W303-1A y de sus correspondientes mutantes *ssk1Δ*, *sho1Δ*, *pbs2Δ* y *hog1Δ* expuestas a 2 μg/ml de tunicamicina. Como control negativo se utilizó el mutante *ire1Δ*. Como cabría esperar, no se detectó actividad β-galactosidasa significativa en células carentes de Ire1p. Mientras que en células silvestres, tras 90 minutos de exposición a la droga, se observó una inducción de ~35 veces. En el caso de los mutantes de la ruta HOG, no se detectaron cambios significativos respecto a la cepa parental (Fig. 13A).

Posteriormente, se monitorizó el “splicing” de *HAC1*, mediante análisis por Northern blot del mRNA de este gen en células expuestas a tunicamicina. Como ya hemos mencionado, la activación de Ire1p promueve el procesado del precursor del mRNA de *HAC1* (*HAC1<sup>u</sup>*) dando lugar a la forma madura de este factor transcripcional (*HAC1<sup>i</sup>*) (Cox y Walter, 1996; Sidrauski y Walter, 1997). Conforme a esto, no se detectó la forma *HAC1<sup>i</sup>* en células del mutante *ire1Δ* expuestas a tunicamicina (Fig. 13B); mientras que 30 min de exposición a tunicamicina indujo la aparición de la banda correspondiente a *HAC1<sup>i</sup>* tanto en una cepa silvestre como en el mutante *hog1Δ* (Fig. 13B).



**Fig. 13. Interacción entre la UPR y la ruta HOG.** A) actividad  $\beta$ -galactosidasa del chivato UPRE-*lacZ* en células de las cepa parental W303-1A (wt) y sus correspondientes mutantes *hog1Δ*, *ire1Δ*, *pbs2Δ*, *sho1Δ* y *ssk1Δ*, expuestas a 2  $\mu\text{g/ml}$  de tunicamicina (Tn) durante 90 minutos. Los datos

representan el valor medio de tres experimentos independientes. B) células de las cepas wt y sus mutantes *ire1Δ* y *hog1Δ*, se trataron con tunicamicina a los tiempos indicados y se procesaron para su análisis por Northern blot del mRNA de *HAC1*. Aquí se muestra un experimento representativo. Las formas del mRNA de *HAC1* se indican como *HAC1<sup>u</sup>* (pre) y *HAC1<sup>i</sup>* (maduro). Crecimiento de la cepa parental W303-1A y sus correspondientes mutantes *hog1Δ*, *ire1Δ* y *hog1Δ ire1Δ* en presencia de tunicamicina a las concentraciones indicadas (C), o 0,2 M de NaCl (D).

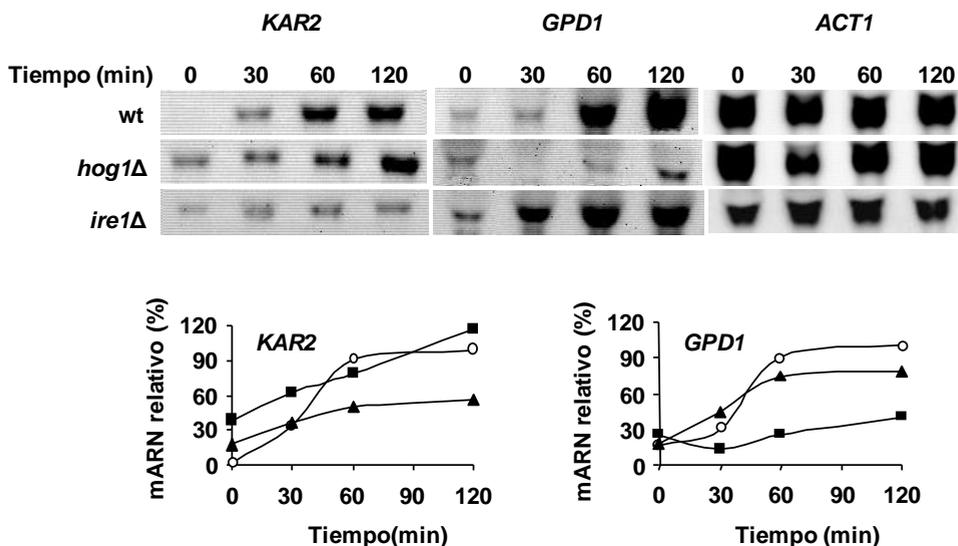
Por último, se analizaron los efectos epistáticos de la interrupción de *HOG1* e *IRE1* sobre la sensibilidad a tunicamicina y NaCl de *S. cerevisiae*. Como se observa en la Fig. 13C, la inhibición del crecimiento producida por exposición a tunicamicina fue más pronunciada en el doble mutante *hog1Δ ire1Δ* que en sus correspondientes mutantes simples *hog1Δ* o *ire1Δ*. Además, los efectos combinados parecen ser completamente aditivos (ver el panel correspondiente a 0,06 μg/ml Tn). Cuando analizamos la tolerancia a NaCl, no se observaron defectos de crecimiento en ausencia de Ire1p (Fig. 13D) y el doble mutante mostró el mismo fenotipo que el mutante *hog1Δ*. En conjunto, estos resultados sugieren que las dos proteínas están involucradas en procesos diferentes de la respuesta a estrés del RE y que la activación de la UPR es independiente de Hog1p.

## **6.- La proteína Hog1p participa en la respuesta transcripcional durante estrés del RE.**

Al no observar relación funcional entre las rutas HOG y UPR decidimos investigar en mayor profundidad el papel transcripcional de esta MAPK en la respuesta de *S. cerevisiae* a estrés del RE. Para ello, se

analizaron los niveles de mRNA de *KAR2* y *GPD1*, en células expuestas a tunicamicina, tanto de la cepa parental como de los mutantes simples *ire1Δ* y *hog1Δ*. Conviene recordar que *KAR2* codifica una chaperona del RE cuya expresión es dependiente del sistema Ire1p-Hac1p (Chapman y col., 1998; Travers y col., 2000), mientras que *GPD1*, es el gen de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la enzima principal en la síntesis de glicerol, cuya transcripción es dependiente de Hog1p (Albertyn y col., 1994).

Como cabía esperar, *KAR2* se indujo con rapidez en células tratadas con tunicamicina. Este efecto, dependió de *IRE1*, mientras que la ausencia de la MAPK Hog1p no tuvo efectos significativos, sólo el nivel basal de transcrito pareció incrementarse (Fig. 14). Estos resultados refuerzan la idea de que Hog1p tiene un papel en la expresión basal (no inducida) de diferentes genes de levadura, como se ha descrito previamente en otros estudios (Proft y Struhl, 2002; Alepuz y col., 2003; De Nadal y col., 2004; Aguilera y col., 2005). Comparado con el perfil de expresión de *KAR2*, el de *GPD1* mostró su máxima inducción tras 120 minutos de tratamiento con tunicamicina. La delección de *HOG1* disminuyó drásticamente la expresión de *GPD1* en estas condiciones de estrés (Fig.14). Por el contrario, en ausencia de una ruta Hac1p-Ire1p funcional la expresión de *GPD1* mostró una inducción más temprana que el observado en la cepa parental (Fig.14).



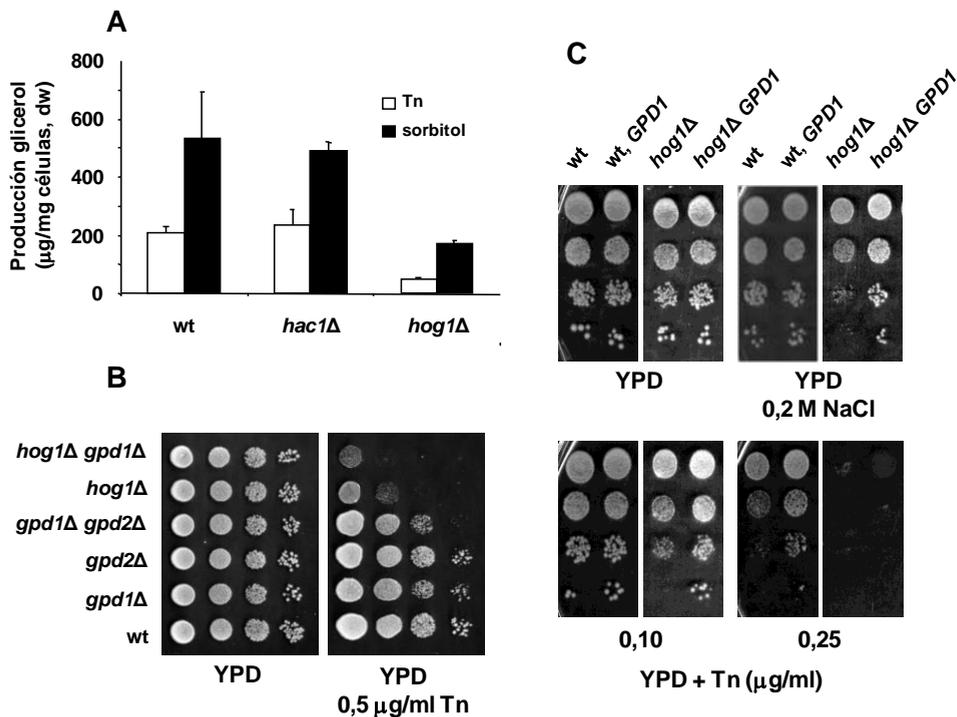
**Fig. 14. Hog1p regula en parte la respuesta transcripcional a estrés del RE.** Cultivos de la cepa parental W303-1A (○) y de sus correspondientes mutantes *hog1Δ* (■) e *ire1Δ* (▲) fueron tratados con 2 μg/ml de tunicamicina (Tn) y los niveles de mRNA de los genes *KAR2* y *GPD1* analizados a los tiempos indicados mediante Northern blot. Los valores de mRNA de cada gen se normalizaron con respecto a los de mRNA del gen *ACT1*, y fueron representados como porcentaje del nivel máximo de inducción. En todos los casos se muestra un experimento representativo. Experimentos independientes mostraron cinéticas de inducción y valores de mRNA similares.

## 7.- La producción de glicerol en respuesta a tunicamicina proporciona protección frente a los efectos tóxicos de la droga.

La inducción de *GPD1* observada por exposición a tunicamicina, nos llevó a plantearnos si la síntesis de glicerol podía tener un papel funcional en la tolerancia a esta droga. La síntesis de este osmolito es

típica de la respuesta a estrés osmótico en levaduras y para su producción máxima se requiere la actividad de Hog1p (Albertyn y col., 1994). Células de la cepa silvestre BY4147 en crecimiento logarítmico, fueron expuestas durante 3 horas a tunicamicina o 1 M de sorbitol como control positivo, observándose un aumento en el contenido en glicerol de ~200 y 500  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de células peso seco, respectivamente. En el caso de células del mutante *hac1 $\Delta$* , no se observaron diferencias significativas respecto a la cepa parental. Este resultado confirma una vez más, la ausencia de interacciones funcionales entre las rutas HOG y UPR. Por el contrario, en células del mutante *hog1 $\Delta$*  expuestas, tanto a tunicamicina como a sorbitol, el aumento en el contenido de glicerol fue menor (Fig. 15A). Así, parece que el estrés del RE induce la acumulación de glicerol y este proceso es dependiente, al menos en parte, de la actividad de la MAPK Hog1p.

A la vista de estos resultados, nos preguntamos si esta acumulación de glicerol, era necesaria para la adaptación a estrés del RE. Como se observa en la Fig.15B, una cepa sin *GPD1* mostró un fenotipo ligeramente más sensible a tunicamicina que su correspondiente cepa parental. No obstante, este efecto fue más evidente cuando células mutantes para *gpd1 $\Delta$*  fueron interrumpidas también para *GPD2*, gen codificante para una segunda isoenzima de la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Ansell y col., 1997). El doble mutante *gpd1 $\Delta$  gpd2 $\Delta$*  no presentó un fenotipo de sensibilidad tan acusado como el de la cepa sin Hog1p. Ahora bien, la delección de *GPD1* sobre un fondo *hog1 $\Delta$*  aumentó el defecto de crecimiento observado en el mutante simple de la MAPK (Fig.15B).

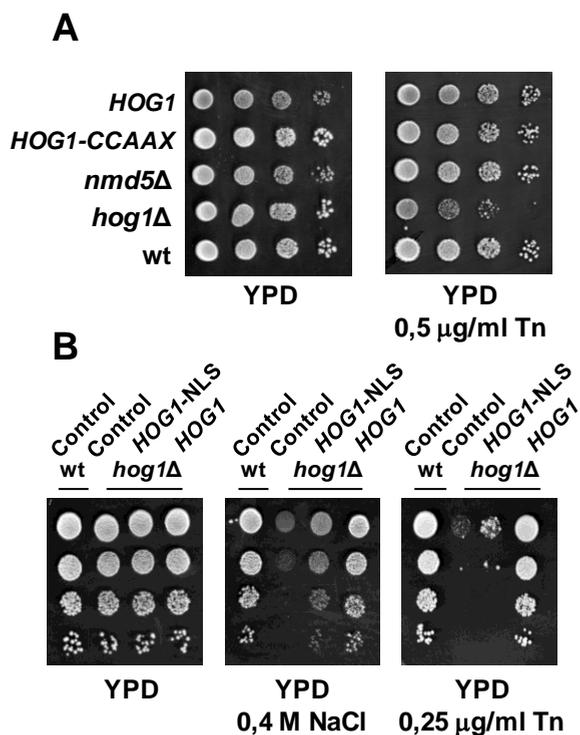


**Fig. 15. El glicérol acumulado en células tratadas con tunicamicina es necesario para la supervivencia a estrés del RE.** A) Cultivos de la cepa parental BY4741 y de sus correspondientes mutantes *hog1Δ* y *hac1Δ* se incubaron en YPD a 30°C ( $A_{600}=0,4-0,6$ ) y posteriormente, se transfirieron al mismo medio suplementado con 1 M de sorbitol o 2 µg/ml de tunicamicina (Tn). Las muestras se procesaron para cuantificar el contenido en glicérol como µg de glicérol por mg de células en peso seco (dw) (Ver el apartado 6.5 de Materiales y Métodos). Los valores representan las diferencias en glicérol total antes y después de los tratamientos indicados y son la media de tres experimentos independientes. B) Crecimiento en presencia de tunicamicina de la cepa silvestre BY4741 y de sus correspondientes mutantes *gpd1Δ*, *gpd2Δ*, *gpd1Δ gpd2Δ*, *hog1Δ* y *hog1Δ gpd1Δ*. C) Crecimiento en presencia de tunicamicina o de NaCl de células de la cepa parental W303-1A y de su correspondiente mutante *hog1Δ* transformadas con el plásmido YEplac195 o YEpGPD1 (*GPD1*).

Por último, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *GPD1*. Como se muestra en la Fig.15C, un elevado número de copias de este gen sólo aumentó la tolerancia a dosis bajas de tunicamicina (0,1 µg/ml) o de NaCl (0,2 M) en un mutante *hog1Δ*. La protección proporcionada por *GPD1* fue incapaz de revertir el fenotipo de sensibilidad del mutante de la MAPK tanto a dosis elevadas de droga (0,25 µg/ml) (Fig.15C) como en condiciones de estrés osmótico severo (datos no mostrados). Aunque sí mejoró la tolerancia de la cepa silvestre a tunicamicina.

## **8.- La exclusión de Hog1p del núcleo no afecta al crecimiento en presencia de tunicamicina.**

Con el objeto de aclarar si la regulación observada en la producción de glicerol, en respuesta a la exposición a tunicamicina dependía de la actividad de Hog1p ejercida en el citosol o en el núcleo, llevamos a cabo dos estrategias. En primer lugar analizamos la sensibilidad a tunicamicina de una cepa cuya MAPK Hog1 está anclada a la membrana plasmática. En este fondo, la copia cromosómica de *HOG1* ha sido sustituida por un alelo del gen fusionado con GFP y la secuencia del extremo C-terminal de la proteína localizada en la membrana Ras2p (Hog1-GFP-CCAAX) (Westfall y col., 2008). Como puede observarse (Fig. 16A), esta forma de Hog1p excluida del núcleo permite el crecimiento en presencia de tunicamicina. Resultados similares se obtuvieron al analizar un mutante *nmd5Δ*, el cual carece de la importina necesaria para la translocación al núcleo de Hog1p, en condiciones de estrés osmótico (Ferrigno y col., 1998).



**Fig. 16. Caracterización fenotípica de cepas de levadura con versiones diferentes del gen *HOG1*.** A) células de la cepa parental SO329 (wt) y sus correspondientes mutantes *nmd5Δ*, *hog1Δ* y derivados de éstos con la copia cromosómica de *HOG1* sustituida por una fusión génica HOG1-GFP (*HOG1*) o HOG1-GFP-CCAAX (*HOG1-CCAAX*). B) crecimiento en presencia de NaCl o tunicamicina de células de la cepa silvestre W303-1A y de su correspondiente mutante *hog1Δ* transformadas con los plásmidos Ycplac111 (Control), pVR53 con el gen *HOG1* (*HOG1*) o pVR53-NLS que contiene una fusión de *HOG1* con la secuencia de localización nuclear del virus SV40 (*HOG1-NLS*).

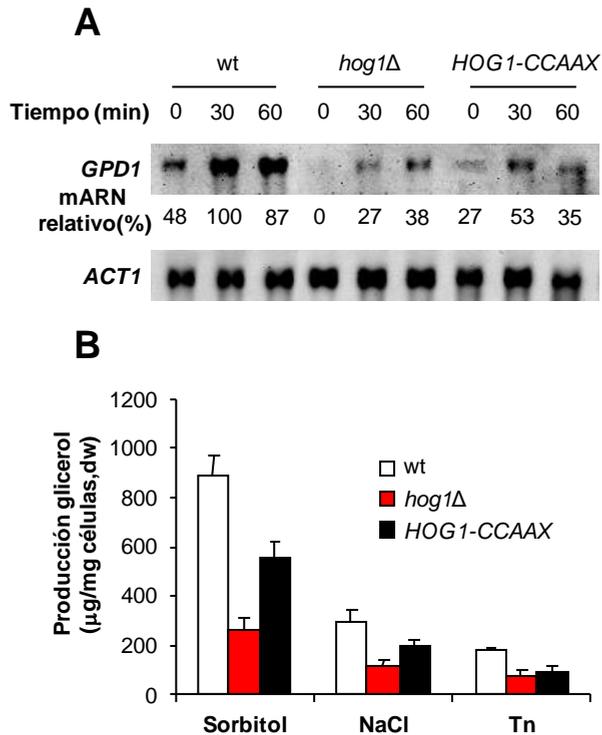
Estos datos sugieren que la función de Hog1p en la tolerancia a estrés del RE no se ejerce principalmente a nivel nuclear. Para confirmarlo,

analizamos la sensibilidad a tunicamicina de una cepa en que se ve alterada la localización nuclear de Hog1p mediante la fusión de la MAPK con una señal genérica de entrada al núcleo (SV40-NLS) (Alepuz y col., 2001). Mientras que la expresión de esta proteína de fusión no afecta a la supervivencia bajo estrés osmótico (Fig.16B), su localización nuclear, da lugar a un fenotipo de sensibilidad a tunicamicina similar al encontrado para la interrupción de *HOG1* (Fig.16B). Las diferentes aproximaciones utilizadas, señalan al citosol como el lugar en el que Hog1p podría ejercer su función en la respuesta a estrés del RE.

### **9.- La producción de glicerol en respuesta a tunicamicina es independiente de la translocación al núcleo de Hog1p .**

Una explicación de los resultados anteriores podía ser que una porción de Hog1p en células *nmd5Δ* o HOG1-CCAAX aún sea capaz de moverse entre el citoplasma y el núcleo, produciendo cierto grado de expresión de genes regulados en condiciones de estrés. Para testar esta posibilidad, se examinó la expresión de *GPD1* inducida en presencia de tunicamicina en células silvestres, *hog1Δ* y HOG1-CCAAX. En estas últimas, se observa una expresión reducida de *GPD1* en comparación con células silvestres, aproximadamente dos veces menor tras 30 minutos de inducción (Fig.17A). Sin embargo, los niveles son más altos que en la cepa carente de la MAPK. A la vista de este resultado, decidimos analizar la acumulación de glicerol en estas tres cepas, en distintas situaciones de estrés. Como se recoge en la Fig.17B, la producción de glicerol siguió un patrón similar al obtenido al analizar los niveles de mRNA de *GPD1*. Así, en las células expuestas a sorbitol o NaCl la cepa con la versión de Hog1p anclada a membrana mostró una acumulación de glicerol intermedia entre

la cepa silvestre y *hog1Δ*. En tunicamicina, observamos un ligero incremento en la producción de glicerol en la cepa con la versión HOG1-CCAAX aunque ésta no resultó ser significativamente diferente a la obtenida en *hog1Δ*.



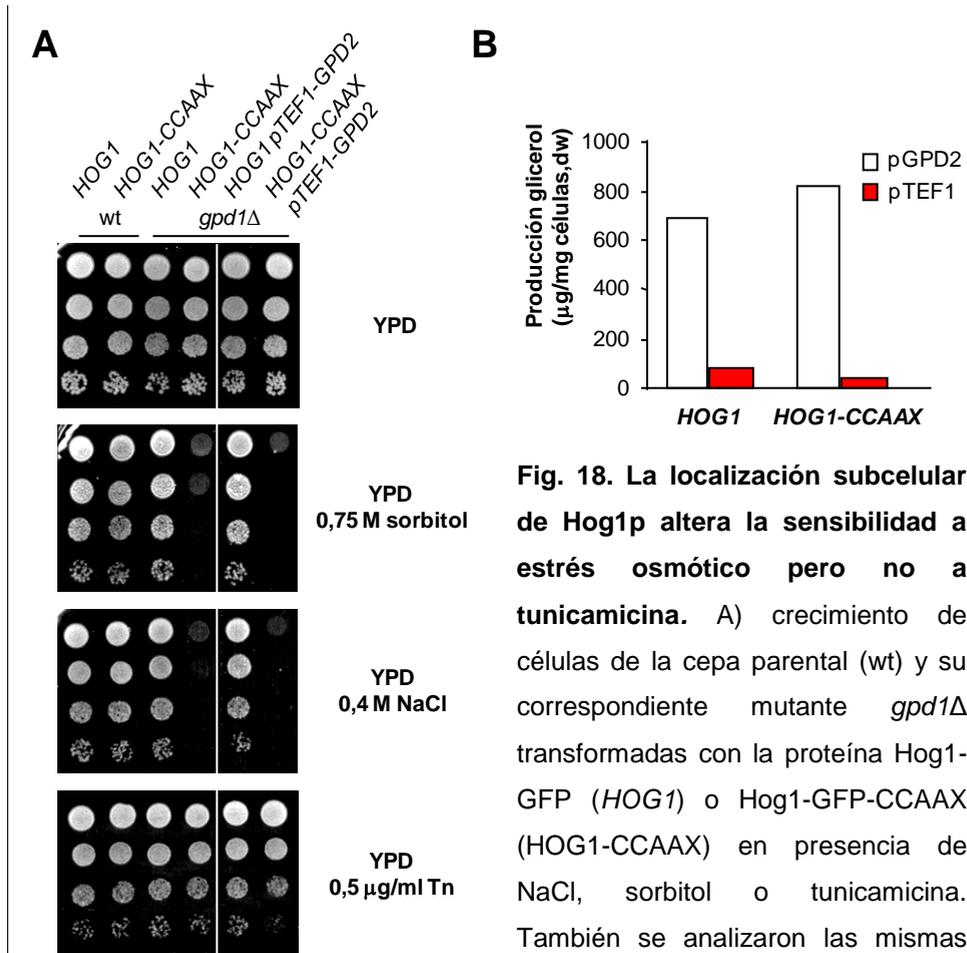
**Fig. 17. Producción de glicerol de cepas de levadura con versiones diferentes del gen *HOG1*.** A) muestras de ARN de células de las cepas indicadas expuestas a 2  $\mu\text{g/ml}$  de tunicamicina durante 30 y 60 minutos, se hibridaron con la sonda para *GPD1*. Los valores de los niveles de mARN se normalizaron con respecto a los valores de *ACT1*, representados como porcentajes de la inducción máxima. B) producción de glicerol de las cepas indicadas tras 3 horas de exposición a 2  $\mu\text{g/ml}$  de tunicamicina en YPD, 1 M NaCl o 1 M de sorbitol. Los

valores se expresan como  $\mu\text{g}$  de glicerol por  $\text{mg}$  de células peso seco (dw) y representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes.

Los resultados obtenidos hasta el momento no dejan clara la necesidad de una actividad nuclear de Hog1p para sobrevivir en estas condiciones de estrés. Por lo que decidimos comparar el crecimiento de células de la cepa silvestre y la cepa *HOG1-GFP-CCAAX*, ambas mutadas para *GPD1*, en placas de cultivo con 0,4 M de NaCl o tunicamicina (Fig 18A). De acuerdo con estudios previos (Albertyn y col., 1994), la ausencia de la enzima Gpd1p no tiene efecto en el crecimiento de la levadura en condiciones de estrés osmótico leve (0,75 M sorbitol o 0,4 M NaCl). Sin embargo, la ausencia de *GPD1* combinada con una proteína Hog1p anclada a la membrana afectó drásticamente al crecimiento (Fig.18A). Este resultado indica que, tanto la producción de glicerol, como la expresión regulada por Hog1p de genes de respuesta a estrés osmótico, tienen un papel clave en la protección celular frente a este estrés. En contraste, el fenotipo en tunicamicina de células *HOG1-GFP-CCAAX* sin *GPD1* fue similar al mostrado por células de la cepa parental (Fig.18A).

Para evitar la dependencia transcripcional de *HOG1*, se reemplazó el promotor de *GPD2* por el promotor *TEF1*, de expresión no regulada por fuentes de carbono (Nevoigt y col., 2006). De acuerdo a esto, la producción de glicerol en estas cepas se redujo drásticamente en comparación con la observada para células con el gen *GPD2* regulado por su propio promotor (Fig.18B, barras rojas). Mientras que los transformantes pTEF1-GPD2 en el fondo *gpd1 $\Delta$  HOG1*, crecieron en todas las condiciones ensayadas, la correspondiente cepa con *HOG1-CCAAX* no fue capaz de crecer en condiciones de estrés osmótico y sólo toleró la presencia de tunicamicina en el medio (Fig.18A). Este resultado apunta que Hog1p tiene

un papel mayoritariamente nuclear en situaciones de estrés osmótico, al margen de la regulación de la producción de glicerol, mientras que en presencia de tunicamicina la célula necesita una proteína Hog1p que sea funcional en el citosol.

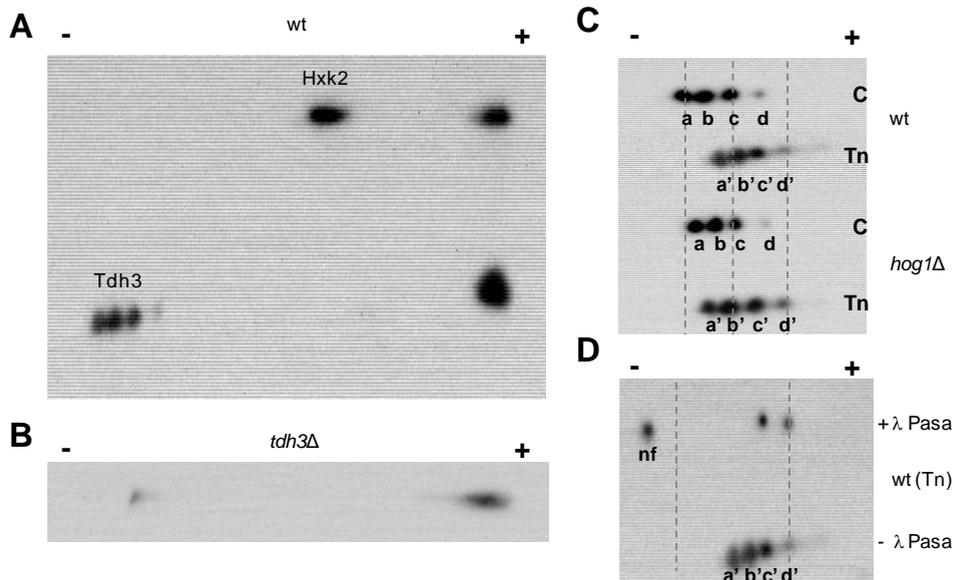


**Fig. 18. La localización subcelular de Hog1p altera la sensibilidad a estrés osmótico pero no a tunicamicina.** A) crecimiento de células de la cepa parental (wt) y su correspondiente mutante *gpd1Δ* transformadas con la proteína Hog1-GFP (*HOG1*) o Hog1-GFP-CCAAX (*HOG1-CCAAX*) en presencia de NaCl, sorbitol o tunicamicina. También se analizaron las mismas cepas reemplazando el promotor de

*GPD2* por el promotor no regulado TEF1 (pTEF1-GPD2). B) Medidas de la acumulación de glicerol en las cepas anteriores en presencia de 1 M de sorbitol.

## 10.- Hog1p participa en la fosforilación de Tdh3p en respuesta a tunicamicina.

Para profundizar en el papel citosólico de Hog1p, centramos nuestra atención en Tdh3p, que codifica la mayor isoenzima de la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, identificada previamente como sustrato *in vitro* de Hog1p (Kim y Shah, 2007; Westfall y col., 2008) y cuya secuencia contiene un sitio consenso de fosforilación (QLSP) por Hog1p en su extremo C-terminal. Con el objeto de analizar si la exposición a tunicamicina afecta al estado de fosforilación de esta proteína de una manera dependiente de Hog1p, se separaron, mediante electroforesis bidimensional (2D), extractos proteicos de células de la cepa parental y su correspondiente mutante *hog1Δ*, visualizándose las diferentes isoformas de Tdh3p (Fig. 19A) con un anticuerpo específico, que no reconoce las proteínas homólogas Tdh1p o Tdh2p (Fig. 19B). Fuimos capaces de detectar cuatro isoformas de Tdh3p en muestras control de la cepa silvestre, a las que denominamos como a, b, c y d, según su posición relativa con respecto a la proteína Hxk2 utilizada como referencia (Fig. 19A y 19C; señaladas como a-d). Todas ellas mostraron una localización a pHs más ácidos, tras 15 minutos de exposición a tunicamicina (Fig. 19C; señaladas como a'-d'). Esto sugiere una hiperfosforilación de este enzima en respuesta a tunicamicina. De hecho, al menos 2 puntos (Fig. 19D; a y b) corresponden a dos isoformas fosforiladas, como demuestra su desaparición tras el tratamiento con  $\lambda$ -fosfatasa y su localización a pHs más básicos (Fig. 19D, señalado como nf). Sin embargo, otros puntos no cambiaron su movilidad relativa (Fig. 19D; ver puntos c' y d'), sugiriendo que Tdh3p podría tener modificaciones post-traduccionales de diferentes tipos.



**Fig. 19. La fosforilación de Tdh3 durante estrés del RE es en parte dependiente de Hog1p.** A) Visión general de un experimento de electroforesis 2D. A partir de un cultivo de células de la cepa parental W303-1A se obtuvo un extracto proteico (50  $\mu$ g) que se separó mediante tiras de isoelectroenfoque seguido de SDS-PAGE al 11%. La detección inmunológica se realizó con anticuerpos anti-Tdh3 y anti-Hxk2 como patrón estándar. B) muestra de mutante *tdh3 $\Delta$* . C) muestras de células de la cepa parental y su correspondiente mutante *hog1 $\Delta$*  tratadas durante 15 minutos con 2  $\mu$ g/ml de tunicamicina. Como control se utilizaron células sin tratar (c). La imagen muestra sólo las isoformas de Tdh3p señaladas como a-d (control) o a'-d' (Tn). D) Identificación de las isoformas de Tdh3p fosforiladas. Replicados de la cepa parental se incubaron durante 1 hora a 30°C con o sin  $\lambda$ -fosfatasa ( $\lambda$ Pasa) o inhibidores de fosfatasa. nf= forma no fosforilada de Tdh3p.

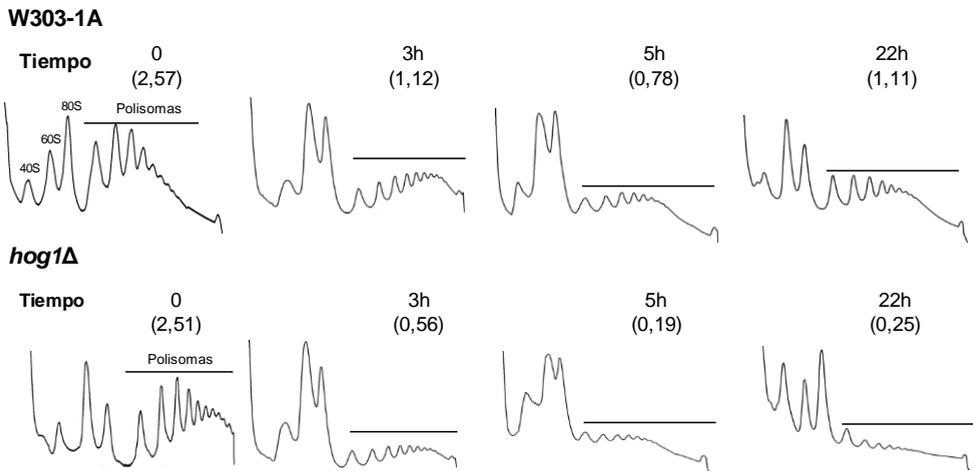
En células del mutante *hog1 $\Delta$* , de nuevo detectamos cuatro isoformas de Tdh3p, en condiciones basales o de estrés del RE (Fig. 19C,

ver puntos a-d control y a'-d' Tn). Sin embargo, en ambos casos parecen estar en posiciones ligeramente diferentes a las de la cepa silvestre. En condiciones basales, las isoformas de Tdh3p presentan un punto isoeléctrico menor, resultado que concordaría con un papel indirecto de Hog1p como regulador negativo de la actividad de una proteína quinasa. Por otro lado, no podemos descartar un posible papel directo de Hog1p en respuesta a estrés del RE, puesto que en presencia de tunicamicina, la hiperfosforilación observada para Tdh3p es menor para las isoformas a' y b' (Fig.19C).

### **11.- Hog1p es necesaria para recuperar la actividad traduccional durante la adaptación al estrés del RE.**

Para seguir investigando sobre el papel citosólico de Hog1p, analizamos su implicación en la regulación de la parada de la traducción de proteínas como respuesta a la exposición a tunicamicina. Estudios previos indican una reducción en la velocidad de traducción como mecanismo de adaptación a estrés del RE (Harding y col., 1999). Además, recientemente se ha descrito que Hog1p está involucrada en la reanudación de la traducción, tras la adaptación celular a condiciones de presión osmótica suave (Warringer y col., 2010). Así, al analizar el perfil de polisomas (ribosomas en traducción activa) en células de la cepa silvestre W303-1A y su correspondiente cepa mutante *hog1Δ* tratadas con tunicamicina (Fig. 20) pudimos observar una pérdida progresiva de la fracción de polisomas en ambas cepas; es decir, el porcentaje de ribosomas asociados a polisomas frente al presente en monosomas descende claramente tras 3 horas de exposición a la droga. De esta forma, en una cepa silvestre la fracción de polisomas se ha reducido más

de la mitad siendo esta situación más drástica en un mutante *hog1Δ* (78%). Este proceso fue más lento en comparación a lo descrito para otras condiciones de estrés, como el osmótico (Warringer y col., 2010). De hecho, tras 5 horas de exposición a tunicamicina, fue más evidente esta reducción en la fracción de polisomas. Sin embargo, tras 22 horas en presencia de tunicamicina, las células de la cepa silvestre comenzaron a recuperar el perfil inicial, mientras que en el caso del mutante *hog1Δ*, la parada traduccional fue mucho más severa y durante todo el experimento no se observó recuperación significativa (Fig. 20).



**Fig. 20. La exposición a tunicamicina inhibe el inicio de la traducción.**

Perfil de polisomas de la cepa silvestre W303-1A y su correspondiente mutante *hog1Δ* a los tiempos indicados tras el inicio del tratamiento con tunicamicina. Se señalan los picos de las subunidades ribosomales 40S, 60S y los monosomas 80S. Los picos de los polisomas se indican con una línea. Los números entre paréntesis corresponden al ratio p:m calculado como el ratio entre el area bajo los polisomas y los monosomas.

## Discusión

Las células de levadura son extremadamente sensibles al estrés del RE y por lo tanto, su capacidad para establecer una respuesta protectora adecuada, es crítica para la viabilidad celular. En este trabajo, hemos estudiado la necesidad de una ruta HOG funcional para lidiar con esta situación. Observamos que en ausencia de Hog1p, las células presentaron un fenotipo de sensibilidad más acusado frente a agentes químicos que inducen este estrés, como la tunicamicina o el agente reductor  $\beta$ -mercaptoetanol. Este efecto resultó dependiente de la actividad quinasa de Hog1p, ya que, células carentes de la MAPKK Pbs2p o que expresan un alelo sin actividad quinasa (*HOG1-KD*) fueron incapaces de crecer en presencia de tunicamicina, mientras que el aumento de la actividad de Hog1p mediante interrupción de sus fosfatasas *PTP2* y *PTP3* incrementó la resistencia a la droga. Además, Hog1p dirige la expresión de *GPD1* inducida por tunicamicina y la acumulación de glicerol, osmolito compatible que confiere también protección a la célula bajo estas condiciones. Por otro lado, observamos que, la respuesta es independiente de la translocación de la MAPK al núcleo, puesto que la producción de glicerol aumenta incluso en células en las que se impide esta entrada. Además, confirmamos que Hog1p tiene un papel citosólico durante la adaptación a este estrés, ya que participa en la regulación del estado de fosforilación de la enzima glicolítica Tdh3p y en la respuesta traduccional. Así, nuestros resultados describen nuevos aspectos de la respuesta de *S. cerevisiae* al estrés del RE e identifican funciones citoplasmáticas adicionales de la MAPK Hog1p para proporcionar resistencia a dicho estrés.

En una situación de estrés del RE, *S. cerevisiae* activa diferentes rutas y una variedad de respuestas que ayudan a prevenir la muerte celular. Además de activar la UPR, las células responden a este estrés mediante la activación de la cascada de MAP quinasas que constituyen la ruta de integridad de la pared celular “*CWI-pathway*” (Bonilla y Cunningham, 2003; Chen y col., 2005; Cohen y col., 2008). En esta respuesta están involucradas la proteína quinasa Pkc1p y la MAPK de la ruta Mpk1p/Slt2p que, a su vez, estimulan el canal de  $Ca^{2+}$  Cch1p-Mid1p y la señalización por calcineurina (Bonilla y col., 2002; Bonilla y Cunningham, 2003). De acuerdo con esto, los mutantes de la ruta de integridad de la pared celular muestran sensibilidad a agentes que inducen estrés del RE (Scrimale y col., 2009). Más aún, agentes que perturban la pared celular activan la señalización de la UPR y la pérdida de funcionalidad de la UPR causa defectos en la pared celular (Cohen y col., 2008). Así, las respuestas para proteger a las células frente a estrés del RE y de la pared celular están coordinadas por las rutas de integridad de la pared celular y de la UPR (Krysan, 2009).

A diferencia de esta regulación coordinada, nuestros resultados excluyen una interacción entre la UPR y la ruta HOG en la activación o modulación mutua en respuesta a estrés del RE. Así, la delección de *HOG1* no tiene efecto en la inducción de la UPR, tal y como indican los niveles de expresión del chivato UPR::*lacZ*. Tampoco en el procesado del pre-mARN de *HAC1*, o en la expresión de genes diana dependientes de la UPR como *KAR2*. Además, el doble mutante carente de Ire1p y Hog1p muestra efectos aditivos frente a este estrés. Finalmente, nuestros resultados muestran que la ausencia de una ruta UPR funcional no afecta a la acumulación de glicerol inducida por tunicamicina. En conclusión,

estas rutas parecen controlar dianas y mecanismos diferentes que permiten a la célula enfrentarse a la acumulación de proteínas mal plegadas.

En nuestras manos, la exposición de células de levadura a tunicamicina no desencadena la fosforilación de Hog1p al menos durante el periodo de tiempo analizado. Sin embargo, un estudio paralelo de Bicknell y col. (2010) indica que Hog1p podría fosforilarse tras 2 h de estrés (Bicknell y col., 2010). Nosotros, fuimos incapaces de mostrar la importación de Hog1p al núcleo en células tratadas con tunicamicina. Más aún, el anclaje de la proteína a la membrana plasmática o su exclusión del núcleo por delección de su importina, no tuvieron efecto sobre su sensibilidad a la droga. Por el contrario, un aumento en la concentración nuclear de la MAPK, mediante su fusión con una señal genérica de entrada al núcleo, produjo un fenotipo similar al de la ausencia de Hog1p. Así, mediante distintas aproximaciones hemos mostrado que la actividad citosólica de Hog1p, determina mayoritariamente su papel en esta situación de estrés. Este descubrimiento no fue del todo sorprendente, ya que, la exposición de células de levadura a choque térmico (Winkler y col., 2002), sales metaloides (Thorsen y col., 2006) o zimoliasa (Bermejo y col., 2008) dan como resultado la fosforilación de Hog1p, pero no se detecta acumulación de la MAPK en el núcleo. El estrés oxidativo desencadena una sutil fosforilación de Hog1p en un reducido rango de concentraciones de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Schlenstedt y col., 1995), mientras que la activación de la MAPK en respuesta a metilglioxal se produce sin su fosforilación (Aguilera y col., 2005). Incluso en el trabajo de Bicknell y col. (2010), establecen una función citosólica de Hog1p, como regulador de la autofagia en respuesta a estrés del RE. Estamos ante un claro ejemplo de cómo la ruta HOG puede

ser activada ante distintas situaciones y de cómo estreses diferentes pueden activarla a diferentes niveles, que determinan la respuesta transitoria de Hog1p. Por otro lado, parece claro que una parte de la actividad de la MAPK es independiente de estos cambios transitorios de fosforilación y localización subcelular, denotando que su actividad catalítica (incluso a nivel basal) podría ser responsable del papel de Hog1p en múltiples procesos celulares (Reynolds y col., 1998; García-Rodríguez y col., 2000; Aguilera y col., 2005).

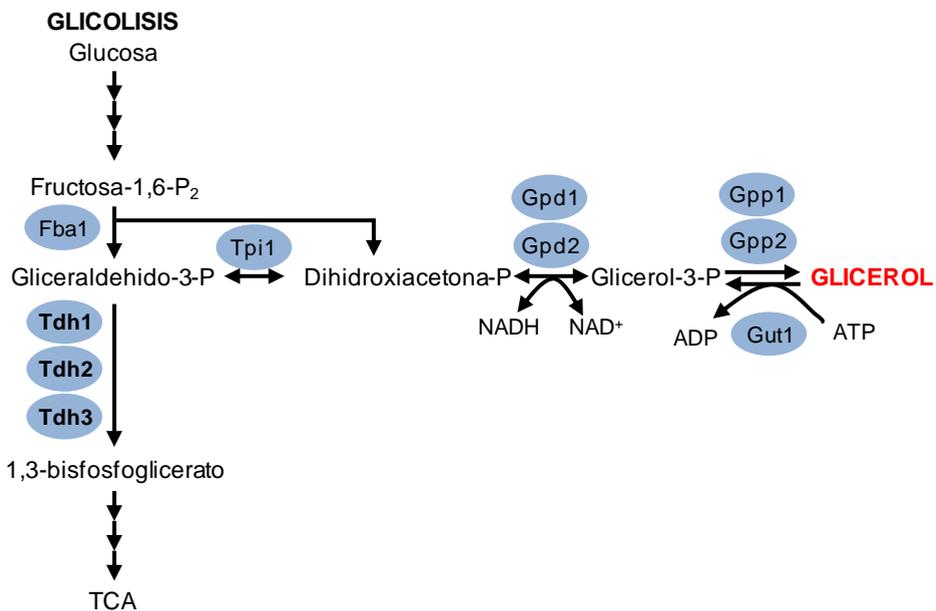
A este respecto, varios estudios sugieren una función nuclear de Hog1p en condiciones óptimas de crecimiento incluyendo la de adaptador estructural de factores transcripcionales o como modulador enzimático de la maquinaria transcripcional (Alepez y col., 2001; De Nadal y col., 2004; Hohmann, 2009). Esto explicaría porque las células portadoras del alelo infoforilable de *HOG1* (Thorsen y col., 2006) exhiben una tolerancia a tunicamicina ligeramente mayor que la de la cepa mutante *hog1Δ*. Además, varias observaciones sugieren la existencia de una actividad señalizadora de Hog1p intrínseca, incluso en ausencia de estrés (Macia y col., 2009). Sorprendentemente, dicha señalización estaría controlada por la rama Sln1 de la ruta, mientras que, la rama Sho1 sería un sistema inducible, no basal (Macia y col., 2009). Este modelo explicaría porque el crecimiento en presencia de tunicamicina está disminuido en la cepa mutante *ssk1Δ*, mientras que, la disrupción de *SHO1* no tiene efecto. En resumen, los efectos mediados por Hog1p bajo estrés del RE parecen depender de su actividad basal.

En este estudio se demuestra que, en respuesta a tunicamicina, se desencadena la acumulación de glicerol de forma parcialmente dependiente de Hog1p, siendo la inducción transcripcional de *GPD1*

regulada por esta MAPK en exposición a tunicamicina. De acuerdo a esto, un doble mutante *gpd1Δ gpd2Δ* muestra una mayor sensibilidad a estrés del RE que la cepa silvestre, mientras que la sobreexpresión de *GPD1* proporciona mayor tolerancia tanto en células silvestres como mutantes para *HOG1*. Esta respuesta no sería el papel exclusivo de esta MAPK, ya que, igual que en el caso del estrés osmótico (Albertyn y col., 1994), se detectó cierta producción de glicerol en la cepa mutante *hog1Δ*. Esto explica porqué el fenotipo de sensibilidad a tunicamicina, fue más severo en el doble mutante *hog1Δ gpd1Δ* que en el mutante simple *hog1Δ*. Ahora bien, la cepa *hog1Δ* muestra un fenotipo más acusado que el doble mutante *gpd1Δ gpd2Δ*, sugiriendo que esta MAPK debe regular otras dianas importantes, diferentes a la producción de glicerol, en respuesta a estrés del RE.

Además, nuestros resultados indican que la producción de glicerol ocurre incluso en células con la proteína Hog1p anclada a la membrana plasmática, por lo que, esta respuesta depende de su actividad citoplasmática. Un estudio previo de Winkler y col. (2002) indica que una proteína Hog1p activada por estrés térmico, puede actuar fosforilando proteínas citoplasmáticas. Siguiendo este argumento, Westfall y col. (2008) proponen que el papel fisiológico principal de Hog1p en estrés osmótico es citosólico. Así, la MAPK establecería las condiciones metabólicas para una elevada producción de glicerol, el rasgo más importante del mecanismo de osmoprotección de *S. cerevisiae*. Se sabe que, la estimulación de la ruta HOG por aumento de la osmolaridad, conlleva la activación de la 6-fosfofructo-2-quinasa, la cual, a su vez resulta en la activación de las primeras etapas de la glicólisis y el aumento de la producción de glicerol (Dihazi y col., 2004). Otra forma de aumentar la producción de glicerol,

sería prevenir la desviación de la ruta hacia la formación de otros derivados. De acuerdo con esto, un punto de control importante sería la conversión del gliceraldehido-3-fosfato (GA3P) en 1,3-bisfosfoglicerato, reacción catalizada por tres isoformas de la GA3P deshidrogenasa (Tdh1-3p). Por lo tanto, la inhibición de su actividad desplazaría la ruta hacia la síntesis de glicerol (Fig. 21).



**Fig. 21. Esquema de la parte superior de la glicolisis.** Se detalla las enzimas implicados en la síntesis de glicerol.

Cabe señalar que Tdh3p presenta varios sitios de fosforilación consenso para Pkc1, (Levin, 2005) y existen evidencias de la regulación de la actividad de esta ruta de señalización por Hog1p (Bermejo y col., 2008).

Además, un reciente rastreo genético ha identificado cuatro nuevos sustratos de la actividad quinasa de Hog1p, incluyendo a la enzima glicolítica Tdh3p (Kim y Shah, 2007). Los resultados presentados en nuestro estudio, indican que Hog1p tiene funciones indirectas y directas controlando el estado de fosforilación de Tdh3p, tanto en condiciones basales como de estrés del RE. Aunque se requieren futuros trabajos para establecer si este cambio modifica de alguna forma la actividad de Tdh3p, ya sea modulando su organización oligomérica como tetrámero, su localización subcelular, o incluso su degradación, se puede especular que la hiperfosforilación de Tdh3p mediada por Hog1p contribuye al control de la síntesis de glicerol en respuesta a estrés del RE, como ya se ha postulado previamente para condiciones de hiperosmolaridad (Westfall y col., 2008).

Nuestros resultados plantean la cuestión de porqué la acumulación de proteínas mal plegadas en el RE desencadena la síntesis de glicerol. Habitualmente se considera a los osmolitos “chaperonas químicas”, debido a su capacidad para aumentar la estabilidad termodinámica de proteínas plegadas, sin alterar otros procesos celulares (Kumar, 2009). Además, se ha demostrado que los osmolitos pueden proporcionar estabilidad (Bolen, 2001; Yancey, 2005; Bolen y Rose, 2008). De acuerdo a esto, la síntesis de glicerol en células expuestas a tunicamicina, tiene un significado fisiológico como parte del mecanismo de supervivencia a estrés del RE y representa un nuevo caso donde *S. cerevisiae* genera este polirol compatible.

Otra evidencia del papel citosólico de Hog1p es su participación en la recuperación de la traducción durante estrés del RE. Estudios previos muestran que, como respuesta a esta situación de estrés, las células de *S.*

*cerevisiae* sufren una reducción, e incluso parada, en la traducción de proteínas, de esta forma, se alivia la carga de proteínas bajo estas condiciones (Harding y col., 1999). En el caso de estrés osmótico se ha identificado a la MAPK Sty1p, homóloga de Hog1p en *Schizosaccharomyces pombe*, como necesaria para la recuperación de la traducción (Dunand-Sauthier y col., 2005). Además, hay evidencias recientes de que Hog1p está involucrada en la respuesta traduccional frente a un choque osmótico suave (Warringer y col., 2010). Sin embargo, este es el primer estudio en relacionar esta MAPK con la respuesta traduccional a estrés del RE.



## **CAPÍTULO 2**

---

**Aislamiento de supresores en multicopia del fenotipo de sensibilidad a baja temperatura en *Saccharomyces cerevisiae*.**



La membrana plasmática juega un papel importante en condiciones de estrés por bajas temperaturas. Aunque el mecanismo sensor que inicia el proceso de adaptación no está claro, cambios en el estado físico de la membrana podrían actuar como señal primaria del cambio de temperatura (Aguilera y col., 2007). Por otro lado, se ha descrito la toma de triptófano como crucial para el crecimiento en frío y se sabe que la permeasa de triptófano Tat2p es sensible a un descenso de la temperatura (Abe y col., 2000). Además, la membrana plasmática presenta una estructura compleja de microdominios que proporcionan microambientes especiales para las proteínas embebidas en ella, pudiendo modular su actividad.

Un rastreo de supresores en multicopia del fenotipo de sensibilidad a baja temperatura, es un buen método para recabar nueva información sobre la respuesta de la levadura a esta situación de estrés, pudiendo identificar entre otras, proteínas implicadas en modificar las propiedades físicas de la membrana o en la regulación de su repertorio de proteínas.

## RESULTADOS

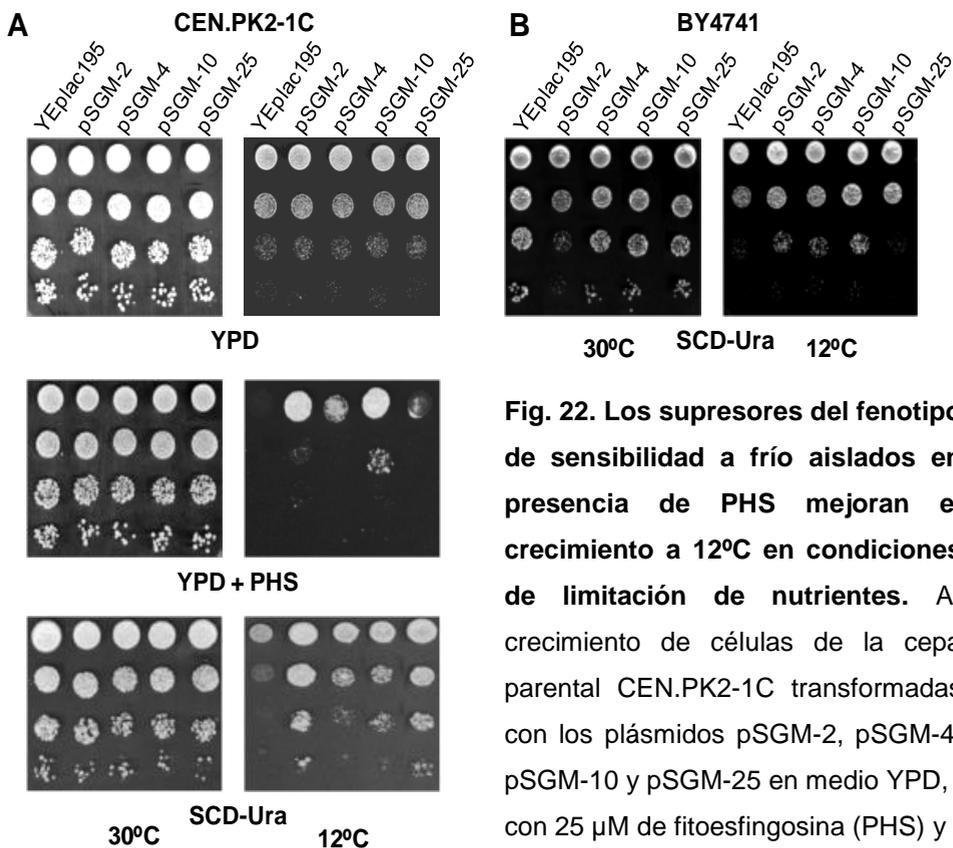
### 1.- Aislamiento de supresores en multicopia

Con el objeto de obtener supresores en multicopia del defecto de crecimiento a bajas temperaturas, se transformó la cepa CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae* con una librería genómica de levadura preparada en un plásmido de alto número de copias y se siguieron dos estrategias: realizar el rastreo en medio de cultivo sintético SCD-Ura o utilizar medio completo YPD con 25  $\mu$ M de fitoesfingosina (PHS), ambos a 12°C.

La adición de PHS a células de levadura promueve una respuesta celular a estrés (Dickson y col., 1997), similar a la producida por elevadas temperaturas (Skrzypek y col., 1998; Chung y col., 2000; Bultynck y col., 2006). De esta forma, la exposición a este esfingoide de cadena larga, restringe todavía más el crecimiento de *S. cerevisiae* a baja temperatura, un efecto que puede ser contrarrestado mediante la adición de triptófano al medio o la sobreexpresión del transportador de triptófano de alta afinidad Tat2p (Skrzypek y col., 1998). Siguiendo este método, inicialmente se seleccionaron 86 transformantes. Tras aislar sus plásmidos y comparar los mapas de restricción se obtuvieron 4 patrones de restricción diferentes. Posteriormente, elegimos un representante de cada grupo (pSGM-2/-4/-10/-25), se obtuvieron transformantes de cada uno de ellos y se analizó de nuevo su capacidad para mejorar el crecimiento a 12°C. Como puede observarse en la Fig. 22A, estos plásmidos no afectan al crecimiento celular a 30°C en ninguna de las condiciones ensayadas, mientras que a 12°C sólo tienen efecto positivo en presencia de PHS o en SCD-Ura (Fig.

22A), por lo que, la ventaja que proporcionan sólo es efectiva en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes.

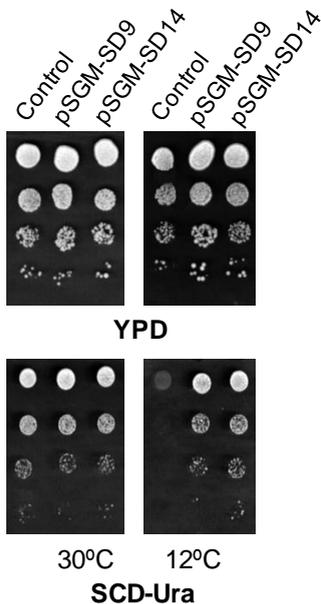
A continuación, se analizó el efecto de los mencionados supresores en un fondo genético diferente, concretamente la cepa protótrofa para triptófano BY4741. En este caso sólo se observó un cierto grado de mejoría con los plásmidos pSGM-2, pSGM-4, y pSGM-10 (Fig. 22B), lo que nos llevó a descartar el plásmido pSGM-25 ya que, probablemente contenga un fragmento de ADN que codifique genes implicados en la toma o biosíntesis de triptófano.



**Fig. 22. Los supresores del fenotipo de sensibilidad a frío aislados en presencia de PHS mejoran el crecimiento a 12°C en condiciones de limitación de nutrientes. A) crecimiento de células de la cepa parental CEN.PK2-1C transformadas con los plásmidos pSGM-2, pSGM-4, pSGM-10 y pSGM-25 en medio YPD, con 25  $\mu$ M de fitoesfingosina (PHS) y**

SCD-Ura a 30°C o 12°C. Como control se utilizaron células transformadas con el plásmido vacío YEplac195. B) crecimiento de células de la cepa silvestre BY4741 con los plásmidos mencionados anteriormente en SCD-Ura a 30°C o 12°C.

En el rastreo llevado a cabo a 12°C en medio sintético (SCD-Ura), se seleccionaron varios transformantes, de los cuales los plásmidos pSGM-SD9 y pSGM-SD14 confirieron una mejora en el crecimiento a 12°C (Fig. 23).



**Fig. 23. Los supresores del fenotipo de sensibilidad a frío aislados en SCD-ura mejoran el crecimiento a 12°C.** A) crecimiento de células de la cepa CEN.PK2-1C transformadas con los plásmidos pSGM-SD9 y pSGM-SD14 en YPD y SCD-Ura a 30°C y 12°C. Como control se utilizaron células transformadas con el plásmido vacío correspondiente.

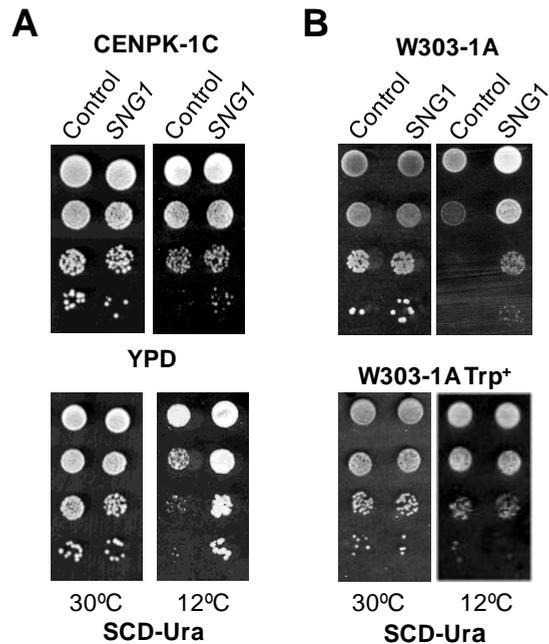
## 2.- Caracterización de los plásmidos aislados

La secuenciación de los insertos contenidos en los plásmidos pSGM-2, pSGM-4 y pSGM-10 reveló la presencia de fragmentos de ADN de longitudes de 9.5 kb, 8.7 kb y 8.9 kb, pertenecientes a los cromosomas

X, V y II, respectivamente. En total, se obtuvieron 11 “pautas de lectura abierta” completas (ORFs, “open reading frames”) y 3 parciales. Cada ORF fue amplificada por PCR a partir de ADN genómico, ligada en el vector de expresión multicopia YEplac195 y retransformada en la cepa CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae*. De esta forma, se identificaron los genes *ALY2* (*ART3/YJL084C*), *CAJ1* (*YER048C*) y *UBP13* (*YBL067C*) como responsables del fenotipo de tolerancia a frío mostrado por los transformantes pSGM-2, pSGM-4 y pSGM-10, respectivamente.

En la secuenciación de los insertos contenidos en los plásmidos pSGM-SD9 y pSGM-SD14, se detectaron 3 y 2 ORF's completas, respectivamente. Destacar la presencia en el plásmido pSGM-SD14 de *TAT1* y *BAP2*, genes que codifican para el transportador de baja afinidad de triptófano o el de alta afinidad de leucina. El plásmido pSGM-SD9 contenía los genes: *YGR196C* (*FYV8*), *YGR197C* (*SNG1*) y *YGR198w* (*YPP1*). De éstos, se identificó como responsable del fenotipo de tolerancia a frío a *SNG1*, que codifica una proteína con seis dominios transmembrana (<http://www.yeastgenome.org>). Así, los transformantes de la cepa CEN.PK2-1C con el plásmido pSGM-SD9 presentaron un crecimiento a 12°C similar a los transformados con el plásmido pSNG1-SNG1, el cual expresa el gen *SNG1* marcado con tres etiquetas en su extremo C-terminal, bajo el control de su propio promotor (Fig. 24A). Se observaron resultados similares utilizando células transformadas con el plásmido pFL44-SNG1yEGFP (datos no mostrados), el cual contiene una fusión entre el gen *SNG1* y la proteína fluorescente *yEGFP* (García-López et al. 2010). De nuevo, el fenotipo de mejora es menos evidente en medio rico YPD, por lo que, la ventaja de crecimiento que proporciona *SNG1* parece ser más efectiva en condiciones de baja disponibilidad de nutrientes. De

acuerdo con este resultado, la sobreexpresión de *SNG1* mejoró el crecimiento a baja temperatura de las células mutantes *trp1* de la cepa W303-1A, pero no se observó efecto en su equivalente protótrofa *TRP1* (Fig. 24B).



**Fig. 24. *SNG1* mejora el crecimiento en frío de cepas de levadura auxótrofas para triptófano.** Crecimiento a 30 o 12°C en placas de SCD-Ura de los transformantes con el plásmido pSNG1-SNG1 (*SNG1*), que expresa el gen *SNG1* bajo el control de su propio promotor o con el plásmido vacío (pBG1805) en cepas. A) CENPK2-1C o B) W303-1A, tanto auxótrofa (Trp<sup>-</sup>) como protótrofa (Trp<sup>+</sup>) para triptófano.

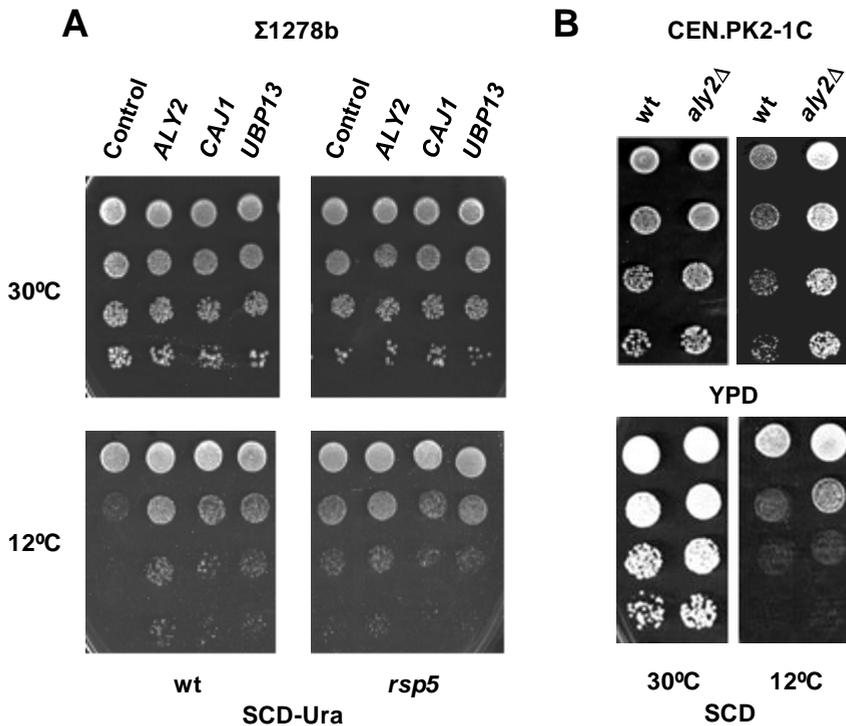
### **3.- Endocitosis: un proceso regulado a baja temperatura**

El proceso de endocitosis permite a la célula internalizar las proteínas de membrana para su degradación. Se inicia mediante una invaginación de la membrana, formando una vesícula de endocitosis y acaba en la vacuola donde la proteína será degradada (Fig. 4).

#### **3.1.- Aly2p como adaptador de endocitosis**

Aly2p/Art3p pertenece a la familia de proteínas ARTs (“Arrestin-Related Trafficking Adaptors”) de levadura (Lin y col., 2008) compuesta por 9 miembros (Polo y Di Fiore, 2008). Como en el caso de otras proteínas de esta familia, predicciones sobre la estructura de Aly2p revelan la presencia de dominios de plegamiento típicas de arrestinas tanto en el extremo N-terminal (pfam00339) como en el C-terminal (pfam02752). Éstos, son elementos estructurales también presentes en las  $\alpha$ - y  $\beta$ -arrestinas de mamíferos (Alvarez, 2008). Además, se pudo detectar dos motivos PY, que constituyen la secuencia conservada de reconocimiento por la ligasa de ubiquitina Rsp5/Npi1p (Belgareh-Touze y col., 2008). Estudios previos proponen a los miembros de la familia ART como proteínas adaptadoras de Rsp5p, promoviendo así, la endocitosis de proteínas asociadas a la membrana plasmática en respuesta a señales ambientales o por marcaje para su degradación, de proteínas dañadas o superfluas de la membrana (Lin y col., 2008). Recientemente, se ha demostrado que Aly2p media la endocitosis, por reclutamiento de Rsp5p, del transportador de ácido aspártico/glutámico Dip5p (Hatakeyama, y col., 2010).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, decidimos analizar el fenotipo a baja temperatura de un mutante puntual en *RSP5*. Como se observa en la Fig. 25, el mutante crece mejor en medio mínimo a 12°C que su correspondiente cepa parental. Por otra parte, la sobreexpresión de Aly2p solo tiene efecto positivo, cuando hay una proteína Rsp5p funcional (Fig. 25A).



**Fig. 25. El efecto en la tolerancia a baja temperatura de Aly2p, Caj1p y Ubp13p depende de la presencia de la ubiquitín ligasa Rsp5p.** A) crecimiento en medio SCD-Ura a 30 y 12°C de células de la cepa mutante *rsp5* y su correspondiente parental ( $\Sigma 1278b$ ) transformadas con los plásmidos derivados de YEplac 195 (*URA3*) con las ORFs completas de *ALY2*, *CAJ1* y *UBP13* incluyendo

su promotor y terminador. B) crecimiento en medio rico YPD y mínimo SCD de CEN.PK2-1C y su correspondiente mutante *aly2Δ*.

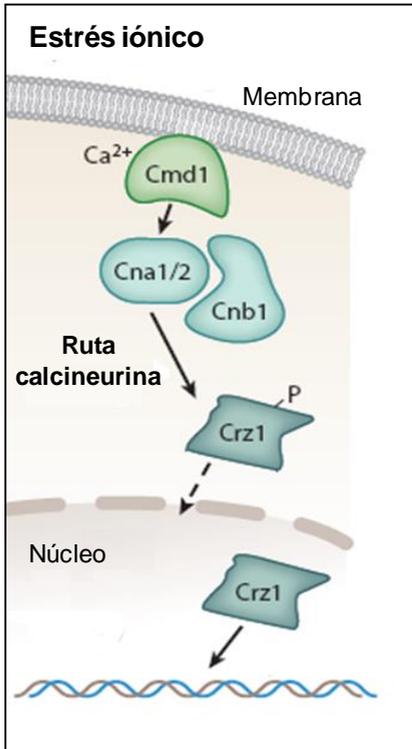
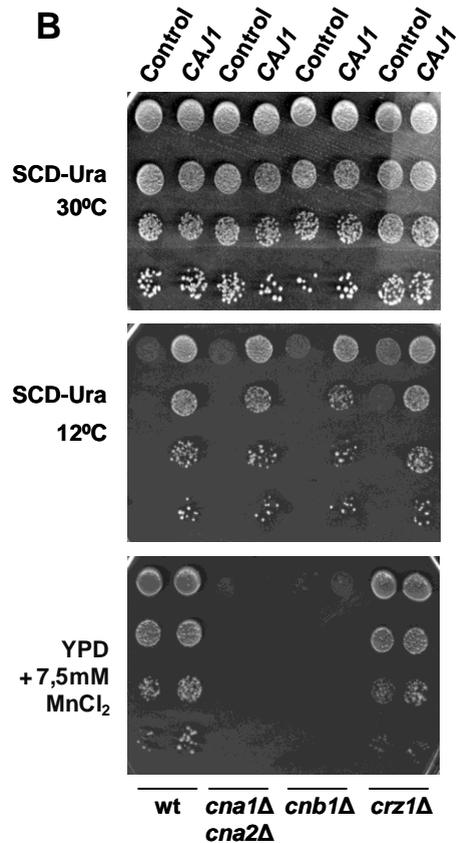
Curiosamente, la ausencia de *ALY2* también mejoró el crecimiento a baja temperatura en medio mínimo (Fig. 25B). Se obtuvieron resultados similares para el mutante de *aly2Δ* en el fondo genético BY4741 (datos no mostrados). Ya que se ha propuesto que las proteínas ARTs confieren especificidad a la endocitosis (Polo y Di Fiore, 2008), la sobreproducción de Aly2p podría producir el reclutamiento para Rsp5p de sustratos sin relevancia para el crecimiento a bajas temperaturas, reduciendo así la endocitosis de permeasas esenciales en dichas condiciones. Apoyando esta hipótesis, un estudio reciente de O'Donnell y col. (2010) ha demostrado que Aly2p estimula el tráfico de la permeasa general de aminoácidos, Gap1p desde los endosomas a la red trans-Golgi, aumentando así los niveles en la membrana plasmática e intracelulares del transportador.

### **3.2.- Caracterización fenotípica de la proteína J Caj1**

*CAJ1* codifica para una proteína citosólica miembro de las proteínas J de clase II (también conocida como Hsp40s), éstas se caracterizan por la presencia de un dominio J (pfam00226) de aproximadamente 65 aminoácidos, que inicialmente se identificó en el gen bacteriano de choque térmico DnaJ (Walsh y col., 2004; Qiu y col., 2006). Todas ellas son cochaperonas de Hsp70s (proteína de choque térmico de 70 kDa) que actúan estimulando su actividad ATPasa, lo que les permite participar en múltiples procesos celulares (Sahi y Craig, 2007; Kampinga y Craig, 2010). Concretamente, Caj1p fue aislada a partir de un antiserum contra una

fracción de unión a calmodulina (Mukai y col., 1994). Dicha proteína reguladora de  $\text{Ca}^{2+}$ , controla numerosas dianas (Yamniuk y Vogel, 2004), entre ellas a la serina/treonina fosfatasa calcineurina (Cyert, 2003). Se ha descrito, que ésta regula a la baja la endocitosis de transportadores de aminoácidos, activada por diferentes condiciones de estrés (Bultynck y col., 2006). De acuerdo con esto, la sobreexpresión de *CAJ1* podría, de alguna manera, aumentar la actividad de la calcineurina y así, reducir el reciclado de transportadores y proteínas ancladas a la membrana inducido por efecto del frío. Con tal de comprobar esta hipótesis, se testó el crecimiento a 12°C de sobreexpresantes de *CAJ1* en cepas mutantes para distintos elementos de la ruta de calcineurina (Fig. 26A) (Cyert y Thorer, 1992; Stathopoulos y Cyert, 1997).

En su forma nativa, la calcineurina está presente en forma de heterodímero que contiene una subunidad catalítica, codificada por los genes redundantes *CNA1* y *CNA2*, en complejo con una subunidad reguladora, el producto del gen *CNB1*. Una calcineurina activa, defosforila al factor de transcripción Crz1p (Matheos y col., 1997; Stathopoulos y Cyert, 1997), el cual regula la expresión de genes de respuesta a estrés iónico (Yoshimoto y col., 2002). Como se muestra en la Fig. 26B, un elevado número de copias de *CAJ1* aumenta el crecimiento en frío de forma independiente a una ruta calcineurina-Crz1p funcional. Además, *CAJ1* no tiene efecto en la sensibilidad de la levadura a los cationes de  $\text{Mn}^{2+}$ , un conocido activador de dicha ruta señalizadora.

**A****B**

**Fig. 26. La sobreexpresión de CAJ1 aumenta el crecimiento en frío de forma independiente a la ruta de la calcineurina-Crz1.** A) Representación esquemática de la ruta de la Calcineurina modificada de Randez-Gil y col., 2013. B) Crecimiento en frío y tolerancia a iones Mn<sup>2+</sup> de células, en fase de crecimiento exponencial, de la cepa silvestre YPH499 y sus correspondientes mutantes *cna1Δ*, *cna2Δ*, *cnb1Δ* y *crz1Δ* transformadas con los plásmidos YEplac195 (Control) y YE<sub>p</sub>CAJ1 (CAJ1).

Se ha descrito que una sobreproducción de Caj1p confiere resistencia a la droga FTY720, un agente inmunosupresor que inhibe el

transporte de aminoácidos en *S. cerevisiae* (Welsch y col., 2003). Aunque no se conoce el mecanismo por el cual Caj1p media la detoxificación de FTY720, se ha planteado la hipótesis según la cual esta proteína J podría afectar a la toma de aminoácidos o a la degradación proteica (Welsch y col., 2003). De hecho, los transportadores de triptófano Tat1p y Tat2p; así como las proteasas de ubiquitina Ubp5p y Ubp11p fueron aisladas como supresores en multicopia de la inhibición del crecimiento inducida por FTY720 (Welsch y col., 2003). Así, cuando analizamos el crecimiento a 12°C de células que sobreexpresan *CAJ1*, la mejoría observada en la cepa parental se ve completamente enmascarada en ausencia de una ligasa de ubiquitina Rsp5p funcional (Fig. 25A). Por lo tanto, nuestros resultados sugieren que Caj1p podría tener un papel específico, en modular la actividad de las chaperonas de Hsp70s durante el reciclado de proteínas a baja temperatura mediada por ubiquitina.

### **3.3.- *UBP13*: la hidrolasa C-terminal de la ubiquitina**

La proteasa Ubp13p es un miembro de la familia de las enzimas de desubiquitilación (Dubs), la cual engloba 17 genes de *S. cerevisiae* (Amerik y col., 2000). Las Dubs son proteasas específicas de ubiquitina encargadas de liberar el péptido de estructuras conjugadas con ubiquitina, revertiendo de esta forma el proceso de ubiquitilación. En consecuencia, las Dubs son necesarias tanto para la homeostasis de ubiquitina, como para la proteólisis dependiente del proteasoma (Mukhopadhyay y Riezman, 2007; Kimura y Tanaka, 2010). En concreto, se ha observado la participación de tres Dubs: *DOA4*, *UBP6* y *UBP14*, en la degradación inducida por altas presiones de Tat2p, de manera que la ausencia de cualquiera de ellas, causa la estabilización del transportador de triptófano, permitiendo el

crecimiento de las células de levadura en estas condiciones (Miura y Abe, 2004). En nuestro estudio, aunque observamos que la sobreexpresión de *UBP13* tiene un efecto beneficioso para las células a baja temperatura, su ausencia no afectó al crecimiento a 12°C (dato no mostrado). Además, esta mejora es dependiente de la presencia de una proteína Rsp5 funcional (Fig. 25A). A la vista de este resultado, es posible que Ubp13p pueda tener funciones tanto específicas como redundantes a bajas temperaturas, de manera similar a lo propuesto para otras enzimas de desubicultilación (Amerik y col., 2000).

### **3.4.- Regulación de los transportadores de membrana y papel funcional de Rsp5p.**

Los resultados obtenidos sugieren, que un descenso de la temperatura es percibido como una condición de estrés en la que los transportadores de membrana deben ser degradados, siendo la activación de Rsp5p esencial en dicho proceso. Para comprobarlo, en primer lugar se analizaron los niveles de la permeasa general de aminoácidos, Gap1p, en células expuestas a baja temperatura. Para ello, se transformó la cepa CEN.PK2-1C con el plásmido YCpJ25, que contiene el gen *GAP1* etiquetado con GFP bajo el control del promotor *GAL1* (De Craene y col., 2001). Como se observa en la Fig. 27A, la cantidad de Gap1p disminuye cuando las células se transfieren de 30 a 12°C durante 4h.

Posteriormente, se examinaron los niveles de Tat1p y Tat2p en células de la cepa silvestre y mutantes para *rsp5* transformadas con los plásmidos p3HA-TAT1c o p3HA-TAT2c, cada uno de los cuales codifica para una proteína funcional Tat1 o Tat2 etiquetada con hemaglutinina (HA)

en su extremo N-terminal (Abe y Iida, 2003). Según lo esperado, el nivel de ambas permeasas de triptófano ya resultó más elevado en células del mutante *rsp5* cultivadas a 30°C que en las correspondientes de la cepa parental (Fig. 27B y C). Los cambios en el nivel de Tat1p (Fig. 27B) fueron escasos después de 4h de exposición a baja temperatura, pudiéndose observar una reducción de Tat1p en ambas cepas, lo que sugiere que su regulación en respuesta a frío podría estar controlada por otra ligasa de ubiquitina, hecho que se ha descrito para células de levadura expuestas a altas presiones (Abe y Iida, 2003). Con el objeto de analizar si exposiciones prolongadas a 12°C podrían tener efectos más acusados, se analizaron células transformadas con el plásmido p3HA-Tat2c tras un tratamiento en frío de 24 h. Como se muestra en la Fig. 27C, una exposición larga a bajas temperaturas, reduce visiblemente el nivel de Tat2p en células de la cepa parental. Sin embargo, este cambio es menos evidente en células del mutante *rsp5*, que aún presentan una banda correspondiente a Tat2p intensa tras 24h a 12°C (Fig. 27C). La exposición a frío activa la degradación de varias permeasas de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* y Rsp5p parece jugar un papel esencial en dicho mecanismo.

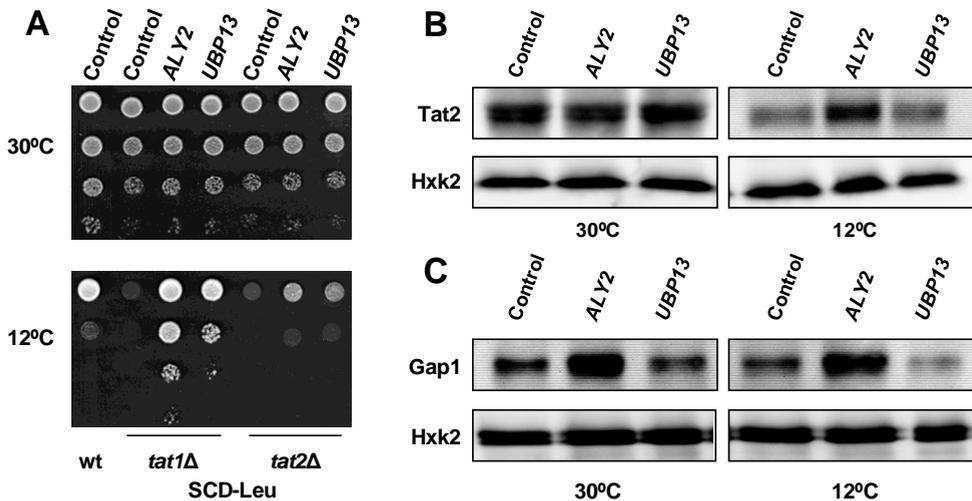


### **3.5.- La sobreexpresión de *ALY2* aumenta la abundancia de Tat2, una proteína esencial para el crecimiento en frío de *S. cerevisiae*.**

Para profundizar en el mecanismo de supresión de la sensibilidad a frío de *ALY2* y *UBP13*, en primer lugar analizamos si la mejora del crecimiento a 12°C era dependiente de las permeasas Tat1p y Tat2p. Para ello llevamos a cabo la delección de *TAT1* o *TAT2* en la cepa parental CEN.PK2-1C, los correspondientes mutantes se transformaron con los plásmidos de *ALY2* y *UBP13* y se ensayó su capacidad de crecimiento a baja temperatura. Como se observa en la Fig. 28A, la delección de cualquiera de las dos permeasas de triptófano, evita la proliferación a 12°C en condiciones de limitada disponibilidad de nutrientes (medio SCD-Leu). Un elevado número de copias de *ALY2* o *UBP13* mejora el crecimiento en frío, siendo el efecto más acusado en la cepa carente de *TAT1* que en la mutante *tat2Δ*.

A la vista de este resultado, se examinó si el nivel de Tat2p se veía afectado por la sobreexpresión de *ALY2* o *UBP13*. Para ello, se introdujo el plásmido YEplac181ALY2 o YEplac181UBP13 en transformantes de la cepa CEN.PK2-1C con p3HA-TAT2c. En estos experimentos se incluyó el análisis de Gap1-GFP como control (YCpJ25). En la Fig. 28B se observa que ni la sobreexpresión de *ALY2* ni la de *UBP13* alteran los niveles de Tat2p a 30°C. Ahora bien, mientras que un mayor número de copias de *UBP13* tendría un ligero efecto, si cabe, sobre la abundancia de Tat2p a 12°C, una elevada expresión de *ALY2* parece inhibir la degradación de Tat2p inducida por frío, ya que sus niveles permanecen estables tras 24h a 12°C (Fig. 28B). La sobreexpresión de *ALY2* también incrementa los

niveles de Gap1p tanto a 30°C como a 12°C (Fig. 28C). Por el contrario un mayor número de copias de *UBP13* parece reducir la abundancia de la permeasa general de aminoácidos, especialmente en células creciendo a 12°C (Fig. 28C). En conjunto, estos resultados sugieren que la regulación a la baja de Tat2p, es la causa principal de la inhibición en el crecimiento observada a bajas temperaturas. La sobreexpresión de *ALY2* contrarresta dicha regulación y aumenta el contenido relativo de Gap1p. No podemos descartar que el efecto de *ALY2* y *UBP13* sea también, al menos en parte, consecuencia de su interacción con el proceso de degradación de otros transportadores, p.e. *FUR4*, que no han sido analizados en este estudio.



**Fig. 28. Un elevado número de copias de *ALY2* disminuye la regulación a la baja del transportador de triptófano, Tat2p, inducida por frío.** A) crecimiento a 30 o 12°C de células mutantes *tat1Δ* y *tat2Δ* del fondo CEN.PK2-1C transformadas con los plásmidos YEplac181 (control, *LEU2*), YEp181ALY2 (*ALY2*) y YEp181UBP13 (*UBP13*). B) extractos proteicos de células del fondo

CEN.PK2-1C transformadas con los plásmidos 3HA-TAT2c (*URA3*) y YEplac181 (control, *LEU2*), YEp181ALY2 (*ALY2*), o YEp181UBP13 (*UBP13*). C) niveles de la permeasa general de aminoácidos Gap1p en células co-transformadas con el plásmido YCpJ25, que contiene el gen *GAP1* etiquetado con GFP y bajo el control del promotor *GAL1* (De Craene y col., 2001), y el plásmido YEplac181 (Control, *LEU2*), YEp181ALY2 (*ALY2*), o YEp181UBP13 (*UBP13*). En este caso, el tratamiento en frío se extendió durante 24 horas.

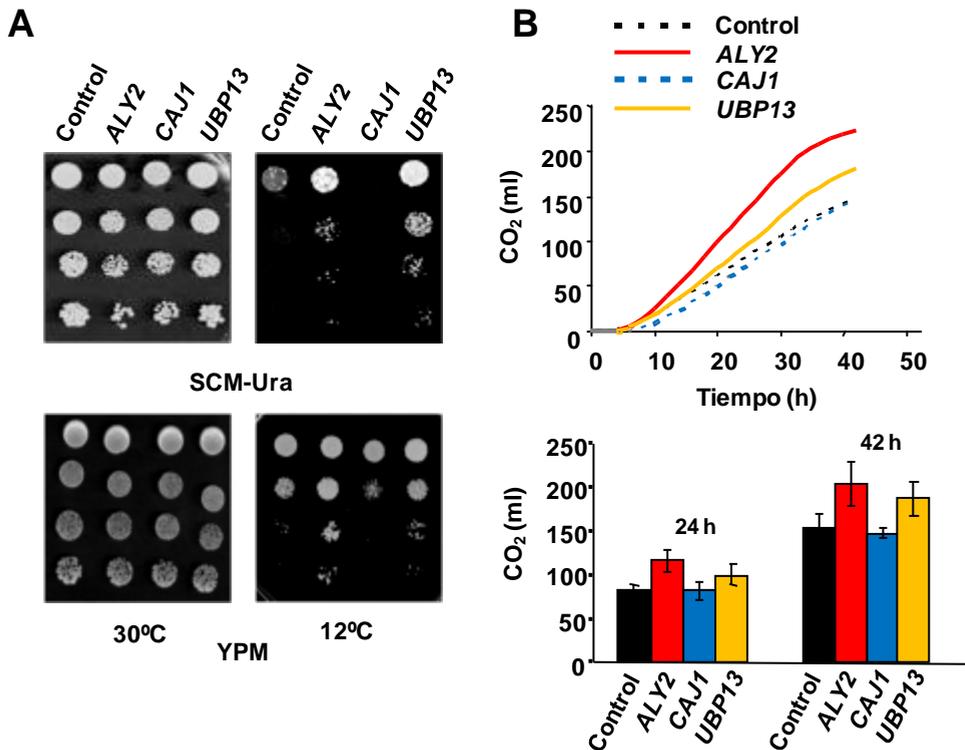
### **3.6.- Mejora del crecimiento a bajas temperaturas de cepas industriales**

Llegados a este punto, decidimos analizar si un aumento de la dosis génica de estos genes identificados como supresores de la sensibilidad a frío de *S. cerevisiae*, podría ser una aproximación adecuada para mejorar el crecimiento a bajas temperaturas de cepas industriales. Con esta finalidad, se generaron derivados de la cepa vínica QA23 auxótrofos para uracilo o para uracilo y triptófano. Dichas cepas auxótrofas se transformaron con los plásmidos YEpALY2, YEpCAJ1 y YEpUBP13 y se analizó su crecimiento a baja temperatura. Como en la cepa de laboratorio, la mejora del crecimiento a 12°C sólo se observó en los transformantes auxótrofos para triptófano y no en las cepas protótrofas (dato no mostrado). Por lo tanto, la habilidad de estos tres genes para mejorar el crecimiento de levaduras a 12°C, parece estar estrechamente relacionado con su capacidad para interferir en la regulación inducida por frío, de los transportadores de aminoácidos. Así, nos preguntamos si esta propiedad se podría extender a otras permeasas de nutrientes y si ese fuera el caso, bajo qué condiciones la sobreexpresión de *ALY2*, *CAJ1* o

*UBP13* podría suponer una ventaja para el crecimiento de cepas industriales protótrofas.

Una característica importante de *S. cerevisiae* es la presencia de numerosos transportadores de glucosa en su genoma. De hecho, para eliminar la toma de glucosa del medio se requiere la delección de al menos 17 genes, *HXT1-17* (Wieczorke y col. 1999). Sin embargo, en la mayoría de las cepas de *S.cerevisiae*, la maltosa se internaliza mediante una permeasa codificada por un único gen, *MAL31* o *MAL61*. Además, este transportador está regulado por inhibición catabólica, previa proteólisis dependiente de Rsp5p y Doa4p (Lucero y Lagunas, 1997). Como se observa en la Fig. 29A, la sobreexpresión de *ALY2* o de *UBP13* mejora el crecimiento a 12°C de células protótrofas de la cepa vínica QA23 en medio mínimo con maltosa como única fuente de carbono (SCM), mientras que no se encontraron diferencias a 30°C. Resultados similares fueron obtenidos en medio rico, con maltosa como fuente de carbono (YPM) (Fig. 29A). No se observó mejoría en los transformantes con YEpCAJ1, lo que sugiere que esta proteína J debe regular otra diana diferente al transporte de maltosa.

Por último, se inspeccionó la capacidad fermentativa de las cepas recombinantes. Como se observa en la Fig. 29B (arriba), la velocidad de producción de CO<sub>2</sub> en células con copias extra de *UBP13* y especialmente para los transformantes con *ALY2*, fue claramente superior a la registrada para las células con el plásmido YEpCAJ1 o de la cepa control, en medio YPM líquido a 12°C. En concreto, la producción de CO<sub>2</sub> medida en cepas sobreexpresantes de *ALY2* tras 42h de fermentación a baja temperatura, fue aproximadamente, un 30% mayor que la obtenida para la cepa control bajo las mismas condiciones (Fig. 29B, abajo).



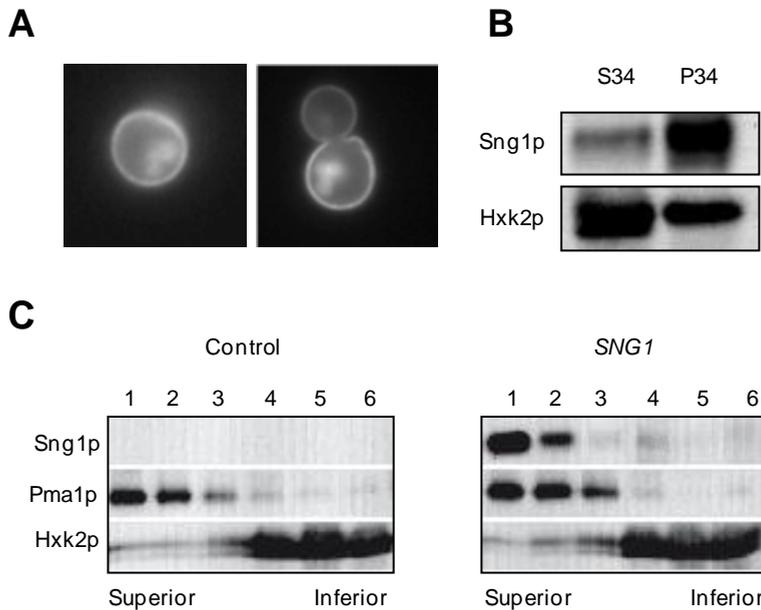
**Fig. 29.** La sobreexpresión de *ALY2* o *UBP13* mejora el crecimiento y la actividad fermentativa de la cepa industrial protótrofa QA23 en maltosa. A) crecimiento a 12 o 30°C en medio con glucosa (SCD-Ura) o maltosa (SCM-Ura) como única fuente de carbono, o medio rico YP-maltosa (YPM) de derivados auxótrofos para uracilo de la cepa vínica QA23 *ho* transformados con los plásmidos YEp<sub>lac195</sub> (Control) YEp<sub>ALY2</sub>, YEp<sub>CAJ1</sub>, o YEp<sub>UBP13</sub>. B) producción de CO<sub>2</sub> de las cepas mencionadas en medio YPMal a 12°C Los valores están expresados como mililitros de CO<sub>2</sub> y representados gráficamente como la variación en el tiempo de la cantidad total de gas (arriba) o como volumen total de gas producido tras 24 o 48 horas de fermentación (abajo). El error (abajo) se calculó con la siguiente fórmula  $(1.96 \times SD)/\sqrt{n}$ , donde *n* es en número de medidas realizadas.

#### **4.- Caracterización del papel funcional de Sng1p en la tolerancia a bajas temperaturas**

Como se ha descrito al principio de este capítulo, otra estrategia utilizada para el aislamiento de supresores en multicopia del defecto de crecimiento a baja temperatura de *S. cerevisiae*, fue la selección en medio mínimo, SCD-Ura, a 12°C. De esta manera la proteína de membrana Sng1p surgió como un candidato a caracterizar. Así, decidimos analizar en profundidad su papel funcional en frío, ya que podría revelar aspectos no explorados con anterioridad, sobre la respuesta a este estrés en levaduras.

##### **4.1.- La proteína Sng1p se localiza en estructuras de la membrana plasmática interactuando con rafts lipídicos.**

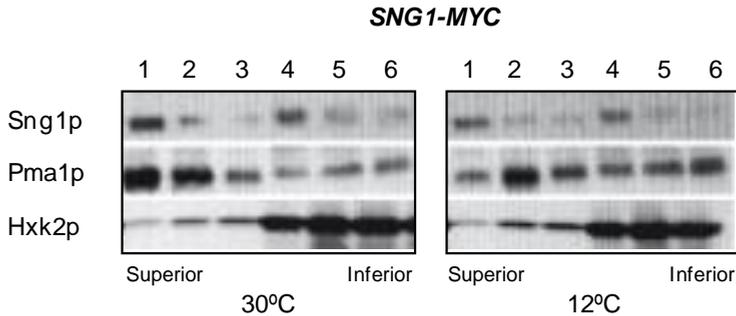
En primer lugar, confirmamos la localización de la proteína Sng1p utilizando una fusión Sng1-yEGFP. Como se observa en la Fig. 30A, Sng1p está presente a lo largo de la superficie celular, aunque también se hizo evidente una acumulación significativa de la proteína en el interior de la célula. Cuando visualizamos esta proteína de fusión mediante Western blot, comprobamos su presencia en la fracción enriquecida en membranas, correspondiente al pellet obtenido tras centrifugar el extracto celular a 34.000 x g. Como marcador citosólico se utilizó la proteína Hxk2, principal enzima glicolítica responsable de la fosforilación de glucosa a glucosa-6-fosfato, que se localiza mayoritariamente en el sobrenadante (Fig. 30B).



**Fig. 30. La proteína de membrana Sng1 interacciona con rafts lipídicos.** A) microscopía de fluorescencia de transformantes *pFL44-SNG1yECFP* de la cepa CEN.PK2-1C. B) Western blot de un extracto celular de la cepa anterior tras una centrifugación a 34.000 x g. Las bandas corresponden al pellet (P34) y al sobrenadante (S34). Como control de proteína mayoritariamente citosólica se utilizó Hxk2p. C) separación mediante centrifugación en gradiente de densidad (Optiprep) de extractos proteicos tratados con Triton X-100 de células de los transformantes *pFL44* (Control) y *pFL44-SNG1yECFP* (*SNG1*). Se analizaron por Western blot seis fracciones tomadas desde la superficie (Superior, 0% Optiprep) hasta el fondo (Inferior, 30% Optiprep). Como marcador de proteínas asociadas a rafts lipídicos se utilizó la ATPasa de protones de membrana Pma1p y Hxk2p como marcador citosólico.

Con el objeto de identificar si Sng1p está asociada a rafts lipídicos, se analizó mediante Western blot la flotación de la misma en un gradiente

de densidad tras el tratamiento del extracto proteico correspondiente con el detergente Triton X-100. Como control se utilizó un extracto de proteínas de células del transformante pFL44 que portan un plásmido vacío. Como se observa en la Fig. 30C, Sng1p se detectó mayoritariamente en las fracciones de menor densidad (Superior), mostrando un patrón similar al de otras proteínas asociadas a rafts, como la protón ATPasa de membrana Pma1p (Fig. 30C) o la proteína anclada a GPI Gas1p (resultados no mostrados). En contraste, Hxk2p quedó relegada a las fracciones inferiores del gradiente, aquellas de mayor densidad (Fig. 30C). Este comportamiento no fue debido al etiquetado de Sng1p con yECFP o a la sobreexpresión del gen en un alto número de copias, pues el análisis de extractos de proteínas de células en las que la copia cromosómica de *SNG1* ha sido etiquetada en su extremo C-terminal con un epítipo 13xmyc, mostró resultados similares (Fig. 31).



**Fig. 31. La interacción de Sng1p con rafts lipídicos no se ve influida por la etiqueta utilizada ni por el nivel de expresión del gen.** A) Análisis mediante Western blot de la flotación en un gradiente de Optiprep de Sng1-myc, Pma1p y Hxk2p. Las muestras corresponden a extractos proteicos de células de la cepa CEN.PK2-1C que expresan una versión cromosómica de *SNG1* marcada con 13 copias del epítipo Myc (*SNG1-MYC*) cultivadas a 30 o 12°C, como se indica, y

fraccionadas en seis alícuotas recogidas desde la parte superior a la inferior del gradiente. Para otros detalles ver apartado 7.5 de Materiales y Métodos.

Cabe destacar que en algunos experimentos, se detectó la presencia de Sng1p también en fracciones de elevada densidad (fracción 4), aunque no podemos determinar con exactitud que porción de la proteína estaría incluida a esta fracción soluble. En células expuestas a 12°C, Sng1p también se localizó en las fracciones resistentes al detergente (Fig. 31). Así, Sng1p se localiza en estructuras de la membrana plasmática, interacciona con lípidos y su asociación persiste incluso en presencia del detergente Tritón X-100, esto es, forma parte de los microdominios de membrana denominados DRMs (“Detergent Resistant Membranes”) o rafts lipídicos (Bagnat y col., 2000; Malinska y col., 2003; 2004). Finalmente, nuestros resultados indican que esta asociación es independiente de la temperatura de crecimiento.

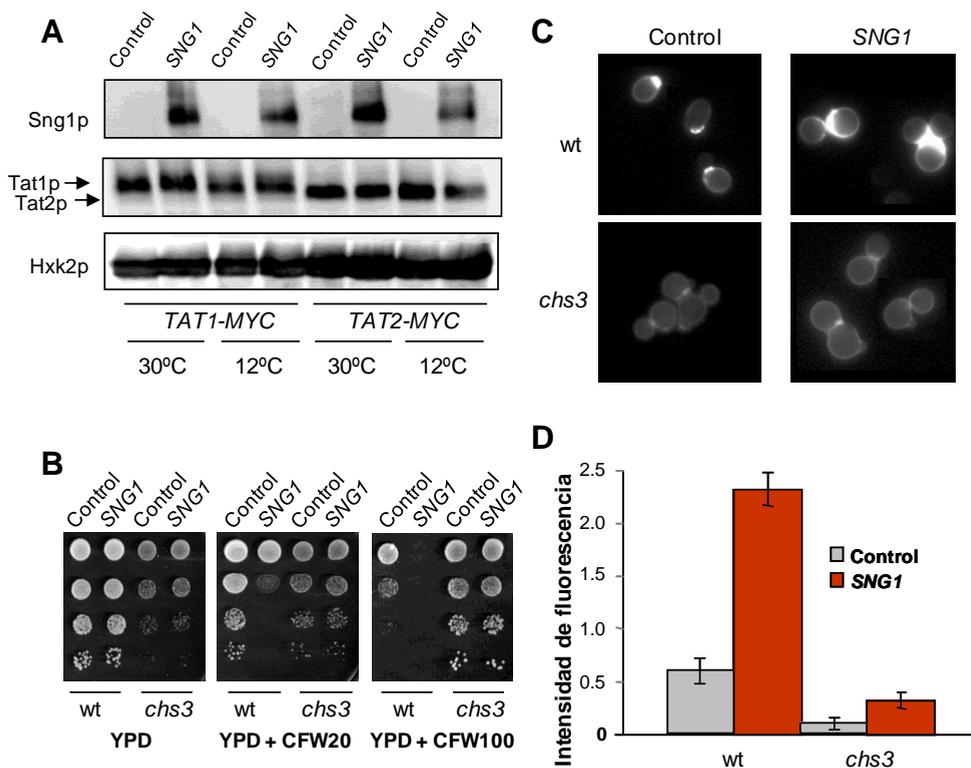
#### **4.2.- La sobreexpresión de *SNG1* altera la actividad de proteínas de membrana**

Dada su asociación con rafts lipídicos, nos preguntamos si Sng1p podría tener un papel en la regulación del contenido y/o actividad de proteínas ancladas a la membrana, entre ellas, de los transportadores de triptófano. Por lo tanto, primero comprobamos si la sobreexpresión de *SNG1* afecta al nivel de Tat1p o Tat2p. Para ello, se analizaron por Western blot extractos proteicos de transformantes pFL44-SNG1yECFP en los que se ha etiquetado los genes *TAT1* o *TAT2* con 13-Myc, *TAT1-MYC* o *TAT2-MYC*. Como puede observarse, no se detectaron cambios apreciables en la abundancia de Tat1p o Tat2p debidos a la

sobreexpresión de *SNG1* ni a 30°C ni tras 3 horas de exposición a 12°C (Fig. 32A).

Posteriormente, examinamos si Sng1p podía afectar a la actividad de las proteínas localizadas en la membrana. Al igual que Tat2p, la enzima quitina sintasa 3 (*Chs3*), principal responsable de la síntesis de quitina en *S. cerevisiae*, se transporta a la membrana plasmática por exocitosis y se elimina de forma regulada mediante endocitosis (Roncero, 2002; Reyes y col., 2007; Grossmann y col., 2008). El nivel de quitina en la pared celular está relacionado con la sensibilidad a blanco de calcofluor (CFW), un agente que perturba la pared celular (Roncero y col., 1988). Por lo tanto, analizamos el crecimiento en presencia de CFW como medida indirecta del nivel de actividad quitina sintasa.

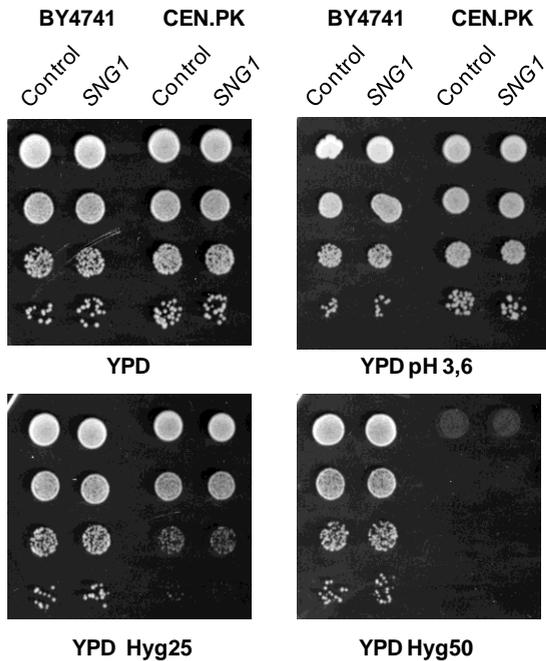
Como se muestra en la Fig. 32B, la sobreexpresión de *SNG1* incrementó la sensibilidad de la cepa CEN.PK2-1C a CFW, sugiriendo un mayor contenido de quitina en estas células. En correspondencia con esto, la ausencia de *CHS3* revirtió el fenotipo (Fig. 32B). Además, el análisis de los niveles de quitina, mediante microscopía de fluorescencia, confirmó la mayor abundancia de este polímero en células pFL44-SNG1yEGFP que en las correspondientes control transformadas con un plásmido vacío (Fig. 32C). Además, como se recoge en el panel D, se observó un ligero aumento en la producción de quitina en transformantes pFL44-SNG1yEGFP del mutante *chs3Δ* (Fig. 32D). Este resultado se debe probablemente al aumento de la actividad quitina sintasa correspondiente al gen homólogo, *Chs2p* (Cabib, 2004).



**Fig. 32. La sobreexpresión de SNG1 parece alterar la actividad de algunas proteínas ancladas a la membrana.** A) análisis mediante Western blot del contenido de Tat1p (*TAT1-MYC*) y Tat2p (*TAT2-MYC*) en transformantes pFL44 (Control) o pFL44-SNG1yEGFP (*SNG1*) cultivados a 30 o 12°C (3 h). Sng1p y Tat1-myc/Tat2-myc se visualizaron con anticuerpos contra GFP y Myc, respectivamente. Como control de carga se verificó la abundancia de Hxk2p. B) crecimiento en presencia de blanco de calcofluor (CFW) de transformantes pFL44 (Control) o pFL44-SNG1yEGFP (*SNG1*) de la cepa silvestre CEN.PK2-1C y del mutante *chs3*Δ. Se ensayaron concentraciones de la droga de 20 (CFW20) y 100 (CFW100) μg/ml. C) inspección visual mediante microscopía de fluorescencia de células de las cepas mencionadas en el apartado anterior tras una tinción con CFW. D) análisis del contenido de quitina en las cepas mencionadas. La

intensidad de fluorescencia se estimó calculando la intensidad media de los píxeles/número de células. El procesado de las imágenes se realizó con el programa Image J. En la gráfica se representan los valores de la media  $\pm$  SE (Error Standard) de, al menos, tres experimentos independientes.

Siguiendo con la caracterización de los efectos de un elevado número de copias de *SNG1* sobre proteínas de membrana, decidimos analizar otros fenotipos como tolerancia a pH ácido o presencia de higromicina B, ya que bajo estas condiciones, el crecimiento celular depende, entre otros, de la actividad de Pma1p (Serrano y col., 1986). A diferencia de Tat2p, Pma1p está excluida de los compartimentos tipo MCC localizándose en los MCPs (Malínská y col., 2003). Como se observa en la Fig. 33, la sobreexpresión de *SNG1* no alteró la sensibilidad de *S. cerevisiae* a pH ácido o a drogas catiónicas como higromicina B. Se obtuvieron resultados similares al utilizar cationes tóxicos como el sodio o el litio (datos no mostrados).

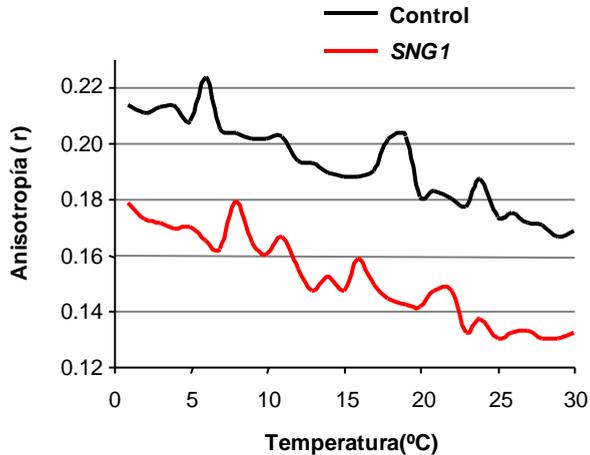


**Fig. 33.** La expresión de *SNG1* en un alto número de copias no altera la sensibilidad a pH ácido o a higromicina B. El crecimiento de células de los transformantes pFL44 (Control) y pFL44-SNG1yEGFP (*SNG1*) de las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 y CEN.PK2-1C fue ensayado en presencia de higromicina B, 25 (Hyg25) o 50  $\mu\text{g/ml}$  (Hyg50), o pH ácido (pH 3,6).

#### 4.3.- Sng1p afecta a la fluidez de membrana

Como ya hemos comentado, a temperaturas inferiores a la óptima, se modifica el orden molecular de la bicapa lipídica, sufriendo el fenómeno conocido como rigidificación (Los y Murata, 2004; Aguilera y col., 2007) que afecta a la funcionalidad y actividad de las proteínas ancladas a la membrana. Así que investigamos, mediante medidas de anisotropía de la sonda fluorescente DPH, si Sng1p altera las propiedades físicas de la membrana. En este tipo de experimentos, un descenso en los valores de anisotropía, refleja el aumento de la fluidez de la membrana, ya que permite la movilidad del DPH en la bicapa lipídica. Como se muestra en la Fig. 34, la sobreexpresión de *SNG1* incrementó la movilidad de la sonda

fluorescente a lo largo de todo el rango de temperaturas ensayado, indicando un aumento de la fluidez de la membrana plasmática.

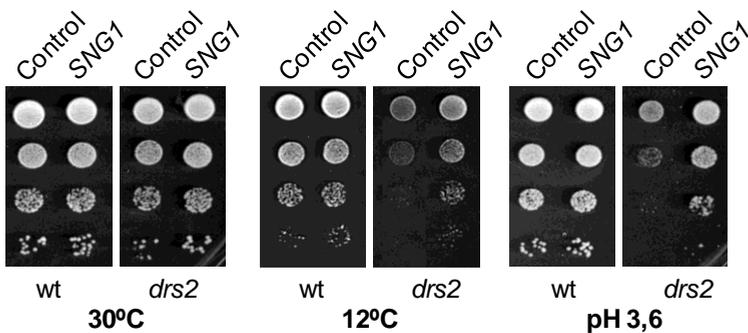


**Fig. 34. La sobreexpresión de *SNG1* aumenta la fluidez de la membrana.** Se utilizó la sonda fluorescente DPH (1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno) para examinar los efectos de la sobreexpresión de *SNG1* en la fluidez de la membrana plasmática en células de levadura a diferentes temperaturas. El parámetro de anisotropía (r) es inversamente proporcional a la fluidez de la membrana.

#### **4.4.- La sobreexpresión de *SNG1* alivia el defecto de crecimiento en frío del mutante *drs2Δ***

Los cambios observados en la fluidez de la membrana nos llevaron a pensar que la proteína Sng1p podía participar de algún modo en la organización de esta estructura celular. Una característica importante de la membrana plasmática, es su asimetría, que depende entre otras de la actividad de las llamadas flipasas (Muthusamy y col., 2009; López-

Marqués y col., 2011). Cabe resaltar que defectos en la actividad de la translocasa de fosfolípidos Drs2p-Cdc50p causa sensibilidad a frío en *S. cerevisiae* (Hua y col., 2002; Saito y col., 2004). Debido a esto, quisimos examinar el efecto de la sobreexpresión de *SNG1* en el crecimiento a 12°C de los mutantes *drs2Δ* y *cdc50Δ* de la cepa parental BY4741. Como se describió anteriormente (Fig. 24B), la expresión en un elevado número de copias de *SNG1* no alteró de forma notoria el crecimiento en frío de células *Trp<sup>+</sup>*, en este caso, de la cepa parental BY4741 (Fig. 33). Tampoco la sobreexpresión de *SNG1* afectó al crecimiento del mutante *cdc50Δ* (datos no mostrados). Cdc50p que actúa como una chaperona de Drs2p, funciona en diferentes procesos celulares (Muthusamy y col., 2009) y exhibe un fenotipo de crecimiento reducido incluso a 30°C (datos no mostrados). Sin embargo, *SNG1* revirtió parcialmente el fenotipo de sensibilidad a frío del mutante *drs2Δ* (Fig. 33). Además, la sobreexpresión de este gen mejoró el crecimiento del mutante a pH ácido (Fig. 33), pero no tuvo efecto en cuanto a su sensibilidad a higromicina B (datos no mostrados).



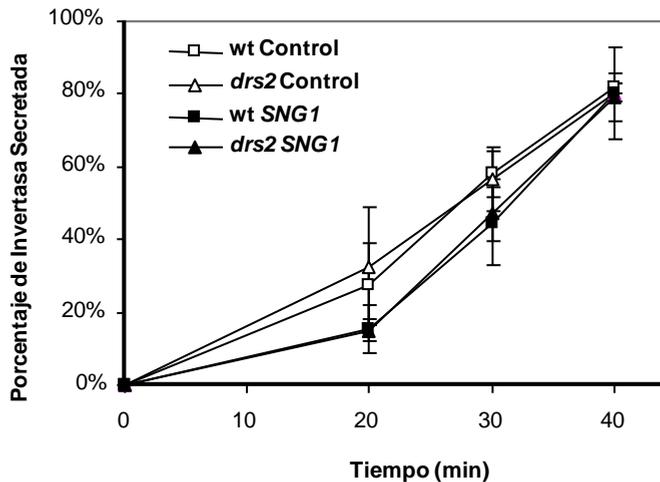
**Fig. 35. La sobreexpresión de *SNG1* revierte el fenotipo de sensibilidad a frío y pH ácido del mutante *drs2Δ*.** Crecimiento en diferentes

condiciones de estrés de transformantes pFL44 (Control) y pFL44-SNG1yECFP (*SNG1*) de la cepa silvestre BY4741 y del mutante *drs2Δ*.

#### **4.5.- La sobreexpresión de *SNG1* no altera significativamente el transporte de proteínas en la ruta de secreción**

El hecho de que la sobreexpresión de *SNG1* alivie el defecto de crecimiento en frío de *drs2Δ*, sugirió la existencia de una interacción funcional de estos dos genes. Estudios previos han determinado la localización mayoritaria de Drs2p en membranas internas, concretamente en la red trans-Golgi (Chen y col., 1999), donde parece desempeñar una función esencial para el transporte en las rutas exocítica y endocítica (Hua y col., 2002). Por ello, decidimos analizar la cinética de secreción de la enzima invertasa en transformantes pFL44 y pFL44-SNG1yECFP de la cepa parental y del mutante *drs2Δ*. La enzima invertasa ( $\beta$ -fructofuranosidasa, EC 3.2.1.26) se localiza en el espacio periplásmico a dónde se secreta por la maquinaria celular en respuesta a una reducción en el contenido de glucosa en el medio de cultivo (Novick y col., 1981). Se ha descrito que la ausencia de Drs2p, produce un ligero retraso inicial en la secreción de invertasa, concretamente en los primeros 15 min después de la transferencia de un cultivo celular desde un medio con un 2% de glucosa a otro con un 0,1% de fuente de carbono (Hua y col., 2002). Sin embargo, en nuestro caso, no fuimos capaces de observar este defecto en el fondo BY4741 (Fig. 36, símbolos vacíos). Más aún, la sobreexpresión de *SNG1* pareció afectar negativamente a la secreción de invertasa a tiempos cortos (20 min) tanto en células de la cepa parental como del mutante *drs2Δ* (Fig. 36, símbolos rellenos), aunque las diferencias no resultaron estadísticamente significativas. Tras 40 minutos, el porcentaje de invertasa

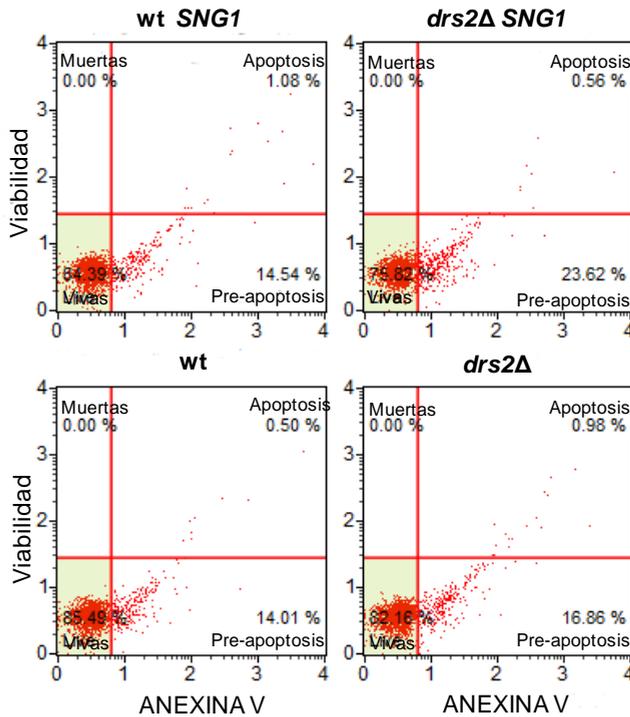
secretada fue prácticamente idéntica en todas las cepas analizadas (Fig. 36). Así, Sng1p tiene un efecto mínimo, si alguno, en el transporte de proteínas y, parece poco probable que el mismo tenga algún significado fisiológico en la mejora de la sensibilidad a frío del mutante *drs2Δ*.



**Fig. 36. La sobreexpresión de *SNG1* no afecta al transporte de proteínas.** Cinética de secreción de invertasa en transformantes pFL44 (Control) y pFL44-SNG1yEGFP (*SNG1*) de la cepa parental BY4741 (wt) y del mutante *drs2Δ* (*drs2*). Cultivos en condiciones de represión (YPD, 4% de glucosa) de las cepas mencionadas se centrifugaron y el pellet celular se resuspendió en el mismo medio conteniendo un 0,1% de fuente de carbono. A los tiempos indicados, se tomaron alícuotas de cada cultivo que se analizaron para invertasa extracelular y total. En la gráfica se representan los valores medios del porcentaje de invertasa externa  $\pm$  SE (Error standard), de al menos, tres experimentos independientes.

#### 4.6.- La actividad de Sng1p afecta a la translocación de los fosfolípidos de la membrana

Además de su papel en la secreción de proteínas, varias evidencias sugieren que Drs2p participa en la translocación fuera-dentro de fosfolípidos de membrana, un movimiento conocido como “flip-flop” o “flipping”, que genera la asimetría de PS, PE y PC, más abundantes en la cara interna que en la externa (Natarajan y col., 2004; Zhou y Graham, 2009; Baldrige y Graham, 2012). Así pues, decidimos investigar si la sobreexpresión de *SNG1* podía aumentar, de algún modo, la actividad flipasa catalizada por Dnf1p, Dnf2p, Dnf3p y/o Neo1p, de manera que este efecto compensara la ausencia de Drs2p. De todas ellas, Dnf1p y Dnf2p parecían los candidatos más probables pues son las flipasas más abundantes en la membrana plasmática (Hua y col., 2002). Así pues, medimos la exposición de PS en la cara externa de la membrana, mediante un ensayo de afinidad con anexina-V, una proteína que se une específicamente a este fosfolípido, utilizando un kit diseñado para la detección de células pre-apoptóticas en cultivos celulares de mamíferos. Como indicaban estudios anteriores (Chen y col., 2006), el porcentaje de células pre-apoptóticas fue ligeramente superior en la cepa *drs2Δ* que en la parental BY4741 ( $14.7 \pm 1.2\%$  frente a  $11.5 \pm 1.5\%$ , respectivamente), indicando que más anexina V se une a la cara externa de células del mutante (Fig. 37). Sin embargo, la sobreexpresión de *SNG1* no redujo la exposición de PS. Por el contrario, los niveles fueron superiores, sugiriendo un descenso en la actividad flipasa localizada en la membrana plasmática de ambas cepas [ $19.2 \pm 2.4$  (*drs2Δ*) frente a  $13.7 \pm 0.9$  (wt)] (Fig. 37).

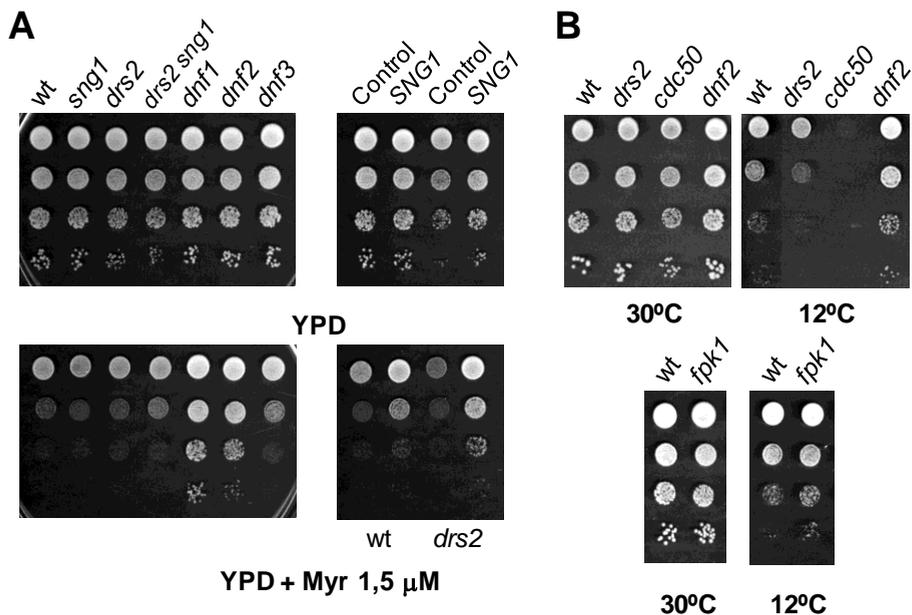


**Fig. 37.** La sobreexpresión de *SNG1* incrementa la exposición de PS en la cara externa de la membrana plasmática. Cantidad de PS expuesta en la cara externa de la membrana y unida a Anexina V. Los datos se expresaron como el porcentaje de células viables marcadas con anexina V. Aquí, se muestra un experimento representativo

Siguiendo esta línea, procedimos a analizar el efecto en el crecimiento celular de la adición de miriocina, una droga que inhibe la síntesis de esfingolípidos (Miyake y col., 1995). Se ha descrito que existe una correlación negativa entre la actividad flipasa y la viabilidad celular en condiciones en las que la disponibilidad de esfingolípidos está comprometida (Roelants y col., 2010). Como se muestra en la Fig. 38A células carentes de *Dnf1p* o *Dnf2p* mostraron mayor resistencia a miriocina que la cepa parental. La ausencia de *DNF3* supuso también una mejora, aunque más ligera. Por su parte, la pérdida de *SNG1*, *DRS2* o la delección combinada de ambos genes, no tuvo efecto aparente (Fig. 38A). Aún más, la sobreexpresión de *SNG1* revertió significativamente el fenotipo de

sensibilidad a miriocina, tanto de células de la cepa silvestre como del mutante *drs2Δ* (Fig. 38A, derecha).

Finalmente, examinamos el crecimiento a bajas temperaturas de células de los mutantes simples *dnf1Δ* y *dnf2Δ*. A diferencia de los resultados de sensibilidad a frío observados en ausencia de *DRS2* (Fig. 35), las células carentes de las flipasas Dnf1p (dato no mostrado) o Dnf2p fueron ligeramente más tolerantes a estrés por frío (Fig. 38B). Además, el crecimiento a bajas temperaturas pareció estimularse ligeramente por la delección de *FPK1* (Fig. 38B) o *FPK2* (datos no mostrados). Las quinasas Fpk1p y Fpk2p están implicadas en el mantenimiento de la asimetría de fosfolípidos, ya que estimulan la actividad de las flipasas Dnf1,2p (Nakano y col., 2008). En conjunto, nuestros resultados sugieren que la sobreexpresión de *SNG1* causa un descenso en la actividad flipasa catalizada por Dnf1,2p con la consiguiente pérdida de asimetría de fosfolípidos, exposición de PS y aumento de resistencia a la droga miriocina. Este efecto en la distribución de fosfolípidos parece influir, al menos en parte, en el fenotipo de resistencia a frío observado en los sobreexpresantes de *SNG1*.

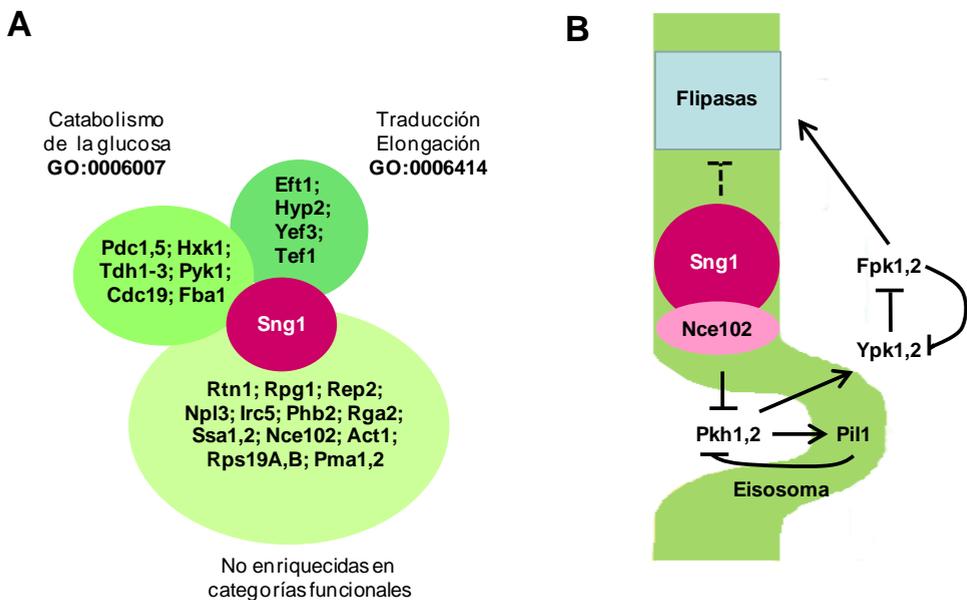


**Fig. 38. La reducción de la actividad flipasa mediada por Dnf1,2p incrementa la resistencia a miriocina y frío.** A) crecimiento en presencia o ausencia de la droga miriocina (Myr 1,5 μM) de células de la cepa parental BY4741 (wt) y de sus correspondientes mutantes, *sng1Δ*, *drs2Δ*, *drs2Δ sng1Δ*, *dnf1Δ*, *dnf2Δ* y *dnf3Δ* (parte izquierda), y de los transformantes pFL44 (Control) y pFL44-SNG1yECFP (*SNG1*) de la cepa parental (wt) y del mutante *drs2Δ* (parte derecha). B) sensibilidad a frío de las cepas de *S. cerevisiae* BY4741 (wt) y sus correspondientes mutantes *drs2Δ*, *cdc50Δ*, *dnf2Δ* y *fpk1Δ*. En cada caso, se muestra un experimento representativo.

#### 4.7.- Identificación de proteínas que interaccionan con Sng1p a baja temperatura

Con el objeto de obtener nuevas evidencias del posible papel de Sng1p como regulador de la actividad flipasa, nos propusimos identificar

otras proteínas que pudieran interaccionar con ésta. Con este fin, se llevó a cabo la purificación por afinidad en tándem (TAP) de un extracto de proteínas de transformantes pBG1805-SNG1 de la cepa BY4741. Esta construcción comercial (Thermo, Open Biosystems) contiene una fusión del gen *SNG1* a una cola que incluye 6xHis, 3-HA y el dominio ZZ de la proteína A, que facilitan su purificación (ver la sección de Materiales y Métodos). Para la extracción se utilizó un tampón con Triton X-100 y Na<sup>+</sup>-deoxicolato que facilita la solubilización de proteínas de membrana (Babu y col., 2012). Además se utilizó un procedimiento a pequeña escala para simplificar el volumen de muestra a procesar.



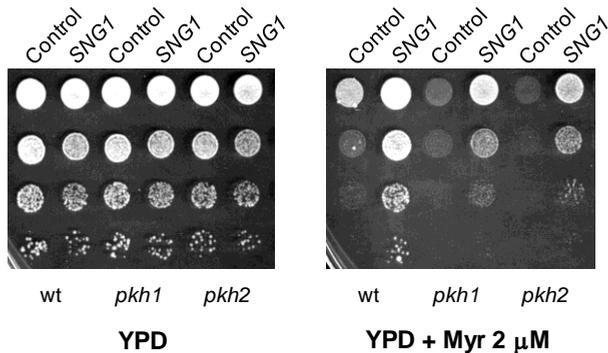
**Fig. 39. Posibles proteínas asociadas a Sng1p.** A) clasificación en grupos funcionales de las proteínas co-purificadas con Sng1p. B) módulo de señalización Nce102-Pkh-Fpk y su posible interacción con Sng1p y las flipasas de la membrana.

En la Fig. 39A se recoge el listado de las 28 proteínas identificadas mediante espectrometría de masas. De las mismas, aproximadamente la mitad fueron proteínas “*housekeeping*”, lo cual refleja que las limitaciones del proceso de purificación para eliminar proteínas solubles muy abundantes p.e. ribosomales o enzimas glicolíticas. En consecuencia, dirigimos nuestra atención a aquellas proteínas, once en total, que no fueron agrupadas de acuerdo a su función biológica en una categoría funcional (GORilla, [cbl-gorilla.cs.technion.ac.il](http://cbl-gorilla.cs.technion.ac.il)) (Fig. 39A). De éstas, cinco, Pma1p, Pma2p, Phb2p, Rtn1p y Nce102p contienen dominios transmembrana (<http://browse.yeastgenome.org>). Centramos nuestra atención en Nce102p, ya que esta proteína integral de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* se ha caracterizado recientemente (Fröhlich y col., 2009) como regulador negativo del módulo de señalización Pkh-Fpk de respuesta a esfingolípidos (Fig. 39B). Este sistema, a su vez, controla negativamente la actividad de las flipasas Dnf1p y Dnf2p (Nakano y col., 2008).

#### **4.8.- Estudio de la dependencia del efecto de *SNG1* sobre la funcionalidad del módulo de señalización Pkh-Fpk**

Los resultados expuestos en el apartado anterior, abrieron una vía de investigación para caracterizar el papel funcional de Sng1p en *S. cerevisiae* centrado en la regulación del módulo Pkh-Fpk. En primer lugar, determinamos si los efectos observados al sobreexpresar *SNG1* se deben, al menos en parte, a un aumento en la actividad Pkh. De acuerdo con estudios previos (Roelants y col., 2010), células sin *PKH1* o *PKH2* son sensibles a la presencia de miriocina, un resultado que corroboramos en mutantes de la cepa BY4741 (Fig. 40). Como puede observarse, la

sobreexpresión de *SNG1* mejoró el crecimiento en presencia de miriocina, aunque esta mejora fue mayor en la cepa silvestre que en ausencia de cualquiera de las quinasas, sugiriendo un papel redundante de las diferentes Pkhs.



**Fig. 40. La efectividad de Sng1p depende de la presencia de una actividad Pkh funcional.** A) Crecimiento en presencia de miriocina de transformantes pFL44 (Control) y pFL44-SNG1yECFP (*SNG1*) de la cepa parental BY4741 (wt) y de sus correspondientes mutantes *pkh1* $\Delta$  y *pkh2* $\Delta$ .

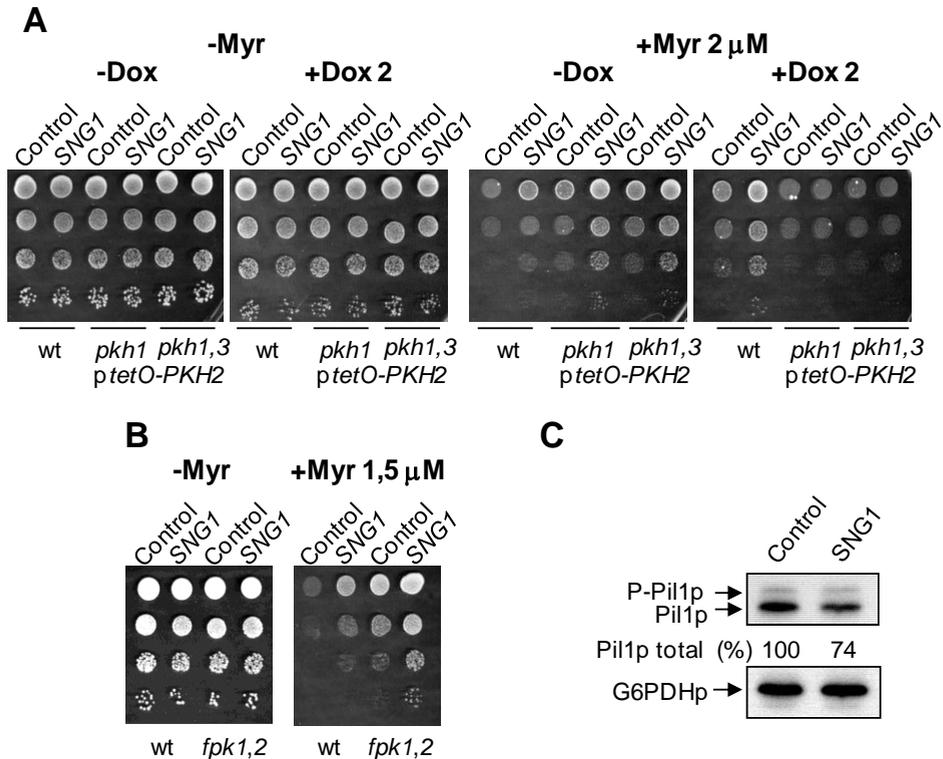
*S. cerevisiae* presenta tres alelos diferentes con actividad Pkh, *PKH1-3* (<http://yeastgenome.org>). Por ello, se procedió a examinar el comportamiento de las cepas *pkh1,3* $\Delta$  *ptetO-PKH2* y *pkh1,3* $\Delta$  *ptetO-PKH2*, en las que, el promotor del gen *PKH2* había sido reemplazado por un promotor sensible a doxiciclina (*ptet0*). Como se muestra en la Fig. 41A (panel derecho), la sobreexpresión de *SNG1* estimuló el crecimiento celular en presencia de miriocina, tanto en la cepa parental como en las mutantes. Sin embargo, al reducir la expresión del gen *PKH2* por adición de doxiciclina a una concentración inocua para el crecimiento (Fig. 41A,

panel izquierdo), las células mutantes resultaron insensibles a la sobreexpresión de *SNG1* (Fig. 41A, panel derecho). Así, el resultado sugiere la necesidad de un módulo Pkh-Fpk totalmente funcional para obtener el efecto mediado por *SNG1*.

Para profundizar en esta hipótesis, se analizó el efecto de la sobreexpresión de *SNG1* en un doble mutante *fpk1Δ fpk2Δ* (Fig. 41B). Las células del doble mutante transformadas con un plásmido vacío, fueron más resistentes a miriocina que las silvestres. Además, para nuestra sorpresa, la sobreexpresión de *SNG1* en dichos mutantes mejoró el crecimiento a la concentración de miriocina ensayada (Fig. 41B), sugiriendo que el efecto de Sng1p no depende de la actividad Fpk.

Posteriormente, se examinó el estado de fosforilación de Pil1p en células sobreexpresantes para *SNG1*, ya que esta proteína ha sido descrita como sustrato de Pkh (Zhang y col., 2004). Mediante Western blot se analizaron extractos proteicos de células que expresan una versión marcada con HA de Pil1p. Coincidiendo con datos previos de otros autores, la proteína fue resuelta en dos bandas mayoritarias (Fig. 41C) (Luo y col., 2008). Se ha descrito que la fosforilación del residuo S273 por las Pkhs es responsable del cambio de movilidad que da lugar a la banda superior (Walther y col., 2007). Como se aprecia en la Fig. 41C no se observan diferencias en la abundancia relativa de la banda fosforilada debidas a la sobreexpresión de *SNG1*. Sin embargo, se detectó un descenso en el nivel total de Pil1p, en torno a un 74% del observado en la cepa control (Fig. 41C). Obtuvimos resultados similares al repetir estos experimentos con la proteína Pil1 marcada con 13xmyc (datos no mostrados). Así, nuestros datos sugieren, que un nivel elevado de Sng1p

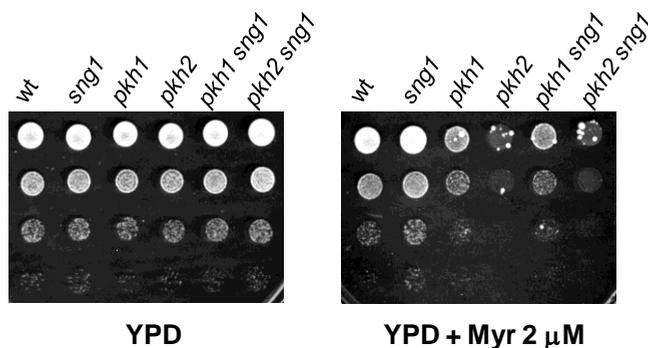
afecta negativamente al contenido en Pil1p lo que podría desestructurar los eisosomas y regular a la baja la actividad de las flipasas de la membrana.



**Fig. 41. SNG1 altera la actividad Pkh.** A) crecimiento en presencia y ausencia de 2  $\mu$ M de miriocina y 2  $\mu$ g/ml de doxiciclina de transformantes pFL44 (Control) y pFL44-SNG1yEGFP (*SNG1*) de la cepa parental CML476 *pkh1 ptetO-PKH2* y *pkh1,3 ptetO-PKH2*. B) Se gotearon suspensiones de células de las cepas KKT342 (wt) y KKT344 (*fpk1,2*) en placas con miriocina (1,5  $\mu$ M) y se incubaron a 30°C. C) Western blot de extractos proteicos de transformantes pFL44 (Control) y pFL44-SNG1yEGFP (*SNG1*) de la cepa BY4741 en los que *PIL1* ha sido etiquetado con 3HA. Los valores corresponden al contenido relativo total de Pil1p total (suma de la intensidad de la banda superior e inferior). Los niveles de

intensidad se normalizaron respecto a los valores correspondientes de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) y se asignó el valor 100 al más alto.

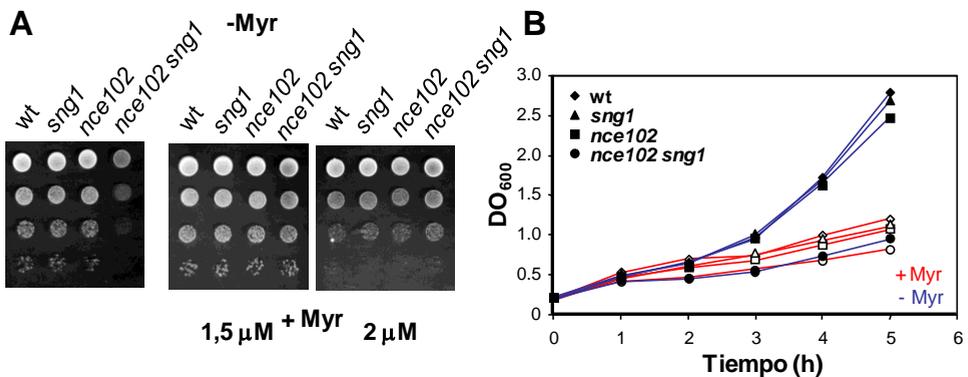
Por último, examinamos el efecto de la delección de *SNG1* en la actividad *pkh*. Como se observa en la Fig. 42, la pérdida de Sng1p aumentó la resistencia a miriocina, en comparación con la cepa silvestre BY4741 (Fig. 42), pero el efecto fue más débil que el mostrado por la sobreexpresión de *SNG1* (Fig. 40). Sin embargo, no se obtuvo mejora alguna en el caso de los dobles mutantes *pkh1Δ sng1Δ* o *pkh2Δ sng1Δ* (Fig. 42), sugiriendo de nuevo, que el efecto de Sng1p está mediado, al menos en parte, por un cambio en la actividad Pkh.



**Fig. 42. La delección de *SNG1* mejora ligeramente el crecimiento en miriocina de *S. cerevisiae* y este efecto parece depender de la actividad *pkh*.** Células de la cepa parental BY4741 (wt) y de sus correspondientes mutantes *sng1Δ*, *pkh1Δ*, *pkh2Δ*, *pkh1Δ sng1Δ* y *pkh2Δ sng1Δ* fueron inoculadas en placas control de medio YPD o en el mismo medio conteniendo miriocina e incubadas a 30°C durante 2 días.

#### 4.9.- La delección combinada de los genes *NCE102* y *SNG1* revela una interacción genética del tipo enfermo-sintética

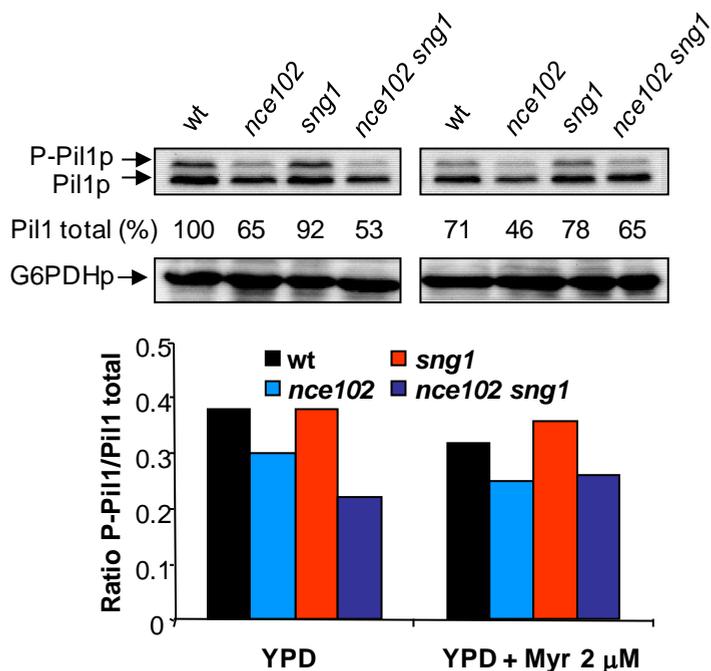
Para estudiar la interacción entre *SNG1* y *NCE102* se llevó a cabo la delección de *SNG1* en una cepa *nce102Δ* y se analizó su crecimiento en diferentes condiciones. Para nuestra sorpresa, el doble mutante mostró un severo defecto de crecimiento tanto en placas de YPD como en medio líquido (Fig. 43B) sugiriendo que *NCE102* y *SNG1* tienen lo que se llama una relación “enfermo-sintética – *synthetic sickness*”, es decir, cuando cualquiera de ellos se deleciona la célula parece responder normalmente y sólo cuando ambos genes se interrumpen se produce una reducción drástica en la vitalidad celular. Cabe resaltar que, la adición de miriocina al medio, rescató el defecto de crecimiento del doble mutante (Fig. 43A, panel derecho; Fig. 43B línea roja). En estas condiciones, todas las cepas se comportaron de manera similar (Fig. 43A). Así, nuestros resultados sugieren que Nce102p y Sng1p podrían regular una diana común en respuesta a variaciones en los niveles de esfingolípidos.



**Fig. 43. *NCE102* y *SNG1* presentan una interacción genética del tipo enfermo-sintética.** A) Crecimiento en presencia de miriocina (Myr) de células de

la cepa BY4741 (wt) y de sus correspondientes mutantes *sng1Δ*, *nce102Δ* y *nce102Δ sng1Δ*. B) curva de crecimiento en medio YPD líquido (DO<sub>600</sub> inicial = 0,2) en presencia (rojo) o ausencia (azul) de miriocina (2 μM).

De acuerdo a esto, se analizó el nivel de Pil1p y sus formas fosforiladas en células de las cepas mutantes ya mencionadas (Fig. 44). Se ha descrito que, Nce102p afecta negativamente a la fosforilación de Pil1p, ya que inhibe la actividad Pkh (Frölich y col., 2009). Por esto, era de esperar que la delección de *NCE102* aumentara la cantidad de fosfo-Pil1p. Sin embargo, fuimos incapaces de observar dicho efecto. En contraste, las células del mutante *nce102Δ* crecidas en YPD mostraron un contenido en fosfo-Pil1p menor (ver gráfica). Más aún, el contenido total de Pil1p estaba notablemente reducido. Por otro lado, la delección de *SNG1* no tuvo efecto, pero combinada con la de *NCE102* redujo aún más el contenido en Pil1p y la abundancia relativa de las especies fosforiladas en la serina 273 (banda superior), respecto a la cepa *nce102Δ* (Fig. 41C). También se examinaron extractos proteicos de células tratadas con miriocina. En presencia de este inhibidor, los patrones de fosforilación de Pil1p fueron más similares entre cepas que en el caso anterior (Fig. 44). Así, los resultados sugieren que Sng1p y Nce102p son homólogos funcionales en la regulación negativa de la actividad Pkh y de la actividad flipasa.



**Fig. 44. La delección combinada de *SNG1* y *NCE102* disminuye el contenido total de Pil1p.** Western blot de extractos de proteínas de la cepa BY4741 (wt) y de sus correspondientes mutantes *sng1* $\Delta$ , *nce102* $\Delta$  y *nce102* $\Delta$  *sng1* $\Delta$ , en las que el gen *PIL1* ha sido etiquetado con 3HA. Los valores de Pil1 total (%) corresponden al contenido relativo de Pil1p, tal y como se describió en la Fig. 41C. La gráfica muestra la abundancia relativa de la especie fosforilada S273 (banda superior) respecto al total de Pil1p (banda superior + inferior).

## Discusión

En este trabajo se han identificado nuevos supresores de la sensibilidad a baja temperatura en *S. cerevisiae*. Ya que las permeasas de nutrientes son esenciales para el crecimiento en frío de cepas auxótrofas de laboratorio, se esperaba que esta aproximación identificara, entre otros, genes involucrados en regular el repertorio y actividad de las proteínas de membrana. De hecho, se aislaron tres genes poco caracterizados, *ALY2*, *CAJ1* y *UBP13*, como responsables de conferir mejoras en el crecimiento a 12°C. De ellos, sólo *ALY2* ha sido recientemente estudiado en profundidad (Hatakeyama, y col., 2010; O'Donnell y col., 2010). De acuerdo con estas publicaciones, la  $\alpha$ -arrestina Aly2p media la endocitosis de Dip5p (Hatakeyama, y col., 2010) y regula el tráfico de Gap1p en respuesta a la señalización por nutrientes (O'Donnell y col., 2010). Nuestros datos aportan nueva información, ya que la sobreexpresión de Aly2p es capaz de modular la abundancia tanto de Gap1p como de Tat2p en respuesta a frío. Según nuestro análisis, no sólo Aly2p es importante en la tolerancia a bajas temperaturas, sino también Caj1p y Ubp13p que forman parte o están relacionadas con la actividad de la maquinaria de ubiquitilación. Este proceso controla el tráfico de proteínas de membrana en levadura, con la ligasa de ubiquitina Rsp5p como principal elemento de dicho sistema regulador. Nuestro estudio demuestra que las permeasas de triptófano, especialmente Tat2p, pero también otros transportadores como Gap1p, están regulados a la baja ante un descenso de la temperatura ambiental y su nivel está controlado por Rsp5p. Es más, demostramos que la sobreexpresión de *ALY2* inhibe la endocitosis de transportadores en respuesta a un descenso de temperatura.

Por otro lado, aportamos evidencias de una posible regulación del transporte de maltosa por parte de *ALY2* y *UBP13*, ya que su sobreexpresión en la cepa vínica QA23 mejora el crecimiento a 12°C utilizando maltosa como fuente de carbono. No se observó mejoría en el caso de la sobreexpresión de *CAJ1*, lo que sugiere que esta proteína debe regular otra diana diferente.

Futuros estudios son necesarios para entender y aclarar el mecanismo exacto de supresión ejercido por Aly2p, Caj1p y Ubp13p. Debido a la constante descripción de genes involucrados en la regulación del transporte en la membrana plasmática, cabe esperar que aún sean identificados nuevos supresores del fenotipo en frío. Esto podría ayudar a dilucidar la maquinaria exacta que opera a bajas temperaturas e identificar nuevos candidatos con capacidad para incrementar el crecimiento bajo tales condiciones restrictivas.

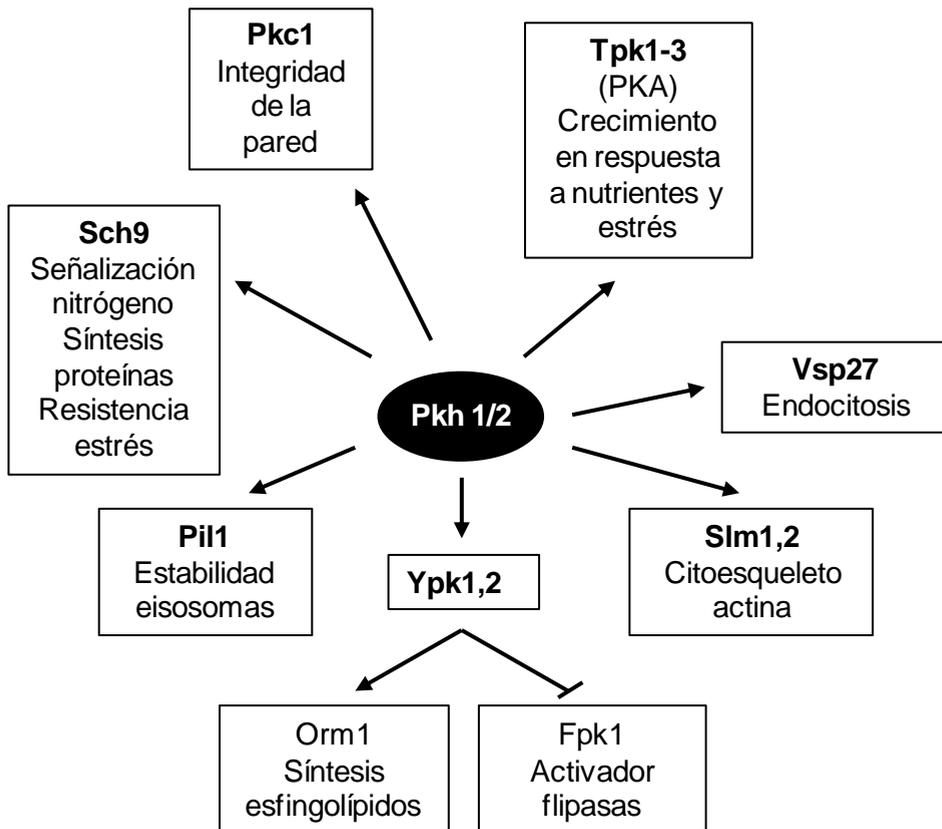
Además, en este trabajo se identificó otro gen, *SNG1* cuya actividad modula las propiedades funcionales de la membrana plasmática. Esta proteína de membrana había sido implicada en la resistencia al mutágeno N-metil-N'nitro-N-nitrosoguanidina (Grey y col., 1995) y al inhibidor del crecimiento 6-azauracilo (García-López y col., 2010). Aunque en nuestro estudio no se investigaron los mecanismos subyacentes a dichos efectos, es posible que el cambio en las propiedades de la membrana causado por Sng1p, pueda afectar a la capacidad de la célula para internalizar o eliminar estos compuestos modificando así su efecto tóxico. En este trabajo, hemos demostrado que Sng1p interacciona con rafts lipídicos, modula la fluidez de la membrana y afecta a la actividad de proteínas ancladas a ella, generando tolerancia a frío. Por lo tanto, parece

desempeñar funciones que tienen efectos globales en la organización de la membrana plasmática.

En este sentido, nuestros resultados revelaron que Sng1p puede tener un papel en la regulación de la actividad de las proteína quinasas Pkh1-3p. Éstas, controlan, entre otras dianas, la actividad de las flipasas de membrana Dnf1p y Dnf2p (Nakano y col., 2008), la fosforilación de Pil1p (Zhang y col., 2004) desestabilizando los eisosomas y estimulan la ruta de integridad de la pared celular (Friant y col., 2001) (Fig. 45).

Como hemos mostrado, la sobreexpresión de *SNG1* confiere resistencia a miriocina, propiedad que ha sido relacionada con un aumento en la actividad Pkh (Roelants y col., 2010). Estudios previos han descrito que el funcionamiento de las proteína quinasas Pkh1-3p activa a Ypk1,2p las cuales a su vez inhiben la actividad de Fpk1,2p, reduciendo finalmente la translocación de aminofosfolípidos catalizada por Dnf1,2p (Nakano y col., 2008; Roelants y col., 2010). La reducción en la actividad flipasa, permite a las levaduras lidiar con el descenso en la biosíntesis de esfingolípidos, causada por la exposición a miriocina (Roelants y col., 2010). Es decir, la asimetría fosfolípida parece depender de la de los esfingolípidos y esta a su vez, de su contenido. Condiciones que reducen el nivel de esfingolípidos, p.e. limitación de nutrientes, condiciones de estrés, etc., tenderán por tanto a relajar la distribución asimétrica de aminofosfolípidos mediada por el modulo Pkh-Fpk y catalizada por Dnf1,2p. En efecto, nuestros resultados indican, que la tolerancia a miriocina propocionada por la sobreexpresión de *SNG1* depende de la actividad Pkh. Así, la sobreexpresión de *SNG1*, en células *pkh1,3Δ ptetO-PKH2*, alivia el defecto de crecimiento en presencia de miriocina y doxiciclina, siempre que exista actividad residual de Pkh. Este resultado

apoya la idea de que Sng1p estimula dicha actividad. Sin embargo, la tolerancia a miriocina no resultó dependiente de la actividad de Fpk1,2p, indicando que las proteína quinasas Pkh1-3p podrían inhibir la actividad flipasa por una vía alternativa. Por otro lado, células con alto número de copias de *SNG1* presentan más PS en la cara externa de la membrana plasmática, una evidencia de una menor actividad flipasa.



**Fig. 45. Las proteína quinasas Pkh1,2 participan en diferentes procesos.** Esquema de proteínas fosforiladas por las Pkhs.

La delección de *DRS2* reduce el crecimiento a 12°C y causa la pérdida de asimetría de PS en la membrana (Hua y col., 2002; Chen y col., 2006; Baldrige y Graham, 2012). Al contrario de lo que ocurre con *drs2Δ*, la pérdida de las flipasas Dnf1p y Dnf2p o de sus reguladores positivos Fpk1p y Fpk2p produce tolerancia a bajas temperaturas. Mientras que Drs2p transloca preferentemente PS (Zhou y Graham, 2009), Dnf1,2p translocan preferentemente PE (Pomorski y col., 2003). Así, parece que la inhibición en la translocación de PS o PE tiene efectos opuestos en el crecimiento a 12°C. En concordancia con esto, la sobreexpresión de *SNG1* inhibe la actividad flipasa de Dnf1,2p y alivia el defecto de crecimiento de *drs2Δ* en frío. Recientemente se ha descrito la regulación de la localización de Tat2p en la membrana plasmática, en función de la asimetría de fosfolípidos. En su estudio, Hachiro y col. (2013) proponen un modelo según el cual, cuando el nivel de PS en la cara interna de la membrana es elevado, el extremo N-terminal de Tat2p se une a este fosfolípido, bloqueando el sitio de unión de la ubiquitina. Sin embargo, cuando el nivel de PS es bajo, como cuando desciende la actividad flipasa, Tat2p es ubiquitilada y transportada a la vacuola. Así, cambios en la asimetría de fosfolípidos, inducidos por una bajada de la temperatura, podrían regular el proceso de endocitosis y afectar al repertorio de proteínas de la membrana plasmática.

No obstante, nuestros resultados no permitieron detectar un cambio en el contenido de Tat1p o Tat2p debido a la sobreexpresión de Sng1p. Así, una alternativa sería que el cambio en la asimetría de aminofosfolípidos afecte al microambiente lipídico entorno a transportadores, enzimas o efectores embebidos en la membrana y que éste a su vez modifique la actividad de aquellos, p.e. el transporte de

triptófano o la síntesis de quitina. Es probable también que el fenotipo de sensibilidad a frío del mutante *drs2Δ* esté más ligado a su papel en el transporte entre el RE y el aparato de Golgi que a su efecto en la exposición de PS en la membrana plasmática. De hecho este mutante muestra también un incremento significativo en la exposición de otros aminofosfolípidos y en concreto de PE. No obstante, necesitamos profundizar en el papel funcional de la asimetría de fosfolípidos de membrana en la respuesta a frío y de la actividad flipasa como catalizador de estos cambios.

Otra evidencia de la participación de Sng1p en la regulación del módulo de proteínas quinasa Pkh-Ypk fue la interacción detectada de esta proteína con Nce102p. Nuestros resultados demuestran una relación genética enfermo-sintética entre ambos genes, que es evidente en situaciones de crecimiento en condiciones óptimas. Sin embargo, en aquellas situaciones que implican una tasa de crecimiento menor por la adición de miriocina, blanco de calcofluor o a temperaturas por debajo de la óptima, no se observó diferencias entre el doble mutante *nce102Δ sng1Δ* y la cepa silvestre. Además, la ausencia de Nce102p redujo tanto la cantidad total de Pil1p, como la abundancia relativa de su especie fosforilada y el efecto fue exacerbado por la pérdida de ambas proteínas, Nce102p y Sng1p. Estos resultados fueron inesperados ya que en el estudio de Frölich y col. (2009) se describe la hiperfosforilación de Pil1p en el mutante *nce102Δ*. Las diferencias podrían deberse a cambios en el procedimiento experimental, puesto que en su análisis utilizaron un abordaje que incluyó la purificación de la proteína y la cuantificación de sus diferentes isoformas mediante espectrometría de masas. En nuestro estudio, Pil1p fue examinada mediante Western blot de extractos celulares.

En este punto, quedaría por aclarar si Sng1p, igual que Nce102p, forma parte de un sistema sensor del nivel de esfingolípidos, dado su papel redundante en la regulación de la actividad Pkh. Nuestra hipótesis es que este es el caso y que la redundancia tendría como objeto asegurar la regulación de un módulo de proteínas quinasa que participa en procesos tan importantes como dispares, entre ellos la organización del esqueleto de actina, la integridad de la pared celular o la endocitosis. Esta duplicación no es en sí misma una sorpresa, pues todas las quinastas de la ruta presentan, al menos, un homólogo, *PKH1-3*, *YPK1,2*, *FPK1,2*, etc. Es más, varias proteínas reguladas por la actividad del módulo Pkh-Ypk-Fpk también se encuentran duplicadas, es el caso de Orm1p y Orm2p o de las propias flipasas Dnf1-3p. Esto no significa que Nce102p y Sng1p sean intercambiables. Por ejemplo, podemos imaginar un escenario en el que Nce102p inhiba la actividad Pkh mientras Sng1p actúa al nivel de las Ypk. También es posible que respondan a diferentes condiciones de estrés o de crecimiento, e incluso que regulen de forma específica la actividad del módulo frente a determinados sustratos. Es evidente pues la necesidad de nuevas investigaciones que nos permitan avanzar en nuestro conocimiento del papel funcional de esta ruta en la respuesta a frío, los elementos y mecanismos implicados en su regulación y los procesos que operan bajo su control.

# PERSPECTIVAS

---



En este trabajo de tesis nos hemos centrado en ampliar el conocimiento sobre la respuesta celular frente a estrés del RE o por exposición a bajas temperaturas. Cabe destacar que el estudio de la respuesta a estas situaciones es complejo y a menudo, cada resultado obtenido plantea nuevas preguntas.

Nuestros resultados inciden en la idea de que la MAP quinasa Hog1p responde a numerosas situaciones de estrés, incluyendo la acumulación de proteínas mal plegadas y modula respuestas a diferentes niveles, desde la transcripción a la modificación post-traducciona. En el presente trabajo, hemos presentado evidencias de que la actividad de Hog1p regula varios procesos citosólicos en respuesta a la exposición a tunicamicina, entre ellos el estado de fosforilación de Tdh3p y la recuperación de los niveles de traducción, aunque no hemos podido establecer datos sólidos sobre el papel funcional de estos cambios en la capacidad de supervivencia y adaptación de *S. cerevisiae* a este estrés y quizás a otros en los que sólo la actividad nuclear de Hog1p ha sido investigada.

En cuanto a la respuesta a bajas temperaturas, el rastreo realizado hace énfasis en la importancia de la maquinaria endocítica en la sensibilidad a frío de *S. cerevisiae* y desvela por primera vez la implicación de proteínas encargadas de regular el repertorio de proteínas de membrana y la organización asimétrica de lípidos.

Al llevar a cabo un rastreo en condiciones tan concretas como baja temperatura y la adición de fitoesfingosina, esperábamos aislar proteínas cuya función estuviera relacionada con la regulación de la estabilidad de la membrana plasmática. En este sentido, la identificación de una serie de genes implicados directa o indirectamente en el proceso de ubiquitilación y

por lo tanto en regular el repertorio de proteínas de la célula, ha validado la estrategia empleada y abre una vía para el estudio del papel de cada una de ellas en la endocitosis en levadura. Además, con este trabajo hemos aportado nuevos datos sobre el papel de ciertas proteínas en la regulación de la abundancia de permeasas de membrana. En concreto, nuestros resultados sugieren que la degradación específica de Tat2p, es la causa principal de la inhibición en el crecimiento observada a bajas temperaturas. La presencia de una mayor cantidad de esta permeasa, debido a la sobreexpresión de Aly2p, mejora la capacidad de la célula para crecer en estas condiciones. No obstante, no podemos descartar que estas proteínas actúen sobre otros transportadores no incluidos en nuestro análisis, por lo que, es necesario un estudio más amplio. Nos preguntamos también por qué la exposición a frío dispara la degradación de transportadores de nutrientes a favor de su biosíntesis y si esto supone una ventaja para *S. cerevisiae* en su lucha por adaptarse a temperaturas muy por debajo de la óptima de crecimiento.

En el caso de la identificación de Sng1p como supresor del fenotipo a bajas temperaturas y su relación con la actividad Pkh, se abren nuevos campos de investigación. Por un lado, que el efecto de la sobreexpresión de *SNG1* dependa de la actividad de las proteína quinasas Pkh1-3p, pero no de Fpk1,2p podría indicar una vía alternativa de regulación de la actividad flipasa, no descrita previamente. Por otro lado, nuestro análisis establece la interacción de Sng1p con Nce102p, su participación en la regulación de la actividad Pkh y como ésta afecta a la actividad flipasa. Queda por aclarar el posible papel de Sng1p como sensor del nivel de esfingolípidos junto con Nce102p y si, como se ha descrito para Nce102p, esta proteína se mueve entre diferentes micro-ambientes de la membrana

en relación al nivel de esfingolípidos. Por otra parte, nuestros resultados no revelan si Sng1p ejerce su función inhibidora a nivel de las Pkhs o de las Ypks y así, es posible que Sng1p y Nce102p pudieran tener diferentes substratos. También, es posible que dado el carácter pleiotrópico del modulo Pkh-Ypk, Sng1p y Nce102p regulen su actividad en respuesta a estímulos comunes, pero también específicos. Además, las proteínas Pkh1,2p están implicadas en procesos muy variados en los que sería interesante estudiar la posible intervención de Sng1p.

Por último, la observación de que la ausencia de las flipasas Dnf1,2p o de sus proteína quinasas reguladoras Fpk1,2p, estimula el crecimiento a 12°C, plantea la cuestión de si la regulación de la asimetría de aminofosfolípidos de membrana podría ser un mecanismo celular diseñado para contrarrestar, al menos en parte, los efectos negativos de una una rigidificación de los lípidos de membrana. Conviene recordar que un descenso de la temperatura ambiental, aumenta el contenido de ácidos grasos insaturados o de menor longitud de cadena, si bien estos cambios y otros descritos en la composición de clases y sub-clases de lípidos no son suficientes para explicar el comportamiento en frío de cepas tolerantes y sensibles de *S. cerevisiae*.



# CONCLUSIONES GENERALES

---



Los resultados descritos en este trabajo y su discusión posterior, han permitido extraer las siguientes conclusiones:

- La MAP quinasa Hog1p juega un papel esencial e independiente de la UPR en la supervivencia en condiciones de estrés del retículo endoplásmico provocado por su exposición a tunicamicina.
- La función nuclear de Hog1p en este estrés es prescindible, mientras que la citosólica es absolutamente necesaria. Ésta regula el incremento en la producción de glicerol, la regulación del estado de fosforilación de Tdh3p y la recuperación de los niveles de traducción.
- La sobreexpresión de *ALY2*, *UBP13* y *CAJ1* mejora el crecimiento a bajas temperaturas de *S. cerevisiae* de forma dependiente de la ubiquitín ligasa Rsp5p. La regulación del proceso de endocitosis y de la maquinaria de ubiquitilación es pues clave en la respuesta de este organismo a temperaturas por debajo de la óptima.
- Las proteínas Aly2p y Ubp13p participan en la regulación de la abundancia de los transportadores de aminoácidos Tat2p o Gap1p.
- Copias extra de los genes *ALY2* o *UBP13*, aumentan el crecimiento en frío de la cepa protótrofa QA23 cuando se utiliza maltosa como única fuente de carbono.
- La sobreexpresión de *SNG1* mejora el crecimiento a bajas temperaturas, aumenta la fluidez de la membrana plasmática y la cantidad de quitina de la pared celular.

- Un elevado número de copias de *SNG1* reduce la actividad flipasa, incrementa la exposición de aminofosfolípidos y la resistencia a miriocina, efectos que dependen de la actividad Pkh, pero no de la de las proteína quinasas Fpk1,2p
- *SNG1* muestra una interacción enfermo-sintética con *NCE102* regulando la actividad flipasa, vía el módulo de proteína quinasas Pkh-Ypk, en respuesta a condiciones que determinan una reducción en la biosíntesis de esfingolípidos.
- La asimetría de aminofosfolípidos de la membrana plasmática y su regulación parecen jugar un papel en el mantenimiento de sus propiedades en respuesta a un descenso de la temperatura ambiente.

# **BIBLIOGRAFÍA**

---



- Abe F. y Horikoshi K. (2000)** Tryptophan permease gene *TAT2* confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 20(21): 8093-8102.
- Abe F. y Iida H. (2003)** Pressure-induced differential regulation of the two tryptophan permeases Tat1 and Tat2 by ubiquitin ligase Rsp5 and its binding proteins, Bul1 and Bul2. *Molecular and Cellular Biology*. 23(21): 7566-7584.
- Aguilera J., Rodríguez-Vargas S. y col. (2005)** The HOG MAP kinase pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*. 56(1): 228-239.
- Aguilera J., Randoz-Gil F. y col. (2007)** Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: New functions for old mechanisms. *FEMS Microbiology Reviews*. 31(3): 327-341.
- Albertyn J., Hohmann S. y col. (1994)** *GPD1*, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 14(6): 4135-4144.
- Alepuz P.M., Jovanovic A. y col. (2001)** Stress-induced MAP Kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Molecular Cell*. 7(4): 767-777.
- Alepuz P.M., De Nadal E. y col. (2003)** Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO Journal*. 22(10): 2433-2442.
- Altschul S.F., Madden T.L. y col. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*. 25(17): 3389-3402.
- Alvarez C.E. (2008)** On the origins of arrestin and rhodopsin. *BMC Evolutionary Biology*. 8(1): 222.

- Amerik A.Y., Li S.J. y col. (2000)** Analysis of the deubiquitinating enzymes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biological Chemistry*. 381(9-10): 981-992.
- Ansell R., Granath K. y col. (1997)** The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO Journal*. 16(9): 2179-2187.
- Back S.H., Schröder M. y col. (2005)** ER stress signaling by regulated splicing: *IRE1/HAC1/XBP1*. *Methods*. 35(4): 395-416.
- Bagnat M., Keränen S. y col. (2000)** Lipid rafts function in biosynthetic delivery of proteins to the cell surface in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(7): 3254-3259.
- Baldridge R.D. y Graham T.R. (2012)** Identification of residues defining phospholipid flippase substrate specificity of type IV P-type ATPases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109(6): E290-E298.
- Bechet J., Greenson M. y col. (1970)**. Mutations affecting the repressibility of arginine biosynthetic enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*. 12(1): 31-9.
- Beck T., Schmidt A. y col. (1999)** Starvation induces vacuolar targeting and degradation of the tryptophan permease in yeast. *Journal of Cell Biology*. 146(6): 1227-1237.
- Belgareh-Touzé N., Léon S. y col. (2008)** Versatile role of the yeast ubiquitin ligase Rsp5p in intracellular trafficking. *Biochemical Society Transactions*. 36(5): 791-796.
- Bell y Engelberg (2003)** Phosphorylation of Tyr-176 of the yeast MAPK Hog1/p38 is not vital for Hog1 biological activity. *The Journal of biological chemistry*. 278(17): 14603-6.
- Beltran G., Novo M. y col. (2006)** Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Research*. 6(8): 1167-1183.

- Bermejo C., Rodríguez E. y col. (2008)** The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Molecular Biology of the Cell*. 19(3): 1113-1124.
- Bicknell A.A., Tourtellotte J. y col. (2010)** Late phase of the endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *Journal of Biological Chemistry*. 285(23): 17545-17547.
- Bimboim H.C. y Doly J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. 7(6): 1513-1523.
- Blomberg A. (2002)** Use of two dimensional gels in yeast proteomics. *Methods in Enzymology*. 350: 559-584.
- Bolen D.W. (2001)** Protein stabilization by naturally occurring osmolytes. *Methods in molecular biology*. 168: 17-36.
- Bolen D.W. y Rose G.D. (2008)** Structure and energetics of the hydrogen-bonded backbone in protein folding. *Annual Review of Biochemistry*. 77: 339-362.
- Bonilla M., Nastase K.K. y col. (2002)** Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO Journal*. 21(10): 2343-2353.
- Bonilla M. y Cunningham K.W. (2003)** Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca<sup>2+</sup> signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 14(10): 4296-4305.
- Bultynck G., Heath V.L. y col. (2006)** Slm1 and Slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Molecular and Cellular Biology*. 26(12): 4729-4745.
- Cabib E. (2004)** The septation apparatus, a chitin-requiring machine in budding yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 426(2): 201-207.
- Cao-Hoang L., Dumont, F. y col. (2008)** Rates of chilling to 0 degrees C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 77: 1379-1387.

- Carlson M. y Botstein D. (1982)** Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell*. 28: 145-154.
- Chapman R., Sidrauski C. y col. (1998)** Intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 14: 459-485.
- Chen C.Y., Ingram M.F. y col. (1999)** Role for Drs2p, a P-type ATPase and potential aminophospholipid translocase, in yeast late Golgi function. *Journal of Cell Biology*. 147(6): 1223-1236.
- Chen S., Wang J. y col. (2006)** Roles for the Drs2p-Cdc50p complex in protein transport and phosphatidylserine asymmetry of the yeast plasma membrane. *Traffic*. 7(11): 1503-1517.
- Chen Y., Feldman D.E. y col. (2005)** Identification of Mitogen-Activated Protein Kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Cancer Research*. 3(12): 669-677.
- Chung N., Jenkins G. y col. (2000)** Sphingolipids signal heat stress-induced ubiquitin-dependent proteolysis. *Journal of Biological Chemistry*. 275(23): 17229-17232.
- Cohen T.J., Mallory M.J. y col. (2008)** Hos2p/Set3p deacetylase complex signals secretory stress through the Mpk1p cell integrity pathway. *Eukaryotic Cell*. 7(7): 1191-1199.
- Contreras F.X., Ernst A.M. y col. (2011)** Specificity of intramembrane protein-lipid interactions. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 3: a004705.
- Cox J.S. y Walter P. (1996)** A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. *Cell*. 87(3): 391-404.
- Cvrcková F., De Virgilio C. y col. (1995)** Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes and Development*. 9: 1817-1830.

- Cyert M.S. y Thorner J. (1992)** Regulatory subunit (*CNB1* gene product) of yeast  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Molecular and Cellular Biology*. 12: 3460–3469.
- Cyert M.S. (2003)** Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: How yeast go crazy in response to stress. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 311(4): 1143-1150.
- Daicho K., Makino N. y col. (2009)** Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant. *FEMS Microbiology Letters*. 298(2): 218-227.
- De Craene J.O., Soetens O. y col. (2001)** The Npr1 Kinase controls biosynthetic and endocytic sorting of the yeast Gap1 permease. *Journal of Biological Chemistry*. 276(47): 43939-43948.
- De Nadal E., Zapater M. y col. (2004)** The MAPK Hog1 recruits Rpd3 histone deacetylase to activate osmoresponsive genes. *Nature*. 427(6972): 370-374.
- Delic M., Valli M. y col. (2013)** The secretory pathway: exploring yeast diversity. *FEMS Microbiology Reviews*. 37(6): 872-914.
- Dickson R.C., Nagiec E.E. y col. (1997)** Sphingolipids are potential heat stress signals in *Saccharomyces*. *Journal of Biological Chemistry*. 272(48): 30196-30200.
- Dihazi H., Kessler R. y col. (2004)** High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation and activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation and yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. *Journal of Biological Chemistry*. 279(23): 23961-23968.
- Donahue T.F. y Henry S.A. (1981)** Myo-Inositol-1-phosphate synthase. Characteristics of the enzyme and identification of its structural gene in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 256(13): 7077-7085.
- Dunand-Sauthier I., Walker C.A. y col. (2005)** Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryotic Cell*. 4(11): 1785-1793.

- Emoto K. y Umeda M. (2000)** An essential role for a membrane lipid in cytokinesis: Regulation of contractile ring disassembly by redistribution of phosphatidylethanolamine. *Journal of Cell Biology*. 149(6): 1215-1224.
- Ferrigno P., Posas F. y col. (1998)** Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of *HOG1* MAPK requires the importin  $\beta$  homologs *NMD5* and *XPO1*. *EMBO Journal*. 17(19): 5606-5614.
- Foiani M., Cigan A.M. y col. (1991)** *GCD2*, a translational repressor of the *GCN4* gene, has a general function in the initiation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*. 11(6): 3203-3216.
- Friant S., Lombardi R. y col. (2001)** Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO Journal*. 20(23): 6783-6792.
- Fröhlich F., Moreira K. y col. (2009)** A genome-wide screen for genes affecting eisosomes reveals Nce102 function in sphingolipid signaling. *Journal of Cell Biology*. 185(7): 1227-1242.
- Galan J.M., Moreau V. y col. (1996)**. Ubiquitination mediated by the Npi1p/Rsp5p ubiquitin-protein ligase is required for endocytosis of the yeast uracil permease. *Journal of Biological Chemistry*. 271: 10946–10952.
- García-López M., Mirón-García M. y col. (2010)** Overexpression of *SNG1* causes 6-azauracil resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*. 56(3): 251-263.
- García-Rodríguez L.J., Durán A. y col. (2000)** Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: Evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *Journal of Bacteriology*. 182(9): 2428-2437.
- Gietz R.D. y Sugino A. (1988)** New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*. 74(2): 527-534.
- Goffeau A.B.B., Bussey H, y col. (1997)** Life with 6000 genes. *Science*. 274(5287): 546, 563-547.

- Goldstein A.L. y McCusker J.H. (1999)** Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 15(14): 1541-1553.
- Graham T.R. (2004)** Flippases and vesicle-mediated protein transport. *Trends in Cell Biology*. 14(12): 670-677.
- Gregg C., Kyryakov P. y col. (2009)** Purification of mitochondria from yeast cells. *Journal of Visualized Experiments*. (30).
- Grey M., Pich C.T. y col. (1995)** *SNG1* - A new gene involved in nitrosoguanidine resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation Research - Mutation Research Letters*. 346(4): 207-214.
- Grossmann G., Opekarová M. y col. (2007)** Membrane potential governs lateral segregation of plasma membrane proteins and lipids in yeast. *EMBO Journal*. 26(1): 1-8.
- Grossmann G., Malinsky J. y col. (2008)** Plasma membrane microdomains regulate turnover of transport proteins in yeast. *Journal of Cell Biology*. 183(6): 1075-1088.
- Gustin M.C., Albertyn J. y col. (1998)** Map kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62(4): 1264-1300.
- Hachiro T., Yamamoto T. y col. (2013)** Phospholipid flippases Lem3p-Dnf1p and Lem3p-Dnf2p are involved in the sorting of the tryptophan permease Tat2p in yeast. *Journal of Biological Chemistry*. 288(5): 3594-3608.
- Harding H.P., Zhang Y. y col. (1999)** Erratum: Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*. 398(6722): 90.
- Hatakeyama R., Kamiya M. y col. (2010)** Endocytosis of the aspartic acid/glutamic acid transporter Dip5 is triggered by substrate-dependent recruitment of the Rsp5 ubiquitin ligase via the arrestin-like protein Aly2. *Molecular and Cellular Biology*. 30(24): 5598-5607.

- Hein C., Springael J.Y. y col. (1995)** *NPI1*, an essential yeast gene involved in induced degradation of Gap1 and Fur4 permeases, encodes the Rsp5 ubiquitin—protein ligase. *Molecular Microbiology*. 18(1): 77-87.
- Hicke L. y Dunn R. (2003)** Regulation of membrane protein transport by ubiquitin and ubiquitin-binding proteins. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 19: 141-172.
- Hohmann S. (2009)** Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 583(24): 4025-4029.
- Hua Z., Fatheddin P. y col. (2002)** An essential subfamily of Drs2p-related P-type ATPases is required for protein trafficking between Golgi complex and endosomal/vacuolar system. *Molecular Biology of the Cell*. 13(9): 3162-3177.
- Huibregtse J.M., Scheffner M. y col. (1995)** A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 92(7): 2563-2567.
- Inouye M. y Phadtare S. (2004)** Cold shock response and adaptation at near-freezing temperature in microorganisms. *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*. (237).
- Jacoby T., Flanagan H. y col. (1997)** Two protein-tyrosine phosphatases inactivate the osmotic stress response pathway in yeast by targeting the mitogen-activated protein kinase, Hog1. *Journal of Biological Chemistry*. 272(28): 17749-17755.
- Kampinga H.H. y Craig E.A. (2010)** The HSP70 chaperone machinery: J proteins as drivers of functional specificity. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 11(8): 579-592.
- Kim S. y Shah K. (2007)** Dissecting yeast Hog1 MAP kinase pathway using a chemical genetic approach. *FEBS Letters*. 581(6): 1209-1216.
- Kimura Y. y Tanaka K. (2010)** Regulatory mechanisms involved in the control of ubiquitin homeostasis. *Journal of Biochemistry*. 147(6): 793-798.

- Kohno K. (2007)** How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress. *Antioxidants and redox signaling*. 9(12): 2295–2303.
- Krysan D.J. (2009)** The cell wall and endoplasmic reticulum stress responses are coordinately regulated in *Saccharomyces cerevisiae*. *Communicative and Integrative Biology*. 2(3): 233-235.
- Kumar R. (2009)** Role of naturally occurring osmolytes in protein folding and stability. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 491(1-2): 1-6.
- Lauwers E., Erpapazoglou Z. y col. (2010)** The ubiquitin code of yeast permease trafficking. *Trends in Cell Biology*. 20(4): 196-204.
- Lawrence C.L., Botting C.H. y col. (2004)** Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Molecular and Cellular Biology*. 24(8): 3307-3323.
- Levin D.E. (2005)** Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 69(2): 262-291.
- Lin C.H., MacGurn J.A. y col. (2008)** Arrestin-related ubiquitin-ligase adaptors regulate endocytosis and protein turnover at the cell surface. *Cell*. 135(4): 714-725.
- Lin J.H., Li H. y col. (2007)** *IRE1* signaling affects cell fate during the unfolded protein response. *Science*. 318(5852): 944-949.
- Lingwood D. y Simons K. (2010)** Lipid rafts as a membrane-organizing principle. *Science*. 327(5961): 46-50.
- Longtine M. S., McKenzie, A. y col. (1998)** Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14: 953-961.
- López-Malo M., Querol A. y col. (2013)** Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS ONE*. 8(3).
- López-Marqués R.L., Holthuis J.C.M. y col. (2011)** Pumping lipids with P4-ATPases. *Biological Chemistry*. 392(1-2): 67-76.

- Los D.A. y Murata N. (2004)** Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochimica et Biophysica Acta – Biomembranes*. 1666(1-2): 142-157.
- Lucero P. y Lagunas R. (1997)** Catabolite inactivation of the yeast maltose transporter requires ubiquitin-ligase Npi1/Rsp5 and ubiquitin-hydrolase Npi2/Doa4. *FEMS Microbiology Letters*. 147(2): 273-277.
- Luo G., Gruhler A. y col. (2008)** The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *Journal of Biological Chemistry*. 283(16): 10433-10444.
- Macia J., Regot S. y col. (2009)** Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Science Signaling*. 2(63).
- Maeda T., Wurgler-Murphy S.M. y col. (1994)** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*. 369(6477): 242-245.
- Malínská K., Malínský J. y col. (2003)** Visualization of protein compartmentation within the plasma membrane of living yeast cells. *Molecular Biology of the Cell*. 14(11): 4427-4436.
- Malinska K., Malinsky J. y col. (2004)** Distribution of Can1p into stable domains reflects lateral protein segregation within the plasma membrane of living *S. cerevisiae* cells. *Journal of Cell Science*. 117(25): 6031-6041.
- Marchler-Bauer A., Anderson J.B. y col. (2009)** CDD: Specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Research*. 37(1): D205-D210.
- Martínez-Pastor M.T., Marchler G. y col. (1999)** The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress-response element (STRE). *EMBO Journal*. 15(9): 2227-2235.
- Matheos D.P., Kingsbury T.J. y col. (1997)** Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes and Development*. 11(24): 3445-3458.

- Mattison C.P. y Ota I.M. (2000)** Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes and Development*. 14: 1229-1235.
- McGraw P. y Henry S.A. (1989)** Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* *OPI3* gene: effects on phospholipid methylation, growth and cross-pathway regulation of inositol synthesis. *Genetics*. 122(2): 317-330.
- Miura T. y Abe F. (2004)** Multiple ubiquitin-specific protease genes are involved in degradation of yeast tryptophan permease Tat2 at high pressure. *FEMS Microbiology Letters*. 239(1): 171-179.
- Miyake Y., Kozutsumi Y. y col. (1995)** Serine palmitoyltransferase is the primary target of a sphingosine-like immunosuppressant, *ISP-1/myriocin*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 211(2): 396-403.
- Mori K., Kawahara T. y col. (1996)** Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: Transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes to Cells*. 1(9): 803-817.
- Mori K., Ogawa N. y col. (2000)** mRNA splicing-mediated C-terminal replacement of transcription factor Hac1p is required for efficient activation of the unfolded protein response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 97(9): 4660-4665.
- Mori T., Ogasawara C. y col. (2010)** Dual functions of yeast tRNA ligase in the unfolded protein response: Unconventional cytoplasmic splicing of *HAC1* pre-mRNA is not sufficient to release translational attenuation. *Molecular Biology of the Cell*. 21(21): 3722-3734.
- Mukai H., Shuntoh H. y col. (1994)** Isolation and characterization of *CAJ1*, a novel yeast homolog of dnaJ. *Gene*. 145(1): 125-127.
- Mukhopadhyay D. y Riezman H. (2007)** Proteasome-independent functions of ubiquitin in endocytosis and signaling. *Science*. 315(5809): 201-205.
- Murata Y., Homma T. y col. (2006)** Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4°C. *Extremophiles*. 10(2): 117-128.

- Muthusamy B.P., Natarajan P. y col. (2009)** Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*. 1791(7): 612-619.
- Nagayama A., Kato C. y col. (2004)** The N- and C-terminal mutations in tryptophan permease Tat2 confer cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* under high-pressure and low-temperature conditions. *Extremophiles*. 8(2): 143-149.
- Nakagawa Y., Sakumoto N. y col. (2002)** Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 291(3): 707-713.
- Nakano K., Yamamoto T. y col. (2008)** Protein kinases Fpk1p and Fpk2p are novel regulators of phospholipid asymmetry. *Molecular Biology of the Cell*. 19(4): 1783-1797.
- Natarajan P., Wang J. y col. (2004)** Drs2p-coupled aminophospholipid translocase activity in yeast Golgi membranes and relationship to in vivo function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101(29): 10614-10619.
- Nevoigt E., Kohnke J. y col. (2006)** Engineering of promoter replacement cassettes for fine-tuning of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 72(8): 5266-5273.
- Nevoigt E. (2008)** Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 72(3): 379-412.
- Niederacher D. y Entian K.D. (1987)** Isolation and characterization of the regulatory *HEX2* gene necessary for glucose repression in yeast. *MGG Molecular & General Genetics*. 206(3): 505-509.
- Novick P., Ferro S. y col (1981)** Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell*. 25: 461-469.

- Odani M., Komatsu Y. y col. (2003)** Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Cryobiology*. 47(2): 155-164.
- O'Donnell A.F., Apffel A. y col. (2010)**  $\alpha$ -arrestins Aly1 and Aly2 regulate intracellular trafficking in response to nutrient signaling. *Molecular Biology of the Cell*. 21(20): 3552-3566.
- Olivera-Couto A. y Aguilar P.S. (2012)** Eisosomes and plasma membrane organization. *Molecular Genetics and Genomics*. 287(8): 607-620.
- Panadero J., Pallotti C. y col. (2006)** A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 281(8): 4638-4645.
- Park J.I., Grant C.M. y col. (1997)** The freeze-thaw stress response of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is growth phase specific and is controlled by nutritional state via the RAS- Cyclic AMP signal transduction pathway. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(10): 3818-3824.
- Pastor-Flores D., Schulze J.O. y col., (2013)** PIF-Pocket as a target for *C. albicans* Pkh selective inhibitors. *American Chemical Society*. 8: 2283-2292.
- Polo S. y Di Fiore P.P. (2008)** Finding the right partner: Science or ART? *Cell*. 135(4): 590-592.
- Pomorski T., Lombardi R. y col. (2003)** Drs2p-related P-type ATPases Dnf1p and Dnf2p are required for phospholipid translocation across the yeast plasma membrane and serve a role in endocytosis. *Molecular Biology of the Cell*. 14(3): 1240-1254.
- Porro D., Sauer M. y col. (2005)** Recombinant protein production in yeasts. *Molecular Biotechnology*. 31(3): 245-259.
- Pretorius I.S. (2000)** Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 16(8): 675-729.

- Proft M. y Serrano R. (1999)** Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulation *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Molecular and Cellular Biology*. 19: 537–546.
- Proft M. y Struhl K. (2002)** Hog1 kinase converts the Sko1-Cyc8-Tup1 repressor complex into an activator that recruits SAGA and SWI/SNF in response to osmotic stress. *Molecular Cell*. 9(6): 1307-1317.
- Qiu X.B., Shao Y.M. y col. (2006)** The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 63(22): 2560-2570.
- Randez-Gil F., Sanz P. y col. (1998)** Carbon source-dependent phosphorylation of hexokinase PII and its role in the glucose-signaling response in yeast. *Molecular and Cellular Biology*. 18(5): 2940-2948.
- Randez-Gil F., Sanz P. y col. (1999)** Engineering baker's yeast: room for improvement. *Trends in biotechnology*. 17(6): 237-244.
- Randez-Gil F., Córcoles-Sáez I. y col. (2013)** Genetic and phenotypic characteristics of baker's yeast: Relevance to baking. *Annual Review of Food Science and Technology*. 4(1): 191-214.
- Rep M., Albertyn J. y col. (1999)** Different signalling pathways contribute to the control of *GPD1* gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 145: 715-727.
- Rep M., Krantz M. y col (2000)** The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. *The journal of biological chemistry*. 275(12): 8290–8300.
- Reyes A., Sanz M. y col. (2007)** Chitin synthase III requires Chs4p-dependent translocation of Chs3p into the plasma membrane. *Journal of Cell Science*. 120(12): 1998-2009.
- Reynolds T.B., Hopkins B.D. y col. (1998)** The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast golgi glycosyltransferase. *Journal of Cell Biology*. 143(4): 935-946.

- Robzyk K. y Kassir Y. (1992)** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Research*. 20(14): 3790.
- Rodríguez-Vargas S., Sánchez-García A. y col. (2007)** Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(1): 110-116.
- Roelants F.M., Torrance P.D. y col. (2004)** Differential roles of *PDK1*- and *PDK2*-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology*. 150(10): 3289-3304.
- Roelants F.M., Baltz A.G. y col. (2010)** A protein kinase network regulates the function of aminophospholipid flippases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107(1): 34-39.
- Roncero C., Valdivieso M.H. y col. (1988)** Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to Calcofluor white. *Journal of Bacteriology*. 170(4):1950-1954.
- Roncero C. (2002)** The genetic complexity of chitin synthesis in fungi. *Current Genetics*. 41(6): 367-378.
- Rotin D. y Kumar S. (2009)** Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 10(6): 398-409.
- Sahara T., Goda T. y col. (2002)** Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *Journal of Biological Chemistry*. 277(51): 50015-50021.
- Sahi C. y Craig E.A. (2007)** Network of general and specialty J protein chaperones of the yeast cytosol. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104(17): 7163-7168.
- Saito H. y Posas F. (2012)** Response to hyperosmotic stress. *Genetics*. 192(2): 289-318.
- Saito K., Fujimura-Kamada K. y col. (2004)** Cdc50p, a protein required for polarized growth, associates with the Drs2p P-type ATPase implicated in phospholipid translocation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 15(7): 3418-3432.

- Salvadó Z., Chiva R. y col. (2012)** Functional analysis to identify genes in wine yeast adaptation to low-temperature fermentation. *Journal of Applied Microbiology*. 113: 76-88.
- Sambrook J., Fritsch E.F. y col., (1989)** Molecular cloning: A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, NY.
- Sanger F., Nicklen S. y col. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 74(12): 5463-5467.
- Schade B., Jansen G. y col. (2004)** Cold adaptation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 15(12): 5492-5502.
- Schlenstedt G., Harris S. y col. (1995)** A yeast DnaJ homologue, Scjlp, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *Journal of Cell Biology*. 129(4): 979-988.
- Scrimale T., Didone L. y col. (2009)** The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*. 20(1): 164-175.
- Serrano R., Kielland-Brandt M.C. y col. (1986)** Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), K<sup>+</sup>- and Ca<sup>2+</sup>-ATPase. *Nature*. 319(6055): 689-693.
- Shamu C.E. y Walter P. (1996)** Oligomerization phosphorylation of the Ire1p kinase during intracellular signaling from the endoplasmic reticulum to the nucleus. *EMBO Journal*. 15(12): 3028-3039.
- Shima J. y Takagi H. (2009)** Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: Stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 53(3): 155-164.
- Sidrauski C. y Walter P. (1997)** The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell*. 90(6): 1031-1039.

- Sigrist C.J., Cerutti L. y col. (2002)** PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Briefings in bioinformatics*. 3(3): 265-274.
- Simons K. y Sampaio J.L. (2011)** Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 3(10).
- Skrzypek M.S., Nagiec M.M. y col. (1998)** Inhibition of amino acid transport by sphingoid long chain bases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 273(5): 2829-2834.
- Spradling A., Ganetsky B. y col. (2006)** New roles for model genetic organisms in understanding and treating human disease: Report from the 2006 Genetics Society of America Meeting. *Genetics*. 172(4): 2025-2032.
- Stathopoulos A.M. y Cyert M.S. (1997)** Calcineurin acts through the *CRZ1/TCN1*-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes and Development*. 11(24): 3432-3444.
- Stefani M. y Dobson C. (2003)** Protein aggregation and aggregate toxicity: new insights into protein folding, misfolding diseases and biological evolution. *Journal of Molecular Medicine*. 81(11): 678-699.
- Strádalová V., Stahlschmidt W. y col. (2009)** Furrow-like invaginations of the yeast plasma membrane correspond to membrane compartment of Can1. *Journal of Cell Science*. 122(16): 2887-2894.
- Stukey J.E., McDonough V.M. y col. (1990)** The *OLE1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the delta 9 fatty acid desaturase and can be functionally replaced by the rat stearoyl-CoA desaturase gene. *Journal of Biological Chemistry*. 265(33): 20144-20149.
- Teixeira M.C., Mira N.P. y col. (2011)** A genome-wide perspective on the response and tolerance to food-relevant stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Opinion in Biotechnology*. 22(2): 150-156.
- Thorsen M., Di Y. y col. (2006)** The MAPK Hog1p modulates Fps1p-dependent arsenite uptake and tolerance in yeast. *Molecular Biology of the Cell*. 17(10): 4400-4410.

- Todorova T., Pesheva M. y col. (2012)** Mutagenic effect of freezing on nuclear DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 29(5): 191-199.
- Travers K.J., Patil C.K. y col. (2000)** Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the Unfolded Protein Response and ER-associated degradation. *Cell*. 101(3): 249-258.
- Vembar S.S. y Brodsky J.L. (2008)** One step at a time: Endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 9(12): 944-957.
- Wach A., Brachat A. y col. (1994)** New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10: 1793–1808.
- Walsh P., Bursać D. y col. (2004)** The J-protein family: Modulating protein assembly, disassembly and translocation. *EMBO Reports*. 5(6): 567-571.
- Walther T.C., Brickner J.H. y col. (2006)** Eisosomes mark static sites of endocytosis. *Nature*. 439(7079): 998-1003.
- Walther T.C., Aguilar P.S. y col. (2007)** Pkh-kinases control eisosome assembly and organization. *EMBO Journal*. 26(24): 4946-4955.
- Warringer J., Hult M. y col. (2010)** The HOG pathway dictates the short-term translational response after hyperosmotic shock. *Molecular Biology of the Cell*. 21(17): 3080-3092.
- Welsch C.A., Hagiwara S. y col. (2003)** Ubiquitin pathway proteins influence the mechanism of action of the novel immunosuppressive drug FTY720 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 278(29): 26976-26982.
- Westfall P.J., Patterson J.C. y col. (2008)** Stress resistance and signal fidelity independent of nuclear MAPK function. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 105(34): 12212-12217.
- Wieczorke R., Krampe S. y col. (1999)** Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 464: 123–128.

- Winkler A., Arkind C. y col. (2002)** Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryotic Cell*. 1(2): 163-173.
- Winzler E.A., Shoemaker D.D. y col. (1999)** Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 285(5429): 901-906.
- Wolfe J. y Bryant G. (1999)** Freezing, drying, and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*. 39(2): 103-129.
- Wurgler-Murphy S.M., Maeda T. y col. (1997)** Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Molecular and Cellular Biology*. 17(3): 1289-1297.
- Yamniuk A.P. y Vogel H.J. (2004)** Calmodulin's flexibility allows for promiscuity in its interactions with target proteins and peptides. *Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology*. 27(1): 35-57.
- Yancey P.H. (2005)** Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*. 208(15): 2819-2830.
- Yen K., Gitsham P. y col. (2003)**. An improved *tet0* promoter replacement system for regulating the expression of yeast genes. *Yeast*. 20: 1255-1262.
- Yoshimoto H., Saltsman K. y col. (2002)** Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*. 277(34): 31079-31088.
- Young M.E., Karpova T.S. y col. (2002)** The Sur7p family defines novel cortical domains in *Saccharomyces cerevisiae*, affects sphingolipid metabolism, and is involved in sporulation. *Molecular and Cellular Biology*. 22(3): 927-934.

**Zhang X., Lester R.L. y col. (2004)** Pil1p and Lsp1p negatively regulate the 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-like kinase Pkh1p and downstream signaling pathways Pkc1p and Ypk1p. *Journal of Biological Chemistry*. 279(21): 22030-22038.

**Zhou X. y Graham T.R. (2009)** Reconstitution of phospholipid translocase activity with purified Drs2p, a type-IV P-type ATPase from budding yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 106(39): 16586-16591.

- **Páginas web:**

Ministerio de Agricultura, Alimentación  
y Medio Ambiente

[www.magrama.gob.es](http://www.magrama.gob.es)

National Center for Biotechnology  
Information (NCBI)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

Swiss Institute of Bioinformatics (SIB)

<http://www.isb-sib.ch>

Munich Information Center for Protein  
Information (MIPS)

<http://mips.gsf.de>

ImageJ

<http://rsb.info.nih.gov/ij/>

*Saccharomyces* Genome Database  
(SGD)

<http://www.yeastgenome.org>



