



Mecanismos de percepción y de respuesta a
bajas temperaturas en
Saccharomyces cerevisiae

Memoria presentada por Isaac Córcoles Sáez para optar al grado de Doctor por la
Universidad de Valencia

Programa de doctorado en Biotecnología

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Valencia, Mayo de 2014

La Dra. Francisca Rández Gil, Científica titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los alimentos de Valencia y 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,

Informan:

Que D. Isaac Córcoles Sáez, licenciado en Biología, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “Mecanismos de percepción y de respuesta a bajas temperaturas en *Saccharomyces cerevisiae*”, que presenta para optar al grado de Doctor por la Universidad de Valencia.

Valencia, Mayo de 2014

Dra. Francisca Rández Gil

Dr. José Antonio Prieto Alamán

Agradecimientos

Demasiado tiempo esperando escribir estas líneas para que al final siempre se utilice el momento de menos inspiración, en el cual lo que estás deseando es llegar a la última de las páginas para nunca mejor dicho, pasar página y empezar de cero no se sabe muy bien que. No obstante merece la pena tomarse el tiempo necesario ya que probablemente, los siguientes párrafos contengan lo más importante de los últimos años, los auténticos organismos vivos que han hecho que hoy sea lo que soy.

En primer lugar, me gustaría agradecer a Paqui y Jose, la oportunidad que, para estas fechas, hace seis años, me concedieron confiando en mí para poder hacer esta Tesis Doctoral en su Laboratorio. Todo empezó con una inesperada llamada telefónica una mañana de primavera mientras me encontraba entre varios ejemplares de oso pardo (*Ursus arctos*) y termina ahora. Se dice rápido, pero para llegar a este momento ha hecho falta mucho trabajo codo con codo en el Laboratorio y muchos consejos. Gracias por vuestra implicación y esfuerzo para que este trabajo tomara forma.

A continuación me gustaría recordar a todas y cada una de las personas que han pasado por el Laboratorio y que escriben el tercer capítulo de esta tesis, un capítulo científico pero sobre todo personal. En primer lugar, mis hermanas de labo, Sara y Lidia, con las cuales he vivido todo tipo de experiencias. Gracias por ser compañeras a la vez que amigas. Pienso que en realidad en algo hemos avanzado, empezamos haciendo escapadas para comer un kebab y terminamos haciéndolo en un japonés, y eso es caché. Sara, mucha suerte en esta fase a la que nos enfrentamos. Lidia, ya estabas ahí cuando yo llegué y ahí te dejo, ánimo... ;). Y no podía ser menos mi Lore, quien me iba a decir a mí aquel día que llegué al labo y me presentaron a esa chica con indumentaria alternativa que íbamos a vivir todo lo que hemos vivido, cuánto hemos reído y llorado con nuestras patéticas vivencias de estos años. Aunque ahora estés *in love* y pases de mí que sepas que te quiero mucho y has sido muy importante para mí estos años. Mariajo eres todo un ejemplo de currante pero sobre todo de persona, sin duda una de las mejores con las que me he cruzado en mi vida. Gracias por los momentos de reírnos de cosas absurdas pero también por tus consejos.

Chicas, gracias por cada uno de los momentos que hemos compartido. No me puedo olvidar de mis mexicanos, Paco y Rocío, por los grandes momentos vividos tanto aquí como allí. Roberto, contigo coincidí poco tiempo en el labo pero después pude conocerte mejor, fueron grandes tus consejos y muy buenas las experiencias que vivimos. Elena, también estuviste poco con nosotros pero lo suficiente para vivir algún viajecito y algún que otro tapeo, los momentos que molan. Y para terminar un afectivo recuerdo a mis chic@s de prácticas, Dani, Ani y Emanuela.

Toda esta gente conforma una parte muy importante de los últimos años, pero por otra parte está lo que se me he atrevido a acuñar con el nombre, "Sociabilización de la ciencia". Aquí incluyo a todas esas personas con las que he coincidido por algún motivo fuera del labo, pero dentro del IATA. Si, todos esos que los primero que pensasteis al verme es, vaya un tío raro que no se relaciona con nadie, seguro que llega lejos en la ciencia, pero no!!! pronto os disteis cuenta de que nada de eso era cierto (cuando digo nada es nada). Mis nenis del 303, María, Fani, Ali y Rosana. No podíamos tener mejores substitutas de laboratorio. María, mi Doc preferida, qué gran persona eres, cuando seas IP quiero que seas mi jefa, pero mientras tanto no dejes de ser mi amiga, mucha suerte!!. Fani, con esa clase no podía tardar en llegar el momento en que fueras ama y señora del laboratorio, y con lo de ama ya sabes a que me refiero... guiño guiño. Ali, recuerda nuestra canción, la que nos llevó a la gran manzana a comprobar si sus versos eran reales, y vaya si lo eran. Mucha suerte por ahí fuera. Sólo puedo decir Viva el Harlem dominicano y sus bachatas espontáneas!!!, o era presentación de póster??.

Nerea, aunque la primera vez que te vi solo eras la chica de las mechas ;), llegaste a ser un elemento especial de esta etapa. Nos conocimos al final pero ha sido suficiente para vivir grandes momentos de risas y de penas científicas, tanto sobrios como bañados en vino blanco, porque las penas con vino son menos penas, pero las risas... Grandes momentos a esas horas indecentes a las que acostumbábamos a estar en el laboratorio pero sobre todo grandes momentos al otro lado del charco, de esos que empiezan presentando póster y terminan en una habitación de hotel de no sabes quién rodeado de IPs del mundo de las levaduras. Espero que todo empiece a irte

como te mereces. Por supuesto, no puedo olvidarme de las que fueron tus compañeras de labo y que estuvieron a puntito de ser las mías ;) , Anto y Adri, cada día estáis peor, pero esos saraos bachateros que montáis no tienen precio, y cómo no, Lupita por esos abrazos de su "uncle" favorito. Y por último, las nuevas generaciones, Ceci, Alba y Javi "miarma", por estos últimos meses, mucha suerte!!! y a las no tan nuevas como Bruno y Jiri, mucha suerte también.

Aurora, otro de mis pilares esenciales en estos últimos años. También llegaste a mi vida tarde, pero espero que permanezcas en ella durante mucho tiempo. Desde el primer día que hablamos noté que ahí podía haber una bonita amistad y creo que no me he equivocado, aunque de vez en cuando tengamos nuestros roces debido a que ambos somos un poco cabezones. Gracias por los ratos de confianzas, las risas, el hospedaje y los tupper de tu madre.

No puedo olvidarme de mis chicas del máster... Bego, Clara, Silvia y Mapi. Gracias por hacer más llevadero aquel vía crucis de trabajos y exámenes de temática tan diversa. Mapi, ejemplo de persona luchadora, me he reído mucho contigo. Clara, ánimo con lo que te queda, créete que eres una gran profesional, pero ante todo eres una gran persona. Silvia, aunque todo terminó como terminó, has sido una persona muy especial en mi vida estos últimos años, mucha suerte. Bego, sin duda eres única y por tanto has sido una parte fundamental de esta etapa, gracias por haber sido mi compañera de meriendas y shopping, pero sobre todo por saber que en ti tengo una amiga.

Thank to Proffesor John D. York for welcoming me in his Lab and to its members for making me life a little easier. Pero sobre todo a Pablo, por hacer de hermano mayor mientras estaba tan lejos de los míos y a Bea por hacer que mis meses allí fueran más llevaderos. Sin duda sois los responsables de que aquella experiencia fuera inolvidable.

Mención especial para tod@s y cada un@s mis chic@s del Orfeo Veus Juntas, por hacer posibles sueños que antes parecían inalcanzables, por enseñarme a volar con la música y por ser tan grandes. Vir, gracias por tus

consejos y por entenderme en estos últimos meses con nuestras conversaciones de camino al parking y por los momentos divertidos que hemos pasado juntos. Espero poder volver con vosotros algún día.

Gracias a los que siempre habéis pensado que hacía algo importante sin saber muy bien lo que hacía y por esa frase de apoyo en cualquier momento y en la distancia. A mis chicas albaceteñas Sara, Llanos, Almu y Bea. Bueno, Almu sabe bien de que va el tema, así que me entiende, mucha suerte, nos queda pendiente algún proyecto empresarial de futuro.

La vida a veces te da regalos especiales y un buen amigo, es el mejor que puede darte. Javi, gracias por ser ese regalo especial, por cuidarme y sobre todo aguantarme, que no es fácil.

A ti, que eres la que más me ha apoyado, porque aunque no hayas estado de la misma manera en los últimos años, esto es algo que empezó hace muchos y tú lo has sufrido. Gracias por tus grandes consejos, por tu apoyo y por confiar en mí como nadie. Te deseo lo mejor que la vida pueda darte.

Finalmente, gracias a Pedro y Natalia, sobre todo estos últimos meses, que me habéis tenido en adopción y a mis padres, por todo el apoyo y sacrificio que han hecho y hacen para que pueda formarme como profesional y sobre todo como persona. Por esa confianza ciega e incondicional que hace falta para creer que uno de estos proyectos que no sabes muy bien como funciona ni hacia donde lleva, puede servir de algo. Espero que así sea y que al final de todo podáis sentirnos orgullosos de este trabajo cuyos resultados os pertenecen en gran medida. Gracias...

Al final, me he puesto y ha salido más de lo que esperaba, ojalá tuviera esta fluidez para escribir otro tipo de cosas. En fin, supongo que eso significa que estos últimos años han sido especiales y al final, la vida no se ha portado del todo mal.....

Gracias

ÍNDICE

ABREVIATURAS	13
INTRODUCCIÓN	15
1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en ambientes variables: la lucha por la supervivencia	17
2. Respuesta genética de <i>S. cerevisiae</i> a las bajas temperaturas	17
3. Efecto de las bajas temperaturas sobre la envoltura celular de <i>S. cerevisiae</i>	19
4. La pared celular de <i>S. cerevisiae</i> : estructura y composición	21
5. Las membranas biológicas de <i>S. cerevisiae</i> : estructura y composición	22
5.1. Fosfolípidos	22
5.2. Clasificación y estructura	22
5.3. Síntesis de fosfolípidos	23
5.4. Mecanismos genéticos y bioquímicos que controlan la síntesis de fosfolípidos	24
5.5. Fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados: PtdIns 4P y PtdIns (4,5)P ₂	25
5.6. Síntesis de PtdIns 4P y PtdIns(4,5)P ₂	27
5.7. Fosfatasas de PtdIns(4,5)P ₂ : Inp51-54p	28
6. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> frente a los cambios ambientales: las rutas de MAPKs	29
6.1. Ruta de respuesta a alta presión osmótica	30
6.2. Ruta de señalización de integridad de la pared celular (CWI): aspectos generales	31
6.2.1. Ruta de integridad de la pared celular: componentes principales	32
6.2.1.1. Sensores: Wsc1-3p, Mid2p y Mtl1p	32
6.2.1.2. La proteína efectora Rho1p	33
6.2.1.3. Proteína quinasa C (Pkc1p)	34
6.2.1.4. El módulo de MAPKs: Bck1p, Mkk1p/Mkk2p y Slk2p	35
6.2.1.5. Dianas nucleares de la MAPK Slk2p	36
6.2.1.5.1. El factor transcripcional Rlm1p	36
6.2.1.5.2. El complejo transcripcional SBF (Swi Binding Factors)	37
6.2.2. Activación de la ruta de señalización CWI	38

6.2.3. Regulación negativa de la ruta	39
6.3. Señalización por inositol fosfatos y difosfoinositol fosfatos	40
6.4. Comunicación entre rutas de señalización	42
6.4.1. Comunicación entre la ruta HOG y la ruta de integridad de la pared celular	43
6.4.2. Las rutas TOR y PKA y su relación con la ruta de integridad de la pared celular	44
6.4.3. Comunicación entre fosfoinosítidos y elementos de la ruta de integridad de la pared celular	46
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	47
MATERIALES Y MÉTODOS	53
1. Cepas	55
2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	55
2.1. Bacterias	55
2.2. Levaduras	56
3. Métodos de manipulación de microorganismos	57
3.1. Transformación de bacterias	57
3.2. Transformación de levaduras	57
4. Métodos de manipulación de DNA	57
4.1. Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	57
4.2. Obtención de DNA plasmídico de levadura	57
4.3. Obtención de DNA genómico de levadura	58
4.4. Análisis de inserción de casetes de interrupción	59
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	59
4.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	60
4.7. Aislamiento de fragmentos de DNA en geles de agarosa	60
4.8. Clonación	60
4.9. Secuenciación y análisis de las secuencias	61

4.10. Construcción de las cepas Tat1-MYC13 y Tat2-MYC13	61
4.11. Inserción en el genoma de la región codificante del dominio con homología a pleckstrina de Plc1p fusionada a GFP	62
5. Análisis del perfil transcripcional: extracción de RNA, hibridación con Chip y análisis de datos	62
6. Rastreo de supresores en multicopia	63
7. Determinación de actividades enzimáticas	64
7.1. Actividad β -galactosidasa	64
7.2. Determinación de la concentración de proteínas	64
8. Técnicas de análisis de proteínas	65
8.1. Obtención y preparación de extractos de proteínas para SDS-PAGE	65
8.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	66
8.3. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección	66
8.4. Electroforesis bidimensional de proteínas	67
8.4.1. Extractos de proteínas	67
8.4.2. Preparación de muestras	67
8.4.3. Isoelectroenfoque	68
8.4.4. Separación de proteínas en función del peso molecular (SDS-PAGE)	68
8.5. Tinción de plata de geles de proteínas	68
8.6. Tinción de geles con Sypro [®] RuBy y Pro Q Diamond	69
8.7. Purificación de afinidad en tándem (TAP)	69
9. Ensayo de supervivencia frente a Zimoliasa	70
10. Técnicas de microscopía	70
10.1. Tinción de filamentos de actina	70
10.2. Tinción de partículas lipídicas o lipid droplets	71
10.3. Observación de células mediante microscopía de fluorescencia	71
11. Análisis de la composición lipídica	71
12. Medidas de anisotropía	72

TABLAS	73
RESULTADOS CAPÍTULO 1	81
CAPÍTULO 1: Estudio de nuevas vías de señalización del descenso de la temperatura en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	85
1. Impacto de la ausencia de diferentes MAPKs en el crecimiento a bajas temperaturas de <i>S. cerevisiae</i>	85
2. Papel del módulo de MAPKs y de los sensores de membrana de la ruta de integridad de la pared celular en la adaptación al descenso térmico en <i>S. cerevisiae</i>	87
3. Implicación de Pkc1p en la respuesta a frío	89
4. Activación de Slr2p ante un descenso de temperatura	90
5. Importancia de la actividad quinasa de Slr2p en el crecimiento a bajas temperaturas de <i>S. cerevisiae</i>	92
6. Respuesta transcripcional mediada por la activación de la ruta CWI a bajas temperaturas	93
7. Implicación de la MAPK Slr2p en la modificación de la pared celular tras la exposición a bajas temperaturas	95
8. Implicación del complejo SBF (Swi4p/Swi6p) en el crecimiento a bajas temperaturas	96
9. Comunicación entre las rutas CWI y HOG en respuesta a un descenso térmico	97
10. TORC1 y las rutas CWI y RAS-cAMP controlan la actividad de PKA en respuesta a un descenso en la temperatura	99
11. Aislamiento de supresores en multicopia del fenotipo de sensibilidad a baja temperatura del mutante <i>slr2Δ</i> de <i>S. cerevisiae</i>	104
12. Análisis fenotípico de la sobreexpresión de <i>EMW1</i>	106
13. Caracterización preliminar de la proteína Emw1p e identificación de proteínas que interactúan con ella	107
14. Análisis de la posible interacción de <i>GCN2</i> y <i>PTC1</i> con <i>SLT2-EMW1</i>	110
15. Estudio de la participación de Emw1p como componente del complejo multichaperona que colabora en la señalización a través de Slr2p	113
DISCUSIÓN CAPÍTULO 1	117
1. La ruta de integridad de la pared celular y su papel funcional en la respuesta a frío de <i>S. cerevisiae</i>	119
2. Emw1p como una posible diana de Slr2p	124

RESULTADOS CAPÍTULO 2	127
CAPÍTULO 2: Análisis de la implicación del PtdIns(4,5)P ₂ y su metabolismo en la señalización y homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática.	131
1. La ausencia de <i>INP51</i> incrementa los niveles de PtdIns(4,5)P ₂ y la tolerancia a frío de <i>S. cerevisiae</i>	131
2. Activación de la ruta CWI y su implicación en el fenotipo del mutante <i>inp51Δ</i> a bajas temperatura	133
3. El metabolismo de PtdIns(4,5)P ₂ mediado por la actividad fosfolipasa de Plc1p confiere tolerancia al descenso de la temperatura	135
4. La pérdida de Inp51p y la exposición a bajas temperaturas estimulan la acumulación de DPInsP _s	137
5. Efectos de la exposición a frío y de la ausencia de Inp51p en la localización y abundancia de Pah1p	140
6. Análisis del contenido en lípidos	142
7. Fluidez de la membrana plasmática	146
8. La ausencia de Pah1p o de su fosfatasa Nem1p resulta en un defecto de crecimiento en frío	148
9. Endocitosis de Tat1p y Tat2p	149
DISCUSION CAPÍTULO 2	151
1. Señalización y homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática: evidencias de la implicación del PtdIns(4,5)P ₂ y sus derivados	153
2. Análisis del fenotipo de resistencia a frío del mutante <i>inp51Δ</i> : endocitosis y estrategias terapéuticas contra la obesidad	159
PERSPECTIVAS	163
CONCLUSIONES GENERALES	169
ANEXO	175
BIBLIOGRAFÍA	179

ABREVIATURAS

HSPs: heat shock proteins	TAG: triacylglycerol
RNA: ribonucleic acid	SE: sterol ester
DNA: deoxiribonucleic acid	AG: ácidos grasos
PC: phosphatidilcoline	MAP: mitogen-activated protein
PE: phosphatidiletanolamine	MAPK: mitogen-activated protein kinase
PI: (PtdIns): phosphatidilinositol	mRNA: messenger RNA
PS: phosphatidilserine	CFW: calcofluor white
PA: fosfatidic acid	G6PDH: glucose 6-phosphate deshidrogenase
DAG: diacilglicerol	GFP: green fluorescent protein
CL: cardiolipine	HA: hemaglutinina
PL: phospholipids	Kb: kilobases
UAS_{INO}: inositol-sensitive upstream activating sequence	o-NPG: ortho-Nitrophenyl- β -galactosidase
CWI: cell wall integrity	ORF: open reading frame
GTPasa: guanosine triphosphate hidrolase	PCR: polymerase chain reaction
HOG: high osmolarity glycerol	rpm: revoluciones por minuto
DMSO: dimetil sulfóxido	SDS-PAGE: Sodium dodecyl sulfate-Polyacrilamide gel electrophoresis
SDS: sodium dodecyl sulfate	TAP: tandem affinity purification
GS: glucan synthase	Tn: tunicamicina
GTP: guanosin triphosphate	ATP: adenosin triphosphate
GDP: guanosin diphosphate	INO: inositol
GAP: GTPase activating protein	
GEF: guanine nucleotide exchange factor	
InsPs: inositol phosphates	
PPInsPs: pyrophoinositol phosphates	
DPInsPs: diphosphoinositol phosphates	
TOR: target of rapamycin	
cAMP: ciclic adenosin monophosphate	
TORC1: target of rapamycin complex 1	
TORC2: target of rapamicyn complex 2	



INTRODUCCIÓN

1. *Saccharomyces cerevisiae* en ambientes variables: la lucha por la supervivencia

Todos los organismos vivos, ya sean uni o pluricelulares, interactúan con el medio que les rodea exponiéndose a rápidos y extremos cambios en el mismo. En respuesta a estas situaciones ambientales, los organismos, a lo largo de la evolución, han desarrollado mecanismos de supervivencia y adaptación que les permiten detectar dichos cambios, transmitir esta información al interior celular y poner en marcha mecanismos de protección, modulando su estado fisiológico, para mantener la homeostasis general de la célula. Para microorganismos unicelulares como las levaduras, detectar estos cambios ambientales y responder a ellos es un requerimiento clave para su supervivencia.

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es capaz de colonizar diferentes medios naturales y artificiales, los cuales, están sujetos a variaciones en la temperatura. Tanto durante su crecimiento en la superficie de frutos como la uva, como durante su uso para la producción de cerveza o vino, la levadura queda expuesta a temperaturas inferiores (10-12°C) a su temperatura óptima (25-30°C). Además, la conservación de este microorganismo se lleva a cabo a muy baja temperatura (4°C), donde las condiciones de crecimiento son restrictivas, aunque se mantiene su viabilidad. Por tanto, *S. cerevisiae* debe disponer de la maquinaria adecuada para hacer frente a estos cambios. El conocimiento de su funcionamiento y la identificación de los elementos implicados en ella, es de gran interés tanto a nivel básico como industrial (Aguilera y col., 2007; Randez-Gil y col., 2013).

2. Respuesta genética de *S. cerevisiae* a las bajas temperaturas

El análisis comparativo de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación del patrón transcripcional de *S. cerevisiae* en respuesta a frío, indica la existencia de una regulación común para ciertos grupos de genes. No obstante, dicha respuesta presenta variaciones en función de la intensidad del estrés y su duración (Sahara y col., 2002; Homma y col., 2003; Kandror y col., 2004; Schade y col., 2004; Murata y col., 2006) (Fig. 1).

Durante las primeras fases de la exposición a bajas temperaturas, tiene lugar la inducción de la maquinaria transcripcional, en la que se incluyen componentes de la RNA polimerasa I (*RPA49*), proteínas procesadoras de RNA (*NSR1*, *HRP1*, *NRD1*, *STP4*, *NOG2*, *HUL5*) o RNA helicasas codificadas por los genes *DED1*, *DBP2*, *DBP3*, *DBP7*, etc. No

obstante, la inducción de estos genes cesa cuando el estrés se prolonga (Sahara y col., 2002; Schade y col., 2004). Un comportamiento similar presentan muchas proteínas ribosomales, cuya inducción incrementa la formación de complejos, compensando así la reducción de capacidad traduccional bajo estas condiciones, aunque, en fases tardías, su expresión se reprime (Sahara y col., 2002; Schade y col., 2004). Otras funciones celulares que siguen el mismo patrón son la biosíntesis de nucleótidos, las modificaciones postraduccionales o el transporte vesicular (Schade y col., 2004).

En fases más avanzadas de la exposición a frío (10°C, desde 4-8 h), tiene lugar la regulación de la expresión de genes que codifican proteínas de *heat-shock* (*Heat Shock Proteins*, HSPs). La mayoría de HSPs se ve reprimidas, con la excepción de las codificadas por los genes *HSP12* y *HSP16*, que se inducen (Sahara y col., 2002). También, se ve afectada la regulación de la expresión de genes relacionados con el metabolismo y la producción de energía. La inducción de genes implicados en la síntesis y acumulación de glucógeno (*GAC1*, *GLG1*, *GLC3*, *GSY1*, *GAC1*, *GPD1*), ocurre en este periodo y de forma simultánea a la de genes implicados en su degradación (*GDB1*, *GPH1*) (Sahara y col., 2002; Schade y col., 2004; Murata y col., 2006). Un comportamiento similar, ha sido observado para genes relacionados con la síntesis de trehalosa (*PGM2*, *UGP1*, *TPS1*, *TPS2*, *ATH1*, *HXK1*, *GLK1*, *TSL1*), aunque en este caso, los genes implicados en la degradación de la misma, se encuentran reprimidos (*NTH1*), lo que explica que la acumulación de trehalosa en la célula sea una respuesta típica de la célula frente al descenso térmico (Sahara y col., 2002; Schade y col., 2004; Murata y col., 2006).

Transcurrido este periodo, o en células expuestas a condiciones más severas (4°C), se ha observado la inducción de genes implicados en glicólisis y gluconeogénesis (*TPII*, *TDH1*, *TDH2*, *TDH3*, *GPM1*, *GPM2*, *ENO1*, *PYCI*, *PDC5*, *PDC6*), lo que puede estar destinado al uso del glucógeno y la trehalosa producido en fases previas (Murata y col., 2006). También se puede observar, la inducción de genes relacionados con la síntesis de fosfolípidos, como *INO1*, *PSD1*, *CDS1*, *CHO1*, *CHO2*, *OPI3* (Murata y col., 2006) o la desaturación de ácidos grasos (*OLE1*) (Sahara y col., 2002), en consonancia con los efectos que tiene el frío sobre la estructura y composición de las membranas celulares.

En esta fase, se observa también la inducción de los denominados genes *cold-shock*, entre los que se encuentran, los genes PAU (*PAU1*, *PAU2*, *PAU4*, *PAU5*, *PAU6*, *PAU7*) y

genes que codifican miembros de la familia de manoproteínas de pared celular DAN/TIR (Kondo e Inoyue, 1991; Kowalski y col., 1995; Donzeau y col., 1996), o los involucrados en detoxificación *CTT1*, *TSA2*, *TTR1*, *GTT1*, etc. (Homma y col., 2003; Schade y col., 2004; Murata y col., 2006). Finalmente, conviene destacar en esta fase, la inducción de genes que codifican elementos de la ruta de señalización cAMP-PKA, como *TPK1*, *TPK2*, *PDE2*, *RAS1*, etc. (Sahara y col., 2002).

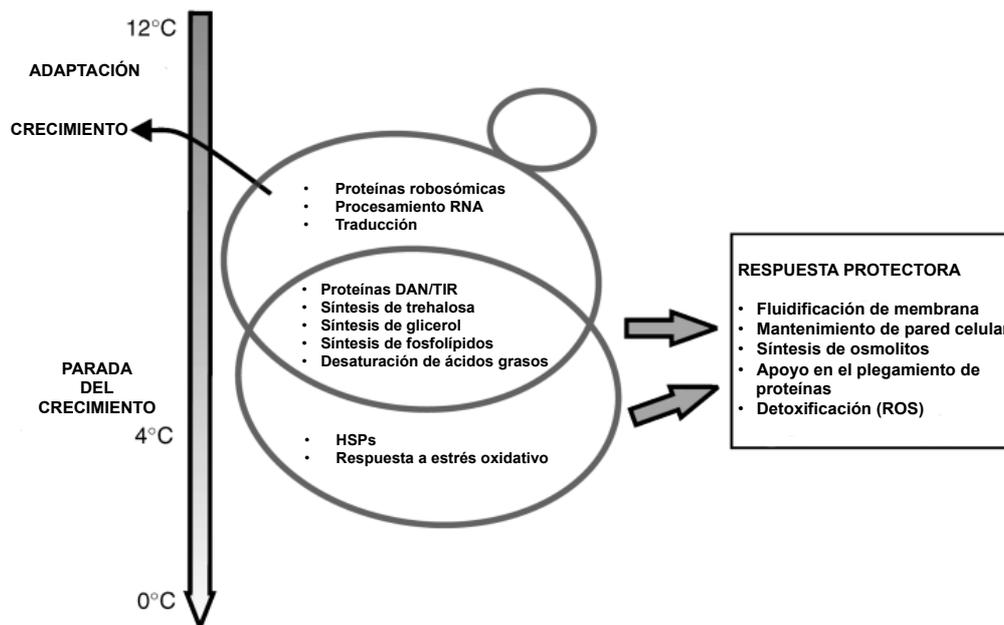


Figura 1. Principales respuestas de *S. cerevisiae* frente al descenso de la temperatura. Modificado de Aguilera y col., 2007.

3. Efecto de las bajas temperaturas sobre la envoltura celular de *S. cerevisiae*

La temperatura es uno de los factores clave que influyen en el estado y composición de la envoltura celular de *S. cerevisiae*.

Los cambios que tienen lugar en la pared celular cuando la célula es sometida a cambios en la temperatura afectan principalmente al repertorio de manoproteínas que la componen. Estas son las determinantes de su permeabilidad (Zlotnik y col., 1984) y algunas son esenciales para otras funciones celulares como el *mating* y la transición al crecimiento filamentoso (Roy y col., 1991; Lambrechts y col., 1996). La composición y distribución de proteínas de la pared celular depende de mecanismos de secreción, que a su vez, se ven afectados por las propiedades de la membrana a diferentes temperaturas.

Una de las principales características de la membrana plasmática es su composición heterogénea de lípidos y proteínas, organizados en dominios, con diferentes características de fluidez (Simons y Sampaio, 2011; Merzendorfer y Heinisch, 2013). Variaciones en la temperatura, van a determinar la movilidad de sus constituyentes, el estado de fase y el orden de los lípidos de membrana en dominios específicos, lo que puede alterar las funciones de ésta (Hazel y Williams, 1990). Las membranas, se encuentran normalmente en estado líquido cristalino y pasan a fase gel en respuesta a un descenso de la temperatura (Thieringer y col., 1998), que incrementa el orden molecular de los lípidos, un fenómeno al que se alude con el término “rigidificación” (Los, 2004) (Figura 2).

La rigidificación de la membrana, afecta a su ambiente y por tanto a la actividad de enzimas y transportadores asociados a ella. Procesos como la actividad H^+ ATPasa (Serrano, 1988), el transporte de aminoácidos (Trivedi y col., 1983) o la fuerza protón motriz (Morsomme y col., 2000), dependen de cambios en la fluidez de la membrana provocados por la temperatura y son factores limitantes para el crecimiento celular. En consonancia con esto, se ha observado que la captación de triptófano por la célula, se ve afectada por el descenso térmico (Abe y Horikoshi, 2000) y que algunos mutantes sensibles a frío, están afectados en el transporte y biosíntesis de triptófano (Chen y col., 1994; Schmidt y col., 1994).

Ante estos cambios, muchos organismos han desarrollado mecanismos para compensar dicha transición, que incluyen, entre otros, el acortamiento de las cadenas de ácidos grasos, así como el incremento de su grado de insaturación (Suutari y col., 1990; Rusell y col., 1995). En el caso de *S. cerevisiae*, un descenso en la temperatura se ha relacionado con un aumento en el contenido de lípidos, un mayor contenido en ácido palmitoléico y en general, un incremento de la relación C_{16}/C_{18} (Suutari y col., 1990). Además, la exposición a bajas temperaturas, incrementa, como ya se ha mencionado, la activación transcripcional de *OLE1*, la única desaturasa conocida en esta levadura (Nakagawa y col., 2002), produciendo un aumento del grado de insaturación de los ácidos grasos (Nakagawa y col., 2002). En definitiva, todas estas modificaciones van a contrarrestar la rigidificación de la membrana a bajas temperaturas (Rusell y col, 1995).

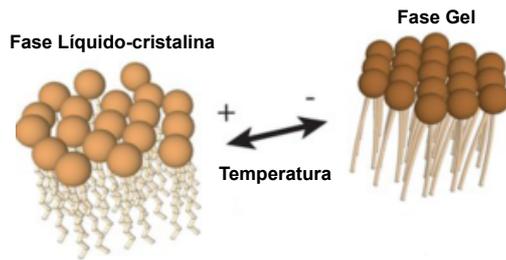


Figura 2. Transición de membrana de fase líquido-cristalina a fase gel en función de la temperatura.

Ciertas evidencias indican que estos cambios en el estado físico de la membrana, podrían ser detectados por sensores anclados en ella, generando una señal de frío (Vigh y col., 1998; Los y Murata, 2004). El único sensor relacionado hasta el momento con el mecanismo de detección del descenso térmico, es Sln1p (Panadero y col., 2006), que forma parte de la ruta de señalización en respuesta a alta presión osmótica (HOG) (ver más adelante). No obstante, existen evidencias de mecanismos y actores adicionales, e incluso, no podemos descartar la implicación de sensores de la pared celular capaces de responder ante cambios en la composición de ésta o de alteraciones en el espacio periplásmico.

4. La pared celular de *S. cerevisiae*: estructura y composición

La pared celular de *S. cerevisiae*, constituye el 20-30 % del peso seco de la célula (Orlean, 2012). Se trata de una estructura altamente compleja formada por dos capas. La más interna consiste en una capa electrón-transparente (Cappellaro y col., 1994) compuesta de cadenas de β -1,3-glucano (80–90 %), con ramas de β -1,6-glucano (8-18 %) y quitina (1-2%). Las principales funciones de esta capa son las de dar resistencia mecánica y elasticidad a la pared celular. La capa externa es electrón-densa (Cappellaro y col., 1994), compuesta principalmente por manoproteínas altamente glicosiladas pertenecientes a dos familias, las proteínas de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Smits y col., 1999) y la representada por las manoproteínas Pir1-5 (Toh-e y col., 1993; Kapteyn y col, 1999; Mrsa y Tanner, 1999). Su función principal es la protección de la capa de glucanos frente a enzimas que degradan la pared celular y del reconocimiento célula-célula.

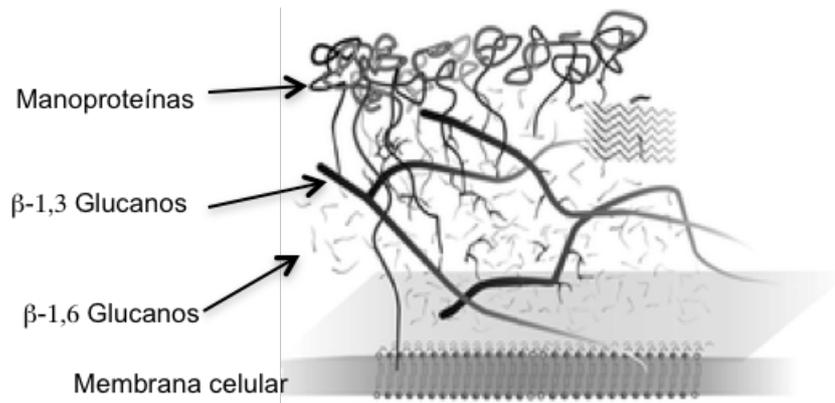


Figura 3. Representación de la estructura de la pared celular de *S. cerevisiae*. Modificado de Kilcher y col., 2008.

5. Las membranas biológicas de *S. cerevisiae*: estructura y composición

Las membranas de *S. cerevisiae*, están formadas por una bicapa lipídica compuesta de lípidos polares y lípidos neutros. Los lípidos polares más importantes, son fosfolípidos, esfingolípidos y glicerolípidos. Por otro lado se encuentran los lípidos neutros, donde se incluyen esteroides y acilglicerol (Revisado en Daum y col., 1998).

5.1. Fosfolípidos

5.1.1. Clasificación y estructura

Los fosfolípidos son el principal componente estructural de la membrana plasmática, contribuyen a mantener sus propiedades físicas y son esenciales para diversos procesos celulares (van Meer y col., 2008; Voelker, 2009). Los principales fosfolípidos encontrados en las membranas celulares incluyen fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS), aunque también, pueden encontrarse otros fosfolípidos minoritarios como ácido fosfátidico (PA), CDP-diacilglicerol (CDP-DAG), D-3, D-4 y D-5 polifosfoinosítidos, fosfatidilmonometiletanolamina, lisofosfolípidos y diacilglicerol (DAG) (Oshiro y col., 2003; Strahl y Thorner, 2007, Henry y col., 2012). Los niveles relativos de fosfolípidos y su composición en ácidos grasos, varían en función de las condiciones de cultivo (fuente de carbono, disponibilidad de nutrientes, temperatura y fase de crecimiento) y determinan por tanto la funcionalidad de la membrana y de sus componentes. La homeostasis de fosfolípidos y su regulación ante diferentes condiciones de estrés es también clave en la respuesta de *S. cerevisiae* (Carman y Han, 2011; Henry y col., 2012).

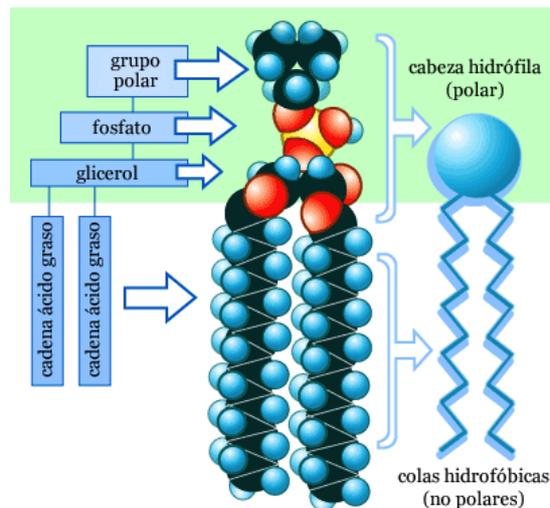


Figura 4. Representación de la estructura de un fosfolípido. Se basa en un esqueleto constituido por un anillo de glicerol 3-fosfato, al cual son esterificados ácidos grasos en posiciones 1 y 2.

5.1.2. Síntesis de fosfolípidos

La síntesis de fosfolípidos de membrana parte de PA, sintetizado a partir de glicerol-3-fosfato o dihidroxiacetona fosfato (Athenstaedt y Daum, 1997). En la ruta de síntesis “*de novo*” (Fig. 5), todos los fosfolípidos son sintetizados a partir de PA, vía el liponucleótido intermediario CDP-DAG. En esta ruta participan diferentes enzimas para dar lugar a la síntesis de los fosfolípidos de membrana PI, CL, PS, PE y PC. Además, PC y PE pueden ser también sintetizados a partir de colina y etanolamina exógena, respectivamente, a través de las ramas CDP-colina y CDP-etanolamina de la ruta de Kennedy (Fig. 5). El DAG usado en esta ruta, deriva de PA por la actividad de la PA fosfatasa, Pah1p (Han y col., 2006). Dicho DAG puede ser reconvertido en PA por la DAG quinasa codificada por *DGKI* (Han y col., 2008), o usado para la síntesis del lípido neutro TAG (Han y col., 2006).

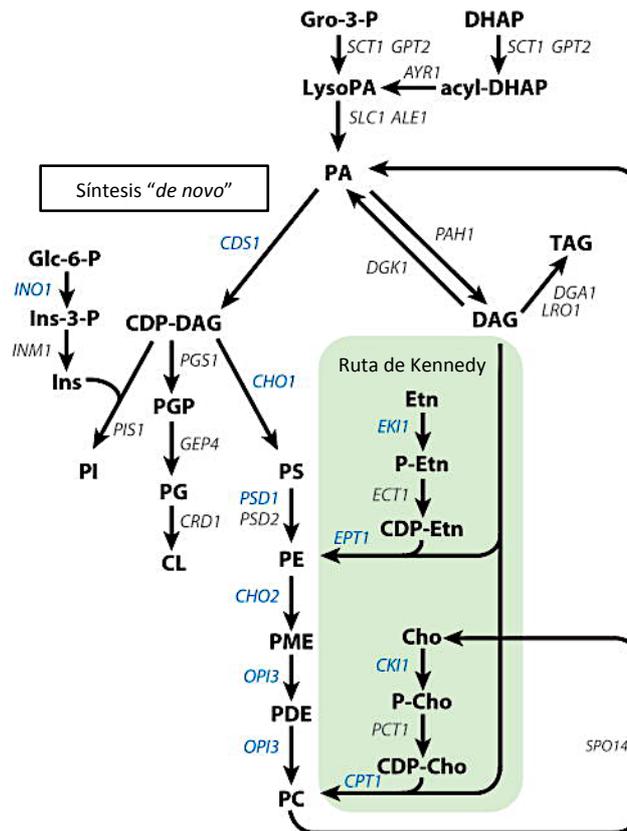


Figura 5. Rutas de síntesis de fosfolípidos en *S. cerevisiae*. Abreviaturas: CDP-DAG, CDP-diacilglicerol; Cho, colina; CL, cardiolipina; Gro, glicerol; DHAP, dihidroxiacetona fosfato; Etn, etanolamina; Glc, glucosa; Ins, inositol; PA, ácido fosfatídico; PC, fosfatidilcolina; PE, fosfatidiletanolamina; PGP, fosfatidilglicerol; PGP, fosfatidilglicerofosfato; PDE, fosfatidildimetiletanolamina; PI, fosfatidilinositol; PME, fosfatidilmonometiletanolamina; PS, fosfatidilserina; TAG, triacilglicerol; UAS_{INO}, secuencia de respuesta a inositol. Modificada de Carman y Han, 2011.

5.1.3. Mecanismos genéticos y bioquímicos que controlan la síntesis de fosfolípidos

La expresión de los genes que codifican las enzimas implicadas en la síntesis de PL está regulada por la disponibilidad de nutrientes, la fase de crecimiento, o las condiciones físico-químicas del entorno (Carman y Han, 2011). Dicha regulación depende entre otros, del elemento de respuesta a inositol (UAS_{INO}) y de los factores Ino2p, Ino4p y Opi1p. Genes que codifican las enzimas involucradas en las rutas CDP-DAG y Kennedy, en la síntesis de PI y los transportadores de inositol y colina/etanolamina, se encuentran regulados por la presencia de un elemento UAS_{INO} en sus promotores. La función represora de Opi1p es controlada por su localización celular (Loewen y col., 2004; Carman y Henry, 2007; Chen y col., 2007). Opi1p se encuentra en el interior del núcleo, o bien, en la membrana del retículo

endoplasmático a través de la interacción con la proteína de membrana del retículo endoplasmático Scs2p, y se estabiliza por PA.

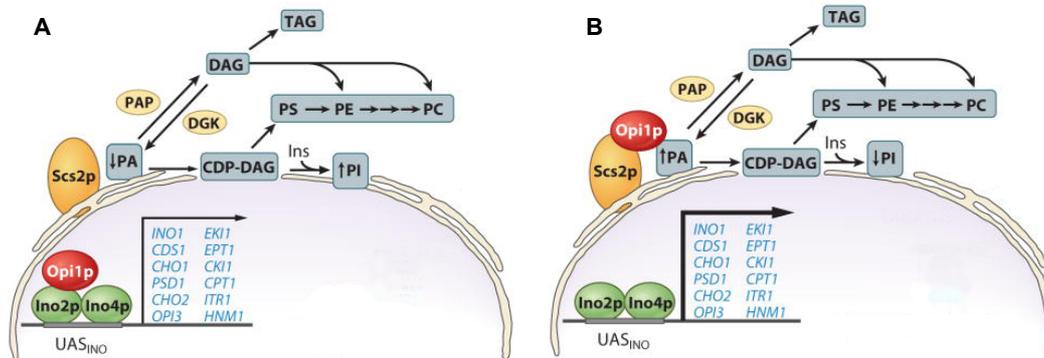


Figura 6. Modelo de regulación por PA de la síntesis de fosfolípidos en *S. cerevisiae*. (A) Cuando los niveles de PA están reducidos, Opi1p se separa de la membrana y entra en el núcleo bloqueando la activación transcripcional mediada por el complejo Ino2p/Ino4p. (B) Cuando los niveles de PA son elevados, Opi1p permanece en la membrana del núcleo o RE. Modificado de Carman y Han (2011).

5.1.4. Fosfatidilinositol y sus derivados fosforilados: PtdIns4P y PtdIns(4,5)P₂

Dentro de los principales fosfolípidos constituyentes de la membrana plasmática, el fosfatidilinositol es uno de los minoritarios, no obstante, las posibilidades que muestra su molécula para ser modificada, le aporta una gran versatilidad tanto como molécula estructural, como precursora de importantes moléculas señalizadoras denominadas fosfoinosítidos. Su anillo de inositol es único entre los fosfoglicéridos, ya que contiene tres grupos hidroxilos (posiciones D3-, D4- y D5-) susceptibles de ser fosforilados (Fig. 7), lo que los convierte en dianas de quinasas y fosfatasa de lípidos, dando lugar a diferentes derivados. Además, este fosfolípido es sustrato de fosfolipasas, generándose así segundos mensajeros. Finalmente, la molécula de fosfatidilinositol actúa como elemento de anclaje a la membrana de proteínas efectoras, a través de diferentes motivos de unión presentes en estas, resultando esta unión esencial, en el desempeño de las funciones de dichas proteínas. En 1953, Mabel y Lowell Hokin demostraron que ciertos fosfolípidos, especialmente PtdIns, son rápidamente metabolizados en respuesta a diversos estímulos externos, dando lugar así a una nueva disciplina centrada en el estudio de la señalización por lípidos.

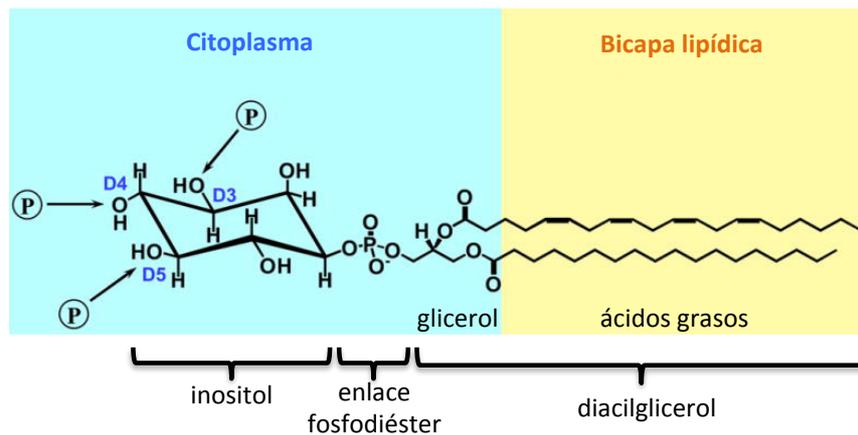


Figura 7. Estructura química del fosfatidilinositol. El anillo de inositol se une por un enlace éster mediado por fosfato inorgánico a DAG. La porción lipídica se inserta en la bicapa lipídica mientras que el grupo hidrofílico se encuentra en la superficie citosólica, lo que deja disponibles los hidroxilos de las posiciones D3, D4 y D5 accesibles a enzimas. Modificada de Strahl y Thorner (2007).

El precursor principal de los fosfoinosítidos, es el PtdIns, glicerofosfolípido con un grupo fosfato en posición D-1, principalmente sintetizado en el retículo endoplasmático (Gardocki y col., 2005; Lofke y col., 2008), o en estructuras derivadas del mismo (Kim y col., 2001). PtdIns es metabolizado a partir de la acción de quinasas de fosfoinosítidos.

Dentro del grupo de los fosfoinosítidos, la especie mas abundante y mejor caracterizada es el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PtdIns(4,5)P₂] y su principal precursor fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns4P). En todos los modelos eucarióticos, regulan diversas funciones estructurales y de desarrollo, como la biogénesis de membrana, homeostasis de lípidos, tráfico vesicular y organización y dinámica del citoesqueleto (D'Angelo y col., 2008; Vicinanza y col., 2008; Ischebeck y col., 2010; Saarikangas y col., 2010). Además, como se ha mencionado, ambas moléculas están involucradas en diversas rutas de señalización, no sólo como precursores de segundos mensajeros, sino también como moléculas de anclaje a la membrana regulando la localización de proteínas señalizadoras. Muchas de estas proteínas contienen dominios de unión a PtdIns(4,5)P₂ específicos, como son los dominios con homología a pleckstrina (PH), formados por aproximadamente 120 aminoácidos que se encuentran en proteínas relacionadas con transducción de señales, organización de actina y tráfico de membrana (Lemmon, 2003; Cozier y col., 2004).

5.1.5. Síntesis de PtdIns4P y PtdIns(4,5)P₂

PI puede ser fosforilado en posición D4, por PtdIns 4-quinasas para dar lugar a PtdIns4P (Fig. 8). Lsb6p es una quinasa no esencial localizada tanto en la membrana plasmática como vacuolar (Han y col., 2001; Shelton y col., 2003). Otra de las quinasas capaz de fosforilar al PtdIns en posición D4 es la codificada por *PIK1*. Se trata de una proteína localizada fundamentalmente en núcleo y aparato de Golgi. La síntesis de PtdIns4P en ambas estructuras por parte de esta quinasa es esencial, aunque se desconoce la función que puede tener en el núcleo, localización donde la proteína establece un equilibrio con el citoplasma (Strahl y col., 2005). La PtdIns 4-quinasa, Stt4p, se localiza en la membrana plasmática (Audhya y col., 2000; Routt y col., 2005), se encarga de generar PtdIns4P, que servirá como sustrato a la quinasa Mss4p para la generación de PtdIns(4,5)P₂. El PtdIns(4,5)P₂ generado en la membrana plasmática requiere de la actividad de Stt4p pero es independiente de Pik1p (Levine y Munro, 2002; Roy y Levine, 2004; Perera y col., 2004).

La proteína Mss4p, es la única quinasa de PtdIns4P descrita en *S. cerevisiae*. Se trata de una proteína esencial que se encuentra fundamentalmente en la membrana plasmática (Homma y col., 1998) aunque se sabe que contiene una secuencia de localización nuclear (NLS). Además de participar en la activación de la ruta CWI a través de la localización de la GTPasa Rho1p en la membrana (Audhya y Emr, 2002), la producción de PtdIns(4,5)P₂ se ha relacionado con otras funciones importantes para la viabilidad celular y es requerida para una correcta organización del citoesqueleto de actina en *S. cerevisiae* (Audhya y col., 2000; Audhya y col., 2004). Como se ha comentado, Mss4p, ha sido localizada en el núcleo (Audhya y Emr, 2003) donde se piensa que puede ser importante para la viabilidad celular a partir de su actividad sobre el PtdIns4P generado por Pik1p, formando así un “pool” de PtdIns(4,5)P₂ nuclear. El hecho de que Plc1p tenga la posibilidad de entrar y salir del núcleo (Huynh, 1998), apoya la importancia del papel nuclear de Mss4p.

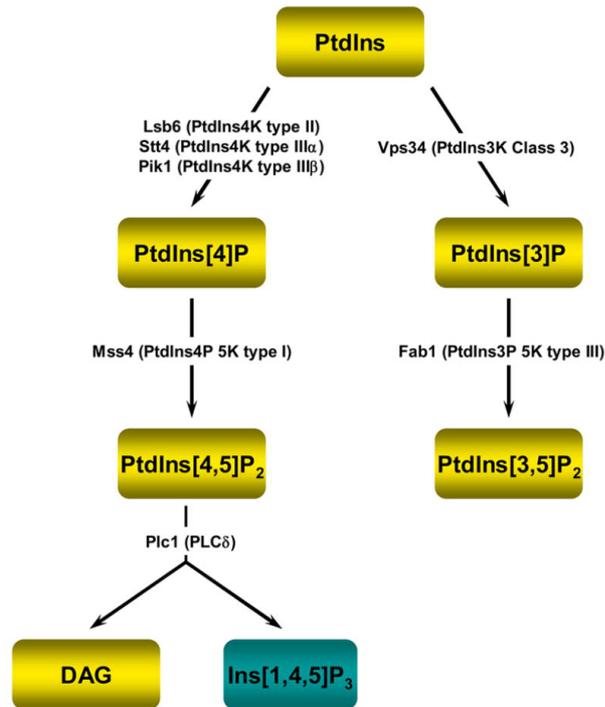


Figura 8. Reacciones de fosforilación de fosfoinosítidos en *S. cerevisiae*. Strahl y Thorner (2007).

5.1.6. Fosfatasa de PtdIns(4,5)P₂: Inp51-54p

Los niveles de PtdIns(4,5)P₂, además de estar controlados por la actividad de Mss4p y Plc1p, vienen determinados por la acción de proteínas con actividad 5-fosfatasa sobre PtdIns(4,5)P₂, denominadas Inp51p, Inp52p, Inp53p e Inp54p (Stolz y col., 1998a; Raucher y col., 2000). Tres miembros de esta familia (Inp51-53p), también poseen un segundo dominio catalítico similar a sinaptojanina de mamíferos, el denominado “Sac1-like domain” (Srinivasan y col., 1997) (Fig. 9).

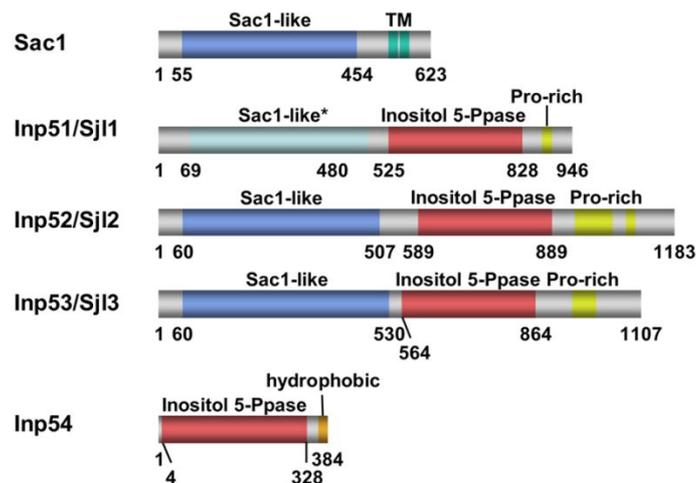


Figura 9. Estructura de los dominios de las fosfatasas de fosfoinosítidos en levadura. Las regiones coloreadas muestran regiones conservadas y otros motivos funcionales. Strahl y Thorner (2007).

La fosfatasa Inp52p, es parcialmente redundante en función con Inp51p e Inp53p, pero estas dos, tienen funciones independientes entre sí (Guo y col., 1999; Stolz y col., 1998a). Ninguno de los genes que las codifican es esencial para el crecimiento, sin embargo una triple deleción es letal y sólo la ausencia de *INP51* muestra un fenotipo de tolerancia a frío (Stolz y col., 1998b).

Inp51p es una proteína de 108 kDa. En su extremo carboxilo terminal encontramos un 30% de identidad y más de un 50% de similitud a dominios catalíticos de 5-fosfatasa OCLR-1 tipo II de humanos, mientras que en su extremo amino terminal posee similitud con *SAC1*, gen que codifica la 4-fosfatasa de PtdIns4P en *S. cerevisiae* (Novick y col., 1989). No obstante, este dominio no es funcional debido a mutaciones en residuos clave. Mutantes carentes de la fosfatasa Inp51p, muestran niveles elevados de PtdIns(4,5)P₂, mientras que su sobreexpresión, induce un descenso de los niveles del fosfoinosítido, dando lugar a un incremento en PtdIns4P (Stolz y col., 1998b; Guo y col., 1999). La fosfatasa Inp51p, no es esencial para la viabilidad celular, pero su ausencia provoca un fenotipo de tolerancia a bajas temperaturas, lo que se ha relacionado con los mayores niveles de PtdIns(4,5)P₂ en la célula (Stolz y col., 1998b). Los mecanismos que desencadenan esta tolerancia no han sido descritos, aunque, se han relacionado con el metabolismo y/o transporte de triptófano, ya que dicho fenotipo se observó en células de un fondo genético auxótrofo para triptófano (Stolz y col., 1998b) y mutaciones en la ruta de biosíntesis de este aminoácido están asociadas a sensibilidad a frío (Singh y Manney, 1974; Chen y col., 1994).

6. *S. cerevisiae* frente a los cambios ambientales: las rutas de MAPKs

S. cerevisiae, al igual que otros organismos eucariotas, posee complejas rutas de señalización que le permiten una rápida respuesta a cambios ambientales. Entre estas rutas de señalización destacan las cascadas de MAP quinasas (MAPKs). En general, están formadas por tres quinasas que actúan en serie: una MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK), una MAP quinasa quinasa (MAPKK) y una MAP quinasa (MAPK) (Chen y Thorner, 2007; Furukawa y Hohmann, 2013). Cuando la cascada es activada, la MAPKKK fosforila a la MAPKK, que a su vez fosforila a la MAPK. Estas cascadas, frecuentemente regulan factores de transcripción a través de su fosforilación mediada por la MAPK. De esta forma, diversas señales intracelulares y extracelulares, modulan la transcripción de genes específicos, ya sea por activación o inhibición de cascadas de MAPKs.

En *S. cerevisiae*, se han descrito cinco rutas de MAPKs, la ruta de crecimiento filamentoso/invasivo, la ruta de respuesta a feromonas, la ruta de construcción de la pared esporal, ruta de respuesta a alta presión osmótica (HOG) y ruta de integridad de la pared celular (CWI) (Fig. 10).

6.1. Ruta de respuesta a alta presión osmótica

La ruta HOG, ha sido relacionada tradicionalmente con la respuesta de la célula frente a estrés osmótico (Hohmann, 2009; Saito y Posas., 2012). No obstante, se ha establecido su papel en la distribución de proteínas dentro del Aparato de Golgi (Reynolds y col., 1998), en el mantenimiento de la pared celular (García-Rodríguez y col., 2000), en la tolerancia a ácido cítrico (Lawrence y col., 2004), metilglioxal (Aguilera y col., 2005), choque térmico (Winkler y col., 2002) o acumulación de proteínas mal plegadas (Torres-Quiroz y col., 2010). La parte superior de la ruta está formada por dos ramas de proteínas señalizadoras que regulan la MAPKK Pbs2p (Maeda y col., 1995). En una rama se encuentran la proteína de membrana Sho1p y la MAPKKK Ste11p. La otra, contiene un complejo de tres componentes formado por Sln1p, Ypd1p y Ssk1p, que regula la función de dos MAPKKKs parcialmente redundantes, Ssk2p y Ssk22p (Maeda y col., 1995; Posas y col., 1996). Ambas ramas confluyen en la activación de la MAPKK Pbs2p, que a su vez activa a la MAPK de la ruta, la proteína Hog1p.

Uno de los sensores descritos para esta ruta, la histidina quinasa Sln1p, es capaz de inducir la señalización a través de la ruta HOG en respuesta a un descenso de temperatura (Hayashi y Maeda, 2006; Panadero y col., 2006). Dicha señalización conlleva la activación de la MAPK Hog1p, que actúa como factor de transcripción, induciendo la activación de genes como *GPD1* o *GLO1*, entre otros (Panadero y col., 2006). El gen *GPD1* codifica una glicerol 3-fosfato deshidrogenasa, enzima clave en la síntesis de glicerol y se ha observado la acumulación de este osmolito en estas condiciones de estrés.

Merece la pena indicar que, la activación de la ruta HOG en presencia de un agente rigidificante de membrana como el DMSO, también depende del sensor Sln1p (Panadero y col., 2006). Por tanto, la rigidificación de la membrana (por hiperosmolaridad o por frío)

parece ser el factor clave en la generación de la señal, y la producción de glicerol es una respuesta esencial para la adaptación a estas condiciones.

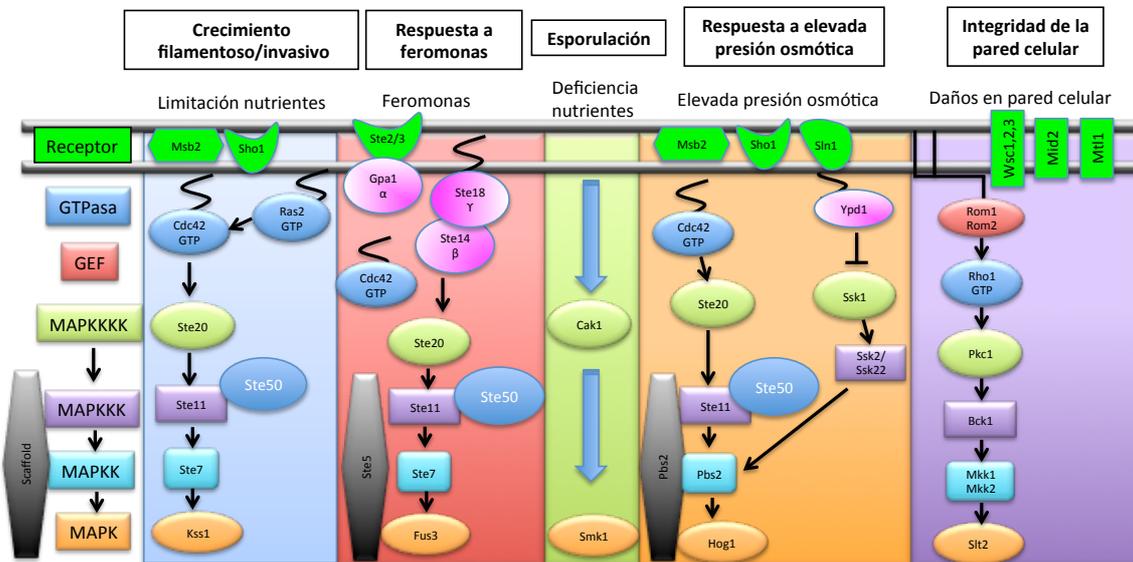


Figura 10. Rutas de MAPKs en *S. cerevisiae*.

6.2. Ruta de señalización de integridad de la pared celular (CWI): aspectos generales

Se trata de una ruta de señalización encargada de la detección y respuesta de la célula frente a estreses que perturban la pared celular, bien durante el crecimiento o como consecuencia de variaciones ambientales. Esta ruta responde a diversos tipos de estímulos, a través de su detección, por una serie de sensores de membrana, que transmiten la señal al interior celular para elaborar una respuesta adecuada. Dichos sensores envían la señal a una proteína G denominada Rho1p, considerada como el regulador general de la ruta por la diversidad de señales que es capaz de recibir y transmitir a diferentes dianas. En este caso, se encuentra regulando la activación de una cascada de MAPKs, a través de la fosforilación de la quinasa Pkc1p y la consiguiente fosforilación secuencial de Bck1p (MAPKKK), Mkk1p y Mkk2p (MAPKKs) y finalmente Slt2p, la MAPK de la ruta, que se encargará de fosforilar dianas adecuadas para regular la respuesta de la célula frente al estímulo recibido.

6.2.1. Ruta de integridad de la pared celular: componentes principales

6.2.1.1. Sensores: Wsc1-3p, Mid2p y Mtl1p

Los sensores de la ruta CWI están agrupados en dos sub-familias, los sensores tipo Wsc: Wsc1p, Wsc2p y Wsc3p (Verna y col., 1997; Lodder y col., 1999), y por otro lado, Mid2p y Mtl1p (Ketela y col., 1999; Rajavel y col., 1999), que muestran una baja identidad de secuencia, pero con una estructura general común (Fig. 11). Cada uno de ellos cuenta con un único dominio transmembrana, que conecta una pequeña cola carboxilo terminal citoplasmática, con una región extracelular relativamente larga.

En general, se piensa que estos sensores actúan como mecanosensores, tanto en la membrana, a través su dominio transmembrana, como en la pared gracias al dominio rico en cisteínas que se encuentra integrado en la misma. Por tanto, alteraciones tanto en la pared celular como en la membrana plasmática podrían ser detectadas por estos dominios y transferidas a las regiones citoplasmáticas para promover la transducción de la señal (Rodicio y Heinisch, 2010). Defectos en los sensores, generan fenotipos comunes a los presentados ante la pérdida de componentes de la ruta, por ejemplo, sensibilidad a choque térmico o a agentes que perturban la pared celular (Rojo Congo, blanco de calcoflúor o inhibidores de la glucano sintasa de la familia de las equinocandinas) o la membrana plasmática (SDS, cloropromazina o aceite del árbol del té) (Levin, 2005; Straede y col., 2007). Estos efectos son más severos en células carentes de Wsc1p, aunque la triple delección de *WSC1-3*, incrementa el defecto de crecimiento del mutante sencillo, sugiriendo una cooperación en las funciones dentro de la familia de sensores Wsc (Verna y col., 1997; Zu y col., 2001).

Por contra, la delección de *MID2* incrementa la tolerancia a blanco de calcoflúor o al aceite del árbol del té (Ketela, 1999; Straede, 2007), lo que puede explicarse por la activación de la síntesis de quitina llevada a cabo por Mid2p bajo condiciones de estrés (Bermejo y col., 2010). Cabe destacar que una combinación de mutantes nulos *mid2Δ* y *wsc1Δ* resulta en una letalidad sintética (Ketela, 1999; Rajavel, 1999), lo que podría deberse a un solapamiento funcional de ambos sensores en el mantenimiento de la integridad celular.

El dominio C-terminal de los sensores Wsc1p y Mid2p, interacciona con el dominio N-terminal del siguiente elemento de la ruta, Rom2p, y posiblemente de Rom1p (Philip y Levin, 2001), dos factores de intercambio de GDP/GTP que controlan la activación de la GTPasa Rho1p.

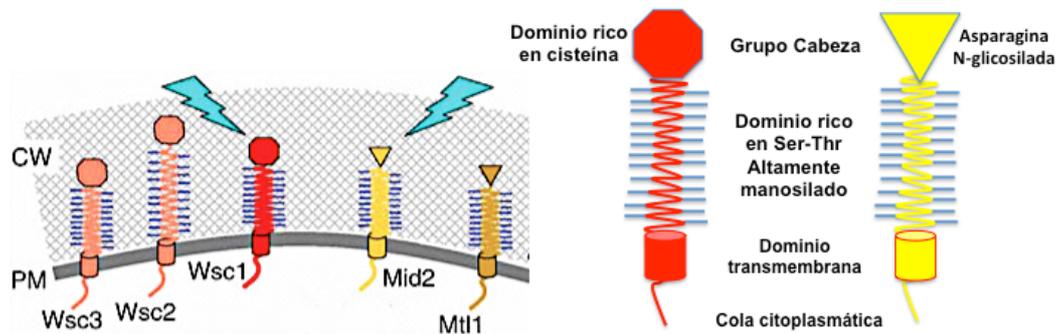


Figura 11. Representación de los sensores de membrana relacionados con la ruta de integridad de la pared celular. Modificado de Heinisch y Dufrene, 2010.

6.2.1.2. La proteína efectora Rho1

Rho1p pertenece a una familia de GTPasas que desempeñan un papel central en el crecimiento polarizado, tanto en células animales como en fúngicas (Levin, 2011). Esta familia está compuesta por las proteínas Rho1-5p y Cdc42p. La proteína Rho1p es considerada como el mayor regulador de la ruta de señalización CWI, tanto por ser la que recibe la mayor parte de estímulos detectados por los sensores de membrana, como por desempeñar un papel fundamental en la biogénesis de la pared celular, destacando su implicación en la activación de la proteína quinasa C (Pkc1p), en la actividad β -1,3-glucano sintasa (GS), en la organización del citoesqueleto de actina y en la secreción polarizada (Cabib y col., 1998). Como otras proteínas-G, Rho1p, fluctúa entre su estado activo, unida a GTP y el inactivo, unida a GDP. Este ciclo es regulado tanto por proteínas con actividad GTPasa denominadas GAPs (GTPasa Activating Proteins) como por factores intercambiadores de nucleótidos de guanosina, denominados GEFs (GTP Exchange Factors). Entre las proteínas GAP, destacan, Bem2p, Sac7p, Bag7p y Lrg1p. Cada una de ellas, regula a Rho1p para una función específica, siendo Bem2p y Sac7p las únicas que han sido descritas como reguladoras de su función en la ruta CWI (Martin y col., 2000; Schmidt y col., 2002). Por otro lado, Rho1p es estimulada principalmente por las proteínas GEF, Rom1p y Rom2p (Ozaki y col., 1996). Estas proteínas poseen una función redundante en la activación de Rho1p y la pérdida de ambas, es letal para la célula. Una característica a destacar en estas proteínas, es la presencia de dominios con homología a pleckstrina (PH), responsables de su unión a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, y por tanto de su correcta localización de en la membrana plasmática

(Audhya y Emr, 2002). El dominio N-terminal de Rom2p y el de Rom1p, es responsable de su asociación con Wsc1p y Mid2p y quizá con otros sensores (Philip y Levin, 2001). Se ha descrito un tercer GEF de Rho1p, denominado Tus1p, que parece tener un papel importante en la activación de la ruta CWI en condiciones de estrés relacionadas con los esfingolípidos de la membrana plasmática (Schmelzle y col., 2002). Además, Tus1p y Rom2p participan en la localización y activación de Rho1p durante la citoquinesis (Yoshida y col., 2006; Yoshida y col., 2009).

Recientemente, la proteína Rho1p ha sido implicada en una ruta de homeostasis de la fluidez de membrana, donde se encuentra regulando la activación de componentes centrales de la ruta. En este caso, tanto la GAP Sac7p como la GEF Tus1p, parecen ser las proteínas involucradas en la regulación de la activación de Rho1p para la transmisión de información acerca de la fluidez de la membrana (Lockshon y col., 2012).

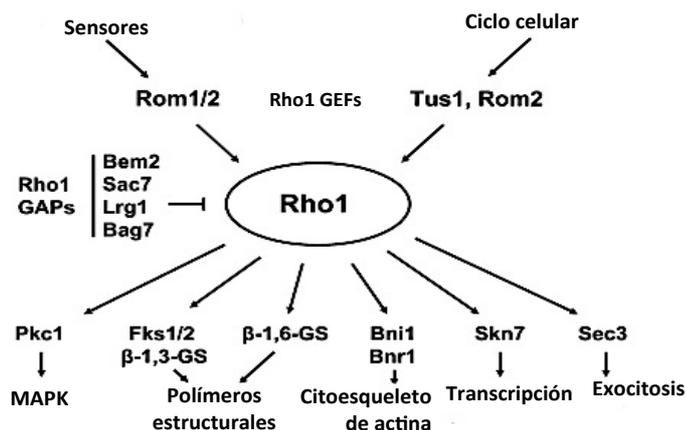


Figura 12. Reguladores y efectores de Rho1p. La localización y actividad de Rho1p es regulada a través de ciclo celular y en respuesta a estrés de pared captado por sensores de superficie, una familia de GEFs y un conjunto de GAPs. Seis conocidos efectores de Rho1p controlan la biogénesis de la pared celular a través de la síntesis de polímeros, polarización del citoesqueleto de actina, secreción y transcripción. Modificada de Levin, 2011.

6.2.1.3. Proteína quinasa C (Pkc1p)

A diferencia de las células de mamíferos, donde se han encontrado 10 isoformas de proteína quinasa C y dos quinasas relacionadas (Mellor y Parker, 1998), el genoma de *S. cerevisiae*, codifica para un solo ortólogo denominado *PKC1* (Levin y col., 1990). Fue el primer componente descrito de la ruta CWI y su regulación ha sido estudiada en profundidad (Levin, 2011). Su delección resulta letal para la célula, excepto en condiciones hiperosmóticas,

aún así, la ausencia de actividad de Pkc1p, resulta en un defecto de crecimiento mayor que el detectado por la pérdida de cualquier otro elemento de la ruta, lo que indica que Pkc1p puede regular múltiples rutas (Levin, 2011). Además, Pkc1p es capaz de asociarse y ser activada por Rho1p, y su regulación por diacilglicerol o Ca^{+2} , como se observa en las PKCs de mamíferos, es controvertida (Tisi y col., 2004).

6.2.1.4. El módulo de MAPKs: Bck1p, Mkk1p/Mkk2p y Slt2p

Pkc1p, activada por Rho1p, transmite la señal al módulo de MAPKs mediante fosforilación (Fig. 13), comenzando por Bck1p (MAPKKK), las MAPKKs redundantes, Mkk1p y Mkk2p, y finalmente la MAPK Slt2p (Levin, 2005; Heinisch, 2005) (Fig. 13).

Pkc1p fosforila a Bck1p en diversos sitios (Ser939, Thr1119 y Ser1134) entre su dominio regulador N-terminal y su dominio catalítico C-terminal (Levin y col., 1994). Es particularmente importante el sitio de fosforilación localizado en el residuo Thr1119, ya que ciertas mutaciones en el mismo resultan en una señalización constitutiva, sugiriendo que el bloqueo de una interacción que implique a este residuo es clave para la activación de la MAPKKK. En condiciones de activación, Bck1p fosforila a las MAPKKs, Mkk1p y Mkk2p, en residuos conservados de serina y treonina de su dominio de activación.

Los genes *MKK1* y *MKK2* fueron aislados como supresores en multicopia del efecto lítico de la temperatura sobre el mutante *pkc1Δ* y defectos en el crecimiento del mutante *bck1Δ* (Irie y col., 1993). La mutación de estas proteínas por separado no causa ningún fenotipo aparente, pero en combinación provocan defectos en el crecimiento que se alivian mediante estabilización osmótica. Estas MAPKKs son funcionalmente redundantes y necesarias para la activación de la MAPK Slt2p. Finalmente, Mkk1p/Mkk2p fosforilan y activan a la MAPK Slt2p, en los residuos de treonina y tirosina del motivo característico de las MAPKs, Thr-X-Tyr, dentro del dominio de activación. Recientemente, se ha descrito un papel de retrofosforilación de Slt2p sobre sus MAPKKs, que podría tener cierto papel en la retroalimentación positiva de la ruta (Jimenez-Sanchez y col., 2007).

Slt2p es ortólogo funcional de la MAPK Erk5p de humanos (Truman y col., 2006). Fue descrito como supresor del fenotipo de lisis térmica dependiente del mutante *lyt2Δ* (Torres y col., 1991) y del mutante *bck1Δ* (Lee y col., 1993). Slt2p se localiza tanto en el núcleo como

en el citoplasma (Kamada y col., 1995). Además, una pequeña proporción de Sl2p, así como Mkk1p y Mkk2p, se localizan de manera dependiente del ciclo celular en la punta de emergencia de la yema y en el septo formado entre la célula madre y la hija. Adicionalmente, Sl2p se localiza en la punta del *shmoo* durante los cambios morfológicos que sufre la levadura bajo la acción de feromonas (Baetz y col., 2001).

Se ha descrito la existencia de un parólogo a Sl2p, codificado por el gen *MLP1* (*Mpk1-like protein kinase*) (Watanabe y col., 1997). Mlp1p es una pseudoquinasa que presenta un elevado grado de homología (53% de su secuencia) con Sl2p. Al igual que esta MAPK, Mlp1p interacciona con el factor de transcripción de la ruta CWI, Rlm1p (Watanabe y col., 1997). Sin embargo, Mlp1p no posee varios dominios conservados en MAPKs críticos para la actividad proteína quinasa.

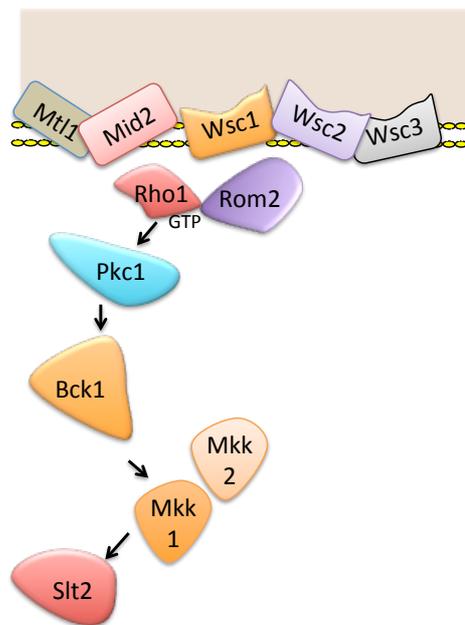


Figura 13. Representación de la ruta de integridad de la pared celular con sus componentes principales.

6.2.1.5. Dianas nucleares de la MAPK Sl2p

6.2.1.5.1. El factor transcripcional Rlm1p

El factor transcripcional Rlm1p, aislado como supresor de la letalidad causada por una forma constitutiva de Mkk1p (Watanabe y col., 1995; Yashar y col., 1995), es el responsable de la mayoría de respuestas transcripcionales desencadenadas tras la activación de la ruta. La

proteína Rlm1p, reside en el núcleo, donde es fosforilada en los residuos Ser427 y Thr439 por Slt2p, estimulándose su actividad (Jung y col., 2002). Regula la expresión de al menos 25 genes, la mayoría de los cuales codifica proteínas de pared celular o implicadas en la biogénesis de la misma (Kamada y col., 1996). A diferencia de lo que ocurre en mutantes de la ruta CWI, la delección de *RLMI* no conduce a fenotipos de sensibilidad frente a sustancias que alteran la pared celular como el blanco de calcoflúor o la Zimoliasa (Dodou y Treisman, 1997), alta temperatura, carencia de nitrógeno o presencia de glicerol en el medio; únicamente se observa un leve fenotipo de sensibilidad a cafeína (Watanabe y col., 1995), típico de mutantes en elementos de la ruta CWI asociado a defectos en la transducción de señal. Sin embargo, la activación transcripcional de la mayoría de los genes inducidos en respuesta a altas temperaturas (39°C) o daños en la pared producidos por el Rojo Congo o Zimoliasa, dependen de Rlm1p (Jung y Levin, 1999; Garcia y col., 2004; Garcia y col., 2009).

6.2.1.5.2. El complejo transcripcional SBF (Swi Binding Factors)

Se trata de un complejo transcripcional heterodimérico formado por los factores transcripcionales Swi4p y Swi6p, que se encarga de regular la transcripción de genes dependientes del ciclo celular, en fase de transición G1/S o *Start*. Swi4p es la subunidad de unión específica a DNA, en concreto a la secuencia SCB (Swi4,6- dependent cell cycle box; CACGAAA) (Taylor y col., 2000), mientras que Swi6p, es la subunidad reguladora, que permite la unión del complejo al DNA a través de Swi4p (Levin, 2011).

Análisis genéticos y bioquímicos, muestran la regulación de SBF por parte de Slt2p en respuesta a estrés de la pared celular. Por un lado, la lisis celular sufrida por un mutante *slt2Δ* es suprimida por la sobreexpresión de Swi4p (Madden y col., 1997). Además, tanto el mutante *swi4Δ* como *swi6Δ*, son sensibles a blanco de calcoflúor (Igual y col., 1996). Se ha demostrado que Slt2p es capaz de asociarse a SBF *in vivo* (Madden y col., 1997) y con Swi4p *in vitro* (Baetz y col., 2001), además de fosforilar a Swi6p *in vivo* e *in vitro* en respuesta a estrés de la pared celular (Madden y col., 1997). No obstante, se ha descrito, que Slt2p o Mlp1p activados, forman un complejo con Swi4p, que se asocia con el promotor de *FKS2* de forma independiente de Swi6p (Kim y col., 2008). Parece ser, que Slt2p libera la interacción autoinhibidora de Swi4p uniéndose a una región de unión vecina al sitio de unión a Swi6p (Truman y col., 2009). No obstante, es necesario que Swi6p sea reclutado al complejo para que se active la transcripción de *FKS2*. Recientemente se ha observado que la función de la

fosforilación de Slt2p sobre Swi6p es la de provocar su salida del núcleo (Kim y col., 2010). En condiciones de activación de Slt2p, Swi6p es reclutada al núcleo una vez formado el complejo Swi4p-Slt2p para iniciar la transcripción, siendo independiente este hecho de la actividad catalítica de Slt2p. Posteriormente Slt2p fosforila a Swi6p con la consecuente salida de esta proteína del núcleo.

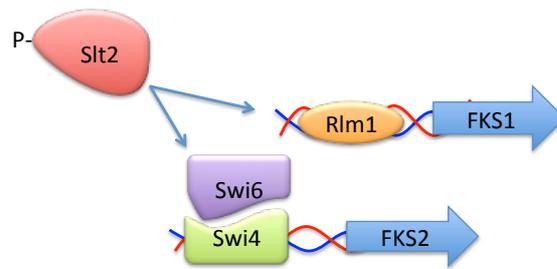


Figura 14. Representación de los principales factores transcripcionales controlados por Slt2p.

6.2.2. Activación de la ruta de señalización CWI

La ruta de integridad de la pared celular es regulada a través del ciclo celular. No obstante, también responde a una gran variedad de estímulos externos o internos que causan estrés sobre la pared celular y/o la membrana plasmática, como choque térmico (Kamada y col., 1995), hipoosmolaridad (Davenport y col., 1995), presencia de feromonas (Buehrer y Errede, 1997), estrés oxidativo (Vilella y col., 2005), despolimerización del citoesqueleto de actina (Delley y Hall, 1999 ; Harrison y col., 2001), mutaciones en componentes de la pared celular (de Nobel y col., 2000), compuestos que causan daños sobre la pared de forma directa o indirecta (Ketela y col., 1999; de Nobel y col., 2000; Martin y col., 2000; Garcia y col., 2004), pH alcalino (Serrano y col., 2006), radiación UV (Bryan y col., 2004), acumulación de proteínas mal plegadas (Bonilla y Cunningham, 2003; Chen y col., 2005) o turgencia (Beese y col., 2009).

En cuanto a los mecanismos que disparan la señal, estos parecen centrarse en la expansión de la membrana plasmática y en cambios en la turgencia y su conexión física con la pared. No podemos olvidar que los sensores de la ruta se encuentran enclavados en la membrana y conectados a la pared celular a través del espacio periplásmico (Rodicio y Heinisch, 2010). Se entiende así, que drogas que afectan a diferentes polímeros de la pared, alterando su composición, organización y estructura, determinen el disparo de la señal.

Además, mutaciones que provocan el incremento de la concentración de potasio (*ppz1/2Δ*) o bien de glicerol (*rgc1/2Δ*), y por tanto, el aumento de la presión de turgencia sobre la membrana, activan a Slt2p (Merchan y col., 2004; Beese y col., 2009). En la misma línea, la acumulación de trehalosa, como consecuencia de la exposición de las células a un choque térmico, también produce un aumento de la presión de turgencia que puede ser el responsable de la activación de la cascada de señalización (Neves y François, 1992; De Virgilio y col., 1994). La cloropromazina, una molécula anfifílica capaz de insertarse en la bicapa lipídica y unirse a lípidos aniónicos, como los polifosfoinosítidos, perturbando su función, es un activador de la MAPK Slt2p (Kamada y col., 1995). Por el contrario, la presencia de agentes que incrementan la osmolaridad extracelular como el sorbitol, bloquean la expansión de la membrana, al neutralizar la presión de turgencia y por tanto, previenen la activación de la ruta. Finalmente, resultados recientes de Lockshon y col. (2012), han implicado a la ruta CWI en la regulación de la homeostasis de la fluidez de la membrana.

6.2.3. Regulación negativa de la ruta

En *S. cerevisiae* se han identificado cinco fosfatasa encargadas de regular de forma negativa la actividad de Slt2p, las fosfatasa de tirosina, Ptp2p y Ptp3p, las fosfatasa duales Sdp1p y Msg5p, y Ptc1p, perteneciente a la familia de las fosfatasa tipo 2C, que desempeñan su actividad fosfatasa sobre residuos de serina y treonina (Ariño y col., 2011). Mientras que las fosfatasa Ptp2p, Ptp3p y Sdp1p, actuarían restableciendo el estado basal de Slt2p tras una situación de estrés (Hahn y Thiele, 2002), la fosfatasa Msg5p, participa en el mantenimiento de una actividad basal de la MAPK en condiciones óptimas de crecimiento (Marin y col., 2009). Entre esta fosfatasa y Slt2p, existe una regulación recíproca, por la cual, una vez activada la MAPK, esta fosforila a Msg5p disminuyendo la afinidad entre ellas y permitiendo el mantenimiento de la fosforilación de Slt2p cuando es necesario prolongar su activación en respuesta a un estrés de pared persistente (Kamada y col., 1995; Beese y col., 2009).

En cuanto a Ptc1p, una fosfatasa bien conocida por su papel en la regulación de la ruta HOG (Saito y Tatebayashi, 2004), existen evidencias de que su actividad también es crucial para el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Mutaciones en *PTC1* exhiben letalidad sintética con genes importantes de la ruta CWI como *SLT2*, *FKS1*, *GAS1* o *SMI1* (Lesage y col., 2004). Además, mutantes *ptc1* muestran una clara sensibilidad a agentes que perturban la pared o a pH elevado (Gonzalez y col., 2006). Al igual que en el caso de la

regulación de la ruta HOG (Mapes y Ota, 2004), Ptc1p actuaría a través de la proteína adaptadora Nbp2p, que mediaría en la interacción de Ptc1p con la MAPKKK Bck1p, controlando así la activación del módulo de MAPKs de la ruta (Du y col., 2006; González y col., 2006; Gorelik y col., 2011). Además, se ha relacionado a Ptc1p con el control de la herencia del retículo endoplasmático y las mitocondrias por parte de Slt2p (Li y col., 2010) (Fig. 15). Así, mutantes *ptc1Δ* o *nbp2Δ*, muestran un retraso en la liberación de túbulos de retículo endoplasmático del cuello de la yema a su periferia, y además experimentan un incremento en la fosforilación de Slt2p. Por tanto, el hecho de que la delección de la MAPK suprime estos defectos, sugieren que Ptc1p, podría regular la herencia del retículo endoplasmático inactivando la ruta de integridad de la pared celular. No obstante, el hecho de que los fenotipos mostrados por mutantes *ptc1Δ* sean más severos y sólo se recuperen parcialmente en presencia de sorbitol, indica que esta fosfatasa, regula otras rutas además de la ruta CWI (González y col., 2006).

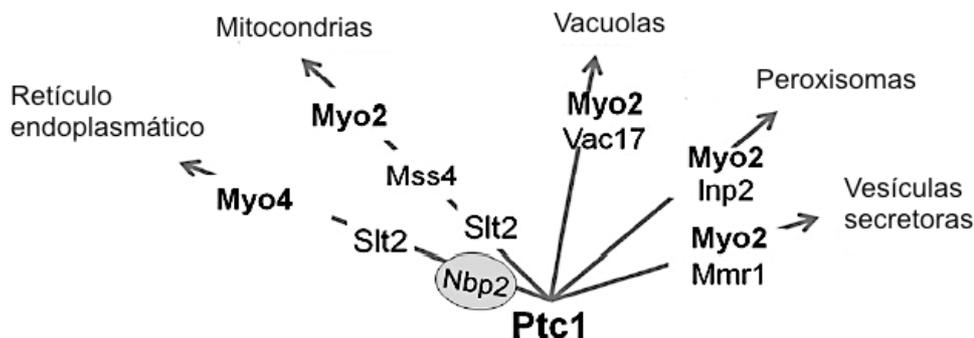


Figura 15. Representación del control de la herencia de orgánulos por parte de Ptc1p. Modificado de Ariño y col. (2011).

6.3. Señalización por inositol fosfatos y difosfoinositol fosfatos

En determinadas condiciones, PtdIns(4,5)P₂ es hidrolizado por Plc1p, liberándose dos segundos mensajeros, 1,2-DAG e Ins(1,4,5)P₃ (InsP₃). En mamíferos, DAG permanece en la membrana activando a miembros de la familia PKC, entre otras dianas (Brose y Rosenmund, 2002). Por otro lado, InsP₃, se une a receptores específicos, localizados principalmente en el RE, induciendo la liberación de Ca⁺² (Taylor y Tovey, 2010). No obstante, aunque la actividad fosfolipasa ha sido descrita en otros modelos eucarióticos (Rebecchi y Pentylala,

2000; Munnik y Vermeer, 2010), no se han encontrado ortólogos a los receptores de InsP_3 , ni evidencias de su conexión entre Pkc1p y Plc1p en levaduras (Wera y col., 2001).

En *S. cerevisiae* se han descrito cuatro quinasas responsables de la síntesis, a partir de InsP_3 , de inositol fosfato (InsPs) y difosfoinositoles fosfato (DPIInsPs) (Fig. 16), que constituyen una ruta de señalización con importantes funciones celulares (York y col., 1999; Saiardi y col., 2000; Odom y col., 2000; Mulugu y col., 2007).

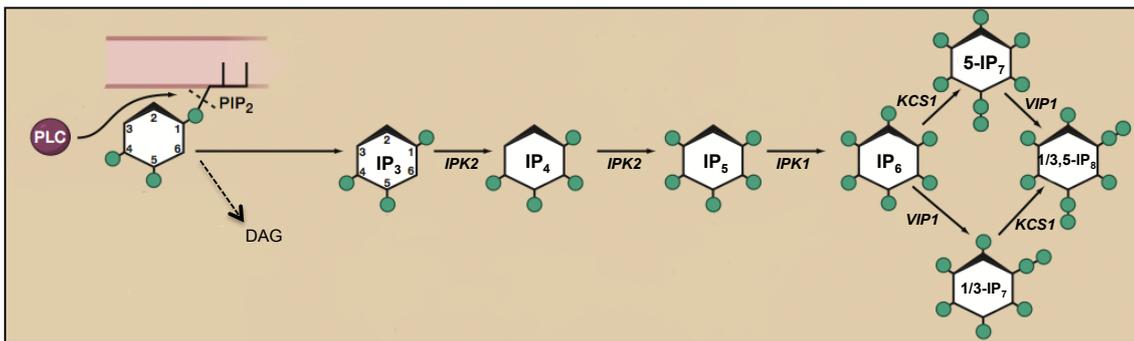


Figura 16. Representación de la ruta de síntesis de inositol fosfatos y difosfoinositol fosfatos. Modificado de Hatch y York (2010).

La primera enzima requerida para la síntesis de InsP_s a partir de InsP_3 , es Ipk2p , que posee actividad dual $\text{InsP}_3/\text{InsP}_4$ 6-/3-quinasa, y que convierte inositol InsP_3 en inositol 1,3,4,5,6-pentaquisfosfato (InsP_5), a través de la generación del intermediario inositol 1,4,5,6-tetraquisfosfato (InsP_4). Esta proteína forma parte de complejos de respuesta a arginina (Odom y col., 2000), y es requerida para inducir genes activados en respuesta a fosfato, como *PHO5* (Steger y col., 2003).

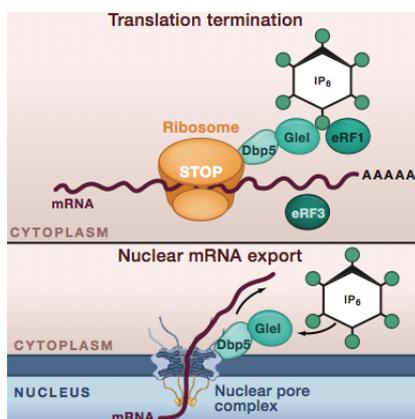


Figura 17. Regulación de la traducción y el transporte de mRNA por InsP_6 . Hatch y York, 2010.

InsP_5 , es metabolizado por otra quinasas, Ipk1p , una InsP_5 2-quinasa, dando lugar a inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato (InsP_6). Este compuesto, actúa como regulador positivo del transporte de mRNA mediado por Gle1p , factor esencial asociado a NPC (Nuclear Pore Complex), requerido para el transporte de mRNA a través de la membrana nuclear (Fig. 17). Además, se ha descrito, la regulación de Gle1p dependiente de InsP_6 , en la terminación de la traducción de mRNA, también a través de la activación de Dbp5p (Bolger y col., 2008) (Fig. 17).

Los pirofosfatos de inositol o difosfoinositol fosfatos (PPInsPs o DPInsPs) son una subclase de fosfoinositoles caracterizados por tener enlaces difosfato de alta energía. Hay dos quinasas descritas como las responsables de su síntesis, Kcs1p y Vip1p. Ambas funcionan como quinasas de inositol hexaquisfosfato (IP6K) e inositol heptaquisfosfato quinasas (PPInsP5K), generando diferentes isómeros de InsP_7 , 5- InsP_7 en el caso de Kcs1p y 1/3- InsP_7 en el caso de Vip1p (Lin y col., 2009). Además, ambas quinasas actúan de forma conjunta para generar InsP_8 a partir de InsP_6 (Otto y col., 2007; Mulugu y col., 2007; Padmanabhan y col., 2009). Se piensa que Kcs1p puede participar en procesos de endocitosis (Saiardi y col., 2002), aunque su función principal parece ser la de modular la homeostasis de los telómeros (Saiardi y col., 2005; York y col., 2005). Por otra parte, la actividad quinasa de Vip1p

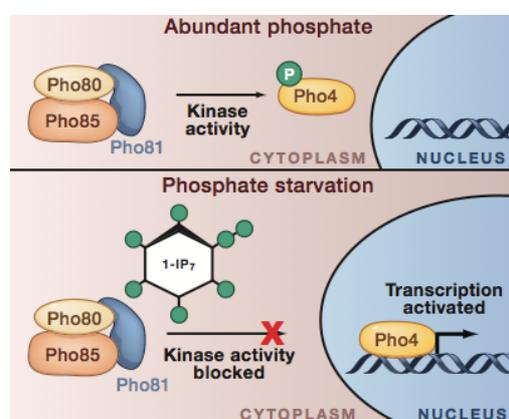


Figura 18. Regulación del complejo Pho81-Pho80-Pho85 por 1/3- IP_7 en respuesta a los niveles de fosfato. Hatch y York, 2010.

formadora de 1/3- IP_7 se ha relacionado con la regulación de la ruta de señalización en respuesta a fosfato (PHO). Durante este proceso (Fig. 18), cuando el fosfato es limitado, Vip1p produce 1/3- IP_7 , que se une al complejo quinasa Pho81p-Pho80p-Pho85p inhibiendo su actividad quinasa y provocando así la defosforilación y acumulación nuclear del factor de transcripción Pho4p y la consiguiente transcripción de genes *PHO* (Lee y col., 2008; York y Lew, 2008).

Finalmente, los PPInsPs, pueden actuar como donadores de grupos fosfato en reacciones de fosforilación no enzimática de proteínas en células eucariotas (Bhandari y col., 2007; Draskovic y col., 2008; Saiardi y col., 2004), actividad que ha sido relacionada con el control de la expresión de genes glicolíticos y de la dinámica energética de la célula (Szijgyarto y col., 2011).

6.4. Comunicación entre rutas de señalización

La exposición de las células a constantes cambios ambientales requiere que éstas sean capaces de detectar dichos cambios y elaborar respuestas que pasan por la necesidad de variaciones en la expresión génica. Dicha respuesta, requiere un esfuerzo coordinado de varias rutas para permitir, con un número limitado de proteínas, superar el complicado reto de

sobrevivir ante condiciones desfavorables. Además, dicha coordinación resulta esencial para mantener la especificidad de cada una de las rutas frente a estreses específicos, así como permitir la activación de una misma MAPK ante un amplio rango de variaciones ambientales con respuestas apropiadas.

6.4.1. Comunicación entre la ruta HOG y la ruta de integridad de la pared celular

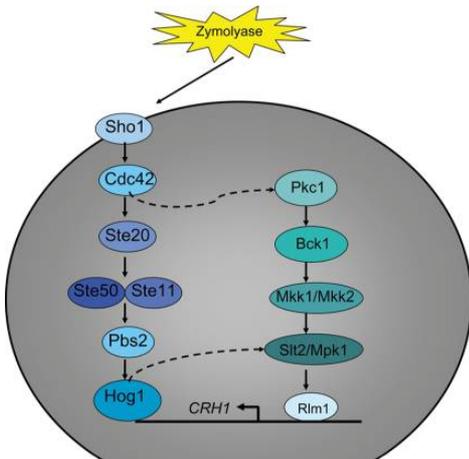


Figura 19. Mecanismo propuesto de respuesta celular a Zimoliasa en *S. cerevisiae* al descenso de pH. Fuchs y Mylonakis, 2009.

En *S. cerevisiae*, cambios osmóticos externos inducen respuestas que implican tanto a la ruta HOG como a la ruta CWI. En general, la ruta CWI es capaz de responder a condiciones hipoosmóticas mientras que la ruta HOG responde ante condiciones de hiperósmosis (Davenport y col., 1995). Por tanto, debe existir algún tipo de comunicación entre ambas rutas para coordinar su regulación ante estas variaciones en el medio. Son diversas las evidencias que apoyan esta comunicación.

Así, para la activación de Slt2p ante una exposición a Zimoliasa (Fig. 19), es necesaria

la activación de Hog1p a través de la rama SHO1 de la ruta (Bermejo y col., 2008; García y col., 2009). Ante un descenso en el pH del medio (Fig. 20), el sensor Mid2p juega un papel fundamental (Claret y col., 2005), no obstante, la ruta CWI recibe la influencia lateral de la proteína Rgd1p. *RGDI* codifica una proteína cuya expresión bajo condiciones de pH ácido es dependiente de Hog1p (Gatti y col., 2005). Finalmente, células con mutaciones en componentes de la ruta HOG muestran mayor resistencia a blanco de calcoflúor que la correspondiente cepa silvestre (García-Rodríguez y col., 2000), lo que sugiere alteraciones en la pared.

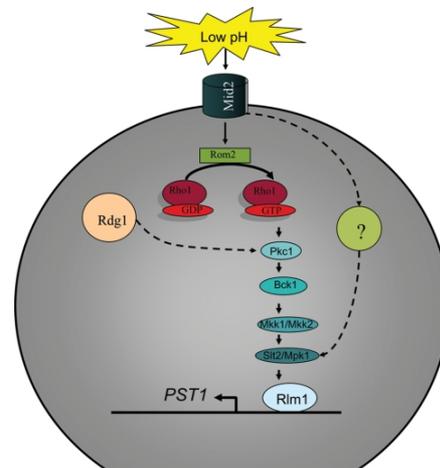


Figura 20. Mecanismo propuesto de respuesta celular en *S. cerevisiae* al descenso de pH. Fuchs y Mylonakis, 2009.

6.4.2. Las rutas TOR y PKA y su relación con la ruta de integridad de la pared celular

En *S. cerevisiae*, las rutas TOR (Target of Rapamycin) y proteína quinasa A dependiente de cAMP (cAMP-PKA) son las dos principales rutas encargadas de señalar los niveles de nutrientes del medio para regular el crecimiento celular (De Virgilio y Loewith, 2006; Santangelo, 2006; Soulard y col., 2009). La ruta TOR esta controlada por dos complejos TORC1 y TORC2 (Wullschleger y col., 2006). El complejo TORC1, sensible a rapamicina, controla el crecimiento celular en respuesta a nutrientes estimulando procesos anabólicos e inhibiendo procesos catabólicos (Crespo y Hall, 2002; Loewith y col., 2002; Reinke y col., 2004; De virgilio y Loewith, 2006). PKA, es parte de la cascada de señalización RAS-cAMP (Fig. 21), que controla varios procesos celulares en respuesta a la fuente de carbono del medio (Santangelo, 2006). La subunidad catalítica de PKA es codificada por los genes *TPK1*, *TPK2*, y *TPK3* y la subunidad reguladora por *BCY1* (Cannon y Tatchell, 1987; Toda y col., 1987). En ausencia de glucosa, dos proteínas Bcy1p se unen a dos proteínas Tpkp para dar lugar a la forma inactiva de PKA. En presencia de glucosa, la adenilato ciclasa se encuentra en su forma activa y produce cAMP a partir de ATP. cAMP activa a PKA uniéndose a Bcy1p y liberando la subunidad catalítica TPK (Santangelo, 2006).

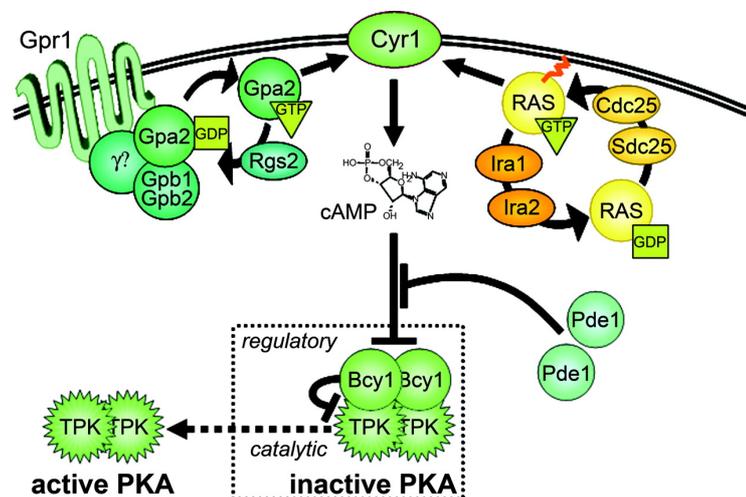


Figura 21. Ruta de señalización por PKA. Santangelo, 2006.

TORC1 y PKA regulan dianas comunes para activar o inhibir el mismo proceso biológico (Santhanam y col., 2004; Stephan y col., 2009). Incluso, algunos datos sugieren que TORC1 es un activador de PKA, situándose ambas quinasas en la misma ruta de señalización (Schmelzle y col., 2004; Zurita-Martinez y Cardenas, 2005; Urban, 2007). Recientemente,

algunos trabajos apuntan a la conexión entre la ruta CWI y la señalización a través de TORC1 y PKA.

Se ha observado, que TORC1 (Fig. 22), bajo ciertas condiciones favorables para la célula, previene la activación de la ruta CWI a través de sus efectores Sit4p-Tap42p, que actuarían evitando cambios en la membrana que activasen a los sensores de la ruta o bien regulando negativamente la activación de elementos situados por encima de Pkc1p (Torres y col., 2002). Este elemento podría ser la proteína Rom2p, como ha sido sugerido por Kuranda y col. (2006) en sus ensayos con cafeína. De forma similar al efecto de la rapamicina, la cafeína inhibiría la función del complejo TORC1, activando la ruta CWI e inhibiendo la ruta Ras/cAMP, lo que desencadena la respuesta ante el estrés. Por otra parte, Soulard y col. (2010), establecen un modelo según el cual, TORC1 fosforila a una de sus dianas, Sch9p (Urban y col., 2007), que se encarga de mantener inactiva a la MAPK Slt2p. Además, se establece la relación directa entre Slt2p y la subunidad reguladora de PKA, Bcy1p, de forma que aquella, una vez activada, es capaz de fosforilar a esta y mantener PKA en su forma inactiva. Finalmente, se ha descrito que el sensor Mtl1p, es capaz de detectar estrés oxidativo o deficiencias de glucosa en el medio, inactivando a Tor1p y Ras2p, a través de Rom2p y Rho1p, pero no de otros elementos de la ruta de integridad de la pared celular, para así, reprimir la transcripción de genes ribosómicos, para inducir la transcripción mediada por Msn2p/Msn4p y para reducir los niveles de cAMP y por tanto la activación de PKA (Petkova y col., 2010).

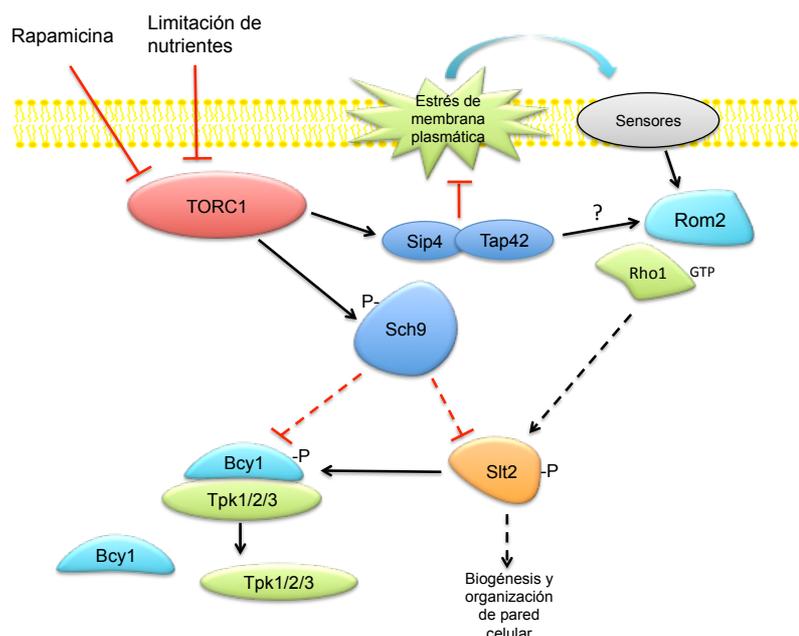


Figura 22. Modelos de comunicación entre TORC1, PKA y elementos de la ruta CWI.

6.4.3. Comunicación entre fosfoinosítidos y elementos de la ruta de integridad de la pared celular

Múltiples evidencias apuntan a la regulación de diversas funciones celulares a través de la comunicación entre fosfoinosítidos y ciertos elementos de la ruta de integridad de la pared celular. Como se ha descrito previamente, los niveles de PtdIns(4,5)P₂ dependen de la actividad de ciertas quinasas y fosfatasas. De esta forma, dichas enzimas regulan la activación de la ruta provocando el reclutamiento de Rom2p, que posee un dominio de interacción con el fosfoinosítido, a las proximidades de la GTPasa Rho1p, para activarla (Audhya y Emr, 2002; Morales-Johansson y col., 2004). De acuerdo con esto, la disrupción de *INP51* suprime el defecto de crecimiento a elevada temperatura de mutantes *wsc1Δ* o *rom2Δ*, elementos de la ruta (Audhya y Emr, 2002). Finalmente, se han descrito defectos sintéticos de la combinación de un alelo nulo *inp51Δ* y mutaciones en el gen *SAC7*, que codifica una proteína inhibidora de Rho1p, y que funciona como antagonista de Rom2p (Morales-Johansson y col., 2004), ambos elementos importantes para la activación de la ruta de integridad de la pared celular.

La proteína Mss4p y por tanto PtdIns(4,5)P₂ son requeridos para una correcta organización del citoesqueleto de actina en *S. cerevisiae* (Audhya y col., 2000; Audhya y col., 2004). En relación con esta función se sabe que calmodulina, funciona por encima de Mss4p en una ruta que controla la organización del citoesqueleto de actina a través de PtdIns(4,5)P₂ (Kubler y col., 1994; Jurado y col., 1999) de forma independiente de la MAPK Slt2p (Nakamura y col., 1996). Además, se ha observado que *MSS4*, junto a elementos de la ruta CWI como *RHO2*, *ROM2* y *PKC1*, son supresores de un mutante *tor2Δ* en el control de la distribución polarizada del citoesqueleto de actina dependiente de ciclo celular (Helliwell y col., 1998). Por otra parte, se sabe que la sobreexpresión de *MSS4* mejora el crecimiento celular de ciertos mutantes de secreción (Routt y col., 2005), regulando la fusión de vesículas secretoras a la membrana plasmática por una activación mediada por lípidos (Halachmi y Lev, 1996; Hay y Scheller, 1997; Carr y col., 1999). Finalmente, Mss4p actúa por encima de *ROM2*, *RHO2* y *PKC1* en una ruta dependiente de esfingolípidos, esencial para el crecimiento celular, ya que defectos asociados al tratamiento con miriocina (un inhibidor de la biosíntesis de esfingolípidos) son suprimidos por niveles elevados de *MSS4*, *RHO2*, *ROM2* y *PKC1* (Kobayashi y col., 2005).



**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 a 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.

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, en particular, estrés por frío y congelación, por lo que, un mejor entendimiento de la fisiología y de los determinantes genéticos y moleculares responsables de esta respuesta, es crucial para establecer estrategias potencialmente útiles.

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.

Los mecanismos moleculares y las alteraciones fisiológicas que tienen lugar en la levadura en respuesta a bajas temperaturas son poco conocidos. Se sabe que, ante variaciones en las condiciones del entorno las rutas de MAPKs van a desempeñar un papel fundamental en la detección del estímulo, la transducción de la señal al núcleo y la elaboración de una respuesta que permita a la célula adaptarse a dichos cambios. No obstante, no hay una ruta de transducción de la señal o factor transcripcional que responda exclusivamente ante el descenso de la temperatura. La fosforilación de Hog1p desencadena la activación de un programa transcripcional a bajas temperaturas, incrementándose la síntesis de glicerol y determinando la supervivencia de la levadura a congelación (Panadero y col., 2006). Sin embargo, la señalización mediada por Hog1p es requerida sólo para la expresión de un subgrupo de genes inducidos por frío. Conocidos marcadores de esta condición de estrés como *OLE1* (desaturasa de ácidos grasos), *TIP1* (manoproteína de pared celular con posible actividad lipasa) y *NSRI* (proteína nuclear que se une a secuencias de localización nuclear), se

inducen a bajas temperaturas independientemente de la actividad de la MAPK Hog1p, apoyando la idea de que otras rutas de transducción son operativas en respuesta a un descenso térmico (Panadero y col., 2006).

En cuanto a la ruta de integridad de la pared celular, se sabe que su activación no está restringida a un estímulo específico, sino que puede responder frente a compuestos que tienen como diana componentes de la pared celular, estrés oxidativo o choque térmico, entre otros (Fuchs y Mylonakis, 2009). En particular, la exposición a temperatura elevada induce un incremento de la fosforilación de la MAPK Slt2p (Kamada y col., 1995), y mutantes nulos en componentes de la ruta muestran lisis celular cuando son cultivados en estas condiciones (Levin, 2011). Además, la pérdida de *PKC1* resulta en un fenotipo de lisis celular osmoremediable, incluso a la temperatura óptima de crecimiento, sugiriendo así una función general de la ruta CWI o de subrutas de la misma en estrés térmico. Sin embargo, no hay evidencias de este tipo de regulación a bajas temperaturas.

Existen evidencias de que la extensión de la membrana plasmática es el estrés físico que subyace tras la activación de la ruta CWI (Kamada y col., 1995). Sin embargo, la activación de Slt2p podría proceder de ramas laterales y desencadenar la regulación de diferentes efectores y rutas paralelas de MAPKs (Fuchs y Mylonakis, 2009). En este sentido, hay evidencias de la comunicación cruzada entre la ruta CWI y la ruta HOG (García-Rodríguez y col., 2005; Casagrande y col., 2009). Además, trabajos recientes han indicado que el complejo TORC1 activa PKA a través de la inhibición de la activación de Bcy1p, subunidad reguladora de esta, mediada por Slt2p (Soulard y col., 2010). De esta forma, PKA controla la actividad de factores de transcripción inducibles por estrés como Msn2p/Msn4p (Estruch, 2000). Hasta el momento, se desconoce si una regulación de este tipo, puede estar teniendo lugar como respuesta al descenso de la temperatura. Sin embargo, estudios previos sugieren que la limitación de nutrientes podría ser la base de algunos fenotipos observados en frío (Schmidt y col., 1994; Abe y Horikoshi, 2000). En consonancia con esta observación, mutantes en varios elementos de las rutas de señalización TOR y cAMP-PKA, las dos principales rutas reguladoras del crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes, muestran defectos de crecimiento a bajas temperaturas.

Aunque los “termómetros moleculares” encargados de percibir y responder a variaciones de temperatura no están bien establecidos, existen evidencias de que cambios

físicos en la membrana plasmática podrían ser interpretados como la señal primaria por sensores anclados a ésta. Procesos celulares como el transporte de nutrientes, la recepción de señales, endocitosis, exocitosis o la biogénesis de orgánulos, depende de las propiedades funcionales de la membrana. Por tanto, conocer cómo la célula adapta dichas propiedades para mantener su funcionalidad en respuesta a cambios del entorno es de gran interés. El descenso de la temperatura y otros estreses físico-químicos (p.e. presión hidrostática y salinidad) causan un descenso en la fluidez de membrana denominado rigidificación, que compromete su funcionalidad y por tanto, limita el crecimiento celular (Abe y Horikoshi, 2000; Panadero y col., 2006; Hernández-López y col., 2011). En *S. cerevisiae*, un descenso en la temperatura, promueve cambios en la composición de sus fosfolípidos caracterizados por el acortamiento de las cadenas de ácidos grasos o el incremento de su insaturación (Martin y col., 2007; Rodríguez-Vargas y col., 2007). Sin embargo, estos cambios no son suficientes para explicar la funcionalidad adquirida por las membranas adaptadas a frío. Por tanto, es crucial conocer cómo son detectados los cambios en la fluidez de la membrana y cómo esta información es transmitida a efectores que permitan a la célula mantener la homeostasis de este orgánulo.

Entre los fosfolípidos constituyentes de la membrana plasmática, el fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato [PtdIns(4,5)P₂], es relativamente común, y desempeña funciones reguladoras en un amplio número de procesos celulares esenciales (Michell, 2011; Gericke y col., 2013). Los niveles celulares de este compuesto, dependen de forma directa de su síntesis a partir de la fosforilación de fosfatidilinositol 4-fosfato (PtdIns4P) por la quinasa Mss4p (Desrivieres y col., 1998) y de la actividad de las fosfatasa Inp51p, Inp52p e Inp53p (Stolz y col., 1998a; Stefan y col., 2002; Liu y Bankaitis, 2010). La modulación de los niveles de PtdIns(4,5)P₂ a través de la regulación de las actividades quinasas y fosfatasa podría afectar a las funciones de este fosfolípido en respuesta a cambios ambientales. En particular, mutaciones en *INP51* tienen como resultado la tolerancia a bajas temperaturas de la célula (Stolz y col., 1998b). Aunque este fenotipo ha sido atribuido a defectos en la endocitosis de transportadores de nutrientes, no se han aportado evidencias que lo apoyen. Sin embargo, se piensa que la actividad fosfolipasa C, podría actuar como sensor de la fluidez de la membrana, como ocurre con ciertos estreses que afectan a la fluidez de la membrana en plantas (Munnik y Vermeer, 2010). La proteína Plc1p, es capaz de hidrolizar la molécula de PtdIns(4,5)P₂ liberándose DAG e InsP₃. Por un lado, tanto la propia molécula de PtdIns(4,5)P₂ (Audhya y Emr, 2002) como el DAG liberado tras su hidrólisis (Levin, 2005) regulan la actividad de Pkc1p, lo que

puede ser relevante en la regulación de la activación de la ruta de MAPKs CWI. Por otro lado, el InsP₃, es transformado en derivados fosforilados que participan en una ruta de señalización por inositoles fosfato y difosfoinositoles fosfato de gran relevancia en la regulación de diversas funciones esenciales para la célula. Así pues, el estudio de estas rutas de señalización puede aportar información esencial acerca de los mecanismos de percepción y transmisión de la señal de frío en *S. cerevisiae*.

Por todo esto, el objetivo general de este trabajo fue aumentar nuestro conocimiento sobre los mecanismos de percepción, señalización y respuesta de *S. cerevisiae* al descenso en la temperatura del entorno, que se llevó a cabo a través de:

1. Estudio de la implicación de la ruta de integridad de la pared celular (CWI) en la percepción y señalización del estímulo de frío, así como identificación de otras rutas de señalización con las que pueda establecer conexiones laterales bajo esta condición ambiental.
2. Caracterización del papel funcional del PtdIns(4,5)P₂ o de compuestos derivados de su metabolismo en la señalización y respuesta de *S. cerevisiae* a frío.
3. Estudio de los mecanismos de homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática y de su importancia en la tolerancia de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas.



**MATERIALES Y
MÉTODOS**

1. Cepas

La cepa de *Escherichia coli* utilizada ha sido la DH10B [F- *mcrAD(mrr-hsdRMS-mrcBC)* f80*dlacZDM15 DlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 D(ara, leu) 7697 galU galK* Γ *rpsL nupG*].

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas se detallan en la tabla M1.

2. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

2.1. Bacterias

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de bacterias fueron:

- LB (Luria Bertani): extracto de levadura al 0,5 %, peptona al 1 % y NaCl al 1%. Los medios sólidos se prepararon adicionando agar al 2%. En los casos en que fue necesario un crecimiento selectivo, se añadió el correspondiente antibiótico, ampicilina (50 μ g/ml) o kanamicina (50 μ g/ml).
- SOC: extracto de levadura 0,5%, triptona 2%, NaCl 10 mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 20 mM, glucosa 20 mM. Se utilizó para recuperar las células después de haber sido transformadas mediante electroporación.
- Terrific Broth: triptona 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, KH₂PO₄ 69 mM, K₂PO₄ 12,7 mM. Recomendado para aumentar la eficacia de producción de ciertos plásmidos por *E. coli*.

El crecimiento de las células en medio sólido se llevó a cabo en placas Petri en una estufa de incubación a 37°C. Las incubaciones en medio líquido se realizaron en un agitador orbital a 200 rpm y 37°C. El crecimiento celular se determinó mediante medida de la densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm.

La detección de actividad β -galactosidasa, para la selección de plásmidos recombinantes, en experimentos de clonación, usando vectores que contienen el gen *lacZ*, se llevó a cabo extendiendo sobre una placa con medio sólido, 20 μ l de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido) 50mg/ml en dimetilformamida (Promega).

2.2. Levaduras

Los medios utilizados fueron:

- YPD: medio rico compuesto de extracto de levadura 1%, peptona 2%, glucosa 2%. En los casos en los que fue necesario un medio de selección se adicionaron los antibióticos geneticina (100 $\mu\text{g/ml}$), ClonNat (nourseotricina, 50 $\mu\text{g/ml}$) o higromicina (300 $\mu\text{g/ml}$) solos o en combinación. De esta misma forma este medio se utilizó para la exposición de las células frente a diferentes agentes como blanco de calcoflúor (CFW), sorbitol, NaCl, etc. La glucosa fue sustituida por galactosa 2% (YPG) como fuente de carbono cuando fue necesario.
- SC: medio sintético mineral compuesto de Yeast Nitrogen Base (sin aminoácidos ni sulfato amónico) 0,17 %, $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ 0,5% y los aminoácidos requeridos dependiendo de la necesidad de hacer selectivo el medio para cepas portadoras de plásmidos con marcadores de selección nutricional. Como fuente de carbono se han adicionado glucosa 2% (SCD), galactosa 2% (SCG) dependiendo de la necesidad.

Los cultivos de *S. cerevisiae* fueron incubados a 39°C, 30°C, 25°C, 15°C ó 12°C dependiendo de los requerimientos del ensayo. Dichos cultivos fueron mantenidos en agitación a 200 rpm en un agitador orbital. En los casos en los que fue necesario el uso de estos medios en estado sólido, se añadió agar al 2%.

En los casos en los que fue necesaria la inducción de la expresión de genes con promotores inducibles por galactosa, células crecidas en medio selectivo con glucosa como fuente de carbono ($\text{DO}_{600} \approx 0,5$) fueron lavadas y transferidas a medio selectivo sustituyendo la glucosa por galactosa. Las células fueron incubadas a 30°C durante tiempos previamente establecidos según el nivel de expresión de cada gen. A continuación se adicionó al medio glucosa hasta una concentración final del 2% para parar la inducción de la expresión del gen y las células fueron transferidas a la condición objeto de estudio.

3. Métodos de manipulación de microorganismos

3.1. Transformación de bacterias

Células de *E. coli* fueron previamente convertidas en electrocompetentes mediante el protocolo indicado por la casa comercial (Eppendorf) y conservadas a -80°C hasta su uso. La transformación se realizó mediante electroporación a voltaje constante de 1700 V en un electroporador *Eppendorf 2510* con cubetas de 1mm de separación de electrodos (Eppendorf). Posteriormente las células se recuperaron en medio SOC durante 45 min a 37°C, para ser sembradas posteriormente en medio LB-Ampicilina o Kanamicina sólidos.

3.2. Transformación de levaduras

La transformación de levaduras se realizó mediante el protocolo (LiAc/ss.-DNA/PEG) descrito por Gietz y Sugino (1988). El método está basado en la utilización de acetato de litio, DNA "carrier" y polietilenglicol. Las células fueron sometidas posteriormente a un choque térmico a 42°C durante 15 min. En el caso de transformaciones con plásmidos portadores de marcadores nutricionales, los medios se hicieron selectivos para dichos marcadores. En el caso de transformación con casetes de interrupción, las células fueron recuperadas tras el choque térmico en YPD a 30°C durante 3 h, tras lo que fueron sembradas en placas con el medio selectivo adecuado.

4. Métodos de manipulación de DNA

4.1. Obtención de DNA plasmídico de *E. coli*

Las células portadoras del plásmido se crecieron en LB con el antibiótico adecuado o/n y el plásmido fue extraído por el método de lisis alcalina descrito por Birnboim y Doly (1979). Para obtener una mayor cantidad de plásmido se ha utilizado 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.

4.2. Obtención de DNA plasmídico de levadura

Para la extracción de plásmidos de levadura, se ha seguido el método descrito por Robzyk y Kassir (1992) partiendo de 1,5 ml de un cultivo saturado en medio sintético selectivo. Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 100 µl de tampón STET para proceder a su rotura con bolas de vidrio (0,5 mm Biospec). Tras hervir 3

min se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se transfirió a otro tubo donde se mezcló con acetato amónico 7,5M en una proporción 2:1 (sobrenadante:acetato amónico). La mezcla se conservó a -20°C durante 1h y se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min. Se recogió el sobrenadante y se mezcló con EtOH 100% en una proporción 1:2 (sobrenadante:EtOH) y se conservó a -20°C durante 1 hora para precipitar el DNA plasmídico. Finalmente se centrifugó a 12000 rpm durante 15 min y se resuspendió en un volumen adecuado de agua destilada.

Tampón STET

Sacarosa	8%
Tritón X-100	5%
Tris-HCl pH 8	50 mM
EDTA	50 mM

4.3. Obtención de DNA genómico de levadura

Para la obtención de DNA genómico, se utilizó el método descrito por Hoffman y Winston (1987) según el cual, las células se crecen en medio rico YPD a 30°C y se recogen por centrifugación, tras un lavado con agua destilada estéril. A continuación, se resuspenden en 100 µl de agua, 200 µl de tampón de lisis y 200 µl de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1) y 500 µl de bolas de vidrio (0,5 mm Biospec). Tras romper las células mediante agitación en vortex a intervalos de 30 seg durante 3 min, se centrifuga a 6000 rpm durante 5 min y se recoge la fase acuosa. Los ácidos nucleicos se precipitan por adición de 1 ml de etanol frío al 100 % y centrifugación a 12000 rpm durante 10 min. El precipitado se resuspende en 400 µl de tampón TE con 3 µl de RNasa A (10/mg/ml). Se incuba la mezcla a 37°C durante 30 min. Finalmente se añaden 4 µl de acetato amónico 4 M y 1 ml de etanol absoluto para precipitar un mínimo de 1 h a -20°C, tras lo cual se centrifuga a 14000 rpm durante 3 min, se decanta el sobrenadante y se deja secar el precipitado, que será resuspendido en agua destilada.

Tampón de Lisis 1X

Triton X-100	2% (v/v)
SDS	1% (p/v)
Tris-HCl pH 8	10 mM
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM

Tampón TE 1X

Tris-HCl	pH	10 mM
		7,5
EDTA		1 mM

4.4. Análisis de inserción de 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. Con tal fin se utilizaron combinaciones de oligonucleótidos complementarios a las regiones promotoras o terminadoras del gen con otros complementarios a regiones del interior del casete.

4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) según el procedimiento estándar propuesto por Sambrook y col. (1989). Esta metodología ha sido empleada para la clonación y subclonación de fragmentos de DNA, para la síntesis de casetes de interrupción génica y comprobación de las mismas. El volumen final de la reacción ha sido de 50 μ l usando 100 ng de DNA genómico o plasmídico como molde, o bien de 25 μ l para el caso de amplificación de PCR de colonia. Este volumen está formado por 5 μ l de tampón (10X) correspondiente a la polimerasa utilizada (*BiotaqTM DNA Polymerase*, Biotline), 2 μ l de $MgCl_2$, 1 μ l de dNTP (0,25 M), 1 μ l de cada oligonucleótido (25 μ M) y 0,5 μ l de polimerasa (5u/ μ l). Tras una fase de desnaturalización inicial de 5 min a 95°C, se inician los ciclos de amplificación. El número de ciclos así como el tiempo y la temperatura utilizados en la desnaturalización de las hebras, hibridación de oligonucleótidos y elongación varía en función del fragmento a amplificar. En todos los casos se realiza una elongación final de 5 min a 72°C. Cabe destacar que en el caso del uso de polimerasas de alta fidelidad, el tiempo de elongación es el doble que para el resto de polimerasas. La reacción fue llevada a cabo en un termociclador *Techne* TC-312, en tubos de

0,5 ml. El resultado de la PCR es posteriormente analizado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. En la tabla M2 se describen los distintos oligonucleótidos utilizados.

4.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración del 1% o 1,3% si se trata de la comprobación de sondas para Northern blot marcadas con digoxigenina. Los geles se prepararon con tampón TAE 1X que también fue usado como tampón de electroforesis. Las muestras de DNA fueron cargadas en dichos geles tras la adición a las mismas de tampón de carga y se uso un patrón de tamaño molecular (*GeneRuler*TM 1 kb DNA Ladder). La electroforesis se realizó a un voltaje constante de 50-100 V.

Tampon TAE 1X		Tampón de carga 1X	
Tris base pH 8,0	40 mM	Ficoll 400	20 % (v/v)
Ácido acético glacial	4 M	EDTA pH 8,0	0,1 M
EDTA	1 mM	SDS	1 % (p/v)
		Azul de bromofenol	0,25 % (p/v)

4.7. Aislamiento de fragmentos de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa al 1%. Una vez separados, se procedió a la separación del bloque de agarosa que contenía el fragmento deseado y se procedió a la purificación del mismo usando el kit *GeneJET Gel Extraction Kit* (Fermentas). El DNA purificado fue separado de las columnas mediante la adición de agua destilada.

4.8. Clonación

Los fragmentos de DNA obtenidos mediante PCR se clonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega) o pJET (Fermentas), realizando la reacción de ligación durante 1 h a temperatura ambiente. La clonación en vectores de expresión de levadura se llevó a cabo mediante digestión enzimática del vector y del fragmento de DNA a clonar mediante endonucleasas de restricción (utilizando el tampón y las indicaciones sobre condiciones óptimas de reacción proporcionadas por la casa comercial para cada enzima). En la reacción de ligación se mezclan 50 ng del vector, al menos tres veces más cantidad de inserto, 1 µl del

tampón proporcionado por el proveedor y 1 μ l de DNA ligasa en un volumen final de 10 μ l. La reacción se deja o/n a 16°C. La relación de plásmidos utilizados se encuentra en la Tabla M3.

4.9. Secuenciación y análisis de las secuencias

La secuenciación del DNA se llevó a cabo en el Servicio de Secuenciación de la Universidad de Valencia. El programa DNAMAN (Lynnon Biosoft) se utilizó para analizar las secuencias. Se realizaron búsquedas de similitud en el Instituto Suizo de Bioinformática (<http://www.isb-sib.ch>), usando el programa BLAST (Altschul y col., 1997).

4.10. Construcción de las cepas Tat1-MYC13 y Tat2-MYC13

Con el objetivo de analizar los niveles de transportadores de triptófano Tat1p y Tat2p en diferentes cepas, utilizamos el epítipo 13xMYC como etiqueta en el extremo carboxilo terminal de los genes *TAT1* y *TAT2* en el genoma de la cepa silvestre y mutante *inp51Δ* del fondo genético CEN.PK, tal y como se describe en Lee y col. (2003). Para ello, tal y como se muestra en la Figura M1, se amplificó por PCR el plásmido pFA6a-13MYC-KanMX6 (Longtine y col., 1998) haciendo uso de los oligonucleótidos (TAT1/2-F2 y TAT1/2-R1) que se caracterizan por la presencia de extremos largos homólogos a la zona de la secuencia del gen donde se desea insertar la etiqueta. Dichos extremos permiten la recombinación homóloga entre el fragmento amplificado por PCR y con ello, la inserción de la etiqueta en el genoma. Posteriormente se comprobó por PCR haciendo uso de los oligonucleótidos (TAT1/2-V-myc y CAN-V1) si los transformantes obtenidos presentaban la etiqueta 13xMYC en el extremo carboxilo terminal de cada uno de los genes.

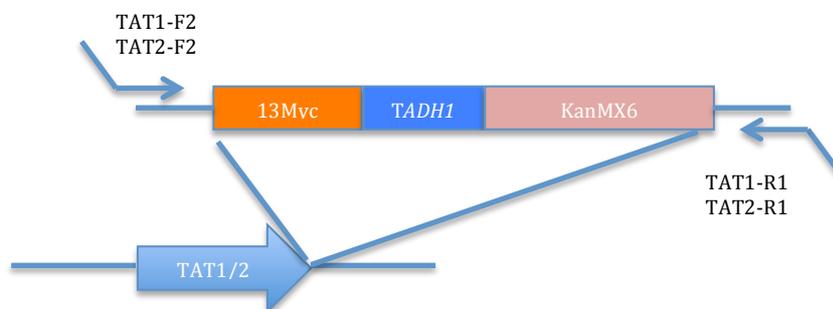


Figura M1. Construcción de las cepas TAT1/TAT2-MYC13. Representación esquemática de la amplificación del fragmento 13MYC-KanMX6 por PCR y su inserción en el genoma para etiquetar TAT1 y TAT2 con el epítipo MYC en su extremo carboxilo terminal.

4.11. Inserción en el genoma de la región codificante del dominio con homología a pleckstrina de Plc1p fusionada a GFP

Con el fin de determinar los niveles de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ en la célula, se llevó a cabo la inserción en el genoma de la cepa silvestre, mutante *inp51Δ* y cepa silvestre con la proteína Mss4p sobre-expresada, de dos copias de la secuencia codificante del dominio con homología a pleckstrina, de la proteína Plc1p, fusionadas a la proteína fluorescente GFP. Para ello, se utilizó el plásmido (Levine y Munro, 2002) como vector de dicha secuencia, que fue digerido con el enzima de restricción NcoI, cuyo único sitio de corte se encuentra dentro de la secuencia del gen *URA3*. Las cepas previamente indicadas fueron transformadas con el fragmento lineal generado, que, se integrará en el genoma de la levadura quedando la secuencia 2X.PH θ .PLC1-GFP insertada.



Figura M2. Representación simplificada de la fusión formada por el gen que codifica la proteína fluorescente GFP y las dos copias de la región que codifica el dominio PH de la proteína Plc1p.

5. Análisis del perfil transcripcional: extracción de RNA, hibridación con Chip y análisis de datos

Células de la cepa silvestre BY4741 y de su mutante *slt2Δ* fueron crecidas en medio SCD a 25°C hasta una DO_{600} de 0,5 y fueron transferidos a 12°C, condición bajo la que fueron incubadas durante 3 h. Se llevó a cabo una extracción de RNA a partir de 100 ml de cada cultivo por disrupción mecánica siguiendo las instrucciones del kit *RNeasy Midi* (Quiagen). La concentración de RNA fue medida a 260 nm y la calidad de la muestra fue valorada en un equipo 2100B Bioanalyzer (Agilent Technologies). Bajo estas condiciones, fueron procesados y analizados tres experimentos correspondientes a tres réplicas independientes. El RNA total (250 ng) fue etiquetado usando el kit 3'IVT express (Affymetrix) siguiendo las instrucciones del fabricante. El cRNA etiquetado con biotina, obtenido, fue fragmentado e hibridado al array Affymetrix GeneChip® Yeast Genome 2.0 durante 16 h a 45°C. Los microarrays hibridados fueron lavados y teñidos con conjugado de estreptavidina-ficoeritrina en un sistema GeneChip® Fluidics Station 450. Todos estos procedimientos fueron llevados a cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. La señal de fluorescencia de la hibridación fue medida en un escáner GeneChip® 3000 7G. Tras el escaneo, se obtuvieron los datos

numéricos, que fueron procesados con el software Expression Console (Affymetrix) y el algoritmo RMA (Robust Means Analysis). Las proporciones fueron obtenidas como un cociente entre las medias de las señales normalizadas de cada réplica. Los valores P se obtuvieron con el algoritmo limma en el sitio web Babelomics (<http://babelomics.bioinfo.cipf.es/>). La preparación de la muestra de RNA para su hibridación con Chips y el análisis de datos fueron llevados a cabo por la Unidad de Genómica del Parque Científico de Madrid, Universidad Complutense de Madrid. Para el análisis de las categorías funcionales a las que pertenecen los genes que aparecían reprimidos en el mutante *slt2Δ*, se seleccionaron aquellos cuya expresión *slt2Δ* vs. wt indicada como logaritmo en base 2, fue igual o inferior a 0,75 (ver Anexo) y se procesaron usando la aplicación GORILLA (*Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool*; Eden y col., 2009)

6. Rastreo de supresores en multicopia

Se aislaron supresores en multicopia del fenotipo de crecimiento en frío de un mutante *slt2Δ* del fondo genético BY4741 de *S. cerevisiae* utilizando una librería genómica construida en el vector YEp13. Los transformantes fueron seleccionados en medio mínimo SCD-leu a 12°C. El fenotipo de mejora de crecimiento en frío de dichos transformantes fue comprobado mediante inoculación de diluciones seriadas en placas incubadas a 12°C. Los plásmidos fueron extraídos, amplificados en *E. coli* y retransformados en el mutante para comprobar que conservaban el fenotipo, mediante las técnicas estándar (Sambrook et al. 1989). El inserto de cada plásmido responsable del fenotipo en frío se secuenció utilizando los cebadores directo y reverso de YEp13. La secuenciación se realizó con el método de terminación de cadenas dideoxi (Sanger, F., y cols., 1977). 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 “National Center for Biotechnology Information” (NCBI; <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) también 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 “Swiss Institute of Bioinformatics” (SIB; <http://www.isb-sib.ch>).

7. Determinación de actividades enzimáticas

7.1. Actividad β -galactosidasa

Para la determinación de actividad β -galactosidasa, se recogieron 15 unidades de DO_{600} de células en cultivo, se lavaron con agua y congelaron en nitrógeno líquido. Una vez recogidas todas las muestras, se resuspendieron en 500 μ l de Tampón Z y se procede a la rotura celular con 500 μ l de bolas de vidrio, durante 3 min, en ciclos de 30 seg, con alternancia en hielo. El sobrenadante obtenido se centrifuga a 12 rpm durante 2 min para eliminar restos celulares y el extracto es conservado en hielo hasta su uso. Para la determinación enzimática se mezclaron, 400 μ l de tampón Z con una concentración de 40 mM de β -mercaptoetanol, 100 μ l del sustrato de la reacción, el o-NPG (o-nitrofenil-B-D-galactopiranosido) y 100 μ l del extracto celular con la dilución deseada. La reacción tuvo lugar a 30°C durante 10 min y fue bloqueada con la adición de 250 μ l de Na_2CO_3 1 M. Esta reacción da lugar a un producto colorimétrico que se determina mediante la medida de absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro. La actividad específica (U/mg proteína) refleja los nanomoles de sustrato hidrolizado por min y mg de proteína.

Tampón Z 1X	
Na_2HPO_4	60 mM
NaH_2PO_4	40 mM
KCl	10 mM
$MgSO_4$	1 mM
pH	7

7.2. Determinación de la concentración de proteínas

Para determinar la concentración de proteínas de los extractos celulares se utilizó el reactivo comercial *BioRad Prtotein Assay*, siguiendo las instrucciones del fabricante, usando inmunoglobulina para la obtención de una recta patrón.

8. Técnicas de análisis de proteínas

8.1. Obtención y preparación de extractos de proteínas para SDS-PAGE

Se tomaron 10 unidades de DO_{600} de células, que fueron recogidas por centrifugación (4000 rpm, 1 min), y lavadas con agua para la posterior congelación en nitrógeno líquido. Las muestras se conservaron a -80°C hasta su procesamiento. La extracción de proteínas se realizó mediante rotura mecánica con bolas de vidrio (0,5mm) para lo que las células fueron resuspendidas en 300 μl de tampón de lisis al que se añadieron inhibidores de proteasas (Halt Protease Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific) e inhibidores de fosfatasa (Halt Phosphatase Inhibitor Cocktail, Thermo Scientific) en el caso de proteínas fosforiladas, en una proporción 1:100. Posteriormente, el extracto fue recogido y centrifugado a 500 g durante 5 min para eliminar el debris celular. Se separó el sobrenadante resultante, al cual se adicionó el tampón de carga de proteínas. La mezcla se hirvió durante 10 min.

En los casos en los que hubo que separar las fracciones enriquecidas en proteínas de membrana o citosólicas, tras la centrifugación a 500 g, se tomó el sobrenadante y se volvió a centrifugar a 13000 rpm durante 10 min. Se separaron ambas fracciones resultantes. La fracción precipitada, enriquecida en membranas, se resuspendió en un volumen adecuado de tampón de carga. De igual forma, se añadió un volumen adecuado de tampón de carga a la fracción soluble. En todos los casos, las muestras se hirvieron durante 10 min antes de ser sometidas a electroforesis.

Tampón de Lisis 1X	
Tris-HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
EDTA	5 mM

Tampón de Carga 1X	
Tris-HCl pH 6,8	62,5 mM
SDS	2%
Glicerol	10%
DTT	50 mM
Azul de Bromofenol	0,1%

8.2. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Cantidades de entre 10 y 20 µg de proteína total fueron separadas mediante electroforesis en condiciones desnaturizantes en minigeles discontinuos de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE). Los geles fueron elaborados a partir de una disolución acrilamida/bisacrilamida (30% Acrylamide/Bis Solution, BIORAD). El gel inferior, de resolución, se preparó a una porcentaje de acrilamida del 5% al 12 % según aplicación y el superior, de empaquetamiento a un porcentaje de acrilamida de entre el 3% y el 5%. En ciertos casos se usaron geles en gradiente de 4 al 15% (4–15% Ready Gel® Tris-HCl Gel, BIORAD). La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta vertical Mini-PROTEAN® Tetra Cell (BIORAD), con geles de 1mm de grosor, en tampón de electroforesis a una intensidad constante de 1 mA por gel. Junto a las muestras se cargó un marcador de peso molecular (PageRuler™ Prestained Protein Ladder, Fermentas).

Tampón de Electroforesis 1X	
Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
SDS	0,1%

8.3. Transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa e inmunodetección

Una vez separadas las proteínas, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Amersan™ Hybond™-ECL) mediante electrotransferencia utilizando tampón de transferencia, a un voltaje constante de 100V durante 1 h en condiciones de refrigeración. Una vez finalizada la transferencia, las membranas se lavaron con tampón TBS-Tween 1X y se incubaron en una solución de bloqueo compuesta por leche en polvo al 5% en tampón TBS-T 1X, para bloquear los sitios de unión no específicos, durante 1 h a temperatura ambiente, o bien durante toda la noche a 4°C. Una vez bloqueadas las membranas, se lavaron con TBS-T y se incubaron con el anticuerpo primario específico para la proteína a detectar, diluido en una solución de BSA al 2%, durante 1 h o durante toda la noche a 4°C según el anticuerpo. Tras sucesivos lavados con TBS-T 1X, las membranas se incubaron con el anticuerpo secundario, diluido en una solución de BSA al 2%, durante 1 h a temperatura ambiente. Tras sucesivos

lavados con TBS-T 1X se procedió a la detección de las proteínas mediante la adición sobre la membrana de reactivos para la detección por quimioluminiscencia (Pierce[®] ECL Western Blotting Substrate, Thermo Scientific o Amersan[™] ECL Select[™] Western Blotting Detection Reagent, GE Healthcare) y su exposición en un equipo de detección de quimioluminiscencia LAS-1000 (Fujifilm), usando diferentes tiempos de exposición en función de la intensidad de la señal. La intensidad de la señal fue cuantificada por densitometría, haciendo uso de las funciones del software ImageJ (<http://imagej.nih.gov/>).

Tampón de Transferencia 1X	
Tris base	25 mM
Glicina	192 mM
Metanol	20 %

Tampón de TBS-Tween	
Tris-HCl pH 7,6	50 mM
NaCl	150 mM
Tween [®] -20	0,1 %

8.4. Electroforesis bidimensional de proteínas

8.4.1. Extractos de proteínas

La obtención de proteínas se realizó rompiendo las células con perlas de vidrio. Se recogieron 10 unidades de DO por muestra, se lavaron con agua destilada fría y fueron congeladas hasta su rotura. Posteriormente se traspasó la muestra a un tubo de 2 ml con 0,5 g de perlas de vidrio y 300 µl de tampón de lisis (25mM MES, 0.1M NaCl, 0.25% Nonidet P40) adicionando en el momento 1/100 de inhibidores de proteasas y 1/100 de inhibidores de fosfatasa. Las células se rompen mediante 3 ciclos de 45 segundos a 5m/s en un FAST-PREP (MP Bio). Posteriormente a la rotura, las muestras fueron centrifugadas a 12.000 rpm durante 20 segundos a 4°C y se recogió el sobrenadante. La cantidad de proteínas se determinó utilizando el reactivo comercial BioRad Protein Assay.

8.4.2. Preparación de 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, azul de bromofenol y solución de rehidratación (8M urea, 4% CHAPS, 1% IPG buffer, 12 µl/ml DeStreak).

8.4.3. Isoelectroenfoque

La primera dimensión de los geles se realizó en tiras “Immobiline (IPG) DryStrips” de 7 cm con un gradiente no lineal de 4 a 7 (Amersham). Las tiras se rehidrataron o/n 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 II (Amersham Biosciences) con el siguiente programa:

IEF Params: 50uA/Strip at 20 C

S1 Step-n-hold 300V 0:30Hrs

S2 Gradient 1000V 0:30Hrs

S3 Gradient 5000V 1:30Hrs

S4 Step-n-hold 5000V 0:30Hrs

S5 Step-n-hold 500V 5:00Hrs

8.4.4. Separación de proteínas en función del peso molecular (SDS-PAGE)

Las tiras se equilibraron en tampón durante 2 ciclos de 15 min a temperatura ambiente. Tampón de equilibrado: 50mM Tris HCl pH 8.8, 2% SDS, 6M Urea, 30% Glicerol, añadiendo 1% DTT para el primer lavado o 2.5% IAA para el segundo; coloreados con azul de bromofenol.

La segunda dimensión se llevó a cabo en geles de acrilamida al 8 % formados en un “gel caster” (BIORAD) para 4 geles. La electroforesis se desarrolló a amperaje constante de 10mA por gel en la cubeta para 4 geles Mini-PROTEAN[®] Tetra Cell (BIORAD).

8.5. Tinción de plata de geles de proteínas

La tinción de geles de poliacrilamida con plata fue llevada a cabo siguiendo el procedimiento de Thierry Rabilloud 1988, con una modificación en la composición de la solución de fijación y el tiempo de la misma. En primer lugar se procedió a una fijación usando una solución de metanol:ácido acético:agua (50:10:40, v/v) durante 1 h. A continuación se llevan a cabo 3 lavados de 20 min con etanol al 30 %, para proceder a una etapa de sensibilización con una solución de tiosulfato de sodio a una concentración de 0,2 g/l. Tras esto, se realizan 3 lavados de 20 min con agua Milli-Q y se procede al equilibrado con una solución de equilibrado con 2 incubaciones de 5 min. El gel se lava 2 veces durante

20 seg para su posterior revelado con solución de revelado. Para parar el revelado, se añade directamente ácido acético (3,5 ml por cada 100 ml de solución de revelado) y se incuba durante 10 min. Finalmente se realizaron 4 lavados de 30 min con agua Milli-Q y las membranas fueron conservadas en etanol al 20% a 4°C. En todo momento, las incubaciones fueron llevadas a cabo en agitación.

8.6. Tinción de geles con SYPRO[®] RuBy Protein Gel Stain y Pro-Q[®] Diamond Phosphoprotein Gel Stain

En ambos casos se procedió siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial (Molecular Probes[™], Invitrogen Detection Technologies).

8.7. Purificación de afinidad en tándem (TAP, *Tandem Affinity Purification*)

Proteínas asociadas *in vivo* a Emw1p fueron purificadas siguiendo un esquema de purificación de afinidad en tándem a pequeña escala (TAP) a partir de extractos de células portadoras del plásmido pEMW1, incubadas a 12°C. La inducción con galactosa, el choque frío y la extracción de proteínas con bolas de vidrio fueron llevadas a cabo como se describe previamente. Células correspondientes a 25 unidades de DO₆₀₀ fueron recogidas y resuspendidas en 300 µl de tampón de lisis con inhibidores de proteasas (Roche), y procesadas. Tras una centrifugación a 17.900 x g durante 10 min a 4°C, 200 µl de sobrenadante fueron incubados durante 2 h con 100 µl de una resina Ni-sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare) equilibrada con tampón de lisis a 4°C. A continuación, la resina se lavó 4 veces con 150 µl de tampón de lisis y la elución se llevó a cabo usando el mismo tampón acompañado de 300 mM de imidazol. Finalmente, el eluido fue mezclado con 50 µl de una resina de IgG-sefarosa, lo que fue incubado para ser posteriormente lavado como se describe previamente, y los complejos proteicos fueron eluidos con tampón de elución. Las proteínas fueron visualizadas por Western-blot o tinción con plata. Las proteínas purificadas fueron indentificadas mediante c-Traq por el Servicio de Proteómica del Instituto de Investigación Príncipe Felipe.

Tampón de Lisis	
HEPES pH7,4	50 mM
NaCl	140 mM
Triton X-100	1%
Na deoxicolato	0,1%

Tampón de Elución	
Tris-HCl pH 8.0	50 mM
EDTA	10 mM
SDS	1%

9. Ensayo de supervivencia frente a Zimoliasa

Células en fase de crecimiento exponencial (DO_{600} : 0,4-0,6) crecidas en medio rico YPD fueron incubadas a 12°C durante 3 horas en un agitador orbital a 200 rpm. Tras este tiempo se recogió la cantidad de células necesaria para obtener una DO_{600} final de 0,9 en un volumen de 20 ml. Estas células se lavaron con agua destilada estéril y se resuspendieron en un tampón adecuado para la actividad de la Zimoliasa (10 mM Tris-HCl pH 7,4, 40 mM B-mercaptoetanol) y se incubaron durante 30 min en un agitador orbital a 25°C. A continuación se añadieron 50 µg/ml de Zimoliasa a cada cultivo y se fue midiendo la DO_{600} a lo largo del tiempo.

10. Técnicas de microscopía

10.1. Tinción de filamentos de actina

Células en fase de crecimiento exponencial cultivadas a 30°C en medio mínimo o transferidas a 12°C, fueron fijadas mediante la adición de paraformaldehído (Electron Microscopy Sciences, 16% solution, EM grade) a una concentración final del 4%, durante 20 min. Las células fueron recogidas por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min y se lavaron en 1ml de PBS con formaldehído al 4%. Tras una nueva centrifugación se eliminó el sobrenadante y las células se conservaron o/n en seco a 4°C. Se procedió a lavar las células 2 veces con PBS (2500 rpm, 5 min) y fueron resuspendidas en 50 µl de PBS. A continuación, se añadieron 5 µl de rodamina/faloidina y se incubaron o/n en oscuridad a 4 C. Tras esto, las células se lavaron 5 veces con PBS (2500 rpm, 5 min) y se resuspendieron en PBS con medio de montaje (Slow Fade[®] Gold Anti fade reagent, Invitrogen) en una proporción 10:5 respectivamente. La suspensión celular se conservó en oscuridad a 4°C hasta su visualización en un microscopio de fluorescencia. La observación y captura de imágenes por microscopía

de fluorescencia se llevó a cabo a través de una colaboración con María Ángeles de la Torre Ruíz, del Departamento de Ciencias Médicas Básicas de la Universitat de Lleida.

10.2. Tinción de partículas lipídicas o lipid droplets

Para visualizar la formación de formas de almacenamiento de triacilglicerol y esterol en la célula en forma de partículas lipídicas o lipid droplets, las células fueron teñidas con el colorante Rojo Nilo. Para ello, células incubadas tanto a 30°C, como a 15°C fueron fijadas en un 2% v/v de formaldehído durante 1 min a temperatura ambiente y posteriormente lavadas dos veces con un tampón Tris 50 mM pH 7,5, para su posterior observación mediante microscopía de fluorescencia.

10.3. Observación de células mediante microscopía de fluorescencia

Para la observación de preparaciones de células teñidas con colorantes fluorescentes o bien que expresan la proteínas fluorescente GFP, 1 μ l de células fijadas en formaldehído fueron observadas directamente usando un microscopio confocal Zeiss 510 Meta con una lente objetivo 63x Plan-Apochromat 1.4 NA Oil DIC (Zeiss). Las imágenes obtenidas fueron procesadas con el software ImajeJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

11. Análisis de la composición lipídica

Células en fase de crecimiento exponencial ($DO_{600} \sim 0,5$) en medio SD suplementado con leucina (100 mg/l), uracilo (20 mg/l), triptófano (50 mg/l) e histidina (20 mg/l), a 30°C, fueron transferidas a 15°C, e incubadas durante 3h. Se recogieron muestras correspondientes a aproximadamente 110 mg (peso seco) de células (DO_{600} de 1 equivale a 0,3 mg [peso seco] de células/ml), que fueron centrifugadas (3000 x g, 2 min, 4°C) y lavadas con agua destilada ultra pura (MiliQ RO 10 Plus; Millipore) y conservadas a -80°C hasta la extracción. El precipitado celular fue calentado a 100°C durante 10 min para inactivar la actividad lipasa endógena. Los lípidos fueron extraídos a partir de alícuotas de 1 ml con 3,75 ml de cloroformo-metanol (1:2, v/v), de acuerdo con el método descrito por Bligh y Dyer (1959), con modificaciones de Kates (1986). La separación de lípidos se llevó a cabo por cromatografía en capa fina según Hernández y col. (2008). Lípidos individuales fueron visualizados con vapor de yodo y la identificación se realizó usando estándares como referencia. Metil ésteres de ácidos grasos (FAMES) de la fracción de lípidos totales y clases individuales de lípidos fueron producidas por transmetilación catalizada por ácido (Garcés y

Mancha, 1993) y analizadas por cromatografía de gases usando un equipo 7890A (Agilent Technologies) adaptado a una columna de capilaridad (30 m de longitud; 0,25 mm i.d.; 0,20 μm de espesor) de sílice (Supelco) y un detector de ionización de llama. Se utilizó hidrógeno como transportador de gas con un flujo lineal de 1,34 ml/min y un split ratio de 1/50. La temperatura del inyector y del detector fue de 220°C, y la temperatura del horno de 170°C. La extracción y análisis de lípidos se llevó a cabo a través de una colaboración con el grupo de José Manuel Martínez Rivas del Instituto de la Grasa (CSIC).

12. Medidas de anisotropía

Para analizar los efectos de la ausencia de *INP51* 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 medio SCD a 30°C hasta su fase logarítmica ($\text{DO}_{600} \approx 0,5$), se recogieron por centrifugación, se lavaron dos veces con PBS pH 7,4 y se resuspendieron en el mismo tampón. Posteriormente, se mezclaron 3ml de la suspensión celular con 4 μl de una solución de DPH 1mM en tetrahidrofurano y se colocaron en una cubeta de cuarzo en un termostato. La temperatura fue descendiendo linealmente ($2^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$) 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 situado en el interior. Las variaciones se registraron cada 8 seg utilizando el sistema PicoLog Recorder (Pico Technology, Cambridgeshire, UK) como ha sido descrito por Cao-Hoang y col. (2008). Las medidas de anisotropía se midieron cada 8 seg a 430 nm, excitando a 360 nm. Este parámetro es inversamente proporcional a la fluidez de la membrana.

TABLAS

Tabla M1. Cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en este trabajo. Para cada cepa se indica su nombre, genotipo y referencia o fuente de donde procede la cepa.

Cepa	Genotipo	Referencia o fuente
EG123	<i>MATa leu-2-3,112 ura3-5 trp1-1 his4 can1'</i>	Lee y col., 1993
DL454	EG123 <i>slt2::TRP1</i>	Lee y col., 1993
BY4741	BY4741 <i>MATa his3Δ1 leu2Δ met15Δ ura3Δ</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>trp1Δ</i>	BY4741 <i>trp1::natMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>hog1Δ</i>	BY4741 <i>hog1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>kss1Δ</i>	BY4741 <i>kss1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>fus3Δ</i>	BY4741 <i>fus3::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>smk1Δ</i>	BY4741 <i>smk1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>slt2Δ</i>	BY4741 <i>slt2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>slt2Δ trp1Δ</i>	BY4741 <i>slt2::kanMX4 trp1::natMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>wsc1Δ</i>	BY4741 <i>wsc1::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>wsc2Δ</i>	BY4741 <i>wsc2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>wsc3Δ</i>	BY4741 <i>wsc3::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>mtl1Δ</i>	BY4741 <i>mtl1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>mid2Δ</i>	BY4741 <i>mid2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>wsc2Δ wsc1Δ</i>	BY4741 <i>wsc2::hphMX4 wsc1::kanMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>wsc3Δ wsc1Δ</i>	BY4741 <i>wsc3::kanMX4 wsc1::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>wsc3Δ wsc2Δ</i>	BY4741 <i>wsc3::kanMX4 wsc2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>wsc3Δ wsc2Δ wsc1Δ</i>	BY4741 <i>wsc3::kanMX4 wsc2::hphMX4 wsc1::natMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>mtl1Δ wsc1Δ</i>	BY4741 <i>mtl1::kanMX4 wsc1::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>mtl1Δ wsc2Δ</i>	BY4741 <i>mtl1::kanMX4 wsc2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>mtl1Δ wsc3Δ</i>	BY4741 <i>mtl1::kanMX4 wsc3::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>mid2Δ wsc2Δ</i>	BY4741 <i>mid2::kanMX4 wsc2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>mid2Δ wsc3Δ</i>	BY4741 <i>mid2::kanMX4 wsc3::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>mid2Δ mtl1Δ</i>	BY4741 <i>mid2::kanMX4 mtl1::hphMX4</i>	Este trabajo

BY4741 <i>rom2</i> Δ	BY4741 <i>rom2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>bck1</i> Δ	BY4741 <i>bck1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>bck1</i> Δ <i>trp1</i> Δ	BY4741 <i>bck1::kanMX4 trp1::natMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>mkk1</i> Δ	BY4741 <i>mkk1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>mkk2</i> Δ	BY4741 <i>mkk2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>mkk1</i> Δ <i>mkk2</i> Δ	BY4741 <i>mkk1::kanMX4 mkk2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>bem2</i> Δ	BY4741 <i>bem2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>sac7</i> Δ	BY4741 <i>sac7::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>bem3</i> Δ	BY4741 <i>bem3::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>tus1</i> Δ	BY4741 <i>tus1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>rom1</i> Δ	BY4741 <i>rom1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>rlm1</i> Δ	BY4741 <i>rlm1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>swi4</i> Δ	BY4741 <i>swi4::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>swi4</i> Δ <i>bck1</i> Δ	BY4741 <i>swi4::kanMX4 bck1::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>swi4</i> Δ <i>slt2</i> Δ	BY4741 <i>swi4::kanMX4 slt2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>swi6</i> Δ	BY4741 <i>swi6::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>swi6</i> Δ <i>bck1</i> Δ	BY4741 <i>swi6::kanMX4 bck1::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>swi6</i> Δ <i>slt2</i> Δ	BY4741 <i>swi6::kanMX4 slt2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>hog1</i> Δ <i>slt2</i> Δ	BY4741 <i>hog1::kanMX4 slt2::natMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>msn2</i> Δ	BY4741 <i>msn2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>msn4</i> Δ	BY4741 <i>msn4::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>msn2</i> Δ <i>msn4</i> Δ	BY4741 <i>msn2::kanMX4 msn4::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>ras2</i> Δ	BY4741 <i>ras2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>tor1</i> Δ	BY4741 <i>tor1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>sch9</i> Δ	BY4741 <i>sch9::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>sch9</i> Δ <i>bck1</i> Δ	BY4741 <i>sch9::kanMX4 bck1::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>sch9</i> Δ <i>slt2</i> Δ	BY4741 <i>sch9::kanMX4 slt2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>ira2</i> Δ	BY4741 <i>ira2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>pde2</i> Δ	BY4741 <i>pde2::kanMX4</i>	EUROSCARF

CML128	<i>MATa leu-2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1^r</i>	Gallego y col., 1997
CML128 Trp ⁺	CML128 <i>TRP1</i>	Este trabajo
CML128 <i>tor1Δ</i>	(MML448) CML128 <i>tor1::kanMX4</i>	Torres y col., 2002
CML128 <i>tor1Δ</i> Trp ⁺	(MML448) CML128 <i>tor1::kanMX4 TRP1</i>	Este trabajo
CML128 <i>ras2Δ</i>	CML128 <i>ras2::LUE2</i>	Petkova y col., 2010
CML128 <i>ras2Δ</i> Trp ⁺	CML128 <i>ras2::LEU2 TRP1</i>	Este trabajo
BY4741 <i>bck1Δ slt2Δ</i>	BY4741 <i>bck1::kanMX4 slt2::natMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>gcn2Δ</i>	BY4741 <i>gcn2::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>gcn2Δ slt2Δ</i>	BY4741 <i>gcn2::kanMX4 slt2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>ptc1Δ</i>	BY4741 <i>ptc1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>ptc1Δ slt2Δ</i>	BY4741 <i>ptc1::kanMX4 slt2::hphMX4</i>	Este trabajo
BY4741 <i>hsc82Δ</i>	BY4741 <i>hsc82::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>hsp82Δ</i>	BY4741 <i>hsp82::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>ssa1Δ</i>	BY4741 <i>ssa1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>zuo1Δ</i>	BY4741 <i>zuo1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>ydj1Δ</i>	BY4741 <i>ydj1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>sse1Δ</i>	BY4741 <i>sse1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>sti1Δ</i>	BY4741 <i>sti1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741 <i>nem1Δ</i>	BY4741 <i>nem1::kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ lys2Δ ura3Δ</i>	
BY4742 <i>pah1Δ</i>	BY4742 <i>pah1::kanMX4</i>	EUROSCARF
CEN.PK2-1C	<i>MATa ura3-52 his3-Δ1 leu-2-3,112 trp1-289</i>	Mathias Rose
CEN.PK <i>inp51Δ</i>	<i>inp51::natMX4</i>	Este trabajo
CEN.PK <i>ipk2Δ</i>	<i>ipk2::hphMX4</i>	Este trabajo
CEN.PK <i>ipk1Δ</i>	<i>ipk1::hphMX4</i>	Este trabajo
CEN.PK <i>kcs1Δ</i>	<i>kcs1::hphMX4</i>	Este trabajo
CEN.PK <i>vip1Δ</i>	<i>vip1::hphMX4</i>	Este trabajo

CEN.PK <i>slt2</i> Δ	<i>slt2::hphMX4</i>	Este trabajo
CEN.PK <i>inp51</i> Δ <i>slt2</i> Δ	<i>inp51::natMX4 slt2::hphMX4</i>	Este trabajo
CEN.PK <i>hog1</i> Δ	<i>hog1::natMX4</i>	Este trabajo
CEN.PK <i>inp51</i> Δ <i>hog1</i> Δ	<i>inp51::natMX4 hog1::hphMX4</i>	Este trabajo
wt-Tat1-myc	CEN.PK-1C <i>TAT1</i> -13 myc:: <i>KanMX6</i>	Este trabajo
wt-Tat2-myc	CEN.PK-1C <i>TAT2</i> -13 myc:: <i>KanMX6</i>	Este trabajo
<i>inp51</i> Δ-Tat1-myc	CEN.PK <i>inp51D TAT1</i> -13 myc:: <i>KanMX6</i>	Este trabajo
<i>inp51</i> Δ-Tat2-myc	CEN.PK <i>inp51D TAT2</i> -13 myc:: <i>KanMX6</i>	Este trabajo
wt-Pah1-myc	CEN.PK-1C <i>PAH1</i> -13myc:: <i>KanMX6</i>	Este trabajo
<i>inp51</i> Δ-Pah1-myc	CEN.PK <i>inp51D PAH1</i> -13myc:: <i>KanMX6</i>	Este trabajo

Tabla M2. Oligonucleótidos utilizados durante este trabajo. Para cada oligonucleótido se indica su nombre, secuencia en sentido 5' - 3' y uso.

Nombre	Secuencia (5'-3')	Uso
BCK1-K1	CCCCGAGTTATTACTATGACAGAGTTTCCAATACTAATC CCGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>BCK1</i>
BCK1-K2	ACATTTCCAGAACGATGCATCCCAGAGACCATATATCAA CCATCGATGAATTCGAGCTC	Delección <i>BCK1</i>
BCK1-V1	GCTGCAATCCAGATGATAC	Verificación delección <i>BCK1</i>
BCK1-V2	ACTTCGCGAGTCTGGTAG	Verificación delección <i>BCK1</i>
SLT2-K1	ATGGCTGATAAGATAGAGAGGCATACTTTCAAGGTCTTC CGTACGCTGCAGGTCG	Delección <i>SLT2</i>
SLT2-K2	TTCGTCAGCTGGATCATGCCATATAGACAAGTAAGGATG CATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>SLT2</i>
SLT2-V1	AGACTGCGAAATGTTGGC	Verificación delección <i>SLT2</i>
SLT2-V2	ATCATACTCTCTTGAGGTCG	Verificación delección <i>SLT2</i>
MSN4-K1	TCTGCTACTTCTTCTAATGACAATTCTGCGAACAATAGCC GTACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>MSN4</i>
MSN4-K2	CAAGTGCTCACTGCGTCTGAATGCCTTCTCACAGTCTTTA CCATCGATGAATTCGAGCTC	Delección <i>MSN4</i>
MSN4-V1	CTAGTCTTCGGACCTAATAG	Verificación delección <i>MSN4</i>
MSN4-V2	CTTGTCATACCGTAGCTTG	Verificación delección <i>MSN4</i>
TRP1-K1	ATGTCTGTTATTAATTTACAGGTAGTTCTGGTCCATTGG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>TRP1</i>

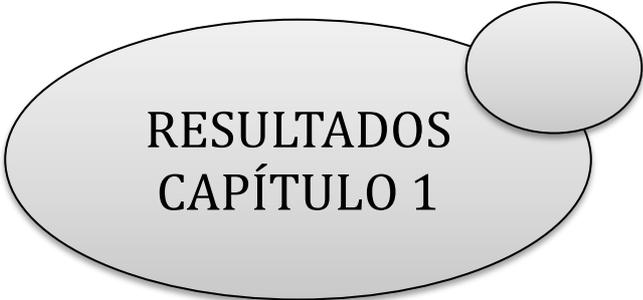
TRP1-K2	ATTGTTTTATCGTTTAAAGCAGTTTTTACGATTCTTTATC ATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>TRP1</i>
TRP1-V1	CAATCTCTCAACACTGAG	Verificación delección <i>TRP1</i>
WSC1-K1	AGACCGAACAAAACAAGTCTGCTTCTGGCGTTATTATCC CGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>WSC1</i>
WSC1-K2	AATGTTCCGTTACTTATTCTCCTTGAGTCGTCGAAAGGAT CGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>WSC1</i>
WSC1-V1	TGGAAATAACGCTGCATGG	Verificación delección <i>WSC1</i>
WSC2-K1	CACCTAGATCTCATACACAAGTCCTTCATCTTAGTGTGCG TACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>WSC2</i>
WSC2-K2	TGCATCATCGTAATCATCATCACCATCTGAGACATTACA TCGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>WSC2</i>
WSC2-V1	ACTATAGCTCAAAGCGTGG	Verificación delección <i>WSC2</i>
WSC3-K1	TTTGCTATGTCAATCTCTGATTGGGCTGGTTAATGCTGCG TACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>WSC3</i>
WSC3-K2	CAGGCTCGATTATGAGATACGGTACTAGATAATTCAGGA TCGATGAATTCGAGCCTCG	Delección <i>WSC3</i>
WSC3-V1	AGCCGATTCGTTAGTAGG	Verificación delección <i>WSC3</i>
MTL1-K1	GAACGATTCTCATGGCGTTAACAACACTACCGCTAAGTG CGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>MTL1</i>
MTL1-K2	GCTTCGCTGTCATCATAAACACGATGAATGTTTTTCATCG ATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>MTL1</i>
MTL1-V1	CGAAGGATACTGCTATTTAC	Verificación delección <i>MTL1</i>
MKK2-K1	GTGAACGAAAGCCCATACTCCAACAATAGCACTTCAGCT ACGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>MKK2</i>
MKK2-K2	CTGCTGAAGTCGTACGCAGAAAGAAGTGTCGAGGGGTA TGATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>MKK2</i>
MKK2-V1	ACCAGAATCCAATAGGAGTC	Verificación delección <i>MKK2</i>
CAN-V1	ATCTCTCGTGACGAGTTA	Verificación integración <i>CAN1</i>
Sc-HOG1-K1	AAGGGAAAACAGGGAAAACACTACAATATCGTATATAAT AGCATAGGCCACTAGTGGATCTG	Delección <i>HOG1</i>
Sc-HOG1-K2	AAGTAAGAATGAGTGGTTAGGGACATTAACAAAAACACG TTTACAGCTGAAGCTTCGTACGC	Delección <i>HOG1</i>
HOG1-V1	GTCACGGAATTACAAGGAAC	Verificación delección <i>HOG1</i>
HOG2-V2	TGGATCTCTGTGTGGTAACG	Verificación delección <i>HOG1</i>
INP51-K1	CTTACCCAGGTCATATGCTTGCTACCGATCCATATGTCC CGTACGCTGCAGGTCGAC	Delección <i>INP51</i>
INP51-K2	TTTTTTAAATCCGAAC TAGGTGGTGGTAACTTTCTACCTC ATCGATGAATTCGAGCTCG	Delección <i>INP51</i>

INP51-V1	ACTTCCCCATTCTTGGACGC	Verificación deleción <i>INP51</i>
INP51-V2	GCTCATCTTCGTTCTCAACG	Verificación deleción <i>INP51</i>
INP51-V3	GATGTCAGTACTGCAGGCGC	Verificación deleción <i>INP51</i>
IPK1-K1	GATATGCTACCAGTCGAAAATTGTCAGAGATAAGTTCCT CGTACGCTGCAGGTCGAC	Deleción <i>IPK1</i>
IPK1-K2	CTTGATGTCAACTGGCTGTAAGTTTTGTCCAATGGGTCC CTCGATGAATTCGAGCCTCG	Deleción <i>IPK1</i>
IPK1-V1	CTCTATTGCTATTCATTTGG	Verificación deleción <i>IPK1</i>
IPK1-V2	TTCTTCCTCCTCATAAAACG	Verificación deleción <i>IPK1</i>
IPK2-K1	ATGGATACGGTAAACAATTATAGGGTTTTAGAGCATAAA GCGTACGCTGCAGGTCGAC	Deleción <i>IPK2</i>
IPK2-K2	ATATCTAGCAAGGTTTCAACTCCTTCAATCACGTTTTTCAT CTCGATGAATTCGAGCCTCG	Deleción <i>IPK2</i>
IPK2-V1	GACTAATTGGTACTTCTTGC	Verificación deleción <i>IPK2</i>
IPK2-V2	AACCGTAAGTCAAAGAAACC	Verificación deleción <i>IPK2</i>
KCS1-K1	TGTAGATAGCAATAATGGCGGGTCCGTGACATGCGCGGA CCGTACGCTGCAGGTCGAC	Deleción <i>KCS1</i>
KCS1-K2	TGTCTTAGTTTACTATTTGGATCATTATACATTTCTTCGTC TCGATGAATTCGAGCTCG	Deleción <i>KCS1</i>
KCS1-V1	GACTATGGATACCTCTCAC	Verificación deleción <i>KCS1</i>
KCS1-V2	CTCAATGGTTCTAGTGATC	Verificación deleción <i>KCS1</i>
SLT2-K1	ATGGCTGATAAGATAGAGAGGCATACTTTCAAGGTCTTC CGTACGCTGCAGGTCG	Deleción <i>SLT2</i>
SLT2-K3	ATTCTTGTTGTGGCGCAACAGAATTAGACGTGGCCATCT GCATCGATGAATTCGAGCTC	Deleción <i>SLT2</i>
SLT2-V1	AGACTGCGAAATGTTGGC	Verificación deleción <i>SLT2</i>
SLT2-V2	ATCATACTCTCTTGAGGTCG	Verificación deleción <i>SLT2</i>
VIP1-K1	ATCTATTGCACCAATATTGGAGGGTTTCAGTCCTAAGAC GCGTACGCTGCAGGTCGAC	Deleción <i>VIP1</i>
VIP1-K2	GTTGAACATAGTCCATATCCAAATGCTTCGTCAGGGAAA TCTCGATGAATTCGAGCTCG	Deleción <i>VIP1</i>
VIP1-V1	CATGAGTGGGATAAAGAAG	Verificación deleción <i>VIP1</i>
VIP1-V2	GGACCTAAAGATCGCGAGC	Verificación deleción <i>VIP1</i>
TAT1-F2	TTCAAGAAAGTTTTTAAAGAGGATGACCAATTTCTGGTG CCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Fusión genética de <i>MYC</i> a <i>TAT1</i>

Tabla M3. Plásmidos utilizados durante este trabajo. Para cada plásmido se indica su nombre, su descripción y la fuente o referencia.

Plásmido	Descripción	Fuente o referencia
p2XRlm1-lacZ	Plásmido chivato (p1434) con dos sitios de unión a Rlm1p del gen <i>YIL117C</i> (2XRlm1) fusionados al promotor de <i>CYC1</i> y al gen <i>lacZ</i>	Jung y col., 2002
pFKS2-lacZ	Plásmido chivato (p2052) que contiene los residuos comprendidos entre las posiciones -540 y -375 del gen <i>FKS2</i> unidos al promotor de <i>CYC1</i> y al gen <i>lacZ</i>	Kim y col., 2008
pSTRE-lacZ	Plásmido chivato que contiene el elemento de respuesta a estrés del promotor del gen <i>CTT1</i>	Stanhill y col., 1999
pBCY1	ORF de <i>BCY1</i> clonada en el vector p416GPD (<i>URA3, CEN</i>)	Trott y col., 2005
pTPK1	Construcción basada en plásmido YCplac33 (pTS134) que contiene 2xHA unidas a la ORF de <i>TPK1</i>	Griffioen y col., 2000
pSLT2	Plásmido (HA ₃ - <i>MPK1</i> -pRS424) que contiene 3xHA fusionadas a la ORF de <i>SLT2</i>	Guo y col., 2009
pSLT2-km	Plásmido (HA ₃ - <i>mpk1</i> ^{K54R} -pRS424) que contiene 3xHA fusionadas al gen mutante <i>slt2</i> ^{K54R}	Guo y col., 2009
pSLT2-HA	Construcción basada en el plásmido pFL44 (2m, <i>URA3</i>) que contiene una secuencia de HA insertada <i>in frame</i> dentro del gen <i>SLT2</i> (pFL44-SLT2HA)	Zarzov y col., 1996
pPKC1	pSH24, secuencia de <i>PKC1</i> en el plásmido pSEY18 (2 μ, <i>URA3</i>)	Helliwell y col., 1998
pTL336	Dos copias en tandem del moninio PH δ -PLC fusionadas a GFP	Levine y Munro, 2002
pPHO89-lacZ	Plásmido chivato que contiene las regiones comprendidas entre los nucleótidos nt -671 to +33 de <i>PHO89</i> clonadas en el plásmido YEp357	Serrano y col., 2002
pCDRE.lacZ	Plásmido chivato (pAMS336) que contiene 4 repeticiones en tandem del elemento CDRE	Stathopoulos y Cyert, 1997
pCRH1-lacZ	Plásmido chivato que contiene un fragmento de 1.1-kb aguas arriba de <i>CRH1</i>	Bermejo y col., 2008
pRGD1-lacZ	Plásmido chivato (YEp/PRGD1-LacZ) que contiene las regiones comprendidas entre los nucleótidos -262 to +45 de <i>RGD1</i> clonadas en el plásmido YEp357R	Gatti y col., 2005
pHXT1-lacZ	Plásmido chivato (pBM2636) conteniendo 1.3-kb del fragmento <i>HindIII-EcoRI</i> de la region reguladora de <i>HXT1</i> clonada en el plásmido YEp357R	Ozcan y Johnston, 1995

pPLC1	pSH25, <i>PLC1</i> en pSEY18 (2 m, <i>URA3</i>)	Helliwell y col., 1998
pMSS4	pHA2-MSS4 con dos repeticiones de HA en el sitio <i>AccIII</i> de <i>MSS4</i> (2 m, <i>LEU2</i>)	Kobayashi y col., 2005
pSTT4	Secuencia de <i>STT4</i> en plásmido 2 μ , <i>URA3</i>	Helliwell y col., 1998
pFA6a-13Myc-KanMX6	Plásmido usado para marcar con una cola de 13xMyc en el extremo carboxilo terminal de los genes <i>TAT1</i> y <i>TAT2</i>	Longtine y col., 1998
pDAL82	Plásmido pBG1805 con el gen <i>DAL82</i> bajo el control de un promotor inducible por galactosa. El gen está etiquetado con 6xHIS, HA y proteína A.	Open Biosystems
pEDC3	Plásmido pBG1805 con el gen <i>EDC3</i> bajo el control de un promotor inducible por galactosa. El gen está etiquetado con 6xHIS, HA y proteína A.	Open Biosystems
pEMW1	Plásmido pBG1805 con el gen <i>EMW1</i> bajo el control de un promotor inducible por galactosa. El gen está etiquetado con 6xHIS, HA y proteína A.	Open Biosystems
pNPP2	Plásmido pBG1805 con el gen <i>NPP2</i> bajo el control de un promotor inducible por galactosa. El gen está etiquetado con 6xHIS, HA y proteína A.	Open Biosystems
pYHI9	Plásmido pBG1805 con el gen <i>YHI9</i> bajo el control de un promotor inducible por galactosa. El gen está etiquetado con 6xHIS, HA y proteína A.	Open Biosystems
pBCK1-20	Plásmido que contiene el locus <i>BCK1-20</i> , que codifica una forma hiperactiva de <i>BCK1</i> , <i>URA3</i>	Lee y Levin, 1992
YEplac195	Plásmido episomal con marcador <i>URA3</i> , utilizado como control	Gietz y Sugino, 1988
YEplac181	Plásmido episomal con marcador <i>LEU2</i> , utilizado como control	Gietz y Sugino, 1988
YCplac33	Plásmido centromérico con marcador <i>URA3</i> , utilizado como control	Gietz y Sugino, 1988
pBG1805	Plásmido episomal con marcador <i>URA3</i> , utilizado como control	Open Biosystems
pFa6A	Utilizado como molde para la amplificación de casetes con <i>kanMX4</i> como marcador de selección	Wach y col., 1994
pAG25	Utilizado como molde para la amplificación de casetes con <i>natMX4</i> como marcador de selección	Goldstein y McCusker, 1999
pAG28	Utilizado como molde para la amplificación de casetes con <i>hphMX4</i> como marcador de selección	Goldstein y McCusker, 1999



RESULTADOS
CAPÍTULO 1

Capítulo 1

**Estudio de nuevas vías de señalización del
descenso de la temperatura en *Saccharomyces
cerevisiae***

Capítulo 1: Estudio de nuevas vías de señalización del descenso de la temperatura en *Saccharomyces cerevisiae*

Como se ha explicado en apartados anteriores, no se ha descrito un mecanismo específico de respuesta al descenso de la temperatura. Se sabe que la ruta HOG es activada en respuesta a este estímulo, pero la respuesta que se desencadena cuando las células son expuestas a frío es mucho más compleja e involucra a elementos que no dependen de la activación de esta ruta de MAPKs (Panadero y col., 2006). Además, como ha sido descrito para otras situaciones ambientales, las cascadas de proteínas que señalizan dichos cambios no son elementos aislados, sino que existen conexiones entre ellas para asegurar una correcta respuesta frente a cada tipo de estímulo (Fuchs y Mylonakis, 2009). Por tanto, durante el presente capítulo nos planteamos la búsqueda de mecanismos capaces de detectar una caída en la temperatura y transmitir esta información al interior celular para la elaboración de una respuesta adecuada. Además, abordamos el estudio de la colaboración entre diferentes rutas de señalización para conseguir ese objetivo por parte de la célula.

1. Impacto de la ausencia de diferentes MAPKs en el crecimiento a bajas temperaturas de *S. cerevisiae*

Ante nuestro interés por la búsqueda de otras rutas de percepción y señalización implicadas en la respuesta a frío en *S. cerevisiae*, analizamos el efecto de la ausencia de *FUS3*, *KSSI*, *HOG1*, *SLT2* y *SMK1*, los genes que codifican las cinco MAPKs conocidas en *S. cerevisiae*, en la sensibilidad a este estrés. Para ello, diluciones seriadas de cultivos de cada una de las cepas fueron incubadas a 12°C, tanto en medio rico (YPD), como en medio mínimo (SCD) (Fig. 1.1A). Células carentes de la MAPK Hog1p mostraron un defecto de crecimiento a 12°C, en consonancia con la regulación funcional de la ruta HOG a bajas temperaturas, previamente descrita (Panadero y col., 2006). La ausencia de *FUS3*, *KSSI* o *SMK1* no alteró el crecimiento en frío de la cepa silvestre. Sin embargo, la falta de *Slr2p*, la MAPK de la ruta de integridad de la pared celular (CWI), causó un severo defecto de crecimiento, que también se observó en medio rico (YPD), aunque con menor intensidad. Como se observa en la Figura 1.1A, esta cepa, mostró ya un ligero defecto de crecimiento a 30°C, que podría estar asociado con su auxotrofia para inositol (el fenotipo *Ino⁻*), un fenotipo previamente descrito en diferentes mutantes de la ruta CWI (Nuñez y col. 2008). En este sentido, tal y como muestra la Figura 1.1B, la ausencia de inositol incrementó el defecto de crecimiento de un mutante *slt2Δ* a 30°C, comparado con el observado en un medio mínimo completo (SCD). En cambio,

la adición de inositol (concentración final de 75 μM) aumentó el crecimiento a 30°C hasta niveles comparables a los observados para la cepa silvestre (wt). Sin embargo, el fenotipo de sensibilidad a frío de *slt2 Δ* persistió en presencia de inositol en el medio (Fig. 1.1B).

Es importante destacar que el defecto de crecimiento mostrado por un mutante *slt2 Δ* no es dependiente del fondo genético, ya que la delección de *SLT2* en la cepa silvestre EG123 causó un comportamiento similar, tanto en medio rico (YPD) como en medio mínimo (SCD) (Fig. 1.1C).

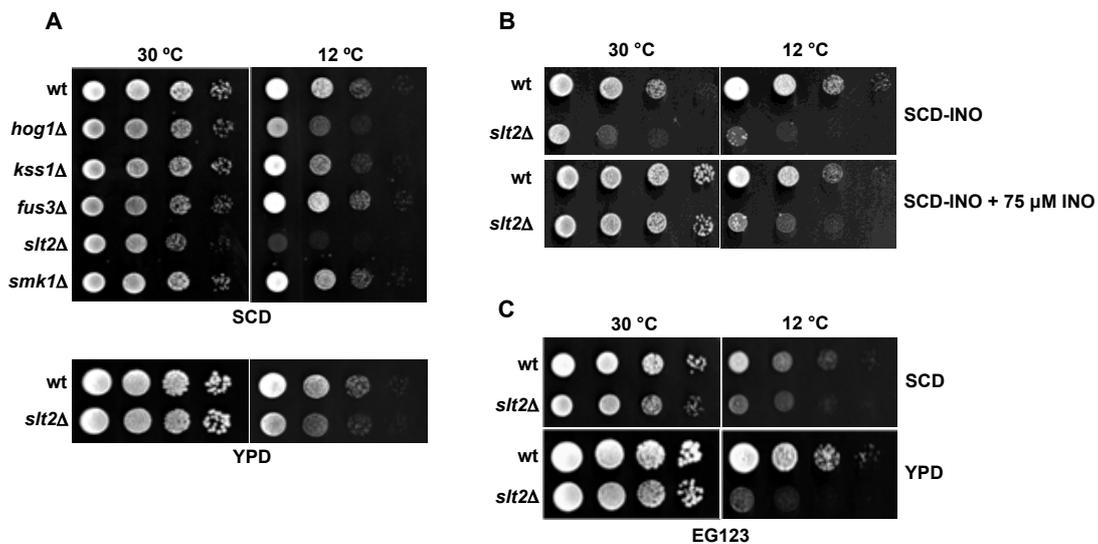


Figura 1.1. Slt2p es necesaria para el crecimiento a bajas temperaturas. (A) Análisis del crecimiento a baja temperatura de la cepa silvestre BY4741 (wt) y sus correspondientes mutantes *hog1 Δ* , *kss1 Δ* , *fus3 Δ* , *slt2 Δ* y *smk1 Δ* . (B) Crecimiento de la cepa silvestre y del mutante *slt2 Δ* en ausencia de inositol y en un medio suplementado con el mismo. (C) Crecimiento a 30°C y 12°C de la cepa silvestre EG123 (wt) y de su correspondiente mutante *slt2 Δ* tanto en SCD como en YPD. En todos los casos, los cultivos fueron incubados a 30°C hasta la fase exponencial de crecimiento y fueron ajustados a una $\text{DO}_{600}=1.0$. Se sembraron en forma de gotas (3 μl) diluciones seriadas ($1 - 10^{-3}$), en YPD, SCD, SCD sin inositol (SCD-INO) o en SCD suplementado con 75 μM de inositol (SCD-INO + 75 μM INO), y fueron incubadas a 30°C durante 2-4 días o a 12°C durante 8-10 días.

Finalmente, el defecto de crecimiento a bajas temperaturas fue parcialmente recuperado en presencia de sorbitol (0,8 M), una respuesta mostrada de forma frecuente por otros mutantes con defectos en la pared celular (Fig. 1.2B).

2. Papel del módulo de MAPKs y de los sensores de membrana de la ruta de integridad de la pared celular en la adaptación al descenso térmico en *S. cerevisiae*

En primer lugar, procedimos a comprobar si el módulo de MAPKs (Fig. 1.2A) era necesario para una correcta activación de la ruta ante un descenso térmico. Como se observa en la Figura 1.2B, el crecimiento bajo estas condiciones empeoró claramente en células carentes de *BCK1*, la MAPKKK de la ruta. La ausencia de las proteínas redundantes Mkk1p o Mkk2p no tuvo efecto, aunque el doble mutante *mkk1Δ mkk2Δ*, mostró un ligero defecto de crecimiento. Como cabía esperar, tanto estos fenotipos, como los encontrados para el mutante *slt2Δ*, fueron aliviados por la adición al medio del estabilizador osmótico sorbitol (Fig. 1.2B).

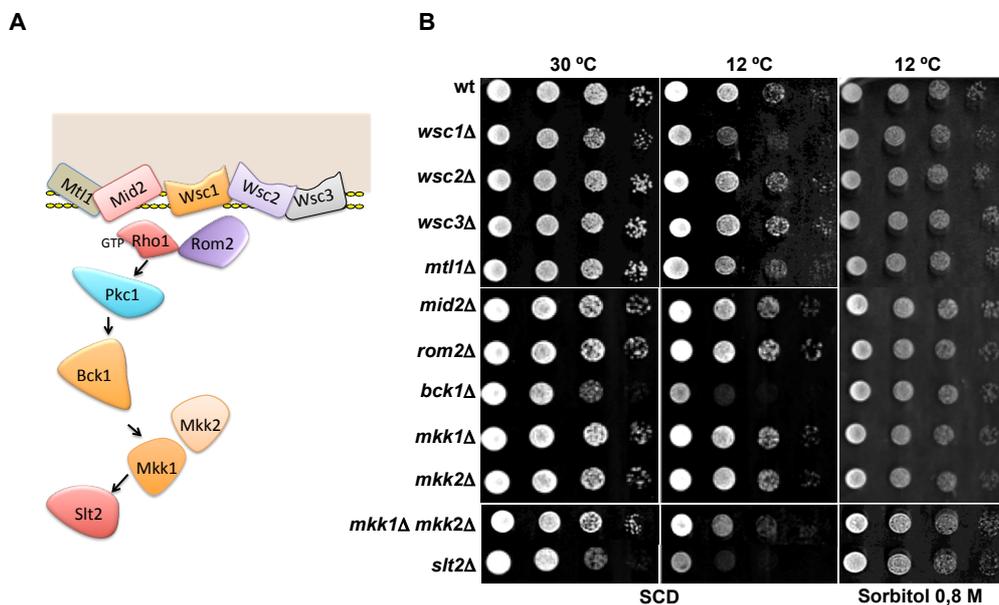


Figura 1.2. Elementos del módulo de MAPKs son necesarios para el crecimiento a bajas temperaturas. (A) Representación de los principales elementos de la ruta CWI. **(B)** Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y sus mutantes *wsc1Δ*, *wsc2Δ*, *wsc3Δ*, *mtl1Δ*, *mid2Δ*, *rom2Δ*, *bck1Δ*, *mkk1Δ*, *mkk1Δ mkk2Δ* y *slt2Δ*, a 30°C y 12°C en medio SCD y a 12°C en medio SCD con sorbitol 0,8 M. Se procedió tal y como se indica en la figura 1.1.

A continuación, centramos nuestro estudio en la regulación funcional de los sensores de membrana Wsc1-3p, Mid2p y Mtl1p, y del GEF Rom2p, los cuales se encuentran por encima del módulo de MAPKs (Fig. 1.2A). En el caso de los sensores, solo el mutante *wsc1Δ* mostró un defecto de crecimiento con respecto a la cepa silvestre (Fig. 1.2B), sugiriendo que Wsc1p es el principal sensor implicado en la respuesta a frío. No obstante, construimos nueve dobles mutantes que carecen dos a dos de los genes *WSC1*, *WSC2*, *WSC3*, *MID2* o *MTL1*, y un triple mutante *wsc3Δ wsc2Δ wsc1Δ*, y se evaluó su crecimiento a 12°C (Fig. 1.3). Fuimos incapaces de obtener un doble mutante *mid2Δ wsc1Δ*, sugiriendo que la ausencia combinada de estos sensores, es letal, en consonancia con lo descrito anteriormente (Green y col., 2003). Los

mutantes que contenían la delección de *WSC1* mostraron de nuevo un defecto de crecimiento a baja temperatura, confirmando la importancia de este gen como sensor de frío. La ausencia de *WSC2* y *WSC3* en un mutante *wsc1Δ* agravó ligeramente el fenotipo de sensibilidad a 12°C de éste, revelando un papel funcional de todos estos sensores (Fig. 1.3). Además, estos efectos fueron enmascarados mediante osmoremediación (Fig. 1.3) de manera similar a lo observado anteriormente para mutantes en otros elementos de la ruta (Fig. 1.2B), una respuesta habitualmente observada para dichos mutantes (Levin, 2011).

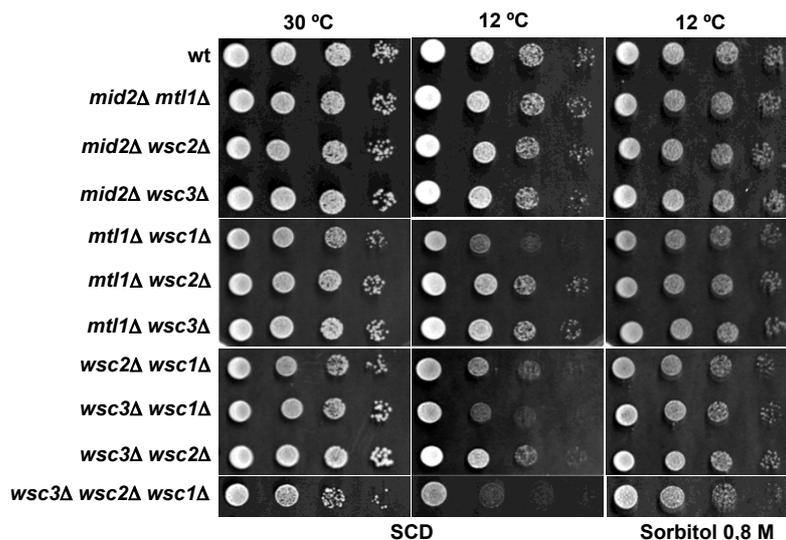


Figura 1.3. El sensor Wsc1p es necesario para el óptimo crecimiento a bajas temperaturas. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741(wt) y de sus mutantes con delecciones de dos o tres de los genes que codifican los sensores de membrana, tanto a 30 como a 12°C, en SCD y a 12°C en SCD con sorbitol 0,8 M. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Por otra parte, analizamos el papel funcional de Rho1p. Ya que la ausencia de Rho1p es letal, se procedió a estudiar el fenotipo de algunos de sus reguladores, los denominados GAPs (GTPase-activating proteins) y GEFs (guanosine nucleotide exchange factors). Como se observa en la Figura 1.4, no se apreció defecto de crecimiento por la delección de *BEM3*. No obstante, la ausencia de las Rho1-GAPs Bem2p y Sac7p, proteínas implicadas en la regulación de la activación de la ruta (Martín y col., 2000; Schmidt y col., 2002), tuvo un efecto negativo sobre el crecimiento celular a 12°C, lo que podría indicar, la participación de dichos reguladores sobre la actividad de Rho1p bajo estas condiciones. Es importante recordar, que la proteína Sac7p, ha sido recientemente involucrada en la regulación de la actividad Rho1p en una ruta de señalización que participa en la homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática (Lockshon y col., 2012). Por otro lado, se examinó el efecto de la delección de los tres principales factores activadores de la actividad GTPasa de Rho1p, Rom2p (Fig. 1.2B), Rom1p y Tus1p (Fig. 1.4). En ninguno de los casos se observó un defecto de

crecimiento a 12°C, aunque no podemos descartar que este fenotipo se deba a una función redundante de los diferentes factores o bien a la participación de algún otro factor no descrito hasta el momento.

En conclusión, podemos afirmar que el crecimiento de la levadura *S. cerevisiae* a 12°C requiere de la actividad de proteínas que detectan y responden a daños en la pared celular y/o la membrana plasmática.

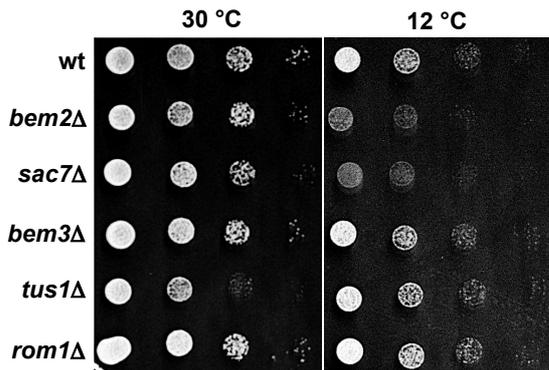


Figura 1.4. Algunos elementos reguladores de Rho1p son esenciales para el crecimiento a bajas temperaturas. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *bem2Δ*, *sac7Δ*, *bem3Δ*, *tus1Δ* y *rom1Δ*, a 30 y 12°C en medio SCD. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

3. Implicación de Pkc1p en la respuesta a frío

Con el objeto de obtener mas evidencias de la señalización inducida por frío a través de la ruta CWI, pasamos a analizar el nivel de polarización de la actina como un indicador del nivel de activación de Pkc1p. En respuesta a estreses que perturban la pared celular, el citoesqueleto de actina sufre una despolarización seguida por una repolarización (De la Torre Ruiz y col., 2010), un proceso dinámico en el que la despolarización de la actina depende de Pkc1p, mientras que Slt2p, es responsable de la repolarización por su efecto retroinhibidor sobre Rho1p (Guo y col., 2009) (Fig. 1.5B). Para tal fin, células incubadas a 12°C, fueron recogidas a diferentes tiempos, fijadas y sus filamentos de actina teñidos con rodamina-faloidina. Como se muestra en la Figura 1.5A, el citoesqueleto de actina no se vio afectado por un descenso térmico. Además, la presencia de un número extra de copias de *PKC1* no tuvo efecto alguno en el crecimiento ni a 30 ni a 12°C de la cepa silvestre (Fig. 1.5C). En el caso del mutante *slt2Δ*, la sobreexpresión de *PKC1*, no tuvo efecto sobre el crecimiento a 12°C, mientras que fue perjudicial para su crecimiento a 30°C. Por tanto, parece que Slt2p, podría desempeñar un efecto inhibitor sobre la actividad de Pkc1p, como se ha descrito para otras condiciones (Guo y col., 2009) y que un exceso de dicha actividad sería negativo para el crecimiento celular.

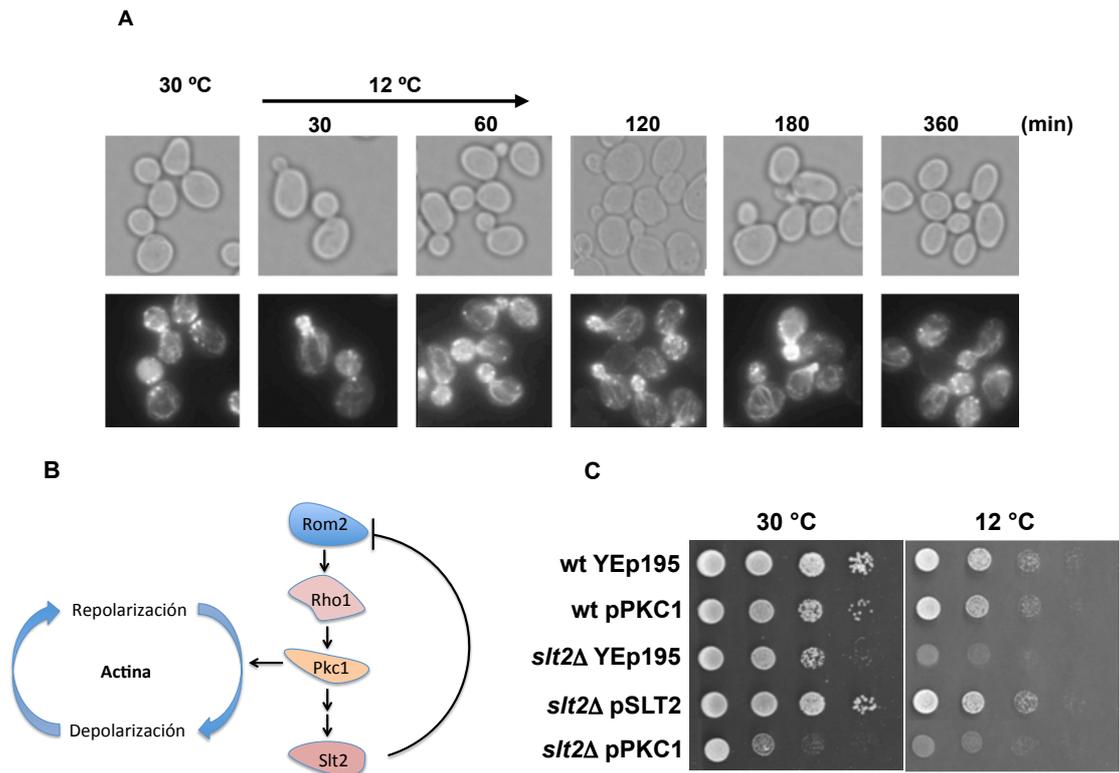


Figura 1.5. La activación de Pkc1p no parece ser esencial para el crecimiento a bajas temperaturas. (A) Imágenes obtenidas mediante microscopía de fluorescencia de células de la cepa silvestre BY4741, incubadas en medio SCD a 30°C y transferidas a 12°C durante los tiempos indicados. Las células fueron recogidas, fijadas y procesadas para la tinción de los filamentos de actina tal y como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. (B) Representación del proceso de despolarización y repolarización. (C) Análisis del crecimiento a 30°C y 12°C en medio SDC-Ura de sobreexpresantes de *PKC1* o *SLT2* de la cepa silvestre (wt) y el mutante *slt2Δ*. Transformantes conteniendo un plásmido vacío Yeplac195 fueron usadas como control. Se procedió tal y como se describe en la Figura 1.1.

4. Activación de Slt2p ante un descenso de temperatura

Los resultados obtenidos nos hacen plantear la existencia de una señalización a través de la ruta CWI en respuesta a un descenso de la temperatura. Para confirmarlo, estudiamos la activación por fosforilación de Slt2p a 12°C, para lo cual, células del mutante *slt2Δ* portando el plásmido pSLT2-HA, fueron incubadas a 25°C hasta fase exponencial, transferidas a 12°C y recogidas a diferentes tiempos para su análisis mediante Western blot (Fig. 1.6A). La exposición a frío incrementó la fosforilación de Slt2p, con un máximo a los 120 min después de la exposición a 12°C. A partir de ese momento, los niveles de la proteína fosforilada comienzan a decrecer, aunque la fosforilación de la MAPK fue todavía evidente a los 180 min de incubación. Además, dicha fosforilación fue dependiente de la presencia de una proteína Bck1p funcional, tanto a bajas temperaturas como en presencia de un conocido agente activador de la ruta, el blanco de calcoflúor (CFW) (Fig. 1.6B).

Con el fin de clarificar si los sensores de membrana WSC participan en la percepción de la señal que provoca la fosforilación de la MAPK, analizamos la activación de Slt2p en un mutante *wsc1Δ*. Como muestra la Figura 1.6C, la delección de *WSC1*, disminuyó el nivel de fosforilación de Slt2p a 12°C, un efecto que fue todavía más acusado en el mutante triple *wsc3-1Δ*. Así, la proporción de fosfo-Slt2p a 12°C frente 25°C (tiempo 0), fue de aproximadamente de 5, 2 y 1 para la cepa silvestre, el mutante simple *wsc1Δ* y el triple mutante, respectivamente. En este punto, cabe destacar, que como observamos en la Figura 1.7C, la ausencia de *WSC1* aumenta los niveles de fosforilación basales de la proteína Slt2p en células creciendo a 25°C (tiempo 0).

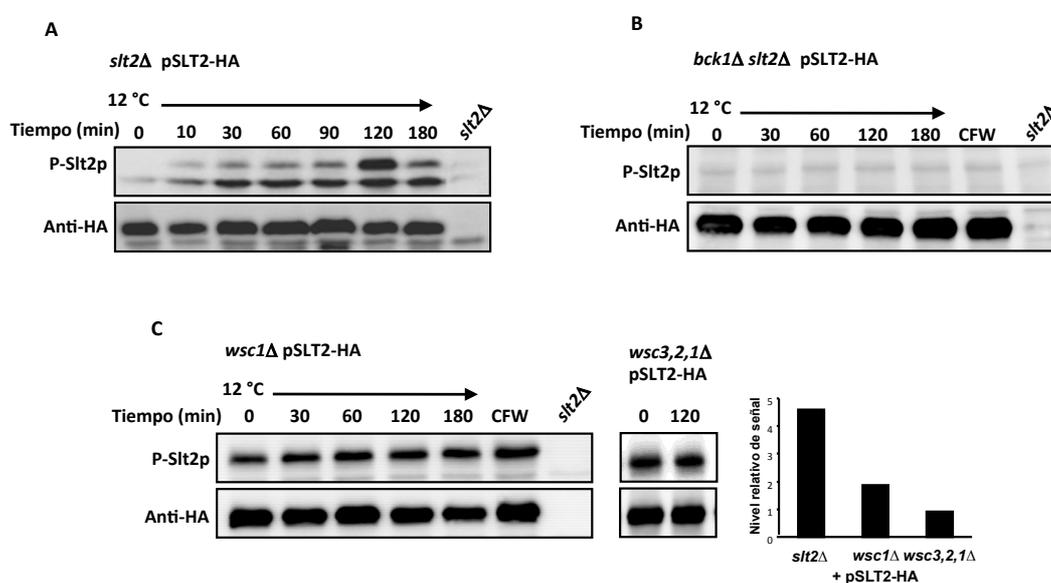


Figura 1.6. Slt2p es activada por fosforilación dependiente de la presencia de los sensores Wsc1-3p y de la MAPKK Bck1p. (A) Transformantes pSLT2-HA del mutante *slt2Δ* fueron analizados por Western blot. (B) Extractos del doble mutante *bck1Δ slt2Δ*, transformado con el plásmido pSLT2-HA fueron analizados por Western blot. (C) Células del mutante *wsc1Δ* y del triple mutante *wsc3Δ wsc2Δ wsc1Δ*, transformadas con el plásmido pSLT2-HA fueron analizados por Western blot. En todos los casos, las células fueron incubadas en SCD-Ura a 25°C hasta fase exponencial ($DO_{600} \sim 0,5$), momento en el que se transfirieron a 12°C. A los tiempos indicados, las células fueron recogidas y procesadas tal y como se describe en Materiales y Métodos. Se recogieron alicuotas del cultivo crecido a 25°C (tiempo 0) y se trataron con CFW y fueron usadas como control positivo. Cultivos de células del mutante *slt2Δ* fueron utilizados como control negativo. El histograma muestra el nivel relativo de señal de Slt2p fosforilada (tras 120 min a 12°C dividida por la señal a 25°C, tiempo 0) para las cepas *slt2Δ*, *wsc1Δ* y *wsc3Δ wsc2Δ wsc1Δ*.

De acuerdo con estos resultados, el defecto de crecimiento del mutante *wsc1Δ*, así como el del triple mutante *wsc3Δ wsc2Δ wsc1Δ*, fue aliviado por la expresión de un alelo hiperactivo de *BCK1*, denominado *BCK1-20* (Lee y Levin, 1992) (Fig. 1.7). Merece la pena destacar, que el efecto de *BCK1-20* es específico y fue incapaz de suprimir el fenotipo de un mutante *slt2Δ*. Por tanto, los sensores *WSC1-3*, participan en la percepción y generación de una señal de frío que se transmite a la MAPK Slt2p por elementos aguas arriba.

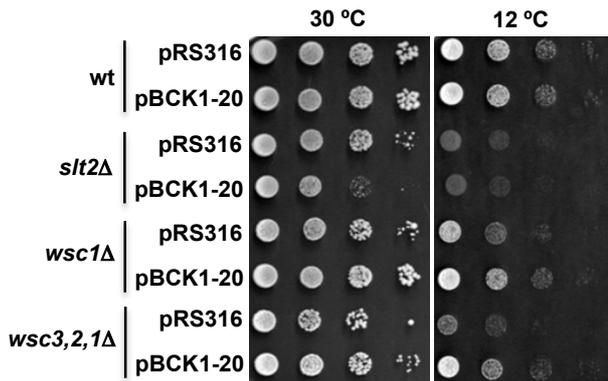


Figura 1.7. Una forma constitutivamente activa de Bck1p revierte el fenotipo causado por la ausencia de los sensores Wsc1-3p. Crecimiento de transformantes *BCK1-20* (pBCK1-20) de la cepa silvestre BY4741 (wt) y sus correspondientes mutantes *slt2Δ*, *wsc1Δ* y *wsc3-1Δ* (*wsc3,2,1Δ*) a 30 y 12°C en medio selectivo SCD-Ura. Transformantes conteniendo el plásmido vacío pRS316 fueron analizadas como controles. Se procedió tal y como se describe en la Figura 1.1.

5. Importancia de la actividad quinasa de Slt2p en el crecimiento de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas

Una vez observado que la MAPK Slt2p es fosforilada en respuesta a un descenso de la temperatura, analizamos si la actividad quinasa de Slt2p es esencial para el crecimiento en frío. Con tal fin, células del mutante *slt2Δ*, fueron transformadas con el plásmido pSLT2-km, que contiene una forma de Slt2p mutante (K54R) carente de actividad catalítica (Guo y col., 2009). Como control, usamos células transformadas con un plásmido que contiene una forma nativa de *SLT2* (pSLT2) (Guo y col., 2009). Como se muestra en la Figura 1.8, el alelo mutante no consiguió complementar el defecto de crecimiento en frío de un mutante *slt2Δ*, mientras que una forma nativa de la proteína Slt2p revirtió completamente el fenotipo hasta alcanzar un crecimiento similar al de una cepa silvestre, a 12°C. Sin embargo, cuando realizamos este experimento utilizando una cepa mutante *bck1Δ*, observamos una mejora parcial del crecimiento respecto a la cepa control (que contiene un plásmido vacío), independiente del alelo de *SLT2* utilizado, por tanto, responde a funciones de Slt2p independientes de su actividad quinasa y de su activación por parte de Bck1p. Nuestros resultados indican que Slt2p es fosforilada tras un descenso de la temperatura y desempeña su función a través de mecanismos que requieren su actividad quinasa de proteínas. No obstante, no podemos descartar su participación en procesos que no requieran su activación por parte del módulo de MAPKs, ni su actividad quinasa.

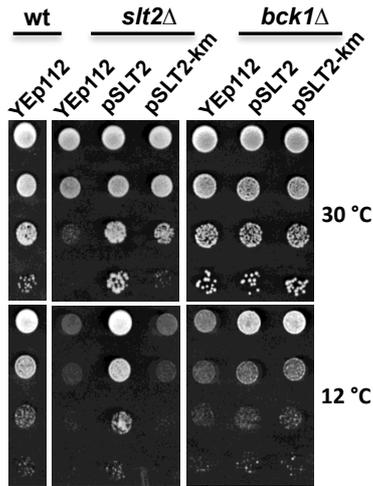


Figura 1.8. La actividad quinasa de Slt2p es necesaria para el crecimiento a bajas temperaturas. Crecimiento a 30 y 12°C en medio SCD-Trp de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *slt2*Δ y *bck1*Δ, transformados con un plásmido conteniendo una forma nativa (pSLT2), o una forma mutada del gen *SLT2* (pSLT2-km) que deja sin actividad quinasa a la MAPK. Transformantes YEplac112 fueron usados como controles. Se procedió tal y como se describe en la Figura 1.1.

6. Respuesta transcripcional mediada por la activación de la ruta CWI a bajas temperaturas

Llegados a este punto, nos propusimos examinar si Slt2p está implicada en la inducción de la transcripción génica mediada por conocidos factores de transcripción dependientes de su actividad. En primer lugar, analizamos la inducción de la expresión controlada por Rlm1p usando un plásmido (p2XRlm1-*lacZ*) que contiene dos regiones de unión a Rlm1p fusionados con el gen *lacZ* de *E. coli*. Como se muestra en la Figura 1.9B, se detectó un incremento de la actividad transcripcional dependiente de Rlm1p en células de la cepa silvestre expuestas a CFW. Sin embargo, no se produjo tal activación a 12°C, un resultado que concuerda con la ausencia de un defecto de crecimiento del mutante *rlm1*Δ a esa temperatura (Fig. 1.9C). Además, observamos que Slt2p es necesaria para la expresión basal del chivato tanto a 25°C como a 12°C (Fig. 1.9B). Obtuvimos un resultado similar cuando analizamos la expresión de *FKS2* (pFKS2-*lacZ*) mediada por el complejo SBF (Kim y col., 2008) (Figura 1.9B). Sin embargo la delección de *SWI4* o *SWI6* produjo un claro defecto de crecimiento a bajas temperaturas, que en el caso del mutante *swi4*Δ no fue osmoremediable (Fig. 1.9C).

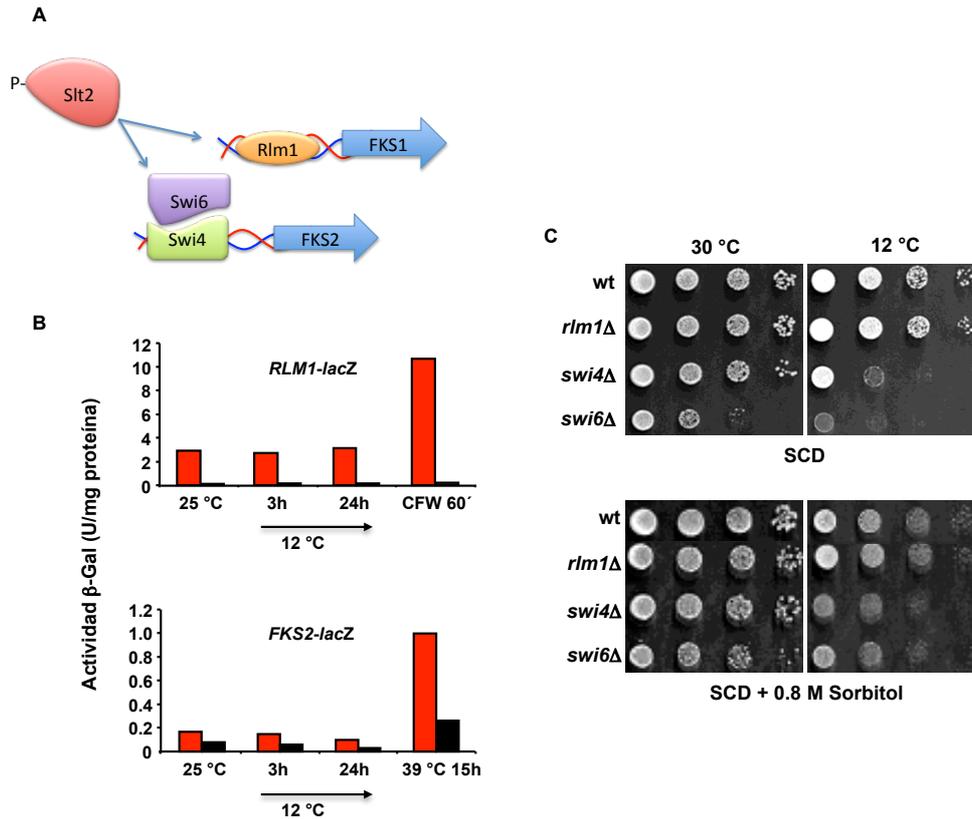


Figura 1.9. Un descenso de la temperatura no desencadena una respuesta transcripcional mediada por los factores Rlm1p o SBF. (A) Representación esquemática de la MAPK Slt2p y de los factores transcripcionales bajo su control. **(B)** Análisis de la activación de dos chivatos de la ruta CWI, *RLM1-lacZ* y *FKS2-lacZ*, en células la cepa silvestre BY4741 (wt) y del mutante *slt2Δ*. Las células fueron incubadas a 25°C en medio SCD-Ura, hasta su fase exponencial de crecimiento, después fueron transferidas a 12°C, para ser recogidas a las 3 y 24 horas. Una alícuota de cultivo a 25°C (tiempo 0) fue incubada con 40 μg/ml de CFW o a 39°C, según el caso, y utilizadas como control positivo. El histograma muestra el nivel de activación de dichos chivatos representado como unidades de β-galactosidasa por mg de proteína. **(C)** Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus correspondientes mutantes *rlm1Δ*, *swi4Δ* y *swi6Δ*, a 30 y 12°C en medio SCD y en este mismo medio suplementado con 0,8 M de sorbitol . Se procedió tal y como se indica en le Figura 1.1.

A continuación, comparamos el transcriptoma de la cepa silvestre y el mutante *slt2Δ* a 12°C. Los datos obtenidos de los ensayos con microarrays revelaron pocas diferencias en los niveles de mRNA bajo esta condición. Sin embargo, cabe destacar que, de entre los genes que encontramos reprimidos en la cepa mutante, un 24% codifican proteínas de pared celular (GO:0071554, P value: $6,23E^{-10}$) (Ver Anexo). Por tanto, Slt2p, parece ser requerida para mantener la expresión basal de un subgrupo de genes a bajas temperaturas, una función en la cual Rlm1p, Swi4p o Swi6p podrían ser importantes. Sin embargo, estos factores transcripcionales no parecen ser dianas de la fosforilación por Slt2p tras un descenso en la temperatura, ya que no parece inducirse un programa transcripcional dependiente de Slt2p, específico de la condición objeto de estudio.

7. Implicación de la MAPK Slt2p en la modificación de la pared celular tras la exposición a bajas temperaturas.

Los resultados obtenidos, nos llevaron a preguntarnos si la activación observada de Slt2p era debida a un efecto del descenso térmico sobre la composición, estructura y/o organización de la pared celular, o realmente se debía a la señalización secundaria disparada por modificaciones de otras estructuras o funciones celulares. Con esta idea, analizamos si la exposición a frío altera la sensibilidad de las células a Zimoliasa, como ha sido descrito para células tratadas con Rojo Congo, CFW o cafeína (Kuranda y col., 2006). La Figura 1.10, muestra los resultados de la tolerancia a un tratamiento con Zimoliasa, de células de la cepa silvestre y del mutante *slt2Δ* cultivadas previamente a 30 y 12°C. Como se observa, la exposición a frío, incrementó la tolerancia a Zimoliasa de las dos cepas analizadas, descartando por tanto, un efecto mediado por Slt2p. Este resultado concuerda con los mostrados previamente en los que la proteína Slt2p no parecía inducir una respuesta transcripcional que diera lugar a modificaciones en la pared como respuesta al frío.

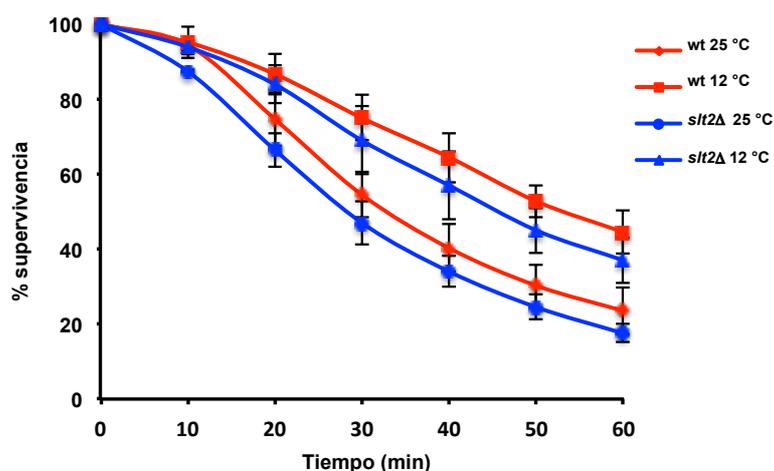


Figura 1.10. La exposición a bajas temperaturas altera la sensibilidad a Zimoliasa. Representación del % de supervivencia (YO₆₀₀) frente al tiempo (min) de la cepa silvestre BY4741 (wt) y su mutante *slt2Δ* incubados a 25 o 12°C en medio SCD y posteriormente expuestos a un tratamiento con 50 μg/ml de Zimoliasa a 25°C. Se procedió tal y como se indica en Materiales y Métodos.

8. Implicación del complejo SBF (Swi4p/Swi6p) en el crecimiento a bajas temperaturas

Como se ha comentado anteriormente la delección de *SWI4* tiene efectos deletéreos para el crecimiento en frío de *S. cerevisiae*. También observamos que Swi6p es requerida para el óptimo crecimiento celular, aunque su efecto es independiente de la temperatura. Para clarificar la conexión funcional entre estas proteínas y el módulo de MAPKs de la ruta CWI, se llevó a cabo la delección de los genes *BCK1* o *SLT2* en los mutantes sencillos *swi4Δ* o *swi6Δ* y se estudió el crecimiento de los dobles mutantes, tanto a 30 como a 12°C. Como se muestra en la Figura 1.11, los dobles mutantes *swi4Δ bck1Δ* y *swi4Δ slt2Δ* mostraron un defecto de crecimiento a 30°C, que fue exacerbado cuando la temperatura de crecimiento se redujo a 12°C. Además, el fenotipo parece ser la suma de los fenotipos observados en los mutantes simples, lo que sugiere la ausencia de interacciones genéticas bajo estas condiciones. Por su parte, los mutantes *swi6Δ bck1Δ* y *swi6Δ slt2Δ* mostraron también un defecto de crecimiento más acusado que el observado en el mutante sencillo *swi6Δ*, si bien, de nuevo, el efecto fue independiente de la temperatura (Fig. 1.11).

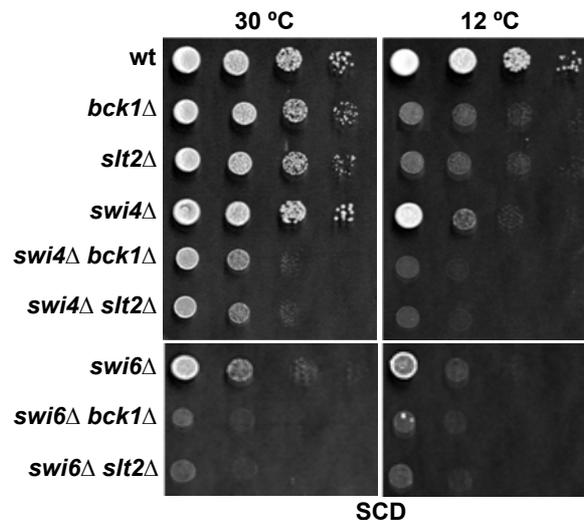


Figura 1.11. La delección de *BCK1* o *SLT2* sobre los mutantes *swi4Δ* o *swi6Δ* da lugar a fenotipos aditivos a baja temperatura. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *bck1Δ*, *slt2Δ*, *swi4Δ*, *swi6Δ* y dobles mutantes *swi4Δ bck1Δ*, *swi4Δ slt2Δ*, *swi6Δ bck1Δ* y *swi6Δ slt2Δ*, a 30 y 12°C en medio SCD. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Por otra parte, decidimos comprobar si el defecto de crecimiento de los dobles mutantes *swi4Δ bck1Δ* y *swi4Δ slt2Δ* dependía, en mayor o menor medida de su capacidad de biosíntesis de inositol. Conviene recordar que los mutantes sencillos *slt2Δ* y *bck1Δ* muestran un ligero defecto de crecimiento a 30°C (Fig. 1.2B) que se alivia por la adición de 75 μM de

inositol en el medio de cultivo (Fig. 1.1B y Fig. 1.12). Como se observa en la Figura 1.12, este fue también el caso para los mutantes dobles, cuyo crecimiento a esta temperatura se estimuló en presencia de elevadas dosis de inositol. Sin embargo, su sensibilidad a frío fue similar en ausencia o presencia de este compuesto, en concordancia también con el resultado para el mutante sencillo *slt2Δ* (Figuras 1.1B y 1.12).

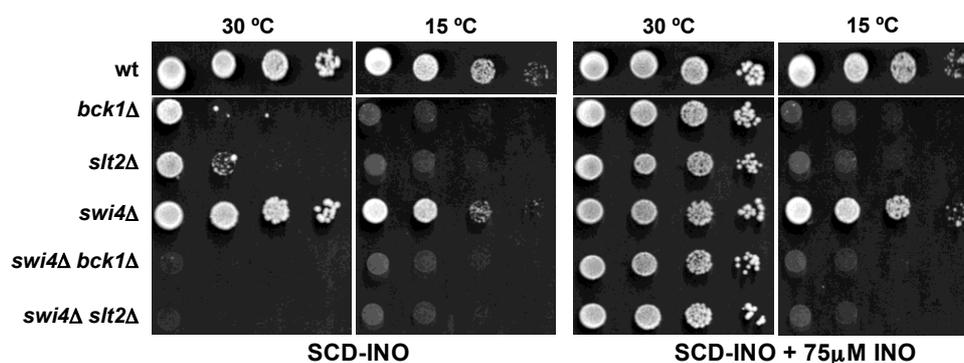


Figura 1.12: La adición de inositol al medio alivia el defecto de crecimiento a 30°C pero no el observado a 12°C en cepas carentes de *BCK1* o *SLT2*. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *bck1Δ*, *slt2Δ*, *swi4Δ* y de los dobles mutantes *swi4Δ bck1Δ* y *swi4Δ slt2Δ*, a 30 y 15°C, en medios SCD sin inositol (SCD-INO) o SCD sin inositol al que se añadió inositol a una concentración final de 75 μM (SCD-INO + 75 μM INO). Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

9. Comunicación entre las rutas CWI y HOG en respuesta a un descenso térmico

Llegados a este punto, nos interesamos por averiguar si el defecto de crecimiento del mutante *slt2Δ* a 12°C podía estar determinado por la actividad de la ruta HOG. Trabajos previos han mostrado que la MAPK Hog1p es fosforilada en células expuestas a baja temperatura (Panadero y col., 2006), y hay evidencias de una comunicación cruzada entre las rutas HOG y CWI. Así pues, analizamos el estado de fosforilación de la proteína Hog1p a 12°C en una cepa carente de Slt2p. La exposición de las células a bajas temperaturas o NaCl indujo una fosforilación rápida y transitoria de la MAPK, similar a la descrita previamente en células silvestres (Van Wuytswinkel y col., 2000; Panadero y col., 2006) (Fig. 1.13A). Sin embargo, la ausencia de Slt2p prolongó el tiempo en que la proteína se encuentra fosforilada tanto en frío como bajo estrés osmótico. Estos resultados encajan con un modelo en el cual Slt2p inhibe la fosforilación de Hog1p inducida por frío. De la misma forma, la ausencia de Hog1p alteró la cinética de fosforilación de Slt2p en respuesta a un descenso de la temperatura, con una activación más temprana de la ruta CWI, un efecto observado de forma más clara en células expuestas a CFW (Fig. 1.13B).

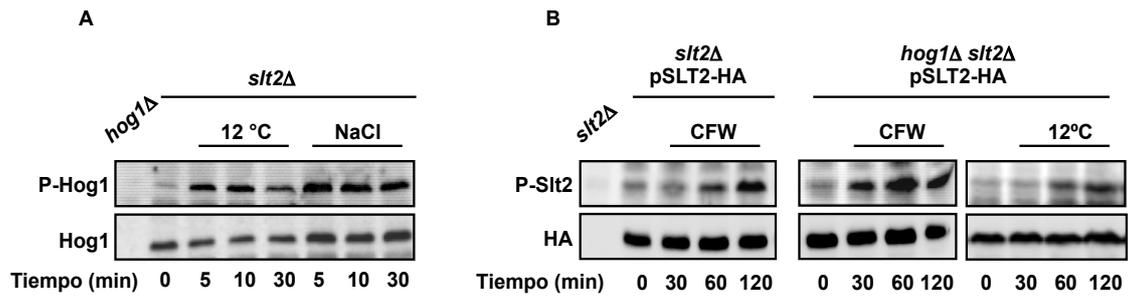


Figura 1.13: La ausencia de Slt2p altera la cinética de fosforilación de Slt2p y viceversa. (A) Células el mutante *slt2Δ* incubadas a 30°C en medio rico YPD fueron transferidas al mismo medio a 12°C o conteniendo NaCl a una concentración final de 0,4 M. A los tiempos indicados, las células fueron recogidas para la extracción de proteínas, que fueron analizadas por Western blot. Para la detección de proteínas se utilizaron anticuerpos anti-fosfo-p38 que reacciona con la fosforilación dual de la proteína (P-Hog1) y anti-Hog1p como control de carga (Hog1p). (B) Se analizó la fosforilación de Slt2p en los mutantes *slt2Δ* y *hog1Δ slt2Δ* expresando Slt2p con una cola de HA (pSLT2-HA). Las células fueron incubadas en medio SCD a 25°C hasta su fase de crecimiento exponencial tras lo que fueron transferidas a 12°C o al mismo medio conteniendo 40 μg/ml de CFW. Se recogieron células a los tiempos indicados y fueron procesadas para la extracción de proteínas. En este caso se utilizaron los anticuerpos anti-fosfo-p42/44 MAPK para la detección de la proteína fosforilada o anti-HA como control de carga. En todos los casos, para la extracción de proteínas se procedió tal y como se indica en Materiales y Métodos.

Cuando analizamos los efectos epistáticos de *HOG1* y *SLT2* a bajas temperaturas (Fig. 1.14), observamos que la disrupción de *HOG1* en un mutante *slt2Δ* no tiene efectos diferentes sobre su crecimiento en frío que los mostrados por el mutante simple. De igual forma, el doble mutante *slt2Δ hog1Δ* mostró el mismo defecto de crecimiento en NaCl que el mutante simple *hog1Δ*. Sin embargo, la ausencia de Hog1p en un mutante *slt2Δ*, confirió a la célula protección frente a CFW, indicando que, para dicha protección, similar a la mostrada por el mutante simple *hog1Δ*, no parece ser necesaria la presencia de una proteína Slt2p funcional. Destacar en este punto que el mutante *hog1Δ*, ya presenta mayor tolerancia a CFW que la correspondiente cepa silvestre, tal y como había sido descrito por García-Rodríguez y col. (2000). En general, nuestros resultados demuestran la existencia de una comunicación cruzada entre las rutas CWI y HOG que parece ser importante en la respuesta adaptativa de la levadura frente a CFW. Sin embargo, nuestros datos no son compatibles con un modelo simple en el cual, una activación de Slt2p mediada por Hog1p en respuesta a un descenso brusco de la temperatura, determina el crecimiento celular en estas condiciones.

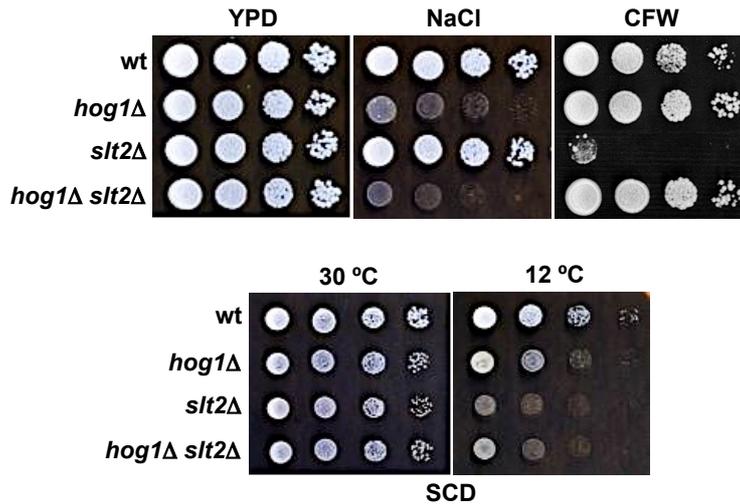


Figura 1.14. La ausencia de Hog1p mejora la tolerancia de un mutante *slt2Δ* frente a CFW pero no tiene efecto en NaCl o a 12°C. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *hog1Δ*, *slt2Δ* y el doble mutante *slt2Δ hog1Δ* a 30°C en medio rico YPD, y en este mismo medio al que se adicionó NaCl a una concentración de 0,4 M o 20 µg/ml de CFW, o bien, en medio SCD a 30 y 12°C. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

10. TORC1 y las rutas CWI y RAS-cAMP controlan la actividad de PKA en respuesta a un descenso en la temperatura

Como se menciona en la introducción, trabajos previos demuestran la existencia de conexiones moleculares entre TORC1 y PKA a través de la ruta CWI (Soulard y col., 2010). En concreto, TORC1 inhibe la fosforilación de Bcy1p, la subunidad reguladora de PKA, a través de Sch9p (supresor de *cdc25*) y Slt2p. Teniendo en cuenta estos datos, decidimos analizar el efecto de la sobre-expresión de *BCY1* en células expuestas a bajas temperaturas. Como se muestra en la Figura 1.15, la presencia de una copia extra de *BCY1* o *TPK1* (gen que codifica para una de las subunidades catalíticas de PKA), no tiene efecto sobre el crecimiento de la cepa silvestre BY4741. El crecimiento del mutante *slt2Δ* tampoco se alteró por la presencia de un mayor número de copias de *TPK1*. Sin embargo, una copia extra de *BCY1*, alivió parcialmente su defecto de crecimiento a 12°C, situación que no se observa en células carentes de Swi4p. Por tanto, esta proteína regula a 12°C dianas diferentes a las controladas por Slt2p.

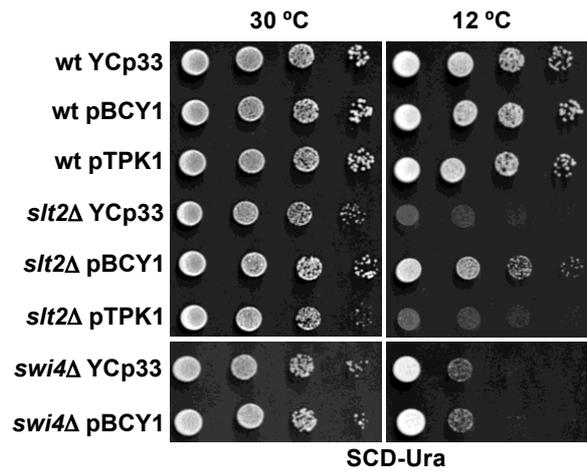


Figura 1.15. La presencia de una copia extra de *BCY1* alivia parcialmente el defecto de crecimiento de un mutante *slt2Δ*. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *slt2Δ* y *swi4Δ* portando una copia extra de los genes *BCY1* (pBCY1) y *TPK1* (pTPK1), a 30 y 12°C en medio SCD-Ura. Transformantes con YCplac33 (plásmido vacío) fueron utilizadas como controles. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Estos resultados sugirieron que una menor actividad PKA podría ser necesaria para un óptimo crecimiento a bajas temperaturas. Por ello, nos dispusimos a analizar la regulación de factores transcripcionales dependientes de PKA, en particular los factores *MSN2* y *MSN4*, que controlan la respuesta general a estrés en *S. cerevisiae* (Estruch, 2000). Además, se ha descrito que la sobreexpresión de *MSN2* revierte el fenotipo de sensibilidad a estrés oxidativo de células carentes del sensor Mtl1p (Petkova y col., 2010). En nuestro caso, la delección de *MSN2*, *MSN4* o de ambos genes, no tuvo o tuvo un efecto muy ligero en el crecimiento a bajas temperaturas (Fig. 1.16A). Además, la sobreexpresión de *MSN2* sólo mejoró parcialmente el crecimiento de los mutantes *bck1Δ* o *slt2Δ* (Fig. 1.16B). Finalmente, medimos la activación del gen *lacZ* dirigida por un promotor sintético que contiene la secuencia STRE del gen *CTT1*, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *slt2Δ*. Como se muestra en la Figura 1.16C, no se detectó un incremento significativo de la actividad β-galactosidasa tras exponer las células a baja temperatura. Sin embargo, observamos una clara inducción dependiente de la presencia de Msn2p/Msn4p cuando las células fueron privadas de glucosa. Todo ello sugiere que la atenuación de la actividad PKA mediada por la activación de Slt2p, podría ser importante para la adaptación de la levadura a bajas temperaturas. Sin embargo, los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p, no desempeñan un papel esencial en este proceso, sugiriendo el control por parte de PKA de otros factores transcripcionales, en la respuesta adaptativa de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas.

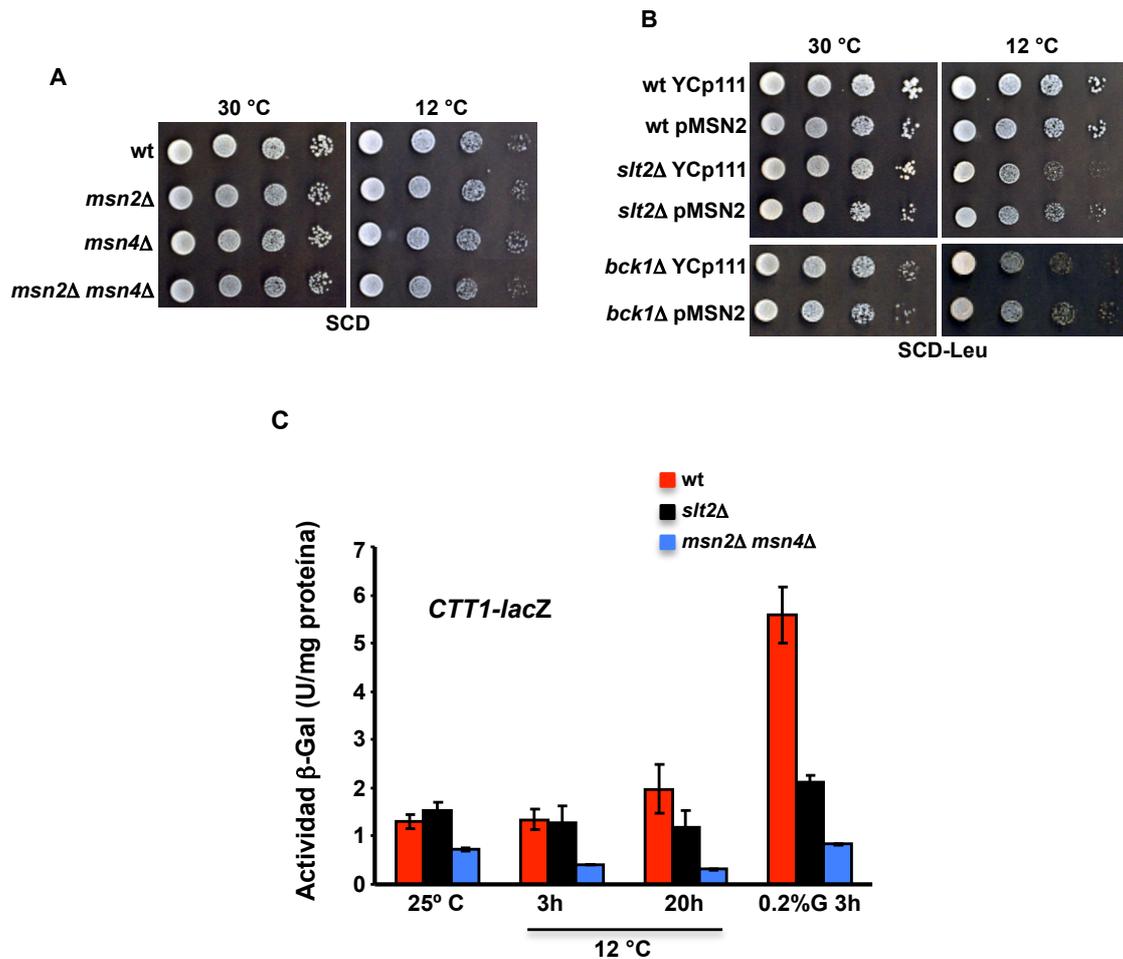


Figura 1.16. Los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p no son esenciales para la tolerancia a bajas temperaturas. (A) Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt), de sus mutantes *msn2Δ*, *msn4Δ* y del doble mutante *msn2Δ msn4Δ* a 30 y 12°C en medio SCD. (B) Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *slt2Δ* y *bck1Δ*, portando una copia extra del gen *MSN2* (pMSN2), a 30 y 12°C en medio SCD-Leu. Dichas cepas fueron transformadas con el plásmido YCp111 y utilizadas como control. En ambos casos (A y B) se procedió tal y como se indica en la figura 1.1. (C) Representación de la activación del chivato formado por la STRE del gen *CTT1* y el gen *lacZ*. Células de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de su mutante *slt2Δ* fueron incubadas a 25°C y transferidas a 12°C durante los tiempos indicados o transferidas a un medio con un 0,2 % de glucosa como fuente de carbono. El doble mutante *msn2Δ msn4Δ* fue utilizado como control negativo. El histograma representa la media \pm la desviación típica de tres experimentos independientes. La obtención y análisis de extractos se llevó a cabo tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos.

Con el fin de obtener una información más completa a cerca de la regulación de la ruta PKA en esta situación de estrés, llevamos a cabo varias aproximaciones fenotípicas. La delección de *TOR1* o *SCH9* en cepas del fondo genético BY4741 (Fig. 1.17) no pareció alterar su crecimiento a 12°C. Sin embargo, la ausencia de *SCH9* alivió el fenotipo de sensibilidad a bajas temperaturas de los mutantes *slt2Δ* y *bck1Δ* (Fig. 1.17). Puesto que, la delección de *SCH9* se ha relacionado con un descenso de la actividad PKA (Zhang y col., 2011) y por tanto

de la fosforilación de algunas de sus dianas, como *MSN2* o *MAF1* (Trott y col., 2005; Huber y col., 2009; Lee y col., 2009), dichos efectos podrían ser beneficiosos para el crecimiento celular a bajas temperaturas, sin necesidad de la participación del módulo de MAPKs.

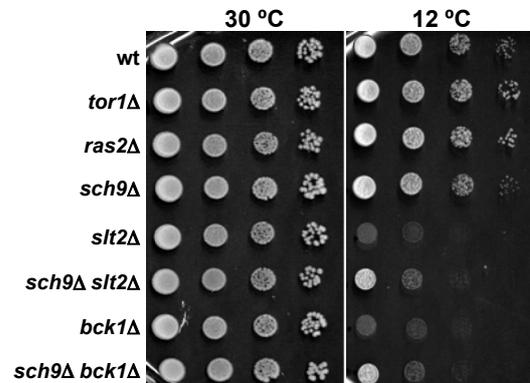


Figura 1.17. La ausencia de Sch9p alivia el fenotipo de sensibilidad a baja temperatura en ausencia de Slt2p o Bck1p. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *tor1Δ*, *ras2Δ*, *sch9Δ*, *slt2Δ*, *bck1Δ* y los dobles mutantes *sch9Δ slt2Δ* y *sch9Δ bck1Δ*, a 30 y 12°C en medio SCD. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Por otro lado, cuando analizamos la ausencia de *TOR1* en células del fondo genético CML128, auxótrofas para triptófano (Fig. 1.18A) observamos un defecto de crecimiento a 12°C, como se había descrito previamente (Sturgill y col., 2008), mientras que, un mutante *ras2Δ* mostró un fenotipo de tolerancia en estas condiciones. Recordar, que *RAS2* codifica un regulador positivo de la enzima adenilato ciclasa y por tanto, células carentes de este gen muestran una actividad PKA reducida (Santangelo, 2006). Estos resultados, de nuevo indican que una menor actividad PKA es necesaria para el crecimiento a baja temperatura. En efecto, la ausencia de *IRA2*, inhibidor de la ruta RAS-cAMP, o de *PDE2*, una fosfodiesterasa de cAMP (Fig. 1.18B), tuvo como consecuencia un aumento de la sensibilidad a bajas temperaturas, incluso en el fondo genético BY4741. Por tanto, proteínas que regulan la actividad de PKA, tienen influencia en el crecimiento de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas.

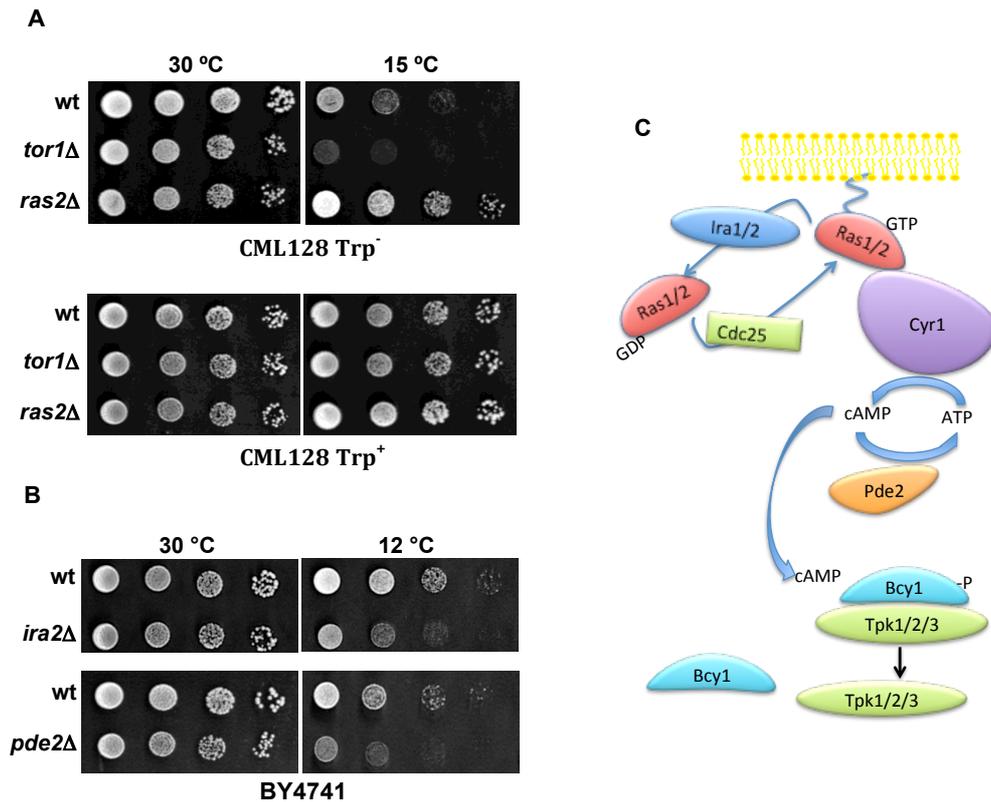


Figura 1.18. Fenotipo a baja temperatura de elementos de la ruta TOR y cAMP-PKA. (A) Crecimiento de la cepa silvestre (wt) CML128, auxótrofa (CML128 Trp⁻) o protótrofa (CML128 Trp⁺) para Trp, y de sus mutantes *tor1Δ* y *ras2Δ* a 30 y 15°C en medio SCD. (B) Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y sus mutantes *ira2Δ* y *pde2Δ*, a 30 y 12°C en medio SCD. En todos los casos se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1. (C) Representación de la ruta cAMP-PKA.

Finalmente analizamos el impacto de la ausencia de Sch9p en la fosforilación de Slt2p. Trabajos previos habían mostrado que la MAPK es fosforilada y activada por rapamicina en células mutantes *sch9Δ*, lo que sugiere que la conexión entre ambas proteínas es indirecta (Soulard y col., 2009). De acuerdo con este resultado, Slt2p se fosforiló en células expuestas a un descenso térmico en ausencia de *SCH9* (Fig. 1.19).

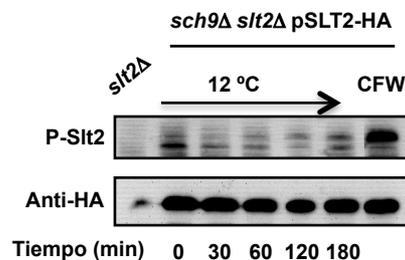


Figura 1.19. La proteína Slt2p es fosforilada como consecuencia de un descenso de la temperatura en ausencia de Sch9p. Fosforilación de Slt2p en células del doble mutante *sch9Δ slt2Δ* transformadas con el plásmido pSLT2-HA, incubadas a 25°C en medio SCD y transferidas a 12°C para ser recogidas a distintos tiempos. Células de esta cepa fueron transferidas al mismo medio con 40 μg/ml de CFW como control positivo y extractos del mutante *slt2Δ* se utilizaron como control negativo. La extracción de proteínas se llevó a cabo tal y como se indica en Materiales y Métodos.

11. Aislamiento de supresores en multicopia del fenotipo de sensibilidad a baja temperatura del mutante *slt2Δ* de *S. cerevisiae*

Con el objeto de profundizar en el papel funcional de Slt2p en la respuesta a frío de *S. cerevisiae*, llevamos a cabo un rastreo de supresores en multicopia. Para ello, se transformó un doble mutante *bck1Δ slt2Δ* con una librería genómica de *S. cerevisiae*. Utilizamos esta cepa con la idea de evitar el aislamiento del propio gen *SLT2* como supresor. Los transformantes se seleccionaron en medio SCD-Ura a 12°C. Aquellos clones que mostraron un crecimiento más rápido con respecto a la cepa silvestre, fueron repicados para su análisis posterior. Los plásmidos aislados en el rastreo se agruparon en tres patrones de restricción diferentes. Un representante de cada patrón, a los que denominamos pSFS-4, pSFS-7 y pSFS-47, fue utilizado para retransformar la cepa mutante *bck1Δ slt2Δ* y analizar su fenotipo. Como puede observarse en la Figura 1.20, todos los plásmidos seleccionados estimularon el crecimiento del doble mutante a 12°C y en presencia de CFW, mientras que no tuvieron efecto alguno a 30°C.

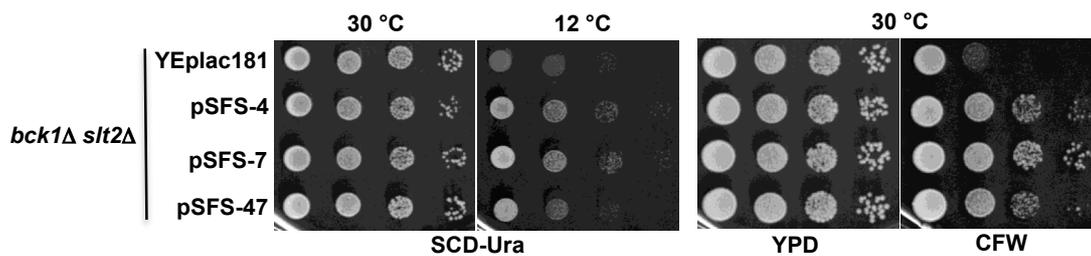


Figura 1.20. Los plásmidos pSFS-4, -7 y -47 mejoran la tolerancia del doble mutante *bck1Δ slt2Δ* de *S. cerevisiae* a 12°C y a CFW. Crecimiento de transformantes pSFS del doble mutante *bck1Δ slt2Δ* de la cepa silvestre BY4741, a 30 y 12°C en medio SCD-Ura y a 30°C en medio YPD conteniendo CFW 20 µg/ml. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Los insertos contenidos en estos plásmidos fueron secuenciados, lo que reveló la presencia de fragmentos de DNA pertenecientes a los cromosomas V, VIII y XIV, respectivamente. En total se identificaron 12 pautas de lectura abierta (Fig. 1.21), de las cuales solo 6 estaban completas, *EDC3* (YEL015W), *NPP2* (YEL016C), *YHI9* (YHR029C), *SLT2* (YHR030C), *DAL82* (YNL314W) y *EMWI* (YNL313C).

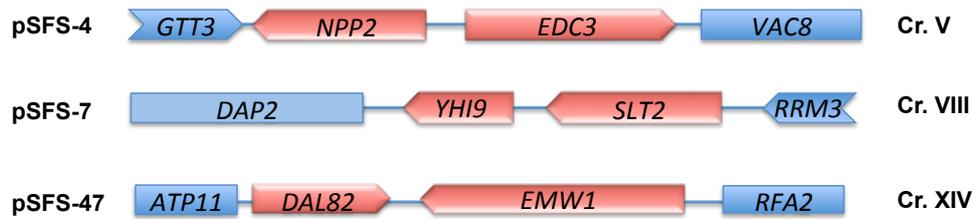


Figura 1.21. Representación esquemática de los fragmentos contenidos en los plásmidos aislados como supresores del fenotipo de crecimiento a baja temperatura del mutante *bck1Δ slt2Δ*. Se indica la denominación que se le ha dado al plásmido (p-SFS-n) y el cromosoma en el que se localiza el inserto. En color azul se muestran las ORFs parciales, mientras que en color rojo se muestran las ORFs completas.

Sorprendentemente, encontramos a *SLT2* como supresor en multicopia del fenotipo mostrado por el doble mutante *bck1Δ slt2Δ*. En consonancia con esto, la sobreexpresión de *SLT2* suprimió el fenotipo de sensibilidad a frío del doble mutante *bck1Δ slt2Δ* (Fig. 1.22), sugiriendo que la fosforilación por Bck1p no es estrictamente necesaria para la funcionalidad de múltiples copias de *SLT2*.

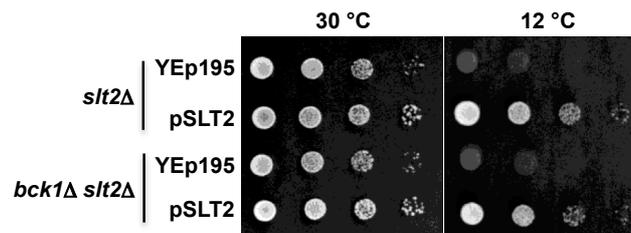


Figura 1.22. La sobreexpresión de *SLT2* revierte el fenotipo de sensibilidad a 12°C del doble mutante *bck1Δ slt2Δ*. Crecimiento del mutante *slt2Δ* y del doble mutante *bck1Δ slt2Δ* con la sobreexpresión de *SLT2* a 30 y 12°C en medio SCD-Ura. El plásmido YEplac195 fue utilizado como control. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Con respecto al resto de ORFs, llevamos a cabo la sobreexpresión de cada una de ellas, tanto en una cepa silvestre como en un mutante *slt2Δ*, utilizando plásmidos episomales comerciales (Thermo, Open biosystems) en los que la expresión del gen queda bajo el control de un promotor inducible por galactosa. Como se observa en la Figura 1.23, solo la sobreexpresión de *EMW1* y en menor medida de *YHI9* estimuló el crecimiento a 12°C de la cepa mutante *slt2Δ*. Además, el efecto fue específico, pues no se observaron cambios en transformantes de la cepa silvestre a 12°C. Como puede observarse, la expresión en estas condiciones de *EMW1*, redujo ligeramente el crecimiento a 30°C tanto del mutante como de su correspondiente cepa parental.

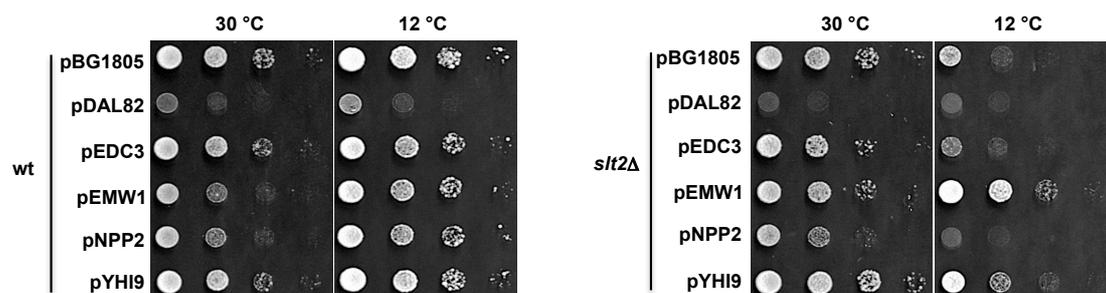


Figura 1.23. Un elevado número de copias de *EMW1* o *YHI9* mejora la tolerancia a bajas temperaturas del mutante *slt2Δ*. Crecimiento de transformantes pDAL82, pEDC3, pEMW1, pNPP2 y pYHI9 de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de su mutante *slt2Δ* a 30 y 12°C en medio SCGal-Ura. El plásmido vacío pBG1805 fue utilizado como control. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Por otra parte, decidimos analizar si los genes identificados, también podían suprimir el fenotipo de sensibilidad a frío de un mutante *bck1Δ*. Como cabría esperar, solo obtuvimos una clara mejora por sobreexpresión de *EMW1* (Figura 1.24). En efecto, la expresión de múltiples copias de *YHI9* redujo el crecimiento del mutante *bck1Δ* tanto a 30 como a 12°C.

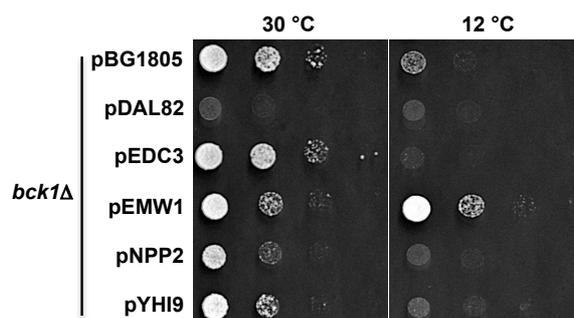


Figura 1.24. La sobreexpresión de *EMW1* mejora el crecimiento a baja temperatura del mutante *bck1Δ*. Crecimiento de transformantes pDAL82, pEDC3, pEMW1, pNPP2 e pYHI9 del mutante *bck1Δ* a 30 y 12°C en medio SCGal-Ura. El plásmido vacío pBG1805 fue utilizado como control. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

12. Análisis fenotípico de la sobreexpresión de *EMW1*

Llegados a este punto, decidimos continuar nuestro estudio centrándonos en el papel funcional de *EMW1*, un gen esencial en *S. cerevisiae*, que codifica para una proteína que contiene en su extremo C-terminal seis dominios TPR en tándem (Karpenahalli y col., 2007). Estos dominios, son motivos estructurales formados por repeticiones de tetratricopéptidos que median interacciones proteína-proteína (Sikorski y col., 1990). Además, recientemente se ha descrito a Emw1p como una proteína esencial para el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Sipling y col., 2011). Estas evidencias, y su aislamiento como supresor en

multicopia del defecto de crecimiento del mutante *slt2Δ* sugerían su relación funcional con la ruta CWI y en particular a bajas temperaturas.

Como se ha comentado en el apartado de Introducción, ciertos agentes que dañan la pared celular como el CFW (de Nobel y col., 2000) y otros que provocan la acumulación de proteínas mal plegadas como la tunicamicina, un inhibidor de la N-glicosilación de proteínas (Bonilla y Cunningham, 2003), inducen la activación de la MAPK Slt2p. En primer lugar analizamos si la sobreexpresión de *EMW1* podía suprimir el defecto de crecimiento de un mutante *slt2Δ* en presencia de CFW o de tunicamicina. Como se observa en la Figura 1.25 la expresión de un alto número de copias de *EMW1*, mejoró la tolerancia a CFW, pero no a tunicamicina.

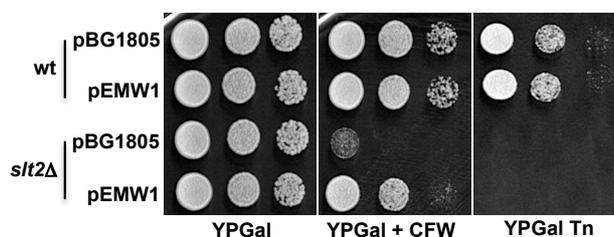


Figura 1.25. La sobreexpresión de *EMW1* mejora la tolerancia de un mutante *slt2Δ* frente a CFW pero no frente a tunicamicina. Crecimiento de transformantes pEMW1 de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de su mutante *slt2Δ* en medio YPGal o en este mismo conteniendo 20 µg/ml CFW o 0,5 µg/ml de tunicamicina (Tn). El plásmido vacío pBG1805 fue usado como control. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

13. Caracterización preliminar de la proteína Emw1p e identificación de proteínas que interaccionan con ella

Ya que disponíamos del plásmido pEMW1, que contiene una fusión del gen *EMW1* a una etiqueta TAP que incluye una secuencia de 6xHis, 3-HA y el dominio ZZ de la proteína A, decidimos analizar la producción de esta proteína de fusión en la cepa silvestre y en un mutante *slt2Δ*, tras su exposición a baja temperatura. Como se observa en la Figura 1.26A la proteína se resolvió en dos bandas de diferente movilidad en un gradiente de SDS-PAGE. Además, la intensidad relativa de la banda de menor movilidad aumentó en células de la cepa silvestre después de 90 min de exposición a 12°C. En el mutante *slt2Δ*, el cambio solo se observó después de 300 min, sugiriendo que la MAPK podía tener un papel funcional en esta modificación. Por otra parte, la tinción con ProQ Diamond, un colorante específico de fosfoproteínas (Fig. 1.26B) reveló una banda con una movilidad aparente correspondiente a la proteína Emw1p. En efecto, cuando analizamos la secuencia de la proteína con el programa

NetPhosK (<http://www.cbs.dtu.dk/cgi-bin/>; Blom y col., 2004) que predice sitios de fosforilación de quinasas conocidas, encontramos un posible sitio de fosforilación por PKC (T457).

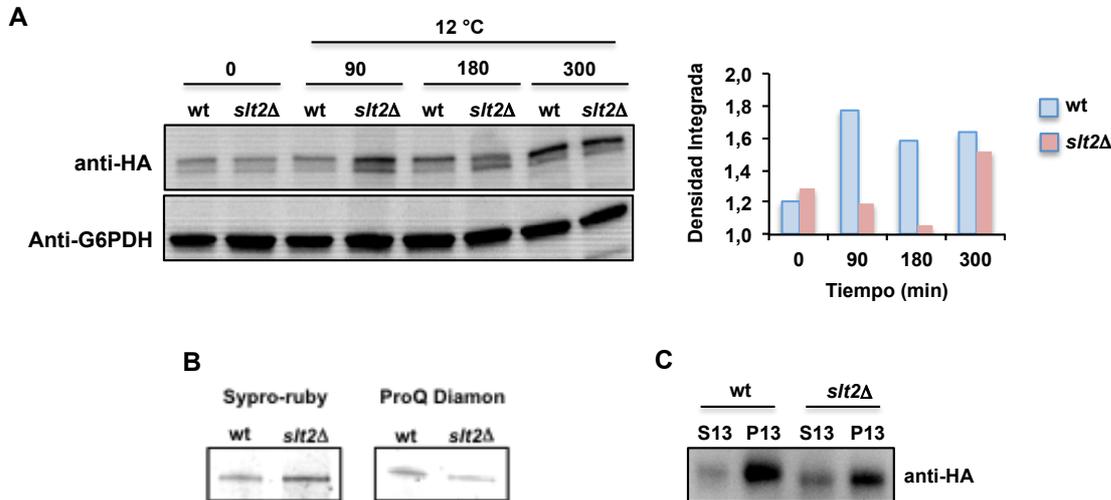


Figura 1.26. La proteína Emw1p es una fosfo-proteína que se localiza preferentemente en fracciones de membrana. (A) Extractos celulares de cultivos de la cepa silvestre BY4741 y de su mutante *slt2Δ*, incubados a 30 o a 12°C durante diferentes tiempos, fueron separados por SDS-PAGE usando un gel en gradiente (4-15% BIORAD) tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. Anticuerpos anti-HA fueron utilizados para la detección de Emw1p, mientras que la inmunodetección de G6PDH se utilizó como control de carga. El histograma representa la relación entre la intensidad de la banda superior y la inferior, tras su densitometría con ImageJ, para cada uno de los extractos. (B) Tinción con Sypro-ruby y ProQ Diamon de gel de SDS-PAGE tras la electroforesis de proteína Emw1p procedente de la cepa silvestre (wt) y del mutante *slt2Δ* tras su purificación por afinidad en tándem, tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. (C) Extractos celulares de la cepa silvestre (wt) y del mutante *slt2Δ* se centrifugaron a 13000 rpm y las proteínas contenidas en el sobrenadante (S13) y el pellet (P13) se analizaron mediante SDS-PAGE (8% acrilamida) e inmunodetección, tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos.

A continuación analizamos si la presencia de dominios TPR en Emw1p le conferían una localización preferente en fracciones de membrana. Como se observa en la Fig. 1.26C, la proteína fue más abundante en fracciones enriquecidas en proteínas de membrana y este resultado fue similar en extractos de células de la cepa silvestre o del mutante *slt2Δ*. Por ello, decidimos analizar qué proteínas interactúan con Emw1p a baja temperatura. Así, células del transformante pEMW1 fueron cultivadas a 30°C en SCGal-Ura para inducir la expresión del gen *EMWI* y después fueron transferidas a 12°C durante 180 min. Los extractos crudos correspondientes, se purificaron por afinidad en tándem (TAP, Tandem Affinity Purification) como se escribe en el apartado de Materiales y Métodos. La posterior identificación de proteínas por espectrometría de masas, reveló la presencia de 22 proteínas (Tabla 1.1) con funciones tan dispares como el transporte de vesículas, splicing o meiosis (Fig. 1.29). Si bien,

no encontramos ninguna categoría funcional enriquecida (GORILLA, *Gene Ontology enRIchment anaLysis and visuaLizAtion tool*; Eden y col., 2009).

Tabla 1.1. Relación de proteínas identificadas como interactores de Emw1p. Se indica el nombre de la proteína y una breve descripción.

Nombre	Descripción
Cdc19	Piruvato quinasa
Tdh2	Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
Urb1	Proteína requerida para la normal acumulación de los RNAr 25S y 5.8S
Prp22	RNA helicasa
Act1	Actina
Dnf2	Amino fosfolípido translocasa localizada en la membrana plasmática
Nmd2	Proteína involucrada en la ruta NMD (Nonsense-mediated mRNA decay)
Pfd1	Subunidad de heterohexámero encargado de transferir proteínas a chaperonas
Smc3	Subunidad de un complejo multiproteico requerido para el mantenimiento de los cromosomas
Bem3	GAP de Rho1p
Rsm22	Proteína de la subunidad pequeña de ribosomas mitocondriales
Idp1	Isocitrato deshidrogenasa mitocondrial
Kar3	Proteína quinesina
Syt1	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina de proteínas Arf
Gcn2	Serin/Treonin quinasa
Mip1	Polimerasa de DNA mitocondrial
Sip3	Cofactor transcripcional
Pxa1	Subunidad de un complejo transportador ABC del peroxisoma
Esp1	Cistein proteasa similar a caspasas
Rpm2	Componente de la ribonucleasa P mitocondrial
Brr1	Ribonucleoproteína componente del espliceosoma
Ptc1	Proteína fosfatasa tipo 2C
Emw1	Proteína esencial implicada en el mantenimiento de la pared celular

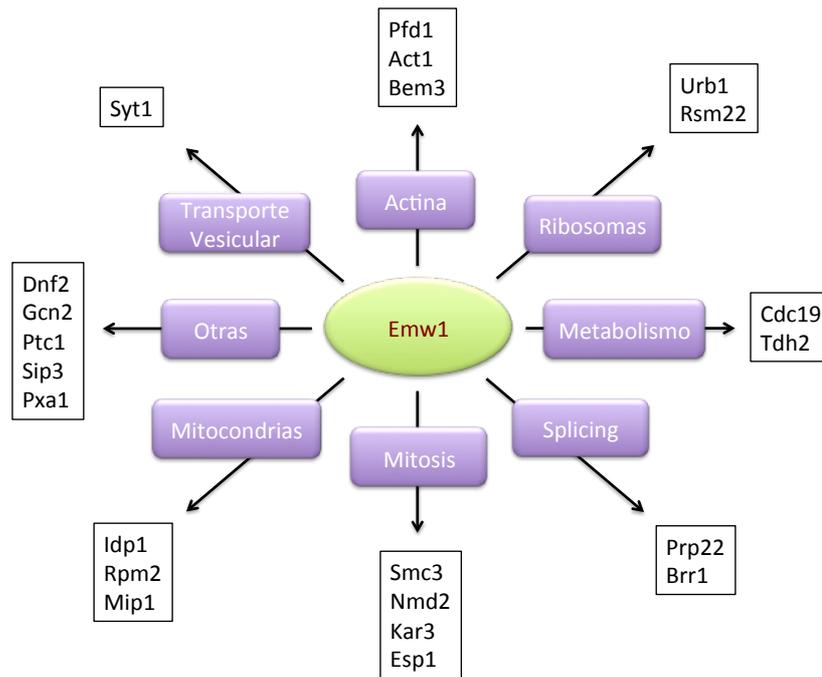


Figura 1.29. Clasificación de las proteínas encontradas como interactores de Emw1p según su función.

14. Análisis de la posible interacción de *GCN2* y *PTC1* con *SLT2-EMW1*

De las proteínas recogidas en la Tabla 1.1, dos llamaron especialmente nuestra atención, Gcn2p y Ptc1p. Gcn2p es una proteína quinasa que fosforila a la subunidad α del factor de inicio de la traducción en respuesta a ayuno de nutrientes (Hinnebusch y Natarajan, 2002), mientras que Ptc1p es una proteína fosfatasa que regula el estado de fosforilación de Hog1p (Warmka y col., 2001) y que recientemente ha sido implicada en la regulación de la ruta CWI, vía Bck1p (Stanger y col., 2012).

En primer lugar examinamos el fenotipo a baja temperatura de cepas carentes de *GCN2* (Fig. 1.30A) o de *PTC1* (Fig. 1.30B). La ausencia de *GCN2* confiere una ligera ventaja de crecimiento a 12°C, mientras que la de *PTC1*, una ligera sensibilidad. Por otra parte, en presencia de CFW, el mutante *gcn2Δ* no exhibió fenotipo diferencial, mientras que *ptc1Δ* fue claramente más sensible que la cepa silvestre. De acuerdo con esto, construimos los correspondientes mutantes en un fondo *slt2Δ* y estudiamos su posible interacción. La interrupción de *SLT2* en un fondo *gcn2Δ* no alteró el fenotipo en CFW respecto al observado en el mutante *slt2Δ*, mientras que a 12°C el doble mutante mostró un crecimiento intermedio respecto al observado para los mutantes sencillos. Este resultado puede indicar que no existe una interacción genética entre *GCN2* y *SLT2*. Este parecía también el caso de *PTC1* y *SLT2*,

aunque a muy bajas dosis de CFW la interrupción de *SLT2* alivió ligeramente el fenotipo de sensibilidad del mutante sencillo *ptc1Δ*.

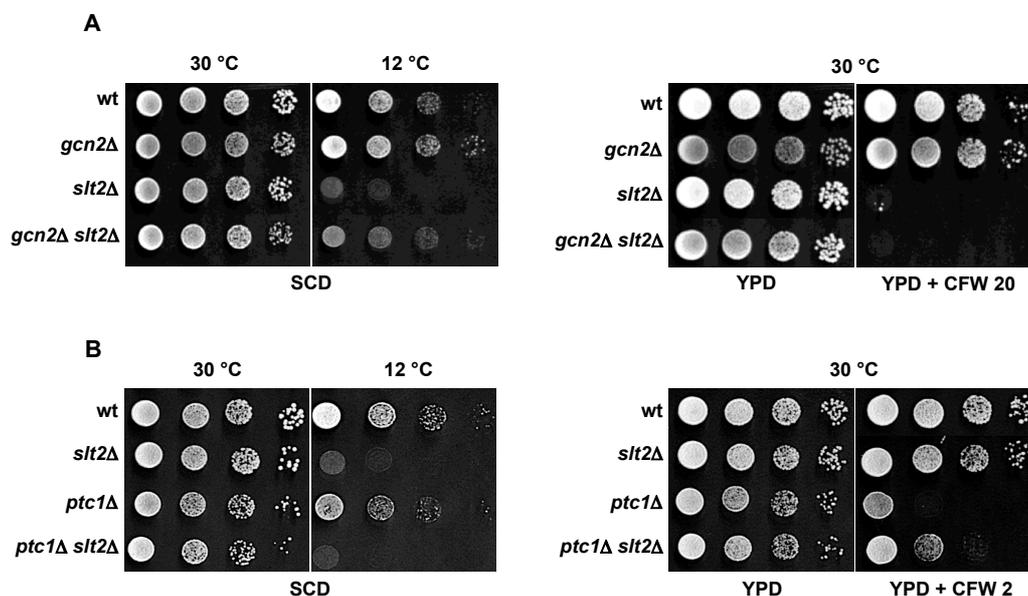


Figura 1.30. Efecto de la ausencia de *GCN2* o *PTC1* en el crecimiento del mutante *slt2Δ* en frío o en presencia de CFW. (A) Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *gcn2Δ*, *slt2Δ* y del doble mutante *gcn2Δ slt2Δ* a 30 y 12°C en medio SCD y a 30°C en medio YPD suplementado con 20 μg/ml de CFW. (B) Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *slt2Δ*, *ptc1Δ* y doble mutante *ptc1Δ slt2Δ* a 30 y 12°C en medio SCD y a 30°C en medio YPD suplementado con 2 μg/ml de CFW.

Para obtener más información sobre la posible interacción entre Emw1p y Gcn2p o Ptc1p, decidimos transformar las cepas mutantes *gcn2Δ*, *ptc1Δ* o el doble mutante *ptc1Δ slt2Δ* con el plásmido pEMW1 y estudiar su fenotipo a baja temperatura. Desafortunadamente, el mutante *gcn2* del fondo genético BY4741, fue incapaz de crecer en medio mínimo con galactosa como fuente de carbono (datos no mostrados). No obstante, cuando se prepararon medios sintéticos con diferentes proporciones de glucosa y galactosa no detectamos ningún efecto debido a la sobreexpresión de *EMW1* (datos no mostrados). De manera similar, cuando inoculamos los transformantes en medio YPGal, tampoco observamos ningún fenotipo relevante en presencia de CFW (Fig. 1.31).

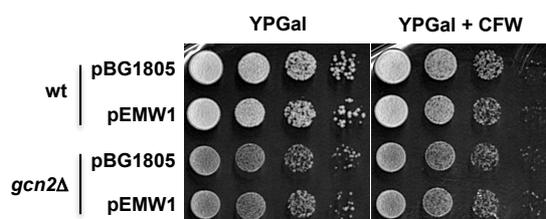


Figura 1.31. La sobreexpresión de Emw1p no altera el crecimiento del mutante *gcn2Δ* en presencia de CFW. Crecimiento de sobreexpresantes pEMW1 de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de su mutante *gcn2Δ* a 30°C en YPGal e YPGal suplementado con 20 μg/ml de CFW. El plásmido vacío pBG1805 fue utilizado como control. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Por otra parte, el mutante *ptc1Δ* (Fig. 1.32), también mostró un ligero defecto de crecimiento en galactosa como fuente de carbono, defecto que se acentuó a 12°C. De hecho, bajo estas condiciones, el mutante *ptc1Δ* fue más sensible que el mutante *slt2Δ*. Aparte de este hecho, la sobreexpresión de *EMW1* resultó perjudicial para el crecimiento a 30°C, como ya se había observado en otras cepas (Fig. 1.22 y 1.24). Además, un mayor número de copias de *EMW1* no afectó a su crecimiento en frío. El doble mutante *ptc1Δ slt2Δ* presentó un defecto de crecimiento en galactosa a 30°C más acusado que su cepa parental *ptc1Δ* y fue incapaz de crecer a 12°C en este medio, un defecto que no alivió la sobreexpresión de *EMW1*. Tampoco en el mutante sencillo *ptc1Δ* la presencia del plásmido pEMW1 pareció alterar el crecimiento en frío, sugiriendo la necesidad de una proteína Ptc1p funcional para la actividad de Emw1p. No obstante, este resultado debe tomarse con cautela dado el escaso crecimiento en galactosa de las cepas *ptc1Δ* y *ptc1Δ slt2Δ*.

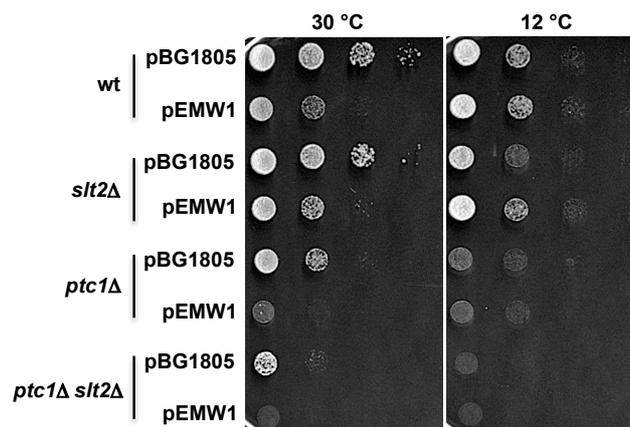


Figura 1.32. La sobreexpresión de *EMW1* no mejora el fenotipo de un mutante *ptc1Δ* o de un doble mutante *ptc1Δ slt2Δ* a 12°C. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *slt2Δ*, *ptc1Δ* y del doble mutante *ptc1Δ slt2Δ* sobreexpresando *EMW1* a 30 y 12°C en medio SCGal-Ura. Se utilizó el plásmido vacío pBG1805 como control. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Con el fin de encontrar otras evidencias de la posible interacción entre *EMW1* y *PTC1* llevamos a cabo un análisis de los extractos proteicos de la cepa silvestre y de sus mutantes *slt2Δ* y *ptc1Δ*. Como se observa en la Figura 1.33, se detectaron 3 isoformas de Emw1p, siendo las formas denominadas A y B las que corresponden a las bandas observadas en un gel en gradiente de poliacrilamida (Fig. 1.26A). Por su parte la isoforma C, no observada en el análisis anterior podría corresponder a una proteína hiperfosforilada o bien a un artefacto electroforético. Por tanto nos centramos en las dos isoformas mayoritarias. Como se puede

observar en la Fig. 1.33 la intensidad relativa de estas dos bandas no se alteró a 30°C por la ausencia de Slt2p, un resultado que se corresponde con el observado en el análisis anterior (Fig. 1.26A) para extractos control (t=0). Por contra, la ausencia de la fosfatasa Ptc1p, incrementó la intensidad relativa de la banda B, sugiriendo que la misma, podría estar implicada directamente en el control del estado de fosforilación de Emw1p. No obstante, más pruebas son necesarias para confirmar esta observación.

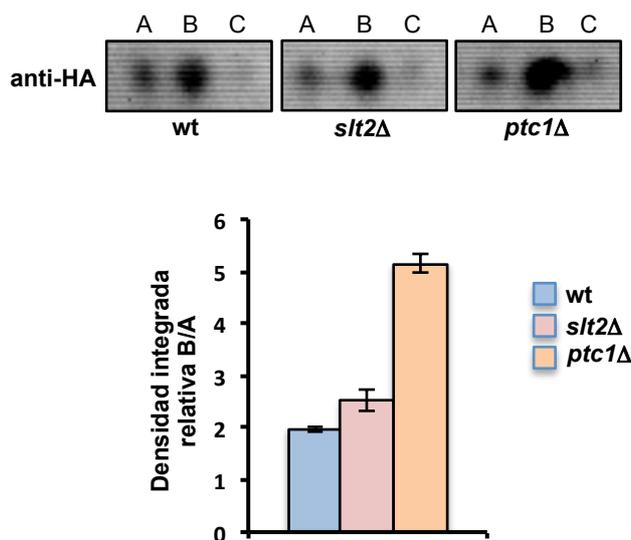


Figura 1.33. La fosfatasa Ptc1p parece estar implicada en la regulación del estado de fosforilación de Emw1p. Extractos de proteínas de células de la cepa silvestre BY4741 (wt), y de sus mutantes *slt2Δ* y *ptc1Δ* crecidas a 30°C en SCGal-Ura (DO₆₀₀≈0,5) fueron analizados mediante electroforesis bidimensional tal y como se indica en el apartado de Materiales y Métodos. La proteína se inmunodetectó por Western blot con anticuerpos anti-HA. La Figura, muestra las isoformas encontradas que fueron denominadas como A, B y C. El histograma representa la relación de densidad integrada del punto B con respecto al A para cada cepa. La densidad integrada de cada punto fue cuantificada con el programa ImageJ.

15. Estudio de la participación de Emw1p como componente del complejo multichaperona que colabora en la señalización a través de Slt2p

El sistema de chaperonas Hsp90 (Fig. 1.34), constituido por las isoformas Hsc82p y Hsp82p (Borkovich y col., 1989), fue identificado como un interactador de Slt2p y múltiples evidencias demuestran que Hsp90 es un componente crítico para la señalización por la ruta CWI (Millson y col., 2005; Piper y col., 2006; Truman y col., 2006). Se ha descrito que Hsp90 colabora en la señalización de la ruta CWI por parte de Slt2p a través de la participación de las co-chaperonas Sse1p (Hsp110), Ssa1p (Hsp70) y Sti1p (Shaner y col., 2008). Además, Sti1p contiene un dominio TPR para la interacción proteína-proteína, similar

al encontrado en Emw1p (Schmid y col., 2012). Por tanto, nos planteamos la posibilidad de que Emw1p pudiera colaborar junto a estas co-chaperonas favoreciendo la señalización de la ruta CWI a través de Slt2p. Para analizar este extremo, en primer lugar observamos el fenotipo en frío y en presencia de CFW de mutantes *hsc82Δ*, *hsp82Δ*, *ssa2Δ*, *sse1Δ* y *sti1Δ*. Incluimos en el análisis otras dos chaperonas, Ydj1p, una chaperona de la familia de las Hsp40, la cual se ha relacionado con la ruta CWI (Wright y col., 2007) y Zuo1p, también perteneciente a la familia de las Hsp40, que estimulan la actividad de las Hsp70 (Qiu y col., 2006).

Como se observa en la Figura 1.35 la ausencia de *HSC82*, *YDJ1*, *SSE1* y *STI1*, provocó un claro defecto de crecimiento a 12°C que coincidió con el fenotipo encontrado en presencia de CFW solo en el caso de *ZUO1*, *YDJ1* y *SSE1*.

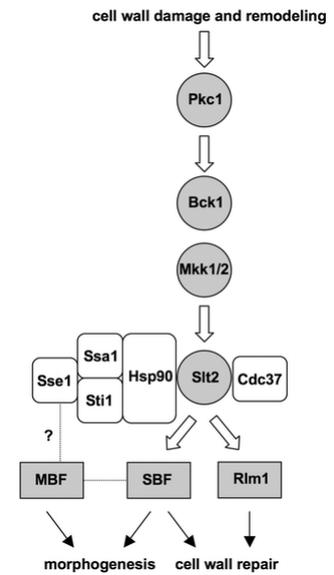


Figura 1.34. Representación del complejo multichaperona que apoya la señalización a través de la ruta CWI. Shaner y col., 2008.

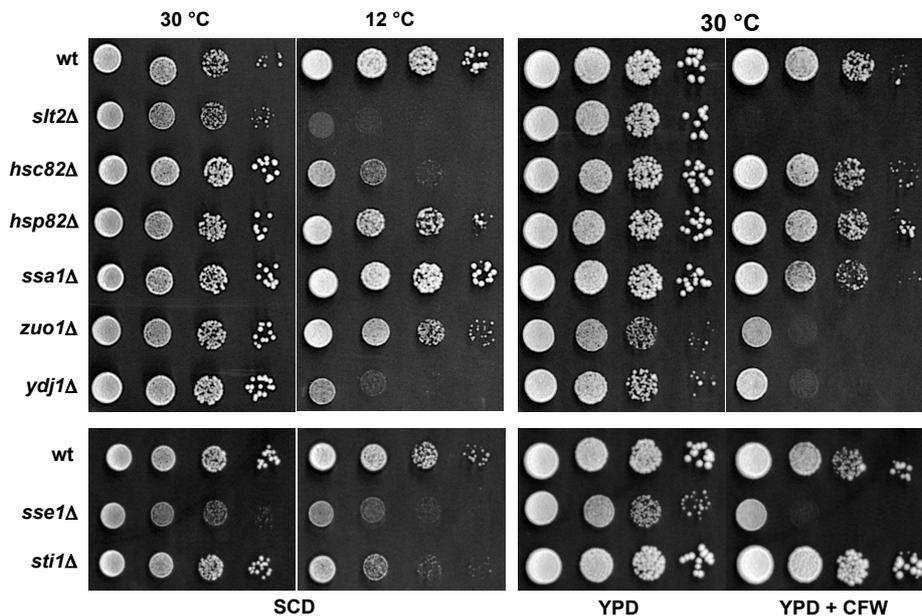


Figura 1.35. La ausencia de ciertas chaperonas relacionadas con la señalización mediada por Slt2p, compromete el crecimiento de una cepa silvestre a baja temperatura y frente a CFW. Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 y de sus mutantes *slt2Δ*, *hsc82Δ*, *hsp82Δ*, *ssa1Δ*, *zuo1Δ*, *ydj1Δ*, *sse1Δ* y *sti1Δ* a 30 y 12°C en medio SCD y a 30°C en medio YPD suplementado con 20 µg/ml de CFW. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.

Para averiguar si la sobreexpresión de Emw1p es capaz de compensar el fenotipo en frío generado por la ausencia de dichas chaperonas, los mutantes que resultaron sensibles se transformaron con el plásmido pEMW1 (Fig. 1.36). Sin embargo, en ninguno de los casos se

mejoró el crecimiento de estos mutantes tanto a 12°C como en CFW. Así, el complejo de chaperonas y co-chaperonas analizado parece ser importante en la respuesta adaptativa de *S. cerevisiae* a 12°C. Sin embargo, su función no es complementada por Emw1p, sugiriendo que esta proteína tiene un papel diferente como supresor en multicopia del defecto de crecimiento en frío del mutante *Slt2p*.

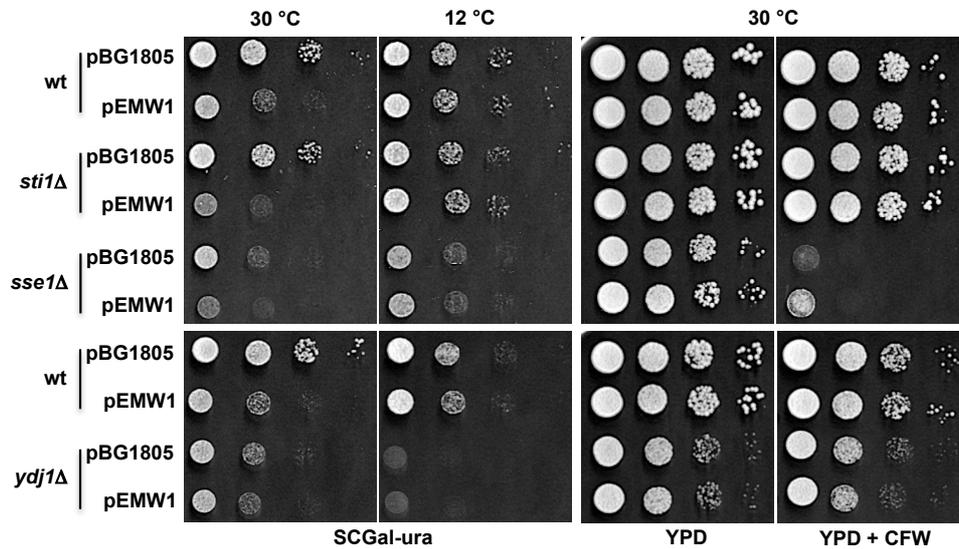


Figura 1.36. Efecto de la sobreexpresión de *EMW1* en el fenotipo de sensibilidad a frío o a CFW de algunos mutantes para chaperonas y co-chaperonas de *Slt2p*. Crecimiento de transformantes pEMW1 de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus mutantes *sti1Δ*, *sse1Δ* e *ydj1Δ*, a 30 y 12°C en medio SCGal-Ura y a 30°C en medio YPD suplementado con 20 µg/ml de CFW. El plásmido vacío pBG1805 fue utilizado como control. Se procedió tal y como se indica en la Figura 1.1.



DISCUSIÓN
CAPÍTULO 1

1. La ruta de integridad de la pared celular y su papel funcional en la respuesta a frío de *S. cerevisiae*

Durante este capítulo, se ha puesto de manifiesto el papel funcional de la ruta CWI en la respuesta molecular de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas. Los resultados muestran la señalización a través de la ruta en respuesta a un descenso de la temperatura y la necesidad de ciertos sensores de superficie y elementos del módulo de MAPKs para el crecimiento en frío. Sin embargo, no hay evidencias de perturbaciones en la pared celular provocados por una reducción de la temperatura o de la activación de un programa transcripcional específico mediado por la MAPK Slt2p. Por tanto, la activación de esta ruta bajo esta condición, podría responder a mecanismos específicos y estar dirigida a regular otras rutas de señalización.

A semejanza de lo descrito para la ruta HOG (Panadero y col., 2006), el fenotipo de sensibilidad a baja temperatura mostrado por un mutante *slt2Δ* y otros elementos de la ruta CWI certifican un papel fundamental de esta cascada de señalización en la adaptación de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas. La ruta de integridad de la pared celular es activada en respuesta a una amplia variedad de agentes químicos y condiciones ambientales que inducen daño en la pared celular (Fuchs y Mylonakis, 2009; Rodicio y Heinisch, 2010; Levin, 2011). Por tanto, la activación de Slt2p observada a 12°C, sugiere que el descenso de la temperatura está provocando una deficiencia en la integridad de la pared celular y/o en su funcionalidad. Además, al igual que ocurre con otros estreses y agentes que tienen como diana la pared celular (Levin, 2011), la compensación osmótica mediante la adición al medio de sorbitol, es capaz de aliviar el defecto de crecimiento a 12°C de mutantes en diversos elementos de la ruta. Sin embargo, no fuimos capaces de detectar una activación bajo esta condición, de los principales factores transcripcionales dependientes de la ruta de integridad de la pared celular, Rlm1p y Swi4p/Swi6 (Levin, 2011). Además, cuando nos propusimos estudiar la respuesta transcripcional de un mutante *slt2Δ* a 12°C, observamos que la MAPK sólo es necesaria para la expresión basal de una serie de genes, de los que, sólo un 24% están implicados en la biogénesis y remodelación de la pared celular (Smits y col., 2001). Por otra parte, comprobamos que el descenso de la temperatura, es capaz de provocar alteraciones en la composición y/o estructura de la pared celular, que la hacen más resistente al tratamiento con Zimoliasa. Sin embargo, este efecto fue observado tanto en la cepa silvestre como en el mutante *slt2Δ*, descartando la implicación de la MAPK en esta respuesta adaptativa.

De forma alternativa, la activación de la ruta de integridad de la pared celular, podía deberse a perturbaciones en la membrana plasmática como ha sido sugerido para otros estreses (Rodicio y Heinisch, 2010; Jendretzki y col., 2011). Se ha descrito que, un descenso en la temperatura provoca una pérdida de fluidez de la membrana plasmática (Roríguez-Vargas y col., 2007), que es detectada por el sensor Sln1p generándo una señal que activa la ruta HOG (Panadero y col., 2006). Sin embargo, la fosforilación de Hog1p alcanza su máximo nivel tras 5 min de exposición a 12°C, mientras que en el caso de Slt2p son necesarios 120-180 min para observar el máximo de fosforilación. Este resultado sugiere que la activación de la ruta bajo estas condiciones podría ser consecuencia de un estrés secundario, como ha sido descrito para un estrés por choque térmico (Mensonides y col., 2005).

La modificación más ampliamente reconocida a nivel de las membranas celulares a baja temperatura es la insaturación de las cadenas de ácidos grasos (Szalontai y col., 2000). Los fosfolípidos que contienen ácidos grasos insaturados tienen un punto de fusión más bajo y muestran una mayor flexibilidad que aquellos que presentan cadenas saturadas. En *S. cerevisiae*, esta adaptación requiere la inducción de *OLE1* (Nakagawa y col., 2002), gen que codifica la desaturasa de ácidos grasos en levaduras, la cual, incrementa el índice de insaturación y por tanto la fluidez de la membrana plasmática (Roríguez-Vargas y col., 2007). Un descenso en la temperatura puede también alterar el repertorio de proteínas de membrana, como se ha demostrado recientemente para transportadores como Gap1 (permeasa de aminoácidos general 1), Tat1p o Tat2p (transportadores de aminoácidos tirosina y triptófano) (Hernández-López y col., 2011). Algunos de los 106 mutantes que muestran defectos de crecimiento a bajas temperaturas (Hampsey, 1997), están afectados en proteínas ribosómicas y traducción, procesamiento de pre-RNA para la biogénesis o ensamblaje de ribosomas y plegamiento de proteínas. Es interesante resaltar que, el estrés generado por la acumulación de proteínas mal plegadas, activa la ruta CWI y Slt2p es importante para la supervivencia de la célula ante este estrés (Chen y col., 2005). Por tanto, el frío podría provocar cambios en la composición de la membrana plasmática, y éstos, a su vez, en la organización y estructura de ésta, provocando alteraciones en el microambiente en el que se encuentran los sensores, lo cual podría disparar la activación de la ruta CWI.

Al igual que ocurre cuando la célula es sometida a un choque térmico, el sensor Wsc1p, parece ser el más importante en la respuesta de la ruta CWI a bajas temperaturas.

Células del mutante *wsc1Δ* presentan una reducción evidente en el nivel de fosforilación de la MAPK, que se ve incrementada con la pérdida simultánea de *WSC2* y *WSC3*. Este resultado sugiere una cooperación entre los sensores de la familia WSC para responder a un descenso de la temperatura, como ha sido descrito previamente para otros estreses (Verna y col., 1997; Zu y col., 2001). Sin embargo la activación de la ruta a bajas temperaturas, difiere de la inducida por otro tipo de situaciones. Mediante el análisis de reguladores de la GTPasa Rho1p, activadora de PKC, pudimos observar que en ningún caso, la ausencia de sus activadores (GEFs), Rom1p y Rom2p, afectó negativamente al crecimiento celular a baja temperatura. No obstante, conviene recordar que se trata de proteínas con función redundante y que su ausencia combinada es letal para la célula. Por otro lado, cuando nos propusimos a analizar el fenotipo de la ausencia de las proteínas inhibidoras de la activación de Rho1p (GAPs), encontramos que la delección de *BEM2* o *SAC7* redujo el crecimiento celular a 12°C. Ambas proteínas han sido descritas como reguladoras de la función de Rho1p en su activación de la ruta CWI (Martín y col., 2000; Schmidt y col., 2002). Además, Sac7p, ha sido involucrada recientemente en la homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática vía la regulación de la actividad de Rho1p (Lockshon y col., 2012). Estas observaciones señalan a alteraciones en la membrana plasmática como origen de la señal generada por frío. Por otra parte, no fuimos capaces de observar despolarización del citoesqueleto de actina en células expuestas a un descenso en la temperatura, un efecto que parece depender de la activación de Pkc1p y que es observado en respuesta a un choque térmico, entre otros estreses (Levin, 2011). Tampoco se observó mejora del crecimiento por la sobreexpresión de *PKC1*. En cambio, encontramos que la fosforilación de Slt2p fue totalmente dependiente de la presencia de la MAKKK Bck1p, mientras que cepas carentes de ella, todavía son capaces de activar a Slt2p en condiciones de choque térmico (Harrison y col., 2004). Por tanto, no queda claro cómo la señal generada por los sensores de membrana Wsc1p-3p llega al módulo de MAPKs o cual es el papel de Pkc1p en dicha señalización. No obstante, la transmisión de la señal podría estar mediada por la activación de Rho1p, que controla funciones independientes de Pkc1p en respuesta a estrés (Schmidt y col., 2002), a juzgar por el fenotipo observado para los mutantes de las GAPs *bem2Δ* y *sac7Δ*.

Se han descrito mecanismos de señalización a través de la ruta CWI en presencia de cafeína o Zimoliasa para los cuales es requerida la rama Sho1 de la ruta HOG, Pkc1p y el módulo de MAPKs (Bermejo y col., 2008; García y col., 2009). La existencia de componentes compartidos y la comunicación cruzada entre ambas rutas ha sido bien

documentada (Fuchs y Mylonakis, 2009). Además, es conocida la activación de la MAPK Hog1p en respuesta a un descenso de la temperatura (Panadero y col., 2006; Aguilera y col., 2007). Aunque encontramos evidencias de que las rutas HOG y CWI están mutuamente reguladas en respuesta a un descenso de la temperatura, los resultados obtenidos no soportan una visión en la que la activación de Slt2p depende de una señal procedente de la ruta HOG. Por otra parte, la señalización en respuesta a cafeína que activa Slt2p, requiere la inhibición de Tor1p y es mediada por Rom2p (Kuranda y col., 2006). En este sentido, hemos observado que, al igual que ante una exposición a cafeína, el fenotipo provocado por frío podría ser parcialmente dependiente de la inhibición de funciones celulares reguladas por Tor1p. Trabajos previos han demostrado que la inactivación de TORC1 por rapamicina (Torres y col., 2002) o por limitación de nitrógeno (Krause y Gray, 2002) desencadenan la activación de Slt2p. TORC1 junto con la ruta cAMP-PKA, son los principales controladores del crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Santangelo, 2006; Soulard y col., 2009). La inhibición de TORC1 activa Slt2p a través de un mecanismo indirecto mediado por Sch9p (Soulard y col., 2010), una de las dianas de la señalización por TORC1 (Urban y col., 2007). Además, Slt2p, fosforila directamente a Bcy1p, lo que provoca la reducción de la actividad de PKA (Soulard y col., 2010). En este sentido, observamos que la ausencia de *TOR1* causó un fenotipo de sensibilidad a frío, mientras que la ausencia de Ras2p, proteína que estimula la producción de cAMP por adenilato ciclasa (Cyr1p) (Broek y col., 1985), provocó un incremento de la tolerancia a bajas temperaturas. También observamos, que la delección de *IRA2*, un regulador negativo de Ras2p y por tanto de la ruta cAMP-PKA (Park y col., 2005), resulta en un fenotipo de sensibilidad a frío. Además, la delección de *SCH9* alivió el fenotipo de un mutante *bck1Δ* o *slt2Δ*, al igual que la introducción de una copia extra de la subunidad reguladora de PKA, *BCY1*. En definitiva, parece que todas aquellas situaciones que conducen a la reducción de la actividad PKA, mejoran la tolerancia de *S. cerevisiae* a bajas temperaturas. Por tanto, estos resultados sugieren que el descenso de la temperatura podría comprometer la toma de nutrientes debido a la rigidificación de la membrana plasmática y sus efectos negativos sobre la actividad de transportadores asociados a ella. Existen evidencias de esta reducción de la actividad (Abe y Horikoshi, 2000) lo cual cabe esperar que provoque la inactivación de TORC1. Este efecto evitaría la inhibición de Slt2p por parte de Sch9p, estimulando así la fosforilación de Bcy1p por la MAPK y reduciendo la actividad de PKA (Ver Fig. D1). No obstante, el hecho de que la ausencia de Sch9p mejore la tolerancia a frío de cepas carentes de *BCK1* o *SLT2*, sugiere la existencia de

un mecanismo directo de regulación de *BCY1* vía TORC1-Sch9p que sería operativo en respuesta a un descenso de la temperatura.

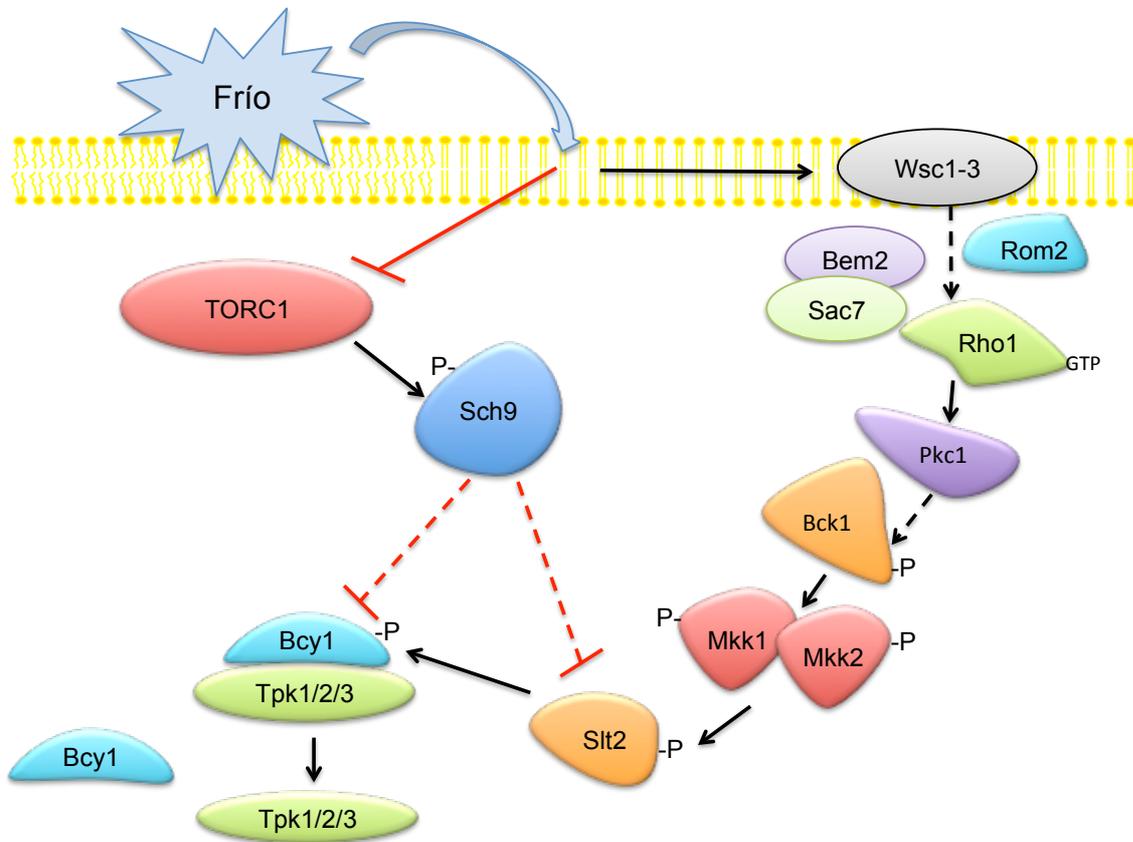


Figura D1. Modelo de percepción y transmisión de la señal generada por frío por parte de las rutas CWI y TOR-PKA.

Estos resultados nos llevaron a plantear la posibilidad de la existencia de un mecanismo de regulación de Msn2p/Msn4p a bajas temperaturas. Se ha descrito que PKA regula múltiples procesos, incluyendo transcripción, metabolismo y progresión del ciclo celular a través de la fosforilación de ciertas dianas (Santangelo, 2006). Entre ellas, los factores de transcripción Msn2p/Msn4p, que controlan la respuesta general a estrés (Estruch, 2000), juegan un papel fundamental en la inducción de un número significativo de genes inducidos por frío (Schade y col., 2004). Además, se sabe que en levaduras, existe una respuesta adaptativa dependiente de Msn2p/Msn4p, que mantiene la viabilidad celular a temperaturas cercanas a la congelación (Kandror y col., 2004). Sin embargo, nuestros resultados no mostraron una regulación de Msn2p/Msn4p bajo las condiciones estudiadas.

La exposición a frío, causó un defecto de crecimiento en células carentes de Swi4p o Swi6p, lo cual resulta sorprendente, ya que, como se ha comentado previamente, la activación en frío de Slt2p no induce la expresión regulada por SBF del gen *FKS2*. El mutante *swi6Δ* mostró también un defecto de crecimiento a 30°C, sin embargo, el defecto de crecimiento del mutante *swi4Δ*, fue observado de forma específica a 12°C y no fue recuperado por estabilización osmótica. Swi4p es un regulador del ciclo celular en levaduras (Fuchs y Mylonakis, 2009; Rodicio y Heinisch, 2010; Levin, 2011), sin embargo, su función podría suponer una conexión entre adquisición y asimilación de nutrientes, el metabolismo energético y el control del ciclo celular, como se ha sugerido (Wittenberg y Reed, 2005). Por ejemplo, resultados previos han mostrado que la regulación transcripcional de genes dependientes del ciclo celular, no está directamente unida a las funciones de éste, como se ha observado en el caso de los genes *PMA* (ATPasa de membrana plasmática), *MET* (requerimiento de metionina) o *PHO* (metabolismo de fosfato) (Spellman y col., 1998). Por tanto, el programa transcripcional dependiente de Swi4p podría ser fundamental para hacer frente a restricciones metabólicas inducidas a bajas temperaturas. Es necesario por tanto plantear nuevas investigaciones a fin de esclarecer cómo es regulada esta función e identificar las dianas específicas reguladas por Swi4p en respuesta a un descenso en la temperatura.

2. Emw1p como una posible diana de Slt2p

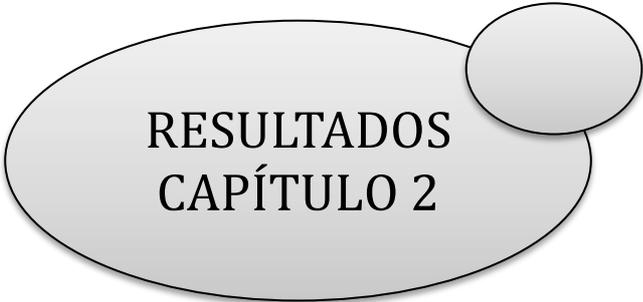
En nuestro afán por conocer cuál es el papel funcional de la ruta CWI y de su MAPK Slt2p en la respuesta a frío, llevamos a cabo un rastreo de supresores en multicopia del fenotipo de sensibilidad a bajas temperaturas del mutante *slt2Δ*. Este abordaje permitió identificar a *EMW1*, un gen esencial que codifica una proteína con dominios TPR en su extremo C-terminal (Karpenahalli y col., 2007), como implicado en la respuesta a frío mediada por Slt2p. Emw1p había sido previamente relacionada con el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Sipling y col., 2011) a 37°C. Así, mutantes condicionales *emw1^{ts}* habían sido caracterizados como sensibles a CFW, cafeína y SDS, defectos asociados a daños en la pared celular, que son aliviados por la sobreexpresión de *GFAI* (Sipling y col., 2011), que codifica una hexosa fosfato aminotransferasa implicada en la biosíntesis de quitina (Watzel y Tanner, 1989; Lagorce y col., 2002). Sin embargo, ni la síntesis de quitina ni la señalización mediada por la ruta CWI parecen afectados por la reducción de la función de

Emw1p (Sipling y col., 2011), generando sombras entorno al papel funcional de esta proteína en la organización y mantenimiento de la pared celular.

Nuestro estudio demuestra que *EMWI* no solo suprime el defecto en frío del mutante *slt2Δ* o del mutante *bck1Δ*, sino que también estimula su crecimiento en presencia de CFW. Además, estos efectos fueron específicos y dependieron de la existencia de un defecto en la señalización mediada por la ruta. Prueba de ello, la sobreexpresión de *EMWI* no mejoró el crecimiento en frío de la cepa silvestre, ni alivió el defecto de crecimiento a 12°C de otros mutantes como *sti1Δ*, *sse1Δ* o *ydj1Δ*. Evidencias bioquímicas sugieren también la implicación de Slt2p y de Ptc1p, una proteína fosfatasa implicada en la desactivación de varias rutas de señalización, entre ellas la ruta CWI (González y col., 2006) en el estado de fosforilación de Emw1p. Además, estudios de interacción génica indican la necesidad de una proteína fosfatasa Ptc1p funcional en la respuesta mediada por Emw1p en frío. Así, nuestros resultados refuerzan la idea de que, en efecto, Emw1p juega un papel importante en la función reguladora de la ruta CWI. Esta idea cobra también fuerza por la evidencia de que el estado de fosforilación de Emw1p es regulado en respuesta a frío. En efecto, la tinción con ProQ Diamon demostró la existencia de especies fosforiladas que se resuelven en una banda de menor movilidad relativa en un gel en gradiente de SDS-PAGE y cuya intensidad se incrementa en respuesta a frío. Así, la actividad de Emw1p, su localización y/o su interacción con otras proteínas parecen depender de la temperatura de crecimiento. La evidencia de que este cambio se produce también en un mutante *slt2Δ* aunque a tiempos más largos, podría sugerir que Emw1p es fosforilada por diferentes quinasas y que la banda de menor movilidad reúne diferentes especies fosforiladas. De hecho, esta banda es también visible a 30°C en el mutante. En cualquier caso, un mayor estudio es necesario para identificar los sitios de fosforilación de Emw1p y las posibles quinasas, además de Slt2p, implicadas en esta regulación, y para aclarar las consecuencias de estos cambios en la actividad de esta proteína.

Finalmente, no podemos olvidar que tanto *BCY1* como *EMWI*, han sido identificados en este trabajo como supresores del defecto de crecimiento del mutante *slt2Δ* en frío. La idea de que la falta de una regulación adecuada de la actividad PKA en este mutante es la causa de su defecto a 12°C, nos lleva a la idea de la existencia de una conexión funcional entre Slt2p-Emw1p-PKA. En este sentido, podemos especular con un modelo en el que la fosforilación de Emw1p por Slt2p estimula la actividad inhibidora de Bcy1p, o bien, de otros reguladores

directos o indirectos de la actividad PKA como Sch9p. Estudios de interacción proteína-proteína podrían ayudarnos a obtener evidencias sobre el papel funcional de Emw1p, una proteína esencial cuya caracterización está comenzando.



**RESULTADOS
CAPÍTULO 2**

Capítulo 2

Análisis de la implicación del PtdIns(4,5)P₂ y su metabolismo en la señalización y homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática.

Capítulo 2: Análisis de la implicación del PtdIns(4,5)P₂ y su metabolismo en la señalización y homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática.

Los resultados previamente expuestos, señalan a alteraciones en la organización, composición y/o estructura de la membrana plasmática como el principal estímulo detectado por la célula ante un descenso de la temperatura ambiente. Además se sabe que esta condición disminuye la fluidez de la membrana plasmática interfiriendo así en todas aquellas funciones que dependen de su estado, como el transporte de nutrientes, la recepción de señales, endocitosis, exocitosis o la biogénesis de orgánulos (Abe y Horikoshi, 2000; Panadero y col., 2006; Hernández-López y col., 2011). Se sabe también que la respuesta de *S. cerevisiae* a estos cambios pasa por modificar la composición de su membrana, tanto de proteínas como de lípidos, y entre ellos su composición en fosfolípidos (Martin y col., 2007; Rodríguez-Vargas y col., 2007). Por otra parte, se sabe que esta clase de lípidos tiene un papel fundamental en numerosos procesos de señalización (Wera y col., 2001), si bien, su implicación en la percepción y transmisión de la señal de frío no ha sido documentada. Una estrategia útil para el estudio de esta respuesta es la caracterización de mutantes de genes implicados en el metabolismo de fosfolípidos que muestren a su vez un crecimiento anómalo a bajas temperaturas. Este es el caso del gen *INP51*, que codifica para una fosfatasa que actúa de forma específica sobre el PtdIns(4,5)P₂, y cuya delección incrementa la tolerancia a frío de una cepa silvestre (Stolz y col., 1998b). Por tanto, durante el presente capítulo nos propusimos analizar la posible implicación de este fosfolípido y en particular, de los compuestos generados por el metabolismo del PtdIns(4,5)P₂ en la homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* en respuesta a frío.

1. La ausencia de *INP51* incrementa los niveles de PtdIns(4,5)P₂ y la tolerancia a frío de *S. cerevisiae*

Empezamos nuestro estudio caracterizando el fenotipo en frío del mutante *inp51Δ* de la cepa CEN.PK2-1C. Como puede observarse en la Fig. 2.1, la ausencia de Inp51p resultó en una notable mejora del crecimiento a 15°C, en consonancia con lo descrito previamente para células mutantes del fondo genético W303-1A (Stolz y col., 1998), una cepa Trp⁻ como la ensayada en nuestro estudio. No obstante, cuando analizamos este fenotipo en células del fondo BY4741, protótrofas para triptófano, estas sólo mostraron una leve mejora en frío, y sólo en condiciones más restrictivas, 12°C (Fig. 2.1).

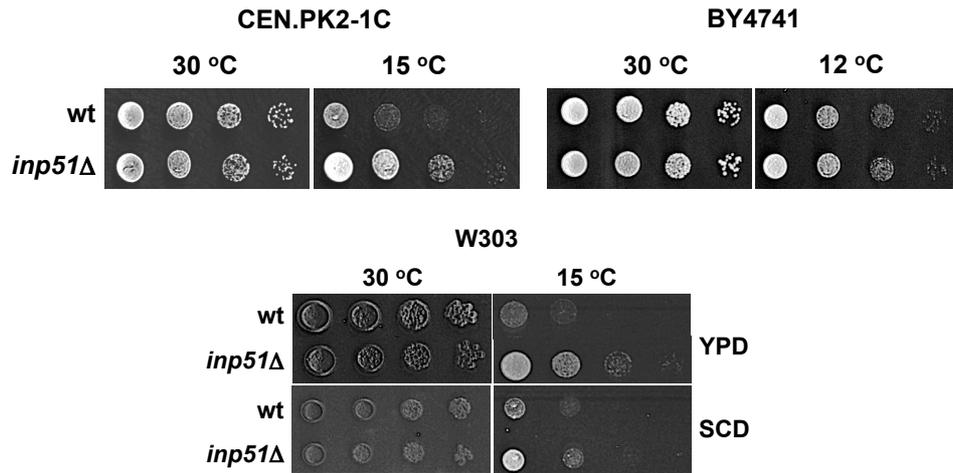


Figura 2.1. La ausencia de *INP51* mejora la tolerancia a frío. Cepas silvestres (wt) de los fondos genéticos CEN.PK2-1C, BY4741 y W303-1A y sus correspondientes mutantes *inp51Δ* se incubaron a 30°C hasta fase exponencial, en medio SCD o YPD y tras ajustar los cultivos a una $DO_{600}=1$, estos fueron diluidos ($1 - 10^{-3}$) y sembrados en forma de gotas de 3 μ l en placas de SCD o YPD. Dichas placas fueron incubadas a 30°C (2-3 días), a 15°C (6-8 días) ó 12°C (8-10 días).

Después, nos interesamos por determinar los niveles de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ en células de la cepa silvestre y del mutante *inp51Δ*. Para ello, se utilizó un plásmido integrativo que contiene dos copias del dominio con homología a pleckstrina de la proteína Plc1p , fusionados al gen codificante de la proteína fluorescente GFP (Levine y Munro, 2002). Este dominio, es el responsable de la unión específica de Plc1p a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$. Como se observa en la Fig. 2.2A, la fluorescencia de esta construcción se acumuló preferentemente en la periferia celular y fue más intensa en el mutante *inp51Δ* (Fig. 2.2A, gráfica). La abundancia de GFP, analizada mediante Western blot, fue también mayor en la fracción enriquecida en membranas (P13) y en los extractos del mutante *inp51Δ* (Fig. 2.2B), un resultado similar al observado para extractos de proteínas de células que sobreexpresan *MSS4*, gen que codifica la quinasa que fosforila $\text{PtdIns}4\text{P}$ en posición 5, responsable de la síntesis de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Homma y col., 1998).

Igualmente, analizamos la intensidad y localización de la señal de GFP en extractos de células incubadas a 15°C durante 180 min. Para nuestra sorpresa, la fluorescencia en la periferia celular se redujo tanto en la cepa parental como en la cepa *inp51Δ* (Fig. 2.2A). También se observó un descenso brusco en la intensidad de la señal de GFP localizada en la fracción P13 y un aumento paralelo en la correspondiente a la fracción S13 (Fig. 2.2B). Por tanto, la ausencia de Inp51p incrementa notablemente los niveles de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ en la

membrana plasmática de *S. cerevisiae*, si bien, la exposición a frío parece disparar la movilización de esta molécula en todas las cepas analizadas.

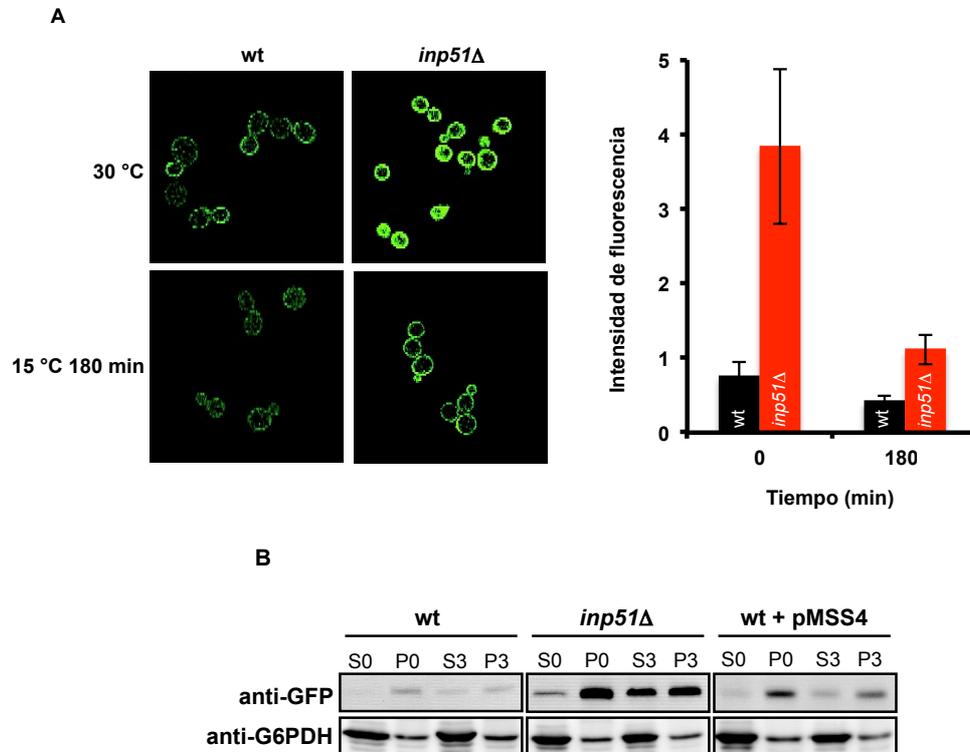


Figura 2.2. La exposición a frío reduce los niveles de PtdIns(4,5)P₂ en la membrana plasmática. (A) Determinación del contenido en PtdIns(4,5)P₂ de la cepa silvestre (barra negra) y su mutante *inp51Δ* (barra roja) mediante la visualización y cuantificación de la fluorescencia emitida por una proteína de fusión que contiene dos copias en tándem del dominio PH de la proteína Plc1p fusionados a la proteína fluorescente GFP. Las imágenes, que representan la observación por microscopía de fluorescencia, fueron cuantificadas con la aplicación para el procesamiento de imágenes ImageJ, para la determinación de la intensidad de fluorescencia. Las barras de error representan la desviación típica de la media de los valores de tres experimentos independientes (con $n > 100$ células por experimento). **(B)** Extractos de proteínas de células transformantes PLC1δ-GFP de la cepa silvestre (wt), del mutante *inp51Δ* y de células sobreexpresantes de *MSS4* (wt + pMSS4) cultivadas a 30°C hasta fase exponencial de crecimiento (control, DO₆₀₀ ~ 0.5) o transferidas a continuación a 15°C durante 3 h, fueron centrifugados a 13.000 rpm y el sobrenadante (S13) y el correspondiente pellet (P13) analizados por separado mediante Western blot como se describe en el apartado de Materiales y Métodos. El nivel de glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH) revelado con anti-G6PDH fue utilizado como control de carga de las fracciones S13.

2. Activación de la ruta CWI y su implicación en el fenotipo del mutante *inp51Δ* a bajas temperaturas

Resultados previos han mostrado que la ruta CWI es un efector del fosfoinosítido PtdIns(4,5)P₂ (Audhya y Emr, 2002). Esta molécula es clave en la interacción Rom2p/Rho1p que conduce a la activación transcripcional mediada por Rlm1p (Audhya y Emr, 2002). Así pues, los niveles de PtdIns(4,5)P₂ pueden ser estimados utilizando el plásmido pRLM1-*lacZ*,

que contiene dos regiones de unión al factor transcripcional Rlm1p fusionadas al gen *lacZ*, *RLM1::lacZ* (Fig. 2.3A). Como se puede observar, la ausencia de Inp51p incrementó alrededor de 3 veces la actividad basal (30°C) del chivato *RLM1::lacZ*. Dicha inducción fue significativa y dependiente de la presencia de Slt2p, como cabía esperar. De igual forma, los niveles de β-galactosidasa medidos a partir de las construcciones *RGD1::lacZ* (codifica para una proteína activadora de la actividad GTPasa de Rho3p y Rho4p), *CRH1::lacZ* (transglucosilasa de quitina) o *HXT1::lacZ* (transportador de glucosa de baja afinidad), se incrementaron a 30°C por la pérdida de Inp51p (Fig. 2.3B). Además, la delección de *SLT2* en el mutante *inp51Δ*, suprimió la hiperactivación del chivato *RLM1::lacZ* (Fig. 2.3A). Por otra parte, la exposición a frío, redujo los niveles de β-galactosidasa en esta cepa (Fig. 2.3A), confirmando la movilización de PtdIns(4,5)P₂ bajo estas condiciones (Fig. 2.2).

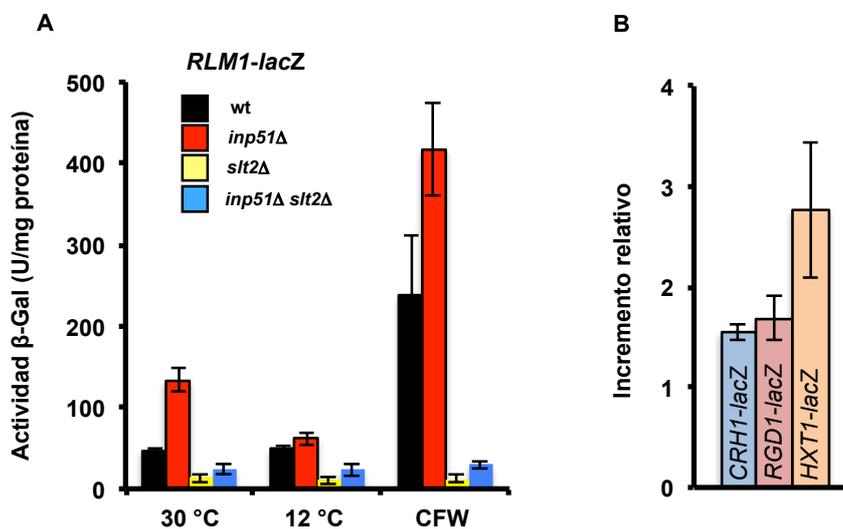


Figura 2.3. La actividad de la ruta CWI responde a los niveles de PtdIns(4,5)P₂. (A) La transcripción del chivato *RLM1::lacZ* fue analizada en las cepas y condiciones de temperatura mencionadas o tras su exposición a CFW (40 μg/ml) como control. (B) La expresión de tres genes regulados por la ruta CWI, *CRH1*, *RGD1* y *HXT1*, fue ensayada utilizando construcciones en las que se utilizó una fusión del promotor correspondiente al gen de *E. coli lacZ*. El histograma representa los valores relativos de actividad β-galactosidasa expresados como el número de veces que se activan dichas construcciones en el mutante *inp51Δ* con respecto a la cepa silvestre (wt). En todos los casos las barras de error representan la desviación típica de las medias de al menos tres experimentos independientes. En ambos casos, la preparación de extractos y determinación de la actividad enzimática se realizó según se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Seguidamente, analizamos la posibilidad de que el fenotipo en frío del mutante *inp51Δ* estuviera causado por la hiperactivación basal de la ruta CWI en esta cepa. Como se observa en la Fig. 2.4, el mutante *inp51Δ* fue más tolerante a la presencia de CFW en el medio de cultivo que la cepa silvestre. Además, el fenotipo fue dependiente de la presencia de una proteína Slt2p funcional, ya que la delección de *SLT2* en el mutante *inp51Δ*, suprimió el fenotipo de tolerancia a este agente (Fig. 2.4). Sin embargo, el doble mutante *inp51Δ slt2Δ* no

alteró su fenotipo a baja temperatura con respecto al observado para el mutante sencillo *inp51Δ*. Así, la ruta CWI es sensible a los niveles de PtdIns(4,5)P₂, si bien su activación a 30°C en el mutante *inp51Δ*, no parece responsable del comportamiento de esta cepa a bajas temperaturas.

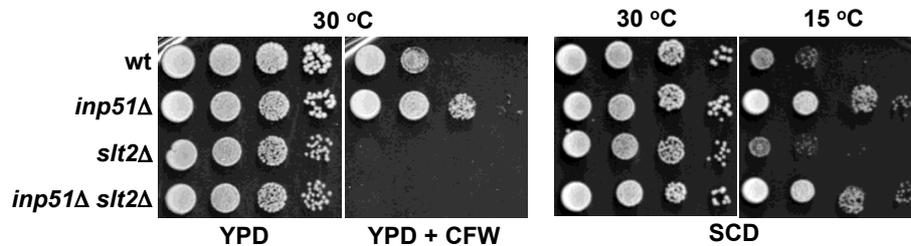


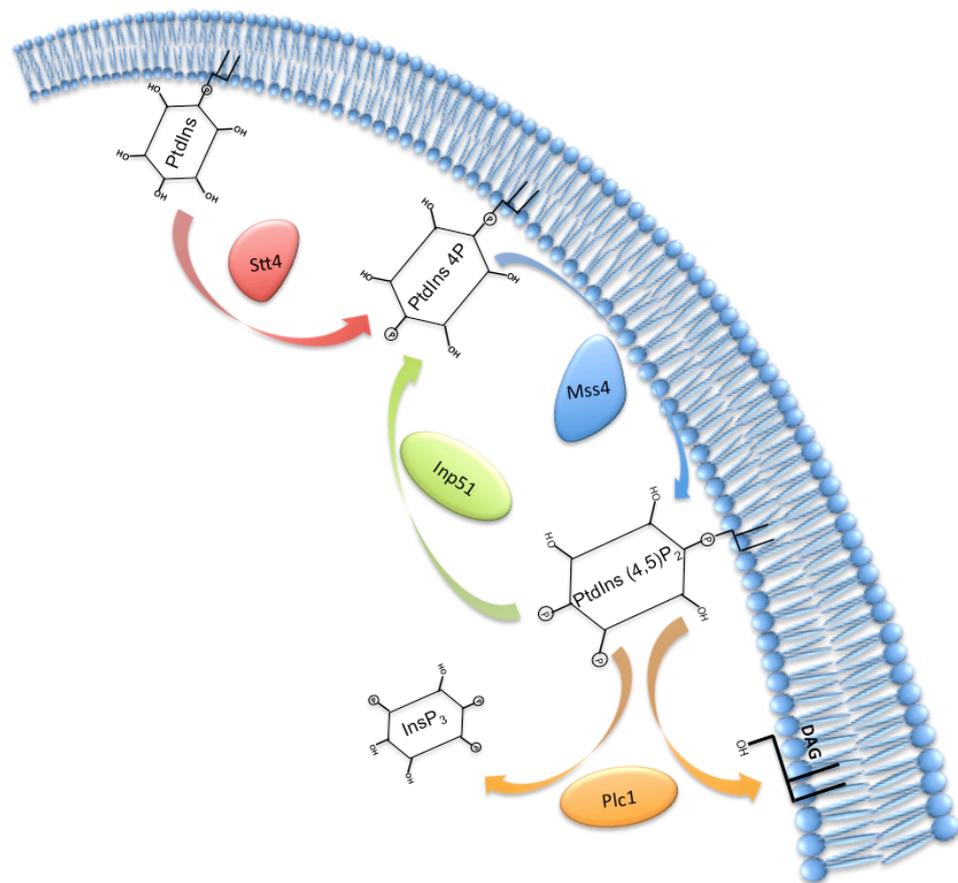
Figura 2.4. La activación de la ruta CWI no determina la tolerancia a frío de un mutante *inp51Δ*. Crecimiento de la cepa silvestre CEN.PK2-1C (wt) y de sus correspondientes mutantes *inp51Δ*, *slt2Δ* e *inp51Δ slt2Δ*, en ausencia (YPD) o presencia de blanco de calcoflúor, YPD + CFW (80 μg/ml) a 30°C. El crecimiento de las cepas mencionadas fue también analizado en medio SCD a 30 y 15°C. Se procedió tal y como se indica en la Figura 2.1.

3. El metabolismo de PtdIns(4,5)P₂ mediado por la actividad fosfolipasa de Plc1p confiere tolerancia al descenso de la temperatura

Los resultados del análisis de los niveles de PtdIns(4,5)P₂ a 30 y 15°C ponían en duda que el fenotipo de un mutante *inp51Δ* fuera consecuencia de su elevado contenido en esta molécula. No obstante, tratamos de clarificar este extremo analizando el crecimiento en frío de células sobreexpresantes de *MSS4* y *STT4*. Como en el caso del mutante *inp51Δ*, la sobreexpresión de *MSS4* resulta en niveles elevados de PtdIns(4,5)P₂ (Fig. 2.2B). Por su parte, Stt4p es la quinasa de fosfatidilinositol que genera PtdIns(4)P en la membrana plasmática. La Fig. 2.5A muestra una ilustración de las etapas que conducen a la síntesis de PtdIns(4,5)P₂ a partir de PtdIns y de las enzimas implicadas. En este sentido, conviene hacer énfasis en que la ausencia de Inp51p debe reducir los niveles de PtdIns(4)P, ya que esta molécula es el producto de la reacción catalizada por esta enzima. Como vemos en la Fig. 2.5B, la sobreexpresión de *MSS4* estimuló el crecimiento de la cepa CEN.PK2-1C. Un efecto similar fue encontrado en células que portan un plásmido de *STT4* (Fig. 2.5B) y en las que cabe esperar niveles más elevados de PtdIns(4)P que en la cepa parental, que servirán como sustrato para la síntesis de PtdIns(4,5)P₂. Analizamos también el efecto de la sobreexpresión de *PLC1*. Se ha descrito que la activación de Plc1p con ionomicina reduce el contenido tanto de PtdIns(4,5)P₂ como de PtdIns(4)P en la membrana plasmática (Hammond y col., 2012). Como se aprecia en la Fig. 2.5B, un alto número de copias de *PLC1* activó el crecimiento de

la cepa silvestre. Es más, la sobreexpresión de este gen en un fondo *inp51Δ*, estimuló también el crecimiento del mutante a 12°C (Fig. 2.5B). Así, nuestros resultados sugieren que el metabolismo exacerbado de PtdIns(4,5)P₂ podría estar en la base de los efectos observados por la delección de *INP51* o la sobreexpresión de *PLC1*. Conviene señalar también que PtdIns(4,5)P₂ es sustrato para la síntesis de PtdIns(3,4,5)P₃ molécula que al igual que otros fosfatidilinositol fosfatos juega un papel importante en señalización (Riehle y col., 2013), sin embargo esta molécula no ha sido detectada en *S. cerevisiae* (Voordeckers y col., 2011). Por tanto, los efectos de la sobreexpresión de *PLC1* sugieren, la canalización de PtdIns(4,5)P₂ hacia la síntesis de InsP₃ y DAG, y no a la producción de PtdIns(3,4,5)P₃ como causa, en todo caso, de los efectos observados.

A



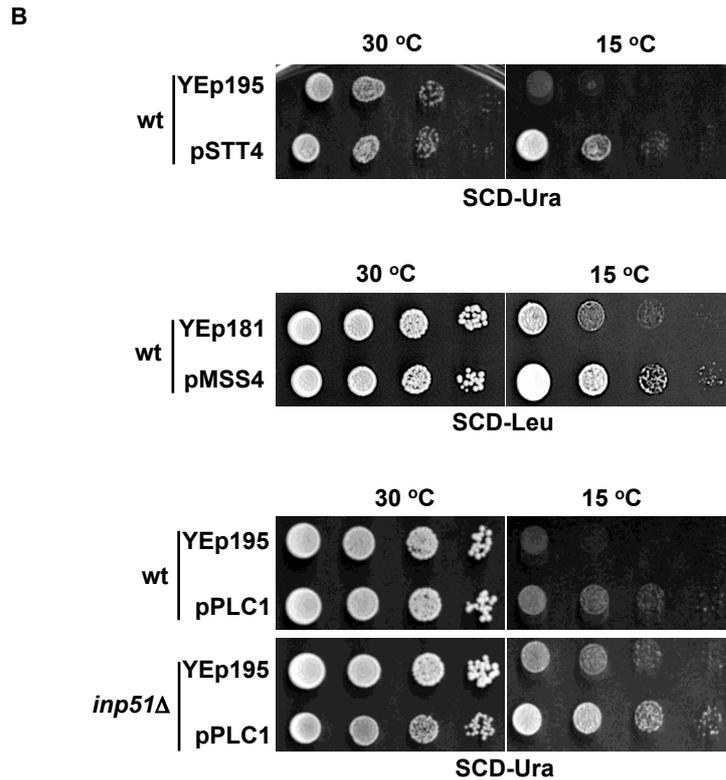
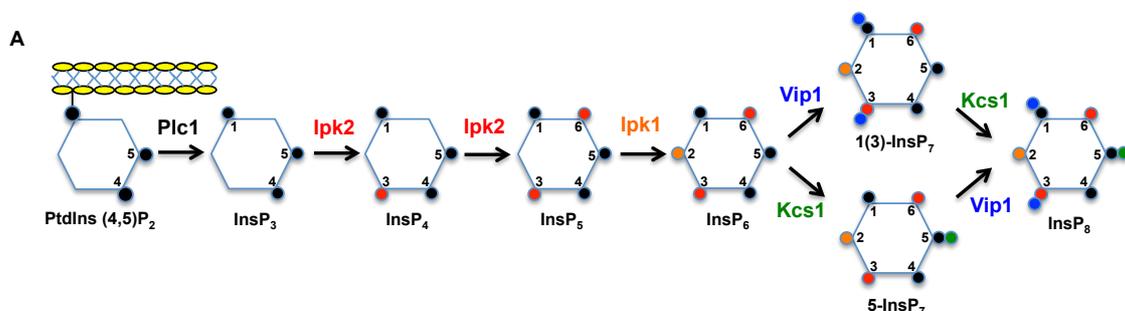


Figura 2.5. La sobreexpresión de *STT4*, *MSS4* o *PLC1* mejora la tolerancia de la cepa silvestre y/o del mutante *inp51Δ* a bajas temperaturas de *S. cerevisiae*. (A) Representación esquemática de la ruta de biosíntesis de PtdIns(4,5)P₂ y las enzimas implicadas. (B) Crecimiento de células de la cepa silvestre CEN.PK2-1C (wt) y su mutante *inp51Δ* sobreexpresando *STT4* (pSTT4), *MSS4* (pMSS4) o *PLC1* (pPLC1) a 30 y 15°C en medio SCD-Leu. Células de estas cepas fueron transformadas con un plásmido vacío (YEp181) y se usaron como controles.

4. La pérdida de Inp51p y la exposición a bajas temperaturas estimulan la acumulación de DPIInsP_s.

Los resultados obtenidos hasta este punto sugerían que el metabolismo de PtdIns(4,5)P₂ mediado por Plc1p podía estar en la base del fenotipo de tolerancia a frío del mutante *inp51Δ*. Por ello, centramos nuestra atención en los InsPs y DPIInsPs generados a partir de PtdIns(4,5)P₂ (ver Fig. 2.6A). En células de mamífero, se ha descrito que la presencia de InsP₃, activa receptores específicos que provocan la acumulación de Ca⁺² en el citosol (Mikoshiha, 2007). Aunque en *S. cerevisiae* no se han encontrado ortólogos a dicho receptor, se ha propuesto que la activación de Plc1p en presencia de glucosa, induce la liberación de Ca⁺² (Tisi y col., 2004). Así, hipotetizamos que un chivato de Ca⁺² podía servirnos para estimar el nivel de InsP₃ y su posible variación tanto en el mutante *inp51Δ* como en respuesta a frío. Para ello, elegimos una construcción en la que el gen *lacZ* de *E. coli* se encuentra bajo el control de un promotor sintético que contiene varias repeticiones del elemento de respuesta a calcineurina (Calcineurin Dependent Response Element), CDRE::*lacZ*. Como se muestra en

la Fig. 2.6B, este chivato se activó por la presencia de niveles elevados de CaCl_2 en el medio de cultivo, siendo esta activación mayor en el mutante *inp51Δ*. Sin embargo, la actividad β-galactosidasa detectada en el mutante a 30°C o en células expuestas a bajas temperaturas, fue insignificante comparada con la observada en la situación control utilizada (Fig. 2.6B). Así, aunque este resultado debe ser tomado con precaución, el mismo sugiere que no existen cambios relevantes en el contenido de InsP_3 ni por la ausencia de Inp51p ni por la exposición a frío. Esto no es del todo sorprendente si tenemos en cuenta, que en levaduras, la síntesis de InsP_3 va acompañada por su rápida conversión en InsP_4 e InsP_5 por la multiquinasa Ipk2p (Fig. 2.6A). InsP_5 es a su vez fosforilado por la quinasa Ipk1p para dar lugar a InsP_6 , que será transformado en los difosfoinositolpolifosfatos (DPIInsPs) 1(3)- InsP_7 o 5- InsP_7 , por la acción de las quinasas Vip1p o Kcs1p (Fig. 2.6A), respectivamente (Dubois y col., 2002; Mulugu y col., 2007). Partiendo de esto, nos propusimos examinar la acumulación de los DPIInsPs producidos a partir de InsP_6 en la cepa silvestre y en el mutante *inp51Δ*. Se ha descrito, que la molécula 1(3)- InsP_7 promueve la expresión de genes *PHO*, inhibiendo el complejo Pho81p-Pho80p-Pho85p que actúa, en esta caso, como un regulador negativo (Lee y col., 2008; York y Lew, 2008). Por tanto, decidimos usar la construcción *PHO89::lacZ*, en la que el promotor del gen *PHO89* (que codifica un cotransportador de Na^+/P_i) dirige la expresión del gen *lacZ*, para estimar el contenido de 1(3)- InsP_7 . De acuerdo a esto, la actividad basal (30°C) del chivato detectada en células del mutante *kcs1Δ*, las cuales acumulan 1(3)- InsP_7 (Padmanabhan y col., 2009), fue muy superior a la observada en células del mutante *vip1Δ* (Fig. 2.6C). A su vez, la delección de *INP51* incrementó alrededor de 5 veces la expresión del chivato *PHO89::lacZ*, en comparación con la registrada para la cepa parental a 30°C. Por tanto, la ausencia de Inp51p incrementa el nivel celular del derivado 1(3)- InsP_7 de PtdIns(4,5)P.



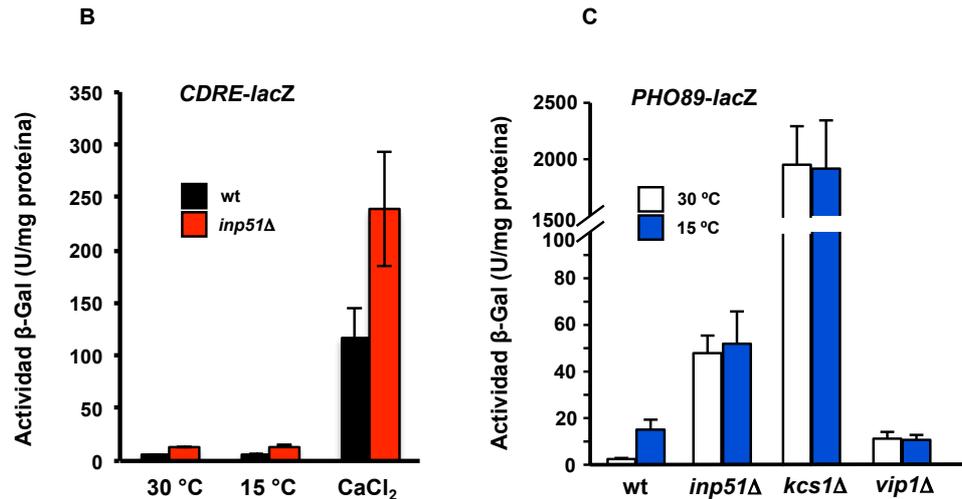


Figura 2.6. La delección de *INP51* y la exposición a frío incrementan el contenido celular de 1(3)-InsP₇. (A) Representación de la ruta de inosítoles fosfato en *S. cerevisiae*. Los círculos representan los grupos fosfato, cuyo color se corresponde con el color de la quinasa encargada de añadirlos a la molécula. (B) Actividad transcripcional del chivato CDRE::lacZ en células de la cepa silvestre CEN.PK2-1C (wt) y de su correspondiente mutante *inp51Δ* a 30°C y tras su exposición a 15°C durante 3h. Como control positivo, células de la cepa silvestre fueron expuestas a 0,2 M de CaCl₂ durante 90 min. Las barras de error representan la desviación típica (SD) de la media de tres experimentos independientes. (C) El contenido de 1(3)-InsP₇ fue estimado utilizando el chivato PHO89::lacZ en las cepas silvestre (wt), *inp51Δ*, *kcs1Δ* y *vip1Δ* en las condiciones que se describen. Los valores representan la media ± SD de la actividad específica β-galactosidasa de tres experimentos independientes. En ambos casos, la preparación de extractos y la determinación de la actividad enzimática se llevaron a cabo según se describe en el apartado de Materiales y Métodos.

Por otra parte, la exposición a frío incrementó los niveles de β-galactosidasa medidos en células de la cepa parental a 30°C (Fig. 2.6C). El cambio fue estadísticamente significativo y supuso un aumento en torno a 4-5 veces. En la cepa *inp51Δ* el valor medio a 12°C también fue más alto que el observado a 30°C, aunque las diferencias no fueron significativas, una situación que se repitió en los mutantes *kcs1Δ* y *vip1Δ* (Fig. 2.6C). Es posible que en estos casos, la interrupción de genes clave en esta ruta dispare mecanismos de regulación *feed-back* que enmascaren la respuesta o modulen la respuesta. En cualquier caso, los resultados en la cepa silvestre confirman la movilización de PtdIns(4,5)P₂ a 15°C y su metabolismo en favor de la síntesis de DPIInsPs.

A continuación nos propusimos estudiar la respuesta fenotípica de cepas carentes de las enzimas que forman parte de la ruta de inositolfosfatos, Ipk2p, Ipk1p, Kcs1p y Vip1p. Como se observa en la Figura 2.7, la delección de *IPK2* provocó un defecto de crecimiento evidente tanto a 30 como a 15°C, en consonancia probablemente con el papel esencial de los intermediarios InsP₄ e InsP₅ en la modulación de complejos remodeladores de cromatina (Steger y col., 2003; Guha y col., 2007; Desai y col., 2009). La pérdida de *IPK1* o *KCSI*

también generó un cierto defecto a 30°C, pero este fue más acusado a 12°C, en especial en el mutante *kcs1Δ*, cuyas células como ya se mencionó acumulan 1(3)-InsP₇ en detrimento del también DPInsP 5-InsP₇. Por contra, la pérdida de Vip1p estimuló el crecimiento a 15°C de la cepa parental (Fig. 2.7). Dado que este mutante no produce 1(3)-InsP₇ pero sí 5-InsP₇ (Fig. 2.6A), nuestros resultados sugieren que esta molécula podría ser un regulador positivo del crecimiento en frío de la cepa CEN.PK2-1C de *S. cerevisiae*.

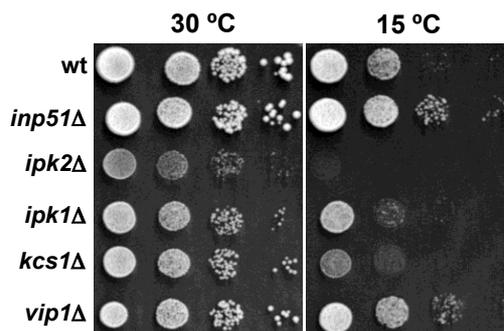


Figura 2.7. La acumulación de 5-IP₇ mejora el crecimiento a bajas temperaturas. Crecimiento de la cepa silvestre CEN.PK2-1C (wt) y de sus correspondientes mutantes *inp51Δ*, *plc1Δ*, *ipk2Δ*, *ipk1Δ*, *kcs1Δ* y *vip1Δ* a 30 y 15°C en SCD. Se procedió tal y como se indica en la Figura 2.1.

5. Efectos de la exposición a frío y de la ausencia de Inp51p en la localización y abundancia de Pah1p

Los resultados expuestos en el apartado anterior mostraban una regulación al alza en el nivel de 1(3)-InsP₇ en respuesta a frío. También la pérdida de Inp51p incrementó el contenido de este DPInsP, a juzgar por la transcripción del chivato de *PHO89* (Fig. 2.7C). Se ha descrito un papel de la molécula 1(3)-InsP₇ en la regulación mediada por Pho81p del complejo quinasa Pho80p-Pho85p. En concreto, se ha demostrado que esta molécula es un activador de Pho81p, que a su vez regula a la baja la actividad quinasa de Pho85p (Lee y col., 2007), lo que resulta en la inducción mediada por Pho4p de este grupo de genes (Schneider y col., 1994; Kaffman y col., 1998). La quinasa Pho85p regula también otros genes relacionados con el metabolismo energético y la biosíntesis (Huang y col., 2007) y en concreto la fosforilación de Pah1p (Choi y col., 2012), la fosfatasa de ácido fosfatídico (PA) de *S. cerevisiae*, que convierte PA en DAG (Rajakumari y col., 2008; Carman y Han, 2009). Pah1p es un regulador clave en la homeostasis lipídica (Pascual y Carman, 2013) y su actividad es controlada, entre otros, por Pho85p. La fosforilación de Pah1p por esta quinasa reduce su actividad catalítica, si bien paradójicamente aumenta su abundancia (Choi y col., 2012). De acuerdo a todo esto, examinamos la distribución de Pah1-myc en fracciones de extractos de la cepa silvestre y del

mutante *inp51Δ*, enriquecidas en proteínas solubles (S13) o en proteínas de membrana (P13). Como se observa en la Fig. 2.8, Pah1p se distribuyó prácticamente por igual entre el citosol y las membranas de la cepa parental cultivada a 30°C. La ausencia de Inp51p alteró esta distribución, reduciendo la abundancia de la enzima en la fracción P13. Esta circunstancia es destacable pues la actividad catalítica de Pah1p se desarrolla en la membrana del retículo endoplasmático, donde se encuentra su sustrato (Pascual y col., 2013). Por su parte, la reducción de la temperatura de crecimiento de *S. cerevisiae* de 30 a 15°C, incrementó la señal de Pah1-myc en las dos cepas analizadas, tanto en la fracción S13 como en la P13 (Fig. 2.8). Así pues, nuestros datos indican que el contenido de Pah1p esta regulado en respuesta a frío. No obstante, no parecieron existir cambios en su localización relativa entre las fracciones P13 y S13. Los resultados no permiten tampoco hablar de cambios en la actividad de Pah1p en respuesta a un descenso de temperatura, más cuando existen evidencias de una localización nuclear de Pah1p, adicional a la del retículo endoplasmático, y de su interacción con promotores de genes implicados en la biosíntesis de fosfolípidos (Santos-Rosa y col., 2005; Siniossoglou, 2012).

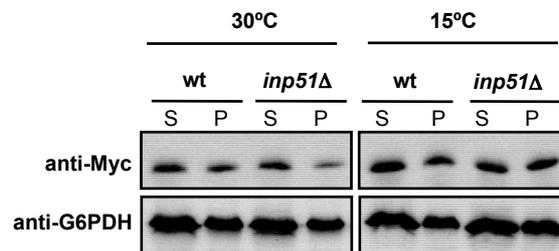


Figura 2.8. La localización y abundancia de Pah1p sufren cambios en respuesta a frío y a la ausencia de Inp51p. Análisis mediante Western blot de extractos de proteínas de células de la cepa silvestre CEN.PK2-1C (wt) y de su correspondiente mutante *inp51Δ* en las que la proteína Pah1 ha sido etiquetada en su extremo C-terminal con el epítipo 13-Myc. Las células fueron cultivadas a 30°C (DO₆₀₀~0.5) o a 15°C (3 h) en medio SCD y los extractos de proteínas obtenidos fueron procesados mediante centrifugación a 13.000 rpm para el análisis por separado del correspondiente sobrenadante (S13) y pellet (P13). Se utilizó un anticuerpo anti-Myc para el revelado de Pah1p. Como control de carga, en particular de la fracción S13, se utilizó la señal generada por un anticuerpo anti-glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (G6PDH). Para otros detalles, se procedió tal y como se indica en el capítulo de Materiales y Métodos.

6. Análisis del contenido en lípidos

La fosfatasa de ácido fosfatídico, Pah1p, convierte PA en DAG, el cual sirve como precursor para la síntesis de TAG (Smith y col., 1957). Así pues, Pah1p es el principal responsable de la síntesis de lípidos neutros (LN) y de los cambios en su abundancia en función de la fase de crecimiento (Han y col., 2006; 2007). A su vez, el DAG generado puede también ser dirigido a la síntesis de PC y PE a través de la ruta de Kennedy, si bien la ruta CDP-DAG que utiliza PA, es la vía principal de síntesis de fosfolípidos (PL) en *S. cerevisiae* (Rajakumari y col., 2008; Carman y Han, 2009; Pascual y Carman, 2013). Tanto es así, que un mutante *pah1Δ* muestra un reducido contenido en TAG, pero una mayor abundancia de PA, PL y ácidos grasos (AG) que su correspondiente cepa silvestre (Han y col., 2006; 2007; Fakas y col., 2011).

Así pues, decidimos analizar el contenido en lípidos de la cepa Inp51p y de su correspondiente parental CEN.PK2-1C a 30 y 15°C con la idea de obtener una visión más clara de los efectos de estas variables sobre la actividad Pah1p. Se incluyó en el análisis el sobreexpresante de *PLC1*, que como se ha descrito en este trabajo muestra un fenotipo en frío similar al de la cepa *inp51Δ*, y el mutante *hog1Δ*. La MAPK Hog1p es activada en respuesta a frío (Panadero y col., 2006) y su ausencia provoca un defecto de crecimiento bajo esta condición, de ahí su elección como un posible control negativo en este estudio (Córcoles-Sáez y col., 2012). Comentar en este punto que *INP51* y *HOG1* no muestran una interacción genética, ya que la delección del primero en el mutante *hog1Δ* mejora su defecto de crecimiento a bajas temperaturas (Fig. 2.9).

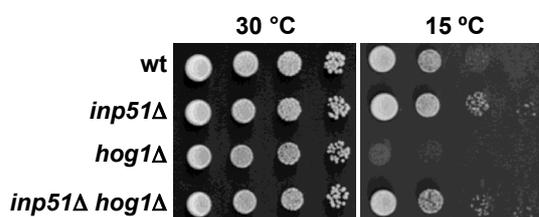


Figura 2.9. Ausencia de interacción genética en frío entre *HOG1* e *INP51*. Crecimiento de la cepa silvestre CEN.PK2-1C (wt) y de sus correspondientes mutantes *hog1Δ*, *inp51Δ* e *inp51Δ hog1Δ* en medio SCD a 30 y 15°C. Se procedió tal y como se indica en la Fig. 2.1.

La Tabla 2.1 y la Fig. 2.10A, recogen los datos del análisis cuantitativo de las diferentes clases y sub-clases de LN (DAG, TAG y SE) y de PL (PC, PE, PS, PI, PA y lyso-PL) examinados. La ausencia de Inp51p o la presencia de un elevado número de copias de *PLC1*, causó un importante descenso en el contenido total de lípidos, tanto neutros como polares, con respecto a lo observado en la cepa silvestre a 30°C. Estas diferencias fueron

especialmente significativas en el caso de los LN y para el mutante *inp51Δ*. Concretamente, el contenido total de especies de TAG mostró valores de $0,97 \pm 0,30$ (cepa silvestre, wt) frente a $0,31 \pm 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco (*inp51Δ*). De acuerdo con este resultado, la visualización de partículas lipídicas, “*lipid droplets*”, con el colorante Rojo Nilo, mostró una señal más intensa en la cepa silvestre (Fig. 2.10B). Respecto al contenido en PC y PE, fosfolípidos que también son en parte sintetizados a partir de DAG a través de la ruta Kennedy (Carman and Han, 2009), este también mostró un descenso, con valores de $1,28 \pm 0,30$ y $0,79 \pm 0,28$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco, respectivamente (cepa silvestre, wt) frente a $0,58 \pm 0,07$ y $0,47 \pm 0,06$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco (*inp51Δ*). Además, el contenido de PA fue algo mayor en el mutante *inp51Δ* y en células que sobreexpresan *PLC1*, si bien las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En conjunto estas diferencias son consistentes con una actividad Pah1p deprimida en estas dos estirpes, si bien los datos para el contenido total de PL y AG sugieren la existencia de mecanismos adicionales de regulación en el mutante *inp51Δ*. Así, el contenido total de PL y de AG se redujo en el mutante y no varió apenas en los transformantes que sobreexpresan *PLC1* en comparación con la cepa parental (Tabla 2.1). Además, la relación del contenido de ácidos grasos insaturados frente al de saturados fue mayor en la cepa silvestre que en el mutante *inp51Δ* o en el sobreexpresante de *PLC1*, con valores de 1,86 frente a 1,50 y 1,61 respectivamente. Por su parte, el mutante *hog1Δ* mostró el mayor contenido de lípidos entre todas las cepas analizadas, en particular de fosfolípidos, con valores de $5,54 \pm 0,30$ frente a $3,86 \pm 0,81$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco de la cepa silvestre, siendo PI y PS las sub-clases más afectadas por este incremento. Además, mostró una relación del contenido de ácidos grasos insaturados frente al de saturados similar al de la cepa parental (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Cantidad total de diacilglicerol (DAG), triacilglicerol (TAG), ésteres de esteroles (SE), lípidos neutros (LN), fosfatidilinositol (PI), fosfatidilserina (PS), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), ácido fosfatídico (PA), lisofosfolípidos (LYSO-PL), lípidos polares (LP), ácido palmítico (C_{16:0}), ácido palmitoléico (C_{16:1}), ácido esteárico (C_{18:0}), ácido oleico (C_{18:1}) en la cepa silvestre (wt) sus mutantes *hog1Δ* e *inp51Δ* y una cepa con la sobreexpresión de *PLC1* (pPLC1), expresada como la media ± la desviación estándar de la concentración celular (μg/mg peso seco) tras incubar las células en medio sintético a 30°C y ser transferidas a 15°C durante 3 horas. La extracción y análisis de la composición lipídica se llevó a cabo tal y como se indica en Materiales y Métodos.

μg/mg p.s.	wt 30°C	wt 15°C	<i>hog1Δ</i> 30°C	<i>hog1Δ</i> 15°C	<i>inp51Δ</i> 30°C	<i>inp51Δ</i> 15°C	wt + pPLC130 °C	wt + pPLC1 15°C
DAG	0.25±0.04	0.25±0.09	0.25±0.02	0.27±0.04	0.17±0.03	0.21±0.038	0.18±0.01	0.22±0.01
TAG	0.97±0.30	0.65±0.04	0.98±0.19	0.84±0.16	0.31±0.06	0.41±0.030	0.32±0.03	0.53±0.11
SE	0.24±0.09	0.24±0.06	0.39±0.21	0.32±0.13	0.11±0.02	0.16±0.06	0.11±0.02	0.18±0.06
Total LN	1.46±0.36	1.14±0.24	1.62±0.23	1.43±0.13	0.58±0.02	0.78±0.33	0.60±0.20	0.94±0.22
PI	1.28±0.20	1.84±0.52	2.06±0.18	2.22±0.53	0.93±0.17	1.27±0.21	1.31±0.11	1.15±0.21
PS	0.29±0.08	0.24±0.05	0.55±0.03	0.42±0.05	0.26±0.06	0.17±0.03	0.34±0.06	0.20±0.04
PC	1.28±0.30	1.55±0.29	1.46±0.07	1.57±0.13	0.58±0.07	0.78±0.02	0.85±0.18	1.099±0.037
PE	0.79±0.27	1.18±0.13	1.24±0.11	1.38±0.26	0.47±0.06	0.91±0.16	0.72±0.10	1.08±0.13
PA	0.11±0.01	0.20±0.02	0.13±0.01	0.14±0.02	0.13±0.02	0.11±0.02	0.13±0.02	0.12±0.02
LYSO-PL	0.10±0.01	0.11±0.02	0.11±0.01	0.10±0.01	0.12±0.01	0.08±0.01	0.09±0.01	0.10±0.02
Total LP	3.86±0.81	5.11±0.99	5.54±0.30	5.82±0.76	2.49±0.41	3.31±0.50	3.44±0.38	3.76±0.53
C_{16:0}	3.27±0.18	3.06±0.12	3.68±0.11	3.50±0.14	2.62±0.07	2.66±0.12	2.76±0.07	2.59±0.15
C_{16:1}	5.99±0.80	6.86±0.20	5.54±0.15	7.30±0.60	3.91±0.23	5.61±0.73	4.28±0.56	5.89±0.56
C_{18:0}	1.71±0.08	1.59±0.05	1.89±0.08	1.77±0.10	1.27±0.04	1.29±0.09	1.30±0.05	1.27±0.07
C_{18:1}	3.27±0.54	3.16±0.15	4.63±0.60	4.76±0.26	1.95±0.16	2.54±0.37	2.25±0.28	2.75±0.24
Insat./Sat.	1.86	2.15	1.82	2.29	1.50	2.06	1.61	2.24

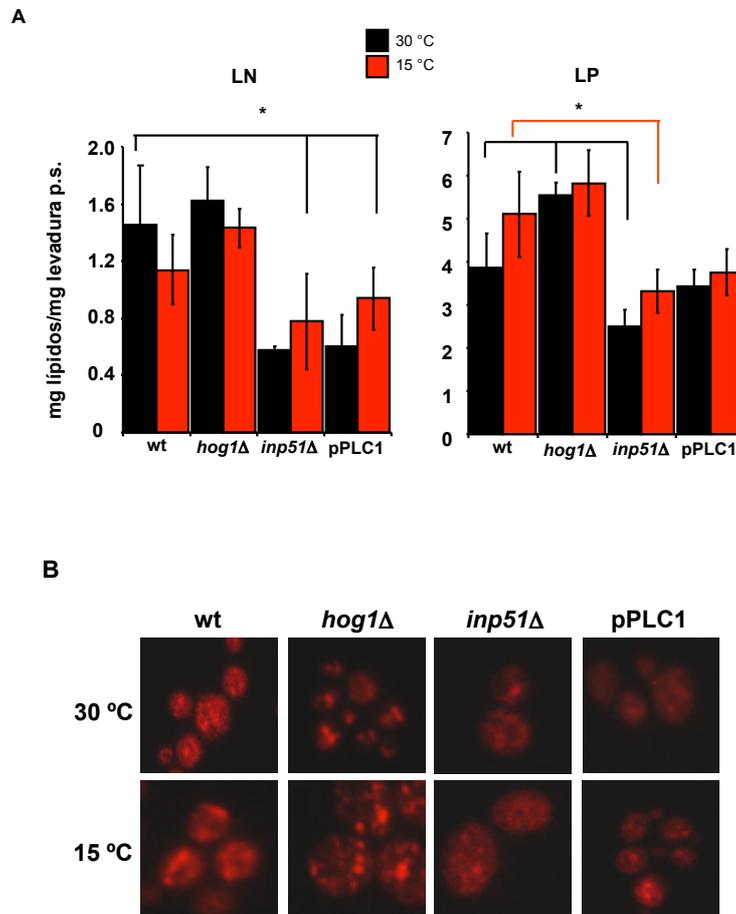


Figura 2.10: La pérdida de *INP51* o la sobreexpresión de *PLC1* disminuyen el contenido en lípidos de células de *S. cerevisiae*. (A) Contenido en lípidos neutros (LN) y lípidos polares (LP) de la cepa silvestre (wt) y de sus correspondientes mutantes *hog1Δ* e *inp51Δ* y de transformantes *pPLC1* a 30°C (barras negras) y a 15°C (barras rojas). Las células fueron cultivadas y sus lípidos analizados tal y como se describe en el capítulo de Materiales y Métodos. Los datos representan la media del valor obtenido \pm la desviación típica de tres experimentos independientes. Los valores marcados con * son significativamente diferentes a nivel de 0,01. (B) Células de la cepa silvestre (wt) y de su mutante *hog1Δ*, fueron incubadas a 30°C hasta su fase de crecimiento exponencial y transferidas a 15°C durante 3 horas, en ambos casos se tomaron alícuotas que fueron teñidas con Rojo Nilo para la visualización de partículas lipídicas, “lipid droplets”, por microscopía de fluorescencia.

Respecto a los cambios producidos en respuesta a un descenso de temperatura, estos siguieron un patrón claro en la cepa silvestre. La exposición a frío redujo el contenido en TAG, $0,97 \pm 0,30$ a 30°C frente a $0,65 \pm 0,04$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco a 15°C, e incremento el de PA, $0,11 \pm 0,01$ y $0,20 \pm 0,02$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco, y el total de PL, $3,86 \pm 0,81$ y $5,11 \pm 0,99$ $\mu\text{g}/\text{mg}$ de peso seco, respectivamente (Tabla 2.1). Estos resultados sugieren una reducción de la biosíntesis lipídica mediada por Pah1p, principalmente de TAG, en respuesta a frío y una activación de la producción de fosfolípidos y de la desaturación de AG. En efecto, el índice de insaturación de los ácidos grasos de lípidos de membranas de la cepa parental fue mayor a 15 que a 30°C, 2,15 frente a 1,86, respectivamente. Por su parte, la cepa *hog1Δ* mostró cambios

en línea con los observados para la cepa silvestre, si bien éstos fueron de menor magnitud y/o no fueron estadísticamente significativos (Tabla 2.1). Finalmente, la cepa *inp51Δ* y el sobreexpresante *PLCI* mostraron también una tendencia a incrementar la síntesis de PL y el nivel de insaturación de sus AG. Sin embargo, el contenido en TAG, y en general el de LN, se incrementó en respuesta a un descenso de temperatura (Tabla 2.1; Fig. 2.10A), sugiriendo de nuevo el funcionamiento inapropiado en estas estirpes de mecanismos de regulación adicionales en respuesta a frío.

7. Fluidez de la membrana plasmática

Los resultados mostrados en el epígrafe anterior revelan cambios importantes en el contenido total y en el de clases y subclases de lípidos en células carentes de la función de Inp51p. También la exposición a frío parece causar cambios que podrían tener como destino modular el efecto de este estrés sobre la fluidez de la membrana. Así pues, nos decidimos a analizar esta propiedad física en membranas de células de la cepa parental y del mutante *inp51Δ*. Utilizamos para ello, la sonda fluorescente DPH [1,6-difenil-1,3,5-hexatrieno]. La Figura 2.11A muestra las medidas de anisotropía (r) en un rango de temperaturas desde 30 a 0°C. Como era de esperar, el descenso de la temperatura ambiente incrementó el valor de anisotropía, indicando así una reducción de la fluidez de los lípidos de las membranas de las dos cepas analizadas. Este parámetro “ r ” es inversamente proporcional a la fluidez de membrana: a mayor valor de la anisotropía, mayor rigidez de la membrana. Además, la cepa mutante exhibió una membrana más rígida a todas las temperaturas analizadas en relación a la cepa silvestre (wt), un resultado inesperado, dado el fenotipo de esta cepa en frío, pero que es consistente con su menor contenido relativo de ácidos grasos insaturados (Tabla 2.1).

Por tanto, nos propusimos confirmar los efectos de la delección de *INP51* en las propiedades de la membrana, estudiando su crecimiento en presencia de diferentes ácidos grasos. Lockshon y col. (2012) han mostrado evidencias de que la exposición a ácido palmitoleico (C16:1) fluidifica la membrana de *S. cerevisiae*, mientras que la exposición a ácido oleico (C18:1) tiene un efecto contrario. Así, un crecimiento atenuado en la presencia de C16:1, pero no en la de C18:1, es considerado como evidencia de una membrana hiperfluida, mientras que un crecimiento exacerbado se interpreta como vinculado a una membrana más rígida. Como vemos en la Figura 2.11B, este fue el caso para células del mutante *inp51Δ*, confirmando así los datos obtenidos con la sonda fluorescente DPH (Fig. 2.11A). Por el contrario, el mutante *hog1Δ* mostró una membrana más fluida. También el

crecimiento del mutante *slt2Δ* fue indicativo de una membrana más fluida que la de la cepa parental o la del mutante *inp51Δ* (Fig. 2.11B). Los resultados para células carentes de la MAPK Slt2p son consistentes con lo descrito por Lockshon y col. (2012), los cuales atribuyen un papel a la ruta CWI en la homeostasis de la fluidez de la membrana.

Seguidamente, analizamos los efectos sobre la fluidez de la membrana, de la delección de *INP51* en células mutantes *hog1Δ* y *slt2Δ*. Como vemos, la ausencia de Inp51p estimuló el crecimiento tanto de *hog1Δ* como de *slt2Δ* en presencia de C16:1, mientras no alteró su crecimiento en medios conteniendo C18:1 (Fig. 2.11B). Así pues, no parece existir una interacción entre *INP51* y *HOG1* o *INP51* y *SLT2* en relación a la toxicidad generada por la exposición a C16:1, en total concordancia con la falta de interacción entre estos genes observada para su crecimiento en frío (Fig. 2.4 y 2.9). En definitiva, nuestros datos sugieren una correlación inversa entre fluidez de membrana y crecimiento en frío para la cepa CEN.PK2-1C.

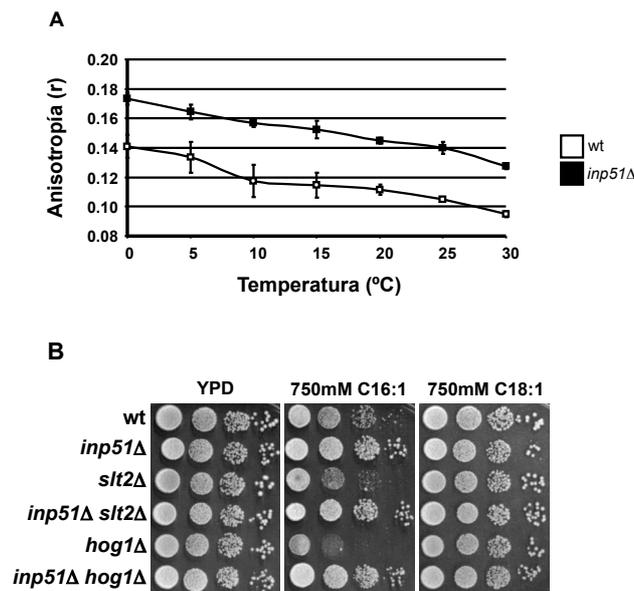


Figura 2.11: Fluidez de membrana y toxicidad a ácidos grasos. (A) Determinación de la fluidez de la membrana plasmática de células de la cepa silvestre (wt, cuadro blanco) y su mutante *inp51Δ* (cuadro negro) usando la sonda fluorescente DPH, 1,6-diphenil-1,3,5-hexatrieno, a diferentes temperaturas. El parámetro anisotropía (r) es inversamente proporcional a la fluidez de membrana. Se procedió tal y como se indica en Materiales y Métodos. Los datos representan la media \pm la desviación típica de tres experimentos independientes. (B) Sensibilidad de la cepa silvestre (wt) y sus mutantes *inp51Δ*, *slt2Δ*, *inp51Δ slt2Δ*, *hog1Δ* e *inp51Δ hog1Δ* a los ácidos palmitoleico (C16:1) y oleico (C18:1) a 30°C. Se procedió tal y como se indica en la figura 2.1.

8. La ausencia de Pah1p o de su fosfatasa Nem1p resulta en un defecto de crecimiento en frío

Los resultados anteriores revelaron una inesperada correlación entre fluidez de membrana y crecimiento en frío. Por otra parte, la respuesta a este estrés parecía marcada por un incremento en la abundancia de la enzima Pah1p (Fig. 2.8), acompañada de una reducción de su actividad, de acuerdo a los cambios observados en la composición lipídica de la cepa silvestre a 15°C (Tabla 2.1). En este escenario, nos preguntamos cuál sería el efecto de la ausencia de Pah1p o de su regulador positivo, la proteína fosfatasa Nem1p, sobre el crecimiento en frío. Como se mencionó anteriormente, un mutante *pah1Δ* se caracteriza por un menor contenido en TAG y DAG, y una mayor abundancia en PA, PL y AG que su correspondiente cepa silvestre (Han y col., 2006; 2007; Fakas y col., 2011). Así pues, este mutante debería exhibir una membrana más fluida, al igual que el mutante en su regulador positivo *nem1Δ*. Como se aprecia en la Figura 2.12, ambos mutantes mostraron mayor sensibilidad a frío que su correspondiente cepa parental, indicando de nuevo, la existencia de una correlación inversa entre fluidez y crecimiento en frío. Además, la interrupción de *INP51* en un fondo *nem1Δ*, al igual que lo observado para *HOG1* o *SLT2*, estimuló también el crecimiento en frío del mutante (Fig. 2.12B). Así, el efecto de la interrupción de *INP51* parece independiente, al menos en parte, de la actividad de Pah1p.

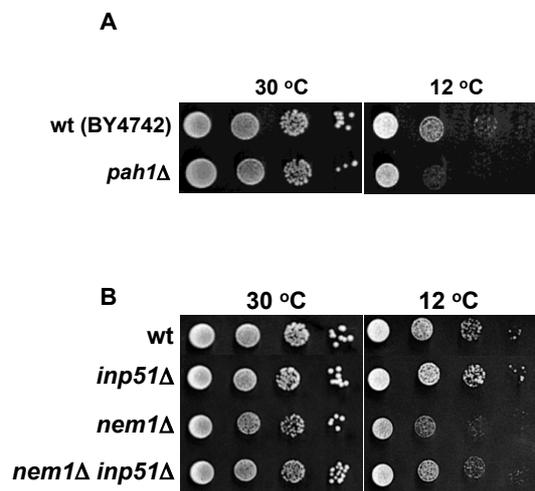


Figura 2.12. Efectos de la ausencia de Pah1p y Nem1p en el crecimiento en frío de *S. cerevisiae*. (A) Crecimiento de la cepa silvestre BY4742 (wt) y de su correspondiente mutante *pah1Δ* en medio SCD a 30 y 12°C. (B) Crecimiento de la cepa silvestre BY4741 (wt) y de sus correspondientes mutantes *inp51Δ*, *nem1Δ* y *nem1Δ inp51Δ* en medio SCD a 30 y 12°C. En ambos casos se procedió tal y como se indica en la Fig. 2.1.

9. Endocitosis de Tat1p y Tat2p

Recientemente, Hachiro y col. (2013) demostraron que la ubiquitilación y endocitosis de Tat2p, el transportador de alta afinidad de triptófano, depende de su interacción con fosfolípidos de membrana. Los resultados expuestos hasta ahora parecían mostrar también una correlación entre fluidez de la membrana y crecimiento en frío. Además, el fenotipo en frío del mutante *inp51Δ* se diluía en cepas *Trp⁺*. Así pues, decidimos analizar si las variaciones en el contenido y fluidez de los lípidos de células del mutante *inp51Δ* podían influir en la degradación de Tat2p que tiene lugar cuando las células son expuestas a un descenso térmico (Abe y Horikoshi, 2000; Hernández-López y col., 2011). Como se muestra en la Fig. 2.13, este fue también el caso para células de la cepa silvestre o del mutante *inp51Δ* cultivadas a 15°C durante 20 h. Sin embargo, en el caso de Tat2-myc este efecto pareció algo más pronunciado en la cepa parental, y así los niveles de este transportador se mantuvieron algo más elevados en el mutante, un rasgo que podría estar en la base, o al menos contribuir, al fenotipo de tolerancia a frío de esta estirpe.

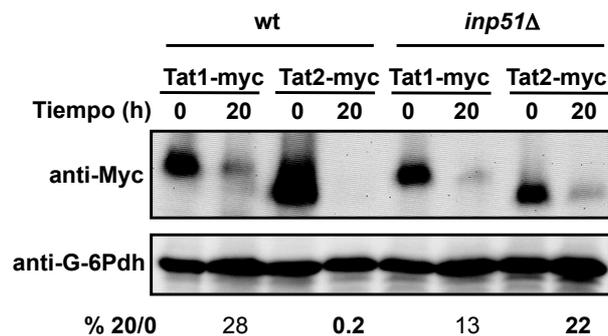


Figura 2.13. La exposición a frío reduce la abundancia de Tat1p y Tat2p. Extractos de proteínas de células de la cepa silvestre (wt) y de su correspondiente mutante *inp51Δ*, etiquetadas con el epítipo 13-myc en su copia cromosómica de *TAT1* o *TAT2*, y cultivadas a 30 o 15°C (20 h) fueron analizados mediante Western blot. Tat1p y Tat2p fueron detectadas utilizando un anticuerpo anti-Myc. Los niveles de glucosa 6-fosfato deshidrogenada G6PDH fueron utilizados como control de carga. En la parte inferior se indica la intensidad relativa normalizada de la banda de Tat1p o Tat2p a 15°C respecto a la observada a 30°C.



DISCUSIÓN
CAPÍTULO 2

Los resultados mostrados en este capítulo se han centrado en analizar la posible implicación de la molécula PtdIns(4,5)P₂ y de sus derivados en la homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* en respuesta a frío. Para ello, hemos investigado los cambios en los niveles de estos compuestos en células expuestas a temperaturas en el rango entre 12-15°C y hemos comparado los resultados obtenidos en diferentes mutantes y sobreexpresantes de genes implicados en su metabolismo. En particular, hemos enfocado nuestra atención en el mutante *inp51Δ*, el cual muestra una actividad reducida de la fosfoinosítido-5-fosfatasa de PtdIns(4,5)P₂, como prototipo de estirpe tolerante a frío. Sin embargo, nuestros resultados han ido, paso a paso, poniendo de manifiesto que el fenotipo de esta cepa está mediatizado por su carácter Trp⁻ y que guarda escasa relación, como tal, con la respuesta intrínseca a frío. No obstante, el estudio de este mutante ha sido una gran herramienta para detectar con suficiente precisión los cambios en los niveles de PtdIns(4,5)P₂ provocados por el frío y que han desembocado, entre otros, en la idea de la implicación de estos compuestos en el mecanismo de señalización y homeostasis de la fluidez de membrana en *S. cerevisiae*.

1. Señalización y homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática: evidencias de la implicación del PtdIns(4,5)P₂ y sus derivados

Nuestra investigación ha mostrado una reducción importante en el contenido de PtdIns(4,5)P₂ en la membrana plasmática de células de *S. cerevisiae* tras su transferencia de 30 a 15°C. Análisis de los niveles de GFP utilizando la construcción GFP-PH(PLCδ) o de la actividad transcripcional del reportero *RLM1::lacZ*, un chivato de la ruta CWI, que responde a los niveles de PtdIns(4,5)P₂, confirmaron estos cambios. Por tanto, un descenso de la temperatura ambiente estimula el metabolismo de PtdIns(4,5)P₂ reduciendo su abundancia en la membrana plasmática. Se ha descrito que la exposición de *S. cerevisiae* a temperaturas elevadas, 37-40°C, incrementa un 40% los niveles de PtdIns(4,5)P₂ (Audhya y Emr, 2002). Estos resultados sugieren pues que la actividad de Plc1p, la única fosfolipasa específica de fosfoinosítidos en *S. cerevisiae*, es sensible a variaciones de la temperatura ambiente. Podemos por tanto imaginar un escenario en el que Plc1p actúa como un sensor de temperatura, un termómetro que genera señales en forma de cambios en los niveles de PtdIns(4,5)P₂.

La actividad de Plc1p podría verse regulada por cambios en la fluidez de la membrana plasmática, una propiedad física que depende de su composición química, y de variables externas, entre ellas de la temperatura ambiente, y tener como propósito la homeostasis de dicha propiedad. Es decir, cambios en la fluidez de la membrana podrían generar señales para mantener dicha propiedad lo más estable posible ante el cambio de temperatura del entorno. En efecto, estudios previos han mostrado que diferentes estreses como el estrés osmótico, presión elevada o frío reducen la fluidez de la membrana celular (Laroche y col., 2001). Además, Sln1p-Ypd1p, el osmosensor de la ruta HOG (Maeda y col., 1994), y el único sensor de frío conocido en *S. cerevisiae* (Panadero y col., 2006), responde también a dimetil sulfóxido (DMSO), un agente rigidificante de la membrana plasmática, induciendo la señalización a través de la ruta HOG (Panadero y col., 2006). Por otra parte, investigaciones en *Synechocystis* y bacterias (Los y col., 2013), también en plantas (Saidi y col., 2011; Hováth y col., 2012), indican que distintos sensores, tanto de temperatura como de presión osmótica, son sensibles a cambios en la fluidez de los lípidos de la membrana plasmática. De igual forma, cambios en la fluidez de la membrana podrían facilitar o restringir la accesibilidad de Plc1p a su substrato PtdIns(4,5)P₂, como ha sido descrito en el caso de liposomas (Verstraeten y Oteiza, 2001; Verstraeten y col., 2003), estimulando o deprimiendo rutas de señalización basadas en fosfolípidos. En definitiva, la actividad de Plc1p juega un papel esencial en la respuesta adaptativa a estreses físicos tanto en células animales como en plantas (Horváth y col., 2012) y su regulación frente a cambios en la fluidez de la membrana tiene un significado fisiológico.

La hidrólisis de PtdIns(4,5)P₂ por Plc1p genera DAG y InsP₃. Esta pequeña molécula induce tras su liberación al citosol y su unión a receptores anclados en la membrana del RE, un incremento en los niveles de Ca²⁺ (Mikoshiha, 2007; Berridge, 2009). Sin embargo, fuimos incapaces de detectar cambios en la expresión de un chivato, CDRE::lacZ, regulado por Ca²⁺ (Jiang y Cyert, 1999), en células expuestas a frío. No obstante, razonamos que este resultado podía ser consecuencia del rápido metabolismo de InsP₃, que en levaduras genera InsP₄ e InsP₅ por la acción de la inositol polifosfato multiquinasa Ipk2p, también llamada Arg82p (York y col., 1999; Odom y col., 2000; Lee y col., 2012), o debido a que la perturbación de los niveles de Ca²⁺ fuera demasiado débil para generar una respuesta perceptible en el chivato. Se sabe también que la señalización mediada por InsP₃/Ca²⁺ esta organizada a nivel temporal (oscilaciones de Ca²⁺) y a nivel espacial (Berridge, 2009), lo que podría haber contribuido a nuestra incapacidad para percibir un cambio en los niveles de InsP₃.

en respuesta a frío. Como alternativa, PtdIns(4,5)P₂ podría generar PtdIns(3,4,5)P₃, una reacción que en células de mamíferos cataliza la quinasa PI3K (Cantley, 2002). Sin embargo, no hay evidencias de esta reacción en *S. cerevisiae*, ni se han identificado ortólogos de PI3K en este organismo (Rodríguez-Escudero y col., 2005). Así pues, fijamos nuestra atención en los inositol polifosfatos generados a partir de InsP₆, los llamados difosfoinositol polifosfatos o inositol pirofosfatos (Lee y col., 2012; Wilson y col., 2013). Nuestro estudio puso de manifiesto el incremento de los niveles de 1(3)-InsP₇ en células de la cepa parental expuestas a frío. Esta molécula actúa como un regulador positivo de la expresión de genes dependientes de Pho4p (Schneider y col., 1994; Kaffman y col., 1998), cuya actividad es inhibida por el complejo quinasa Pho80p-Pho85p-Pho81p (Lee y col., 2007; Lee y col., 2008; York y Lew, 2008). Así, la inducción del chivato *PHO89::lacZ* en células transferidas a 12°C sugiere también una inhibición de la actividad de Pho85p en respuesta a frío. Este resultado es relevante pues Pho85p regula la actividad de un buen número de proteínas relacionadas con el metabolismo energético y la biosíntesis (Huang y col., 2007), entre ellas la de Pah1p (Choi y col., 2012), una enzima clave en la homeostasis lipídica (Pascual y Carman, 2013). La generación de señales mediadas por especies de InsP₇ en respuesta a un cambio de fluidez de la membrana plasmática podría tener como propósito la homeostasis de dicha propiedad. Esto es consistente con un posible papel de estas moléculas en la regulación del metabolismo lipídico, pues estos compuestos son determinantes en la arquitectura, organización y propiedades de la membrana. En consonancia con esto, nuestros resultados revelaron que la exposición a frío reduce el contenido de triglicéridos (TAG) e incrementa el de ácido fosfatídico (PA) y el total de fosfolípidos (PL), cambios que se ajustan a lo descrito previamente por otros autores en células de *S. cerevisiae* incubadas a temperatura reducida y a los rasgos característicos de un mutante puntual *pah1Δ* (Han y col., 2006; 2007; Fakas y col., 2011). Además, la ausencia de Inp51p, la cual eleva considerablemente los niveles de 1(3)-InsP₇ a 30°C, o la sobreexpresión de *PLC1*, causó también una reducción importante en el contenido celular de TAG, y en este caso también de fosfatidil colina (PC) y fosfatidil etanolamina (PE), fosfolípidos que pueden ser sintetizados a partir de diacilglicerol DAG a través de la ruta Kennedy (Carman and Han, 2009). Así, tanto la exposición a frío como la interrupción de *INP51* generan un incremento en los niveles de 1(3)-InsP₇ y una aparente reducción en la actividad fosfatasa de PA, que influencia a su vez el contenido de clases y sub-clases de lípidos.

Es obvio del análisis de la composición en lípidos de las cepas analizadas en este estudio que su regulación en respuesta a frío o a la ausencia de Inp51p debe implicar mecanismos y efectores adicionales. Por ejemplo, no se detectan cambios significativos en el contenido de DAG o de ácidos grasos (AG) en los lípidos de la cepa parental tras su exposición a frío, cuando un cambio aislado de la actividad Pah1p debería incrementarlos (Han y col., 2006; 2007; Fakas y col., 2011). Tampoco, el análisis de células del mutante *inp51Δ* pone de manifiesto un aumento en el contenido de PL en esta cepa cuando se compara con la cepa silvestre a 30°C, un cambio previsible dada la mayor disponibilidad de PA para su síntesis vía la ruta CDP-DAG (Rajakumari y col., 2008; Carman y Han, 2009; Pascual y Carman, 2013). Resultados similares fueron también observados en nuestro estudio para células que sobreexpresan *PLC1*. Es posible por tanto que otras especies de fosfatidilinositol fosfatos o de difosfoinositol polifosfatos, estimulados al alza o a la baja por la activación mediada por Plc1p de esta ruta de señalización o por la pérdida de la función fosfatasa de Inp51p, pudieran modular los cambios en la composición lipídica observados en respuesta a frío o en el mutante *inp51Δ* a 30°C. Por ejemplo, el incremento en el contenido de 1(3)-InsP₇ sugiere una elevación simultánea en los niveles de 5-InsP₇. Ambos difosfoinositol polifosfatos son generados a partir del mismo substrato, InsP₆, por la acción de las quinasas Vip1p o Kcs1p, respectivamente (Dubois y col., 2002; Mulugu y col., 2007). Esta posible variación en los niveles de 5-InsP₇, podría ser relevante en la regulación de la composición en lípidos de levadura y en su respuesta a frío.

Recientemente, estudios en células de mamífero han puesto de manifiesto un mecanismo regulador de la señalización de la ruta Akt-mTOR mediado por PtdIns(3,4,5)P₃ y 5-InsP₇ en el que dichas moléculas regulan la fosforilación de Akt/PKB por PDK1 (Chakraborty y col., 2010), el ortólogo en mamíferos de las proteína quinasas Pkh1-3p de levadura (Casamayor y col., 1999). En concreto, altos niveles de 5-InsP₇ inhiben la fosforilación de Akt, regulando a la baja la señalización de la ruta y reduciendo la toma de glucosa, la traducción de proteínas y estimulando la ganancia de peso (Chakraborty y col., 2010). Así, ratones carentes de Kcs1p/IP6K1, exhiben entre otros fenotipos, hipertrofia muscular y elevada resistencia a la obesidad (Nishizawa y col., 2008; Chakraborty y col., 2010). En levaduras, aunque no existe evidencia de la presencia de PtdIns(3,4,5)P₃, se ha descrito que la quinasa Sch9p, la cual comparte una alta identidad de secuencia con las de mamíferos Akt/PKB y S6K, es fosforilada por Pkh1p (Voordeckers y col., 2011), el ortólogo en levadura de PDK1, y diana también de TORC1 (Urban y col., 2007), el principal regulador

del crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (De Virgilio y col., 2006b). La interacción de Pkh1p con PtdIns(3,4)P₂, a través de su dominio PH, mantiene a la quinasa unida a la membrana, cambiando su conformación y permitiendo su interacción con Sch9p (Voordeckers y col., 2011). De manera similar, los niveles de otro fosfoinosítido PtdIns(3,5)P₂ regulan la localización de TORC1 en la vacuola y reclutan a Sch9p para su interacción directa con TORC1 y su fosforilación (Jin y col., 2014). Además, existen evidencias de una conexión entre la actividad TORC1-Sch9p y el metabolismo lipídico. En concreto, se ha descrito una implicación de Sch9p en el catabolismo de TAG en condiciones de supervivencia cronológica (Wei y col., 2009) y es bien conocido el papel regulador del sistema TORC1-Sch9p en los cambios que conducen a la adaptación metabólica durante la fase diauxica (Swinnen y col., 2013), en la que existe una transición desde un predominio en la síntesis de PL a la de TAG (Taylor y Parks, 1979). En definitiva, la alteración de los niveles de PtdIns(4,5)P₂ y de 5-InsP₇ y sus efectos sobre la actividad de Pkh1p y/o del complejo TORC1 podría determinar cambios de importancia en la localización y/o actividad de Sch9p y contribuir así a la regulación mediada por Pah1p.

La idea de una implicación de Pah1p en los cambios en la composición de lípidos de *S. cerevisiae* en respuesta a frío requería evidencias adicionales de la regulación de la actividad fosfatasa de PA bajo estas condiciones. El aumento en los niveles de 1(3)-InsP₇ en la cepa parental a 15°C parecían indicar que esta regulación podía estar mediada por Pho85p. Se sabe que Pah1p, una de las enzimas más reguladas en el metabolismo de lípidos (Pascual y Carman, 2013), es fosforilada por Pho85p-Pho80p (Choi y col., 2012). Esta modificación, reduce la actividad catalítica de la enzima y estimula su disociación de la membrana plasmática del retículo endoplasmático (O'Hara y col., 2006; Choi y col., 2011), dónde se encuentra su sustrato. Consistente con esto, la delección de *PHO85* estimula la asociación de Pah1p a membranas y compensa la ausencia de la actividad fosfatasa mediada por Nem1p (Choi y col., 2012), el más importante factor regulador de la actividad de Pah1p (Pascual y Carman, 2013). Nuestro estudio no revela ningún cambio aparente en la movilidad electroforética de Pah1-myc en respuesta a frío. Tampoco en muestras de cultivos a 30°C fue evidente la resolución de bandas de distinta movilidad que pudieran sugerir la existencia de especies fosforiladas. No obstante, el análisis mediante Western blot reveló un incremento en los niveles de Pah1-myc a 15°C tanto en la cepa parental como en el mutante *inp51Δ*. Se ha descrito que la fosforilación de Pah1p por Pho85p-Pho80p estabiliza la enzima incrementando

su contenido. Así, la ausencia de Pho85p o la substitución de la forma nativa de Pah1p por una mutada no fosforilable conduce a una reducción del 50-60% en la abundancia de la proteína (Choi y col., 2011; 2012). Este incremento en la estabilidad de la enzima podría tener como objeto estimular su actividad en el núcleo y no en el RE. En efecto, se ha descrito una interacción de Pah1p con promotores de genes implicados en la biosíntesis de fosfolípidos (Santos-Rosa y col., 2005; Siniosoglou, 2013). Por tanto, esta regulación tendría un efecto dual, liberando por una parte PA y por otra estimulando la síntesis de la maquinaria biosintética de PL.

Sin embargo, nuestros resultados sugieren una reducción en la actividad de Pho85p y no un incremento, como se desprende del aumento en los niveles de 1(3)-InsP₇ en respuesta a frío. En este sentido, se ha descrito que Pah1p es fosforilada además de por Pho85p, por otras quinasas, entre ellas PKA y Pkc1p (Xu y col., 2012; Su y col., 2012; Pascual and Carman, 2011), cuyo papel funcional en la regulación de Opi1p y en la biosíntesis de fosfolípidos es bien conocido (Carman y Han, 2011). La fosforilación mediada por PKA, en cinco residuos de Pah1p reduce su actividad catalítica y aumenta, como en el caso de Pho85p, su estabilidad (Su y col., 2012). En el caso de Pkc1p, su actividad sobre Pah1p parece inhibir también su actividad aunque se desconocen más detalles sobre sus efectos (Xu y col., 2012). Por otra parte, ambas proteína quinasas, además de Sch9p, son sustrato de las quinasas ancladas a membrana Pkh1-3p (Voordeckers y col., 2011) y por tanto sensibles a las variaciones de los niveles de PtdIns(4,5)P₂ y de sus derivados. Podemos imaginar por tanto un escenario en el que la acción coordinada de todas ellas perfila la composición en lípidos de *S. cerevisiae* en respuesta a frío y a la ausencia de Inp51p.

En resumen, nuestros resultados nos permiten proponer un modelo (Figura D.2) en el que la exposición a frío reduce la fluidez de los lípidos de membrana y estimula el metabolismo de PtdIns(4,5)P₂ por Plc1p. La hidrólisis del fosfoinosítido incrementa la abundancia de sus derivados polifosfato, particularmente de la molécula 1(3)-InsP₇ y probablemente de 5-InsP₇, que regulan la abundancia y actividad de Pah1p y quizás la de otros efectores. En conjunto, estos cambios permiten modular a diferentes niveles la biosíntesis de clases y sub-clases de lípidos y establecer un mecanismo de homeostasis de la fluidez de membrana.

2. Análisis del fenotipo de resistencia a frío del mutante *inp51Δ*: endocitosis y estrategias terapéuticas contra la obesidad

El análisis y caracterización del mutante *inp51Δ* tenía como objeto esclarecer las bases moleculares de su fenotipo de tolerancia a frío, un rasgo previamente identificado y descrito en la bibliografía (Stolz y col., 1998b). Nuestra hipótesis era que la ausencia de Inp51p incrementaba la fluidez de la membrana de *S. cerevisiae*, estimulando la actividad de transportadores anclados en ella. Como alternativa, el fenotipo podía atribuirse a un defecto en el proceso de endocitosis de transportadores de nutrientes, un mecanismo invocado previamente (Stolz y col., 1998b). En este sentido, es bien conocido que el transportador de alta afinidad de triptófano Tat2p es endocitado en respuesta a frío (Abe y Horikoshi, 2000) y que defectos en la maquinaria de ubicuilitación mejoran el crecimiento en frío (Hernández-López y col., 2011). Sin embargo, un estudio de Stefan y col. (2005) apuntaba a la fosfatasa Inp52p, pero no a su homóloga Inp51p, cómo implicada en los efectos de la molécula PtdIns(4,5)P₂ en el proceso de endocitosis. En cualquier caso, una u otra opción explicaban porque los efectos en frío de la delección de *INP51* eran más acusados en cepas Trp⁻ cuyo crecimiento es especialmente sensible a la toma de triptófano (Abe y Horikoshi, 2000).

El mutante *inp51Δ* mostró a 30°C un contenido reducido en lípidos, especialmente en TAG y PL, cuando se compara con la cepa parental. Las células del transformante *pPLCI* también mostraron un contenido graso significativamente inferior. Sin embargo, esta característica no parece estar en la base del fenotipo de tolerancia a frío mostrado por estas cepas, pues como se mencionó, esta condición estimula la biosíntesis de lípidos en todas las cepas analizadas, también en el mutante *inp51Δ*. Éste exhibió además una membrana más rígida que la cepa parental, en consonancia con un menor contenido relativo en ácidos grasos insaturados. Este rasgo aporta protección frente a la toxicidad inducida por la exposición a ácido palmitoleico (C16:1), la cual ha sido atribuida a la sobre-fluidificación de la membrana (Lockshon y col., 2012). De forma similar, un mutante *vip1Δ* exhibe una membrana más rígida y un crecimiento mayor a 15°C que la cepa silvestre. Por el contrario, la pérdida de Hog1p, al igual que la de Slt2p, incrementa la fluidez de la membrana y genera sensibilidad a frío, un fenotipo que es, de nuevo, más pronunciado en cepas Trp⁻ (Panadero y col., 2006; Córcoles-Sáez y col., 2012). En esta línea, conviene recordar que la sobre-expresión de las desaturasas de girasol *FAD2-1*, permite la producción en levadura de ácidos grasos dienólicos,

incrementando notablemente la fluidez de sus membranas. Sin embargo, estos cambios reducen el crecimiento a bajas temperaturas, un fenotipo que es mitigado en cepas Trp^+ (Rodríguez-Vargas y col., 2007).

Nuestros resultados sugieren que un elevado contenido relativo de ácidos grasos insaturados en los lípidos de membrana tiene un efecto negativo sobre el crecimiento en frío de cepas Trp^- de *S. cerevisiae*. Así, este cambio podría ser relevante en la dinámica de endocitosis de Tat2p, tal y como sugiere nuestro análisis de la abundancia de esta proteína en muestras de células de la cepa silvestre y del mutante *inp51Δ* expuestas a frío. No obstante, Hachiro y col. (2013) han descrito recientemente que el destino de Tat2p es regulado por la interacción de su extremo NH_2 terminal con el fosfolípido PS en la cara citoplasmática de la membrana. Existen también evidencias de que los niveles de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ (Stefan y col., 2005) y de 5-InsP_7 (Saiardi y col., 2002) podrían regular el proceso de endocitosis. En efecto, la interacción de Pkh1p con fosfoinosítidos, a través de su dominio PH, podría regular la actividad de la quinasa y por ende la de todo el módulo Pkh1p-Fpk1p, que como se mencionó, controla la asimetría de fosfolípidos de membrana (Muthusamy y col., 2009; López-Marqués y col., 2011). La regulación al alza o a la baja de la actividad flipasa de Dnf1-3p introduciría así cambios en la asimetría de PS estimulando o deprimiendo la endocitosis de Tat2p. En conclusión, cambios en el estado físico de los lípidos de membrana y/o en el contenido de algunas especies moleculares reguladoras podrían ser responsables del fenotipo del mutante *inp51Δ*.

Como se mencionó anteriormente, nuestro estudio revela un importante déficit lipídico en el mutante *inp51Δ* o en el sobreexpresante de *PLC1*, en especial de TAG. Por contra, la ausencia de *HOG1* promueve la acumulación de lípidos en la célula, algo que concuerda con la función inhibidora previamente descrita para su homólogo p38 en lipogénesis hepática (Xiong y col., 2007). En concreto, el bloqueo de p38 da lugar a hipertrigliceridemia e hígado graso (Xiong y col., 2007). Recientemente, Subramanian y col. (2013), han descrito también en *Drosophila melanogaster* una homeostasis lipídica alterada en mutantes defectivos en el receptor de InsP_3 , que da lugar a obesidad. Por tanto, este estudio identifica a $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ como un importante modulador de la biosíntesis de lípidos y sugiere que la inhibición de la actividad fosfatasa de Inp51p o la activación de Plc1p podrían ser dianas terapéuticas para el diseño de drogas en el tratamiento de desórdenes lipídicos.

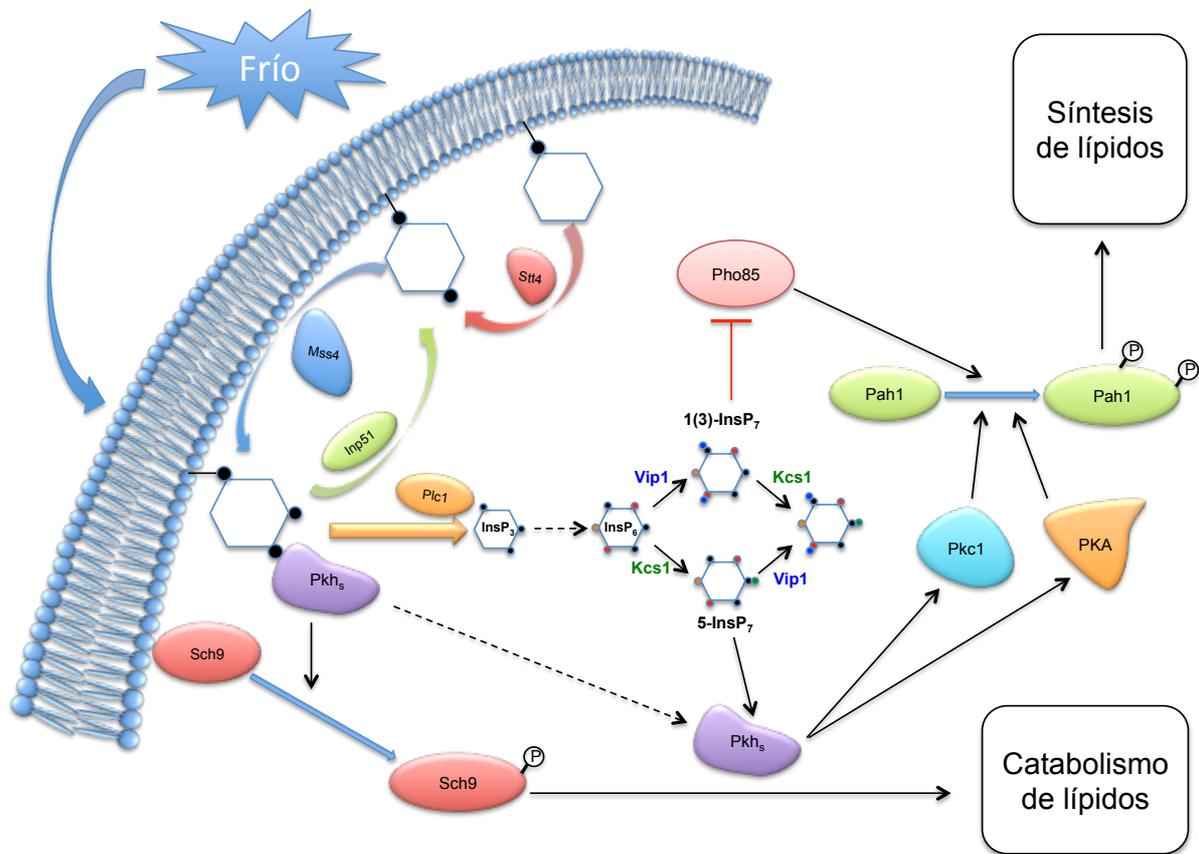
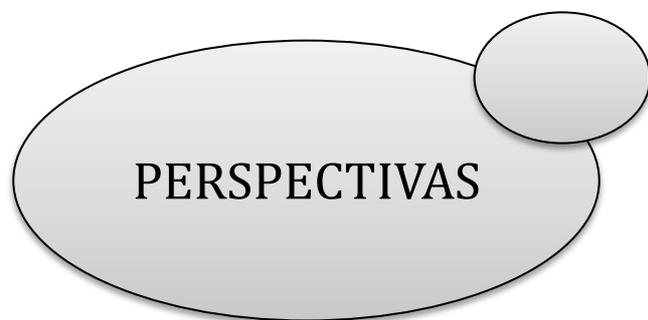


Figura D.2. Modelo de regulación del metabolismo lipídico mediado por PtdIns(4,5)P₂ e inosítoles fosfato, ante el descenso de la temperatura.



En este trabajo nos hemos centrado en el estudio de los mecanismos de percepción y señalización en respuesta a frío y su implicación en la adaptación de *S. cerevisiae* a estas condiciones. En este sentido, hemos demostrado que la ruta de integridad de la pared celular es sensible a estos cambios y que elementos de la misma son requeridos para hacer frente a un descenso de la temperatura del entorno. Nuestros resultados indican que los sensores de la familia WSC participan en la detección del estímulo y que el módulo de MAPKs es necesario para la transmisión de la señal. Sin embargo, no queda claro cómo la señal es capaz de llegar hasta la MAPKKK Bck1p sin la activación aparente de la quinasa Pkc1p.

Resultó también sorprendente no encontrar la activación de un programa transcripcional dependiente de Slt2p en respuesta a frío. Además, sus principales dianas, el complejo SBF y/o Fks2p no responden a la activación de la ruta provocada por un descenso de la temperatura. Sin embargo la ausencia de *SWI4*, generó de forma específica un claro fenotipo de sensibilidad a baja temperatura, sugiriendo un papel en la adaptación a dicha condición, independiente de la activación de la ruta CWI. Por tanto, es necesario un análisis pormenorizado de los mecanismos que controlan la actividad de Swi4p en respuesta a frío e identificar que dianas controla este efector.

Diversos resultados presentados en este trabajo evidencian la importancia de la reducción de la actividad PKA en la tolerancia a frío de la levadura. No obstante, cuando estudiamos la implicación de los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p, que regulan la respuesta general a estrés y cuya actividad está regulada por PKA (Estruch, 2000), no observamos respuesta alguna. Por tanto sería interesante un estudio más profundo de las posibles dianas controladas por PKA bajo estas condiciones. La actividad de PKA en frío, parece estar controlada de forma directa por la activación de la MAPK Slt2p e indirectamente por la actividad de Sch9p, una conocida diada del complejo TORC1 (Urban y col., 2007). Sin embargo, no conocemos cómo el descenso en la temperatura del entorno modula la actividad del complejo TORC1-Sch9p y por ende la de PKA tanto a través de elementos de la ruta CWI como de forma independiente.

Por otra parte llevamos a cabo una búsqueda de supresores en multicopia del defecto de crecimiento a 12°C del mutante *slt2Δ*, la cual identificó al gen *EMWI*, un gen esencial implicado en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Sipling y col., 2011).

Durante este trabajo tratamos de buscar una conexión molecular y fisiológica de Emw1p y Slt2p en el crecimiento de *S. cerevisiae* a baja temperatura. Nuestros resultados sugieren que Emw1p es una fosfoproteína y que su nivel de fosforilación está regulado en respuesta a frío. Más aún, aportamos evidencias de la posible implicación de Slt2p y de la proteína fosfatasa Ptc1p en la regulación del nivel de fosforilación. No obstante, estamos todavía muy lejos de entender la implicación de Emw1p en los mecanismos de adaptación a frío y de su conexión con la ruta CWI. La observación de que un alto número de copias de *BCY1* o de *EMW1* alivia el defecto de un mutante *slt2Δ* sugiere que Emw1p podría funcionar como un regulador directo o indirecto de la actividad PKA.

Son múltiples los resultados que apuntan a variaciones a nivel de la membrana plasmática como la señal primaria de un descenso de la temperatura en *S. cerevisiae*. En este sentido, se presentan evidencias en este trabajo de la participación de Plc1p en la movilización de PtdIns(4,5)P₂ en respuesta a frío, sugiriendo que esta proteína funciona como un sensor de frío. Obviamente la explicación más plausible de esta función es que la actividad de PLC1 es regulada por la fluidez de los lípidos de su entorno, la cual cambia en respuesta a frío. Resultados preliminares utilizando DMSO, un agente que reduce la fluidez de los lípidos de la membrana plasmática indican una reducción de los niveles de PtdIns(4,5)P₂ en células expuestas a este compuesto. No obstante, son necesarios nuevas aproximaciones y trabajo experimental para poder confirmar y entender a nivel molecular la relación causa-efecto entre la actividad de Plc1p u la fluidez de los lípidos.

Por otra parte, hemos observado que un descenso en la temperatura ambiente aumenta los niveles de 1(3)-InsP₇, la abundancia de Pah1p, la fosfatasa de ácido fosfatídico, y regula a la baja los niveles de TAG a favor de un mayor contenido en PA y sobre todo en PL. Dado el papel clave de los PL en la fluidez de la membrana, la regulación de la actividad de Pah1p y los cambios observados en la composición de lípidos parecen destinados a compensar en parte la rigidificación debida a una menor temperatura del entorno, constituyendo así un mecanismo de homeostasis de la fluidez de la membrana plasmática. En este sentido, necesitamos clarificar diferentes aspectos del mecanismo de regulación de Pah1p, una proteína compleja, fosforilada por diferentes quinasas y cuya actividad depende de su localización. A esto se une una correlación inversa entre su abundancia y su actividad y su posible funcionalidad como regulador transcripcional de genes implicados en la biosíntesis de PL.

El análisis de la composición lipídica de las cepas ensayadas, nos permitió observar que tanto el mutante *inp51Δ* como el sobreexpresante *pPLC1* contienen un reducido contenido en lípidos totales y TAG. Por tanto, nuestros estudios, identifican al PtdIns(4,5)P₂ como un importante modulador de la biosíntesis de lípidos y abren un posible campo de estudio que sitúa a la fosfatasa Inp51p y a la fosfolipasa Plc1p como dianas para el diseño de fármacos que inhiban el metabolismo lipídico para tratar desordenes relacionados con el mismo. Sin embargo quedan en el aire diversas cuestiones a cerca de la importancia de la ausencia de Inp51p en la tolerancia a bajas temperaturas de una cepa silvestre. Como se ha descrito en este trabajo, la ausencia de *INP51*, tiene como consecuencia la rigidificación de la membrana plasmática, lo contrario que cabría esperar para una cepa que se adapta al descenso térmico a través del incremento en la fluidez de la membrana. Como se especula en el presente trabajo, quizás esta rigidificación, dificulta la endocitosis y por tanto la pérdida de ciertos transportadores y otras proteínas de membrana importantes para el crecimiento celular. Por tanto, resultaría interesante el estudio de la alteración de la composición y funcionalidad de este repertorio proteico a nivel de membrana plasmática.

Finalmente sería interesante el estudio de la alteración de los niveles de otros fosfoinosítidos o difosfoinositol fosfatos bien por la activación de Plc1p o bien por la ausencia de Inp51p, que puedan modular cambios en la composición lipídica observados tanto a bajas temperaturas como en el mutante *inp51Δ*. Nuestros resultados apuntan a la molécula 5-InsP₇ y al módulo Pkh-Ypk-Sch9 como posibles actores en la regulación de los cambios observados en la composición de lípidos de *inp51Δ* a 30°C. Experimentos preliminares en nuestro laboratorio confirman esta idea, aunque todavía estamos lejos de un conocimiento de la implicación de estos cambios en la respuesta a frío.



**CONCLUSIONES
GENERALES**

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

- La ruta de integridad de la pared celular es sensible a un descenso de la temperatura del entorno y juega un papel clave en el mecanismo de adaptación de *S. cerevisiae* a frío.
- La activación de Slt2p en respuesta a frío no desencadena la inducción de un programa transcripcional específico dependiente de típicos factores transcripcionales regulados por la MAPK. Por contra, Slt2p parece jugar un papel clave en la regulación del módulo de quinasas TORC1-PKA, cuya actividad controla el crecimiento de *S. cerevisiae* en respuesta a la disponibilidad de nutrientes.
- El aumento del número de copias de los genes *BCY1* y *EMW1* suprime el defecto de crecimiento a bajas temperaturas del mutante *slt2Δ*, sugiriendo su conexión funcional con la actividad de PKA.
- El descenso de la temperatura dispara un mecanismo de señalización a través de la ruta de fosfoinosítidos y fosfoinositoles fosfato de *S. cerevisiae*. En este proceso participan Plc1p y quinasas de inositoles fosfato, que elevan el contenido de derivados InsP₇, lo que regula la actividad de la fosfatasa de ácido fosfatídico Pah1p, el contenido lipídico de la célula y la fluidez de su membrana plasmática.
- La ausencia de la fosfatasa Inp51p en *S. cerevisiae*, reduce los niveles de fosfolípidos, en particular de diglicéridos y triglicéridos, y rigidifica su membrana plasmática con respecto a su correspondiente cepa parental. Estas características parecen provocar un defecto en la endocitosis de transportadores de triptófano, lo que justificaría en fenotipo de tolerancia a frío de este mutante.



Tabla A.1. Genes reprimidos a 12°C en el mutante *slt2Δ*. Se indica la ORF, el nombre del gen, el número de veces reprimido en el mutante *slt2Δ* con respecto a su cepa parental y la descripción de las proteínas que codifican. Las ORF marcadas en gris se corresponden con los genes agrupados por GORILLA en el grupo funcional “Cell wall organization or biogénesis” (GO:0071554) con un p-value de 6,23E-10.

ORF	Gen	<i>slt2 v</i> <i>s. wt</i>	Descripción
YIL176C	<i>PAU14</i>	0,75	Proteína de función desconocida, miembro de la familia de las seripauperinas codificada principalmente en las regiones subtelerómicas; idéntica a Pau1p
YER130C	---	0,75	Función desconocida
YDR420W	<i>HKR1</i>	0,75	Miembro de la familia de las mucinas, funciona como un osmosensor en la rama Sho1p de la ruta HOG junto con Msb2p
YDL156W	---	0,75	Función desconocida
YLR063W	---	0,74	Función desconocida
YGR142W	<i>BTN2</i>	0,74	Proteína de unión a v-SNARE que facilita la recuperación de proteínas específicas de un endosoma tardío al aparato de Golgi
YCR059C	<i>YIH1</i>	0,74	Proteína que inhibe la activación de Gcn2, compitiendo por su unión a Gcn1p
YLR332W	<i>MID2</i>	0,74	Proteína de membrana plasmática O-glicosilada que actúa como sensor de la ruta de integridad de la pared celular
YOL159C	---	0,74	Función desconocida
YEL058W	<i>PCMI</i>	0,74	Mutasa de N-acetilglucosamina-foosfatasa esencial
YKL071W	---	0,73	Función desconocida
YLR205C	<i>HMX1</i>	0,73	Oxigenasa de hemo localizada en RE
YPR124W	<i>CTR1</i>	0,72	Transportador de cobre de alta afinidad de membrana plasmática
YPL089C	<i>RLM1</i>	0,72	Factor de transcripción MADS-box, componente de la ruta de MAPKs mediada por protein quinasa C
YOL159C-A	---	0,71	Función desconocida
YAL053W	<i>FLC2</i>	0,71	Posible transportador de FAD; requerido para captar FAD hacia el RE; involucrado en el mantenimiento de la pared celular.
YNL246W	<i>VPS75</i>	0,71	Chaperona de histonas de la familia NAP
YBL101W-A	---	0,71	Función desconocida
YIL122W	<i>POG1</i>	0,71	Posible activador transcripcional que promueve la recuperación tras una parada del crecimiento inducida por feromonas; regulada por SBF
YDR261C	<i>EXG2</i>	0,71	Exo-1,3-beta-glucanasa, involucrada en el ensamblaje del beta-glucano
YJL043W	---	0,70	Función desconocida
YMR104C	<i>YPK2</i>	0,70	Proteína quinasa con similitud a la serin/treonin quinasa Ypk1p
YJL159W	<i>HSP150</i>	0,70	Proteína de <i>heat shock</i> O-manosilada que es secretada y unida covalentemente y por puentes disulfuro a la pared celular a través del beta-1,3-glucano
YAR010C	---	0,70	Función desconocida
YMR095C	<i>SNO1</i>	0,69	Proteína de función no confirmada involucrada en el metabolismo de piridoxina
YJL108C	<i>PRM10</i>	0,69	Proteína regulada por feromonas
YLR461W	<i>PAU4</i>	0,69	Proteína de función desconocida, miembro de la familia multigénica de las seripauperinas, codificada principalmente en regiones subtelerómicas
YBR071W	---	0,68	Función desconocida

YPL088W	---	0,68	Función desconocida
YJL106W	<i>IME2</i>	0,67	Serin/treonin protein quinasa involucrada en la activación de la meiosis
YAL068C	<i>PAU8</i>	0,67	Proteína de función desconocida, miembro de la familia multigénica de las seripauperinas, condificada principalmente en regiones subteloméricas
YOR382W	<i>FIT2</i>	0,67	Manoproteína que es incorporada a la pared celular a través de anclaje a glicosilfosfatidilinositol (GPI)
YOR134W	<i>BAG7</i>	0,67	Proteína activadora de la GTPase Rho (RhoGAP), estimula la actividad intrínseca de Rho1
YNL058C	---	0,67	Función desconocida
YOR208W	<i>PTP2</i>	0,66	Proteína fosfatasa de fosfotirosinas involucrada en la inactivación de MAPKs
YBR093C	<i>PHO5</i>	0,66	Fosfatasa ácida reprimible (1 de 3)
YGR023W	<i>MTL1</i>	0,65	Sensor de membrana
YOR383C	<i>FIT3</i>	0,65	Manoproteína incorporada a la pared celular a través de glicosilfosfatidilinositol (GPI)
YGR189C	<i>CRH1</i>	0,65	Transglicosilasa de quitina que actúa en la transferencia de quitina de beta(1-6) a beta(1-3) glucanos en la pared celular
YFL067W	---	0,64	Función desconocida
YGL255W	<i>ZRT1</i>	0,63	Transportador de zinc de alta afinidad de la membrana plasmática
YMR182C	<i>RGM1</i>	0,62	Posible represor transcripcional con dedos de zinc ricos en prolina
YPR194C	<i>OPT2</i>	0,62	Transportador de oligopéptidos; miembro de la familia OPT
YOL154W	<i>ZPS1</i>	0,62	Posible proteína anclada a GPI cuya transcripción es inducida bajo condiciones de escasez de zinc
YLR121C	<i>YPS3</i>	0,60	Aspartato proteasa, miembro de la familia yapsina de proteasas, relacionadas con el crecimiento y mantenimiento de la pared celular
YIL169C	<i>HPF1</i>	0,59	Manoproteína protectora
YKL096W	<i>CWPI</i>	0,59	Manoproteína de pared celular que se localiza en la cicatriz de la célula hija
YDR085C	<i>AFR1</i>	0,54	Proteína requerida para la formación del <i>shmoo</i> inducido por feromonas
YDR055W	<i>PST1</i>	0,53	Proteína de pared celular que contiene un sitio de anclaje a GPI
YHR209W	<i>CRG1</i>	0,44	Presunta metiltransferasa dependiente de S-adenosilmetionina
YLR194C	---	0,43	Función desconocida
YKL161C	<i>KDX1</i>	0,41	Proteína quinasa implicada en la ruta de integridad de la pared celular
YKL163W	<i>PIR3</i>	0,24	Proteína O-glicosilada unida covalentemente a la pared celular
YIL117C	<i>PRM5</i>	0,23	Proteína regulada por feromonas
YKR091W	<i>SRL3</i>	0,21	Proteína citoplasmática que cuando es sobreexpresada, suprime la letalidad de una mutación nula <i>rad53</i>
YHR030C	<i>SLT2</i>	0,01	Serin/treonin MAPK involucrada en la regulación del mantenimiento de la pared celular y la progresión a través del ciclo celular



BIBLIOGRAFÍA

- Abe F., Horikoshi K. (2000)** Tryptophan permease gene TAT2 confers high-pressure growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 20(21):8093-102.
- Aguilera J., Rodríguez-Vargas S., Prieto J.A. (2005)** The HOG MAP kinase pathway is required for the induction of methylglyoxal-responsive genes and determines methylglyoxal resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 56(1):228-39.
- Aguilera J., Rande-Gil F., Prieto J.A. (2007)** Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: new functions for old mechanisms. *FEMS Microbiol Rev.* 31(3):327-41.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., Lipman D.J. (1997)** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25(17):3389-402.
- Ariño J., Casamayor A., González A. (2011)** Type 2C protein phosphatases in fungi. *Eukaryot Cell.* 10(1):21-33.
- Athenstaedt K., Daum G. (1997)** Biosynthesis of phosphatidic acid in lipid particles and endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 179(24):7611-6.
- Audhya A., Foti M., Emr S. (2000)** Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Molecular Biology of the Cell.* 11:2673-89.
- Audhya A., Emr S.D. (2002)** Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1- mediated MAP kinase cascade. *Developmental Cell.* 2:593-605.
- Audhya A., Emr S.D. (2003)** Regulation of PI4,5P2 synthesis by nuclear-cytoplasmic shuttling of the Mss4 lipid kinase. *Embo Journal.* 22:4223-36.
- Audhya A., Loewith R., Parsons A.B., Gao L., Tabuchi M., Zhou H., Boone C., Hall M.N., Emr S.D. (2004)** Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P2 effectors that regulate the actin cytoskeleton. *Embo Journal.* 23:3747-3757.
- Baetz K., Moffat J., Haynes J., Chang M., Andrews B. (2001)** Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol.* 21(19):6515-28.
- Beese S.E., Negishi T., Levin D.E. (2009)** Identification of positive regulators of the yeast fps1 glycerol channel. *PLoS Genet.* 5(11):e1000738.
- Bermejo C., Rodríguez E., García R., Rodríguez-Peña J.M., Rodríguez de la Concepción M.L., Rivas C., Arias P., Nombela C., Posas F., Arroyo J. (2008)** The sequential activation of the yeast HOG and SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. *Mol Biol Cell.* 19(3):1113-24.
- Bermejo C., García R., Straede A., Rodríguez-Peña J.M., Nombela C., Heinisch J.J., Arroyo J. (2010)** Characterization of sensor-specific stress response by transcriptional profiling of *wsc1* and *mid2* deletion strains and chimeric sensors in *Saccharomyces cerevisiae*. *OMICS.* 14(6):679-88.
- Berridge M.J. (2009)** Inositol trisphosphate and calcium signalling mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 1793(6):933-40.
- Bhandari R., Saiardi A., Ahmadibeni Y., Snowman A.M., Resnick A.C., Kristiansen T.Z., Molina H., Pandey A., Werner J.K. Jr, Juluri K.R., Xu Y., Prestwich G.D., Parang K., Snyder S.H. (2007)** Protein pyrophosphorylation by inositol pyrophosphates is a posttranslational event. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(39):15305-10.
- Birnboim H.C., Doly J. (1979)** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7(6):1513-23.
- Bligh E.G., Dyer W.J. (1959)** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.* 37(8):911-7.

- Blom N., Sicheritz-Ponten T., Gupta R., Gammeltoft S., Brunak S. (2004)** Prediction of post-translational glycosylation and phosphorylation of proteins from the amino acid sequence. *Proteomics*. 4(6):1633-49.
- Bolger T.A., Folkmann A.W., Tran E.J., Wente S.R. (2008)** The mRNA export factor Gle1 and inositol hexakisphosphate regulate distinct stages of translation. *Cell*. 134(4):624-33.
- Bonilla M., Cunningham K.W. (2003)** Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca²⁺ signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell*. 14(10):4296-305.
- Borkovich K.A., Farrelly F.W., Finkelstein D.B., Taulien J., Lindquist S. (1989)** hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures. *Mol Cell Biol*. 9(9):3919-30.
- Broek D., Samiy N., Fasano O., Fujiyama A., Tamanoi F., Northup J., Wigler M. (1985)** Differential activation of yeast adenylate cyclase by wild-type and mutant RAS proteins. *Cell*. 41(3):763-9.
- Brose N., Rosenmund C. (2002)** Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J Cell Sci*. 115(Pt 23):4399-411.
- Bryan B.A., Knapp G.S., Bowen L.M., Polymenis M. (2004)** The UV response in *Saccharomyces cerevisiae* involves the mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Curr Microbiol*. 49(1):32-4.
- Buehrer B.M., Errede B. (1997)** Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 17(11):6517-25.
- Cabib E., Drgonová J., Drgon T. (1998)** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem*. 67:307-33.
- Cannon J.F., Tatchell K. (1987)** Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding subunits of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol*. 7(8):2653-63.
- Cantley L.C. (2002)** The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science*. 296(5573):1655-7.
- Cao-Hoang L., Dumont F., Marechal P.A., Le-Thanh M., Gervais P. (2008)** Rates of chilling to 0 degrees C: implications for the survival of microorganisms and relationship with membrane fluidity modifications. *Appl Microbiol Biotechnol*. 77(6):1379-87.
- Cappellaro C., Baldermann C., Rachel R., Tanner W. (1994)** Mating type-specific cell-cell recognition of *Saccharomyces cerevisiae*: cell wall attachment and active sites of α - and α -agglutinin. *EMBO J*. 13(20):4737-44.
- Carman G.M., Han G.S. (2009)** Phosphatidic acid phosphatase, a key enzyme in the regulation of lipid synthesis. *J Biol Chem*. 284(5):2593-7.
- Carman G.M., Han G.S. (2011)** Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Biochem*. 80:859-83.
- Carman G.M., Henry S.A. (2007)** Phosphatidic acid plays a central role in the transcriptional regulation of glycerophospholipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 282(52):37293-7.
- Carr C.M., Grote E., Munson M., Hughson F.M., Novick P.J. (1999)** Sec1p binds to SNARE complexes and concentrates at sites of secretion. *J Cell Biol*. 146(2):333-44.
- Casagrande V., Del Vescovo V., Militti C., Mangiapelo E., Frontali L., Negri R., Bianchi M.M. (2009)** Cesium chloride sensing and signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: an interplay among the HOG and CWI MAPK pathways and the transcription factor Yaf9. *FEMS Yeast Res*. 9(3):400-10.
- Casamayor A., Torrance P.D., Kobayashi T., Thorner J., Alessi D.R. (1999)** Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr Biol*.

- 9(4):186-97.
- Chakraborty A., Koldobskiy M.A., Bello N.T., Maxwell M., Potter J.J., Juluri K.R., Maag D., Kim S., Huang A.S., Dailey M.J., Saleh M., Snowman A.M., Moran T.H., Mezey E., Snyder S.H. (2010)** Inositol pyrophosphates inhibit Akt signaling, thereby regulating insulin sensitivity and weight gain. *Cell*. 143(6):897-910.
- Chen M., Hancock L.C., Lopes J.M. (2007)** Transcriptional regulation of yeast phospholipid biosynthetic genes. *Biochim Biophys Acta*. 1771(3):310-21.
- Chen R.E., Thorner J. (2007)** Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1773(8):1311-40.
- Chen X.H., Xiao Z., Fitzgerald-Hayes M. (1994)** SCM2, a tryptophan permease in *Saccharomyces cerevisiae*, is important for cell growth. *Mol Gen Genet*. 244(3):260-8.
- Chen Y., Feldman D.E., Deng C., Brown J.A., De Giacomo A.F., Gaw A.F., Shi G., Le Q.T., Brown J.M., Koong A.C. (2005)** Identification of mitogen-activated protein kinase signaling pathways that confer resistance to endoplasmic reticulum stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cancer Res*. 3(12):669-77.
- Choi H.S., Su W.M., Morgan J.M., Han G.S., Xu Z., Karanasios E., Siniosoglou S., Carman G.M. (2011)** Phosphorylation of phosphatidate phosphatase regulates its membrane association and physiological functions in *Saccharomyces cerevisiae*: identification of SER(602), THR(723), AND SER(744) as the sites phosphorylated by CDC28 (CDK1)-encoded cyclin-dependent kinase. *J Biol Chem*. 286(2):1486-98.
- Choi H.S., Su W.M., Han G.S., Plote D., Xu Z., Carman G.M. (2012)** Pho85p-Pho80p phosphorylation of yeast Pah1p phosphatidate phosphatase regulates its activity, location, abundance, and function in lipid metabolism. *J Biol Chem*. 287(14):11290-301.
- Claret S., Gatti X., Doignon F., Thoraval D., Crouzet M. (2005)** The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*. 4(8):1375-86.
- Córcoles-Sáez I., Ballester-Tomas L., de la Torre-Ruiz M.A., Prieto J.A., Rande-Gil F. (2012)** Low temperature highlights the functional role of the cell wall integrity pathway in the regulation of growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J*. 446(3):477-88.
- Cozier G.E., Carlton J., Bouyoucef D., Cullen P.J. (2004)** Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol*. 282:49-88.
- Crespo J.L., Hall M.N. (2002)** Elucidating TOR signaling and rapamycin action: lessons from *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 66(4):579-91.
- Daum G., Lees N.D., Bard M., Dickson R. (1998)** Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14(16):1471-510.
- Davenport K.R., Sohaskey M., Kamada Y., Levin D.E., Gustin M.C. (1995)** A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem*. 270(50):30157-61.
- D'Angelo G., Vicinanza M., Di Campli A., De Matteis M.A. (2008)** The multiple roles of PtdIns(4)P -- not just the precursor of PtdIns(4,5)P₂. *J Cell Sci*. 121(Pt 12):1955-63.
- de la Torre-Ruiz M.A., Mozo-Villarías A., Pujol N., Petkova M.I. (2010)** How budding yeast sense and transduce the oxidative stress signal and the impact in cell growth and morphogenesis. *Curr Protein Pept Sci*. 11(8):669-79.
- de Nobel H., van Den Ende H., Klis F.M. (2000)** Cell wall maintenance in fungi. *Trends Microbiol*. 8(8):344-5.

- De Virgilio C., Hottiger T., Dominguez J., Boller T., Wiemken A. (1994)** The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem.* 219(1-2):179-86.
- De Virgilio C., Loewith R. (2006)** The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol.* 38(9):1476-81.
- De Virgilio C., Loewith R. (2006b)** Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene.* 25(48):6392-415.
- Delley P.A., Hall M.N. (1999)** Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J Cell Biol.* 147(1):163-74.
- Desai P., Guha N., Galdieri L., Hadi S., Vancura A. (2009)** Plc1p is required for proper chromatin structure and activity of the kinetochore in *Saccharomyces cerevisiae* by facilitating recruitment of the RSC complex. *Mol Genet Genomics.* 281(5):511-23.
- Desrivieres S., Cooke F.T., Parker P.J., Hall M.N. (1998)** MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 273(25):15787-93.
- Dodou E., Treisman R. (1997)** The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 17(4):1848-59.
- Donzeau M., Bourdineaud J.P., Lauquin G.J. (1996)** Regulation by low temperatures and anaerobiosis of a yeast gene specifying a putative GPI-anchored plasma membrane protein. *Mol Microbiol.* 20(2):449-59.
- Draskovic P., Saiardi A., Bhandari R., Burton A., Ilc G., Kovacevic M., Snyder S.H., Podobnik M. (2008)** Inositol hexakisphosphate kinase products contain diphosphate and triphosphate groups. *Chem Biol.* 15(3):274-86.
- Du Y., Walker L., Novick P., Ferro-Novick S. (2006)** Ptc1p regulates cortical ER inheritance via Slt2p. *EMBO J.* 25(19):4413-22.
- Dubois E., Scherens B., Vierendeels F., Ho M.M., Messenguy F., Shears S.B. (2002)** In *Saccharomyces cerevisiae*, the inositol polyphosphate kinase activity of Kcs1p is required for resistance to salt stress, cell wall integrity, and vacuolar morphogenesis. *J Biol Chem.* 277(26):23755-63.
- Eden E., Navon R., Steinfeld I., Lipson D., Yakhini Z. (2009)** GOrilla: a tool for discovery and visualization of enriched GO terms in ranked gene lists. *BMC Bioinformatics.* 10:48. doi: 10.1186/1471-2105-10-48.
- Estruch F. (2000)** Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev.* 24(4):469-86.
- Fakas S., Qiu Y., Dixon J.L., Han G.S., Ruggles K.V., Garbarino J., Sturley S.L., Carman G.M. (2011)** Phosphatidate phosphatase activity plays key role in protection against fatty acid-induced toxicity in yeast. *J Biol Chem.* 286(33):29074-85.
- Fuchs B.B., Mylonakis E. (2009)** Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell.* 8(11):1616-25.
- Furukawa K., Hohmann S. (2013)** Synthetic biology: lessons from engineering yeast MAPK signalling pathways. *Mol Microbiol.* 88(1):5-19.
- Gallego C., Garí E., Colomina N., Herrero E., Aldea M. (1997)** The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.* 16(23):7196-206.
- Garcés R., Mancha M. (1993)** One-step lipid extraction and fatty acid methyl esters preparation from fresh plant tissues. *Anal Biochem.* 211(1):139-43.

- García P., Tajadura V., Sanchez Y. (2009)** The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell.* 20(2):721-31.
- García R., Bermejo C., Grau C., Pérez R., Rodríguez-Peña J.M., Francois J., Nombela C., Arroyo J. (2004)** The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem.* 279(15):15183-95.
- García R., Rodríguez-Peña J.M., Bermejo C., Nombela C., Arroyo J. (2009)** The high osmotic response and cell wall integrity pathways cooperate to regulate transcriptional responses to zymolyase-induced cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 284(16):10901-11.
- García-Rodríguez L.J., Durán A., Roncero C. (2000)** Calcofluor antifungal action depends on chitin and a functional high-osmolarity glycerol response (HOG) pathway: evidence for a physiological role of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG pathway under noninducing conditions. *J Bacteriol.* 182(9):2428-37.
- García-Rodríguez L.J., Valle R., Durán A., Roncero C. (2005)** Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett.* 579(27):6186-90.
- Gardocki M.E., Jani N., Lopes J.M. (2005)** Phosphatidylinositol biosynthesis: biochemistry and regulation. *Biochim Biophys Acta.* 1735(2):89-100.
- Gatti X., de Bettignies G., Claret S., Doignon F., Crouzet M., Thoraval D. (2005)** RGD1, encoding a RhoGAP involved in low-pH survival, is an Msn2p/Msn4p regulated gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 351:159-69.
- Gericke A., Leslie N.R., Lösche M., Ross A.H. (2013)** PtdIns(4,5)P₂-mediated cell signaling: emerging principles and PTEN as a paradigm for regulatory mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 991:85-104.
- Gietz R.D., 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):527-34.
- Goldstein A.L., McCusker J.H. (1999)** Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 15(14):1541-53.
- González A., Ruiz A., Serrano R., Ariño J., Casamayor A. (2006)** Transcriptional profiling of the protein phosphatase 2C family in yeast provides insights into the unique functional roles of Ptc1. *J Biol Chem.* 281(46):35057-69.
- Gorelik M., Stanger K., Davidson A.R. (2011)** A Conserved residue in the yeast Bem1p SH3 domain maintains the high level of binding specificity required for function. *J Biol Chem.* 286(22):19470-7.
- Green R., Lesage G., Sdicu A.M., Ménard P., Bussey H. (2003)** A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology.* 149(Pt 9):2487-99.
- Griffioen G., Anghileri P., Imre E., Baroni M.D., Ruis H. (2000)** Nutritional control of nucleocytoplasmic localization of cAMP-dependent protein kinase catalytic and regulatory subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 275(2):1449-56.
- Guha N., Desai P., Vancura A. (2007)** Plc1p is required for SAGA recruitment and derepression of Sko1p-regulated genes. *Mol Biol Cell.* 18(7):2419-28.
- Guo W., Roth C., Walch-Solimena C., Novick P. (1999)** The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *Embo Journal.* 18:1071-1080.
- Guo S., Shen X., Yan G., Ma D., Bai X., Li S., Jiang Y. (2009)** A MAP kinase dependent feedback mechanism controls Rho1 GTPase and actin distribution in yeast. *PLoS One.* 4(6):e6089.

- Hachiro T., Yamamoto T., Nakano K., Tanaka K. (2013)** Phospholipid flippases Lem3p-Dnf1p and Lem3p-Dnf2p are involved in the sorting of the tryptophan permease Tat2p in yeast. *J Biol Chem.* 288(5):3594-608.
- Hahn J.S., Thiele D.J. (2002)** Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem.* 277(24):21278-84.
- Halachmi N., Lev Z. (1996)** The Sec1 family: a novel family of proteins involved in synaptic transmission and general secretion. *J Neurochem.* 66(3):889-97.
- Hammond G.R., Fischer M.J., Anderson K.E., Holdich J., Koteci A., Balla T., Irvine R.F. (2012)** PI4P and PI(4,5)P2 are essential but independent lipid determinants of membrane identity. *Science.* 337(6095):727-30.
- Hampsey M. (1997)** A review of phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 13(12):1099-133.
- Han G.S., Audhya A., Markley D.J., Emr S.D., Carman G.M. (2001)** The *Saccharomyces cerevisiae* *LSB6* Gene Encodes Phosphatidylinositol 4-Kinase Activity. *Journal of Biological Chemistry.* 277:47709-47718.
- Han G.S., Wu W.I., Carman G.M. (2006)** The *Saccharomyces cerevisiae* Lipin homolog is a Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase enzyme. *J Biol Chem.* 281(14):9210-8.
- Han G.S., Siniosoglou S., Carman G.M. (2007)** The cellular functions of the yeast lipin homolog PAH1p are dependent on its phosphatidate phosphatase activity. *J Biol Chem.* 282(51):37026-35.
- Han G.S., O'Hara L., Siniosoglou S., Carman G.M. (2008)** Characterization of the yeast DGK1-encoded CTP-dependent diacylglycerol kinase. *J Biol Chem.* 283(29):20443-53.
- Harrison J.C., Bardes E.S., Ohya Y., Lew D.J. (2001)** A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat Cell Biol.* 3(4):417-20.
- Harrison J.C., Zyla T.R., Bardes E.S., Lew D.J. (2004)** Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J Biol Chem.* 279(4):2616-22.
- Hatch A.J., York J.D. (2010)** SnapShot: Inositol phosphates. *Cell.* 143(6):1030-1030.
- Hay J.C., Scheller R.H. (1997)** SNAREs and NSF in targeted membrane fusion. *Curr Opin Cell Biol.* 9(4):505-12.
- Hayashi M., Maeda T. (2006)** Activation of the HOG pathway upon cold stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biochem.* 139(4):797-803.
- Hazel J.R., Williams E.E. (1990)** The role of alterations in membrane lipid composition in enabling physiological adaptation of organisms to their physical environment. *Prog Lipid Res.* 29(3):167-227.
- Heinisch J.J. (2005)** Baker's yeast as a tool for the development of antifungal kinase inhibitors--targeting protein kinase C and the cell integrity pathway. *Biochim Biophys Acta.* 1754(1-2):171-82.
- Heinisch J.J., Dufre ne Y.F. (2010)** Is there anyone out there?--Single-molecule atomic force microscopy meets yeast genetics to study sensor functions. *Integr Biol.* 2(9):408-15.
- Helliwell S.B., Howald I., Barbet N., Hall M.N. (1998)** TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 148(1):99-112.
- Henry S.A., Kohlwein S.D., Carman G.M. (2012)** Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 190(2):317-49.
- Hernández-López M.J., García-Marqu es S., Rández-Gil F., Prieto J.A. (2011)** Multicopy suppression screening of *Saccharomyces cerevisiae* Identifies the ubiquitination machinery as a main target for improving growth at low temperatures. *Appl Environ Microbiol.* 77(21):7517-25.

- Hinnebusch A.G. y Natarajan K. (2002)** Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress. *Eukaryot Cell* 1(1):22-32.
- Hoffman C.S., Winston F. (1987)** A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of Escherichia coli. *Gene*. 57(2-3):267-72.
- Hohmann S. (2009)** Control of high osmolarity signalling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 583(24):4025-9.
- Homma K., Terui S., Minemura M., Qadota H., Anraku Y., Kanaho Y., Ohya Y. (1998)** Phosphatidylinositol-4- phosphate 5-Kinase Localized on the Plasma Membrane Is Essential for Yeast Cell Morphogenesis. *Journal of Biological Chemistry*. 273:15779–15786.
- Homma T., Iwahashi H., Komatsu Y. (2003)** Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology*. 46(3):230-7.
- Horváth I., Glatz A., Nakamoto H., Mishkind M.L., Munnik T., Saidi Y., Goloubinoff P., Harwood J.L., Vigh L. (2012)** Heat shock response in photosynthetic organisms: membrane and lipid connections. *Prog Lipid Res.* 51(3):208-20.
- Huang D., Friesen H., Andrews B. (2007)** Pho85, a multifunctional cyclin-dependent protein kinase in budding yeast. *Mol Microbiol.* 66(2):303-14.
- Huber A., Bodenmiller B., Uotila A., Stahl M., Wanka S., Gerrits B., Aebersold R., Loewith R. (2009)** Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes Dev.* 23(16):1929-43.
- Huynh, C.V. (1998)** Molecular genetic analysis of a phosphatidylinositide-specific phospholipase C (*PLC1* gene product) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Univ. of California; Berkeley: p.173
- Igual J.C., Johnson A.L., Johnston L.H. (1996)** Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* 15(18):5001-13.
- Irie K., Takase M., Lee K.S., Levin D.E., Araki H., Matsumoto K., Oshima Y. (1993)** MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 13(5):3076-83.
- Ischebeck T., Seiler S., Heilmann I. (2010)** At the poles across kingdoms: phosphoinositides and polar tip growth. *Protoplasma.* 240(1-4):13-31.
- Jendretzki A., Wittland J., Wilk S., Straede A., Heinisch J.J. (2011)** How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol.* 90(9):740-4.
- Jiang B., Cyert M.S. (1999)** Identification of a novel region critical for calcineurin function in vivo and in vitro. *J Biol Chem.* 274(26):18543-51.
- Jiménez-Sánchez M., Cid V.J., Molina M. (2007)** Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem.* 282(43):31174-85.
- Jin N., Mao K., Jin Y., Tevzadze G., Kauffman E.J., Park S., Bridges D., Loewith R., Saltiel A.R., Klionsky D.J., Weisman L.S. (2014)** Roles for PI(3,5)P2 in nutrient sensing through TORC1. *Mol Biol Cell.* 25(7):1171-85.
- Jung U.S., Levin D.E. (1999)** Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol.* 34(5):1049-57.
- Jung U.S., Sobering A.K., Romeo M.J., Levin D.E. (2002)** Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol.* 46(3):781-9.
- Jurado L.A., Chockalingam P.S., Jarrett H.W. (1999)** Apocalmodulin. *Physiol Rev.* 79(3):661-82.
- Kaffman A., Rank N.M., O'Neill E.M., Huang L.S., O'Shea E.K. (1998)** The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature.* 396(6710):482-6.

- Kamada Y., Jung U.S., Piotrowski J., Levin D.E. (1995)** The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9(13):1559-71.
- Kamada Y., Qadota H., Python C.P., Anraku Y., Ohya Y., Levin D.E. (1996)** Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem.* 271(16):9193-6.
- Kandror O., Bretschneider N., Kreydin E., Cavalieri D., Goldberg A.L. (2004)** Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell.* 13(6):771-81.
- Kapteyn J.C., Van Den Ende H., Klis F.M. (1999)** The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta.* 1426(2):373-83.
- Karpenahalli M.R., Lupas A.N., Söding J. (2007)** TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics.* 8:2.
- Ketela T., Green R., Bussey H. (1999)** *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol.* 181(11):3330-40.
- Kilcher G., Delneri D., Duckham C., Tirelli N. (2008)** Probing (macro)molecular transport through cell walls. *Faraday Discuss.* 139:199-212.
- Kim D.H., Eu Y.J., Yoo C.M., Kim Y.W., Pih K.T., Jin J.B., Kim S.J., Stenmark H., Hwang I. (2001)** Trafficking of phosphatidylinositol 3-phosphate from the trans-Golgi network to the lumen of the central vacuole in plant cells. *Plant Cell.* 13(2):287-301.
- Kim K.Y., Truman A.W., Levin D.E. (2008)** Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol.* 28(8):2579-89.
- Kim K.Y., Truman A.W., Caesar S., Schlenstedt G., Levin D.E. (2010)** Yeast Mpk1 cell wall integrity mitogen-activated protein kinase regulates nucleocytoplasmic shuttling of the Swi6 transcriptional regulator. *Mol Biol Cell.* 21(9):1609-19.
- Kobayashi T., Takematsu H., Yamaji T., Hiramoto S., Kozutsumi Y. (2005)** Disturbance of sphingolipid biosynthesis abrogates the signaling of Mss4, phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase, in yeast. *J Biol Chem.* 280(18):18087-94.
- Kondo K., Inouye M. (1991)** TIP 1, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 266(26):17537-44.
- Kowalski L.R., Kondo K., Inouye M. (1995)** Cold-shock induction of a family of TIP1-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 15(2):341-53.
- Krause S.A., Gray J.V. (2002)** The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Biol.* 12(7):588-93.
- Kübler E., Schimmöller F., Riezman H. (1994)** Calcium-independent calmodulin requirement for endocytosis in yeast. *EMBO J.* 13(23):5539-46.
- Kuranda K., Leberre V., Sokol S., Palamarczyk G., François J. (2006)** Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Mol Microbiol.* 61(5):1147-66.
- Lambrechts M.G., Bauer F.F., Marmur J., Pretorius I.S. (1996)** Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(16):8419-24.
- Laroche C., Beney L., Marechal P.A., Gervais P. (2001)** The effect of osmotic pressure on the membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae* at different physiological temperatures. *Appl Microbiol Biotechnol.* 56(1-2):249-54.

- Lawrence C.L., Botting C.H., Antrobus R., Coote P.J. (2004)** Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol.* 24(8):3307-23.
- Lee J., Moir R.D., Willis I.M. (2009)** Regulation of RNA polymerase III transcription involves SCH9-dependent and SCH9-independent branches of the target of rapamycin (TOR) pathway. *J Biol Chem.* 284(19):12604-8.
- Lee J.Y., Kim Y.R., Park J., Kim S. (2012)** Inositol polyphosphate multikinase signaling in the regulation of metabolism. *Ann N Y Acad Sci.* 1271:68-74.
- Lee K.S., Levin D.E. (1992)** Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol.* 12(1):172-82.
- Lee K.S., Irie K., Gotoh Y., Watanabe Y., Araki H., Nishida E., Matsumoto K., Levin D.E. (1993)** A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol.* 13(5):3067-75.
- Lee Y.S., Mulugu S., York J.D., O'Shea E.K. (2007)** Regulation of a cyclin-CDK-CDK inhibitor complex by inositol pyrophosphates. *Science.* 316(5821):109-12.
- Lee Y.S., Huang K., Quioco F.A., O'Shea E.K. (2008)** Molecular basis of cyclin-CDK-CKI regulation by reversible binding of an inositol pyrophosphate. *Nat Chem Biol.* 4(1):25-32.
- Lemmon M.A. (2003)** Phosphoinositide recognition domains. *Traffic.* 4(4):201-13.
- Lesage G., Sdicu A.M., Ménard P., Shapiro J., Hussein S., Bussey H. (2004)** Analysis of beta-1,3-glucan assembly in *Saccharomyces cerevisiae* using a synthetic interaction network and altered sensitivity to caspofungin. *Genetics.* 167(1):35-49.
- Levin D.E., Fields F.O., Kunisawa R., Bishop J.M., Thorner J. (1990)** A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell.* 62(2):213-24.
- Levin D.E., Bowers B., Chen C.Y., Kamada Y., Watanabe M. (1994)** Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res.* 40(3):229-39.
- Levin D.E. (2005)** Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 69(2):262-91.
- Levin D.E. (2011)** Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics.* 189(4):1145-75.
- Levine T.P., Munro S. (2002)** Targeting of Golgi-Specific Pleckstrin Homology Domains Involves Both Phosphatidylinositol 4-Kinase-Dependent and -Independent Components. *Current Biology.* 12:1-10.
- Li X., Du Y., Siegel S., Ferro-Novick S., Novick P. (2010)** Activation of the mitogen-activated protein kinase, Slt2p, at bud tips blocks a late stage of endoplasmic reticulum inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 21(10):1772-82.
- Lin H., Fridy P.C., Ribeiro A.A., Choi J.H., Barma D.K., Vogel G., Falck J.R., Shears S.B., York J.D., Mayr G.W. (2009)** Structural analysis and detection of biological inositol pyrophosphates reveal that the family of VIP/diphosphoinositol pentakisphosphate kinases are 1/3-kinases. *J Biol Chem.* 284(3):1863-72.
- Liu Y., Bankaitis V.A. (2010)** Phosphoinositide phosphatases in cell biology and disease. *Prog Lipid Res.* 49(3):201-17.
- Lockshon D., Olsen C.P., Brett C.L., Chertov A., Merz A.J., Lorenz D.A., Van Gilst M.R., Kennedy B.K. (2012)** Rho signaling participates in membrane fluidity homeostasis. *PLoS One.* 7(10):e45049.

- Lodder A.L., Lee T.K., Ballester R. (1999)** Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 152(4):1487-99.
- Loewen C.J., Gaspar M.L., Jesch S.A., Delon C, Ktistakis N.T., Henry S.A., Levine TP. (2004)** Phospholipid metabolism regulated by a transcription factor sensing phosphatidic acid. *Science*. 304(5677):1644-7.
- Loewith R., Jacinto E., Wullschleger S., Lorberg A., Crespo J.L., Bonenfant D., Oppliger W., Jenoe P., Hall M.N. (2002)** Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 10(3):457-68.
- Löfke C., Ischebeck T., König S., Freitag S., Heilmann I. (2008)** Alternative metabolic fates of phosphatidylinositol produced by phosphatidylinositol synthase isoforms in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J*. 413(1):115-24.
- Longtine M.S., McKenzie A. 3rd, Demarini D.J., Shah N.G., Wach A., Brachat A., Philippsen P., Pringle J.R. (1998)** Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 14(10):953-61.
- López-Marqués R.L., Holthuis J.C., Pomorski T.G. (2011)** Pumping lipids with P4-ATPases. *Biol Chem*. 392(1-2):67-76.
- Los D.A. (2004)** The effect of low-temperature-induced DNA supercoiling on the expression of the desaturase genes in *synechocystis*. *Cell Mol Biol*. 50(5):605-12.
- Los D.A., Murata N. (2004)** Membrane fluidity and its roles in the perception of environmental signals. *Biochim Biophys Acta*. 1666(1-2):142-57.
- Los D.A., Mironov K.S., Allakhverdiev S.I. (2013)** Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. *Photosynth Res*. 116(2-3):489-509.
- Madden K., Sheu Y.J., Baetz K., Andrews B., Snyder M. (1997)** SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science*. 275(5307):1781-4.
- Maeda T., Wurgler-Murphy S.M., Saito H. (1994)** A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature*. 369(6477):242-5.
- Maeda T., Takekawa M., Saito H. (1995)** Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science*. 269(5223):554-8.
- Mapes J., Ota I.M. (2004)** Nbp2 targets the Ptc1-type 2C Ser/Thr phosphatase to the HOG MAPK pathway. *EMBO J*. 23(2):302-11.
- Marchler-Bauer A., Anderson J.B., Chitsaz F., Derbyshire M.K., DeWeese-Scott C., Fong J.H., Geer L.Y., Geer R.C., Gonzales N.R., Gwadz M., He S., Hurwitz D.I., Jackson J.D., Ke Z., Lanczycki C.J., Liebert C.A., Liu C., Lu F., Lu S., Marchler G.H., Mullokandov M., Song J.S., Tasneem A., Thanki N., Yamashita R.A., Zhang D., Zhang N., Bryant S.H. (2009)** CDD: specific functional annotation with the Conserved Domain Database. *Nucleic Acids Res*. 37(Database issue):D205-10.
- Marín M.J., Flández M., Bermejo C., Arroyo J., Martín H., Molina M. (2009)** Different modulation of the outputs of yeast MAPK-mediated pathways by distinct stimuli and isoforms of the dual-specificity phosphatase Msg5. *Mol Genet Genomics*. 281(3):345-59.
- Martin C.E., Oh C.S., Jiang Y. (2007)** Regulation of long chain unsaturated fatty acid synthesis in yeast. *Biochim Biophys Acta*. 1771(3):271-85.
- Martín H., Rodríguez-Pachón J.M., Ruiz C., Nombela C., Molina M. (2000)** Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*.
- Martín H., Rodríguez-Pachón J.M., Ruiz C., Nombela C., Molina M. (2000)** Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 275(2):1511-9.

- Mellor H., Parker P.J. (1998)** The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 332 (Pt 2):281-92.
- Menonides F.I., Brul S., Klis F.M., Hellingwerf K.J., Teixeira de Mattos M.J. (2005)** Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl Environ Microbiol.* 71(8):4531-8.
- Merchan S., Bernal D., Serrano R., Yenush L. (2004)** Response of the *Saccharomyces cerevisiae* Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway to increases in internal turgor pressure caused by loss of Ppz protein phosphatases. *Eukaryot Cell.* 3(1):100-7.
- Merzendorfer H., Heinisch J.J. (2013)** Microcompartments within the yeast plasma membrane. *Biol Chem.* 394(2):189-20.
- Michell R.H. (2011)** Inositol and its derivatives: their evolution and functions. *Adv Enzyme Regul.* 51(1):84-90.
- Mikoshiba K. (2007)** The IP3 receptor/Ca²⁺ channel and its cellular function. *Biochem Soc Symp.* ;(74):9-22.
- Millson S.H., Truman A.W., King V., Prodromou C., Pearl L.H., Piper P.W. (2005)** A two-hybrid screen of the yeast proteome for Hsp90 interactors uncovers a novel Hsp90 chaperone requirement in the activity of a stress-activated mitogen-activated protein kinase, Slt2p (Mpk1p). *Eukaryot Cell.* 4(5):849-60.
- Morales-Johansson H., Jenoe P., Cooke F.T., Hall M.N. (2004)** Negative regulation of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate levels by the INP51-associated proteins TAX4 and IRS4. *J Biol Chem.* 279(38):39604-10.
- Morsomme P., Slayman CW, Goffeau A. (2000)** Mutagenic study of the structure, function and biogenesis of the yeast plasma membrane H(+)-ATPase. *Biochim Biophys Acta.* 1469(3):133-57.
- Mrsa V., Tanner W. (1999)** Role of NaOH-extractable cell wall proteins Ccw5p, Ccw6p, Ccw7p and Ccw8p (members of the Pir protein family) in stability of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Yeast.* 15(10A):813-20.
- Mulugu S., Bai W., Fridy P.C., Bastidas R.J., Otto J.C., Dollins D.E., Haystead T.A., Ribeiro A.A., York J.D. (2007)** A conserved family of enzymes that phosphorylate inositol hexakisphosphate. *Science.* 316(5821):106-9.
- Munnik T., Vermeer J.E. (2010)** Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant Cell Environ.* 33(4):655-69.
- Murata Y., Homma T., Kitagawa E., Momose Y., Sato M.S., Odani M., Shimizu H., Hasegawa-Mizusawa M., Matsumoto R., Mizukami S., Fujita K., Parveen M., Komatsu Y., Iwahashi H. (2006)** Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4 degrees C. *Extremophiles.* 10(2):117-28.
- Muthusamy B.P., Natarajan P., Zhou X., Graham T.R. (2009)** Linking phospholipid flippases to vesicle-mediated protein transport. *Biochim Biophys Acta.* 1791(7):612-9.
- Nakagawa Y., Sakumoto N., Kaneko Y., Harashima S. (2002)** Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce OLE1 transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun.* 291(3):707-13.
- Nakamura T., Ohmoto T., Hirata D., Tsuchiya E., Miyakawa T. (1996)** Genetic evidence for the functional redundancy of the calcineurin- and Mpk1-mediated pathways in the regulation of cellular events important for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet.* 251(2):211-9.
- Neves M.J., François J. (1992)** On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J.* 288 (Pt 3):859-64.

- Nishizawa M., Komai T., Katou Y., Shirahige K., Ito T., Toh-E A. (2008)** Nutrient-regulated antisense and intragenic RNAs modulate a signal transduction pathway in yeast. *PLoS Biol.* 6(12):2817-30.
- Novick P., Osmond B.C., Botstein D. (1989)** Suppressors of Yeast Actin Mutations. *Genetics.* 121:659– 674.
- Nuñez L.R., Jesch S.A., Gaspar M.L., Almaguer C., Villa-Garcia M., Ruiz-Noriega M., Patton-Vogt J., Henry S.A. (2008)** Cell wall integrity MAPK pathway is essential for lipid homeostasis. *J Biol Chem.* 283(49):34204-17.
- Odom A.R., Stahlberg A., Wentz S.R., York J.D. (2000)** A role for nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate kinase in transcriptional control. *Science.* 287(5460):2026-9.
- O'Hara L., Han G.S., Peak-Chew S., Grimsey N., Carman G.M., Siniosoglou S. (2006)** Control of phospholipid synthesis by phosphorylation of the yeast lipin Pah1p/Smp2p Mg²⁺-dependent phosphatidate phosphatase. *J Biol Chem.* 281(45):34537-48.
- Orlean P. (2012)** Architecture and biosynthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Genetics.* 192(3):775-818.
- Oshiro J., Han G.S., Carman G.M. (2003)** Diacylglycerol pyrophosphate phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1635(1):1-9.
- Otto J.C., Mulugu S., Fridy P.C., Chiou S.T., Armbruster B.N., Ribeiro A.A., York J.D. (2007)** Biochemical analysis of inositol phosphate kinases. *Methods Enzymol.* 434:171-85.
- Ozaki K., Tanaka K., Imamura H., Hihara T., Kameyama T., Nonaka H., Hirano H., Matsuura Y., Takai Y. (1996)** Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 15(9):2196-207.
- Ozcan S., Johnston M. (1995)** Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (HXT) genes to be induced by different levels of glucose. *Mol Cell Biol.* 15(3):1564-72.
- Padmanabhan U., Dollins D.E., Fridy P.C., York J.D., Downes C.P. (2009)** Characterization of a selective inhibitor of inositol hexakisphosphate kinases: use in defining biological roles and metabolic relationships of inositol pyrophosphates. *J Biol Chem.* 284(16):10571-82.
- Panadero J., Pallotti C., Rodríguez-Vargas S., Randez-Gil F., Prieto J.A. (2006)** A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 281(8):4638-45.
- Park J.I., Grant C.M., Dawes I.W. (2005)** The high-affinity cAMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae* is the major determinant of cAMP levels in stationary phase: involvement of different branches of the Ras-cyclic AMP pathway in stress responses. *Biochem Biophys Res Commun.* 327(1):311-9.
- Pascual F., Carman G.M. (2013)** Phosphatidate phosphatase, a key regulator of lipid homeostasis. *Biochim Biophys Acta.* 1831(3):514-22.
- Pascual F., Soto-Cardalda A., Carman G.M. (2013)** PAH1-encoded phosphatidate phosphatase plays a role in the growth phase- and inositol-mediated regulation of lipid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 288(50):35781-92.
- Perera N.M., Michell R.H., Dove S.K. (2004)** Hypo-osmotic Stress Activates Plc1p-dependent Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate Hydrolysis and Inositol Hexakisphosphate Accumulation in Yeast. *Journal of Biological Chemistry.* 279:5216–5226.
- Petkova M.I., Pujol-Carrion N., Arroyo J., García-Cantalejo J., Angeles de la Torre-Ruiz M. (2010)** Mtl1 is required to activate general stress response through Tor1 and Ras2 inhibition under conditions of glucose starvation and oxidative stress. *J Biol Chem.* 285(25):19521-31.

- Philip B., Levin D.E. (2001)** Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol.* 21(1):271-80.
- Piper P.W., Truman A.W., Millson S.H., Nuttall J. (2006)** Hsp90 chaperone control over transcriptional regulation by the yeast Slr2(Mpk1)p and human ERK5 mitogen-activated protein kinases (MAPKs). *Biochem Soc Trans.* 34(Pt 5):783-5.
- Posas F., Wurgler-Murphy S.M., Maeda T., Witten E.A., Thai T.C., Saito H. (1996)** Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell.* 86(6):865-75.
- Qiu X.B., Shao Y.M., Miao S., Wang L. (2006)** The diversity of the DnaJ/Hsp40 family, the crucial partners for Hsp70 chaperones. *Cell Mol Life Sci.* 63(22):2560-70.
- Rabilloud T., Carpentier G., Tarroux P. (1988)** Improvement and simplification of low-background silver staining of proteins by using sodium dithionite. *Electrophoresis.* 9(6):288-91.
- Rajakumari S., Grillitsch K., Daum G. (2008)** Synthesis and turnover of non-polar lipids in yeast. *Prog Lipid Res.* 47(3):157-71.
- Rajavel M., Philip B., Buehrer B.M., Errede B., Levin D.E. (1999)** Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 19(6):3969-76.
- Randez-Gil F., Córcoles-Sáez I., Prieto J.A. (2013)** Genetic and phenotypic characteristics of baker's yeast: relevance to baking. *Annu Rev Food Sci Technol.* 4:191-214.
- Rattray J.B., Schibeci A., Kidby D.K. (1975)** Lipids of yeasts. *Bacteriol Rev.* 39(3):197-231.
- Raucher D., Stauffer T., Chen W., Shen K., Guo S., York J.D., Sheetz M.P., Meyer T. (2000)** Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate functions as a second messenger that regulates cytoskeleton-plasma membrane adhesion. *Cell.* 100:221-8.
- Rebecchi M.J., Pentylala S.N. (2000)** Structure, function, and control of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Physiol Rev.* 80(4):1291-335.
- Reinke A., Anderson S., McCaffery J.M., Yates J. 3rd, Aronova S., Chu S., Fairclough S., Iverson C., Wedaman K.P., Powers T. (2004)** TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 279(15):14752-62.
- Reynolds T.B., Hopkins B.D., Lyons M.R., Graham T.R. (1998)** The high osmolarity glycerol response (HOG) MAP kinase pathway controls localization of a yeast golgi glycosyltransferase. *J Cell Biol.* 143(4):935-46.
- Riehle R.D., Cornea S., Degterev A. (2013)** Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in cell signaling. *Adv Exp Med Biol.* 991:105-39.
- Robzyk K., Kassir Y. (1992)** A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* 20(14):3790.
- Rodicio R., Heinisch J.J. (2010)** Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast.* 27(8):531-40.
- Rodríguez-Escudero I., Roelants F.M., Thorner J., Nombela C., Molina M., Cid V.J. (2005)** Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem J.* 390(Pt 2):613-23.
- Rodríguez-Vargas S., Sánchez-García A., Martínez-Rivas J.M., Prieto J.A., Randez-Gil F. (2007)** Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl Environ Microbiol.* 73(1):110-6.

- Routt S.M., Ryan M.M., Tyeryar K., Rizzieri K.E., Mousley C., Roumanie OBPJ., Bankaitis V.A. (2005)** Nonclassical PITPs Activate PLD via the Stt4p PtdIns-4-kinase and Modulate Function of Late Stages of Exocytosis in Vegetative Yeast. *Traffic*. 6:1157–1172.
- Roy A., Lu C.F., Marykwas D.L., Lipke P.N., Kurjan J. (1991)** The AGA1 product is involved in cell surface attachment of the *Saccharomyces cerevisiae* cell adhesion glycoprotein a-agglutinin. *Mol Cell Biol*. 11(8):4196-206.
- Roy A., Levine T.P. (2004)** Multiple Pools of Phosphatidylinositol 4-Phosphate Detected Using the pleckstrin Homology Domain of Osh2p. *Journal of Biological Chemistry*. 279:44683–44689.
- Russell N.J., Evans R.I., ter Steeg P.F., Hellemons J., Verheul A., Abee T. (1995)** Membranes as a target for stress adaptation. *Int J Food Microbiol*. 28(2):255-61.
- Saarikangas J., Zhao H., Lappalainen P. (2010)** Regulation of the actin cytoskeleton-plasma membrane interplay by phosphoinositides. *Physiol Rev*. 90(1):259-89.
- Sahara T., Goda T., Ohgiya S. (2002)**. Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *J Biol Chem*. 277(51):50015-21.
- Saiardi A., Caffrey J.J., Snyder S.H., Shears S.B. (2000)** Inositol polyphosphate multikinase (ArgRIII) determines nuclear mRNA export in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 468(1):28-32.
- Saiardi A., Sciambi C., McCaffery J.M., Wendland B., Snyder S.H. (2002)** Inositol pyrophosphates regulate endocytic trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99(22):14206-11.
- Saiardi A., Bhandari R., Resnick A.C., Snowman A.M., Snyder S.H. (2004)** Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science*. 306(5704):2101-5.
- Saiardi A., Resnick A.C., Snowman A.M., Wendland B., Snyder S.H. (2005)** Inositol pyrophosphates regulate cell death and telomere length through phosphoinositide 3-kinase-related protein kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(6):1911-4.
- Saidi Y., Finka A., Goloubinoff P. (2011)** Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytol*. 190(3):556-65.
- Saito H., Tatebayashi K. (2004)** Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem*. 136(3):267-72.
- Saito H., Posas F. (2012)** Response to hyperosmotic stress. *Genetics*. 192(2):289-318.
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. Cold Spring Harbor, NY
- Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977)** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 74(12):5463-7.
- Santangelo G.M. (2006)** Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 70(1):253-82.
- Santhanam A., Hartley A., Düvel K., Broach J.R., Garrett S. (2004)** PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryot Cell*. 3(5):1261-71.
- Santos-Rosa H., Leung J., Grimsey N., Peak-Chew S., Siniosoglou S. (2005)** The yeast lipin Smp2 couples phospholipid biosynthesis to nuclear membrane growth. *EMBO J*. 24(11):1931-41.
- Schade B., Jansen G., Whiteway M., Entian K.D., Thomas D.Y. (2004)** Cold adaptation in budding yeast. *Mol Biol Cell*. 15(12):5492-502.
- Schmelzle T., Helliwell S.B., Hall M.N. (2002)** Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol*. 22(5):1329-39.

- Schmelzle T., Beck T., Martin D.E., Hall M.N. (2004)** Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast. *Mol Cell Biol.* 24(1):338-51.
- Schmid A.B., Lagleder S., Gräwert M.A., Röhl A., Hagn F., Wandinger S.K., Cox M.B., Demmer O., Richter K., Groll M., Kessler H., Buchner J. (2012)** The architecture of functional modules in the Hsp90 co-chaperone Sti1/Hop. *EMBO J.* 31(6):1506-17.
- Schmidt A., Hall M.N., Koller A. (1994)** Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, TAT1 and TAT2, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol Cell Biol.* 14(10):6597-606.
- Schmidt A., Schmelzle T., Hall M.N. (2002)** The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 45(5):1433-41.
- Schneider K.R., Smith R.L., O'Shea E.K. (1994)** Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science.* 266(5182):122-6.
- Serrano R. (1988)** Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim Biophys Acta.* 947(1):1-28.
- Serrano R., Ruiz A., Bernal D., Chambers J.R., Ariño J. (2002)** The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol.* 46(5):1319-33.
- Serrano R., Martín H., Casamayor A., Ariño J. (2006)** Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem.* 281(52):39785-95.
- Shaner L., Gibney P.A., Morano K.A. (2008)** The Hsp110 protein chaperone Sse1 is required for yeast cell wall integrity and morphogenesis. *Curr Genet.* 54(1):1-11.
- Shelton S.N., Barylko B., Binns D.D., Horazdovsky B., Albanesi J.P., Goodman J.M. (2003)** *Saccharomyces cerevisiae* contains a Type II phosphoinositide 4-kinase. *Biochemical Journal.* 371:533-540.
- Sikorski R.S., Boguski M.S., Goebel M., Hieter P. (1990)** A repeating amino acid motif in CDC23 defines a family of proteins and a new relationship among genes required for mitosis and RNA synthesis. *Cell.* 60(2):307-17.
- Sigrist C.J., Cerutti L., Hulo N., Gattiker A., Falquet L., Pagni M., Bairoch A., Bucher P. (2002)** PROSITE: a documented database using patterns and profiles as motif descriptors. *Brief Bioinform.* 3(3):265-74.
- Simons K., Sampaio J.L. (2011)** Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 3(10):a004697.
- Singh A., Manney T.R. (1974)** Genetic analysis of mutations affecting growth of *Saccharomyces cerevisiae* at low temperature. *Genetics.* 77:651-9.
- Siniosoglou S. (2013)** Phospholipid metabolism and nuclear function: roles of the lipin family of phosphatidic acid phosphatases. *Biochim Biophys Acta.* 1831(3):575-81.
- Sipling T., Zhai C., Panaretou B. (2011)** Emw1p/YNL313cp is essential for maintenance of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology.* 157(Pt 4):1032-41.
- Smith S.W., Weiss S.B., Kennedy E.P. (1957)** The enzymatic dephosphorylation of phosphatidic acids. 228(2):915-22.
- Smits G.J., Kapteyn J.C., van den Ende H., Klis F.M. (1999)** Cell wall dynamics in yeast. *Curr Opin Microbiol.* 2(4):348-52.
- Smits G.J., van den Ende H., Klis F.M. (2001)** Differential regulation of cell wall biogenesis during growth and development in yeast. *Microbiology.* 147(Pt 4):781-94.

- Soulard A., Cohen A., Hall M.N. (2009)** TOR signaling in invertebrates. *Curr Opin Cell Biol.* 21(6):825-36.
- Soulard A., Cremonesi A., Moes S., Schütz F., Jenö P., Hall M.N. (2010)** The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell.* 21(19):3475-86.
- Spellman P.T., Sherlock G., Zhang M.Q., Iyer V.R., Anders K., Eisen M.B., Brown P.O., Botstein D., Futcher B. (1998)** Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Mol Biol Cell.* 9(12):3273-97.
- Srinivasan S., Seaman M., Nemoto Y., Daniell L., Suchy S.F., Emr S.D., De Camilli P., Nussbaum R. (1997)** Disruption of three phosphatidylinositol-polyphosphate 5-phosphatase genes from *Saccharomyces cerevisiae* results in pleiotropic abnormalities of vacuole morphology, cell shape, and osmohomeostasis. *European Journal of Cell Biology.* 74:350–360.
- Stanger K., Gorelik M., Davidson A.R. (2012)** Yeast adaptor protein, Nbp2p, is conserved regulator of fungal Ptc1p phosphatases and is involved in multiple signaling pathways. *J Biol Chem.* 287(26):22133-41.
- Stanhill A., Schick N., Engelberg D. (1999)** The yeast ras/cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress response. *Mol Cell Biol.* 19(11):7529-38.
- Stathopoulos A.M., Cyert M.S. (1997)** Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* 11(24):3432-44.
- Stefan C.J., Audhya A., Emr S.D. (2002)** The yeast synaptojanin-like proteins control the cellular distribution of phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate. *Mol Biol Cell.* 13(2):542-57.
- Stefan C.J., Padilla S.M., Audhya A., Emr S.D. (2005)** The phosphoinositide phosphatase Sjl2 is recruited to cortical actin patches in the control of vesicle formation and fission during endocytosis. *Mol Cell Biol.* 25(8):2910-23.
- Steger D.J., Haswell E.S., Miller A.L., Wente S.R., O'Shea E.K. (2003)** Regulation of chromatin remodeling by inositol polyphosphates. *Science.* 299(5603):114-6.
- Stephan J.S., Yeh Y.Y., Ramachandran V., Deminoff S.J., Herman P.K. (2009)** The Tor and PKA signaling pathways independently target the Atg1/Atg13 protein kinase complex to control autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(40):17049-54.
- Straede A., Corran A., Bundy J., Heinisch J.J. (2007)** The effect of tea tree oil and antifungal agents on a reporter for yeast cell integrity signalling. *Yeast.* 24(4):321-34.
- Strahl T., Hama H., DeWald D.B., Thorner J. (2005)** Yeast phosphatidylinositol 4-kinase, Pik1, has essential roles at the Golgi and in the nucleus. *J Cell Biol.* 171(6):967-79.
- Strahl T., Thorner J. (2007)** Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta.* 1771(3):353-404.
- Stolz L.E., Huynh C.V., Thorner J., York J.D. (1998a).** Identification and characterization of an essential family of inositol polyphosphate 5-phosphatases (*INP51*, *INP52* and *INP53* gene products) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 148:1715–29.
- Stolz L.E., Kuo W.J., Longchamps J., Sekhon M.K., York J.D. (1998b)** *INP51*, a yeast inositol polyphosphate 5- phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers a cold-resistant phenotype. *Journal of Biological Chemistry.* 273:11852–61.
- Sturgill T.W., Cohen A., Diefenbacher M., Trautwein M., Martin D.E., Hall M.N. (2008)** TOR1 and TOR2 have distinct locations in live cells. *Eukaryot Cell.* 7(10):1819-30.
- Su W.M., Han G.S., Casciano J., Carman G.M. (2012)** Protein kinase A-mediated phosphorylation of Pah1p phosphatidate phosphatase functions in conjunction with the Pho85p-Pho80p and Cdc28p-cyclin B kinases to regulate lipid synthesis in yeast. *J Biol Chem.* 287(40):33364-76.

- Subramanian M., Metya S.K., Sadaf S., Kumar S., Schwudke D., Hasan G. (2013)** Altered lipid homeostasis in *Drosophila* InsP3 receptor mutants leads to obesity and hyperphagia. *Dis Model Mech.* 6(3):734-44.
- Suutari M., Liukkonen K., Laakso S. (1990)** Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. *J Gen Microbiol.* 136(8):1469-74.
- Swinnen E., Ghillebert R., Wilms T., Winderickx J. (2013)** Molecular mechanisms linking the evolutionary conserved TORC1-Sch9 nutrient signalling branch to lifespan regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 10.1111/1567-1364.12097.
- Szalontai B., Nishiyama Y., Gombos Z., Murata N. (2000)** Membrane dynamics as seen by fourier transform infrared spectroscopy in a cyanobacterium, *Synechocystis* PCC 6803. The effects of lipid unsaturation and the protein-to-lipid ratio. *Biochim Biophys Acta.* 1509(1-2):409-19.
- Szijgyarto Z., Garedew A., Azevedo C., Saiardi A. (2011)** Influence of inositol pyrophosphates on cellular energy dynamics. *Science.* 334(6057):802-5.
- Taylor F.R., Parks L.W. (1979)** Triacylglycerol metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. Relation to phospholipid synthesis. *Biochim Biophys Acta.* 575(2):204-14.
- Taylor C.W., Tovey S.C. (2010)** IP(3) receptors: toward understanding their activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2(12):a004010.
- Taylor I.A., McIntosh P.B., Pala P., Treiber M.K., Howell S., Lane A.N., Smerdon S.J. (2000)** Characterization of the DNA-binding domains from the yeast cell-cycle transcription factors Mbp1 and Swi4. *Biochemistry.* 39(14):3943-54.
- Thieringer H.A., Jones P.G., Inouye M. (1998)** Cold shock and adaptation. *Bioessays.* 20(1):49-57.
- Tisi R., Belotti F., Wera S., Winderickx J., Thevelein J.M., Martegani E. (2004)** Evidence for inositol triphosphate as a second messenger for glucose-induced calcium signalling in budding yeast. *Curr Genet.* 45(2):83-9.
- Toda T., Cameron S., Sass P., Zoller M., Scott J.D., McMullen B., Hurwitz M., Krebs E.G., Wigler M. (1987)** Cloning and characterization of BCY1, a locus encoding a regulatory subunit of the cyclic AMP-dependent protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 7(4):1371-7.
- Toh-e A., Yasunaga S., Nisogi H., Tanaka K., Oguchi T., Matsui Y. (1993)** Three yeast genes, *PIR1*, *PIR2* and *PIR3*, containing internal tandem repeats, are related to each other, and *PIR1* and *PIR2* are required for tolerance to heat shock. *Yeast.* 9(5):481-94.
- Torres J., Di Como C.J., Herrero E., De La Torre-Ruiz M.A. (2002)** Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J Biol Chem.* 277(45):43495-504.
- Torres L., Martín H., García-Saez M.I., Arroyo J., Molina M., Sánchez M., Nombela C. (1991)** A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol Microbiol.* 5(11):2845-54.
- Torres-Quiroz F., García-Marqués S., Coria R., Randez-Gil F., Prieto J.A. (2010)** The activity of yeast Hog1 MAPK is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *J Biol Chem.* 285(26):20088-96.
- Trivedi A., Singhal G.S., Prasad R. (1983)** Effect of phosphatidylserine enrichment on amino acid transport in yeast. *Biochim Biophys Acta.* 729(1):85-9.
- Trott A., Shaner L., Morano K.A. (2005)** The molecular chaperone Sse1 and the growth control protein kinase Sch9 collaborate to regulate protein kinase A activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 170(3):1009-21
- Truman A.W., Millson S.H., Nuttall J.M., King V., Mollapour M., Prodromou C., Pearl L.H., Piper P.W. (2006)** Expressed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, human ERK5 is a client of

- the Hsp90 chaperone that complements loss of the Slp2p (Mpk1p) cell integrity stress-activated protein kinase. *Eukaryot Cell*. 5(11):1914-24.
- Truman A.W., Kim K.Y., Levin D.E. (2009)** Mechanism of Mpk1 mitogen-activated protein kinase binding to the Swi4 transcription factor and its regulation by a novel caffeine-induced phosphorylation. *Mol Cell Biol*. 29(24):6449-61.
- Urban J., Soulard A., Huber A., Lippman S., Mukhopadhyay D., Deloche O., Wanke V., Anrather D., Ammerer G., Riezman H., Broach J.R., De Virgilio C., Hall M.N., Loewith R. (2007)** Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell*. 26(5):663-74.
- van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. (2008)** Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 9(2):112-24.
- Van Wuytswinkel O., Reiser V., Siderius M., Kelders M.C., Ammerer G., Ruis H., Mager W.H. (2000)** Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol*. 37(2):382-97.
- Verna J., Lodder A., Lee K., Vagts A., Ballester R. (1997)** A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94(25):13804-9.
- Verstraeten S.V., Villaverde M.S., Oteiza P.I. (2003)** Al(3+)-mediated changes on membrane fluidity affects the activity of PI-PLC but not of PLC. *Chem Phys Lipids*. 122(1-2):159-63.
- Vicinanza M., D'Angelo G., Di Campli A., De Matteis M.A. (2008)** Phosphoinositides as regulators of membrane trafficking in health and disease. *Cell Mol Life Sci*. 65(18):2833-41.
- Vilella F., Herrero E., Torres J., de la Torre-Ruiz M.A. (2005)** Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem*. 280(10):9149-59.
- Vigh L., Maresca B., Harwood J.L. (1998)** Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends Biochem Sci*. 23(10):369-74.
- Voelker D.R. (2009)** Genetic and biochemical analysis of non-vesicular lipid traffic. *Annu Rev Biochem*. 78:827-56.
- Voordeckers K., Kimpe M., Haesendonckx S., Louwet W., Versele M., Thevelein J.M. (2011)** Yeast 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) orthologs Pkh1-3 differentially regulate phosphorylation of protein kinase A (PKA) and the protein kinase B (PKB)/S6K ortholog Sch9. *J Biol Chem*. 286(25):22017-27.
- Wach A., Brachat A., Pöhlmann R., Philippsen P. (1994)** New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 10(13):1793-808.
- Warmka J., Hanneman J., Lee J., Amin D., Ota I. (2001)** Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol Cell Biol*. 21(1):51-60.
- Watanabe Y., Irie K., Matsumoto K. (1995)** Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slp2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 15(10):5740-9.
- Watanabe Y., Takaesu G., Hagiwara M., Irie K., Matsumoto K. (1997)** Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slp2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 17(5):2615-23.
- Watzel G., Tanner W. (1989)** Cloning of the glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase gene from yeast. Pheromonal regulation of its transcription. *J Biol Chem*. 264(15):8753-8.

- Wei M., Fabrizio P., Madia F., Hu J., Ge H., Li L.M., Longo V.D. (2009)** Tor1/Sch9-regulated carbon source substitution is as effective as calorie restriction in life span extension. *PLoS Genet.* 5(5):e1000467.
- Wera S., Bergsma J.C., Thevelein J.M. (2001)** Phosphoinositides in yeast: genetically tractable signalling. *FEMS Yeast Res.* 1(1):9-13.
- Wilson M.S., Livermore T.M., Saiardi A. (2013)** Inositol pyrophosphates: between signalling and metabolism. *Biochem J.* 452(3):369-79.
- Winkler A., Arkind C., Mattison C.P., Burkholder A., Knoche K., Ota I. (2002)** Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot Cell.* 1(2):163-73.
- Wittenberg C., Reed S.I. (2005)** Cell cycle-dependent transcription in yeast: promoters, transcription factors, and transcriptomes. *Oncogene.* 24(17):2746-55.
- Wright C.M., Fewell S.W., Sullivan M.L., Pipas J.M., Watkins S.C., Brodsky J.L. (2007)** The Hsp40 molecular chaperone Ydj1p, along with the protein kinase C pathway, affects cell-wall integrity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 175(4):1649-64.
- Wullschleger S., Loewith R., Hall M.N. (2006)** TOR signaling in growth and metabolism. *Cell.* 124(3):471-84.
- Xiong Y., Collins Q.F., An J., Lupo E. Jr, Liu H.Y., Liu D., Robidoux J., Liu Z., Cao W. (2007)** p38 mitogen-activated protein kinase plays an inhibitory role in hepatic lipogenesis. *J Biol Chem.* 282(7):4975-82.
- Xu Z., Su W.M., Carman G.M. (2012)** Fluorescence spectroscopy measures yeast PAH1-encoded phosphatidate phosphatase interaction with liposome membranes. *J Lipid Res.* 53(3):522-8.
- Yashar B., Irie K., Printen J.A., Stevenson B.J., Sprague G.F. Jr, Matsumoto K., Errede B. (1995)** Yeast MEK-dependent signal transduction: response thresholds and parameters affecting fidelity. *Mol Cell Biol.* 15(12):6545-53.
- York J.D., Odom A.R., Murphy R., Ives E.B., Wentz S.R. (1999)** A phospholipase C-dependent inositol polyphosphate kinase pathway required for efficient messenger RNA export. *Science.* 285(5424):96-100.
- York J.D., Lew D.J. (2008)** IP7 guards the CDK gate. *Nat Chem Biol.* 4(1):16-7.
- York S.J., Armbruster B.N., Greenwell P., Petes T.D., York J.D. (2005)** Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *J Biol Chem.* 280(6):4264-9.
- Yoshida S., Kono K., Lowery D.M., Bartolini S., Yaffe M.B., Ohya Y., Pellman D. (2006)** Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science.* 313(5783):108-11.
- Yoshida S., Bartolini S., Pellman D. (2009)** Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev.* 23(7):810-23.
- Zarrov P., Mazzoni C., Mann C. (1996)** The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* 15(1):83-91.
- Zhang A., Shen Y., Gao W., Dong J. (2011)** Role of Sch9 in regulating Ras-cAMP signal pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 585(19):3026-32.
- Zlotnik H., Fernandez M.P., Bowers B., Cabib E. (1984)** *Saccharomyces cerevisiae* mannoproteins form an external cell wall layer that determines wall porosity. *J Bacteriol.* 159(3):1018-26.
- Zu T., Verna J., Ballester R. (2001)** Mutations in *WSC* genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics.* 266(1):142-55.

Bibliografia

Zurita-Martinez S.A., Cardenas M.E. (2005) Tor and cyclic AMP-protein kinase A: two parallel pathways regulating expression of genes required for cell growth. *Eukaryot Cell.* 4(1):63-71.