



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGIA CELULAR

**PAPEL DE LA RAMA DE SHO1 EN LA RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO EN
Kluyveromyces lactis: FOSFORILACIÓN INEFECTIVA DE LA MAPK KIHOG1**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:

M. en C. NANCY GUADALUPE VELAZQUEZ ZAVALA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. ROBERTO CORIA ORTEGA
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

COMITÉ TUTORAL:

DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO
Instituto de Fisiología Celular, UNAM

DR. ROBERTO HERNÁNDEZ FERNÁNDEZ
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

México D.F.

Febrero, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS

A la UNAM por haberme brindado un lugar para consolidar mi formación académica y humana.

Esta tesis se realizó en las instalaciones del Instituto de Fisiología Celular bajo la tutoría del Dr. Roberto Coria.

Se reconoce y agradece la participación de la Dra. Laura Kawasaki y de la M. en C. Miriam Beatriz Rodríguez González por el apoyo técnico y las observaciones realizadas al presente trabajo.

Al Comité Tutorial integrado por la Dra. Bertha González Pedrajo y el Dr. Roberto Hernández Fernández por las aportaciones realizadas para mejorar este proyecto.

A los miembros del jurado: Dr. Jesús Aguirre, Dra. Laura Camarena, Dr. Dimitris Georgelis, Dra. Imelda López Villaseñor por la disponibilidad de revisar este trabajo. Sus aportaciones fueron muy importantes para ayudar a mejorarlo.

A la Unidad de Biología Molecular: Dra. Laura Ongay Larios, Biol. Guadalupe Códiz Huerta y M. en C. Minerva Mora Cabrera por la asesoría personal y la ayuda con la secuenciación y síntesis de oligonucleótidos.

A la unidad de cómputo: Biol. Gerardo Coello, M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo, Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo e Ing. Ivette Rosas Arciniega por toda la asistencia técnica.

A los miembros del taller: Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides que siempre nos apoyaron en la reparación y mantenimiento de los diferentes equipos.

A la laboratorista Marisela Bolaños por tener disponible el material necesario para la realización de los experimentos.

A la Secretaría Rocío Martínez por el apoyo logístico durante los seminarios.

El presente trabajo se realizó gracias al apoyo del CONACyT, número de proyecto 166734 y PAPIIT, DGAPA, UNAM, proyecto número IN206513

La asistencia a Congresos se pudo llevar a cabo gracias al Programa de Apoyo para Estudios de Posgrado (PAEP).

Se agradece la beca otorgada por el CONACyT para la realización del Doctorado en Ciencias Biomédicas.

- ¿Me podrías indicar hacia dónde tengo que ir desde aquí?- pregunta Alicia.

- Eso depende de adónde quieras llegar- responde el gato de Cheshire.

- A mi no me importa demasiado adónde.

- En ese caso, da igual adonde vayas.

- Siempre que llegue a alguna parte- musita Alicia.

- ¡Oh! Siempre llegarás a alguna parte, si caminas lo suficiente.

Alicia de Lewis Carroll.

A mis padres
Guadalupe Zavala Ovando e
Hilario Velázquez Mendoza
por ser un ejemplo de vida y de superación.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

En este apartado de la tesis algunos nos damos la oportunidad de ser subjetivos y escribir las cosas como realmente se sienten y no como dice el método científico. Es la oportunidad de poder agradecer a todas las personas que dentro y fuera del laboratorio han contribuido y apoyado durante mucho o poco tiempo, la difícil y algunas veces frustrante pero fascinante tarea: la investigación.

El orden de los aquí mencionados no altera la importancia...

Gracias Dr. Coria porque desde el primer momento en que llegue a tu laboratorio me brindaste tu apoyo y todo lo necesario para la realización de este trabajo. Gracias por tu paciencia y por siempre tener la disponibilidad de aclarar mis dudas. Gracias por creer en mí ¡Lo logramos!

Gracias a mis compañeros de laboratorio (a los que están y a los que ya emigraron): Rocío, Citlalli, Uriel, Abrajam, Eunice, Marcela, Bere, Mariana, Abiram, Ricardo, Diana, Eunice, Mariel y Mary por hacer del 302-Ote un lugar muy ameno para trabajar.

A mi familia:

Gracias a mis padres por toda la paciencia y acompañamiento durante la realización de este trabajo y por ayudarme a no dejar este proyecto inconcluso. Creo que esta frase resume todo lo que ustedes son para mí "Si he visto más lejos, es porque me he sentado sobre hombros de gigantes" (Isaac Newton, 1676). Esos gigantes son ustedes.

Gracias a ti Pedrin, mi compañero de vida y amigo, por estar y permanecer durante todo este tiempo a mi lado. Muchas gracias por ayudarme a ser más tolerante y paciente, por enseñarme una forma más sencilla de ver la vida; también por todos los momentos felices e ingratos que hemos compartido y por no huir cuando las cosas se han puesto intensas.

A mi familia Velázquez-Mendoza: Luis y Lety mi más sincero agradecimiento por haberme dado la felicidad de saber lo que es ser tía –aunque sea a distancia- y por permitir la convivencia con estos seres hermosos: Pedro y Camis. ¡¡Los adoro!!

A las familias Vázquez-Velázquez y De Paz-Zavala por ser un apoyo constante e incondicional en todo momento.

A mis amig@s:

Miriam y Jaqueline, es muy agradable saber que existen personas como ustedes en este ambiente de la investigación. ¡¡¡ Las quiero mucho!!!!

Miriam, eres una persona que ha influido de diferentes maneras en mi vida, te agradezco por la presencia-ausencia durante todo este tiempo, ¡Eres entrañable la Mir!

Jacki, muchas gracias por acompañarme en la recta cuasi final para concluir este ciclo (que duró muchos meses) y por animarme a terminar lo que muchas veces considere interminable. También te agradezco por la confianza que te animó a compartir más de ti.

Laurita Kawasaki, muchas gracias por todo lo que me has brindado durante mi estancia en el laboratorio tanto en el ámbito laboral como personal, te agradezco tu amistad, tu apoyo y tu visión siempre objetiva que me han ayudado a resolver de la mejor manera posible conflictos académicos y de orden personal. ¡Te voy a extrañar!

Adrian, Julio, Marisol, Rosario y Gaby por continuar con esto que inicio ya hace algunos ayerés cuando éramos estudiantes ceceacheros.

A Lizardo Valencia porque no importa los miles de km que estemos lejos y los años que pasen sin vernos, siempre has estado presente y eres un ejemplo de perseverancia y resistencia para conseguir lo que uno se propone.

A Erika T. Sánchez de verdad que fui afortunada al conocerte a ti y a tu familia. Gracias por todo.

A Noé Becerra, que me enseñaste que aún en la dispersión es posible encontrar un camino y porque a pesar de que nos hemos perdido, por alguna razón extraña siempre nos volvemos a encontrar.

Gracias a los hongos, que además de traer felicidad, han sido y serán una fuente de inspiración para generar más y más trabajos.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1. Respuesta de las levaduras a señales del ambiente.....	3
1.2. El estrés osmótico.....	3
1.3. La vía de respuesta al estrés hiperosmótico.....	5
1.3.1. La rama SLN1.....	6
1.3.2. La rama SHO1.....	7
1.4. La importancia de la vía HOG.....	12
1.5. La actividad de Hog1p en el núcleo.....	12
1.6. La Regulación de la vía HOG.....	13
1.7. Papel de Hog1p en la regulación de la fisiología celular.....	14
1.7.1. La regulación del ciclo celular.....	14
1.7.2. La regulación de la síntesis proteica.....	15
1.7.3. La regulación de la respuesta retrógrada.....	15
1.8. La vía HOG en otras levaduras.....	16
1.9. <i>Kluyveromyces lactis</i> como modelo de estudio.....	18
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	21
5. MATERIALES Y MÉTODOS	22
5.1. Cepas, medios de cultivo y plásmidos.....	22
5.2. Clonación y secuenciación de genes.....	22
5.2.1. Fusión KISho1 TM - KISte11.....	24
5.2.2. Fusión KIHog1-GFP.....	25
5.3. Ensayos de estrés osmótico.....	26
5.4. Ensayos de apareamiento.....	26
5.5. Ensayos de Western blot.....	27
5.6. Expresión del gen <i>KISTL1</i>	28
5.7. Microscopía de fluorescencia.....	28
6. RESULTADOS	30
6.1. Amplificación y clonación de <i>KISHO1</i> y <i>KISSK2</i>	30
6.2. Análisis de las secuencias de <i>KISHO1</i> y <i>KISSK2</i>	31
6.3. Análisis de las mutantes de las ramas SHO1 y SLN1 en respuesta al estrés hiperosmótico en <i>K. lactis</i>	34

6.4. La localización de KIS _{te} 11 en la membrana es suficiente para proteger a la célula contra el estrés osmótico en ausencia de las proteínas KIS _{sk} 2p y kIS _{ho} 1p.....	36
6.5. El estrés osmótico induce la fosforilación de KIHog1p en <i>K. lactis</i> .	39
6.6. La fosforilación de KIHog1p no protege a las células contra el estrés hiperosmótico.....	40
6.7. La fosforilación de KIHog1p no depende de la actividad de las MAPKKK.....	41
6.8. La fosforilación de KIHog1p es dependiente de la actividad cinasa de la MAPKK KIP _{bs} 2p	42
6.9. La internalización de KIHog1p en el núcleo no protege a las células contra el estrés osmótico.....	44
7. DISCUSIÓN.....	47
8. CONCLUSIONES.....	55
9. PERSPECTIVAS.....	56
10. REFERENCIAS	57
11. APÉNDICE.....	63
11.1. Artículo: Ineffective Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1p in Response to High Osmotic Stress in the Yeast <i>Kluyveromyces lactis</i>	64

RESUMEN

Kluyveromyces lactis es una levadura que cuando se somete a un estímulo hiperosmótico responde activando la proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK) Hog1p (KIHog1p) por medio de dos ramas que están conservadas, SLN1 y SHO1. Las mutantes interrumpidas en una rama pueden responder a hiperosmolaridad externa activando a KIHog1p por fosforilación, excepto en mutantes sencillas $\Delta Kiste11$ y $\Delta Kiste50$, en las cuales se observa sensibilidad al estrés hiperosmótico, aún cuando la rama SLN1 funcione adecuadamente. La inactivación de ambas ramas, por la delección de los genes *KISHO1* y *KISSK2*, también produce sensibilidad a altas concentraciones de sal. En este trabajo se observó que una mutante sencilla $\Delta Kiste11$ y una doble mutante $\Delta Kisho1 \Delta KIssk2$, muestran sensibilidad al estrés hiperosmótico y contrario a lo que se esperaba, se induce la fosforilación de KIHog1p en respuesta a estrés osmótico. Además, en mutantes que no tienen ninguna de las MAPK cinasas cinasas (MAPKKK) presentes en *K. lactis* (KISSte11p and KISSk2p), el estrés hiperosmótico induce la fosforilación y la internalización al núcleo de KIHog1p. Sin embargo, este hecho no es suficiente para inducir la expresión transcripcional del gen *KISTL1* y las células son incapaces de crecer en un medio con alta osmolaridad. La fosforilación de KIHog1p por la vía tradicional o en mutantes donde las ramas de SHO1 y SLN1 están inactivas requiere la presencia de KIPbs2p y así como de su actividad de cinasa. Esto indica que cuando las ramas de SHO1 y SLN1 están inactivas, el estrés hiperosmótico activa una rama independiente que puede activar a KIPbs2p, lo cual ocasiona una fosforilación de KIHog1p que no protege a la célula contra el estrés hiperosmótico. Finalmente, se encontró que cuando KISSte11p se localiza en la membrana mediante la adición de los cuatro segmentos transmembranales de KISho1p es capaz de revertir la sensibilidad al estrés hiperosmótico que se observa en la doble mutante $\Delta Kisho1 \Delta KIssk2$, indicando que esta proteína híbrida puede reemplazar a KISho1p y KISSk2p.

ABSTRACT

When treated with a hyperosmotic stimulus, *Kluyveromyces lactis* cells respond by activating the mitogen-activated protein kinase (MAPK) *K. lactis* Hog1p (KIHog1p) via the two conserved branches SLN1 and SHO1. Mutants affected in only one branch can cope with external hyperosmolarity by activating KIHog1p by phosphorylation, except for single $\Delta Kiste11$ and $\Delta Kiste50$ mutants, which show high sensitivity to osmotic stress, even though the other branch (SLN1) was intact. Inactivation of both branches by deletion of *KISHO1* and *KISSK2* also produced sensitivity to high salt. Interestingly, we have observed that in $\Delta Kiste11$ and $\Delta Kisho1\Delta KIssk2$ mutants, which exhibit sensitivity to hyperosmotic stress, and contrary to what would be expected, KIHog1p becomes phosphorylated. Additionally, in mutants lacking both MAPK kinase kinases (MAPKKKs) present in *K. lactis* (KISte11p and KISsk2p), the hyperosmotic stress induced the phosphorylation and nuclear internalization of KIHog1p, but it failed to induce the transcriptional expression of *KISTL1* and the cells were unable to grow on high-osmolarity medium. KIHog1p phosphorylation via the canonical HOG pathway or in mutants where the SHO1 and SLN1 branches have been inactivated requires not only the presence of KIPbs2p but also its kinase activity. This indicates that when the SHO1 and SLN1 branches are inactivated, high-osmotic-stress conditions activate an independent input that yields active KIPbs2p, which, in turn, renders KIHog1p phosphorylation ineffective. Finally, we found that KISte11p can alleviate the sensitivity to hyperosmotic stress displayed by a $\Delta Kisho1\Delta KIssk2$ mutant when it is anchored to the plasma membrane by adding the KISho1p transmembrane segments, indicating that this chimeric protein can substitute for KISho1p and KISsk2p.

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. LA RESPUESTA DE LAS LEVADURAS A LAS SEÑALES DEL AMBIENTE

La adaptación a cambios en el ambiente es muy importante para que los organismos puedan sobrevivir. Los mecanismos de adaptación se pueden dividir en tres fases: percepción de una señal externa, transmisión de la señal y finalmente una respuesta adaptativa. En las levaduras se han caracterizado una amplia variedad de vías de transducción de señales encargadas de responder a estímulos externos. **(Hohmann & Mager, 1997).**

Los eucariontes poseen vías conservadas compuestas por MAPK cinasas, las cuales desempeñan un papel importante en la respuesta a diversos factores ambientales como los factores de crecimiento, las citocinas, la radiación UV y diferentes tipos de estrés. Estas vías de señalización están compuestas por 3 proteínas cinasas secuenciales y esenciales; una MAPK cinasa-cinasa-cinasa (MAPKKK o MEKK), una MAPK cinasa-cinasa (MAPKK o MEK) y una MAPK cinasa (MAPK) **(Widmann, 1999)**. La MAPKKK fosforila y activa a la MAPKK que, subsecuentemente, fosforila y activa a la MAPK. Normalmente esta última proteína se transloca al núcleo donde fosforila a sus proteínas blanco. Las diferentes vías de MAPK cinasas forman un sistema interactivo de señalizaciones, lo que conforma una red compleja de respuestas entre distintas vías, que mantienen su especificidad a través de proteínas reclutadoras **(Proft & Struhl, 2004)**.

1.2. EL ESTRÉS OSMÓTICO

Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el cual se desarrolla un organismo. Las levaduras han desarrollado mecanismos para detectar los cambios de osmolaridad en el ambiente y la adaptación a estos cambios es un proceso activo que sirve para generar una respuesta adecuada para mantener la actividad celular **(Blomberg & Adler, 1992)**.

La respuesta inmediata al estrés, se da en segundos; hay salida del agua intracelular, seguida de un proceso adaptativo a largo plazo para llevar a cabo un ajuste osmótico. Debido al movimiento del agua, las concentraciones intracelulares de iones y de moléculas se incrementan y esto da como resultado una disminución en la actividad celular; una vez que el organismo logra adaptarse a estas condiciones, el crecimiento continúa **(Folch-Mallol, 2004)** (Figura 1).

La proliferación celular se reanuda después de varias horas. El período de adaptación depende de varios factores, tales como el tipo y la severidad del estrés, el fondo genético de la cepa, y la etapa del ciclo celular en la cual se encuentre la célula **(Blomberg, 2000)**. En esta fase de aclimatación las células experimentan una serie de cambios como la reestructuración del citoesqueleto de actina, la interrupción transitoria del ciclo celular y la reprogramación del metabolismo. Al mismo tiempo, se inducen mecanismos involucrados en la resistencia al estrés, como son el aumento en la concentración intracelular del glicerol y la exclusión de iones tóxicos. Además, se induce la expresión de una serie de genes cuyos productos participan en diferentes sistemas y/o procesos como el metabolismo redox, la transcripción y traducción de proteínas chaperonas y el reajuste en los niveles de carbohidratos, lípidos y aminoácidos **(Kim S & Shah K, 2007)**.

En la levadura el balance hídrico se re-establece mediante la acumulación de glicerol como osmolito compatible **(Nevoigt & Stahl, 1997)** (Figura 1), aunque también puede acumular trehalosa y glicerofosfolina **(Kiewietdejonge, 2006)**. El flujo de glicerol a través de la membrana se realiza por medio de una proteína transportadora, el canal a través del cual fluye el glicerol se cierra rápidamente después del estrés osmótico para retener el glicerol que se va sintetizando y evitar su salida **(Burg, 2008)** (Figura 1).

Otras levaduras y hongos producen y/o acumulan diferentes moléculas que funcionan como osmolitos compatibles, entre los cuales están los aminoácidos, algunos polioles y azúcares (eritritol, ribitol, arabinitol, xilitol, sorbitol, manitol y galacticol), las metilaminas y los compuestos metilsulfonados **(Yancey, 2005; Burg, 2008)**.

Osmoregulación en las levaduras

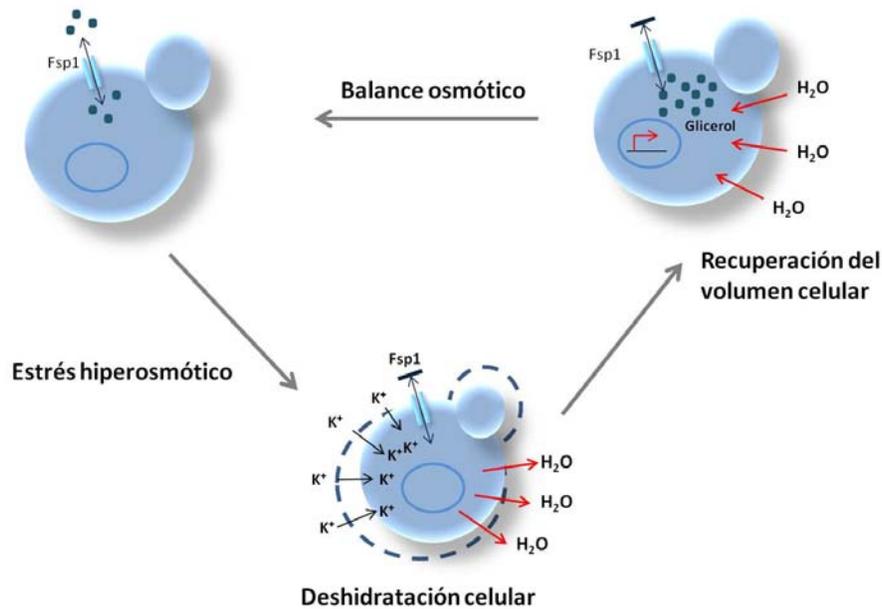


Figura 1. Esquema de la osmoregulación en levaduras. Cuando hay un aumento en la concentración de osmolitos en el ambiente extracelular, rápidamente inicia la salida de agua de la célula lo que lleva a la pérdida de la turgencia de la membrana y a una disminución en el volumen celular. En la fase de adaptación, se sintetiza y acumula glicerol, se recupera agua y con ello se restablece la turgencia de la membrana y el volumen celular (Tomado y modificado de Kühn & Gennermark, 2013).

1.3. LA VIA DE RESPUESTA AL ESTRÉS HIPEROSMOTICO EN *S. cerevisiae*

La vía HOG es una de las vías de MAP cinasas mejor caracterizadas en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Revisado en Hohmann, 2002) y está involucrada en producir solutos compatibles como el glicerol, el cual es necesario para evitar el daño a las estructuras celulares y a diferentes macromoléculas, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función en condiciones de alta osmolaridad (Burg, 2008). Esta levadura detecta fluctuaciones en el gradiente osmótico a través de cambios en la tensión de membrana y este “estiramiento” desencadena una respuesta mediada por la MAPK Hog1p (Brewster & Gustin, 2014).

En *Saccharomyces cerevisiae* la vía HOG se compone de las ramas Sln1p (**Posas, 1996**) y Sho1p (**Maeda, 1995**). Cada una involucra una proteína transmembranal que actúa sobre otros componentes que se encuentran río abajo de la vía. Ambas ramas convergen en la MAPKK Pbs2p, la cual mediante fosforilación activa a la MAPK Hog1p. Hog1p fosforilada se transloca al núcleo para regular la transcripción de varios genes (**Posas, 1997; Ferrigno, 1998**).

1.3.1. LA RAMA SLN1

La rama de SLN1 es una variación de los sistemas de dos componentes descritos para bacterias. Esta rama consiste en un sistema de fosforrelevo el cual se encuentra activo bajo condiciones normales de presión en la membrana (**Fassler & West, 2010**) (Figura 2a). Este sistema está conformado por la proteína transmembranal homodímera Sln1p que contiene un dominio cinasa de histidina (HK) y un dominio aceptor de fosfatos, Ypd1, que es la proteína que se encarga de transferir el fosfato a un residuo de aspartato (D) en el dominio aceptor de la proteína reguladora de respuesta Ssk1, la cual fosforilada es incapaz de activar a las MAPKKK río abajo (Figura 2b). Cuando la célula se encuentra en condiciones de estrés osmótico disminuye la presión en el turgor de la membrana, deshidratando la célula y ocasionando una reducción en su volumen, esta serie de procesos inhiben la autofosforilación de Sln1p por lo que Ypd1p interrumpe la transferencia de fosfatos y esto permite la acumulación de la forma no fosforilada de Ssk1, la cual que interactúa con el dominio amino terminal de la MAPKKK Ssk2p favoreciendo su autofosforilación (**Posas & Saito, 1998**) y de esta manera puede activar a Pbs2p y ésta a su vez a Hog1p. Hog1p fosforilada se internaliza en el núcleo (**Posas, 1996; 1997**) (Figura 4).

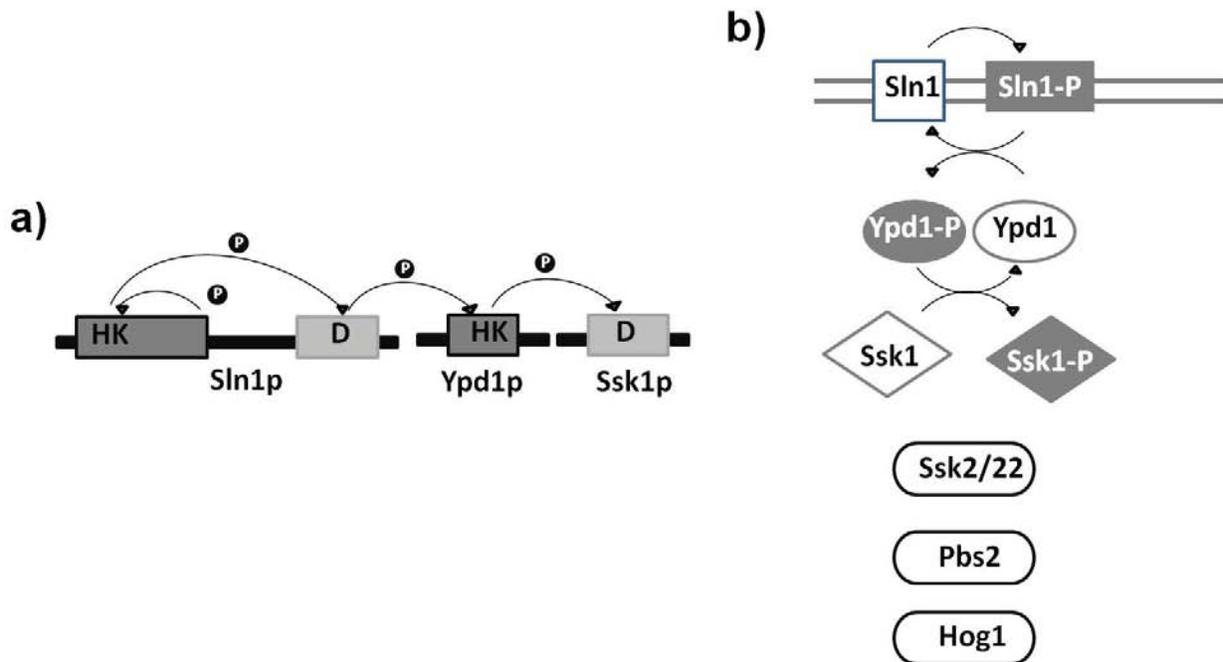


Figura 2. Sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae*. a) Esquema del mecanismo de transferencia del fosfato entre Sln1p→Ypd1→Ssk1. El dominio cinasa de histidina (HK) de Sln1p transfiere el fosfato al dominio aceptor aspartato (D) localizado en la misma proteína, posteriormente el fosfato se transfiere a Ypd1p y después a Ssk1p. b) Vía SLN1 en condiciones isoosmóticas, las flechas indican las reacciones de transferencia del fosfato. Los elementos activos se encuentran en gris y los componentes inactivos en blanco (Tomado y modificado de Posas, 1996).

1.3.2. LA RAMA SHO1

La rama de SHO1, se compone de varias proteínas entre las cuales están Sho1p, Cdc42, Ste20p, Ste11p y Ste50p y algunas de estas participan en otras vías de señalización en levaduras: Sho1p, Cdc42p, Ste20p, Ste50p y Ste11p participan en la vía de crecimiento filamentoso y al menos Cdc42p, Ste20p y Ste11p son importantes en la vía de respuesta a feromonas. Sin embargo, la activación de estas proteínas a través de un estímulo específico induce, en cada caso una respuesta adaptativa específica (**Dohlman & Thorner, 2001**).

Sho1p es una proteína que se localiza predominantemente en la membrana plasmática en regiones de crecimiento apical, como en las zonas en las cuales emerge la gema o en el cuello de la misma (**Raitt, 2000; Reiser, 2000**). Sho1p es una proteína de 367 aminoácidos y está compuesta de una región amino terminal con cuatro dominios transmembranales separados por 3 asas cortas de 5 a 8 aminoácidos cada

una (Maeda, 1995). Tiene una región carboxilo terminal que le sirve para interactuar con otras proteínas. Sho1p se requiere para la activación de la rama de SHO1 en la vía HOG1 y funciona como una proteína de andamiaje ya que se ha demostrado que participa en al menos dos interacciones funcionales, ya que contiene un dominio SH3 en la región del carboxilo terminal que le permite interactuar con una región rica en prolina de la MAPKK Pbs2p. Esta interacción ocurre de manera constitutiva y es independiente de Hog1p (Zuzuarregui, 2015). En la misma región carboxilo terminal Sho1 tiene un dominio a través del cual interactúa con la MAPKKK Ste11p (Maeda, 1995; Zarrinpar, 2004). El anclaje a la membrana es esencial para que Ste11p pueda activar de manera eficiente a Pbs2p (figura 3 y 4).

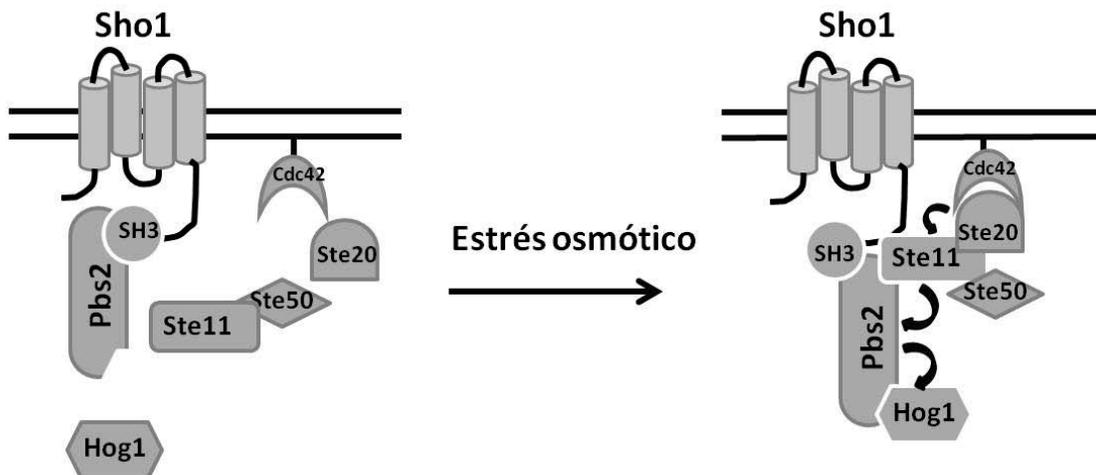


Figura 3. Activación de la rama SHO1. Cuando la célula se encuentra en condiciones isoosmóticas las proteínas se encuentran en el citoplasma. Después de la exposición a estrés osmótico Sho1p a través de su interacción con Pbs2p y Ste11p lleva al complejo de proteínas a la membrana para activar a Hog1p (Tomado y modificado de Zarrinpar, 2004 y Zuzuarregui, 2015). Las flechas indican la cascada de activación del módulo de MAPK cinasas.

Cuando la célula se encuentra en estrés hiperosmótico, los elementos río arriba de la vía de SHO1 permiten la activación de Ste11p a través de diferentes proteínas entre las cuales están Cdc42p que es una proteína G monomérica del tipo Rho que se une a Ste20p, una proteína que pertenece a la familia de las PAK cinasas (cinasas activadas por p21) (figura 3 y 4). Ste20p en su forma activa, fosforila a la MAPKKK Ste11p en la Ser 281, Ser 285 y la Thr 286, que favorece la disociación del dominio inhibitorio de la región amino terminal del dominio catalítico carboxilo terminal

(Tatebayashi, 2006). Ste11p también se une a Ste50p a través de un dominio SAM (motivo alfa estéril) que se encuentra en el amino terminal de la proteína adaptadora, este suceso permite que el dominio inhibitorio amino terminal de Ste11p se disocie del dominio cinasa localizado en el carboxilo terminal **(Wu, 1999)**.

La interacción entre Ste50p y Ste11p es constitutiva, mientras que la fosforilación de Ste11p sólo ocurre en condiciones de estrés osmótico. Sin embargo ninguno de los eventos anteriormente mencionados es suficiente para activar la vía HOG. Esta vía se puede activar de forma constitutiva sólo cuando se sobreexpresa una versión de Ste11p que carece del dominio inhibitorio amino terminal **(Lamson, 2006)**. Además la hiperactivación de la vía mediada por mutaciones puntuales en el dominio SH3 de Sho1p requiere de una mutación adicional en Ste11p que la mantenga hiperactiva. Esto sugiere que la activación de la vía HOG después del choque osmótico requiere que Ste11p esté activado y concentrado en la membrana y esto se lleva a cabo por medio de su unión con Ste50p la cual se ancla a la membrana a través de su asociación con Opy2p, Cdc42p y Sho1p **(Drogen, 2000; Zarrinpar, 2004)**. La arquitectura del complejo asociado a la membrana se establece por interacciones directas entre la parte citoplásmica de Sho1p con Ste11p y esta interacción favorece que Ste11p interactúe de manera eficiente con su sustrato Pbs2p, el cual también se localiza en la membrana mediante su interacción con el dominio SH3 de Sho1p (Figura 4). Además, el reclutamiento de Ste11p a los sitios de ensamble de complejos localizados en la membrana para responder a alta osmolaridad, es muy relevante para evitar el entrecruzamiento entre la vía de respuesta a feromonas y la vía de crecimiento filamentoso, ya que cuando la interacción mediada por SH3 se interrumpe, puede ocasionar entrecruzamiento con la vía de apareamiento, probablemente por la activación de la MAPKKK Ste7p.

Es importante reconocer que Sho1p no solo participa como un osmosensor si no también como una proteína adaptadora (como ya se mencionó anteriormente), que funciona como un conector de diferentes señales entre la pared celular y las cascadas de MAPK a través de la formación de diferentes complejos que están asociados a la

membrana. En las vías de crecimiento filamentoso y osmoregulación Sho1p requiere a Msb2p y Hkr1p, que son proteínas de un cruce transmembranal y una región extracelular altamente glicosilada, las cuales estimulan la función de andamiaje coordinada por Sho1p y Pbs2p (**Tatebayashi, 2007; de Nadal, 2007**) (figura 4). Estas proteínas son parecidas a las mucinas que en humanos son componentes principales de la mucosa que cubre la superficie del epitelio interno y el glicocálix. La interacción de los dominios extracelulares glicosilados con la red de quitina y glucanos podrían ayudar a percibir el estrés osmótico de una manera similar a lo que ocurre con Sln1p. La deshidratación de la pared ocasiona cambios en la superficie de contacto entre la membrana y la pared celular y esto podría ser detectado por estas mucinas y activar la vía HOG1 a través de Sho1p, aunque por mecanismos de interacción diferentes. La forma activa de Msb2p interactúa con la proteína citosólica Bem1p para reclutar a Ste20p o Cla4p a la membrana y activar a Ste11p. La activación de la vía HOG por Hkr1p no requiere a Bem1p (**Tanaka, 2014**). La proteína transmembranal Opy2p tiene solo un dominio transmembranal y su región carboxilo terminal citoplásmica tiene múltiples sitios de unión funcionalmente distintos para Ste50p, la proteína adaptadora necesaria para la señalización entre Ste11p y Pbs2p (**Yamamoto, 2010**) (figura 4).

Respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae*

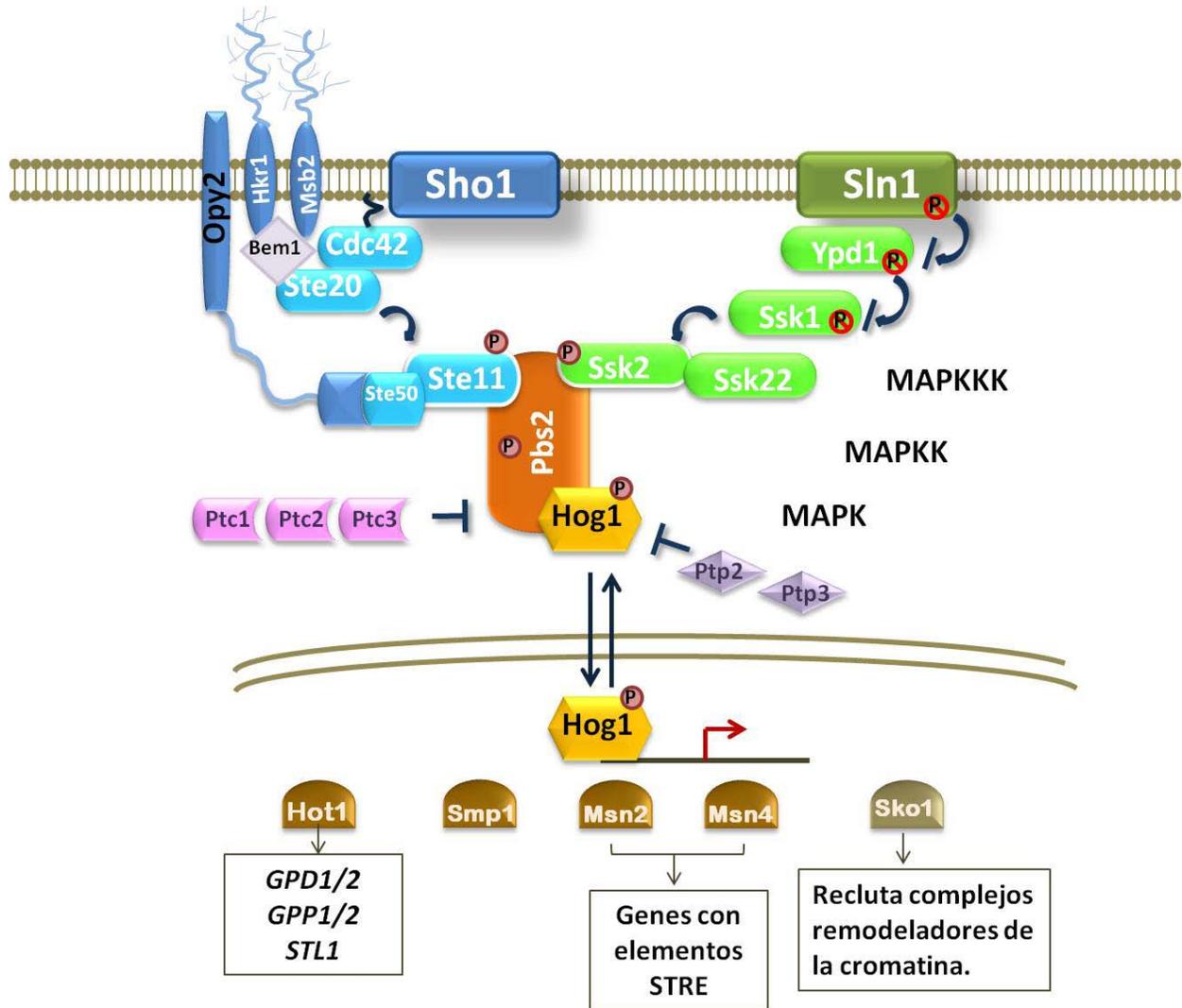


Figura 4. La vía HOG de la respuesta al estrés osmótico. En condiciones iso-osmóticas el fosforrelevo de la rama SLN1 se encuentra activo transfiriendo un grupo fosfato de Sln1p a Ssk1p; y las proteínas de la rama SHO1 están localizadas en el citoplasma. Cuando se eleva la concentración de osmolitos en el ambiente, el fosforrelevo se detiene para que Ssk1p en condiciones no fosforiladas permita la activación de Ssk2/22p. En la rama SHO1 las proteínas son rápidamente reclutadas a la membrana para permitir una cascada de fosforilación de Ste20p a Ste11p y posteriormente a Pbs2p que es la MAPKK donde convergen ambas vías. Pbs2p se encarga de fosforilar a Hog1p para que esta MAPK entre a núcleo y active diversos genes blanco (Tomado y modificado de Hohmann, 2002; Brewster, 2014).

1.4. LA IMPORTANCIA DE LA VÍA HOG

Se ha considerado que es una ventaja tener dos ramas de señalización ya que esto provee de un comportamiento robusto a las perturbaciones que puede sufrir la célula. Mediante estudios en biología de sistemas se identificó que la rama de SLN1 en *S. cerevisiae* es la más importante ya que controla casi el total de los mecanismos de osmoadaptación y también ayuda a darle especificidad a la vía de respuesta a estrés osmótico, mientras que la rama de SHO1 puede desempeñar el papel de transmitir señales provenientes de otras vías como la vía de integridad de la pared celular, además de contribuir a que las células se adapten a un estrés osmótico moderado. Esta puede ser una de las razones por la que la rama SLN1 esté evolutivamente más conservada en otras levaduras y hongos que la rama SHO1 (**Parmar, 2009**).

Las dos ramas que conforman la vía HOG han sido consideradas como redundantes ya que convergen en la activación de la MAPKK Pbs2p. Se han realizado estudios en mutantes de cada una de las ramas. Si se intercepta la señal en la rama SLN1, la rama SHO es capaz de activar a la MAPK Hog1p y viceversa. Sin embargo, cuando se eliminan componentes de ambas ramas, como en $\Delta ssk2\Delta ssk22 \Delta sho1$ o $\Delta ssk2\Delta ssk22\Delta ste11$, ó en la MAPKK Pbs2p, las células de *S. cerevisiae* muestran sensibilidad a estrés hiperosmótico (**Posas & Saito, 1997**). Después del estímulo con estrés hiperosmótico Pbs2p fosforila a Hog1p en un motivo Thr-X-Tyr lo cual conduce a cambios estructurales y a un aumento rápido de su actividad. Posterior a la fosforilación, Hog1p se transloca al núcleo (**Bell & Engelberg, 2003**).

1.5. LA ACTIVIDAD DE Hog1p EN EL NÚCLEO

Después del estímulo con estrés osmótico Hog1p se transporta al núcleo en segundos y mantiene su actividad alrededor de 20 minutos, mientras se produce la respuesta adaptativa (acumulación de glicerol), y después disminuye gradualmente hasta alcanzar sus niveles de fosforilación basales después de una hora, aún cuando las células permanezcan expuestas al estrés osmótico (**Reiser, 1999**). Mediante un análisis de microarreglos se identificó que la señalización inducida por Hog1p afecta

alrededor del 70% de los genes de respuesta a estrés general (**Rep, 2000**) y regula la expresión de más de 300 genes en respuesta al estrés osmótico. Mientras la MAPK Hog1p permanece en el núcleo lleva a cabo diferentes funciones, una de ellas es la fosforilación de factores de transcripción como Hot1p, Sko1p, Msn2/4p y Smp1p con lo cual modula la actividad transcripcional de varios genes involucrados en la osmoadaptación (**Hohmann, 2002; Ni L, 2009**). Los factores de transcripción Msn2/4p son mediadores importantes en los cambios de expresión génica a través de la secuencia reguladora STRE (stress response element). Hog1p además induce la redistribución del complejo de la RNA polimerasa II y estimula el remodelamiento de la cromatina, mediante el reacomodo de nucleosomas para favorecer la actividad transcripcional de los promotores de genes de respuesta al estrés (**Alepuz et al. 2003**).

Entre los genes que se regulan por Hog1p se encuentran los que están relacionados con la síntesis y el transporte del glicerol. El gen *GPD1* codifica para una enzima que convierte la fosfato-dihidroxiacetona (DHPA) en glicerol; el gen *GPD2* codifica para la Glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa y los genes *GPP1* y *GPP2* codifican para la Glicerol-3-fosfatasa (**Blomberg, 2000; Brewster & Gustin, 2014**). El gen *STL1* codifica para el simportador glicerol-protón (**Ferreira & Lucas, 2007; Rep, 2000**). En el citoplasma, la activación de Hog1p induce el cierre del canal Fsp1p (**Lee, 2013**). La síntesis, el transporte y la acumulación de glicerol ayuda a la célula a restablecer el balance osmótico, lo que conlleva a que la levadura pueda sobrevivir en un medio con alta osmolaridad (**Posas, 1998**).

1.6. LA REGULACIÓN DE LA VÍA HOG

Después de que se lleva a cabo el proceso de adaptación a alta osmolaridad, la vía HOG se regula de manera negativa y a diferentes niveles. La actividad de Hog1p durante la osmoregulación es necesaria para estimular la defosforilación del propio Hog1p y para inhibir la activación de otras vías de señalización como la de crecimiento filamentoso y la respuesta a feromonas. Hog1p es defosforilado en mediante las fosfatasas Ptp2p, Ptp3p (que reconocen residuos de tirosina de proteínas del núcleo y del citoplasma respectivamente) y Ptc1p, Ptc2p y Ptc3p (fosfatasas para residuos de serina/threonina) que actúan sobre los residuos de la threonina 174 y la tirosina 176

(Saito & Tatebayashi, 2004). Por otro lado Hog1p también fosforila a Ste50p en diferentes sitios para disminuir su afinidad por la proteína transmembranal Opy2p y de esta manera inhibir la activación de la MAPK de crecimiento filamentoso Kss1p durante el estrés osmótico **(Hao, 2008; Yamamoto, 2010)**. Sho1p también se regula negativamente por fosforilación dependiente de Hog1p. Cuando esto ocurre, Sho1p se monomeriza y se inactiva **(Hao, 2007)**. La inhibición por retroalimentación de los componentes de la vía HOG es muy importante para evitar una hiperestimulación ocasionada por el estrés osmótico que pueda conducir a la muerte celular y para prevenir la activación de otras vías con las cuales se comparten algunos componentes.

1.7. PAPEL DE Hog1p EN LA REGULACIÓN DE LA FISIOLÓGIA CELULAR

1.7.1. LA REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.

El ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae* se compone de cuatro fases consecutivas: fase S (o de síntesis de DNA), fase M (o mitosis), y fases G1 y G2. La progresión del ciclo celular es dependiente de la presencia de nutrientes y del estrés. En condiciones de estrés osmótico, Hog1p es capaz de modular transitoriamente la progresión del ciclo celular para permitir que las células produzcan una respuesta osmoadaptativa. La progresión del ciclo celular depende en gran parte del grado de estrés, ya que una activación prolongada de Hog1p puede conducir a la muerte celular **(Vendrell A, 2011)**. La activación de Hog1p ocasiona un retraso en la fase G1 mediante dos mecanismos: el primero consiste en la inhibición de la transcripción de genes que codifican para las ciclinas, Cln1p y Cln2p; y el segundo paso es la fosforilación de Sic1p, un inhibidor de la cinasa dependiente de ciclina (CDK). Hog1p también es capaz de modular la progresión de la fase S mediante la regulación de las ciclinas Clb5p y Clb6p (retrasa su expresión), además interactúa con varias proteínas de los complejos de replicación y retrasa la fosforilación de la subunidad Dpd2p de la DNA polimerasa **(Yaakov, 2009; Adrover, 2011)**. En la progresión a la fase G2, Hog1p disminuye la actividad de cinasa del complejo ciclina/CDK, Clb2/Cdc28, además de

regular a Clb2p (**Clotet, 2007**) y después del estrés osmótico, Hog1p promueve que la célula pueda llevar a cabo la mitosis (**Reiser, 2006**).

1.7.2. LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS PROTEICA

Como consecuencia del aumento de osmolaridad externa, las levaduras inhiben transitoriamente la velocidad de la síntesis de proteínas la cual continúa a niveles normales después de un período de adaptación. La duración en el retraso de la traducción está directamente relacionada con la severidad del estrés (**Uesono & Tohe, 2002**). Hog1p fosforila y activa a la proteína cinasa Rck2p la cual está involucrada en la regulación de la traducción ya que fosforila al factor de elongación EF-2 que tiene como consecuencia la inhibición de la síntesis de proteínas (**Bilsland-Marchesan, 2000 & Teige, 2001**). Se sabe que durante la adaptación general al estrés se activa la expresión de un gran número de genes y sólo algunos son completamente dependientes de Hog1p, ya que cuando Hog1p está activo, estimula la síntesis de proteínas codificadas por estos genes, lo cual sugiere que existe una traducción preferente de determinados mRNAs bajo condiciones de hiperosmolaridad, aunque las bases moleculares de este fenómeno no están todavía esclarecidas (**Melamed, 2008; Warringer, 2010**).

1.7.3. LA REGULACIÓN DE LA RESPUESTA RETRÓGRADA

En levaduras la actividad mitocondrial regula la expresión de genes nucleares que están involucrados en la biogénesis y algunas funciones de la mitocondria, a este proceso se le llama respuesta retrógrada (RTG). En *S. cerevisiae* la vía de respuesta retrógrada funciona como un mecanismo de respuesta al estrés, en el cual se ajustan las rutas metabólicas y biosintéticas para compensar las alteraciones ocasionadas por la exposición de la célula a condiciones adversas (**Liu & Butow, 1999**). Cuando la vía de la RTG se encuentra inactiva, el complejo de transcripción heterodimérico Rtg1p/Rtg3p se localiza en el citoplasma. Después de la activación a través de Rtg2p, el complejo Rtg1p/Rtg3p se disocia para translocarse al núcleo. En respuesta al estrés hiperosmótico Hog1p regula la acumulación en el núcleo del complejo Rgt1/Rgt3p, así como su asociación con los promotores de la respuesta RTG y además controla la

actividad transcripcional de *RGT3*. La participación de Hog1p a diferentes niveles en la RTG, es esencial para la regulación de genes que son importantes para la actividad mitocondrial durante la adaptación al estrés osmótico **(Ruiz-Roig, 2012)**.

1.8. LA VIA HOG EN OTRAS LEVADURAS

La vía de Hog1 fue descrita hace tiempo y se ha estudiado ampliamente en *S. cerevisiae*. Sin embargo, son pocos los estudios que se han realizado en otras levaduras, entre las cuales están *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida albicans*.

En *S. pombe* por ejemplo se ha descrito la vía de Sty1p muestra algunas similitudes con la vía HOG, en cuanto a que responde al estrés osmótico y activa genes que son requeridos para la adaptación a condiciones de estrés hiperosmótico **(Degols, 1996; Hohmann, 2002)**. Sin embargo, Spc1/Sty1p no es una proteína que responda únicamente a condiciones de hiperosmolaridad, también se ha descrito que puede activarse en presencia de altas temperaturas, estrés oxidativo **(Degols, 1996; Samejima, 1997)** y en condiciones de bajos niveles de nutrientes **(Shiozaki, 1996; 1997)**. La vía de Spc1/Sty1p parece estar más relacionada con vías de cinasas de la familia de Jnk1 o p38 que con la vía HOG de *S. cerevisiae* **(Degols, 1996)**. Además, otra diferencia importante de la vía de Spc1/Sty1p con respecto a la vía de Hog1p es su composición ya que en *S. pombe* no existe una proteína homóloga a Sho1p y la regulación de Spc1/Sty1p se lleva a cabo por el sistema de fosforrelevo que se activa por estrés oxidativo pero no por estrés osmótico **(Buck, 2001)**.

En *C. albicans* hay un respuesta central al estrés y ocurre de una manera específica dependiendo del nicho donde se encuentre la levadura, por ejemplo, en el humano promueve la sobrevivencia de este patógeno dentro del hospedero. En esta levadura la vía de la SAPK (Hog1p) (stress activated protein kinase) responde a una variedad de condiciones de estrés, entre otras al estrés oxidativo y al estrés osmótico **(Alonso-Monge, 2003; Smith, 2004)**, además de que presenta funciones en morfogénesis, en respuesta a estrés por bajos niveles de carbono y en respuesta a estrés por metales pesados entre otros. La vía de SAPK se regula únicamente por la MAPKKK Ssk2p ya que mutantes Δ *Cahog1* y Δ *Cassk2* muestran el mismo fenotipo en

condiciones de estrés osmótico, estrés oxidativo y en la morfología de crecimiento filamentoso. Además, en mutantes ΔCassk2 expuestas al estrés osmótico y oxidativo, CaHog1p no puede ser activado y no se acumula en núcleo (**Cheetman, 2007**). De manera similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, la respuesta a este tipo de estrés parece depender del sistema de fosforrelevo (**Hohmann, 2002; Kruppa, 2006**).

Aún cuando en *C. albicans* se han identificado genes homólogos de la rama SHO1 de *S. cerevisiae*, como la MAPKKK CaSte11p, estas proteínas no participan en la activación de CaHog1p en respuesta al estrés osmótico (**Cheetham, 2007**). En *C. albicans* Sho1p desempeña un papel importante en el control de la MAPK Cek1p que regula la biogénesis de la pared celular y la morfogénesis. Se mostró que las mutantes $\Delta\text{Caste11}$ y ΔCasho1 son sensibles a agentes inductores de estrés de pared celular. Esto indica que aunque la regulación de estas dos vías es similar en *S. cerevisiae* y *C. albicans*, la función de Sho1p en la regulación de Hog1p en estrés hiperosmótico parece ser exclusiva de *S. cerevisiae* (**Cheetham, 2007**).

Como se mencionó anteriormente en *S. cerevisiae* la vía SHO1 también transmite la señal en respuesta a daño en la integridad de la pared celular así como en el crecimiento filamentoso además del estrés hiperosmótico, lo cual en *C. albicans* no ocurre.

Las condiciones que estimulan la respuesta central al estrés en *C. albicans* son diferentes de las que inducen respuestas similares en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, además el circuito molecular que detecta y transduce las señales de estrés involucra vías de señalización que tienen que ver con el crecimiento y la sobrevivencia de *C. albicans* dentro del humano. *C. albicans*, *S. cerevisiae* y *S. pombe* no comparten el mismo nicho ecológico, por lo tanto es probable que las condiciones que activan una respuesta a estrés sean diferentes en cada una de las levaduras y se genere de manera específica de acuerdo al ambiente donde se desarrollan (**Smith, 2004**).

1.9. *Kluyveromyces lactis* COMO UN MODELO DE ESTUDIO

Kluyveromyces lactis es una levadura que pertenece a los ascomicetos, se ha aislado de diferentes nichos ecológicos y algunas cepas se desarrollan en productos lácteos y son capaces de fermentar lactosa. Es una levadura que se encuentra relacionada con *S. cerevisiae* y se considera un excelente modelo ya que tiene características metabólicas y fisiológicas diferentes **(Wesolowski-Louvel, 1996; Rodicio & Heinisch, 2013)**. *K. lactis* presenta un metabolismo fermentativo-respiratorio y la mayoría de las cepas pueden crecer en fuentes de carbono fermentables. El bloqueo en la respiración por la pérdida de DNA mitocondrial tiene un efecto letal porque esta levadura no es capaz de crecer en condiciones anaerobias estrictas **(Wesolowski, 1996)**.

El genoma de *K. lactis* está completamente secuenciado y se ha visto que a diferencia de lo que ocurrió en *S. cerevisiae*, en esta especie no hubo un evento de duplicación del genoma (WGD) **(OhEigeartaigh, 2011)**. Este hallazgo explica porqué los genes que participan en el metabolismo central y en vías de señalización son menos redundantes en *K. lactis*.

Como en todas las células eucariontes, *K. lactis* también utiliza vías MAPK para convertir las señales del ambiente en cambios intracelulares que generan una regulación de la expresión genética. En *K. lactis* se han estudiado tres vías de MAPK; la vía de respuesta a feromonas **(Coria, 2006)**, la vía de respuesta al estrés osmótico **(Kawasaki, 2008)** y la vía de integridad de la pared celular **(Backhaus, 2011)**. De manera general los componentes de la vía de respuesta a feromonas están conservados entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*, pero su funcionamiento es diferente. En *K. lactis* se encontró que además del dímero KIG $\beta\gamma$, la subunidad KIG α también transduce la señal río abajo y aumenta la eficiencia del apareamiento mediante la interacción con la proteína adaptadora KISTe50p **(Sánchez-Paredes, 2011)**. Se identificó que el módulo de MAPKs está constituido por la MAPKKK KISTe11p, la MAPKK KISTe7p y la MAPK KIFus3p, así como la proteína de andamiaje KISTe5p y el factor de transcripción KISTe12p. En un estudio realizado por Kawasaki y cols. **(2008)** se encontró que las

mutantes en algunos de los componentes del módulo de MAPK descritos para la vía de respuesta a feromonas (*KISTE11*, *KISTE20*, *KISTE50*) presentaban sensibilidad a estrés osmótico; así también una mutante en *KIHOG1* (**Kawasaki, 2008**) que codifica para la MAPK de la vía de respuesta al estrés osmótico previamente descrita para *S. cerevisiae*.

Cialfi y cols. (**2011**) reportaron un estudio en el cual una mutante del gen *KIHSL1* muestra defectos en la acumulación de glicerol y presenta aumento en la fosforilación de KIHog1p en condiciones de alta osmolaridad, además de presentar alteraciones en la pared celular y la composición de lípidos de la membrana.

En un estudio de comparación de genomas de diferentes especies de levaduras se encontró que en *K. lactis* están la mayoría de las proteínas ortólogas que en *S. cerevisiae* funcionan en la vía de respuesta al estrés hiperosmótico, excepto la MAPKKK Ssk22p (cinasa redundante de Ssk2p) (**Krantz, 2006**). Además de los estudios anteriormente mencionados, muy poco es lo que se ha investigado sobre la arquitectura y regulación de la vía de respuesta al estrés osmótico en la levadura *K. lactis* (**Rodicio & Heinisch, 2013**).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La vía de respuesta a estrés hiperosmótico (HOG) es una de las vías de señalización mejor estudiadas en *S. cerevisiae*. Hog1p ha sido identificada y caracterizada en diferentes hongos y se ha observado que puede haber diferencias importantes en cuanto al funcionamiento de la vía que activa esta proteína. En *K. lactis* se encuentran la mayoría de las proteínas que en *S. cerevisiae* funcionan en la vía de respuesta al estrés hiperosmótico. A excepción de un estudio genético en donde se observó el fenotipo de algunas mutantes, son pocos los reportes en los cuales se ha investigado la arquitectura y regulación de la vía de respuesta a estrés hiperosmótico en la levadura *K. lactis*. Para esto es importante realizar estudios que aporten un mayor conocimiento acerca de cómo funciona la vía HOG en esta especie y si las ramas SLN1 y SHO1 son redundantes o participan de manera diferencial para responder al estrés hiperosmótico. En este trabajo describimos la contribución que tiene la rama SHO1 en la respuesta al estrés osmótico en la levadura *K. lactis*, haciendo énfasis en la MAPKKK Ste11p, y describimos que la fosforilación de Hog1p puede ocurrir por una vía independiente de las dos ramas y que cuando esto ocurre no es suficiente para generar protección contra el estrés.

3. HIPÓTESIS

En *K. lactis* se encuentran la mayoría de los componentes de la vía HOG descritos para *S. cerevisiae*. Si las ramas SHO1 y SLN1 están conservadas en *K. lactis* las mutantes sencillas en cualquiera de las ramas no mostrarán sensibilidad en un medio hiperosmótico ya que en ausencia de una rama, la otra será capaz de compensarla. Sólo cuando ambas ramas sean interrumpidas, el crecimiento de las levaduras en un medio hiperosmolar será inhibido y KIHog1p no será fosforilado.

4. OBJETIVO GENERAL

- ◆ Estudiar la conservación de las ramas SHO1 y SLN1 de la vía HOG en *Kluyveromyces lactis* y su función en la respuesta al estrés hiperosmótico.

Objetivos Particulares

- ◆ Conocer cuáles son los componentes de la rama SHO1 que participan en la respuesta a estrés hiperosmótico en *Kluyveromyces lactis*.
- ◆ Determinar si KIHog1p se fosforila y cuál es su localización en respuesta al estrés hiperosmótico.
- ◆ Investigar si en condiciones de estrés osmótico, KIHog1p es capaz de inducir activación de genes blanco.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas, medios de cultivo y plásmidos

Las cepas de *Kluyveromyces lactis* utilizadas en este trabajo son MD2/1 (*MAT α argA lysA ura3*) (**Bianchi, 1987**) y 155 (*MAT α ade2 his3 ura3*) (**Saviñón-Tejeda, 2001**). La cepa DH5 α de *Escherichia coli* se utilizó para la propagación de plásmidos y para producir DNA para secuenciación. Para la selección de bacterias recombinantes se utilizó medio LB adicionado con 100 μ g/ml de ampicilina. Para levaduras se utilizó medio extracto de levadura peptona dextrosa (YPD) que contiene 1% de extracto de levadura, 2% de bactopectona y 2% de glucosa. Para la selección negativa del marcador URA3 se añadió 1mg/ml de 5-Ácido fluoroorotico (5-FOA). En el medio YPGal se sustituyó la glucosa al 2% por galactosa. Para las pruebas de estrés hiperosmótico se añadió a los medios YPD y YPGal, 0.7M de KCl y 1M de Sorbitol. Para selección de colonias levaduriformes con plásmidos se utilizó medio mínimo (SD) (base nitrogenada de levadura al 0.67% sin aminoácidos (DIFCO) y glucosa 2%) suplementado con aminoácidos y bases nitrogenadas requeridos, en una concentración de 50 μ g/ml. Para el medio SGal se sustituyó la glucosa 2% por rafinosa ó galactosa. Para los ensayos de Southern blot, tecnología de DNA recombinante y manipulación de levaduras se utilizaron protocolos ya descritos. El plásmido pGEM-Easy vector (Promega) se utilizó para clonar y secuenciar productos de PCR. El fagemido pBlueScript KSII se utilizó para la subclonación de productos de PCR. Para la interrupción de genes se utilizó el vector de integración Ylp352-URA (**Kawasaki L, 2008**). El vector YEpKDGal (**Kawasaki L, 2005**) se utilizó para inducir la expresión de genes utilizando galactosa.

5.2. Clonación y secuenciación de genes

Las mutantes de *K. lactis* $\Delta Klste20$, $\Delta Klste50$, $\Delta Klste11$, $\Delta Klpbs2$ y $\Delta Klhog1$ se realizaron por recombinación homóloga como se describe en Kawasaki *et al.*, 2008; y son isogénicas a la cepa MD2/1.

Se hizo una búsqueda en la base de datos del genoma de *K. lactis*, Genolevures project II (<http://cbi.labri.fr/Genolevures/elt/KLLA>) lo cual permitió identificar posibles marcos de lectura abiertos (ORF's) para los genes ortólogos *KISHO1* y *KISSK2* que en *S. cerevisiae* participan en la vía HOG.

Para amplificar al gen *KISHO1* se utilizaron los oligonucleótidos Sho1a [(-7) CAGAGAGATGGCGTTGAT (-11)] y Sho1b [(-1076) ATCAGTGTGATTTCCCAT (-1059)] y para el gen *KISSK2* se utilizaron los oligonucleótidos SSk2a [(-19) CAGTTCGTCGacTAAAGCCATGTC (-5)] y Ssk2b [(-4676) AACTTTTATGTCTtctAGAA CTAGTT (-4650)], las letras minúsculas indican las modificaciones realizadas para insertar los sitios de restricción (fragmento subrayado) *SalI* y *XbaI* respectivamente. Los fragmentos obtenidos por PCR se clonaron en pGEM-Easy vector ® (Promega) y posteriormente se enviaron a secuenciar para verificar que no se presentarán mutaciones que pudieran alterar la función del gen.

Para la interrupción el gen *KISHO1* se reemplazó el fragmento *BclI-PstI* (496-pb) por la secuencia URA3 del vector de integración Yip352. El plásmido pGEM-*KISHO1*URA3 se linearizó con las enzimas *EcoRI* y *SacI* que se encuentran en la secuencia de vector pGEM. En los extremos 3' y 5' hay secuencias de recombinación de 399 y 185pb respectivamente. Para interrumpir la función del gen *KISSK2* se subclonó el fragmento *EcoRI-HindIII* (1861-pb) en el vector de integración para levaduras Yip352 digerido previamente con las mismas enzimas. El plásmido Yip352-*KISSK2* se digirió con la enzima *XhoI* y se perdió un fragmento de 316pb. En el extremo 3' y 5' se dejaron secuencias de 483pb y 1189pb respectivamente para favorecer la recombinación.

La interrupción de los genes se realizó por recombinación homóloga en células MD2/1 *MAT α* . Las mutantes se seleccionaron en un medio sin uracilo. Para realizar dobles mutantes, las mutantes sencillas URA3+ se plaquearon en medio YPD con 5-FOA a 30°C hasta que aparecieron colonias.

Para generar las dobles mutantes, se utilizó como fondo genético una segregante $\Delta K/issk2URA^-$. Para la doble mutante $\Delta K/issk2 \Delta sho1$ se transformó con el plásmido pGEM-KISho1URA3 (utilizando el procedimiento anteriormente mencionado). Para la doble mutante $\Delta K/issk2 \Delta ste11$ se transformó siguiendo el protocolo descrito en

Kawasaki, 2008. Todas las interrupciones se analizaron y confirmaron mediante Southern blot.

El gen *KIPBS2* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos Pbs2a [(-7) TCCAATTATGAGTAATAG (-11)] y Pbs2b [(-2183) AGCTTAACTTACAATCCG (-2166)] El alelo *KIPBS2*^{KM} (donde KM indica la sustitución de la Lys⁴⁴⁷ por Met) se generó por PCR y se utilizó el oligonucleótido iniciador (-1327) TAATGGCCATGATGGAAGTCAGATT (-1351) que tiene una sustitución en la adenina 1339 por timidina (negritas) y el oligonucleótido Pbs2b como oligo reversa. Para un segundo PCR se utilizó el oligo Pbs2a y el producto del PCR1 como oligo reversa. Los productos de PCR obtenidos se subclonaron en el vector pGEM-T Easy. Para subclonar el gen silvestre y mutante *KIPBS2*, se digirió el vector PGEM-*KIPBS2* y pGEM- *KIPBS2*^{KM} con la enzima *NotI* que genera extremos romos, estos fragmentos se subclonaron en el vector YEpKDGal previamente digerido con *BamHI* y rellenado con la enzima Klenow.

5.2.1. Fusión KISho1TM-KISte11

La construcción pGEM-*KISTE11*, previamente descrita en Kawasaki *et al.* (2008), se digirió con la enzima *XhoI* y se obtuvo un fragmento de 2193 pb, el cual se incubó con la enzima Klenow y se subclonó en el vector YEpKDGalURA (**Saviñón-Tejeda, 2001**), previamente digerido con *EcoRI* y rellenado con la enzima Klenow. Como resultado de esto se generó el plásmido YEpKDGal-*KISTE11*. Para construir una proteína híbrida que incluyera los cuatro segmentos transmembranales de KISho1p fusionados al extremo amino terminal del ORF (open reading frame) de *KISTE11* se siguió el siguiente procedimiento: mediante una primera PCR se obtuvo un fragmento de 360pb etiquetado con 6 histinas utilizando como templado el plásmido pGEM-*KISHO1* y como cebador iniciador (FSho1) [(+1) ATG**CACCACCACCACC**ACTCTCATT
TTTTGGGCGATCCTTTT (+21)] en el cuál después del codón de inicio se insertó una secuencia de 6 histidinas en marco de lectura abierto (letras negritas). Como terminador se utilizó el oligonucleótido R-Sho1/Ste11 (TGACACGTC**ACTGCTC**

ATTGGAGATGCATTATCTCC) en el cuál los primeros 18 nucleótidos corresponden a la secuencia complementaria del extremo 5' de *KISTE11*, incluyendo el codón de inicio, los siguientes 18 nucleótidos corresponden a la secuencia de *KISHO1* en las posiciones +448 y +430 (subrayada). El producto de la PCR1 sirvió como iniciador para una segunda PCR en la cual se utilizó como templado el plásmido pGEM-*KISTE11*. En esta PCR se utilizó como oligo reversa R-Ste11 (+2223) AGTAACAATACcTCgAgACTG AAAACGGC (+2194) el cual se realizaron modificaciones en los nucleótidos (letras minúsculas) para insertar el sitio de restricción *XhoI* (subrayado). El producto final de la PCR se subclonó en el vector pGEM-T y se envió a secuenciar.

Para obtener el fragmento correspondiente al gen híbrido se digirió el plásmido pGEM-*KISHO1*TM/*STE11* con las enzimas *NcoI* y *XhoI* y después se rellenó con la enzima Klenow. El fragmento obtenido se subclonó en el vector de expresión YEpKDGalURA previamente digerido con la enzima *BamHI* y rellenado con Klenow.

Para la construcción que incluye la secuencia que codifica para los cuatro segmentos transmembranales (TM) de *KISho1p* se realizó una PCR utilizando como iniciador el oligo F-Sho1 y como terminador el oligonucleótido a Sho14t Rev (+430) TGGAGATGCTTAATCTCC (+448) el cual se modificó para insertar un codón de término (subrayado). El producto obtenido se subclonó en el vector pGEM-T Easy. Esta construcción se digirió con la enzima *EcoRI* y se obtuvo un fragmento de 372 pb que se subclonó en el vector YEpKDGalURA el cual previamente se digirió con la misma enzima. El plásmido resultante fue YEpKDGalSho1TM.

5.2.2. Fusión *KIHog1*-GFP

La amplificación del gen *KIHOG1*, que incluye su propio promotor se realizó por PCR utilizando como iniciador el oligonucleótido [(-499) TTCGCAAATCTTACTCTA (-482)] y como terminador a R-Hog1 [(+1352) GTTTAATTTATTtAgcTaACATTACTTT (+1323)] en el cual, se sustituyeron algunos nucleótidos (letras minúsculas) para insertar un sitio *Clal* antes del codón de término de *KIHOG1*. El producto de PCR se subclonó en el vector pGEM-T Easy. Esta construcción se digirió con las enzimas *PstI* -

ClaI y se obtuvo un fragmento de 1834pb el cual se subclonó en el plásmido pSGFP (donado por Bertha Michel) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Esta fusión permitió posicionar a la proteína verde fluorescente (GFP) en marco de lectura abierto en el extremo carboxilo terminal de *KIHOG1*. La construcción del gen híbrido en el vector pSbGFP se digirió con las enzimas *PstI-HindIII* y el fragmento obtenido se subclonó en el vector de expresión YEpKD (**Saviñón-Tejeda, 2001**) previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La construcción YEpKD-Hog1-GFP se utilizó para ensayos de expresión en levaduras.

5.3. Ensayos de estrés osmótico

Todas las cepas se incubaron a 30°C en agitación constante durante toda la noche en medio mínimo (SD) suplementado con los aminoácidos requeridos. Al día siguiente las células se diluyeron en medio fresco a una densidad óptica de 0.1 a 600nm (OD₆₀₀) y se incubaron en las mismas condiciones que el cultivo primario hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 (OD₆₀₀). En ensayos de expresión, el medio de cultivo SD se sustituyó por medio SGal para inducir la expresión del promotor de Galactosa. Para monitorear el crecimiento celular, se tomaron los cultivos en fase exponencial y se realizaron diluciones seriadas de 1:10, de las cuales se inocularon 5µl en cajas de YPD (o Sgal para las cepas que tienen plásmidos de expresión) con 0.7M KCl o 1M de Sorbitol. Las placas se incubaron a 30°C durante 48h y después se fotografiaron.

Para los ensayos de fosforilación de KIHog1p, las células se incubaron a 30°C en medio líquido a hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 (OD₆₀₀). Después se centrifugaron, se lavaron agua y se resuspendieron en medio fresco. Cada suspensión de células se incubó con y sin tratamiento, con 0.5M KCl durante 5 minutos y después se realizó la extracción de proteínas y los ensayos de Western blot.

5.4. Ensayos de apareamiento

Se hicieron parches de la cepa mutante sobre medio selectivo (SGal-ura) y la cepa silvestre se plaqueó en un medio rico, las dos se incubaron a 30°C durante 24 horas. Para llevar a cabo el apareamiento, ambas cepas se replicaron en terciopelos,

se recuperaron en medio rico (YPD) y se incubaron a 30°C durante 8h. Después de este tiempo se replicaron, se pasaron a una caja de medio mínimo (SD) y se incubaron a 30°C durante 48h para recuperar las células diploides. Después de este tiempo se tomaron fotografías de las placas.

5.5. Ensayos de Western blot

Las células se incubaron a 30°C en medio YPD o SGal (para cepas que tienen plásmidos) durante toda la noche en agitación. Al otro día se inoculó en medio fresco y se inició el cultivo a una densidad óptica de 0.1 (OD_{600}) y se incubaron en las mismas condiciones que el cultivo inicial hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 (OD_{600}). Posteriormente las muestras se incubaron con y sin tratamiento con KCl 0.5M durante 5 minutos. Después de la incubación las células se trataron con ácido tricloroacético (TCA) al 85% durante 10 minutos y se centrifugaron, el sobrenadante se removió cuidadosamente por aspiración con vacío. El pellet se resuspendió en un buffer de lisis (250 mM Tris [pH 6.8], 0.5 M ditiotreitól (DTT), SDS 10%, glicerol 20%, azul de bromofenol 0.5%) que se ajustó a pH 8.8 con una solución de Tris 1.5M. Después se adicionó un volumen de 0.5 mm de perlas de vidrio y se agitó en el vórtex durante 3 minutos. Siguió 1 minuto de centrifugación y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se incubó a 95°C durante 5 minutos. Las proteínas se sometieron a electroforesis en geles de SDS- acrilamida al 10% y después se transfirieron a una membrana de polivinilideno difluoride inmovilizada (Millipore Corporation). La membrana se bloqueó con leche al 7% durante 30 min y se incubó toda la noche con el anticuerpo primario anti-fosfo-p38 (rabbit monoclonal anti-phospho-p38 antibody, Cell Signaling Technology). Al otro día la membrana se lavó 3 veces durante 10 minutos a temperatura ambiente con una solución de PBS (phosphate-buffered saline) – 0.1% Tween 20 y después se incubó con el anticuerpo secundario (anti-rabbit immunoglobulin anti-horseradish peroxidase-conjugated antibody, Zymed) durante 1h a temperatura ambiente. La fosforilación dual de KIHog1p se visualizó utilizando un sustrato quimioluminiscente (chemiluminescent horseradish peroxidase substrate, Millipore Corporation). El anticuerpo primario se removió de la membrana incubándola

a 55°C durante 30 minutos en una solución de 100mM de β -mercaptoetanol, 62.5 mM de Tris-HCl pH 6.8 y SDS al 2%. La membrana se incubó con el anticuerpo anti-Hog1p (yC-20; Santa Cruz Biotech) siguiendo el mismo procedimiento utilizado para el anticuerpo anti-fosfo-p38.

Para identificar las proteínas marcadas con 6 histidinas la membrana se incubó con anticuerpo anti-His-peroxidasa de acuerdo a las indicaciones del proveedor (Roche).

5.6. Expresión del gen *KISTL1*

Se identificó mediante hibridación Northern blot de membranas que contienen RNA de la cepa silvestre y las mutantes $\Delta KIssk2$ $\Delta Kiste11$ y $\Delta Klhog1$. Los cultivos en fase exponencial se incubaron a 30°C con y sin tratamiento con 0.5M KCl a diferentes tiempos, después se realizó la extracción del RNA total utilizando el protocolo de fenol ácido y se separó por electroforesis en condiciones desnaturalizantes con formaldehído en geles de agarosa al 1%. Cada gel se transfirió por capilaridad a una membrana de nylon (Amersham®) como describe Sambrook, 1989. La hibridación se realizó utilizando como sonda un fragmento *EcoRI*–*NcoI* de 600 pb obtenido del plásmido pGEM-*KISTL1*. La sonda se marcó con [α -³²P] dCTP siguiendo el protocolo de Prime-It II (random primer labeling kit, Stratagene). La hibridación se realizó a 55°C toda la noche y los lavados se realizaron 3 veces con una solución de SSC 1x (NaCl 0.15M, Citrato de Sodio 0.015M y SDS 0.1%) a 60°C por 10 minutos. El RNA se *KISTL1* se detectó por auto radiografía.

5.7. Microscopía de fluorescencia

El medio SD se inoculó con células y se incubó toda la noche a 30°C en agitación. Al otro día las células se colectaron por centrifugación durante 3 minutos y se resuspendieron en medio SGal y se incubaron durante 5 horas a 30°C. Después, para inducir el estrés osmótico, se incubaron con 0.5M KCl durante 10 minutos y las células se fijaron en formaldehído al 37% durante 30 minutos a temperatura ambiente. Siguió una centrifugación y se resuspendieron en 1ml de agua destilada. Para tinción de

núcleo, las células fijadas se trataron con 1mg/ml de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) por 30 segundos, se centrifugaron y se lavaron 3 veces con una solución de PBS al 1%. Se retiró el sobrenadante y las células se resuspendieron en el líquido residual. Se tomaron 10µl de cada muestra y se observaron en el microscopio de epifluorescencia. Las imágenes se capturaron y se ajustaron utilizando el programa QCapture Pro (versión 6.0) (QImages).

6. RESULTADOS

6.1. Amplificación y clonación de *KISHO1* y *KISSK2*

En un trabajo realizado por Kawasaki y cols. en 2008 se describieron los fenotipos de algunas mutantes de la vía HOG. Sin embargo, fue necesario estudiar algunos componentes que en ese trabajo no se describen, para tener un panorama general del comportamiento de las ramas SHO1 y SLN1 en *Kluyveromyces lactis*. Estos componentes son *KISHO1* y *KISSK2*, los cuales se identificaron en el genoma de *K. lactis* y posteriormente se amplificaron por PCR (Figura 5), se clonaron y se secuenciaron.

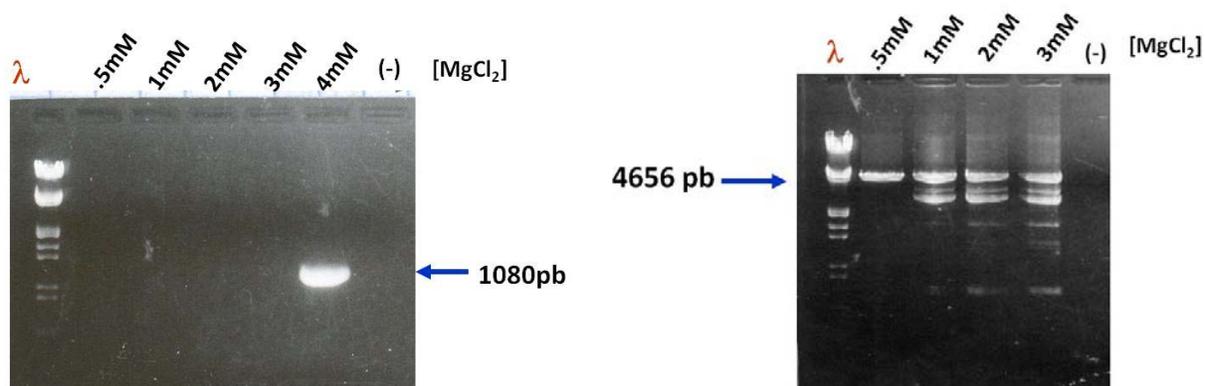


Figura 5. Amplificación por PCR de *KISHO1* y *KISSK2*.

6.2. Análisis de las secuencias de *KISHO1* y *KISSk2*

El análisis de la secuencia de *KISHO1* predice un gen de 1080 pb incluyendo el codón de término y codifica para una proteína de 360 aa. Se realizó un alineamiento con el gen ScSHO1 utilizando el programa BLASTp (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) y los resultados muestran un porcentaje de identidad del 48% y 65% de similitud. El análisis de la secuencia nos indica que en KISho1p se encuentran conservados los dominios de unión a las proteínas: Ste11p (residuos 171-207) (Zarrinpar, 2004; Tatebayashi, 2006) y Pbs2p (dominio SH3) (Marles, 2004) (Figura 6a). Para identificar los dominios transmembranales de KISho1p se utilizó el programa SOSUI (Hirokawa, 1998) y se identificó que en KISho1p se encuentran conservados los cuatro cruces transmembranales que se han descrito para ScSho1p (Figura 6b).

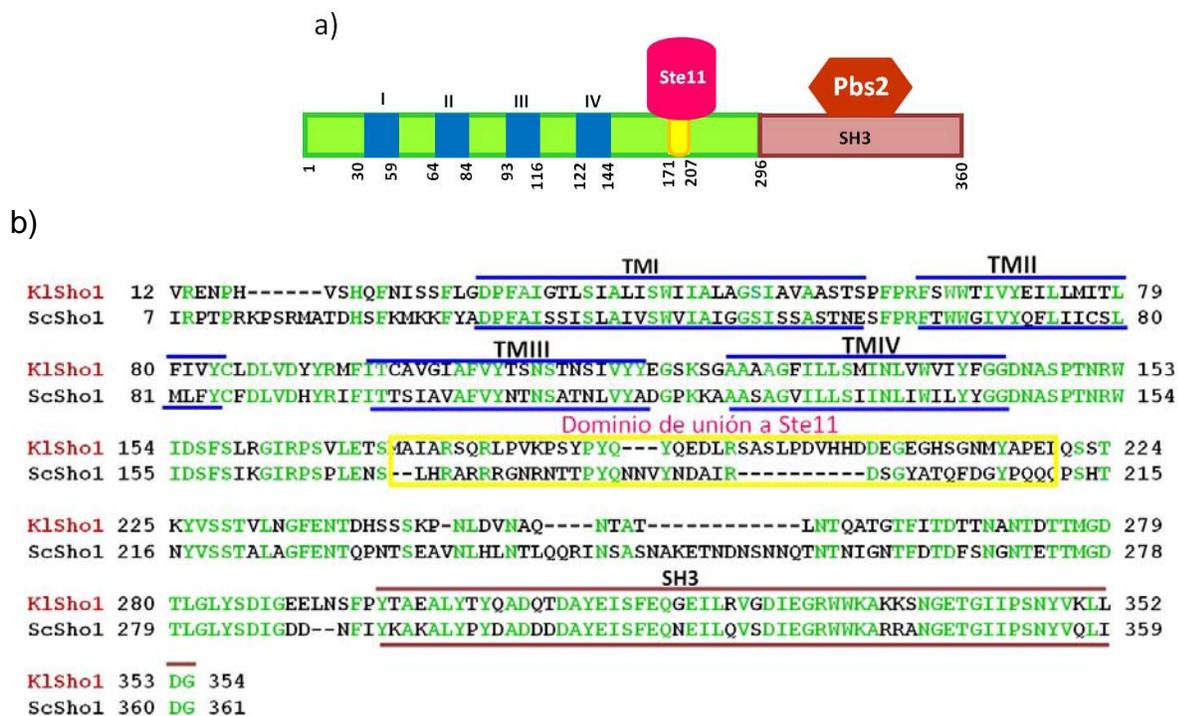


Figura 6. a) Mapa físico de KISho1p. Se identificaron los dominios que se han descrito en su ortólogo ScSho1p. En verde se muestra el fragmento que corresponde a la región amino terminal en la cual se localizan los cuatro cruces transmembranales y el dominio a través del cual se une a la MAPKKK Ste11p (color amarillo). En el carboxilo terminal se localiza el dominio SH3 a través del cual interactúa con la MAPKK KIPbs2p (rojo). b) Alineamiento de KISho1p y ScSho1p. En verde están indicados los aminoácidos idénticos. Las regiones más conservadas corresponden a los cuatro cruces transmembranales (barras azules) y al dominio SH3 en donde se localiza el sitio de unión a Pbs2p.

En *S. cerevisiae* se expresan dos MAPKKK's, ScSsk2p y ScSsk22p las cuales tienen una función redundante en la rama SLN1 (**Posas F, 1996**) sin embargo, en el análisis del genoma que se realizó en *K. lactis* no se encontró el ortólogo a Ssk22p. El análisis de la secuencia de *KISSK2* mostró que es un gen de 4656 pb que codifica para una proteína de 1552 aa y presenta un porcentaje de identidad del 45% y una similitud del 63% con respecto a Ssk2p de *S. cerevisiae* (ScSsk2) (figura 7). En KISsk2p se identificaron algunos dominios descritos para ScSsk2p; un dominio regulatorio cuya función es evitar que la proteína se active constitutivamente y un dominio de cinasa localizado en el carboxilo terminal. En la región amino terminal (dominio regulatorio) se mapeó un sitio de unión al regulador de la respuesta Ssk1p (**Posas & Saito, 1998**) y un dominio de localización (LD) que le sirve a la proteína para posicionarse adecuadamente en condiciones de estrés osmótico (**Bettinger & Amberg, 2007**). El sitio a través del cual la MAPKK Pbs2p se une a ScSsk2p se encuentra en la región del dominio cinasa (**Tatebayashi, 2003**) (Figura 7 a y b).

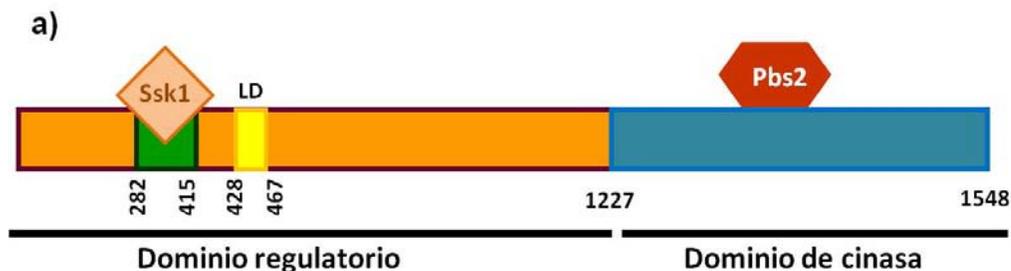


Figura 7. a) Mapa físico de KISSk2p en donde se indican el dominio regulatorio (anaranjado) en donde se localiza el dominio de localización LD (amarillo) y la región a través de la cual interactúa con Ssk1p (verde). En azul se indica el dominio cinasa en donde se localiza el sitio de interacción con Pbs2p (rojo). b) Se muestra el alineamiento entre KISSk2 y ScSsk2, en rojo se indican los aminoácidos idénticos. Con el programa BLASTp se realizó un alineamiento local de los dominios de KISsk2p y ScSsk2p y la región de unión a Ssk1p (verde) presenta un 33% de identidad, el dominio de localización (amarillo) y el de cinasa (azul) son los que están más conservados tienen 61% y 69% de identidad respectivamente.

KlSsk2 147 SRSNSLTSSKLFALNQSNDSPSSSTSVYPVPPNVAASLNSQTASSMSV-----STSADQYFP--AQQNGSTTTV 211
 ScSsk2 149 SKTESEIHKKPPAVNSNQDPLLTPTLVISPELASLNTTNTSIMSTPQNITNQTSNKHIPTRSQPNGSTSSS 220

 KlSsk2 212 NLTPTLSS-PSIRS LNNSSTSTTKSFKPLQKQYVLNEQLYLSMKNNKADDYYTRGITSSGNEDDDD--FRV 280
 ScSsk2 221 TLQDVTTNSQRSVGHGGSTT-SLRTYKQYVLNEQLYLRKMRNRANDDYTRGIVASSNFEDDEENFSN 292

 KlSsk2 281 DGEND-----DVDNDLSKLNGLGSAIFGNNIATTTDKGFHSIDDDLVLMNDKILLERMEWL 338
 ScSsk2 293 KGEDDLELEMDLLKVEGEDKDNDFN-----FGYNFITSSTK-----NNENVVMSLNLYLKGLDWL 349

 KlSsk2 339 RSVEPNPL-IENSLNLLNKTGGSTDSLESFSNIETQLALEQLSNNHLVRELEWQTMSSVLNGDIVKSEK 410
 ScSsk2 350 RDVNNQDPCIEIDE-----EWHSLGSEDLSKLLONPMVNNRFEWQTMSSKVLKGDIVRNEK 408

 KlSsk2 411 TKLAKR-KPDEILLNNDLITWLELKAWLNGRTVEDQRKSLEYSKTTADEVFEEILNYKNEKEENPEVVIEEA 479
 ScSsk2 409 TKIANQGGKPGFNTQFSDDIWIELKAWLNGRTVEDQNKSLRIFRSDTDSVFEIIMAFKLEDNMSADEAAETI 478

 KlSsk2 480 KILLNKYYKVVGYWKNLPMNLEKPVTKTSNFVSRIEALNSLINSYEGLYEIEALKQW-TQNDLDDVTFK 551
 ScSsk2 479 KSLVDKYYRVLNLWPNIKRMHAEKPIITKTEAFRRNIDTLNSWLNFKFNFDNIAYLKKWIVGNKELESTTEV 550

 KlSsk2 552 DS----LDTEGIFK-NDRSFAEQIMKEKDIEGIFOKKIFFKHAPWMFKSKLVFLKQNSIHEMRLPLPVDK 617
 ScSsk2 551 DNTTVNLDDPAVFATNCKRFAEQIMKEKDIELIFOKKIFFPLAPWILKAKFFFLKYOKTWNELNSYLDQD 622

 KlSsk2 618 LHSLLTFPLRLIQEII SIRLEYARKLKKPTMMIDQMIDDFSTYIKLSVQIKHTLMEYRSGWSLKVEISDAF 689
 ScSsk2 623 LEFLLMFPMRLVKDIIILIRLSYAKKIQNPTLMMIDQMIDDFSTYIKLAVQMKTVASYCNDFWFFVKIDPEF 694

 KlSsk2 690 DAKVVEAIEFLKLLHLKLIDSSKNSFKTFKEPDILFAHWENLKNFGCYISGASKVIAQQGFVNITIRLLNRL 764
 ScSsk2 695 DHTVVEGLEYYFSILELRILYSGKNSFKTSKEDLLKYWEMFRNVGYIDDAGELIAAEFTKLTLRVHRL 766

 KlSsk2 765 HLYIMEEQRNSVDLVTSDARKWVVEVIENVGAFKRKTNRFSNVLTKAFQNSVLYNIKDHSMLELRNRS GH 836
 ScSsk2 767 HAYLLRQNTPPKLENEAAEKWLVIQIFEILGSMKRKLNRFNLTILTKAFQNFVRYKIEDHNYLLKQLKETGH 838

 KlSsk2 837 FLIYTGILEQNGIYLIASEELLGCSDEIMDIKSTKIGSDLIPKVEINNSLTIYNPPEDLTLPEAMFVQK 908
 ScSsk2 839 FLIYTGILEQNGTYLIGSPELLGCKDDILRIKNSDIGCDLVPKLEINNSLTIYNALDDNWNNSNSLGS 910

 KlSsk2 909 ERRNGVSYHLKQDDLTQRVGIKGGSSSTAPEEG----EELVQLENKLMKLGYYLVFCPTKPMVWNGEM 972
 ScSsk2 911 ISNDGTPFYIYKNDLTTQPRSYNG-NRVNREPDEFNSRSTEEFYELETRLNSLGYVVLVLPQEPPLWEGEM 980

 KlSsk2 973 YNLTSEEPLTMEEFGLSVEEDVIVMLNQGSTYALDYQVDRFQHFAGDAISIREKKCAINSIETALQRINKSY 1044
 ScSsk2 981 YNLSDNKTIKPEGLNLKVIPNSIDLKMGSSYALEYQCDRFQISGSSVSFLEKSSSETVKNLQRINKAY 1052

 KlSsk2 1045 FRMTYIVLKNFGSVQKNVTLQTNESVFFNIAYLFVKDFAKNFKLLNVAPETKAIIIRLMIQISIDWLT FVL 1116
 ScSsk2 1053 FRCTYSVLKNYTKIVTTFKVSVPNDLNNIFLGRDFGLNFRINVANNEKRSIIILLMMRLSIGWLKFLA 1124

 KlSsk2 1117 DECDPANPETFRWCVPAMEFAMRMINGNWLIGIEEKEFKLLKEKIARCMSLLISHFDITGARSREAEIDAQ 1189
 ScSsk2 1125 EDCDPTDQRVFRWCVTSMEFAMHMVSGWNILALDECQFSSLKQKISECMSLLISHFDIIGARSIEVEKIN-Q 1195

 KlSsk2 1190 QTRPNFDIDDA-DDDMI LAVNSEMRMNAITDMEKVVKVRHYSVGVVIDDTDNQSKLLKSLASSISNLSIRW 1260
 ScSsk2 1196 QARSNLDLEDVFDMMMLQVNSEFRVQSIMELEBERIKRNPH-QTGKVIDDSKGNKYLVSLASSISNVSMRW 1266

 KlSsk2 1261 QKRSFIGSGSFGTVYSAVNLDTGDI LAVKEIKIQDAKSMKQIFPSLKEEMR VMEILNHPNI VQYYGVEVHRD 1332
 ScSsk2 1267 QKRNF IGGTFGRVYSAVDLDNGEILAVKEINI QDSKSMQKIFPLIKEEMS VLEILNHPNIVSYGVEVHRD 1338

 KlSsk2 1333 KVNIFMEFCEGSLASLLEHGRIEDEMVTQVYTLQLEGLACLHQSGVVHRDIKPENILLDRNGVIKYVDFG 1404
 ScSsk2 1339 KVNIFMEYCEGSLAALLEHGRIEDEMVTQVYTLQLEGLAYLHESGIVHRDVKPENILLDFNGVIKYVDFG 1410

 KlSsk2 1405 AAKLIAKNGSKRISLDANNKSTGGK-----DMIGTPMYMAPEVTGQ-GHGKFGSDD 1455
 ScSsk2 1411 AAKKIANNTRLASMNKIENADGEHEDVTHVSDSKAVKNNENALLDMGTPMYMAPE SITGSTTKGLGADD 1482

 KlSsk2 1456 IWSLGCVVLEMTGRRPWANLDNEWAIMYHVAAGHLPQFPKSEISSAGRKFISRCLIQDANKRATAMELLL 1527
 ScSsk2 1483 VWSLGCVVLEMTGRRPWANLDNEWAIMYHVAAGHTPQFPKDEVS SAGMKFLERCLIQNPSKRASAVELLM 1554

 KlSsk2 1468 DGRRPWANLDNEWAIMYHVAAGHLPQFPKSEISSAGRKFISRCLIQDANKRATAMELLDPWISQIRNIAF 1538
 ScSsk2 1496 DGRRPWANLDNEWAIMYHVAAGHTPQFPKDEVS SAGMKFLERCLIQNPSKRASAVELLMDPWIVQIREIAF 1568

 KlSsk2 1539 GGNAESFNNE 1548
 ScSsk2 1567 GDDSSSTDTE 1576

6.3. Análisis de las mutantes de las ramas SHO1 y SLN1 en respuesta al estrés hiperosmótico en *K. lactis*

Para evaluar la respuesta al estrés hiperosmótico en *K. lactis*, se generaron mutantes en los posibles componentes de la rama SHO1, los cuales se ha demostrado que participan en la respuesta a estrés osmótico en *S. cerevisiae*. En este análisis se incluyeron los genes que codifican para la proteína transmembranal KISho1p, la PAK KISte20p, la MAPKKK KISte11p y su proteína adaptadora KISte50p. Como controles se incluyeron las mutantes $\Delta Klpbs2$ y $\Delta Klhog1$, que muestran sensibilidad al estrés hiperosmótico (**Kawasaki, 2008**).

En la Figura 6 se muestran los resultados obtenidos de un ensayo de diluciones seriadas. El crecimiento de las mutantes $\Delta Klsho1$ y $\Delta Klste20$ es similar al de la cepa silvestre en condiciones de hiperosmolaridad (0.7M KCl o 1M Sorbitol). Sin embargo, se observó que la inactivación de KISte11p y de su proteína adaptadora KISte50p ocasiona una disminución drástica en el crecimiento. La sensibilidad a 1M de Sorbitol que muestra la mutante $\Delta Klste11$ es tan fuerte como la que se observó en las mutantes $\Delta Klpbs2$ y $\Delta Klhog1$ (Figura 8a). Este fenotipo es diferente del de una mutante $\Delta ste11$ en *S. cerevisiae* ya que en esta levadura se observa sensibilidad al estrés hiperosmótico únicamente cuando también se inactiva la rama SLN1 (**Posas & Saito, 1997**). La sensibilidad observada en la mutante $\Delta Klste11$ de *K. lactis* indica que esta proteína MAPKKK puede ser un componente importante de convergencia entre las ramas SHO1 y SLN1.

Debido a los resultados obtenidos en la mutante $\Delta Klste11$ se procedió a analizar si la rama SLN1 también participaba en la respuesta al osmoestrés. Para responder esta pregunta se construyó una mutante en el gen que codifica para la proteína KISsk2p, que es la MAPKKK de la rama SLN1 de la vía HOG en *K. lactis*. KISsk2p es el ortólogo de Ssk2p en *S. cerevisiae*. Los ensayos de crecimiento en 0.7M KCl y 1M de sorbitol (Figura 8b) demostraron que estas condiciones de hiperosmolaridad no afectan el crecimiento de la mutante $\Delta Klssk2$. Se construyó entonces una doble mutante $\Delta Klsho1\Delta Klssk2$ para inactivar ambas ramas de la vía HOG en *K. lactis*. A diferencia de las mutantes sencillas $\Delta Klsho1$ y $\Delta Klssk2$, la doble mutante mostró una disminución drástica en el crecimiento en condiciones de estrés hiperosmótico, parecido a lo que se

observa en la mutante $\Delta Klhog1$ (Figura 8b). Estos resultados indican que la vía HOG de *K. lactis* está compuesta por dos ramas que trabajan de forma paralela.

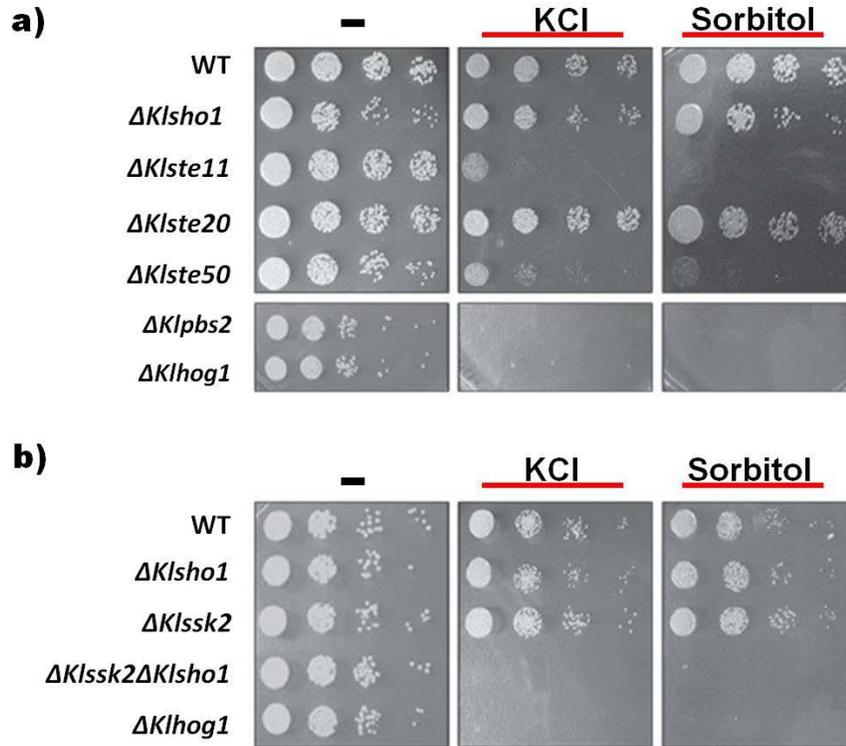


Figura 8. Ensayos por diluciones seriadas para evaluar el crecimiento en estrés hiperosmótico. a) Efecto del estrés hiperosmótico en mutantes sencillas de la rama SHO1. b) Fenotipo de las dobles mutantes donde las ramas SHO1 y SLN1 están inactivas. WT, cepa silvestre. Las mutantes sencillas $\Delta Klste11$ y $\Delta Klste50$ así como la doble mutante $\Delta Klssk2\Delta Klsho1$ son sensibles al estrés hiperosmótico tanto como una mutante $\Delta Klpbs2$ o $\Delta Klhog1$. Las células de las diferentes cepas se incubaron a 30°C en medio YPD líquido hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 (O.D₆₀₀), se realizaron diluciones seriadas y se colocaron 5µl de cada muestra en placas con medio YPD y YPD con 0.7M de KCl o 1M de sorbitol. Las placas se incubaron a 30°C durante 48h y se fotografiaron.

6.4. La localización de KISte11p en la membrana es suficiente para proteger a la célula contra el estrés osmótico en ausencia de las proteínas KISsk2p y KISho1p.

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que en respuesta al estrés osmótico Sho1p recluta a Ste11p a la membrana permitiendo que sea activada por la PAK cinasa Ste20p. Cuando el complejo está localizado en la membrana se favorece que la MAPKKK Ste11p active por fosforilación a la MAPKK Pbs2p, pero esta activación es dispensable si la rama SLN1 se encuentra activa (Zarrinpar, 2004; Tatebayashi, 2006). En *K. lactis* resulta interesante que una mutante en la MAPKKK Klste11p muestra una alta sensibilidad al estrés hiperosmótico aún cuando la rama SLN1 no está interrumpida, lo que sugiere que en esta levadura, KISte11p puede ser un punto de convergencia entre ambas ramas. Para investigar el papel que está desempeñando KISte11p en la vía HOG de *K. lactis* se decidió analizar si la sobreexpresión de esta proteína puede proteger a la célula contra el estrés osmótico en mutantes donde ambas ramas están inactivas y si la localización en la membrana es importante para llevar a cabo su función. Para esto, se fusionaron los dominios transmembranales de KISho1p a la proteína completa KISte11p, como se muestra en la figura 9a. La proteína híbrida KISho1TM-KISte11p se expresó en la doble mutante $\Delta Klssk2\Delta Klsho1$, en la cual están inactivas la MAPKKK de la rama SLN1 (KISsk2p) y la proteína que probablemente localiza a KISte11p en la membrana (KISho1p). Los resultados muestran que cuando se expresa el fragmento que corresponde a los segmentos transmembranales de KISho1p no se recupera el crecimiento de las mutantes $\Delta Klste11$ y $\Delta Klssk2\Delta Klsho1$ en un medio hiperosmótico (Figura 9b). Sin embargo, cuando se expresó la proteína híbrida KISho1TM / KISte11p en estas mismas mutantes se observó que las células son capaces de crecer en condiciones de estrés osmótico. Esto indica que la localización de KISte11p en la membrana es muy importante en la vía HOG.

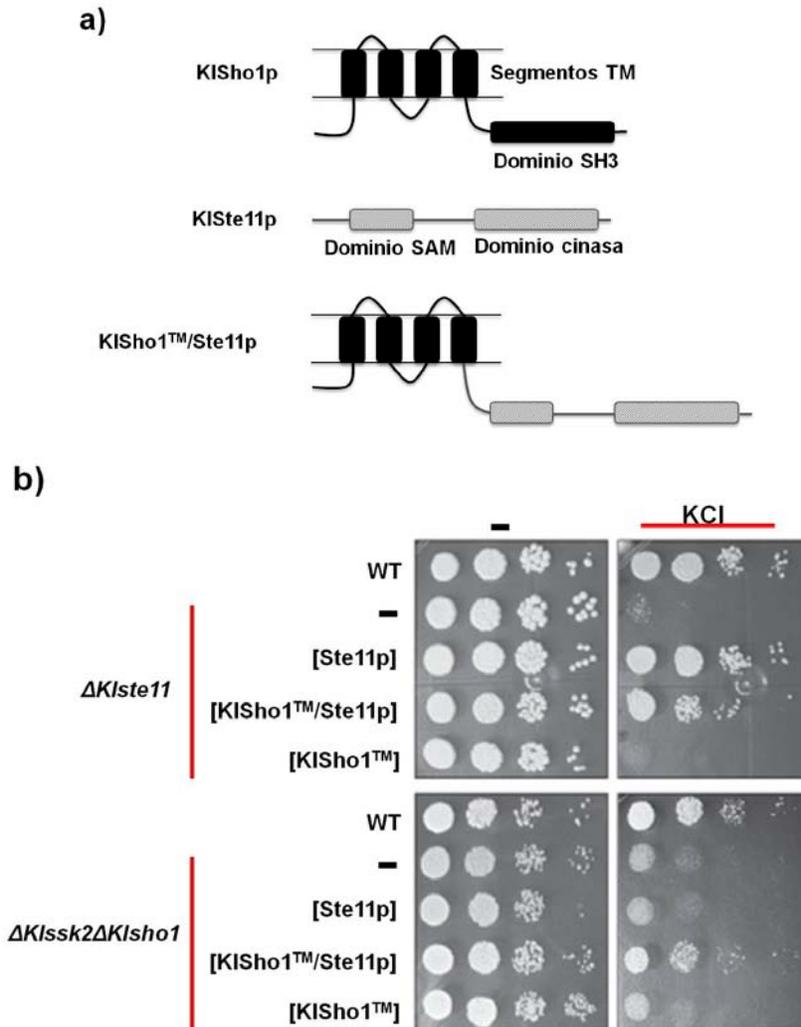


Figura 9. La localización de KISte11p en la membrana revierte el fenotipo de sensibilidad a estrés osmótico en la doble mutante $\Delta Klssk2\Delta Klsho1$. a) Esquema de la fusión KISho1TM-KISte11p. El fragmento que codifica para los cuatro dominios transmembranales de KISho1p se fusionó al extremo amino terminal de KISte11p. b) Expresión de KISho1TM-KISte11p en las mutantes $\Delta Klste11$ y $\Delta Klssk2\Delta Klsho1$, la proteína híbrida es capaz de conferir resistencia al estrés hiperosmótico en la doble mutante. Las células se transfectaron con el plásmido YEpKDGal vacío (-) y con las diferentes construcciones. Cada cepa se creció en medio SGal hasta alcanzar una densidad óptica de 0.4 (O.D₆₀₀), se realizaron diluciones seriadas y se gotearon 5μl de cada muestra en medio YPGal (en el cual se sustituyó la glucosa por galactosa) con y sin 0.7M KCl. Las placas se incubaron a 30°C y se fotografiaron después de 48h.

Se ha reportado que KSte11p es una proteína muy importante la vía de respuesta a feromonas de *K. lactis* ya que mutantes donde esta proteína esta inactiva son estériles (**Kawasaki, 2008**). Se realizó un ensayo para saber si la proteína de fusión KISho1TM-KSte11p podía revertir la esterilidad que se observa en una mutante $\Delta KSte11$. Los resultados muestran que mientras que la proteína silvestre KSte11p complementa la mutante $\Delta KSte11$, la fusión KISho1TM/KSte11p no revierte el fenotipo de esterilidad (Figura 10). Esto sugiere que si KSte11p se retiene en le membrana plasmática a través de KISho1p, sólo participa en la respuesta a estrés osmótico y no en la respuesta a feromonas y de esta manera se puede evitar el entrecruzamiento en las dos vías.

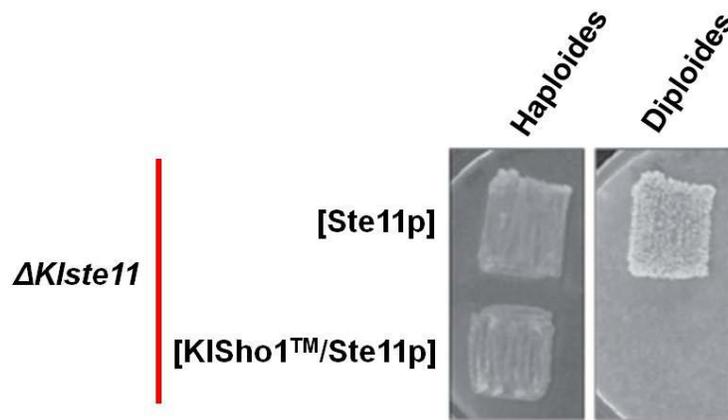


Figura 10. Ensayos de apareamiento con la mutante $\Delta KSte11$. La cepa que expresa la proteína híbrida es incapaz de responder a feromonas de apareamiento. Los parches de las células haploides Mat α que expresan la proteína silvestre ó la versión híbrida KISho1TM-KSte11p y el césped del tipo celular Mata, se crecieron en placas de SGal durante 24 h. Para favorecer el apareamiento las cepas de los diferentes tipos celulares se replicaron en placas de YPD y se incubaron durante 8 horas a 30°C. Las diploides se seleccionaron en medio SD y se fotografiaron 48 horas después de incubarlas a 30°C.

6.5. El estrés osmótico induce la fosforilación de KIHog1p en *K. lactis*.

La MAPK Hog1p se activa de manera transitoria después de la estimulación con estrés hiperosmótico. En *S. cerevisiae* la fosforilación de Hog1p (en el motivo TGY) incrementa rápidamente, alcanza un nivel máximo a los 5 minutos y comienza a disminuir gradualmente hasta llegar al nivel basal a los 30 min (**Murakami, 2008**). En *K. lactis* se evaluó si el estrés osmótico induce la fosforilación de KIHog1p. Para esto se realizó un ensayo incubando a la cepa silvestre en diferentes concentraciones de KCl a diferentes tiempos. En este análisis se observó que KIHog1p se fosforila desde 0.2 M de KCl (Figura 11a) y hasta concentraciones tan altas como 1M de KCl. Para medir el tiempo en que el estrés osmótico induce la fosforilación de KIHog1p, se utilizó la concentración de 0.4 M de KCl. En este ensayo se observó que KIHog1p incrementa su nivel de fosforilación a los 5 minutos, comienza a disminuir y llega a los niveles basales después de 30 minutos de exposición al estrés osmótico (Figura 11b). Con estos experimentos se comprobó que el estrés osmótico induce la fosforilación transitoria de KIHog1p en *K. lactis* y que la máxima fosforilación ocurre con 0.4 M de KCl.

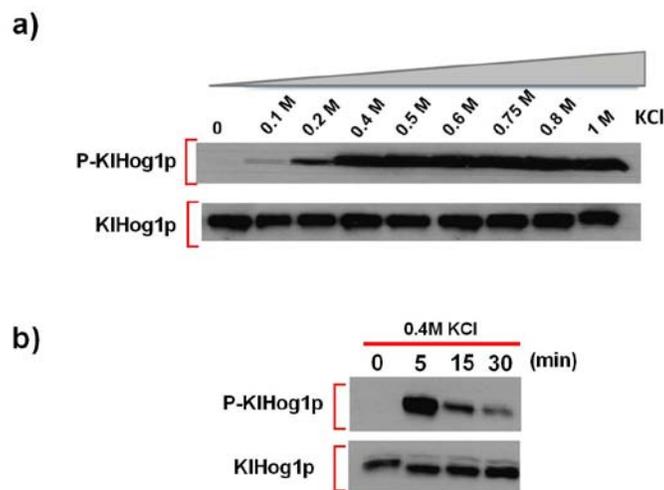


Figura 11. Ensayos de fosforilación de KIHog1p en la cepa silvestre. a) Efecto del estrés osmótico en la fosforilación de KIHog1p inducido por diferentes concentraciones KCl. b) La fosforilación de KIHog1 se puede observar desde los 5 min de exposición a 0.4M KCl. Los lisados celulares se incubaron con el anticuerpo anti-p38 que reconoce Hog1p fosforilado (P-KIHog1p) y con el anti-Hog1 para identificar el Hog1 total (KIHog1p). Para los siguientes ensayos de fosforilación de KIHog1p, las muestras se trataron con 0.4M KCl durante 5 minutos para inducir el estrés osmótico y se utilizaron los mismos anticuerpos.

6.6. La fosforilación de KIHog1p no protege a las células contra el estrés hiperosmótico

Después de conocer los fenotipos de las mutantes de las ramas SHO1 y SLN1, se procedió a analizar cuál era el estado de fosforilación de KIHog1p en cada una de las mutantes. El análisis de KIHog1p en la cepa silvestre y en las mutantes de *K. lactis* mostró que el nivel de proteína total no cambia después del estrés hiperosmótico (figura 12a). Además la alta osmolaridad induce la fosforilación de KIHog1p en las mutantes sencillas $\Delta K/sho1$ y $\Delta K/ste20$ que no muestran sensibilidad a estrés osmótico. Sin embargo, es importante resaltar que en las mutantes $\Delta K/ste11$ y $\Delta K/ste50$ que son sensibles a estrés hiperosmótico (figura 8a), KIHog1p también se encuentra fosforilado después de la exposición de las células a 0.4M de KCl durante 5 minutos (figura 12a). La fosforilación de KIHog1p sólo se observa después del tratamiento con altas concentraciones de sal y no se observó en la mutante de la MAPKKK KIPbs2p (figura 12a). La fosforilación de KIHog1p en mutantes sencillas de la rama SHO1 puede ser inducida por la actividad de la rama SLN1. Para probar esta hipótesis, se realizaron ensayos para saber el estado de fosforilación de KIHog1p en mutantes donde ambas ramas de la vía HOG estuvieran inactivas. En los resultados obtenidos se observó que aunque la doble mutante $\Delta K/ssk2\Delta K/sho1$ es sensible a condiciones de estrés hiperosmótico (Figura 8b), la fosforilación de KIHog1p en esta cepa no se encuentra disminuida después de que las células se trataron con 0.4 M de KCl durante 5 minutos (figura 12b). La fosforilación observada en mutantes de ambas ramas de la vía HOG que son sensibles a estrés hiperosmótico puede ser debido a que la fosforilación de KIHog1p no es un pre-requisito para la activación de una respuesta celular ó que el nivel de fosforilación que se observa en esas mutantes no sea suficiente para proteger a las células contra el estrés hiperosmótico. En *S. cerevisiae* se ha observado la fosforilación de Hog1p en mutantes de ambas ramas de la vía HOG únicamente en condiciones de osmolaridad muy elevadas (por ejemplo 1M de KCl) (**Van Wuytswinkel, 2000; Zhi, 2013**). En contraste con estos datos, en *K. lactis*, la fosforilación de KIHog1p en mutantes que son sensibles al estrés osmótico, se observó en condiciones de osmolaridad media (0.4 M de KCl durante 5 minutos).

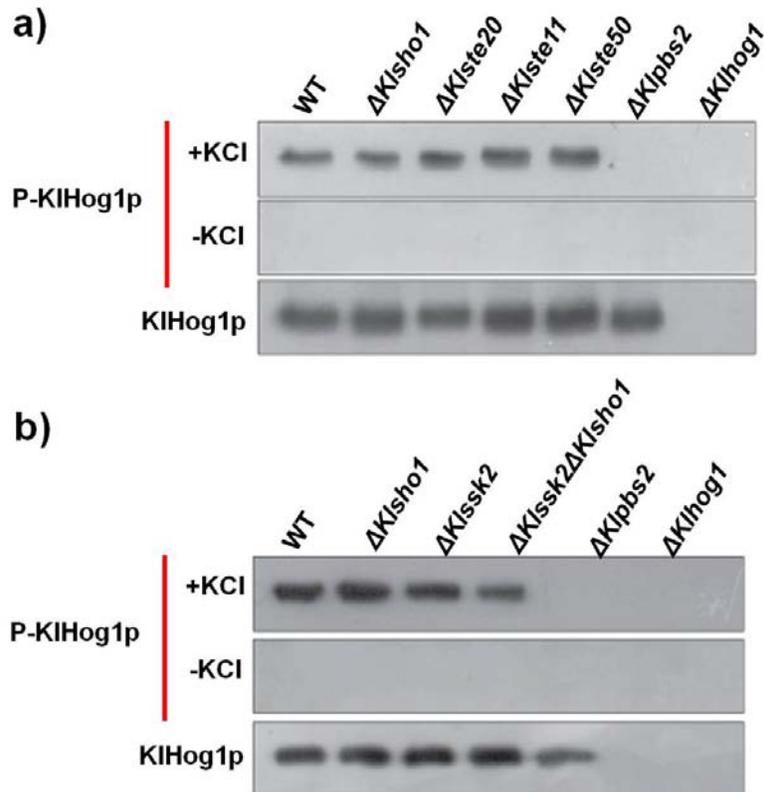


Figura 12. En las mutantes sensibles al estrés osmótico se induce la fosforilación de KIHog1p. a) Fosforilación de KIHog1p en mutantes de la rama SHO1. b) Efecto de la inactivación de las ramas SHO1 y SLN1 en la fosforilación de KIHog1p. Los lisados celulares se sometieron a electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), se transfirieron a una membrana de nylon y se incubaron con los anticuerpos mencionados en la figura 11.

6.7. La fosforilación de KIHog1p no depende de la actividad de las MAPKKK

Después de saber que KIHog1p se fosforila en células que son sensibles a estrés hiperosmótico, se realizó un ensayo para investigar si esta fosforilación es dependiente de la actividad de alguna de las dos MAPKKK presentes en la vía HOG de *K. lactis*. Para investigar esto, se generó la doble mutante $\Delta Klssk2\Delta Klste11$, y se evaluó su crecimiento en condiciones de estrés osmótico y su estado de fosforilación de KIHog1p. En los resultados obtenidos se observó que la doble mutante $\Delta Klssk2\Delta Klste11$ es tan sensible al estrés osmótico como una mutante sencilla

$\Delta K1Ste11$ (Figura 13a), sin embargo, el nivel de fosforilación de KIHog1p se mantuvo similar al observado en la cepa silvestre o en las mutantes sencillas (Figura 13b).

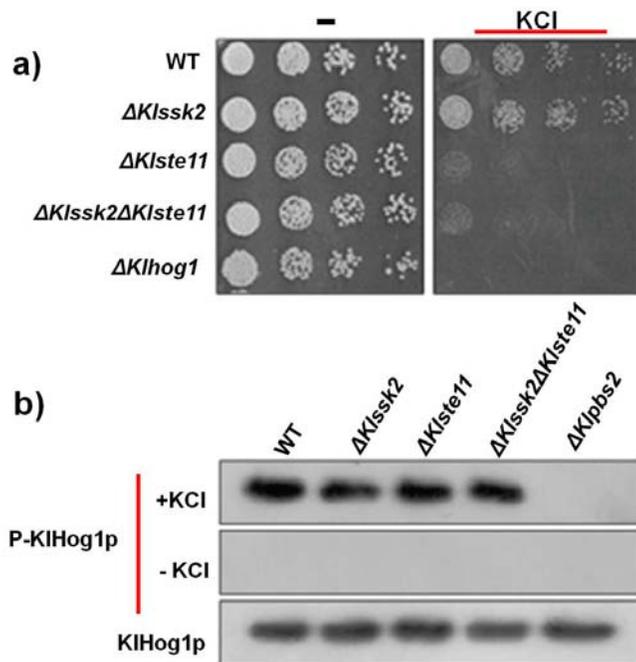


Figura 13. La inactivación de $\Delta K1ssk2\Delta K1Ste11$ produce sensibilidad al estrés osmótico pero no evita la fosforilación de KIHog1p. a) Efecto del estrés osmótico en el crecimiento de las mutantes sencillas y dobles de las MAPKKK de la vía HOG. Los ensayos se realizaron por diluciones seriadas. b) La fosforilación de KIHog1p en mutantes sencillas y dobles. Los extractos se analizaron por Western blot utilizando los anticuerpos anteriormente mencionados.

6.8 La fosforilación de KIHog1p es dependiente de la actividad cinasa de la MAPKK KIPbs2p

Lo que se observó en los resultados anteriores es que una doble mutante $\Delta K1ssk2\Delta K1Ste11$ es tan sensible como las células que no tienen la MAPKK KIPbs2p, sin embargo, en las primeras es evidente que KIHog1p se fosforila mientras que en la mutante $\Delta K1pbs2$ no, estos hallazgos, nos llevaron a investigar si la fosforilación de KIHog1p es dependiente de la actividad de cinasa de KIPbs2p. En *S. cerevisiae* se reportó que la sustitución de la lisina 389 por metionina inhibe la actividad de cinasa de Pbs2p (Posas & Saito, 1997). Con este antecedente, en *K. lactis* se construyó un mutante cinasa menos de *KIPBS2*, reemplazando la lisina en la posición 447 por metionina ($KIPbs2^{KM}$). Esta mutante retiene la actividad de andamiaje con la cual puede

unirse eficientemente a Hog1p. Para monitorear la fosforilación de KIHog1p y el crecimiento en un medio hiperosmolar, las mutantes $\Delta Klpbs2$ y las células que expresan la proteína KIPbs2^{KM} se trataron con estrés osmótico. Los resultados confirman que en la mutante de la proteína KIPbs2p, la fosforilación de KIHog1p se encuentra inhibida, y además, se observó que la sobreexpresión de KIPbs2^{KM} en un fondo genético $\Delta Klpbs2$ no restablece la fosforilación de KIHog1p después de la exposición de las células a 0.4M KCl (Figura 14a). De estos experimentos se concluye que la fosforilación de KIHog1p es totalmente dependiente de la presencia de KIPbs2p y de su actividad de cinasa ya que en ambas condiciones, las células muestran un fenotipo de sensibilidad cuando se exponen a un medio con estrés osmótico (Figura 14b).

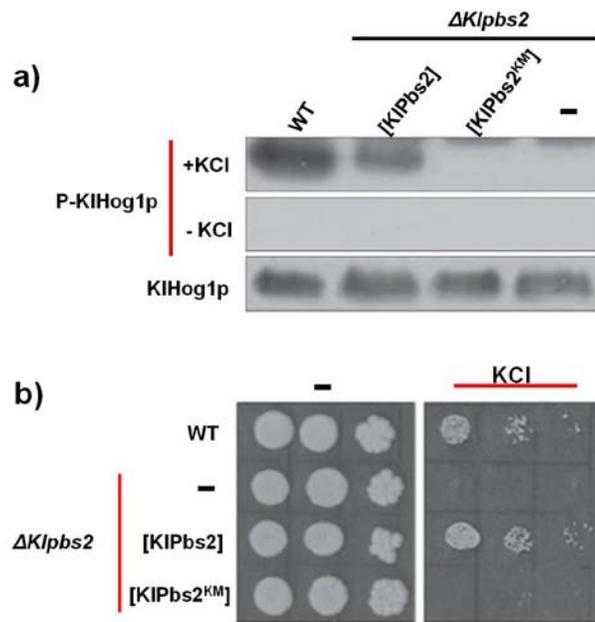


Figura 14. La actividad de cinasa de KIPbs2p es indispensable para responder a estrés osmótico. a) La fosforilación de KIHog1p en mutantes $\Delta Klpbs2$ que expresan el alelo silvestre [KIPbs2] y la versión cinasa menos [KIPbs2^{KM}]. Se obtuvieron los extractos proteicos de las células transfectadas con el plásmido YEpkDGal vacío y YEpkDGal con las diferentes versiones de KIPbs2p y se analizaron por Western blot utilizando las condiciones mencionadas en la figura 11. b) Las diferentes versiones de KIPBS2 transfectadas en la mutante $\Delta Klpbs2$, donde se observa que la actividad de cinasa es importante para que la célula pueda crecer en un medio hiperosmolar. Las células se trataron como indica la figura 9.

6.9. La internalización de KIHog1p en el núcleo no protege a las células contra el estrés osmótico

En *S. cerevisiae* el estrés osmótico activa el transporte de Hog1p al núcleo para activar genes que ayuden a la sobrevivencia de la célula (**Reiser, 1999**), entonces nos preguntamos si en *K. lactis* la fosforilación que se observa en KIHog1p induce su localización en el núcleo. Para responder esta pregunta, tanto la cepa silvestre como la doble mutante $\Delta K/SSK2\Delta K/STE1$ se transfectaron con una versión de KIHog1p etiquetada con la proteína verde fluorescente (GFP) y se observó que en la cepa silvestre, KIHog1p se localiza en el núcleo después de exponer las células 5 minutos al estrés osmótico (Figura 15a) similar a lo que ocurre en *S. cerevisiae*. Sin embargo, cuando la doble mutante $\Delta K/SSK2\Delta K/STE11$ se trató con estrés osmótico, contrario a lo que se esperaba, se observó que KIHog1p también es capaz de localizarse en el núcleo. Estos resultados son inesperados y sugieren que aun cuando KIHog1p se fosforila y puede localizarse en el núcleo, no protege a la célula contra el estrés osmótico ya que la doble mutante $\Delta K/SSK2\Delta K/STE11$ muestra defectos para crecer en un medio hiperosmolar. Para revisar si la fusión KIHog1-GFP era funcional, se realizó un ensayo de complementación transfectando células $\Delta K/ihog1$ con la proteína híbrida KIHog1p-GFP y se observó que esta fusión es capaz de revertir el fenotipo sensible causado por el estrés osmótico de la mutante $\Delta K/ihog1$ (Figura 15b).

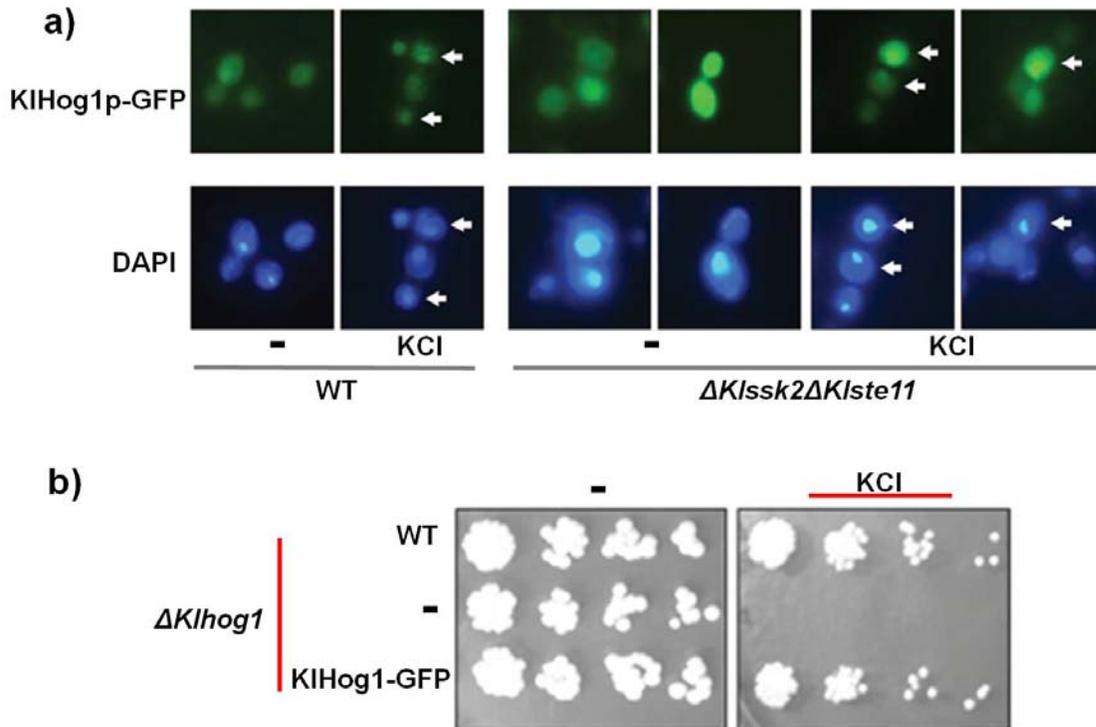


Figura 15. Localización de KIHog1-GFP. a) La cepa silvestre y la doble mutante se transfectaron con el plásmido YEpKD352-Hog1-GFP. Las células se incubaron con y sin tratamiento de 0.4M KCl durante 5 minutos. Las células se fijaron, se observaron en el microscopio de epifluorescencia y se fotografiaron. El núcleo se tiñó con DAPI (panel inferior), la localización de KIHog1-GFP se observa en la parte superior. Las flechas indican los sitios en donde la localización de KIHog1-GFP coincide con DAPI. b) Sobreexpresión de KIHog1-GFP en la cepa silvestre y la mutante $\Delta Klhog1$. KIHog1-GFP es una proteína funcional ya que rescata el fenotipo de sensibilidad observado en la mutante $\Delta Klhog1$. Las células se transfectaron con la construcción YEpKD352-Hog1-GFP y con el plásmido vacío (-). El ensayo se realizó por diluciones seriadas.

Como se describió anteriormente KIHog1p se fosforila y se internaliza en el núcleo en respuesta al estrés osmótico aún en mutantes de ambas MAPKKK (KlSsk2p y KlSte11p), con base en estos datos, se evaluó si bajo estas condiciones KIHog1p es capaz de inducir la expresión de uno de sus genes blanco. En *S. cerevisiae* el gen *STL1* codifica para un simportador glicerol-protón, el cual se activa cuando Hog1p es fosforilado después de estimular a las células con estrés osmótico. Lo que se observó es que el gen *STL1* aumenta su expresión considerablemente y lo hace de manera transitoria (Ferreira, 2005; Rep, 2000). Tomando estos datos como antecedente, en *K. lactis* se realizó un ensayo para determinar la expresión del gen ortólogo *KISTL1* en la

cepa silvestre y en la doble mutante $\Delta KIssk2\Delta KSte11$. Mediante ensayos de Northern blot, se observó que en condiciones isoosmóticas la expresión de *KISTL1* se encuentra a niveles basales tanto en la cepa silvestre como en la doble mutante $\Delta KIssk2\Delta KSte11$. Después de que las células se estimularon con una concentración de 0.4M KCl durante 5 minutos, la expresión de *KISTL1* aumentó considerablemente en la cepa silvestre (Figura 16). Esta sobreexpresión fue transitoria y disminuyó después de 15 minutos de exposición al estrés osmótico. Sin embargo, en la doble mutante $\Delta KIssk2\Delta KSte11$, KIHog1p no activa la transcripción del gen *KISTL1* (Figura 16), lo cual indica que KIHog1p fosforilado no es funcional en estas condiciones. Debido a los resultados obtenidos se plantea que la fosforilación de KIHog1p que se observa en la doble mutante puede ser inducida por una vía diferente que no involucra las ramas SHO1 y SLN1 en *K. lactis* y que esta activación no es suficiente para inducir la expresión de genes blanco que favorezcan la protección de la célula contra el estrés osmótico.

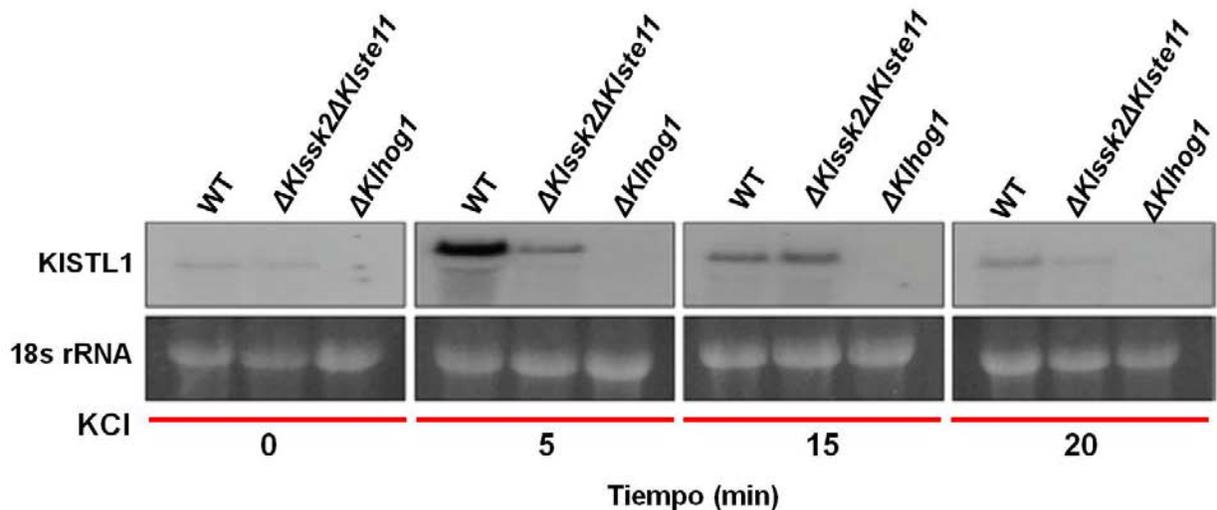


Figura 16. Expresión de *KISTL1* en respuesta al estrés osmótico. En la doble mutante $\Delta KIssk2\Delta KSte11$ se encuentra disminuida la expresión de *KISTL1* con respecto a la cepa silvestre (WT). El RNA total, se separo por electroforesis en condiciones desnaturalizantes para después transferirlo a una membrana de nylon e hibridarlo con una sonda de *KISTL1* marcada radioactivamente. El mRNA de *KISTL1* se detectó por autoradiografía.

7. DISCUSIÓN

Las proteínas cinasas activadas por estrés (SAPK) son miembros de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK) y son moléculas importantes en la respuesta a diferentes tipos de estrés en todas las células eucariontes. La activación de estas proteínas ocurre por fosforilación secuencial hasta activar a la MAPK, la cual se transloca al núcleo para activar genes blanco para desarrollar una respuesta apropiada contra el estrés. Una de las vías SAPK más estudiadas es la vía HOG, la cual se ha descrito en las levaduras *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *C. albicans*. Los estudios realizados en estos organismos muestran que la estructura que conforma esta vía se encuentra evolutivamente conservada, sin embargo, su funcionalidad ha divergido de forma significativa (Nikolaou, 2009). En este trabajo se utilizó como modelo de estudio la levadura *Kluyveromyces lactis*, que está relacionada evolutivamente con *S. cerevisiae*, sin embargo se encontraron algunas diferencias en cuanto a la función de la vía de respuesta a estrés hiperosmótico.

En *K. lactis* se identificaron los componentes de la rama de SHO1 que en *S. cerevisiae* están involucrados en la respuesta a estrés osmótico, entre los que se encuentran la proteína de andamiaje KISho1p y la cinasa PAK KISte20p. Como se esperaba los resultados mostraron que estos elementos no son indispensables en la vía de respuesta al estrés hiperosmótico, ya que mutantes en los genes que codifican para estas proteínas no muestran ningún fenotipo cuando son expuestas a altas concentraciones de sal, esto se debe probablemente a que la vía de SLN1 funciona adecuadamente (los componentes de esta rama también se identificaron en *K. lactis*).

En *K. lactis* encontramos que en una mutante de la MAPKKK KISSk2p (en *K. lactis* no existe Ssk22p), la transmisión de la señal se lleva a cabo mediante la vía de Sho1p y las células crecen adecuadamente en un medio de alta osmolaridad. Sin embargo, cuando *KISSK2* se inactivó en una mutante $\Delta KISho1$, se observó que las

levaduras son sensibles a un medio hiperosmolar, lo cual concuerda con los resultados observados en dobles mutantes de *S. cerevisiae* (**Posas & Saito, 1997**).

En *S. cerevisiae*, Ste11p y su proteína adaptadora Ste50p (**Wu, 2006**) participan en diferentes vías de señalización entre las cuales está la vía HOG. Cuando se inactiva alguna de estas proteínas la levadura no tiene ningún problema en crecer adecuadamente en condiciones hiperosmolares ya que la vía SLN1 es capaz de compensar esta pérdida y sólo se observa sensibilidad al estrés osmótico cuando se inactivan ambas ramas (**Posas & Saito, 1997**). Sin embargo en *K. lactis* los resultados mostraron de manera sorprendente que la falta de KISTe11p y KISTe50p comprometen el crecimiento de las células en condiciones de alta osmolaridad, aún cuando no se presente alguna alteración en el funcionamiento de la rama SLN1, lo cual nos indica que la vía SHO1 y en particular estas proteínas pueden actuar en conjunto para responder a condiciones de hiperosmolaridad de manera similar a como funcionan en el sistema de respuesta a feromonas (**Kawasaki, 2008**).

Los resultados observados muestran que una mutante $\Delta Kiste11$ tiene un fenotipo de sensibilidad en condiciones de hiperosmolaridad, el cual puede ser comparado con el que se observa en mutantes de la MAPKK Pbs2p o de la MAPK Hog1p de *S. cerevisiae*, este hallazgo es muy interesante ya que sugiere que en *K. lactis*, esta proteína podría ser un punto de convergencia entre ambas ramas, a diferencia de lo que se ha reportado para *S. cerevisiae* en donde se ha descrito que la MAPKK Pbs2p es la proteína en donde las dos ramas se interceptan (Figura 17a). A pesar de la sensibilidad tan evidente que presenta la mutante $\Delta Kiste11$, la presencia de esta proteína por sí misma no es suficiente para conferir osmoprotección a la célula, ya que una cepa que tiene inactivas ambas ramas de la vía de HOG como $\Delta KIssk2 \Delta Kisho1$, (la MAPKKK de la vía de SLN1 y la proteína encargada de localizar a Ste11p en la membrana respectivamente) es muy sensible al estrés hiperosmótico (**Tatebayashi, 2006; Zarrinpar, 2004**). Estos resultados sugieren que la localización de KISTe11p es muy importante para que lleve a cabo su actividad.

Sho1p es una proteína de membrana que participa en la activación de la vía HOG. Se ha demostrado que Ste11p se asocia con Sho1p y con la MAPKK Pbs2p en

condiciones de estrés hiperosmótico y que el complejo se localiza en la membrana **(Posas & Saito, 1997)**. De acuerdo a esto se localizó a KIS_{te}11p en la membrana añadiéndole los segmentos transmembranales de la proteína KIS_{ho}1p al extremo amino terminal; y se observó que esta proteína híbrida es capaz de generar protección a estrés hiperosmótico en una doble mutante $\Delta KIS_{ho}1KIS_{sk}2$, estos resultados muestran que cuando KIS_{te}11p se lleva a la membrana de manera artificial es capaz de formar y activar complejos que pueden funcionar aún en ausencia de la proteína de andamiaje KIS_{ho}1p. Además de probar la proteína híbrida en la vía HOG, también se evaluó su posible participación en el sistema de apareamiento de *K. lactis* y se observó que esta fusión no es capaz de funcionar en ausencia de la proteína endógena KIS_{te}11p, por lo que las células son incapaces de aparearse. Esto indica que esta proteína quimérica no es capaz de formar complejos proteicos que son requeridos para responder a feromonas.

Los resultados obtenidos indican que más allá del papel que pueda desempeñar KIS_{te}11p en la vía de respuesta a feromonas **(Kawasaki, 2008)**, esta proteína desempeña un papel fundamental en la formación de complejos para responder a estrés hiperosmótico en *K. lactis* (Figura 17b). La función de KIS_{ho}1p en la vía HOG de *K. lactis* podría ser más detallada en un futuro. Tradicionalmente, esta molécula es considerada como un andamio para la MAPKK Pbs2p. Sin embargo, por los resultados observados es probable que KIS_{ho}1p pueda tener una función más activa en la vía de señalización, quizá sirviendo como una plataforma alrededor de la cual se organice el complejo de señalización, por lo cual es de particular interés investigar cuáles son los requerimientos estructurales para generar un complejo activo, particularmente los que involucran a KIS_{ho}1p que recluta a la MAPKKK KIS_{te}11p y a la MAPKK KIPbs2p. Los resultados obtenidos sugieren que KIS_{te}11p desarrolla un papel central permitiendo que KIPbs2p se localice en los sitios donde se forman los complejos, ya que la proteína de fusión KIS_{ho}1TM/Ste11p, a la cual le falta el sitio mediante el cual KIS_{ho}1p de una a KIPbs2p, es capaz de conferir osmoprotección a la célula.

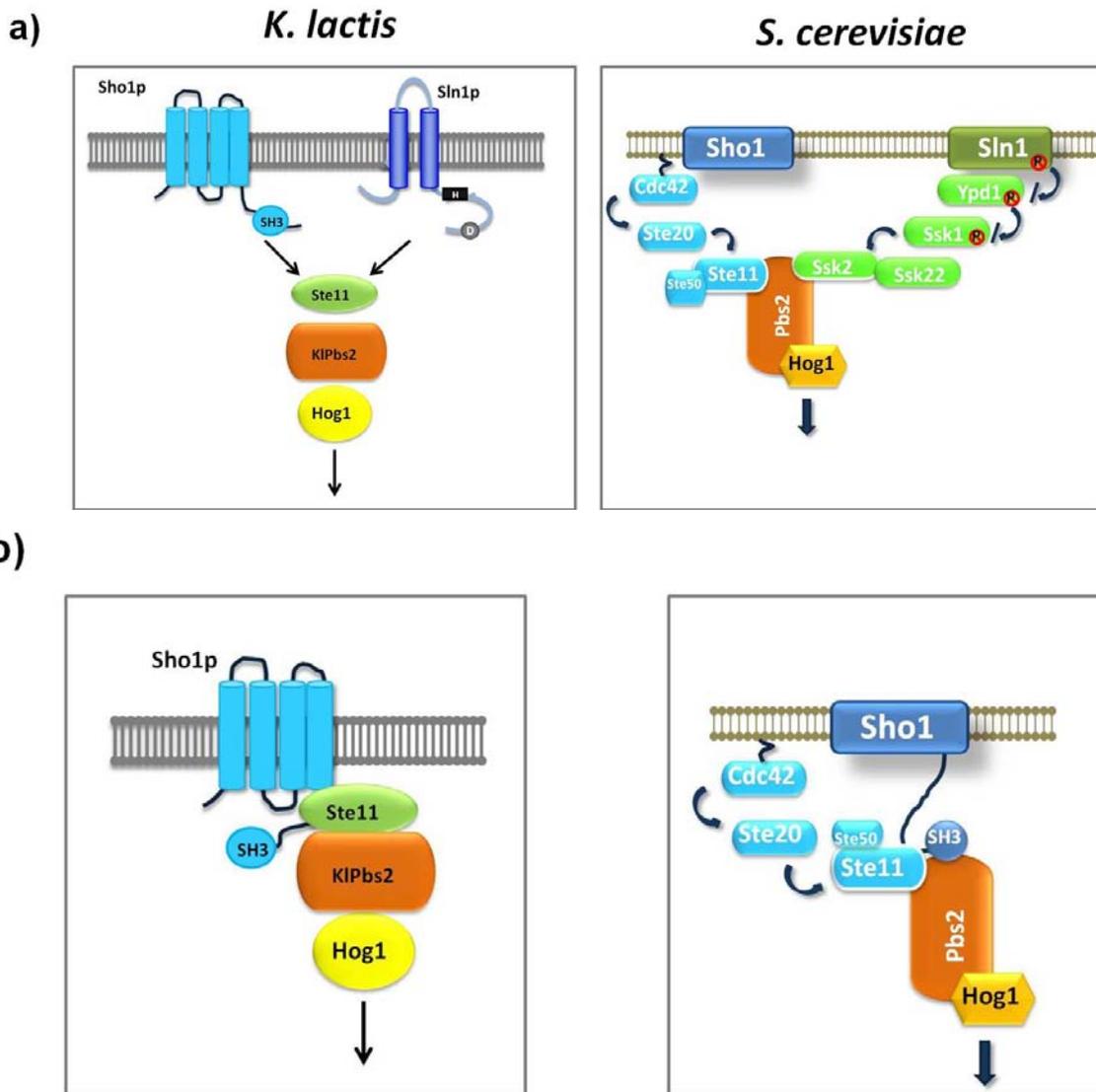


Figura 17. Modelo de la función de KISte11p en la vía de respuesta a estrés osmótico en *K. lactis*. a) La falta de KISte11p induce que la célula no pueda responder al estrés osmótico, por lo tanto esta proteína podría ser un punto de intersección entre ambas ramas, lo cual contrasta con *S. cerevisiae* en donde el punto de convergencia es la MAPKK Pbs2. b) La localización de KISte11 en la membrana es muy importante para responder al estrés hiperosmótico y puede prescindir del dominio SH3 de KISho1p.

En este trabajo, se encontró que la exposición de células de *K. lactis* a estrés hiperosmótico induce la fosforilación de KIHog1p y su translocación al núcleo. Esta respuesta permite que las células sean osmoresistentes y puedan crecer en un medio hiperosmótico. Para inducir la sensibilidad a estrés hiperosmótico en *K. lactis*, es necesario eliminar componentes de ambas ramas (SHO1 y SLN1) o la MAPKKK KISte11p. La inactivación a nivel de la proteína membranal y adaptadora KISho1p ó de

la MAPKKK K1Ste11p, ambas de la rama SHO1, junto con la eliminación de la MAPKKK K1Ssk2p de la rama SLN1, generó sensibilidad al estrés osmótico. Sorprendentemente, en esas mutantes se observó fosforilación de K1Hog1p (Figura 18a, c y d)). En las levaduras donde se inactivaron ambas MAPKKK ($\Delta K1ste11\Delta K1ssk2$), K1Hog1p en su forma activa (observada mediante fosforilación) se localizó en el núcleo pero no fue capaz de inducir la expresión del gen *K1STL1* que codifica para el simportador glicerol/protón encargado de mantener los niveles de glicerol para proteger a las células contra estrés hiperosmótico (**Ferreira & Lucas, 2007**). Adicionalmente, los resultados muestran que cuando una mutante sencilla de $\Delta K1ste11$ se expone a estrés hiperosmótico, K1Hog1p también se fosforila, pero el fenotipo que se observa en la mutante es de osmosensibilidad, como se mencionó anteriormente (Figura 18a y b).

Como se esperaba, se observó que otras mutantes sencillas como en $\Delta K1sho1$, $\Delta K1ste20$ y $\Delta K1ssk2$, en las cuales está inactiva solo una de las ramas de la vía HOG (SHO1 o SLN1), son capaces de inducir la fosforilación de K1Hog1p y se observó osmoresistencia cuando fueron expuestas a estrés osmótico.

Estos resultados sugieren que la fosforilación que se produce en K1Hog1p en células silvestres de alguna manera puede ser diferente a la fosforilación que se observa en la mutante sencilla $\Delta K1ste11$ y en la doble mutante $\Delta K1ste11\Delta K1ssk2$. Un fenómeno similar se ha observado en *S. cerevisiae*; en mutantes que no tienen alguna de las MAPKKK (**Van Wuytswinkel, 2000**) y en una doble mutante de la MAPKKK Ste11p y el regulador de la respuesta de la vía SLN1, Ssk1p (**Zhi, 2013**), Hog1p se fosforila pero no induce osmoprotección en condiciones de estrés hiperosmótico severo (en estos experimentos se utilizó más de 1.0 M de NaCl o 0.8 M Sorbitol). Maayan y colaboradores (**2012**) propusieron que en *S. cerevisiae*, Hog1p puede ser autofosforilado en condiciones de exposición a estrés osmótico severo, aún en mutantes a las cuales les falta alguna vía canónica ya sea SHO1 y SLN1. En las condiciones que se utilizaron en este trabajo no se observó autofosforilación de K1Hog1p de *K. lactis* y se demostró que la fosforilación de K1Hog1p requiere de la presencia de K1Pbs2p y además de su actividad de cinasa (Figura 18a y e).

a)

Mutante	Fenotipo en estrés osmótico	Fosforilación de KIHog1
$\Delta Kiste11$	Sensible	+
$\Delta KIssk2\Delta Kisho1$	Sensible	+
$\Delta KIssk2\Delta Kiste11$	Sensible	+
KIPbs2 ^{KM}	Sensible	-

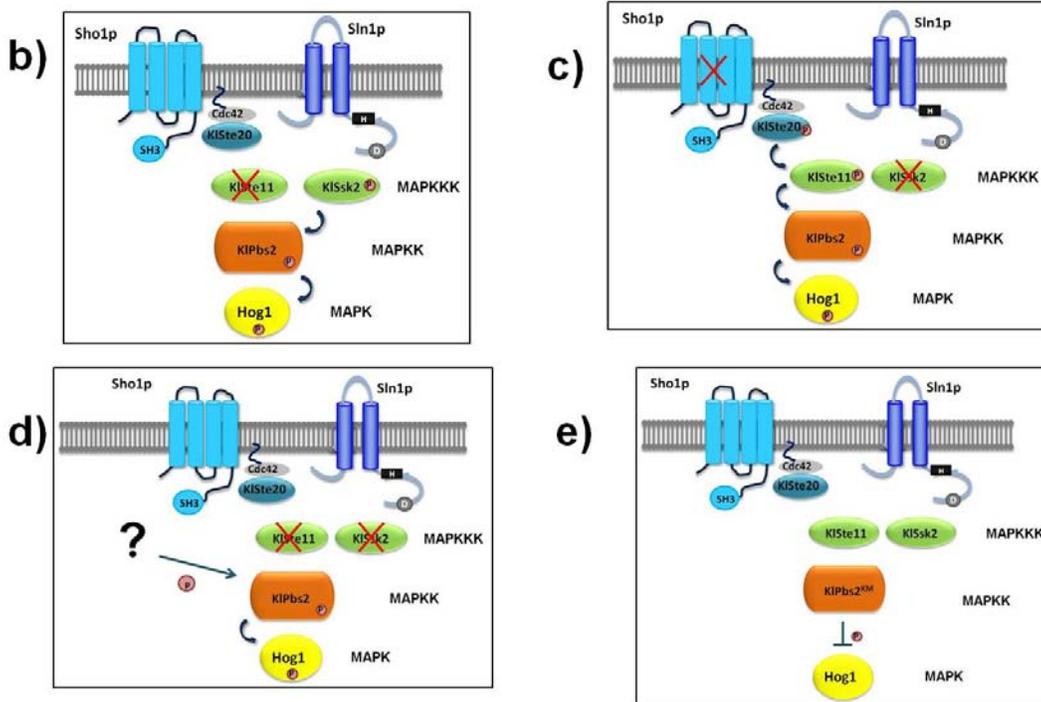


Figura 18. KIHog1p se fosforila por una proteína desconocida en mutantes donde las ramas SHO1 y SLN1 están inactivas. a) Fenotipos de las mutantes generadas en este trabajo y el estado de fosforilación de KIHog1p. b) Modelo de la fosforilación de KIHog1p en ausencia de la MAPKKK Kiste11p. En esta condición KIHog1p puede ser fosforilado la MAPKKK KIssk2p ya que la rama SLN1 no está inactiva. c) Modelo de fosforilación de KIHog1p en la mutante $\Delta Kisho1\Delta KIssk2$. En esta mutante se encuentran inactivas las ramas SHO1 y SLN1, sin embargo, la MAPKKK Kiste11p de alguna manera puede estar transmitiendo la señal a la MAPKK KIPbs2p y esta a la MAPK KIHog1p, aunque esta fosforilación sea fútil ya que la célula es sensible al estrés hiperosmótico. d) En la mutante donde ambas MAPKKK (KIssk2p y Kiste11p) están inactivas la fosforilación de KIHog1p puede llevarse a cabo a través de alguna proteína que aún no se ha identificado la cual puede activar a KIPbs2p y esta fosforilar a KIHog1p. e) La actividad de cinasa de KIPbs2p es muy importante para inducir la fosforilación de KIHog1p ya que cuando se suprime esta actividad, la célula es sensible a estrés hiperosmótico y en este caso no se observa fosforilación de KIHog1p.

Los resultados observados sugieren que en *K. lactis* la respuesta de la vía HOG a condiciones de estrés hiperosmótico puede ser activada por diferentes rutas, y en alguna de ellas la fosforilación de KIHog1p quizás no esté relacionada del todo con la respuesta al estrés hiperosmótico en esta especie de levadura.

Este estudio indica que bajo ciertas circunstancias, la fosforilación de KIHog1p puede ser provocada por alguna otra vía diferente a las ramas conocidas de HOG y que la fosforilación por dicha vía alternativa conduce a que KIHog1p sea capaz de localizarse en el núcleo aunque este hecho no es suficiente para proteger a la célula en condiciones de hiperosmolaridad.

Sería interesante buscar un posible activador de Hog1p, y un candidato podría ser la MAPKK Ste7p, ya que en trabajos previos se demostró que esta proteína participa en la fosforilación de KIHog1p, a pesar de que no muestra interacción con KIPbs2p (**Kawasaki, 2008**). Adicionalmente, se podría analizar la posible participación de la cinasa KIHsl1p en la activación de KIHog1p en células a las que les falta la rama SHO1 y SLN1, ya que una mutante inactiva en esta proteína es sensible al estrés hiperosmótico pero muestra fosforilación constitutiva de KIHog1p (**Cialfi, 2011**).

De acuerdo a las observaciones no se descarta la posibilidad de que esta vía o algunos de sus componentes participen en la respuesta celular a otros tipos de estrés, como el estrés oxidativo y el estrés por calor que tengan como resultado la activación de la vía de HOG de *K. lactis*. De hecho se ha observado un aumento en la fosforilación de KIHog1p en células donde KIPmr1p ha sido inactivado (**Uccelletti, 2005**). Las mutantes en *KIPMR1* muestran una variedad de defectos, incluyendo alteración en la homeostasis del calcio y estrés oxidativo.

Los hallazgos obtenidos en este estudio contribuyen a incrementar el conocimiento de la vía HOG en diferentes especies de levaduras y confirmar que la fosforilación de KIHog1p no es suficiente para inducir una respuesta celular a estrés hiperosmótico.

8. CONCLUSIONES

- ✓ Las mutantes en los componentes de la rama SHO1 o SLN1 mostraron un patrón de sensibilidad variable a condiciones de alta osmolaridad.
- ✓ La MAPKKK K1Ste11p es muy importante en la respuesta a estrés hiperosmótico y podría ser la proteína donde convergen las ramas SHO1 y SLN1.
- ✓ K1Hog1 se fosforila y se localiza en el núcleo en mutantes de las MAPKKK, pero protege a las células contra el estrés hiperosmótico.
- ✓ La fosforilación de K1Hog1p y su localización en el núcleo no es suficiente para proteger a la célula contra el estrés hiperosmótico.
- ✓ La fosforilación de K1Hog1p es dependiente de la actividad de cinasa de K1Pbs2p.

Perspectivas

- ◆ Realizar ensayos para buscar una proteína que pudiera estar activando a KIPbs2p en respuesta a estrés hiperosmótico.
- ◆ Determinar si esa proteína podría ser parte de una vía no descrita para responder a estrés hiperosmótico.
- ◆ Conocer cuál es el mecanismo por el cual KIPbs2p puede unirse a la membrana en ausencia del dominio SH3 de KISho1p.
- ◆ Mapear los posibles sitios de interacción entre KISte11p y KIPbs2p y determinar mediante ensayos de interacción si la unión de KISte11p a KIPbs2p es más importante que la unión de KIPbs2p a KISho1p en la respuesta al estrés hiperosmótico.

10. REFERENCIAS

- Adrover M, Zi Z, Duch A, Schaber J, Gonzalez-Novo A, Jimenez J, Nadal-Ribelles M, Clotet J, Klipp E, Posas F. 2011. Time-dependent quantitative multicomponent control of the G(1)-S network by the stress-activated protein kinase Hog1 upon osmostress. *Sci Signal* 4:ra63
- Alonso-Monge R, Navarro-Garcia F, Román E, Negredo AI, Eisman B, Nombela C, Pla J. 2003. The Hog1 mitogen- activated protein kinase is essential in the oxidative stress response and chlamydospore formation in *Candida albicans*. *Eukaryot Cell* 2:351–361.
- Backhaus K, Buchwald U, Heppeler N, Schmitz H, Rodicio R, Heinisch J. 2011. Milk and sugar: Regulation of cell wall synthesis in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eur J Cell Biol* 90: 745– 750
- Bell M, Engelberg D. 2003. Phosphorylation of Tyr-176 of the yeast MAPK Hog1/p38 is not vital for Hog1 biological activity. *Biol Chem* 278:14603-6.
- Bettinger B, Amberg D. 2007. The MEK Kinases MEKK4/Ssk2p Facilitate Complexity in the Stress Signaling Responses of Diverse Systems. *J Cell Biochem* 101:34–43.
- Bianchi M, Falcone C, Jie C, Wésłowski-Louvel M, Frontali L, Fukuhara H. 1987. Transformation of the yeast *Kluyveromyces lactis* by new vectors derived from the 1.6 µm circular plasmid pKD1. *Curr Genet* 12:185–192.
- Bilsland-Marchesan E, Ariño J, Saito H, Sunnerhagen P, Posas F. 2000. Rck2 Kinase Is a Substrate for the Osmotic Stress-Activated Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1. *Mol Cell Biol* 20:3887–3895.
- Blomberg A, & Adler L. 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv Microb Physiol* 33:145–212.
- Blomberg A. 2000. Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett* 182:1-8.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* 259:1760–1763.
- Brewster JL, Gustin MC. 2014. HOG1 : 20 years of discovery and impact. *Cell Biol* 7: 1–11.
- Buck V, Quinn J, Soto Pino T, Martin H, Saldanha J, Makino K, Morgan BA, Millar JB. 2001. Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Biol Cell* 12:407–419.
- Burg MB, Ferraris JD. 2008. Intracellular organic osmolytes: function and regulation. *J Biol Chem* 283:7309 –7313.
- Cheetham J, Smith DA, da Silva Dantas A, Doris KS, Patterson MJ, Bruce CR, Quinn J. 2007. A single MAPKKK regulates the Hog1 MAPK pathway in the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 18:4603–4614.
- Cialfi S, Uccelletti D, Carducci A, Wésolowski-Louvel M, Mancini P, Heipieper HJ, Saliola M. 2011. KIHs11 is a component of glycerol response pathways in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* 157: 1509–1518.
- Clotet J, Posas F. 2007. Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods Enzymol* 428:63-76.

- Degols G, Shiozaki K, Russell P. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16:2870–2877.
- Dohlman H, Thorner J. 2001. Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: paradigms and principles. *Annu. Rev. Biochem* 70:703-54.
- Drogen F, O'Rourke S, Stucke V, Jaquenoud M, Neiman A, Peter M. 2000. Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling *in vivo*. *Curr Biol* 10:630–639.
- Fassler J, West A. 2010. Genetic and biochemical analysis of the SLN1 pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 471:291-317
- Ferreira C, van Voorst F, Martins A, Neves L, Oliveira R, Kielland-Brandt M, Lucas C, Brandt A. 2005. A Member of the Sugar Transporter Family, Stl1p Is the Glycerol/H⁺ Symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 16:2068–2076.
- Ferreira C, Lucas C. 2007. Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene STL1 is overcome by high temperature. *FEBS Lett* 581: 1923–1927.
- Ferrigno P, Posas F, Koepp D, Saito H, Silver PA. 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J* 17:5606-5614.
- Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias-Robles A. 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev Latinoam Microbiol* 46: 24-46.
- Hao N, Behar M, Parnell SC, Torres MP, Borchers CH, Elston T C, Dohlman HG. 2007. A Systems Biology Analysis of Feedback Inhibition in the Sho1 Osmotic-Stress-Response Pathway. *Curr Biol* 17:659–667.
- Hao N, Zeng Y, Elston TC, Dohlman H. 2008. Control of MAPK specificity by feedback phosphorylation of shared adaptor protein Ste50. *J Biol Chem* 283:33798–33802.
- Hirokawa T, Boon-Chieng S, Mitaku S. 1998. SOSUI: classification and secondary structure prediction system for membrane proteins. *Bioinformatics* 14:378-379.
- Hohmann S, Mager WH. 1997. *Yeast Stress Responses*. Austin, TX, USA: R.G. Landes.
- Hohmann S. 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* 66:300-372.
- Hohmann S. 2015. An integrated view on a eukaryotic osmoregulation system. *Curr Genet* 61:373-82
- Kawasaki L, Castañeda-Bueno M, Sánchez-Paredes E, Velázquez-Zavala N, Torres-Quiroz F, Ongay-Larios L, Coria R. 2008. Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* 7:78-85.
- Kiewietdejonge A, Pitts M, Cabuhat L, Sherman C, Kladowang W, Miramontes G, Floresvillar J, Chan J, Ramirez R. 2006. Hypersaline stress induces the turnover of phosphatidylcholine and results in the synthesis of the renal osmoprotectant glycerophosphocholine in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* 6:205–217
- Kim S, Shah K. 2007. Dissecting yeast Hog1 MAP kinase pathway using a chemical genetic approach. *FEBS Lett* 581:1209–1216
- Krantz M, Becit E, Hohmann S. 2006. Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet* 49:137–151

- Kruppa M, Calderone R. 2006. Two-component signal transduction in human fungal pathogens. *FEMS Yeast Res* 6:149–159.
- Kühn C, Gennemark P. 2013. Modeling yeast osmoadaptation at different levels of resolution. *J Bioinform Comput Biol* 11:1330001
- Lamson R, Takahashi S, Winters M, Pryciak P. 2006. Dual role for membrane localization in yeast MAP kinase cascade activation and its contribution to signaling fidelity. *Current Biol* 16:618–623.
- Lee J, Reiter W, Dohnal I, Gregori C, Beese-Sims S, Kuchler K, Ammerer G, Levin D. 2013. MAPK Hog1 closes the *S. cerevisiae* glycerol channel Fps1 by phosphorylating and displacing its positive regulators. *Genes Dev* 27:2590–2601.
- Liu Z, Butow R. 1999. A Transcriptional Switch in the Expression of Yeast Tricarboxylic Acid Cycle Genes in Response to a Reduction or Loss of Respiratory Function. *Mol Cell Biol* 19:6720-6728
- Maayan I, Beenstock J, Marbach I, Tabachnick S, Livnah O, Engelberg D. 2012. Osmostress induces autophosphorylation of Hog1 via a C-terminal regulatory region that is conserved in p38 α . *Plos One* 7:44749.
- Maeda T, Takekawa M, Saito H. 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269:554–558.
- Marles J, Dahesh S, Haynes J, Andrews B, Davidson A. 2004. Protein-Protein Interaction Affinity Plays a Crucial Role in Controlling the Sho1p-Mediated Signal Transduction Pathway in Yeast. *Mol Cell* 14: 813–823.
- Melamed D, Pnueli L, Arava Y. 2008. Yeast translational response to high salinity: Global analysis reveals regulation at multiple levels. *RNA* 14:1337–1351
- Murakami Y, Tatebayashi K, Saito H. 2008. Tyrosine Phosphatase MAP Kinase Kinase and the Ptp2 Protein Kinase Differentially Interact with the Pbs2 Hog1 Mitogen-Activated Protein (MAP). *Mol Cell Biol* 28:2481-2494
- De Nadal E, Real F, Posas F. 2007. Mucins, osmosensors in eukaryotic cells? *TRENDS Cell Biol* 17:571-574
- Nevoigt E, Stahl U. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* 21:231–241.
- Ni L, Bruce C, Hart C, Leigh-Bell J, Gelperin D, Umansky L, Gerstein M, Snyder M. 2009. Dynamic and complex transcription factor binding during an inducible response in yeast. *Genes Dev* 23:1351-63.
- Nikolaou E, Agrafioti I, Stumpf M, Quinn J, Stansfield I, Brown A. 2009. Phylogenetic diversity of stress signalling pathways in fungi. *BMC Evol Biol* 9:44
- OhEigeartaigh SS, Armisen D, Byrne KP, Wolfe KH. 2011. Systematic discovery of unannotated genes in 11 yeast species using a database of orthologous genomic segments. *BMC Genomics* 12:377.
- Parmar JH, Bhartiya S, Venkatesh KV. 2009. A model-based study delineating the roles of the two signaling branches of *Saccharomyces cerevisiae*, Sho1 and Sln1, during adaptation to osmotic stress. *Physic Biol* 6:036019
- Posas F, Saito, H. 1997. Osmotic activation of the HOG MAP kinase pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276:1702–1705.

- Posas F, Takekawa M, Saito H. 1998. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* 1:175-182.
- Posas F, Saito H. 1998. Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* 17:1385-1394.
- Posas F, Wurgler-Murphy SM, Maeda T, Witten EA, Thai TC, Saito H. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 86:865-875.
- Proft M, Struhl K. 2004. MAP Kinase-Mediated Stress Relief that Precedes and Regulates the Timing of Transcriptional Induction. *Cell* 118:351-361.
- Raitt DC, Posas F, Saito H. 2000. Yeast cdc42 GTPase and Ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the Hog1 MAPK pathway. *EMBO J*. 19:4623-4631.
- Reiser V, Ruis H, Ammerer G. 1999. Kinase Activity-dependent Nuclear Export Opposes Stress-induced Nuclear Accumulation and Retention of Hog1 Mitogen-activated Protein Kinase in the Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10:1147-1161
- Reiser V, Salah SM, Ammerer G. 2000. Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol* 2:620-627.
- Reiser V, D'Aquino K, Ee L, Amon A. 2006. The stress-activated mitogen-activated protein kinase signaling cascade promotes exit from mitosis. *Mol Biol Cell* 17:3136-3146
- Rep M, Krantz M, Thevelein JM, Hohmann S. 2000. The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* 275:8290-300
- Rodaki A, Bohovych IM, Enjalbert B, Young T, Odds FC, Gow NA, Brown AJ. 2009. Glucose promotes stress resistance in the fungal pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 20:4845-4855.
- Rodicio R, Buchwald U, Schmitz HP, Heinisch JJ. 2008. Dissecting sensor functions in cell wall integrity signaling in *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* 45:422-435.
- Rodicio R, Heinisch J. 2013. Yeast on the milky way: genetics, physiology and biotechnology of *Kluyveromyces lactis*. *Yeast* 30:165-177
- Ruiz-Roig C, Noriega N, Duch A, Posas F, de Nadal E. 2012. The Hog1 SAPK controls the Rtg1/Rtg3 transcriptional complex activity by multiple regulatory mechanisms. *Mol Biol Cell* 23:4286-4296.
- Saito H, Tatebayashi K. 2004. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J. Biochem* 136:267-272.
- Sambrook J, Fritsch E and Maniatis T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor. N.Y.
- Samejima I, Mackie S, Fantes PA. 1997. Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J* 16:6162-6170.
- Sánchez-Paredes E, Kawasaki L, Ongay-Larios L, Coria R. 2011. The Gα subunit signals through the Ste50 protein during the mating pheromone response in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* 10:540-6

- Saviñón-Tejeda A, Ongay-Larios L, Valdés-Rodríguez J, Coria R. 2001. The *KlGpa1* gene encodes a G-protein α subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol* 183:229–234
- Shiozaki K, Russell P. 1996. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* 10:2276–2288.
- Shiozaki K, Shiozaki M, Russell P. 1997. Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1- Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell* 8:409–419.
- Smith DA, Nicholls S, Morgan BA, Brown AJ, Quinn J. 2004. A conserved stress-activated protein kinase regulates a core stress response in the human pathogen *Candida albicans*. *Mol Biol Cell* 15:4179–4190.
- Tanaka K, Tatebayashi K, Nishimura A, Yamamoto K, Yang H, Saito H. 2014. Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Sci Signal* 7:1-10
- Tatebayashi K, Takekawa M, Saito H. 2003. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J* 22:3624-3634
- Tatebayashi K, Yamamoto K, Tanaka K, Tomida T, Maruoka T, Kasukawa E, Saito H. 2006. Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J* 25:3033–3044.
- Tatebayashi K, Tanaka K, Yang H, Yamamoto K, Matsushita Y, Tomida T, Imai M, Saito H. 2007. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *EMBO J* 26, 3521–3533.
- Teige M, Scheikl E, Reiser V, Ruis H, Ammerer G. 2001. Rck2, a member of the calmodulin-protein kinase family, links protein synthesis to high osmolarity MAP kinase signaling in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci* 98:5625-30
- Uesono Y, Toh-e A. 2002. Transient inhibition of translation initiation by osmotic stress. *J Biol Chem* 277:13848-55.
- Van Wuytswinkel O, Reiser V, Siderius M, Kelders MC, Ammerer G, Ruis H, Mager WH. 2000. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol* 37:382-397.
- Vendrell A, Martínez-Pastor A, González-Novo A, Pascual-Ahuir A, Sinclair D, Proft M, Posas F. 2011. Sir2 histone deacetylase prevents programmed cell death caused by sustained activation of the Hog1 stress-activated protein kinase. *EMBO Rep* 12:1062-8.
- Warringer J, Hult M, Regot S, Posas F, Sunnerhagen P. 2010. The HOG Pathway Dictates the Short-Term Translational Response after Hyperosmotic Shock. *Mol Biol Cell* 21: 3080–3092.
- Wesolowski-Louvel M, Breunig KD, Fukuhara H. 1996. *Kluyveromyces lactis*: Genetics, Biochemistry and Molecular Biology of Non-Conventional Yeast. Springer-Verlag, Berlin, 139-201.
- Widmann C, Gibson S, Jarpe M, Johnson G. 1999. Mitogen-Activated Protein Kinase: Conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev* 79:143-180.
- Wu C, Jansen G, Zhang J, Thomas D, Whiteway M. 2006. Adaptor protein Ste50p links the Ste11p MEKK to the HOG pathway through plasma membrane association. *Genes Dev* 20:734-46
- Wu C, Leberer E, Thomas D, Whiteway M. 1999. Functional Characterization of the Interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 10:2425-2440

Yaakov G, Duch A, García-Rubio M, Clotet J, Jimenez J, Aguilera A, Posas F. 2009. The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress. *Mol Biol Cell* 20:3572-82

Yamamoto K, Tatebayashi K, Tanaka K, Saito H. 2010. Dynamic control of yeast MAP kinase network by induced association and dissociation between the Ste50 scaffold and the Opy2 membrane anchor. *Mol Cell* 40:87–98.

Yancey P. 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J Exp Biol* 208:2819-2830

Zarrinpar A, Bhattacharyya RP, Nittler MP, Lim WA. 2004. Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol Cell* 14:825–832.

Zhi H, Tang L, Xia Y, Zhang J. 2013. Ssk1p-independent activation of Ssk2p plays an important role in the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: Alternative activation of Ssk2p in osmotic stress. *Plos One* 8:54867

Zuzuarregui A, Li T, Friedmann C, Ammerer G, Alepuz P. 2015. Msb2 is a Ste11 membrane concentrator required for full activation of the HOG pathway. *Biochimica et Biophysica Acta* 1849:722–730.

11. APÉNDICE

11.1. ARTICULO: Ineffective Phosphorylation of Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1p in Response to High Osmotic Stress in the Yeast *Kluyveromyces lactis*.