



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

**ESTUDIO DEL SISTEMA DE FOSFORELEVO (Sln1p-Ypd1p-Ssk1p) EN  
LA VÍA DE RESPUESTA A ESTRÉS OSMÓTICO EN LA LEVADURA**

***Kluyveromyces lactis***

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**BIÓL. MIRIAM BEATRIZ RODRÍGUEZ GONZÁLEZ**

**TUTOR PRINCIPAL:**

**DR. ROBERTO CORIA ORTEGA**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:**

**DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO**

Facultad de química, UNAM

**DR. DIMITRIS GEORGELLIS**

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

**Ciudad de México. Diciembre, 2018**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

---

Este trabajo se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega, en el departamento de Genética Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Miriam Beatriz Rodríguez González recibió durante el desarrollo de este trabajo el apoyo de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y contó con el apoyo del Programa de Posgrado de Ciencias Bioquímicas, UNAM.

El proyecto se realizó gracias a los financiamientos del CONACYT proyecto CB-166734 y PAPIIT-DGAPA UNAM Proyecto IN206513.

El trabajo recibió la supervisión del comité tutorial integrado por la Dra. Martha Patricia Coello Coutiño y el Dr. Dimitris Georgellis, a quienes agradecemos por las aportaciones realizadas.

Agradecemos la colaboración y el apoyo técnico de la Dra. Laura Kawasaki Watanabe, durante la realización de este proyecto. Reconocemos el apoyo y asesoría de la Dra. Nancy Guadalupe Velázquez Zavala.

Reconocemos el apoyo y la asesoría recibida por la Unidad de Biología Molecular del IFC, UNAM. A la Dra. Laura Ongay Larios y a la Biol. Guadalupe Códiz Huerta.

Agradecemos a la unidad de cómputo del IFC, UNAM. Al M. en C. Gerardo Coello Coutiño, a la M. en C. Ana María Escalante Gonzalbo y al Ing. Juan Manuel Barbosa Castillo. Así mismo agradecemos al taller de Mantenimiento del IFC, al Ing. Aurey Galván Lobato e Ing. Manuel Ortínez Benavides. Y a la secretaria Rocío Martínez por el apoyo logístico.

Agradecemos a los miembros del jurado quienes evaluaron esta tesis. Dra. González Manjarrez María Alicia, Dr. Aguilar Osorio Guillermo, Dr. Pardo Vázquez Juan Pablo, Dra. Navarro González Rosa Estela y Dra. González Pedrajo Bertha María Josefina.

***A Lourdes y Víctor  
por su amor y apoyo incondicional  
los amo***

***y a todas aquellas mujeres que todos los días  
luchan por un mundo más justo***

***“Cuando uno sabe, sabe, y cuando no sabe lo mejor es aprender. Y, mientras tanto, no decir nada, a menos que lo que uno diga esté encaminado a hacer más claro el aprendizaje. Su vida misma, según explicaba, había sido un aprendizaje constante”***

**Roberto Bolaño, 2666.**

## AGRADECIMIENTOS

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi casa y sitio de partida para tantas aventuras. Agradezco a todos los docentes que guiaron y cambiaron mi vida. A mis alumnos que me han acompañado en la elaboración de este trabajo.

A Roberto Coria por tanto aprendizaje y paciencia. Por aceptarme en su laboratorio, no podría escribir todo lo que ello significó para mi.

A Laurita cuya paciencia no dejará de sorprenderme nunca. Agradezco tu amistad y pasión por lo todo lo que haces, tu compañía siempre será invaluable para mi. ¡Te quiero muchísimo!

A Nancy que siempre será entrañable. Que sin importar las distancias físicas y espirituales ha sabido acompañarme ¡cuantas aventuras recorridas!

A mis padres que siempre han acompañado mis sueños y locuras, son los mejores guías que el universo pudo darme. Gracias por apoyar y cuidar a sus nietos con tanto amor. Sin ustedes no sería nada

A mis hermanas y sobrinas. Ariana, Sandra, Natalia y Emilia no tengo palabras para escribir todo lo que aportan a mi vida y lo que su apoyo y locuras significan para mi. Las amo incondicionalmente. ¡Ustedes junto a mi Lucia y mi mamá son las mujeres de mi vida!

A Héctor por ser mi hogar. No podría tener mejor compañero de viaje. Gracias por estar aún sin entender muchos de mis enredos mentales. Te amo.

A mis luciérnagas; Leonardo y Lucía. Cuya Luz alienta mis sueños y guía mis pasos. Ustedes más que nadie han tenido que sortear conmigo este último trayecto.

A la música y a la literatura que siempre me han acompañado. . .

# CONTENIDO

Página

---

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	2
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	3
- LEVADURAS COMO MODELO DE ESTUDIO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR .....	3
- VÍA DE RESPUESTA A ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.....	4
- RAMA DE SHO1.....	7
- RAMA DE SLN1 SISTEMA DE FOSFORELEVO.....	7
- OTROS SISTEMAS DE FOSFORELEVO .....	11
- RESPUESTA A ESTRÉS HIPERÓSMOTICO EN <i>Kluyveromyces lactis</i> .....	15
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	17
<b>HIPÓTESIS</b> .....	18
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	18
<b>MATERIALES Y METODOS</b> .....	19
- CEPAS .....	19
- MEDIOS DE CULTIVO .....	20
- PLÁSMIDOS .....	21
- OLIGONUCLEOTIDOS .....	21
- CONSTRUCCIONES GENÉTICAS Y MUTAGÉNESIS .....	23
- PURIFICACIÓN DE KIYpd1, KISSk1 Y KISSk1 <sup>DA</sup> .....	28
- PRUEBAS DE RESPUESTA A ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.....	29
- ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS .....	29
- ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN E INMUNODETECCIÓN.....	30
- ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN <i>in vitro</i> .....	30
- ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN <i>in vivo</i> .....	31
- CUANTIFICACIÓN INTRACELULAR DE GLICEROL Y TREHALOSA.....	32
<b>RESULTADOS PUBLICADOS</b> .....	33
- AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS GENES <i>KISLN1</i> , <i>KIYPD1</i> Y <i>KISSK1</i> .....	33
- LA ELIMINACIÓN DE LOS GENES <i>KISLN1</i> , <i>KIYPD1</i> Y <i>KISSK1</i> PRODUCE CELULAS VIABLES Y NO SON SENSIBLES AL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.....	35
- CINÉTICA DE FOSFORILACIÓN DE KIHOG1 EN <i>K. lactis</i> .....	38

- <i>KlHog1</i> NO SE FOSFORILA CONSTITUTIVAMENTE EN LAS MUTANTES <i>ΔKlsln1, ΔKlypd1, ΔKlssk1</i> Y <i>ΔKlsln1 ΔKIPTP2</i> .....	39
- INACTIVACIÓN DE LAS DOS RAMAS DE LA VÍA DE HOG EN <i>K. lactis</i> OCASIONA ALTA SENSIBILIDAD EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.....	42
- <i>KlYpd1</i> ES CAPAZ DE ACEPTAR UN GRUPO FOSFATO Y TRANSFERIRLO A <i>KLSSK1</i> .....	43
- EL SISTEMA DE FOSFORRELEVO SE INACTIVA EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.....	45
- LA PROTEÍNA <i>KlSsk2</i> INTERACCIONA MAS CON LA FORMA DESFOSFORILADA DE <i>KISSK1</i> ( <i>KlSsk1<sup>DA</sup></i> ).....	47
- <i>K. lactis</i> ACUMULA MENOS GLICEROL QUE <i>S. cerevisiae</i> EN RESPUESTA AL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO.....	48
- <i>KlHog1p</i> COMPLEMENTA LA AUSENCIA DE <i>ScHog1p</i> EN <i>S. cerevisiae</i> .....	50
- <i>ScHog1</i> NO GENERA LETALIDAD CELULAR Y COMPLEMENTA LA AUSENCIA DE <i>KlHog1</i> EN <i>K. lactis</i> .....	53
<b>DISCUSIÓN</b> .....	54
<b>CONCLUSIONES</b> .....	61
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	62
<b>REFERENCIAS</b> .....	63
<b>APÉNDICE</b> .....	69
<b>ARTÍCULO:</b> <b>ROLE OF THE SLN1-PHOSPHORELAY SYSTEM IN THE RESPONSE TO HYPEROSMOTIC STRESS IN THE YEAST <i>Kluyveromyces lactis</i></b>	

---



**FIGURAS****Página**

---

<b>Fig. 1</b>	Cascada de señalización típica de MAP cinasas.....	4
<b>Fig. 2</b>	Vía de HOG de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	6
<b>Fig. 3</b>	Sistemas de fosfotransferencia.....	8
<b>Fig. 4</b>	Sistema de fosforrelevo Sln1-Ypd1-Ssk1 en la vía de HOG.....	10
<b>Fig. 5</b>	Productos de PCR de los genes <i>KISLN1</i> , <i>KIYPD1</i> y <i>KISSK1</i> de <i>K. lactis</i> .....	33
<b>Fig. 6</b>	Generación de cepas $\Delta Klsln1$ y $\Delta KlYPD1$ .....	36
<b>Fig. 7</b>	Obtención de la cepa $\Delta Klssk1$ .....	37
<b>Fig. 8</b>	Pruebas de estrés hiperosmótico en placa.....	38
<b>Fig. 9</b>	Cinética de fosforilación de KlHog1 .....	39
<b>Fig. 10</b>	Fosforilación de KlHog1 de mutantes de <i>K. lactis</i> .....	40
<b>Fig. 11</b>	Fosforilación de KlHog1 en las cepas $\Delta Klptp2$ y $\Delta Klsln1\Delta Klptp2$ .....	41
<b>Fig. 12</b>	Inactivación de las dos ramas SLN1 y SHO1.....	43
<b>Fig. 13</b>	Ensayo de fosforilación <i>in vitro</i> de las proteínas KIYpd1 y KISsk1.....	45
<b>Fig. 14</b>	Fosforilación <i>in vivo</i> de KIYpd1 .....	46
<b>Fig. 15</b>	Interacción entre KISsk1 y KISsk2.....	47
<b>Fig. 16</b>	Comparación en la acumulación de glicerol entre <i>K. lactis</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	49
<b>Fig. 17</b>	Expresión de KlHog1 en <i>S. cerevisiae</i> .....	51
<b>Fig. 18</b>	Expresión de KlHog1 en la cepa <i>sln1-ts</i> .....	52
<b>Fig. 19</b>	Expresión de Schog1 en <i>K. lactis</i> .....	53
<b>Fig. 20</b>	Sistema de fosforelevo en respuesta a estrés hiperosmótico de <i>K. lactis</i> .....	60

---

**TABLAS****Página**

---

<b>Tabla 1</b>	Número de componentes de sistemas de fosforelevo en eucariontes.....	12
<b>Tabla 2</b>	Comparación entre estructuras de SHK's.....	13
<b>Tabla 3</b>	Cepas utilizadas.....	19
<b>Tabla 4</b>	Oligonucleótidos empleados.....	22
<b>Tabla 5</b>	Comparación de las proteínas del sistema de fosforelevo entre <i>K. lactis</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	34
<b>Tabla 6</b>	Comparación en la producción de trehalosa entre <i>K. lactis</i> y <i>S. cerevisiae</i> .....	50

---

## RESUMEN

---

La señalización celular implica procesos muy importantes para la supervivencia de los seres vivos. La vida misma depende directamente de la capacidad de las células de recibir señales y adaptarse a un entorno cambiante. La vía de HOG en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* está involucrada en la respuesta al estrés hiperosmótico y consiste en dos ramas; la de SHO1 y la de SLN1. La rama de Sln1 contiene un sistema de fosforrelevo que tiene un papel negativo sobre la MAP cinasa ScHog1. Al eliminar dicho sistema se da una sobre activación de ScHog1 lo que ocasiona letalidad celular.

En este trabajo demostramos que la levadura *Kluyveromyces lactis* tiene un sistema de fosforelevo compuesto por el osmosensor cinasa de histidina KISln1, una proteína de fosfotransferencia KIYpd1 y una reguladora de la respuesta KISsk1. El sistema resultó ser funcional, además de que se comprobó su participación en la respuesta al estrés hiperosmótico. Sorprendentemente, al eliminar KISln1 o KIYpd1 e inactivar el sistema de fosforelevo, no se detectó fosforilación constitutiva de KIHog1 y las células resultaron viables. El sistema de fosforrelevo en *K. lactis* regula negativamente a KIHog1, ya que se demostró que el sistema se inactiva en condiciones de estrés y que la forma KISsk1 que carece del grupo fosfato es la que interactúa con la MAPKKK KISsk2. También hemos observado que la inactivación de la fosfatasa KIPtp2 en una cepa  $\Delta KISln1$ , no da lugar a una fosforilación constitutiva de KIHog1. Por otro lado, observamos que en comparación con *S. cerevisiae*, *K. lactis* tiene una acumulación moderada de glicerol y produce muy poca trehalosa bajo estrés hiperosmótico, lo que indica que la regulación de la producción de osmolitos es diferente en *K. lactis*.

Por último, hemos demostrado que KIHog1 puede reemplazar a ScHog1 y activar la respuesta al estrés en *Saccharomyces cerevisiae*, y cuando ScSln1 se desactiva, KIHog1 se fosforila e induce letalidad celular. Además, se observó que ScHog1 puede activar la respuesta al estrés en *K. lactis*, y sin embargo no genera letalidad celular. Nuestro datos sugiere la existencia de una retroalimentación negativa que es independiente de KIPtp2 que opera en *K. lactis*.

## ABSTRACT

---

Cell signaling involves very important processes for survival of organisms. Life itself depends directly on the capacity of the cells to receive signals and adapt to a changing environment. The HOG pathway from *Saccharomyces cerevisiae* consists of two branches (SHO1 and SLN1) that sense osmotic changes. The SLN1 branch consists of a phosphorelay system that is analogous to bacterial two-component systems. It is composed of a hybrid histidine sensor kinase, Sln1, an intermediate phosphotransfer protein, Ypd1, and two response regulators, Ssk1. The SLN1 phosphorelay system plays a negative regulatory role for Hog1, and null mutants of SLN1 and YPD1 showed constitutive phosphorylation of Hog1 and cell death due to overactivation of the HOG pathway.

In this study we demonstrated that the phosphorelay system in *Kluyveromyces lactis* includes the osmosensor histidine kinase KISln1, the phosphotransfer protein KIYpd1 and the response regulator KISsk1. Upon hyperosmotic stress the phosphorelay is inactivated, KIYpd1 is dephosphorylated in a KISln1 dependent manner, and only the version of KISsk1 that lacks the phosphate group interacts with the MAPKKK KISsk2. Surprisingly elimination of the KISln1 or KIYpd1, does not generate constitutive phosphorylation of KIHog1 and the cells are viable. Furthermore, the inactivation of the KIPtp2 phosphatase in a  $\Delta KISln1$  mutant did not lead to KIHog1 constitutive phosphorylation. All these observations indicate that the phosphorelay negatively regulates KIHog1. Additionally compared with *S. cerevisiae*, *K. lactis* has only a moderate accumulation of glycerol and fails to produce trehalose under hyperosmotic stress, indicating that regulation of osmolyte production is different in *K. lactis*.

KIHog1 can replace ScHog1p and activate the hyperosmotic response in *Saccharomyces cerevisiae*, and when ScSln1 is inactivated, KIHog1 becomes phosphorylated and induces cell lethality. In addition, ScSln1 can activate the stress response in *K. lactis* however does not generate cellular lethality. Our data suggest the existence of a strong negative feedback that is independent of KIPtp2 operates in *K. lactis*.

# INTRODUCCIÓN

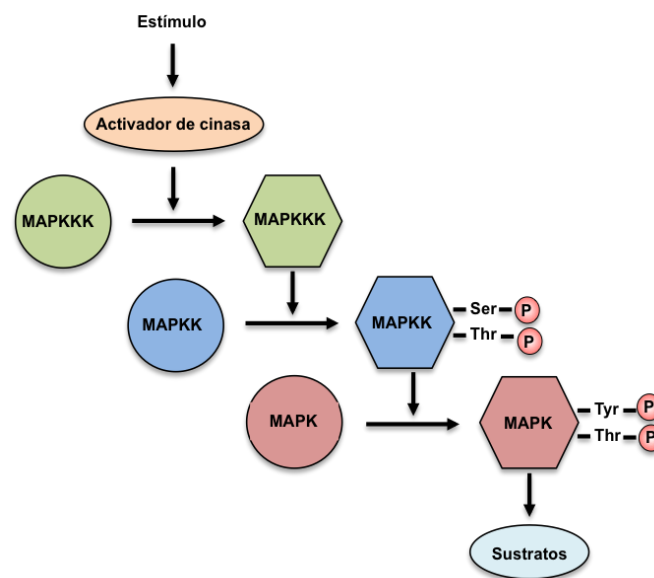
---

## LEVADURAS COMO MODELO DE ESTUDIO EN SEÑALIZACIÓN CELULAR

Poder percibir y adaptarse a un medio ambiente cambiante constituye una de las características más importantes de los seres vivos. Todos los organismos han adquirido diversos sistemas de señalización celular que les permiten generar respuestas prontas y adecuadas. Estos sistemas de señalización involucran una serie de proteínas que interactúan entre sí para transmitir una señal específica y desencadenar cambios en las funciones celulares, permitiendo la adaptación. Se estima que más del 20% de los genes presentes en el genoma humano codifican proteínas que tienen que ver con señalización celular, y si pensamos en los muchos y diversos estímulos que una célula recibe todo el tiempo, es de esperarse que estos sistemas resulten extraordinariamente complejos. Se trata de una compleja red de circuitos con múltiples elementos, intersecciones y nódulos. A pesar de la gran cantidad de estudios que se han hecho, aún se desconocen muchos aspectos de la regulación y retroalimentación celular presente en dichas redes ([Downward 2000](#); [Pawson 1995](#)).

Las levaduras son excelentes modelos de estudio para entender toda clase de mecanismos celulares, además de que su manejo en el laboratorio resulta bastante sencillo y económico comparado con otros eucariontes. En el área de señalización celular han sido ampliamente empleadas, tanto para entender el funcionamiento de cascadas de señalización propias como para extrapolar la función y la composición de vías de señalización de eucariontes superiores. En la actualidad, se emplean las llamadas levaduras humanizadas; donde gracias al avance de técnicas en biología molecular y celular, es posible montar toda una cascada de señalización de mamíferos y así estudiar enfermedades como el cáncer ([Rodríguez-Escudero et al., 2005](#)). La levadura más estudiada ha sido, por muchos años, *Saccharomyces cerevisiae*. En particular, se conocen

muy bien las vías de señalización que involucran a las MAP cinasas. Estas vías están altamente conservadas y se componen de tres proteínas: la MAPKKK (MAP cinasa-cinasa-cinasa), la MAPKK (MAP cinasa-cinasa) y una MAPK (MAP cinasa). Ante el estímulo, la MAPKKK activa por fosforilación a la MAPKK en los residuos de serina y treonina (Ser/Thr) altamente conservados, a su vez la MAPKK fosforila la MAPK en los residuos de tirosina y treonina (Tyr/Thr). Esta última cinasa es comúnmente la encargada de entrar al núcleo y desencadenar el proceso adaptativo (Widmann 1999; Saito & Posas 2012) (Fig. 1).



**Fig. 1.- Casada de señalización típica de MAP cinasas;** un estímulo conlleva la activación de la MAPKKK que fosforila a la MAPKK en los residuos de Ser/Thr y esta a su vez fosforila y activa la MAPK que se encarga de desencadenar la respuesta al estímulo (Modificado de Saito & Posas, 2012).

### VÍA DE RESPUESTA A ESTRÉS HIPEROSMÓTICO

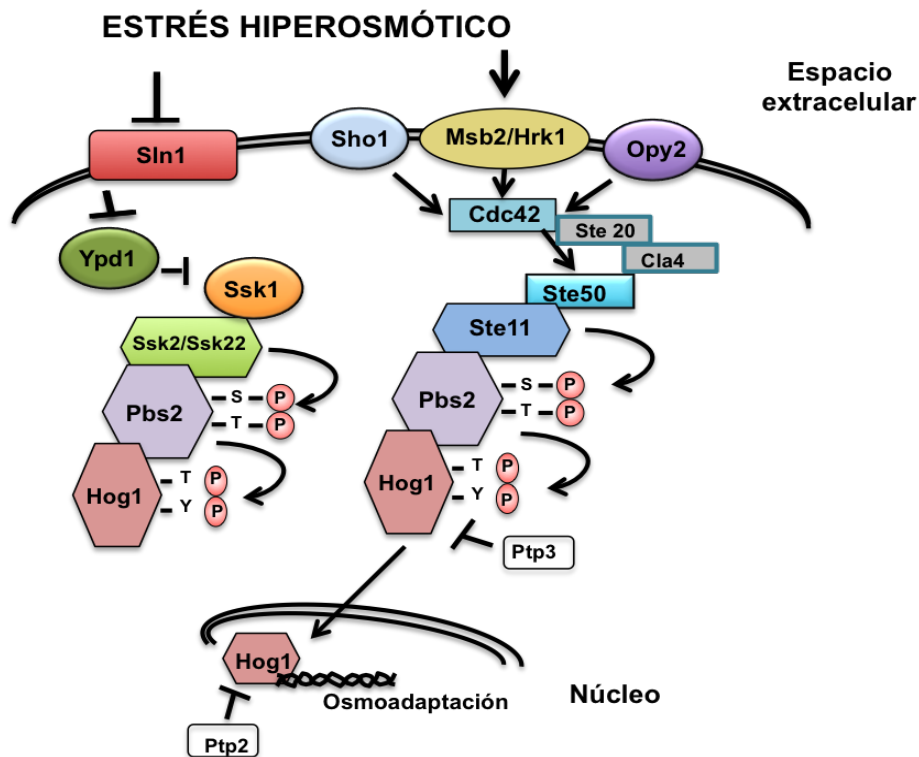
Una condición de estrés hiperosmótico se define como una disminución en el potencial hídrico del ambiente en el que la célula se encuentra. La respuesta inmediata a este cambio es una salida de agua del interior celular para compensar las concentraciones en ambos lados de la membrana (Rep et al., 2000). En *S. cerevisiae* el estrés hiperosmótico genera un cambio en el volumen celular debido a la pérdida de agua del citosol (esto

sucede aproximadamente en un minuto). Dicha deshidratación se ve compensada por la salida de agua de la vacuola (Serrano 1996). Consecuentemente a la salida de agua, se induce un aumento en la concentración intracelular de glicerol, en la síntesis de proteínas involucradas en el metabolismo redox, además hay un reajuste en el ciclo celular y se modifican los niveles de carbohidratos, lípidos y aminoácidos (Rep et al., 2000). En específico, la síntesis de glicerol y de otros osmolitos compatibles, como la trehalosa y la glicerolfosfocolina resultan de vital importancia para las células (Saito & Posas 2012; Hohmann 2002).

La ruta de señalización responsable de la respuesta al estrés hiperosmótico en *S. cerevisiae* es la vía HOG, por sus siglas en inglés High Osmolarity Glycerol. En un principio, se asoció la actividad de dicha vía únicamente con la síntesis de glicerol en respuesta al estrés. Actualmente sabemos, por muy diversos estudios, que la ruta de HOG desencadena un complejo proceso de adaptación al estrés (Saito & Posas 2012; Hohmann 2002). La vía HOG está compuesta por la rama de SHO1 y de SLN1 (Posas 1996; Maeda 1995). Ambas ramas convergen en una MAP cinasa cinasa (Pbs2) que, en condiciones de estrés hiperosmótico, fosforila a Hog1 (MAP cinasa), que es la encargada de entrar al núcleo y generar la respuesta al estímulo (Fig. 2) (Tamas et al., 2000; Hohmann 2002). Hog1 se acumula rápidamente en el núcleo luego del estímulo (en menos de un minuto) y regresa al citoplasma aproximadamente a los 20 minutos. De hecho, la localización nuclear de Hog1 correlaciona directamente con la cinética de fosforilación de la misma. Además por estudios genéticos se sabe que mutaciones puntuales en los residuos Thr-174 y Tyr-176 evitan la translocación de Hog1 al núcleo (Hohmann 2002; Reiser V. et al., 1999). Por otro lado, se sabe que para que Hog1 entre y salga del núcleo se necesita la presencia de las proteínas Ptp2 y Ptp3, fosfatasa de tirosina nuclear y fosfatasa de tirosina citoplasmática, respectivamente (Mattison C. & Ota I. 2000). Además, se sabe que la presencia de Hog1 en el núcleo modifica la expresión genética de más de 300 genes en respuesta al estrés osmótico y que fosforila otros factores transcripcionales como Hot1, Sko1, Msn2/4 y Smp1, que tienen que ver con la osmo-adaptación. Aunado a esto, Hog1

está involucrada en la remodelación de la cromatina mediante la estructuración de los nucleosomas (Hohmann 2002; Alepuz *et al.*, 2003).

Aunque se desconoce cómo es que la célula detecta el estrés osmótico, se sabe que se requiere de proteínas membranales que actúan como sensores de cambios en la presión y el gradiente osmótico. Proteínas como Sln1 (una cinasa de histidina), Msb2 y Hkr1 (sensores de la rama de SHO1) y la propia Sho1, son proteínas membranales necesarias para una correcta respuesta al estrés osmótico (Saito & Posas 2012; Brewster & Gustin 2014).



**Fig. 2. Vía de HOG de *Saccharomyces cerevisiae*.** Está compuesta por la rama de SLN1 y SHO1. Los osmosensores membranales detectan los cambios en la presión osmótica y las interacciones entre las proteínas de cada rama se modifican. En condiciones de estrés hiperosmótico el sistema de fosforelievo queda inactivo ocasionando que Ssk1 active a las proteínas redundantes Ssk2/Ssk22, quienes activan a la MAPKK Pbs2 que a su vez fosforila a Hog1. Por otro lado Sho1, Opy2, Msb2 y Hrk1 reclutan y activan a Cdc42 quien a su vez interacciona con las proteínas Ste20 y Cla4 que se encargan de activar a Ste11/Ste50, la MAPKKK Ste11 fosforila a Pbs2 y esta a su vez a Hog1, quien entra al núcleo y desencadena la osmo-adaptación (Modificado de Saito & Posas, 2012).

## **RAMA DE SHO1**

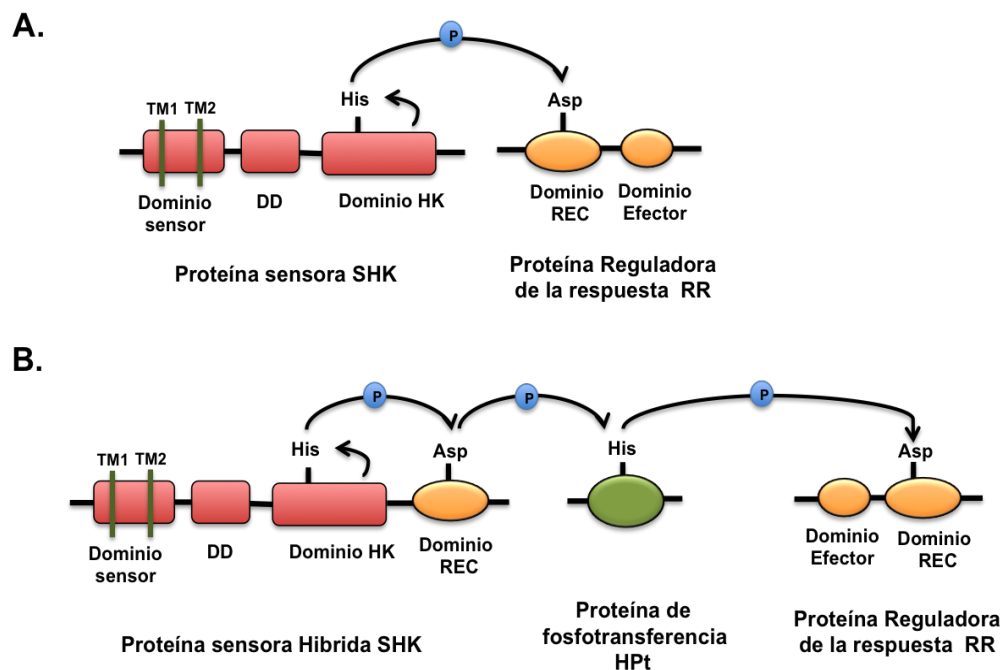
En condiciones de estrés hiperosmótico, la rama de SHO1 se activa. Los osmosensores Msb2 y Hkr1 son proteínas de un solo cruce transmembranal. Ambas interactúan con Sho1, que es una proteína con cuatro cruces transmembranales y un dominio SH3 en el extremo carboxilo (Tatebayashi *et al.*, 2007; Zarrinpar, *et al.*, 2004). Estas interacciones conducen a la activación de las cinasas Ste20 y Cla4, induciendo su asociación con la proteína G monomérica Cdc42, lo que ocasiona que Ste20 fosforile y active a la MAPKKK Ste11, que se encuentra en la cercanía gracias a su interacción con la proteína Ste50 (dicha proteína tiene interacciones con Sho1 y Cdc42) (Yamamoto *et al.*, 2012). Ste11p fosforila y activa a la MAPKK Pbs2 que se encuentra asociada a Sho1 mediante el dominio SH3; esta cinasa se encarga de fosforilar y activar a la MAPK Hog1 (Fig. 2) (Maeda *et al.*, 1995; Raitt *et al.*, 2000).

## **RAMA DE SLN1 SISTEMA DE FOSFORELEVO**

La rama de SLN1 consiste en un sistema de fosforrelevo que es análogo a los sistemas de dos componentes presentes en las bacterias, donde tienen un papel fundamental en la mayoría de los aspectos de la vida bacteriana. Un sistema bacteriano típico de dos componentes tiene dos proteínas: la primera es una proteína sensora cinasa de histidina (SHK por sus siglas en inglés), que en su mayoría se encuentran ancladas a la membrana plasmática, con un dominio sensor, un dominio de dimerización, ya que funcionan como dímeros, y un dominio cinasa (HK) cuya función es dependiente de ATP y, muy cercano a este dominio, se encuentra un residuo de histidina fosforilable; la segunda proteína es la reguladora de la respuesta (RR), la cual tiene un dominio aceptor (REC) que contiene un residuo de aspartato fosforilable y un dominio efector en el extremo C-terminal, la mayoría de estos dominios son dominios de unión al ADN, por lo que actúan como factores de transcripción (Fig. 3A). Cuando la proteína sensora detecta el estímulo, el dominio HK se activa (o inactiva según sea el caso) y fosforila (o desfosforila) el residuo

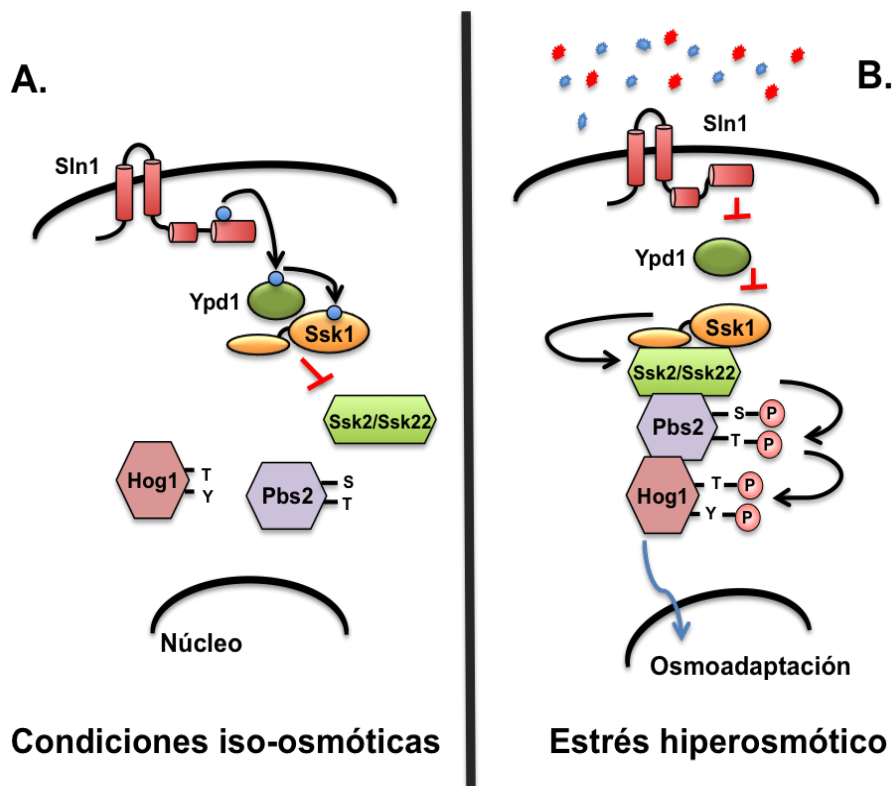


de histidina mediante la hidrólisis de una molécula de ATP. Posteriormente, el grupo fosfato es transferido al residuo de aspartato presente en el dominio REC de la proteína RR; esta proteína es la encargada de inducir la respuesta celular específica al estímulo (Schaller *et al.*, 2011). Estas reacciones de fosfotransferencia se conocen como sistemas de fosforrelevo His-Asp. Existen variantes a estos sistemas que involucran más de dos proteínas; el fosforrelevo His-Asp-His-Asp presente en algunos eucariontes está conformado por una proteína sensora híbrida que, además de tener un dominio HK, contiene su propio dominio REC, una proteína intermedia denominada proteína de fosfotransferencia (Hpt) que cataliza la reacción de fosfotransferencia entre la proteína sensora y la reguladora de la respuesta (Posas 1996; Saito & Posas 2012) (Fig. 3B).



**Fig.3 Sistemas de fosfotransferencia. A.** Sistema típico de dos componentes en bacterias, compuesto por una proteína cinasa de histidina o sensora que al activarse se auto-transfosforila en el residuo de His, el fosfato es transferido a la segunda proteína llamada reguladora de la respuesta (RR) quien desencadena la respuesta **B.** Sistema de fosforelevo de tres proteínas His-Asp-His-Asp compuesto por una proteína sensora híbrida que contiene su propio dominio REC, proteína de fosfotransferencia Hpt y proteína reguladora de la respuesta. TM Cruce transmembranal, DD dominio de dimerización, HK dominio cinasa de histidina, REC dominio aceptor.

En la vía de HOG la rama SLN1 (**Fig. 2**) contiene un sistema de fosforrelevo compuesto por Sln1 (SHK híbrida), Ypd1 (HPT) y Ssk1 (RR); además, existe una segunda proteína RR llamada Skn7 que participa en estrés oxidativo y quizás en estrés hipo-osmótico ([Saito & Posas 2012](#)). Sln1 es una proteína de 1155 aminoácidos (a.a.), que cuenta con dos cruces transmembranales unidos por un bucle extracelular y se sabe que estos cruces y el bucle son importantes para la actividad de cinasa. El extremo carboxilo terminal tiene un dominio HK y un dominio REC ([Posas \*et al.\*, 1996](#); [Ostrander & Gorman 1999](#)). Ypd1 es una proteína citosólica de 135 a.a. que contiene un dominio de fosfotransferencia en el cual se encuentra la histidina fosforilable. Por su parte, Ssk1 es una proteína de 635 a.a. que contiene un dominio REC y un dominio regulador de la respuesta ([Posas \*et al.\*, 1996](#)). En condiciones iso-osmóticas, Sln1 se encuentra activa y en forma de dímero; bajo estas condiciones se trans-autofosforila, empleando ATP, en el residuo de histidina-576. El grupo fosfato se transfiere al residuo de aspartato-1114 del dominio REC de la misma Sln1. Posteriormente, el fosfato pasa al residuo His-64 de Ypd1. Finalmente, el fosfato es transferido al residuo de aspartato-554 del dominio REC de Ssk1. La forma fosforilada de Ssk1 es la forma inactiva, lo que indica que el fosforrelevo regula negativamente la vía de HOG ([Saito & Posas 2012](#)) (**Fig. 4**). En condiciones de estrés hiperosmótico, la presión de turgencia disminuye, inhibiendo la actividad de cinasa de Sln1, es decir, que el sistema de fosforrelevo se inactiva ([Tamás \*et al.\*, 2000](#); [Reiser \*et al.\*, 2003](#)). La proteína Ssk1 desfosforilada puede unirse entonces a las MAPKKKs redundantes Ssk2/Ssk22, las cuales se activan por autofosforilación y éstas a su vez activan por fosforilación a Pbs2, que fosforila a Hog1 ([Posas & Saito 1998](#); [Posas \*et al.\*, 1996](#)) (**Fig. 4**).



**Fig. 4 Sistema de fosforelevo Sln1-Ypd1-Ssk1 en la vía de HOG.** A. Condiciones iso-osmóticas la fosfotransferencia se encuentra activa entre las tres proteínas, Ssk1 fosforilada es incapaz de interactuar con sus blancos Ssk2/Ssk22 (MAPKKK's) por lo que la rama de SLN1 se encuentra apagada. B. Condiciones de estrés hiperosmótico. Sln1 detecta cambios en la turgencia celular lo que ocasiona su inactivación, al perderse la fosfotransferencia Ssk1 es capaz de interactuar con Ssk2/Ssk22 lo que conlleva a la activación de Hog1 (Modificado de [Saito & Posas, 2012](#)).

Como se mencionó anteriormente, Hog1 se transloca al núcleo, donde regula la transcripción de múltiples genes y la progresión del ciclo celular, entre otras funciones celulares ([de Nadal & Posas 2015](#)). Estudios genéticos de ScSln1 y ScYpd1 han mostrado que la inactivación permanente de cualquiera de las dos proteínas induce una fosforilación constitutiva de ScHog1, lo que ocasiona letalidad, ya que Hog1 activa de forma permanente a sus proteínas blanco ([Maeda et al., 1994](#); [Vendrell et al., 2011](#)).

El fenotipo letal puede ser suprimido con mutaciones en Ssk1, Pbs2 y Hog1, aunque estas células son incapaces de responder al estrés hiperosmótico ([Posas et al., 1996](#)). También se ha observado que es posible suprimir la letalidad de la mutante  $\Delta Scsln1$  empleando

proteínas homólogas de otras levaduras, como CaSln1 de *Candida albicans*, la cual complementa la falta de ScSln1 (Saito, 2001).

Ahora bien, aunque el sistema de fosforrelevo de *S. cerevisiae* tiene pocos elementos, tiene algunos aspectos bastante interesantes. Como lo es el hecho de que la SHK (Sln1), junto con la proteína de fosfotransferencia (Ypd1), regulan dos respuestas distintas: la de Ssk1, que como ya se explicó interviene en la vía de HOG1 y la de Skn7, que es un factor de transcripción que activa genes en respuesta a condiciones hipoosmóticas. Además, Skn7 tiene que ver con la respuesta a estrés oxidativo, lo que resulta interesante, ya que esta proteína no necesita estar fosforilada en el residuo de aspartato, sino que es fosforilada en un dominio cinasa de serina/treonina. Se sabe que Skn7 interacciona con el factor transcripcional Yap1 y que juntos regulan la expresión de genes en respuesta al estrés oxidativo. Resulta interesante cómo una proteína reguladora de la respuesta tiene un papel independiente a su papel en un sistema de fosforelevo (He *et al.* 2009).

## **OTROS SISTEMAS DE FOSFORRELEVO**

En eucariontes se han descrito sistemas de fosforrelevo en plantas, amebas sociales y hongos, aunque no queda muy claro cómo es que fueron adquiridos, aunque se piensa que fue por transferencia horizontal. A diferencia de lo que sucede típicamente en las bacterias, donde la proteína reguladora de la respuesta (RR) es la que directamente modifica la expresión de genes en respuesta al estímulo, los sistemas de fosforrelevo en eucariontes se encuentran acoplados a módulos de MAP cinasas, lo que hace mucho más compleja la regulación de las vías (Álvarez *et al.*, 2016). Por otro lado, resulta muy interesante la variada organización que presentan estos sistemas en los eucariontes; por ejemplo, las plantas tienen un mayor número de proteínas reguladoras de la respuesta (RR) que cinasas de histidina (SHK), mientras que los hongos tienen una gran diversidad de SHK's en comparación con las proteínas de fosfotransferencia y las reguladoras de respuesta (Álvarez *et al.*, 2016; Schaller *et al.*, 2011) (Tabla 1). Dentro del grupo de los hongos encontramos que la cantidad de componentes de estos sistemas varía de forma

considerable; en levaduras como *S. cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Candida albicans* hay relativamente pocos elementos en comparación con hongos filamentosos como *Neurospora crassa* y *Aspergillus nidulans*, que cuentan con hasta 11 y 15 proteínas sensoras cinasas de histidina, respectivamente. Por otro lado, dentro de las levaduras es interesante la diversidad estructural entre las proteínas SHK's, lo que implica que puede tener diferentes funciones (Schaller *et al.*, 2011) (Tab. 1 y 2).

**Tabla 1.** Número de componentes del sistema de fosforelevo en algunos eucariontes.

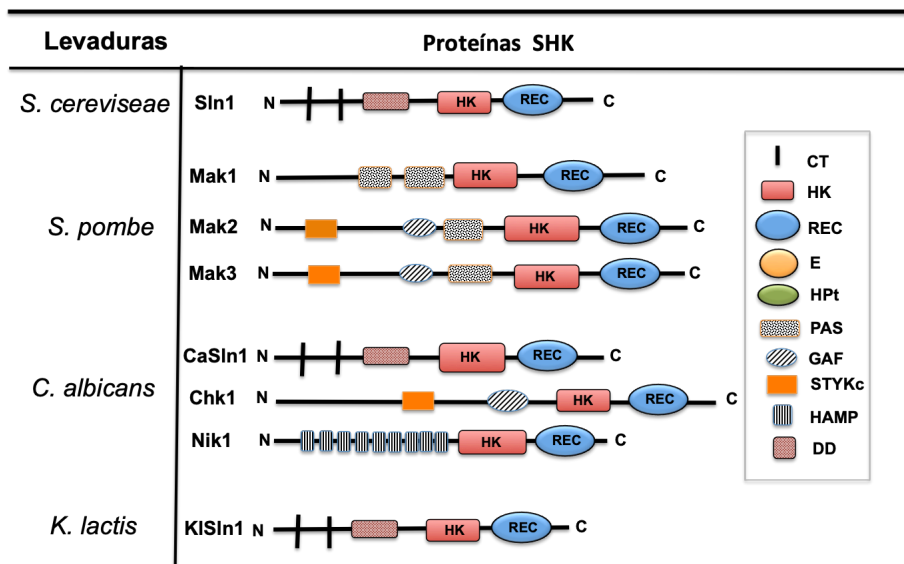
	<b>Especie</b>	<b>SHK</b>	<b>HPT</b>	<b>RR</b>
<b>Hongos</b>	<i>S. cerevisiae</i>	1	1	1
	<i>S. pombe</i>	3	1	2
	<i>C. albicans</i>	3	1	3
	<i>K. lactis</i>	3	1	2
	<i>N. crassa</i>	11	1	3
	<i>A. nidulans</i>	15	1	4
<b>Plantas</b>	<i>A. thaliana</i>	17	6	32
	<i>O. sativa</i>	15	5	36

SHK proteína Sensora Cinasa de Histidina, HPT proteína de fosfotransferencia, RR reguladora de la respuesta. Datos tomados de Schaller *et al.* 2011.

*S. pombe* presenta tres proteínas sensoras (Mak1 Mak2 y Mak3), una proteína de fosfotransferencia (Mpr1) y dos reguladoras de la respuesta (Msc4 y Prr1) (Tabla 1). A diferencia de lo que se ha descrito en otras levaduras, las tres proteínas SHK son citosólicas y las tres presentan dominios PAS, que son dominios que tienen que ver con la respuesta a la luz y al estrés oxidativo. Por otro lado, Mak2 y Mak3 tienen dominios STYKc y GAF, el primero es un dominio de cinasa de serina/treonina típico de eucariontes,

mientras que el dominio GAF está involucrado en la respuesta a estrés oxidativo (Tabla 2). El sistema de fosforrelevo de esta levadura se ha asociado a estrés oxidativo, control del ciclo celular y a la respuesta a estrés por bajas temperaturas (Schaller *et al.*, 2011; Salas *et al.*, 2017). Las mutantes de cualquiera de estas SHK son viables pero con alteraciones en el ciclo celular y en la respuesta al estrés oxidativo. Se sabe que la vía de respuesta a estrés oxidativo es mediada por la cascada de MAP cinasas Win1-Wis1-Sty1 y está claro que tanto Mak2 y Mak3 son parte de esta cascada; sin embargo, no queda muy claro mediante qué vía, Mak1 responde al estrés oxidativo. En cuanto a la proteína Hpt, se ha relacionado con estrés oxidativo y con el control del ciclo celular, y aunque es capaz de rescatar el fenotipo letal de la mutante *Δypd1* de *S. cerevisiae*, no es necesaria para la viabilidad de *S. pombe*. En cuanto a las proteínas RR, se sabe que Msc4 participa en la vía de respuesta a estrés oxidativo (vía de Sty1), mientras que Prr1, que se parece mucho a Skn7, activa genes de respuesta al estrés independientemente de la vía Sty1 (Aoyama *et al.*, 2000; Salas *et al.*, 2017).

**Tabla 2. Comparación estructural entre proteínas SHK's en distintas levaduras.**



(CT) Cruce transmembranal, (DD) Dominio dimerización, (HK) Dominio cinasa de histidina, (S) Dominio Sensor, (RE)C Dominio aceptor, (E) Dominio Efector, (HPT) Dominio fosfotransferidor,(PAS) Dominio sensor de luz y oxygeno, (GAF) Dominio para regulación y sensor, (STYKc) Dominio ciansa de Serina/Treonina y (HAMP) Dominio asociado a sensibilidad a fungicidas. Datos tomados de Schaller *et al.* 2011

En *C. albicans*, el sistema de fosforrelevo está involucrado en la virulencia, en el estrés osmótico, en el *quorum sensing*, en la respuesta al estrés oxidativo, en la síntesis de pared celular y en la resistencia a triazoles. Esta levadura tiene tres proteínas SHK, CaSln1p, Nik1 y Chk1. CaSln1 es la más parecida a la de *S. cerevisiae* y participa en la respuesta a estrés osmótico, virulencia y morfogénesis. Nik1 y Chk1 son proteínas citosólicas; la primera participa en la virulencia, en la resistencia a fungicidas mientras que la segunda participa en la formación de hifas y en la síntesis de pared celular. Estructuralmente Chk1 presenta un dominio de cinasa de serina/treonina (STYKc) y un dominio GAF. Nik1 se caracteriza por tener nueve repeticiones del dominio HAMP, que tiene que ver con resistencia a fungicidas (Tabla 2). La delección de cualquiera de estas tres proteínas no genera letalidad, aunque la mutante  $\Delta chk1$  disminuye la patogenicidad y la mutante  $\Delta nik1$  presenta defectos en la formación de hifas (Salas *et al.*, 2017; Hohmann, 2002). Tal como se muestra en la Tabla 1, *C. albicans* tiene una sola proteína de fosfotransferencia, la cual participa en estrés oxidativo y a diferencia de lo que sucede en *S. cerevisiae*, su delección no genera letalidad, aunque se ha observado un CaHog1 fosforilado constitutivamente. *C. albicans* tiene tres proteínas reguladoras de la respuesta, Ssk1, Skn7 y Srr1, que estructuralmente son muy similares. Las tres participan en la respuesta a estrés oxidativo y, de manera específica, Ssk1 está involucrada en la virulencia de manera más contundente que las otras dos y Srr1 se ha descrito como un componente mitocondrial implicado en estrés oxidativo y muerte celular (Salas *et al.*, 2017; Thomason & Kay 2000).

Es bastante claro que los sistemas de dos componentes en eucariontes se han adaptado y diversificado para participar en muchos procesos celulares. También resulta interesante cómo es que los componentes de estos sistemas se han mezclado y combinado con nuevos dominios que no están presentes en las bacterias. Quizás lo más interesante en este sentido es la presencia tanto del dominio de cinasa de histidina como de los reguladores de respuesta fusionados a dominios de cinasa de serina/treonina, que son dos distintas vías de fosforilación (una típica de procariontes y la otra de eucariontes). Esto

último denota una historia evolutiva bastante interesante de estudiar, ya que se trata de la especialización de estos sistemas dependiente de las necesidades de los eucariontes que los contienen. Por último, es importante mencionar lo fascinante que resulta entender que estos sistemas de fosforrelevo se han acoplado a cascadas de MAP cinasas, haciendo la regulación de las vías de señalización más compleja.

### **RESPUESTA A ESTRÉS HIPERÓSMOTICO EN *Kluyveromyces lactis***

*K. lactis* es una levadura del grupo de los hemiascomicetos y algunas de sus cepas son empleadas en la industria para generar lactasa (Johnson & Echavarii 2011). Además, esta levadura resulta un excelente modelo de estudio molecular y celular, ya que es fácil manipularla genéticamente en el laboratorio y presenta menos proteínas redundantes en comparación con *S. cerevisiae*, ya que no sufrió un evento de duplicación genómica. Por otro lado, su genoma está completamente secuenciado e incluso se han descrito algunas vías de señalización que involucran a cascadas de MAP cinasas.

En estudios comparativos de genomas se ha descrito la presencia de secuencias ortólogas para las proteínas de la vía de respuesta a estrés osmótico de *S. cerevisiae* (Fig. 2), excepto para la MAPKKK Ssk22, que es redundante de Ssk2 (Krantz *et al.*, 2006). Kawasaki y colaboradores en 2008 describieron que la eliminación de los genes *KIHOG1*, *KIPBS2*, *KISTE11*, *KISTE7*, *KISTE50* y *KISTE20* en *K. lactis* produce retraso en el crecimiento en condiciones de estrés hiperosmótico, lo que indica su participación en esta respuesta. Además, demostraron la interacción física entre la proteína KISTe7 y KIHog1 y una disminución de la fosforilación en KIHog1 en la mutante  $\Delta KISTe7$  en respuesta al estrés. Estos datos resultan muy interesantes ya que, según lo descrito en *S. cerevisiae*, no existe participación de Ste7 en la respuesta a estrés hiperosmótico (Ver Fig. 2). Por otro lado, se ha demostrado que mutantes de la rama de SHO1 pueden responder al estrés porque aún se da la fosforilación y translocación al núcleo de KIHog1, excepto en las mutantes  $\Delta KISTe11$  y  $\Delta KISTe50$ , que son incapaces de crecer en condiciones de estrés hiperosmótico,



aunque se encuentre activa la rama de SLN1. Además, se encontró que tanto la doble mutante  $\Delta Kls1\Delta Klsk2$  como la mutante sencilla de  $\Delta Kls11$  son incapaces de responder y adaptarse al estrés hiperosmótico, aunque KIHog1 se fosforile y se internalice al núcleo en respuesta a estrés (Velázquez *et al.*, 2015). Estos datos sugieren que la regulación y activación de KIHog1 en respuesta al estrés hiperosmótico no depende únicamente de su estado de fosforilación y de su localización en el núcleo, sino que deben existir otros mecanismos para su regulación que aún no se han descrito. Además, puede ser que haya otra u otras vías a través de las cuales KIHog1 se fosforile, y que esas vías no tengan que ver con la activación de la respuesta al estrés hiperosmótico. Por otro lado, hace falta conocer el papel que tiene Kls7 y el sistema de fosforrelevo en la regulación de KIHog1. Por análisis genómicos se sabe que esta levadura presenta los componentes de la rama de SLN1, sin embargo no se sabe qué función desempeñan en la respuesta a estrés hiperosmótico.

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

Los sistemas de fosforrelevo son mecanismos de señalización muy dinámicos, descritos inicialmente en bacterias, que han mostrado una plasticidad sorprendente al adaptarse a cascadas de MAP cinasas en eucariontes y en respuesta a muy diversos estímulos. La levadura *K. lactis* es un modelo eucarionte emergente de importancia industrial, que divergió antes de la duplicación del genoma que dio lugar a las especies de *Saccharomyces*, por lo que muestra menor redundancia de genes. Por análisis genómicos se sabe que posee un sistema de fosforrelevo compuesto por las proteínas KISln1, que es una cinasa de histidina, KIYpd1, que es una proteína de fosfotransferencia y KISsk1, proteína reguladora de la respuesta. La conservación de estos componentes hace suponer que la vía de respuesta a estrés osmótico de *K. lactis* es análoga a la de *S. cerevisiae*, sin embargo ya se ha encontrado que la vía de Sho1 tiene características específicas. En este trabajo se pretende caracterizar el papel que tiene la vía de Sln1 en la respuesta a estrés hiperosmótico en *K. lactis* y se describen las semejanzas y diferencias con el sistema de *S. cerevisiae*.

## HIPÓTESIS

---

La inactivación de la vía de SLN1 a nivel de la cinasa de histidina o de la proteína de transferencia (Ypd1) genera letalidad en *S. cerevisiae* debido a una activación constitutiva de Hog1. La gran conservación de los componentes estructurales de esta vía en *K. lactis* predice que KISln1 y KIYpd1 también juegan un papel regulatorio negativo sobre KIHog1 en esta especie.

## OBJETIVO GENERAL

---

Describir el papel del sistema de fosforrelevo conformado por las proteínas: cinasa de histidina (KISln1), de fosfotransferencia (KIYpd1) y reguladora de la respuesta (KISsk1) en la respuesta a estrés hiperosmótico de *K. lactis*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Generar mutantes de cada uno de los componentes del sistema de fosforrelevo en *K. lactis* y determinar si participan en la respuesta a estrés hiperosmótico.
- Evaluar el papel que tiene el sistema de fosforrelevo sobre la activación de la MAP cinasa KIHog1.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### CEPAS

A continuación se presenta un listado con las principales cepas empleadas en este trabajo. Se muestran los genotipos y la referencia de cada una.

**Tabla 3. Cepas utilizadas.**

Organismo / Cepa	Genotipo	Referencia
<b><i>K. lactis</i></b>		
12/8	MATa, lysA, argA, ura3	(Saviñón-Tejeda <i>et al.</i> , 2001)
155	MAT $\alpha$ , ade2, his3, uraA	(Saviñón-Tejeda <i>et al.</i> , 2001)
MD2/1	MATa, argA lysA ura3	(Saviñón-Tejeda <i>et al.</i> , 2001)
$\Delta$ Ksln1	MATa, argA lysA, sln1::URA3	En este trabajo
$\Delta$ Klypd1	MATa, argA lysA, ypd1::URA3	En este trabajo
$\Delta$ Klssk1	MATa, argA lysA, ssk1::URA3	En este trabajo
$\Delta$ Klypd1+KIYPD1 HIS	MATa, argA lysA, ypd1::ura3 YepKDGal-URA3- KIYPD1His(6)	En este trabajo
$\Delta$ Klsln1+KIYPD1 HIS	MATa, argA lysA, sln1::ura3 YepKDGal-URA3- KIYPD1His(6)	En este trabajo
$\Delta$ Klhog1	MATa, argA lysA, hog1::URA3	(Kawasaki <i>et al.</i> , 2008)
$\Delta$ Klpbs2	MATa, argA lysA, pbs2::URA3	(Kawasaki <i>et al.</i> , 2008)
$\Delta$ Klptp2	MATa, argA lysA ptp2::clonNAT	En este trabajo
$\Delta$ Klsln1 $\Delta$ Klsho1	MATa, argA lysA sln1::ura3 sho1::URA3	En este trabajo
$\Delta$ Klypd1 $\Delta$ Klhog1	MATa, argA lysA ypd1::ura3 hog1::URA3	En este trabajo
$\Delta$ Klsho1	MATa, argA lysA, sho1::URA3	(Velázquez <i>et al.</i> , 2015)
Diploides (MD2/1-155)		
$\Delta$ Klsln1 $\Delta$ Klptp2	sln1::URA3/SLN1 ptp2::clonNAT	En este trabajo
$\Delta$ Klsln1	sln1::URA3/SLN1	En este trabajo
$\Delta$ Klypd1	sln1::URA3/YPD1	En este trabajo
<b><i>S. cerevisiae</i></b>		
BY4742	MATa, his3, leu2,lys2, ura3	
$\Delta$ Schog1	MATa his3, leu2, lys2, ura3, hog1::G418	Colección mutantes
TM141	MATa, ura3, leu2 trp1 his3	(Maeda <i>et al.</i> , 1994)
sln1 <sup>ts</sup>	MATa, ura3, leu2 trp1 his3, sln1 <sup>ts</sup> fenotipo letal a 37°C	(Maeda <i>et al.</i> , 1994)
sln1 <sup>ts</sup> $\Delta$ Scssk1	MATa, ura3, leu2 trp1 his3, sln1 <sup>ts</sup> ssk1::clonNAT	En este trabajo

sln1 <sup>ts</sup> $\Delta$ Schog1	MATa, ura3, leu2 trp1 his3, sln1 <sup>ts</sup> hog1::clonNat	En este trabajo
EGY48	MATa his3 trp1 ura3 leu2::pLeu-Lex	(Golemis <i>et al.</i> , 1997)
<b><i>E. coli</i></b>		
DH5 $\alpha$	lacZYA-argF, recA1, gyrA96 relA1	(New England Biolabs)
BL21		
M15 2Z291		(Qiagen)

## MEDIOS DE CULTIVO

- Para las levaduras se emplearon los siguientes medios de cultivo:

YPD. Contiene 1% de extracto de levadura, 2% de glucosa, 2% de bacto peptona y según el tipo de medio, se le adicionó 2% de agar.

YPD 5-FOA. Medio YPD con 1mg/ml de ácido 5-fluoroorótico, empleado para la selección negativa del marcador URA3.

YPGAL. Medio similar a YPD, pero en lugar de glucosa tiene 2% de galactosa.

YPGAL-Pi. Medio de cultivo sin fosfato, preparado según Warner, 1991.

SD. Medio mínimo que contiene 0.67% de base nitrogenada sin aminoácidos, 2% de glucosa y según se requiera, 2% de agar.

SGal. Contiene 0.67% de base nitrogenada sin aminoácidos, 2% de galactosa y según el tipo de medio, se le adicionó 2% de agar. Similar a SD, pero en lugar de glucosa tiene 2% de galactosa. Tanto en SD como en SGal se adicionaron los aminoácidos necesarios a una concentración de 50  $\mu$ g/ml para la selección específica de cepas.

Medio de esporulación. Contiene 5% de extracto de malta (Difco) y 3% de agar.

- Para las bacterias se emplearon los medios:

LB. Contiene 1% de bacto-triptona, 0.5% de extracto de levadura, 1% de NaCl y 2% agar. Para propagación de plásmidos se le adicionó 100  $\mu$ g/ml de ampicilina.

## PLÁSMIDOS

A continuación se enlistan los plásmidos empleados en el presente trabajo.

Ylp352. Vector de integración para levaduras, gen URA3 como marcador de selección.

PGEM-T Easy<sup>®</sup>. Vector de clonación para productos de PCR.

YEpkDGal. Vector de expresión para *K. lactis*. Promotor de Galactosa

pYES2. Vector de expresión para *S. cerevisiae*. Promotor de Galactosa

pAG25. Vector de expresión para levaduras, contiene el gen de Nat1 como marcador de selección.

pQE30 (Qiagen). Plásmido de expresión bacteriana, resistencia a ampicilina y etiqueta de 6 histidinas

pMAL (New England BioLabs). Plásmido de expresión bacteriana, resistencia a ampicilina y etiqueta de proteína de unión a maltosa.

## OLIGONUCLEÓTIDOS

Para el diseño de oligonucleótidos se obtuvieron las secuencias de los genes *KISLN1*, *KIYPD1*, *KISSK1*, *KISSK2* y *KIPTP2* de la base de datos Génolevures (URL: <http://cbi.labri.fr/Genolevures/>). La siguiente tabla muestra los oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo; se indica el nombre del gen y del oligo, así como las coordenadas respecto al ORF y la secuencia. El subrayado indica el sitio de restricción, la letra en negrita cambio puntual.

**Tabla 4. Oligonucleótidos empleados**

Gen Nombre del oligo	Posición y Secuencia	Sitios de Restricción cambios puntales
<b>KISLN1</b>		
Sln1F	+2321 AGTCGAATCCGAAACG+2306	
Sln1R	+3570 GGAAACCATCCATTCC +3585	
<b>KIYPD1</b>		
Ypd1F	-231 TTGTATATACACCCGGGTTTCTTTTGT -257	Sitio de corte para <i>SmaI</i>
Ypd1R	+529 CAGCACAGATCCCGGGTCAATATA +552	Sitio de corte para <i>SmaI</i>
YPD1A	-16 AAAAGCACAAAGAGCTCATGTCCCAAACA +12	Sitio de corte para <i>SacI</i>
YPD1B	+445 AGAGAAAAGCTTGCCTG +429	Sitio de corte para <i>HindIII</i>
<b>KISSK1</b>		
SSK1F	-47 TGTTGAATTCTTGCAGAA -65	Sitio de corte para <i>EcoRI</i>
SSK1R	+2079 AAGATGTTGAATTCGTGATG +2060	Sitio de corte para <i>EcoRI</i>
SSK1MF	+1318 CTTATCCTTATGGCTTTGCAATTG +1344	Cambio puntual de una A por C
SSK1MR	+1344 CAATTGCAAAGCCATAAGGATAA +1318	Cambio puntual de una T por G
SSK1DHF	-12 TAACGCGAATTCATGCAAGAA +9	Sitio de corte para <i>EcoRI</i>
Ssk1DHR	+1920 CCATGGCTCGAGTCACGG +1900	Sitio de corte para <i>XhoI</i>
SSK1rrA	-1138 GGATCCGATAAGCAAGGCAA -1158	Sitio de corte para <i>BamHI</i>
SSK1rrB	+1943 AAATATTCTTGCGGCCGCAAGCTTCTGATGACCAT +1908	Sitio de corte para <i>HindIII</i>
<b>KISSK2</b>		
Ssk2DHF	-12 TCGTTCCCGGGCATGTCGCAA +9	Sitio de corte para <i>SmaI</i>
Ssk2DHR	+4662 TTATGTGCGGCGCCTAGTTATG +4639	Sitio de corte para <i>NotI</i>
<b>KIPTP2</b>		
PTP2-Nat-F	tggtcgctatactgctgtcgTTCAATCACCAAATAAAAGAAC	20 nucleótidos en minúsculas son complementarios al promotor de clonNAT y los 22 en mayúsculas corresponden al gen KIPTP2 (+2189 +2210)
PTP2-Nat-R	aagctaaacagatctggcgCACCTTCGATTAAGCTGATC	19 nucleótidos corresponden a la región terminadora del gen clonNAT (minúsculas) y las 20 restantes al gen KIPTP2 (+622 to +603)
PTP2-F	+1 ATGAGAATGCAAATGAGTATG +21	
PTP2-R	+2712 TTATATGTGCTCCTTCAAATA +2691	

KIHO1		
1FHKIHog	5'ACGTCTCAAATTCAAATAAgtttagcttgcttgccttgc3'	20 nucleótidos en minúsculas son complementarios al gen Higromicina y los 20 en mayúsculas corresponden al KIHO1
2RHKIHog	5'AAAAAGAAGTAAGAATGAGTGGTTAGGGACAT- -TAAAAAACACGTcgtttgcactggatggc3'	20 nucleótidos en minúsculas son complementarios al gen Higromicina y 45 en mayúscula corresponden a KIHO1.
3FHScKIHog	5'GGAACAAAGGGAAAACAGGGAAAACACTACAAC- -ATCGTATATAATAatgtcgaatgaggatttag3'	23 nucleótidos en minúsculas son de KIHO1. En mayúscula SchOG1 (32 nucleótidos)
4FHScKIHog	5'ggggacaaggcaagctaacTTATTTGAATTTGGAGA- -CGT3'	20 nucleótidos que corresponden a Higromicina (minúsculas). Y 20 de KIHO1 (mayúscula)

## CONSTRUCCIONES GENÉTICAS Y MUTAGÉNESIS

Obtención e interrupción de los genes *KISLN1*, *KIYPD1* y *KISSK1*

A partir del ADN genómico de la cepa MD2/1 *MATa* de *K. lactis* se amplificaron por PCR los genes *KISLN1*, *KIYPD1* y *KISSK1*. Los productos de PCR se clonaron en el vector pGEM-T-Easy (Promega); las construcciones obtenidas se utilizaron para transfectar células competentes de *E. coli* (DH5 $\alpha$ ) siguiendo el protocolo de transformación de alta eficiencia de Inoue *et al.* Los plásmidos se analizaron con endonucleasas de restricción y secuenciación. Posteriormente cada fragmento se subclonó en el vector de integración Ylp352 (Saviñón-Tejeda *et al.*, 2001). La interrupción de dichos genes se realizó por recombinación homóloga y las transformantes se seleccionaron en medio mínimo SD-URA. Las mutantes se verificaron mediante hibridación tipo Southern blot.

Para *KISLN1* se emplearon los oligos Sln1F y Sln1R, obteniéndose un producto de 1083 pares de bases (p.b.). La construcción pGEM-*KISLN1* se digirió con la enzima *EcoRI*; el fragmento obtenido se subclonó en el vector Ylp352, el cual se abrió con la misma enzima. El plásmido Ylp352-*KISLN1* se digirió con la enzima *BglII*, que corta dos veces dentro de *KISLN1*, la molécula resultante se integró en el locus de *KISLN1* en células haploides (cepa



MD2/1) y diploides de *K. lactis*. Las diploides son el producto del cruce entre las cepas MD2/1 y 155. En ambos casos se obtuvo una delección de 600 p.b. en uno de los alelos que se corroboró por Southern blot utilizando sondas específicas para *KISLN1*. Las diploides resultantes se incubaron en un medio de esporulación durante 48 hrs. Posteriormente se realizó la disección de esporas mediante micro-manipulación utilizando protocolos estándar (Sherman *et al.*, 1986). Las esporas se germinaron en medio YPD y se analizaron por Southern blot utilizando sondas específicas para *KISLN1* para identificar el marcador de *URA3* y apreciar la segregación meiótica correspondiente.

En el caso de *KIYPD1* se utilizaron los oligos Ypd1F y Ypd1R, dando un producto de 809 p.b. Para el subclonado en Ylp352 se emplearon los sitios de restricción *SmaI* presentes tanto en los oligos como en el vector. La construcción Ylp352-*KIYPD1* se digirió con *EcoRI*, el fragmento obtenido se empleó para transformar células diploides de *K. lactis*, producto del cruce entre las cepas MD2/1 y 155. Al final se generó una delección de 234 p.b. en uno de los alelos de *KIYPD1*. Se empleó el mismo fragmento para la interrupción de dicho gen en células haploides (cepa MD2/1). En ambos casos se comprobó la interrupción mediante Southern blot empleando una sonda específica marcada para *KIYPD1*. Las diploides resultantes se incubaron en un medio de esporulación durante 48 hrs. Posteriormente se realizó la disección de esporas mediante micromanipulación utilizando protocolos estándar (Sherman *et al.*, 1986). Las esporas se germinaron en medio YPD y se analizaron por Southern blot utilizando sondas específicas para *KIYPD1* para identificar el marcador de *URA3* y observar la segregación meiótica correspondiente y obtener la mutante  $\Delta Klypd1$ .

La amplificación de *KISSK1* se realizó con los oligos SSK1F y SSK1R, dando un producto de 2131 p.b. A partir de la construcción pGEM-*KISSK1* se realizó la subclonación en el vector de integración mediante los sitios *EcoRI* presentes tanto en los oligos como en Ylp352. La construcción resultante se digirió con *Clal* y se utilizó para generar la delección de *KISSK1* en células haploides (cepa MD2/1) de *K. lactis*, y así obtener la cepa  $\Delta KIssk1$ .

Obtención de las mutantes  $\Delta Klptp2$ ,  $\Delta Klsln1\Delta Klptp2$ ,  $\Delta Klssk1\Delta Klste11$ ,  $\Delta Klsln1\Delta Klsho1$ ,  $\Delta Klypd1\Delta Klhog1$ ,  $\Delta Scssk1/sln1^{ts}$  y  $\Delta Schog1/sln1^{ts}$ .

Para las mutantes  $\Delta Klptp2$  y  $\Delta Klsln1\Delta Klptp2$  se realizó una construcción con el gen de resistencia a la natamicina flanqueado por regiones homólogas al gen *KIPTP2*. Para ello se realizaron dos distintas PCR's. En una primer reacción se amplificó el gen clonNAT incluyendo su promotor, empleándose los oligos PTP2-Nat-F y el PTP2-Nat-R, ambos oligos híbridos (Tabla 4) y como ADN molde se utilizó el plásmido pAG25 (obtenido por el Dr. Francisco Torres, IFC. UNAM). El producto se empleó en una segunda PCR junto con los oligos PTP2-F y PTP2-R, utilizando ADN genómico de *K. lactis* como molde. El producto final contenía el gen y promotor clonNAT flanqueado por las regiones recombinantes de *KIPTP2* de 622 p.b. y 523 p.b. cada una (*ptp2::clonNAT*). Esta construcción se utilizó para transformar la cepa MD2/1 y obtener la mutante  $\Delta Klptp2$  que se corroboró por Southern blot. Con la misma construcción se transformó la cepa diploide  $\Delta Klsln1$  (*sln1::URA3/KISLN1*); la selección se realizó por resistencia a natamicina. Las células diploides resultantes se incubaron en un medio de esporulación durante 48 hrs. Posteriormente se realizó la disección de esporas mediante micromanipulación utilizando protocolos estándar (Sherman *et al.*, 1986). Las esporas se germinaron en YPD y se analizaron por Southern blot para identificar el marcador *URA3* y el marcador clon-NAT obteniéndose la cepa  $\Delta Klsln1\Delta Klptp2$ .

Para la obtención de las cepas  $\Delta Klssk1\Delta Klste11$ ,  $\Delta Klypd1\Delta Klhog1$  y  $\Delta Klsln1\Delta Klsho1$ , se utilizaron los fondos genéticos de las mutantes resistentes a 5-FOA (ácido 5-fluoroorótico)  $\Delta Klssk1$ ,  $\Delta Klypd1$  y  $\Delta Klsln1$  descritos en la primera parte. Para las deleciones correspondientes se emplearon las construcciones *Klste11::URA3* y *Klhog1::URA3* descritas en el trabajo de Kawasaki 2008, y la construcción *Klsho1::URA3* descrita por Velázquez 2015.

Para las mutantes de *S. cerevisiae*  $\Delta ScsSk1/sln1^{ts}$  y  $\Delta Schog1/sln1^{ts}$  se empleó el fondo genético *sln1<sup>ts</sup>*, y se transformó la cepa con las construcciones *ScsSk1::Kan* donada por Posas Francesc y la construcción *Schog1::Higromicina* elaborada por la Doctora Laura Kawasaki.

Obtención de la forma no fosforilable de KISsk1 (*KISSK1D444A*)

Para la obtención de la forma desfosforilada de *KISSK1* se realizó un alineamiento de la secuencia de aminoácidos entre KISsk1 y ScSsk1 y según lo reportado por Posas F. 1998 se detectó el posible aspartato fosforilable en el dominio REC de *KISSK1*. A partir de esto se diseñaron los oligos SSK1MF y SSK1MR, ambos con un cambio puntal de una citosina por una adenina (**Tabla 4**) y con ello producir una alanina en lugar de un aspartato en la posición 444 de la proteína KISsk1. La modificación se realizó mediante PCR; se realizaron dos reacciones por separado utilizando en un caso los oligos SSK1MF y SSK1R y otra utilizando los oligos SSK1MR y SSK1F (**Tabla 4**). Los productos de PCR se utilizaron como templado en una tercera reacción con los oligos SSK1F y SSK1R. El producto final se clonó en el vector pGEM-T Easy y se secuenció completamente.

Construcciones génicas

*KIYPD1*

Para la expresión de *KIYpd1* en *E. coli* se diseñaron los oligos YPD1A y YPD1B. En la reacción de PCR se utilizó como molde la construcción pGEMTEasy-*KIYPD1* mencionada en la primera parte de este apartado. El producto se clonó nuevamente en pGEMTEasy y se envió a secuenciar. La construcción se digirió con las enzimas *SacI* y *HindIII* al igual que el vector pQE30 y se ligaron. Por otro lado, a partir de esta construcción se obtuvo el fragmento *KIYPD1::6His* digiriendo con las enzimas *XhoI-HindIII* el cual se clonó en el vector de expresión para *K. lactis* YEpkdGal mismo que se abrió con la enzima *EcoRI*, ambos fragmentos se rellenaron con la enzima Klenow antes de su ligación.

### *KISSK1*

Tanto la forma silvestre como la mutante puntual de *KISSK1* se subclonaron en el vector para expresión de *K. lactis* YEpKDGal a partir de los vectores pGEM-*KISSK1* y el pGEM-*KISSK1*<sup>DA</sup>. Para el ensayo de doble híbrido fue necesario diseñar oligos específicos para permitir subclonar tanto la forma silvestre como la mutante puntual en el vector pJG4-5. En ambos casos se emplearon los oligos Ssk1DHF- Ssk1DHR (**Tabla 4**), como ADN molde se emplearon los plásmidos pGEM-*KISSK1* y el pGEM-*KISSK1*<sup>DA</sup> para cada PCR. Los productos se volvieron a clonar en pGEMT Easy y se secuenciaron. Posteriormente se utilizaron las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para subclonar cada gen en el vector para doble híbrido pJG4-5. Para la expresión de *KISSK1* y *KISSK1*<sup>DA</sup> en *E. coli* se diseñaron los oligos SSK1rrA y SSK1rrB (**Tabla 4**). Como molde se emplearon los mismos plásmidos de la reacción mencionada anteriormente. Ambos productos se clonaron en pGEMT para su correspondiente secuenciación. Para subclonarlos en el vector de expresión pMAL se realizó la digestión con las enzimas *BamHI* y *HindIII* tanto para obtener los fragmentos como para abrir el vector pMAL.

### *KISSK2*

Para el ensayo de doble híbrido se clonó el gen *KISSK2* en el vector pEG202. Se diseñaron los oligos Ssk2DHF y Ssk2DHR (**Tabla 4**) con los cuales se amplificó el gen de interés, el producto se ligó en pGEMT Easy y se secuenció. Posteriormente se subclonó en el vector pEG202 gracias a las enzimas *SmaI* y *NotI*.

### *KIHOG1* y *ScHOG1*

El gen *KIHOG1* se obtuvo a partir de la construcción pGEMTEasy-*KIHOG1* descrita en [Kawasaki et al., 2008](#). Dicha construcción se digirió con las enzimas *EcoRI* y *XhoI* para obtener el fragmento a clonar en el vector pYES2, que se digirió con las mismas enzimas. Por otro lado para obtener el gen *ScHOG1* se digirió la construcción pGEM-*ScHOG1* con las

enzimas *HindIII* y *XbaI* para clonarlo en pYES2, que se digirió con las mismas enzimas. Ambas construcciones se emplearon para la expresión en *S. cerevisiae*. Por otro lado las construcciones pYES2-*KIHOG1* y pYES2-*ScHOG1* sirvieron para obtener ambos genes y subclonarlos en el plásmido YEpKDGal, para ello se digirieron dichas construcciones con las enzimas *HindIII-XhoI* y *HindIII-XbaI* respectivamente. Mientras que el plásmido se digirió con *EcoRI* y se rellenó.

#### *KIHOG1*::Higromicina

Para intercambiar el gen *ScHOG1* por *KIHOG1* en la cepa *sln1<sup>ts</sup>* fue necesario realizar la construcción *KIHOG1*::Higromicina. Se realizó un primer PCR con los oligos 1FHKIHog y 2RHKIHog (Tabla 4), como templado se utilizó el plásmido pAG32 que contiene el gen de Higromicina. Un segundo PCR se realizó con los oligos 3FHScKIHog y 4FHScKIHog, de ADN molde se empleó el plásmido pGEMT- *KIHOG1*. Ambos productos de PCR se emplearon como molde para una tercer PCR en la que se utilizaron los oligos 3FHScKIHog y 2RHKIHog. El producto final contiene una región homóloga de *ScHOG1* que permita la recombinación en el sitio específico del genoma de *S.cerevisiae*, el gen *KIHOG1* y el gen de HIGROMICINA. Dicho producto se clonó en el vector pGEMT Easy y se secuenció. Una vez confirmado, se utilizó esta construcción (pGEMTEasy-*ScHOG1*::*KIHOG1*::Higro) como molde en otro PCR y los oligos 3FHScKIHog y 2RHKIHog, el producto se empleó para transformar la cepa *ScSln1<sup>ts</sup>*, las transformantes fueron seleccionadas por Higromicina. Por último se comprobó por PCR la introducción correcta del gen *KIHOG1* en el locus de *ScHOG1*.

#### **PURIFICACIÓN DE KIYPD1, KISSk1 Y KISSk1<sup>DA</sup>**

La cepa M15 de *E.coli* se transformó con la construcción pQE30-*KIYPD1*. Para purificar la proteína se dejaron crecer las transformantes en 100ml de medio LB con ampicilina a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica (DO<sub>600</sub>) de 0.6, se le adicionó 1mM de isopropil-β-D-tiogalactosido (IPTG), el cultivo se dejó cuatro horas más y luego se recuperaron las células por centrifugación y se resuspendieron en 8ml de la solución A (1% de NP40, 500 mM de NaCl, 40mM de Tris-HCl y 5mM de imidazol). En dicho amortiguador se sonicaron

y la suspensión se centrifugó a 5000 rpm por 15 minutos a 48°C. Se tomó 1ml del sobrenadante y se aplicó en una resina de níquel, la cual se lavó y equilibrio con la solución A (Novagen). Se siguieron las indicaciones del proveedor (Novagen His Bind purification kit) para la purificación de la proteína Klypd1-6His. Al final del proceso se eluyó con una solución de 1% de NP<sub>4</sub>O, 500mM de NaCl, 40mM de Tris-HCl y 100 mM de imidazol.

Para la expresión de KISsk1 y KISsk1<sup>DA</sup> se realizaron dos transformaciones de la cepa BL2 de *E. coli* con los plásmidos pMAL-KISSK1 y pMAL-KISS1<sup>DA</sup>. En ambos casos se dejaron crecer las transformantes en medio LB con ampicilina a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica de 0.5 y se añadió IPTG a una concentración final de 0.3mM. Los cultivos se dejaron por 12hrs a 15°C. Las células se recolectaron por centrifugación en frío y se resuspendieron en 20ml de solución B (20mM de Tris-HCl, 200mM de NaCl, 1mM de EDTA a pH7.5). Las células se lisaron por sonicación y el lisado se centrifugó a 500rpm por 15 min a 4°C. Se aplicaron 3ml del sobrenadante a una resina de amilasa y se siguió el protocolo del proveedor New England Amylose Resin para la purificación de Mal-KISsk1 y Mal-KISsk1<sup>DA</sup> que serán utilizados para los ensayos de fosforilación *in vitro*.

### **PRUEBAS DE RESPUESTA A ESTRÉS HIPEROSMÓTICO**

Las cepas de levadura a probar se cultivaron toda la noche a 30°C en medio SD líquido suplementado con los aminoácidos requeridos por cada cepa. Las levaduras recolectan por centrifugación y se resuspenden en medio YPD o YPGal (según se requiera), los cultivos se ajustan a una DO<sub>600</sub> de 0.1 y se dejan crecer hasta que alcancen una DO<sub>600</sub> de 0.5. A partir de estos cultivos se realizan diluciones seriadas que se gotean en cajas de Petri con medio YPD o YPGal que contenga 0.5, 0.75 o 1 M de KCl y se dejan incubando por un intervalo de 24 a 48hrs. a 30°C.

### **ENSAYOS DE INTERACCIÓN DE PROTEÍNAS**

Para medir interacción entre proteínas se utilizó el sistema de Doble Híbrido LexA-B42 descrito por [Ongay-Larios et al., 2000](#). Por lo que la cepa EGY48 se transformó con los plásmidos correspondientes, las clonas seleccionadas se estriaron en un medio sólido SGal

con 1mg/ml de XGal (5bromo-4-cloro-3-indol-b-Dgalactopiranósido) y se incubaron por 48hrs a 30°C. Se determinó la interacción proteica por la capacidad de las proteínas híbridas para inducir coloración azul en aquellas colonias donde se expresó adecuadamente el gen reportero LacZ. Para medir de manera cuantitativa la dicha interacción se realizaron en paralelo ensayos de actividad enzimática de la  $\beta$ -Galactosidasa según lo descrito en [Ongay-Larios et al., 2000](#).

### **ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN E INMUNODETECCIÓN**

La detección de Hog1 total y fosforilado se realizó por ensayos Western blot utilizando el anticuerpo policlonal anti-Hog1p (Biotechnology, Santa Cruz) y el anticuerpo monoclonal anti-fosfo-p38 (Cell Signaling Technology). Las cepas de levadura a probar se cultivaron toda la noche a 30°C en medio SD líquido suplementado con los aminoácidos requeridos por cada cepa. Las levaduras se recolectan por centrifugación y se resuspendieron en medio YPD o YPGal (según se requiera) y se ajustan a una  $DO_{600}$  de 0.2. Se dejan crecer hasta fase exponencial y son tratadas o no tratadas con diferentes concentraciones de KCl durante diferentes periodos de tiempo. Se toma 1ml de estos cultivos y se tratan con ácido tricloroacético (TCA) al 80%. Las células se recuperan por centrifugación y se resuspenden en el amortiguador SB-DTT y se continúa el procedimiento según se describe en [Velazquez et al., 2015](#). La concentración de proteína se determinaron mediante ensayos de Bradford. Para la detección de la proteína Klypd1-6His se utilizó el anticuerpo conjugado anti-His6- Peroxidasa (Roche). Todos los ensayos se repitieron tres veces y como control de carga que se utilizó fue el lisado de Hog1 total.

### **ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN *in vitro***

Para estos ensayos se emplearon las proteínas Klypd1-His6, Mal-KISsk1 y Mal-KISsk1<sup>DA</sup> cuya expresión y purificación se explicó anteriormente. También se utilizaron los dominios ArcB<sup>78-521</sup> (H1) y ArcB<sup>521-661</sup> (D1) de la proteína ArcB de *E. coli*, dichos dominios se purificaron tal como se describió en [Alvarez y Georgellis 2010](#). Para los ensayos se incubó el dominio H1 con 0.05mM de  $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$  (con actividad específica de 2Ci/mmol) en una

solución de fosforilación que contiene 165mM de HEPES, 250mM de KCl, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 5mM DTT y 50% de glicerol a pH 7.5 por 10 min. a temperatura ambiente. Luego se le adicionó el dominio D1, His6-KIYpd1, Mal-KISsk1 o Mal-KISsk1<sup>DA</sup>. Se realizaron varias reacciones de fosforilación donde se variaron los dominios y las proteínas utilizadas como controles de la fosfo-transferencia. Todas las reacciones se realizaron a temperatura ambiente por 10 min y se detuvieron con la solución de carga (10% de SDS, 0.2M de Tris pH7.5, 10% de glicerol, 0.14M de β-mercaptoetanol y 0.4 mM de azul de bromofenol). Todas las reacciones se cargaron en geles SDS-PAGE y se secaron para ser analizados con un escáner de fosfo-imágenes.

### **ENSAYOS DE FOSFORILACIÓN *in vivo***

Se utilizaron las cepas mutantes resistentes a 5-FOA (5' ácido fluorótico) *ΔKlsIn1* y *ΔKlypd1*, las cuales fueron transfectadas con los plásmidos YEpKDGal-*KIYPD1*-6His y YEpKDGal vacío cada una. Las transformantes resultantes se crecieron en medio líquido YPGal-P (medio rico reducido en fosfatos) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.6, las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 1ml de YPGal-P, el marcaje de KIYpd1 con ortofosfato [<sup>32</sup>P] y el choque osmótico se realizó como describe Posas *et al.* 1996. Luego de ello, las células se trataron con 80% de TCA, se centrifugaron y se resuspendieron en solución de lisis (250 mM de Tris pH6.8, 0.5M de DTT, 10% de SDS, 20% de glicerol y 0.5% de azul de bromofenol). Se rompieron las células con 0.5mg de perlas de vidrio con agitación en vórtex para luego recuperar el lisado por centrifugación. Los lisados se calentaron a 95°C por 5min. Posteriormente se purificó la proteína KIYpd1-6His usando una columna de níquel, los purificados finales se cargaron en un gel de Poliacrilamida-SDS al 15% que se dejó correr por una hora a un voltaje constante de 70v. Se realizó la transferencia a una membrana de nylon la cual se analizó con un escáner para fosfo-imágenes. Por otro lado se realizó la inmuno-detección de la proteína KIYpd1-6His empleando el anticuerpo anti-His (Santa Cruz Biotechnology) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.



## CUANTIFICACIÓN DE GLICEROL Y TREHALOSA

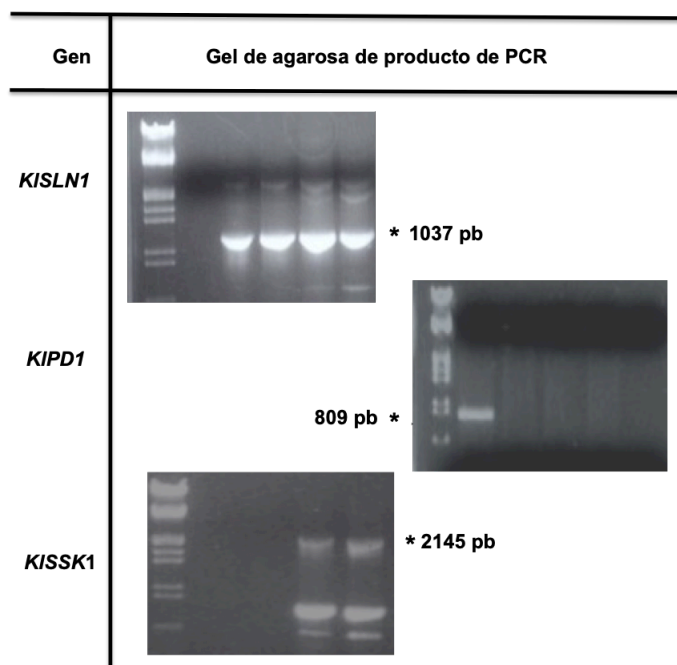
La cuantificación enzimática de glicerol se realizó como se describe en [Bergmeyer, 1984](#). Para lo cual las células se cultivaron en medio SD complementado con los aminoácidos correspondientes, se dejaron crecer a 30°C hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.5. Las células se colectaron por centrifugación y se resuspendieron en medio YPD y se trataron o no con 0.4 M de KCl por 6 hrs a 30°C, la cepa ScSln1<sup>ts</sup> que se incubó a 37°C. Las células ( $2 \times 10^6$  células) se recuperaron por centrifugación y se resuspendieron en 1 ml de PBS frío, se hirvieron por 15 min y se volvieron a centrifugar a 14000 rpm por 2min. Se recuperan 500  $\mu$ l del sobrenadante y se mezclan con 500  $\mu$ l de una solución que contenía 137 mM de glicina, 686 mM de hidrazina, 1.37 mM de  $MgCl_2$ , 1.23 mM de ATP, 0.49 mM de  $NAD^+$ , 2-15  $\mu$ M de glicerol y 17 kU/l glicerol-3-fosfato deshidrogenasa y se determinó la  $DO_{340}$  de cada muestra (lecturas  $A_1$ ). Luego se les adicionó 0.85 kU/l de glicerol cinasa y se volvieron a tomar las densidades ópticas (lecturas  $A_2$ ). La resta de  $A_2 - A_1$  de cada reacción se usó para calcular la concentración de glicerol utilizando la fórmula  $C = [V/\epsilon dV]\Delta A$  mmol/l, donde V es el volumen final de la reacción,  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar del NADH a 340 nm, d es la distancia que recorre el haz de luz en la celda (en cm) y v es el volumen de la muestra.

La acumulación de trehalosa se determinó de acuerdo al protocolo descrito por [Hounsa et al., 1998](#). Para este estudio las cepas se crecieron y trataron con KCl tal como se describió para glicerol. La trehalosa, la glucosa oxidasa y la peroxidasa de rábano se obtuvieron de SIGMA.

## RESULTADOS





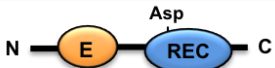
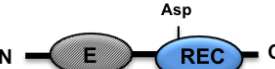
### AMPLIFICACIÓN Y CLONACIÓN DE LOS GENES *KISLN1*, *KIYPD1* Y *KISSK1*

En la levadura *S. cerevisiae* la inactivación de Sln1 o de Ypd1 induce letalidad (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996). La letalidad se debe a la activación constitutiva de Hog1, lo que impide la progresión del ciclo celular, promueve la producción sin control de glicerol. En análisis genómicos se ha detectado la gran similitud entre las proteínas del fosforrelevo con sus ortólogos en otras especies. En éste trabajo decidimos estudiar los efectos de la inactivación de KISln1, de KIYpd1 y de KISSk1 en *K. lactis*. Realizamos la búsqueda de los genes en la base de datos de *Genolevures* y se diseñaron los oligos que permitieron la amplificación de cada uno de los componentes del sistema de fosforrelevo; los productos de dichas amplificaciones se muestran en la Fig. 5, los fragmentos se clonaron en el vector pGEMT-Easy y se secuenciaron.



**Fig. 5. Productos de PCR de los genes *KISLN1*, *KIYPD1* y *KISSK1* de *K. lactis*.** Se usó marcador Thermo Scientific™ ADN Lambda/HindIII (primer carril en todos los geles). El asterisco indica el producto del peso esperado. Se realizaron curvas de Mg<sup>+</sup> (1, 2, 3, 4 y 5 mM). Gel de agarosa al 1%. (pb) pares de bases.

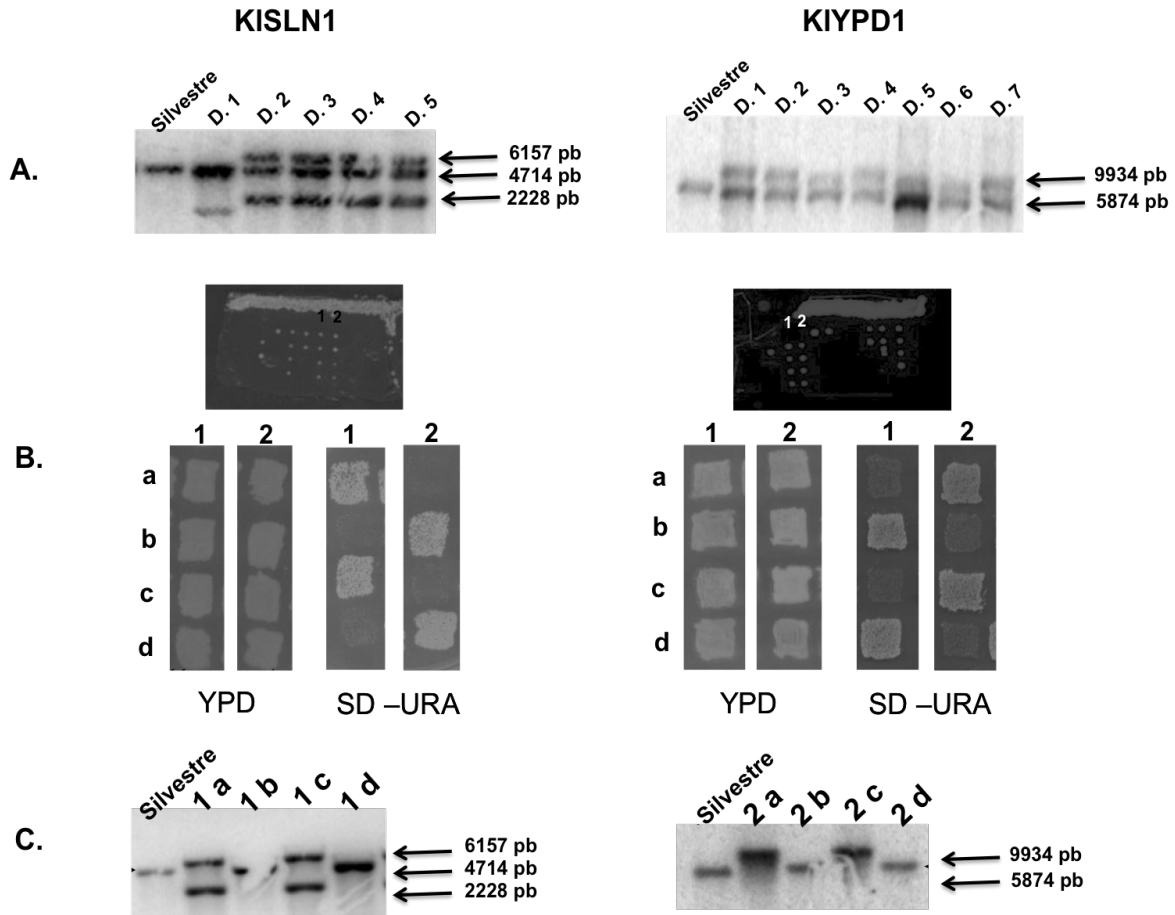
Por otro lado, se realizó un análisis comparativo entre las proteínas de *K. lactis* y *S. cerevisiae*. Se realizó un alineamiento de las secuencias de aminoácidos de cada una de las proteínas que conforman el sistema de fosforrelevo, la mayor similitud entre las proteínas corresponde a los dominios que tienen que ver con la fosfotransferencia (ver [Tabla 5](#)).

Proteína	Esquema y tamaño (aa) de las proteínas	% de Identidad
ScSln1		1155
KISln1		1220
ScYpd1		135
KIYpd1		167
ScSsk1		635
KISsk1		712

**Tabla 5. Comparación de las proteínas del sistema de fosforrelevo de *K. lactis* y *S. cerevisiae*.** Representación esquemática de los dominios de las proteínas de los minios presentes en las proteínas, así como el tamaño de cada una y el porcentaje de identidad entre las secuencias de aminoácidos. Se realizaron alineamientos de las proteínas con el programa Protein Blast de NCBI (solo se muestra el porcentaje de identidad). (Sc) *S. cerevisiae*, (Kl) *K. lactis*, (HK) dominio de cinasa de histidina, (S) dominio sensor, (REC) dominio aceptor, (E) dominio efector, (HPT) dominio de fosfotransferencia.

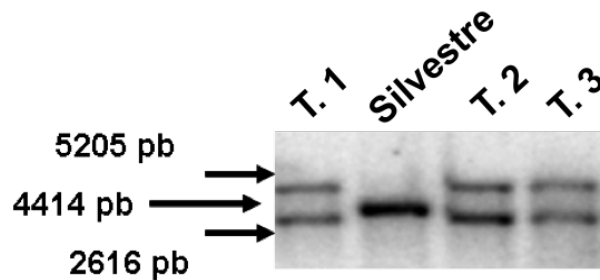
## LA ELIMINACIÓN DE LOS GENES *KISLN1*, *KIYPD1* Y *KISSK1* PRODUCE CELULAS VIABLES Y NO SON SENSIBLES AL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO

Con el antecedente de letalidad de las mutantes en *S. cerevisiae* y la similitud de las proteínas del sistema de fosforrelevo de *K. lactis* y aprovechando las características del ciclo de vida de dicha levadura, se construyeron las cepas heterocigotas diploides *Klsln1/SLN1* y *Klypd1/YPD1* mediante la introducción del casete *URA3*. A las transformantes diploides obtenidas se les realizó un ensayo de hibridación tipo Southern blot para verificar la presencia del alelo silvestre y del mutante (Fig. 6A). Se seleccionó en cada caso un heterocigoto diploide que dio positivo a la hibridación y se dejó crecer en medio de esporulación por 72 horas. Posteriormente se realizó una disección de esporas por micromanipulación. Sorprendentemente, se produjeron esporas viables (parte superior de Figura 6B) y la segregación meiótica mostró que de cuatro esporas viables dos fueron *URA3*<sup>+</sup> (parte inferior de Fig. 6B). Se corroboró por Southern blot que las segregantes *URA3*<sup>+</sup> presentan el alelo alterado mientras que las otras dos presentan el alelo silvestre, tanto para *KISLN1* y *KIYPD1* (Fig. 6C). Estos resultados indican que a diferencia de *S. cerevisiae*, la inactivación de *KISln1* o *KIYpd1* no induce letalidad en *K. lactis*.



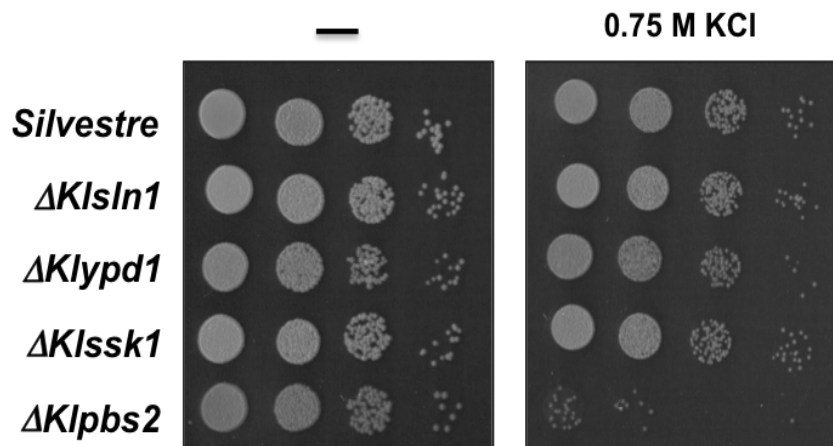
**Fig. 6 Generación de cepas  $\Delta Kisl1$  y  $\Delta Klypd1$ .** La inactivación de *KISln1* y de *KIYpd1* no afecta la viabilidad celular en *K. lactis*. Del lado izquierdo se muestran resultados para *KISLN1* y del lado derecho para *KIYPD1*, para las hibridaciones se emplearon sondas específicas para cada gen, el ADN genómico se digirió con las enzimas *Pst*I para *KISLN1* y *Cla*I para *KIYPD1*, en todos los casos la cepa silvestre empleada fue la MD2/1. Para *KISLN1* el tamaño esperado para el alelo silvestre es de 4714pb y para el alelo modificado son dos bandas una de 6157 y 2228 pb. Para *KIYPD1* la banda del alelo silvestre es de 5874pb mientras que para el modificado es de 9934pb. **A.** Southern blot de las algunas de las transformantes diploides obtenidas, las clonas positivas fueron aquellas que presentan tanto el alelo silvestre y el mutado. Se tomó una de estas heterocigotas diploides y se utilizó para un ensayo de esporulación. **B.** Disección de esporas y segregación meiótica. En la parte superior se aprecia la foto de una plantilla de disección de esporas y en la parte inferior el resultado del crecimiento de dos de las tétradas disectadas (1 y 2). Se dejaron crecer en medio rico YPD y para apreciar la segregación meiótica se empleó el medio mínimo SD sin Uracilo; dos de las esporas germinadas son incapaces de crecer en dicho medio (1b-1d / 2a-2c para *KISLN1* y 1a-1c / 2b-2d para *KIYPD1*) mientras que las otras dos pueden crecer gracias a la presencia del gen marcador *URA3* (1a-1c / 2b-2d para *KISLN1* y 1b-1d / 2a-2c para *KIYPD1*). **C.** Southern blot de las segregantes meióticas para confirmar la presencia del alelo mutado (Marcador *URA3*). Para *KISLN1* se utilizó la tétrada 1, donde se corroboró la presencia del alelo mutado en 1a y 1c, mientras que 1b y 1d presentan el alelo silvestre. En el caso de *KIYPD1* se empleó la tétrada 2, donde se comprobó que 2a y 2c presentan el alelo mutado y 2b y 2c el silvestre.

En paralelo, a los resultados mostrados se realizó la interrupción del gen *KISSK1* en células haploides mediante la introducción del casete *URA3* en la cepa MD2/1. Las levaduras se seleccionaron en medio SD sin uracilo y algunas de las transformantes se analizaron por Southern blot para verificar la correcta inserción del casete (Fig. 7). Se corroboró que las tres transformantes presentan una correcta integración del casete y por lo tanto presentan la interrupción del gen *KISSK1*.



**Fig. 7. Obtención de la cepa  $\Delta KISSK1$ .** Las tres transformadas son  $\Delta KISSK1$  ya que presentan el alelo modificado. Southern blot de tres de tres de las transformantes obtenidas en la interrupción del gen *KISSK1*. El ADN genómico fue digerido con la enzima *EcoRV* y la cepa silvestre utilizada fue la MD2/1, se empleó una sonda específica para el gen y el peso esperado para el alelo silvestre es de 4414 p.b. mientras que para la interrupción de *KISSK1* se esperaban dos fragmentos de 5205 y 2616 p.b.

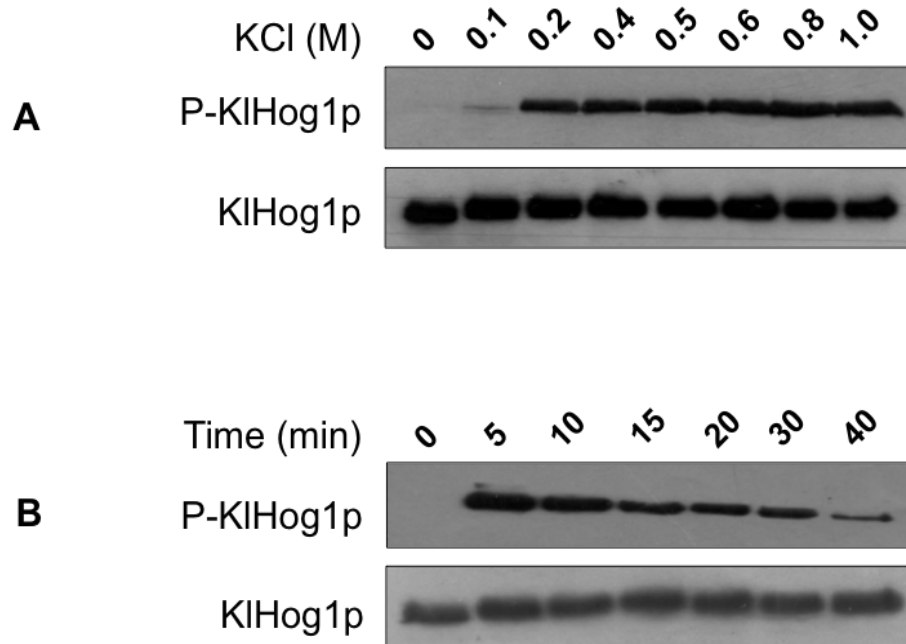
Con los resultados anteriores nos interesó conocer si el sistema de fosforrelievo de *K. lactis* tenía un papel en la respuesta a estrés hiperosmótico, por lo que probamos la capacidad de crecer en condiciones de alta osmolaridad a las mutantes haploides  $\Delta KISln1$ ,  $\Delta Klypd1$  y  $\Delta KISSK1$  (Fig. 8). Estos ensayos se realizaron comparando el crecimiento con la cepa silvestre MD2/1, que es capaz de responder efectivamente al estrés y por lo tanto crecer correctamente, y con la cepa  $\Delta Klpbs2$ , que es incapaz de responder al estrés, por lo que prácticamente no crece en un medio con alta osmolaridad. Se probó un medio rico con 0.75 M de KCl (Fig. 8). Los resultados muestran que las tres mutantes del sistema de fosforrelievo crecen de manera similar a la cepa silvestre, es decir, que la eliminación de *KISln1*, *KIYpd1* ó *KISSK1* no afecta ni la viabilidad ni la capacidad de responder al estrés hiperosmótico en *K. lactis*.



**Fig. 8 Pruebas de estrés hiperosmótico en placa.** El estrés hiperosmótico no afecta el crecimiento de las células que carecen de las proteínas del sistema de fosforrelevo en *K. lactis*. Las cepas se cultivaron toda la noche a 30°C, se recolectaron por centrifugación y se lavaron para ser diluidas en medio YPD donde crecieron por aproximadamente 3 hrs hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.5, a partir de estos cultivos se realizaron diluciones seriales que se gotearon en placas con medio YPD (placa izquierda) y YPD con 0.75 M de KCl (placa de la derecha). Pasadas las 48 hrs. se evalúa el crecimiento.

#### CINÉTICA DE FOSFORILACIÓN DE KIHOG1 EN *K. lactis*

Decidimos estudiar la fosforilación de KIHog1 en las mutantes del sistema de fosforelevo. Para ello analizamos primero la fosforilación de Hog1 en la cepa silvestre de *K. lactis*. La cepa silvestre MD2/1 se expuso a concentraciones crecientes de KCl por 5 minutos, en dichos ensayos se observó que KIHog1 alcanza una fosforilación máxima desde los 0.2 M y no parece variar a mayores concentraciones (Fig. 9A). Por otro lado, se realizó una cinética de activación de la cepa silvestre utilizando 0.4 M de KCl y se tomaron muestras a distintos tiempos. La fosforilación de KIHog1 alcanzó su máximo a los 5 min para luego ir disminuyendo gradualmente, a los 40 min prácticamente ya no se observa fosforilación en KIHog1 (Fig. 9B). En ambos experimentos se realizó también la inmunodetección del KIHog1 total.



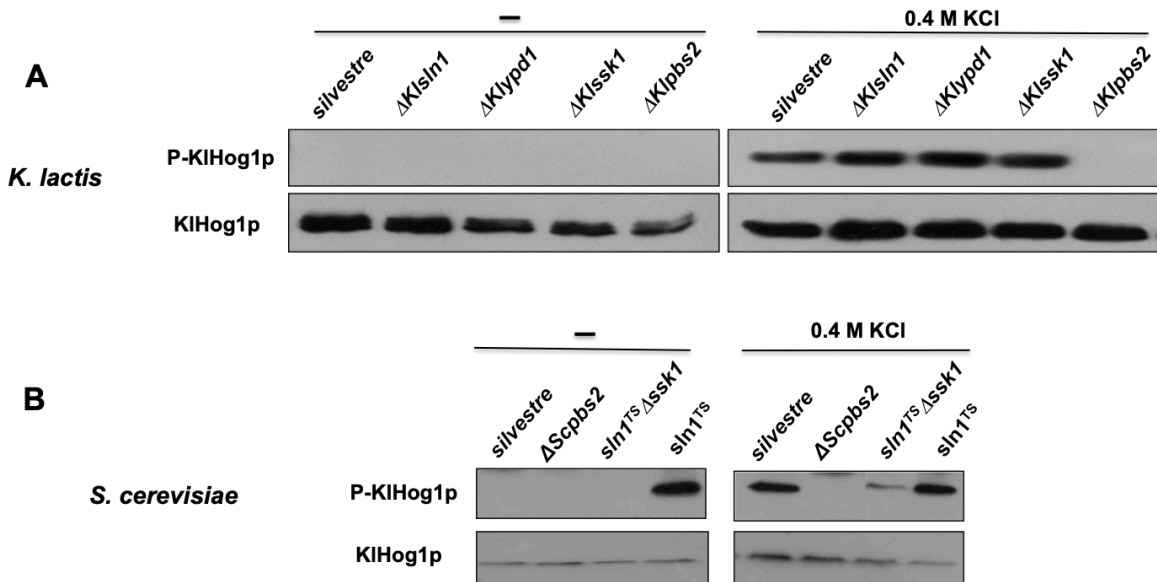
**Fig. 9 Cinética de fosforilación de KIHog1 en respuesta al estrés hiperosmótico.** KIHog1 se fosforila desde 0.2 M de KCl y no parece variar mucho, además se fosforila a partir de los 5 minutos de exposición al estrés y la fosforilación disminuye gradualmente. Las células se cultivaron en medio YPD y se ajustaron a una  $DO_{600}$  0.5, para luego ser tratadas o no con las concentraciones de KCl y tiempos especificados. Para el Western Blot se usaron 20 $\mu$ g de cada muestra, se usó primero el anticuerpo anti-p38 (P-Hog1) (parte superior de cada panel) y posteriormente se lavaron las membranas para usar el anticuerpo anti-Hog1 (parte inferior de cada panel). **(A)** Fosforilación de KIHog1 después de 5 min del tratamiento con las concentraciones de KCl indicadas. **(B)** Fosforilación de KIHog1 luego de tratar las células con 0.4 M de KCl durante los tiempos indicados en la imagen.

**KIHog1 NO SE FOSFORILA CONSTITUTIVAMENTE EN LAS MUTANTES  $\Delta Klsln1$ ,  $\Delta Klypd1$ ,  $\Delta Klssk1$  Y  $\Delta Klsln1 \Delta KIPTP2$**

Una vez establecidas las condiciones adecuadas para la fosforilación de KIHog1 en respuesta al estrés hiperosmótico, analizamos la fosforilación de KIHog1 en las cepas  $\Delta Klsln1$ ,  $\Delta Klypd1$  y  $\Delta Klssk1$ , tanto en condiciones de estrés hiperosmótico como en condiciones sin estrés (iso-osmóticas). Contrario a lo que se ha visto en *S. cerevisiae*, no se observa fosforilación constitutiva de KIHog1 en las mutantes que carecen de Klsln1 o Klypd1 en condiciones iso-osmóticas (Fig. 10A lado izquierdo panel). Sin embargo, sí se indujo la fosforilación de KIHog1 en las mutantes después de un tratamiento con KCl (Fig.

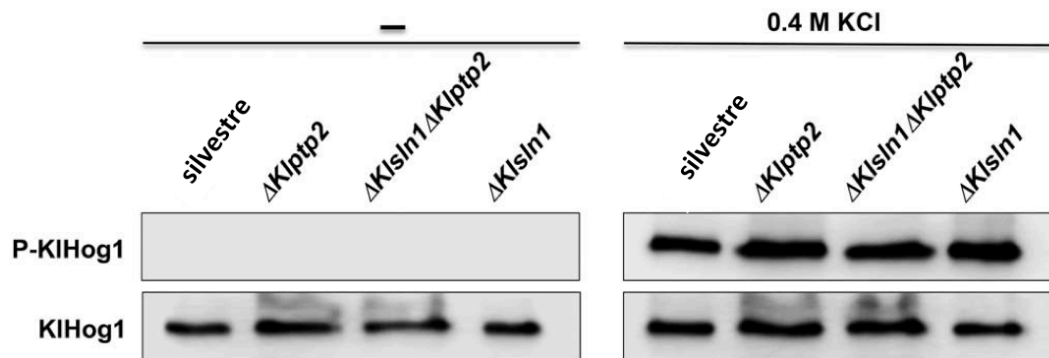


10A lado derecho). Para una mejor comparación realizamos el mismo ensayo en algunas cepas de *S. cerevisiae*. Se utilizó la cepa termosensible *Scsln1<sup>ts</sup>* (Maeda *et al.*, 1994) en la que al crecer a 37°C, ScSln1 se inactiva. En estas condiciones, ScHog1 se fosforila constitutivamente aún en un medio iso-osmótico (Fig. 10B lado izquierdo). En la doble mutante *Scsln1<sup>ts</sup>ΔScssk1* en cambio, ScHog1 ya no se fosforila de manera constitutiva, pero sí se fosforila ligeramente en estrés hiperosmótico (Fig. 10B lado izquierdo).



**Fig. 10 Fosforilación de Hog1 de *K. lactis* y *S. cerevisiae* en mutantes que carecen de los componentes del sistema de fosforrelevo.** Las mutantes del sistema de fosforelevo de *K. lactis* no activan constitutivamente la fosforilación de KIHog1 en condiciones isoosmóticas en comparación con *S. cerevisiae* (cepa *Scsln1-ts*). Las distintas cepas señaladas en la imagen fueron tratadas con 0.4 M de KCl por 5 minutos. Se usó primero el anticuerpo anti-p38 (P-Hog1) (parte superior de cada panel) y posteriormente se lavaron las membranas para usar el anticuerpo anti-Hog1 (parte inferior de cada panel) **(A)** Fosforilación de KIHog1 en cepas de *K. lactis*, parte izquierda se aprecia las cepas en condiciones isoosmóticas y del lado derecho con el tratamiento de estrés, se empleó la cepa *ΔKlpbs2* como control negativo de la fosforilación de KIHog1 en condiciones de estrés. **(B)** Fosforilación de las cepas *ΔScpbs2*, *ΔKlpbs2*, *Scsln1<sup>ts</sup>ΔScssk1*, *Scsln1<sup>ts</sup>* y de la cepa silvestre de *S. cerevisiae*. Para la inactivación de Sln1 las cepas termosensibles se dejaron crecer a 37°C por tres horas antes de someterlas a estrés hiperosmótico.

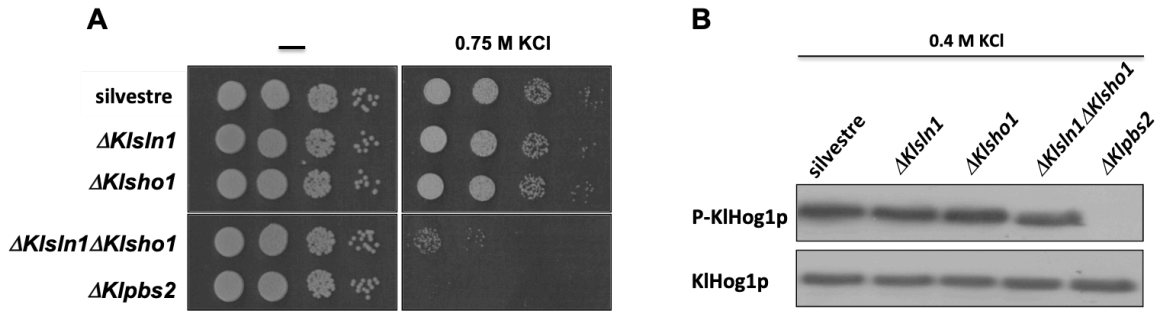
Ahora bien, en *S. cerevisiae* se sabe que ScHog1 tiene una retroalimentación negativa mediante su desfosforilación. Las proteínas encargadas de defosforilarla son las fosfatasa de tirosina ScPtp2 y ScPtp3. En particular, ScPtp2 se encuentra en el núcleo, donde defosforila el residuo tyr176 de ScHog1 (Mattison & Ota 2000). Con lo anterior, nos pareció oportuno estudiar el papel de la fosfatasa KlPtp2 de *K. lactis* en la defosforilación de KlHog1 en algunas de las mutantes del sistema de fosforrelevo, en particular empleamos la que carece de KIsln1, por lo que evaluamos la fosforilación de KlHog1 en las cepas  $\Delta Klptp2$  y  $\Delta KIsln1\Delta Klptp2$ , ambas generadas en el laboratorio. En condiciones iso-osmóticas no se observó fosforilación alguna de KlHog1 (Fig. 11 lado izquierdo). Mientras que en condiciones de estrés hiperosmótico se observó una fosforilación de KlHog1 muy similar a la de la cepa silvestre y la mutante sencilla  $\Delta KIsln1$  (Fig. 11 lado derecho). Los datos muestran que la ausencia de fosforilación constitutiva de KlHog1 en las cepas  $\Delta KIsln1$  y  $\Delta Klpyd1$  y la consecuente viabilidad celular de estas cepas no se debe a una desfosforilación rápida de KlHog1.



**Fig. 11. Fosforilación de KlHog1 en las cepas  $\Delta Klptp2$  y  $\Delta KIsln1\Delta Klptp2$ .** La eliminación de la fosfatasa KlPtp2 no modifica la fosforilación de las mutantes que carecen del sistema de fosforrelevo en *K. lactis*. Para el Western Blot se usaron 20 $\mu$ g de cada muestra, se uso primero el anticuerpo anti-p38 (P-Hog1) (parte superior de cada panel) y posteriormente se lavaron las membranas para usar el anticuerpo anti-Hog1 (parte inferior de cada panel). El panel de la izquierda muestra los resultados en condiciones iso-osmóticas y del lado derecho se aprecian los resultados en condiciones de estrés hiperosmótico.

## **INACTIVACIÓN DE LAS DOS RAMAS DE LA VÍA DE HOG EN *K. lactis* OCASIONA ALTA SENSIBILIDAD EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIPEROSMÓTICO**

En *S. cerevisiae* la respuesta al estrés hiperosmótico se da por la participación de las dos ramas de la vía de HOG (SLN1 y SHO1). Esto se conoce bastante bien, ya que al inactivar cualquiera de las ramas, las células pueden crecer normalmente en condiciones hiperosmóticas, pero al inactivar ambas ramas se produce una fuerte sensibilidad al estrés (Posas & Saito 1997). Ahora bien, dados los resultados obtenidos hasta este punto decidimos evaluar los efectos de la inactivación de ambas ramas en *K. lactis*. Para ello se evaluó el crecimiento en medio hiperosmótico y la fosforilación de KIHog1 en mutantes dobles de ambas ramas. Para fines prácticos, en la figura 12 mostramos los resultados para la cepa  $\Delta Klsln1\Delta Klsho1$ . Se observa que en condiciones hiperosmóticas la doble mutante crece mucho menos que las mutantes sencillas y que la cepa silvestre (Fig. 12A). Este dato indica que *K. lactis* responde al estrés hiperosmótico activando tanto la rama de SHO1 como la de SLN1, indicando además que se requiere de KISln1 para generar una respuesta apropiada al estrés. Por otro lado, la fosforilación de KIHog1 no parece verse afectada en la doble mutante, pese a que es muy sensible al estrés hiperosmótico. La doble mutante se fosforila de manera muy similar a la cepa silvestre luego del tratamiento con 0.4 M de KCl durante 5 minutos (Fig. 12B). Este resultado es constante en todas las dobles mutantes estudiadas anteriormente (Velázquez *et al.*, 2015).



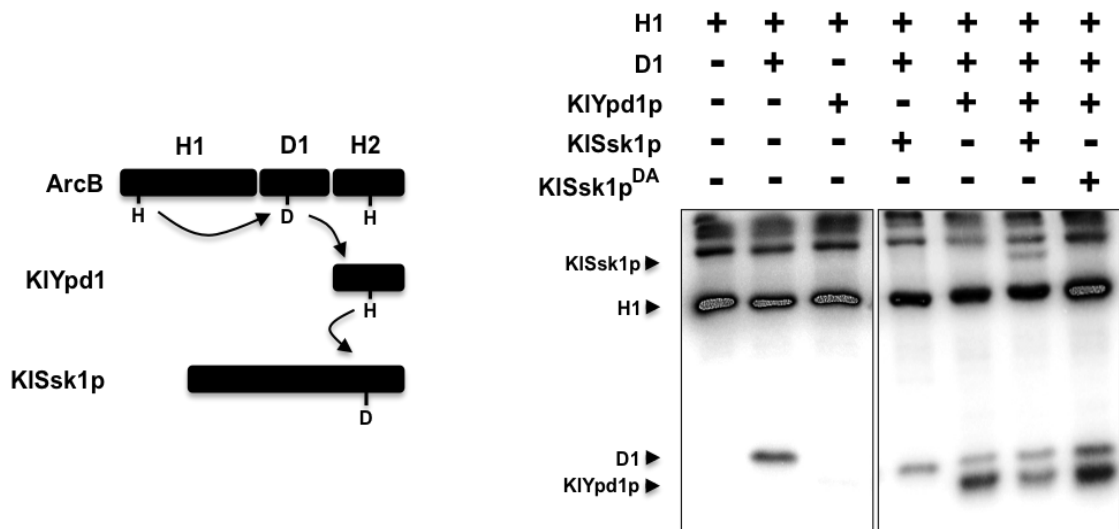
**Fig. 12 Inactivación de las dos ramas SLN1 y SHO1.** El estrés hiperosmótico induce defectos en el crecimiento en una cepa mutante que carece de los genes *KISLN1* y *KISHO1* aunque se presenta fosforilación de KlHog1 en condiciones de estrés. Las cepas se cultivaron toda la noche a 30°C, se colectaron por centrifugación y pasadas a medio YPD donde crecieron por aproximadamente 3 hrs hasta alcanzar una  $DO_{600}$  de 0.5, se realizaron diluciones seriales que se gotearon en placas con medio YPD (-) y YPD con 0.75 M de KCl (placa de la derecha). Para el Western Blot se usaron 20  $\mu$ g de cada muestra, se uso primero el anticuerpo anti-p38 (P-Hog1) (parte superior de cada panel) y posteriormente se lavaron las membranas para usar el anticuerpo anti-Hog1 (parte inferior de cada panel). **(A)** Evaluación del crecimiento en placa con medio rico (parte izquierda) y en condiciones hiperosmóticas (placa de la derecha). **(B)** Fosforilación de KlHog1 luego del tratamiento con 0.4 M de KCl.

#### KlYpd1 ES CAPAZ DE ACEPTAR UN GRUPO FOSFATO Y TRANSFERIRLO A KISSK1.

Sabemos entonces que el sistema de fosforrelevo en *K. lactis* tiene participación en la respuesta al estrés hiperosmótico, aunque no queda claro qué papel tiene. Por lo que decidimos realizar ensayos de fosforilación *in vitro* que nos permitiese permitieron determinar si KlYpd1 podía aceptar grupos fosfatos de una proteína donadora y transferirlos a KlSsk1. Expresamos y purificamos ambas proteínas en sistemas bacterianos, tal como se describe en la sección de materiales. En un primer experimento se trató de utilizar la porción citoplasmática de KlSln1 como donador de fosfatos, pero mostró alta inestabilidad cuando se purificaba, por lo que decidimos utilizar un donador distinto. Utilizamos dos dominios de la proteína ArcB, la cual es una cinasa de histidina híbrida de *E. coli* (Georgellis *et al.*, 1997). En los ensayos se utilizó el dominio de cinasa de histidina H1 (ArcB78-521 corresponde al dominio HK) y el dominio aceptor D1 (ArcB521-661). Los ensayos de expresión y purificación de KlSsk1 y KlYpd1 se realizaron y reportaron como

parte de la tesis de Licenciatura de la LIBB Eunice Domínguez Martín en 2012. Los dominios y las proteínas empleadas se esquematizan en la parte izquierda de la **Fig. 13**. Los ensayo mostraron que el dominio H1 fue capaz de transferir un grupo fosfato al dominio aceptor D1 cuando se incubaron con un nucleótido de ATP marcado radioactivamente (**Fig. 13 carril 2**) (Alvarez & Georgellis 2010). Así mismo, el dominio D1 es capaz de donar el grupo fosfato a la proteína KIYpd1 al agregarla a la reacción (**Fig. 13 carril 5**). Al incluir a KISsk1 en la reacción se observó claramente que es capaz de recibir el fosfato proveniente de KIYpd1 (**Fig. 13 carril 6**). La fosforilación de KISsk1 se da únicamente en presencia de KIYpd1, lo que indica que el fosfato no puede ir directamente del dominio D1 de ArcB a KISsk1 (**Fig. 13 carril 4**). Estos datos confirman que KIYpd1 es capaz de aceptar un grupo fosfato de un dominio aceptor y transferirlo a KISsk1.

Por último, se realizó la construcción de una mutante KISsk1 cuyo residuo de aspartato 444 fue remplazado por una alanina (KISsk1<sup>DA</sup>). Se sabe que en *S. cerevisiae* este tipo de cambios evita que ScSsk1 sea fosforilada por ScYpd1 (Posas et al 1996; Horie et al 2008). Al sustituir en los ensayos de fosforilación *in vitro* a KISsk1 por KISsk1<sup>DA</sup>, esta última es incapaz de recibir el grupo fosfato proveniente de KIYpd1 (**Fig. 13 carril 7**). Estos resultados indican que el residuo 444 es el aceptor del grupo fosfato en la proteína KISsk1 de *K. lactis*.

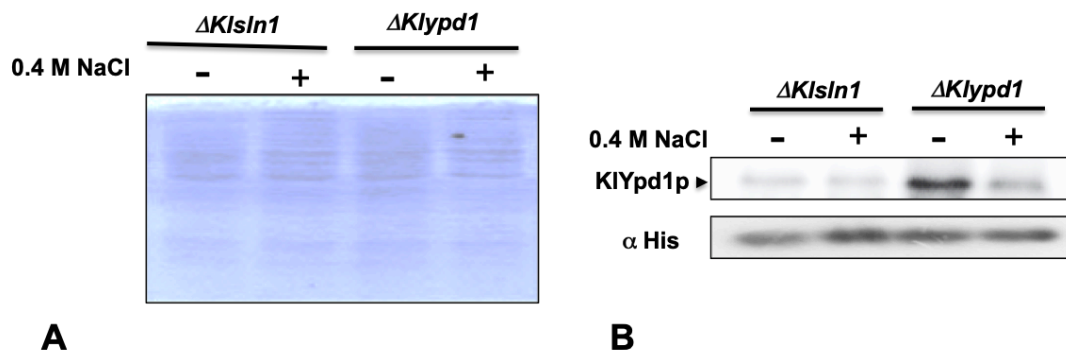


**Fig. 13 Ensayo de fosforilación *in vitro* de las proteínas KLYpd1 y KISsk1.** Se utilizaron los dominios H1 y D1 de ArcB descritos por Alvarez & Georgellis 2010 y las proteínas KLYpd1, KISsk1 y KISsk1<sup>DA</sup>. Del lado izquierdo se muestra un esquema de las proteínas y de la transferencia que se lleva a cabo. Cada carril corresponde a una distinta reacción de fosfotransferencia, inicialmente se incubó el dominio H1 por 10 min a temperatura ambiente con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP y luego se añade D1, KLYpd1, KISsk1 o KISsk1<sup>DA</sup> según corresponda a cada reacción y se deja por otros 10 min. En la parte superior del panel se indica con un signo más las proteínas o dominios que fueron utilizadas para cada reacción y del lado izquierdo de la imagen se indica con flechas la posición para cada proteína de acuerdo al peso esperado de cada una.

### EL SISTEMA DE FOSFORRELEVO SE INACTIVA EN CONDICIONES DE ESTRÉS HIPEROSMÓTICO

Se ha demostrado que el sistema de fosforrelevo en *S. cerevisiae* funciona como regulador negativo de la vía de HOG. Es decir, la transferencia de fosfatos se encuentra activa en condiciones iso-osmóticas mientras que en condiciones de estrés hiperosmótico el sistema se inactiva permitiendo la activación de ScHog1 (Maeda *et al.*, 1994). Según los resultados obtenidos y los fenotipos observados se podría pensar que el sistema de fosforrelevo en *K. lactis* funciona de forma diferente a lo descrito en *S. cerevisiae*. Para comprobar lo anterior decidimos estudiar la fosforilación de KLYpd1 en condiciones iso-osmóticas e hiperosmóticas y en presencia y ausencia de KISln1. Realizamos ensayos de fosforilación *in vivo* mediante marcaje metabólico utilizando ortofosfato [<sup>32</sup>P] en ausencia

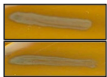
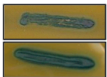


y presencia de 0.4 M de KCl. Utilizamos las cepas  $\Delta KIsIn1$  y  $\Delta Klypd1$  que fueron transformadas con la construcción YEpKDGal-*KIYPD1*::6His. Gracias a la etiqueta de histidinas fue posible purificar por columna de níquel a KIYpd1 tal como se describe en el apartado de materiales. Los resultados de los ensayos muestran que KIYpd1 se fosforila en condiciones iso-osmóticas y únicamente en presencia de KISIn1 (Fig. 14B), mientras que en condiciones de estrés hiperosmótico que la fosforilación de KIYpd1 disminuye drásticamente (Fig. 14B). Estos resultados indican que KISIn1 está catalíticamente activo en condiciones iso-osmóticas, por lo que KIYpd1 se encuentra fosforilado. Por el contrario, cuando KISIn1 se inactiva como consecuencia del estrés hiperosmótico, KIYpd1 se desfosforila. Todo esto indica que el sistema de fosforrelevo en *K. lactis* parece estar funcionando de manera similar al de *S. cerevisiae*.



**Fig. 14. Fosforilación *in vivo* de KIYpd1.** La fosforilación de KIYpd1 por KISIn1 se produce en condiciones isoosmóticas y es dependiente de KISIn1. Se muestra uno de los ensayos realizados; utilizamos las cepas  $\Delta KIsIn1$  y  $\Delta Klypd1$  que fueron transformadas con la construcción YEpKDGal-*KIYPD1*::6His, con la finalidad de purificar la proteína KIYpd1 mediante columna de níquel. Las cepas se crecieron en un medio sin fosfatos para luego introducir el ortofosfato [ $^{32}$ P], luego se les trato o no con 0.4M de KCl por 1 minuto a temperatura ambiente. KIYpd1 se purificó mediante columna de níquel y las proteínas se cargaron en un gel de SDS-PAGE y luego transferidas a una membrana de nylon la cual fue analizada, la misma membrana se empleo para el western blot con el anticuerpo anti-His. **(A)** Gel teñido con azul de Coomassie con los extractos de proteína total de cada una de las cepas empleadas, como control de carga para la columna de níquel y el western blot. **(B)** Fosforilación y western blot de KIYpd1. En el panel superior se aprecia el resultado del marcaje metabólico de KIYpd1 y en el panel inferior el western blot anti-His.

## LA PROTEÍNA KISsk2 INTERACCIONA MAS CON LA FORMA DESFOSFORILADA DE KISSK1 (KISsk1<sup>DA</sup>)

Lo siguiente que nos interesó resolver es la conexión entre el sistema de fosforrelevo y el módulo de MAPK. En *S. cerevisiae*, ScSsk1 interacciona directamente con ScSsk2/Ssk22 (MAPKKK redundantes). *K. lactis* carece de Ssk22, por lo que decidimos analizar la interacción entre KISsk1 y KISsk2, para lo cual empleamos la técnica de doble híbrido. Fusionamos el dominio de unión a ADN LexA a KISsk1 y el dominio activador B42 a KISsk2. Observamos que KISsk1 prácticamente no interacciona con KISsk2 (ausencia de coloración azul y en los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa) (Fig. 15). Por otro lado, también probamos la forma desfosforilada de KISsk1 (KISsk1<sup>DA</sup>), la cual no puede ser fosforilada por Klypd1. En la Figura 15 se puede observar que la interacción entre KISsk1<sup>DA</sup> y KISsk2 es muy fuerte. Estos datos indican que al igual que en *S. cerevisiae*, el sistema de fosforrelevo de *K. lactis* está conectado a la vía de HOG y que la regula negativamente.

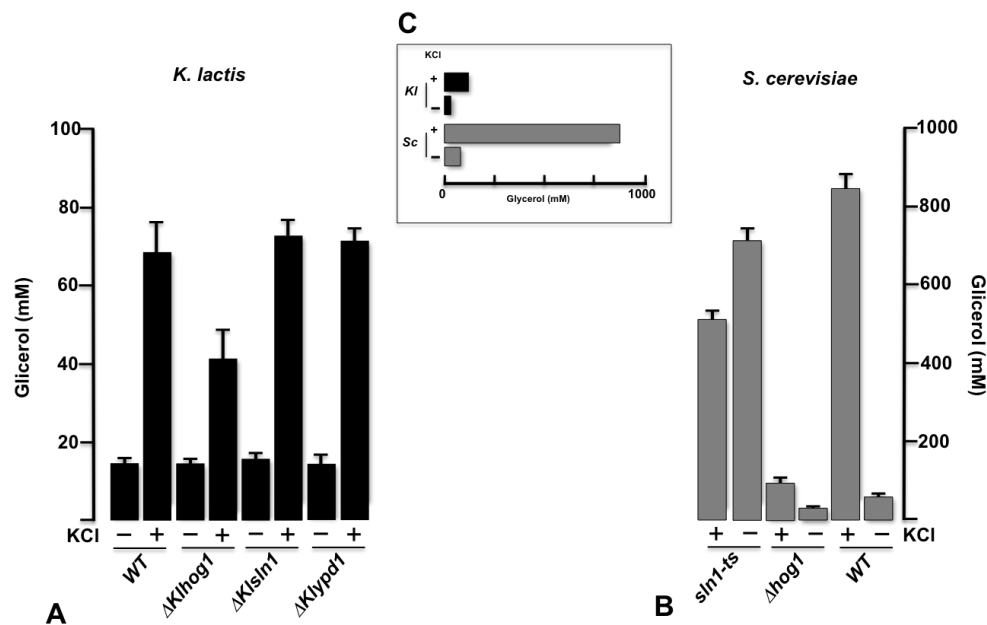
Dominio de unión	Dominio de activación		Actividad de $\beta$ -galactosidasa (U/mg x 10 <sup>-3</sup> )
KISsk1p	KISsk2p		2.4 ± 0.9
KISsk1p <sup>DA</sup>	KISsk2p		35.2 ± 5.7
KISsk1p	—		0.9 ± 0.7
KISsk1p <sup>DA</sup>	—		0.8 ± 0.5

**Fig. 15 Interacción entre KISsk1 y KISsk2.** Existe una fuerte interacción entre KISsk1<sup>DA</sup> y KISsk2 en comparación con la casi nula interacción entre KISsk1 y KISsk2. Se emplearon los plásmidos para doble híbrido pEG202-KISSK1, pEG202-KISSK1<sup>DA</sup>, pJG4-KISSK2 y pSH18. El gen reportero utilizado fue LacZ que codifica para la enzima  $\beta$ -galactosidasa que rompe el X-Gal dando como resultado una coloración azul. Se empleó la cepa EGY48. La cuantificación de la actividad de la  $\beta$ -galactosidasa se determinó como describe Ongay y colaboradores en el 2000. En las filas del lado izquierdo se indica las proteínas de cada ensayo, en la parte central la imagen de dos de las clonas analizadas cualitativamente y en la fila de la derecha tenemos el valor promedio de la actividad de la enzima de tres clones independientes.



## ***K. lactis* ACUMULA MENOS GLICEROL QUE *S. cerevisiae* EN RESPUESTA AL ESTRÉS HIPEROSMÓTICO**

La activación de ScHog1 en *S. cerevisiae* induce muchos cambios celulares, tales como el arresto celular y la acumulación de varios osmolitos que le ayudan a contener la deshidratación que se da como primera respuesta al estrés hiperosmótico; el principal osmolito sintetizado es el glicerol (Saito & Posas 2012). Y si recordamos, la inactivación de ScSln1 causa la activación constitutiva de ScHog1 lo que lleva a una producción no controlada de glicerol (Hohmann 20002). Con estos antecedentes y los datos obtenidos decidimos comparar la cantidad de glicerol acumulado después de un estrés hiperosmótico tanto en *K. lactis* como en *S. cerevisiae*. Se compararon algunas mutantes y las cepas silvestres. La cepa silvestre de *K. lactis* acumula entre 5 y 7 veces más glicerol en estrés hiperosmótico. El mismo efecto se observa en las mutantes  $\Delta Klsln1$  y  $\Delta Klypd1$ , mientras que en la cepa  $\Delta Klhog1$  disminuye ligeramente el glicerol acumulado respecto a la silvestre (Fig. 16A). Es importante mencionar que en condiciones iso-osmóticas las mutantes del sistema de fosforelevo no presentan acumulación de glicerol tal como sucede en las mutantes de *S. cerevisiae*, esto último concuerda con la falta de fosforilación constitutiva de KlHog1 en  $\Delta Klsln1$  y  $\Delta Klypd1$ . Por otro lado, la cepa silvestre de *S. cerevisiae* acumula entre 18 y 20 veces más glicerol en condiciones de estrés hiperosmótico en comparación con las condiciones iso-osmóticas. La cepa  $\Delta Schog1$  no produce glicerol en condiciones de estrés, mientras que la mutante con el alelo Scsln1<sup>ts</sup> a temperatura restrictiva (37°C) acumula tanto glicerol como la cepa silvestre, (Fig. 16B). Al realizar una comparación entre las cepas silvestres de ambas levaduras, podemos notar como *K. lactis* acumula diez veces menos glicerol que la cepa silvestre de *S. cerevisiae* luego del estrés hiperosmótico (Fig. 16C).



**Fig. 16 Comparación de la producción de glicerol entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*.** La levadura *S. cerevisiae* acumula mucho glicerol en consecuencia del estrés hiperosmótico, así mismo la activación constitutiva de ScHog1 en la cepa *Scsln1<sup>ts</sup>* ocasiona una excesiva producción de glicerol en condiciones iso-osmóticas, contrario a lo que sucede en *K. lactis* que no acumula glicerol. El contenido de glicerol se determinó según se indica en métodos, las cepas que se emplearon se muestran en la parte inferior de cada gráfico así como si fueron tratadas o no con 0.4 M KCl. **(A)** Cuantificación de glicerol para *K. lactis* **(B)** Cuantificación de glicerol en cepas de *S. cerevisiae* **(C)** Comparación del contenido de glicerol acumulado en las cepas silvestres entre ambas levaduras.

Los resultados sugieren que la cantidad de glicerol acumulado en *K. lactis* es suficiente para proteger a las células contra el estrés hiperosmótico o que esta levadura utiliza otro osmolito como principal protector celular. Se ha reportado que la trehalosa puede usarse como osmolito en ciertas condiciones y en algunas especies de levaduras (Hounsa *et al.*, 1998), por lo que decidimos medir la cantidad de trehalosa que se acumula en condiciones de estrés hiperosmótico en *K. lactis*. Para el ensayo se probaron únicamente las cepas silvestres y las mutantes que carecen de Hog1 en ambas levaduras. Los resultados obtenidos en la cepa silvestre muestran que las células de *K. lactis* no acumulan trehalosa, en cambio, detectamos que después de exponerlas al estrés hiperosmótico la

concentración de trehalosa disminuye un 50% (Tabla 6). Se observó el mismo fenómeno y en proporciones muy similares en la cepa  $\Delta KIHog1$ , lo que indica que en *K. lactis* KIHog1 no tiene un papel significativo en la producción de trehalosa. Por el contrario, en la cepa silvestre de *S. cerevisiae* la trehalosa aumenta 15 veces con el estrés hiperosmótico, dicho incremento es dependiente de ScHog1, ya que en la cepa  $\Delta Schog1$  no se observa este fenómeno (Tabla 6).

**Tabla 6. Comparación de producción de trehalosa entre *K. lactis* y *S. cerevisiae*.**

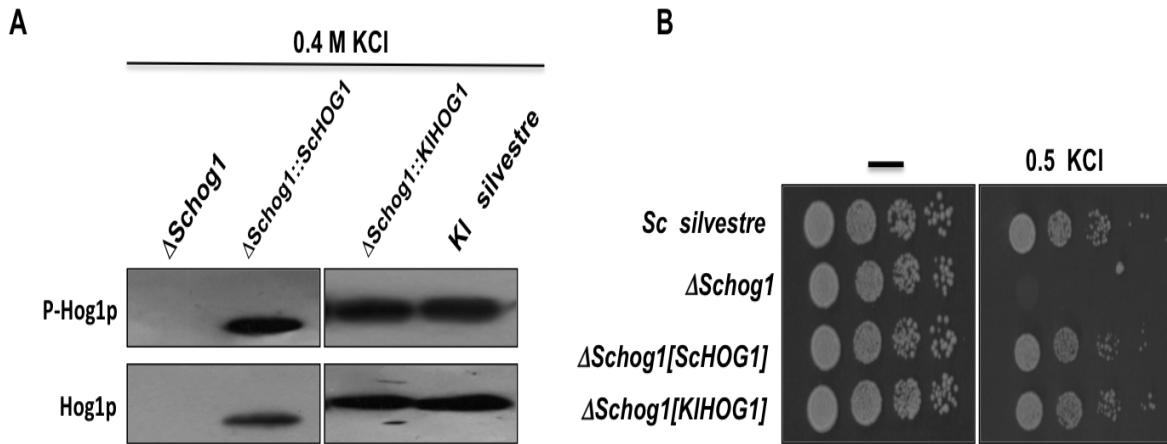
		–	NaCl
<b><i>K. lactis</i></b>	Silvestre	0.54 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.05
	$\Delta hog1$	0.63 $\pm$ 0.07	0.28 $\pm$ 0.05
<b><i>S. cerevisiae</i></b>	Silvestre	0.20 $\pm$ 0.03	3.02 $\pm$ 0.09
	$\Delta hog1$	0.32 $\pm$ 0.05	0.27 $\pm$ 0.08

Valores promedio de tres experimentos independientes ( $\pm$  DS). La concentración de trehalosa se da en [mg / g de peso seco]. El tratamiento con NaCl fue de 6h con 0.4 M.

### **KIHog1p COMPLEMENTA LA AUSENCIA DE ScHog1p EN *S. cerevisiae***

Para comprender un poco los resultados diferenciales en la inactivación del sistema de fosforrelevo en *K. lactis* decidimos estudiar un poco más a KIHog1. Para ello, probamos si KIHog1 podía sustituir a ScHog1 en *S. cerevisiae*, fosforándose en respuesta a estrés hiperósmótico. Se transformó la cepa  $\Delta Schog1$  con la construcción pYES2-KIHOG1 y se hicieron tratamientos con 0.4 M de KCl. Encontramos que después de 5 minutos de tratamiento hiperosmótico, KIHog1 se fosforila en *S. cerevisiae* y además lo hace a un nivel muy similar al de ScHog1 (Fig. 17A). Además, se realizaron ensayos en placa para comparar el crecimiento de la cepa  $\Delta Schog1$  que expresa KIHog1. Observamos que cuando se expresa la proteína KIHog1, la cepa recupera la capacidad de crecer en condiciones de estrés hiperosmótico (Fig. 17B). Se estudió también la expresión de ScHog1 en la misma cepa bajo las mismas características y se observó que KIHog1 revierte la sensibilidad al

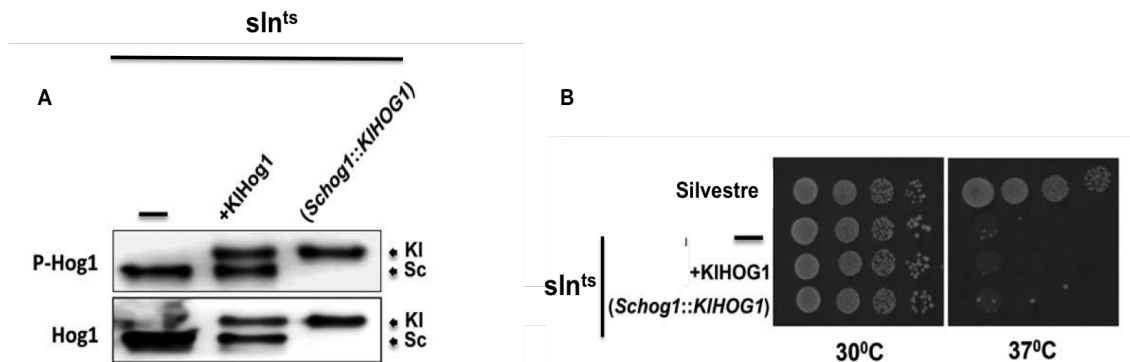
estrés al mismo nivel que lo hace ScHog1. Estos datos estarían indicando que KIHog1 puede acoplarse eficientemente a la vía de HOG de *S. cerevisiae*.



**Fig. 17 Expresión de KIHog1 en *S. cerevisiae*.** KIHog1 rescata la sensibilidad a estrés hiperosmótico de la mutante  $\Delta$ Schog1 y se fosforila adecuadamente. La cepa  $\Delta$ Schog1 se transformo con los plásmidos pYES2-KIHog1 y pYES2-ScHog1. Para permitir la expresión de ambas proteínas, las cepas se crecieron en medio SGal por cuatro horas. Para los ensayos en placa se realizaron diluciones seriales. **(A)** Fosforilación de ScHog1 en condiciones de estrés hiperosmótico, se utilizó un extracto de la cepa silvestre de *K. lactis* como control por la diferencia de peso entre las proteínas. ScHog1 pesa 48.8 KDa y KIHog1 pesa 52 KDa **(B)** Ensayos en placa de las cepas en medio YPD y medio YPD con 0.5 M de KCl, las placas se incubaron por 48 hrs. se utilizó la cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY4742 y la  $\Delta$ Schog1 como controles.

También nos interesó probar qué sucedía al expresar KIHog1 en ausencia de estrés en las células de *S. cerevisiae* cuando se inactiva el sistema de fosforelevo, para lo cual expresamos KIHog1 en la cepa que tiene el alelo termosensible ScSln1<sup>ts</sup>. Se probó el efecto de un incremento de la temperatura (37°C) para inactivar a ScSln1. Aprovechamos la diferencia de tamaño entre KIHog1 y ScHog1 para poderlas distinguir en el mismo gel. Al crecer las células a 37°C se puede observar que ambas proteínas se fosforilan al mismo nivel (**Fig. 18A**). También se analizó el crecimiento en placa de estas cepas, en donde observamos que las cepas ScSln1<sup>ts</sup> y ScSln1<sup>ts</sup>[pYES2-KIHOG1] son incapaces de crecer a 37°C, esto se debe muy probablemente a la actividad constitutiva de ScHog1 endógeno

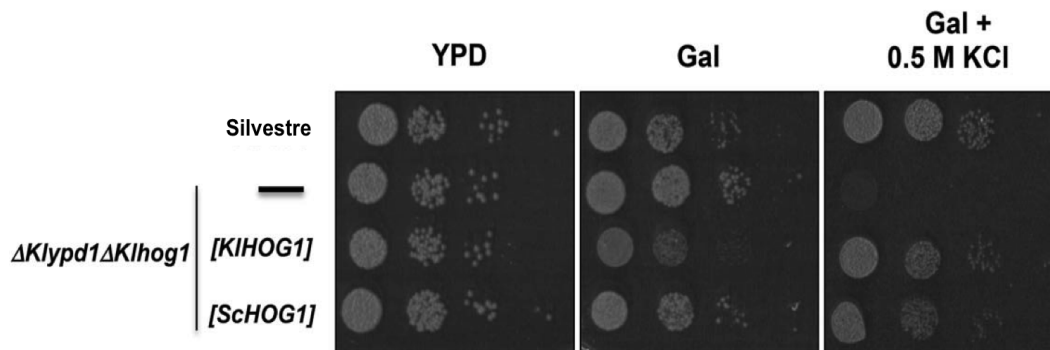
(Fig. 18B). Dado estos resultados se decidió integrar el gen *KIHog1* en el locus *ScHog1* [*Schog1::KIHOG1*], garantizando que el efecto de crecimiento en la cepa fuese únicamente de *KIHog1* y además que su expresión esté regulada por el promotor de *ScHog1*. En estas condiciones se observó que al crecer la cepa *Sln1<sup>ts</sup>* [ $\Delta$ *Schog1::KIHOG1*] a 37°C se induce la fosforilación de *KIHog1* (Fig. 18A) así como la letalidad de la cepa (Fig. 18B). Los resultados mostrados en las figuras 16 y 17 indican que *KIHog1* de *K. lactis* puede remplazar a *ScHog1* en términos de su capacidad para responder al estrés hiperosmótico, así como en la capacidad de inducir la letalidad celular cuando se inactiva el fosforrelevo.



**Fig. 18 Expresión de *KIHog1* en la cepa *Sln1-ts*.** La proteína *KIHog1* es capaz de fosforilarse constitutivamente y generar un fenotipo de letalidad cuando el sistema de fosforelevo se inactiva en *S. cerevisiae*. La cepa *Sln1-ts* se transformó por un lado con el plásmido *pYES2-KIHog1* y con la construcción *KIHOG1::Higromicina* tal como se menciona en métodos. Para la expresión de *KIHog1* a partir del plásmido se creció la cepa en medio *SGal* por tres horas a 30°C y a continuación se crecieron otras tres horas a 37°C. La cepa silvestre indicada fue la *TM141*, el guión indica que la cepa contiene el plásmido vacío. Para el crecimiento en placa se realizaron diluciones seriales. **(A)** Fosforilación de *KIHog1* en la cepa *Sln1-ts*, las cepas mostradas se crecieron a 37°C para inactivar el sistema de fosforrelevo. Se observa fosforilación tanto de *ScHog1* como de *KIHog1* en el carril +*KIHog1*, del lado derecho. Se marca la banda que corresponde para *Kl* así como la que corresponde para *Sc*. Al realizar la integración de *KIHog1* se aprecia la fosforilación constitutiva de la misma. **(B)** Comparación del crecimiento en placa a 30°C y a 37°C. Las cepas se indican del lado izquierdo.

## ScHog1 NO GENERA LETALIDAD CELULAR Y COMPLEMENTA LA AUSENCIA DE KIHog1 EN *K. lactis*

Finalmente nos preguntamos si ScHog1 sería capaz de inducir letalidad celular en *K. lactis* en alguna de las cepas que tiene inactivo el sistema de fosforrelevo. Para lo cual utilizamos la cepa  $\Delta Klypd1\Delta Klhog1$ . Cuando se sobre expresan las proteínas KIHog1 y ScHog1, ambas son capaces de revertir la sensibilidad al estrés hiperosmótico que tiene dicha cepa (Fig. 19). Aunque se observó que KIHog1 afecta ligeramente el crecimiento de la cepa en condiciones iso-osmóticas. Esto pudiera deberse a un efecto de la sobreexpresión de la proteína. Por otro lado, ScHog1 no afectó el crecimiento de la cepa en condiciones iso-osmóticas (Fig. 19). Lo que indica que ScHog1 no induce letalidad en *K. lactis* cuando se inactiva el sistema de fosforrelevo.



**Fig. 19. Expresión de ScHog1 en *K. lactis*.** La proteína ScHog1 no induce letalidad en *K. lactis* tras la inactivación del sistema de fosforelevo. La cepa  $\Delta Klypd1\Delta Klhog1$  se transformó con los plásmidos YEpKDGal, YEpKDGal-ScHog1 y YEpKDGal-KIHog1. Se realizaron diluciones seriales para evaluar el crecimiento en placa. Se utilizaron tres distintos medios: YPD, YPGal y YPGal+0.5 M de KCl. La cepa silvestre empleada de control fue la MD 2/1.

## DISCUSIÓN

---

*Saccharomyces cerevisiae* se ha considerado un organismo modelo para estudiar señalización celular y en específico la vía de respuesta a estrés osmótico. Como hemos indicado en la introducción, los estudios previos han demostrado que el sistema de fosforrelevo Sln1 tiene un papel negativo sobre la vía de HOG y que además al eliminar cualquiera de los genes *SLN1* o *YPD1* las células mueren debido a una sobreactivación de Hog1 ocasionada por su fosforilación constitutiva (Posas *et al.* 1999 & Hohmann 2000). La levadura que hemos estudiado en este trabajo es *Kluyveromyces lactis* y aunque es un pariente cercano de *S. cerevisiae* tiene la particularidad de que divergió antes de la duplicación del genoma de esta última. El genoma de *K. lactis* codifica para la mayoría de los genes necesarios para la respuesta a estrés hiperosmótico, exceptuando el gen para la MAPKKK redundante *SSK22* (Krantz *et al.* 2006). Además, la similitud estructural entre las proteínas de *K. lactis* y *S. cerevisiae* es alta, lo que podría sugerir una arquitectura y mecanismos de respuesta a estrés hiperosmótico similares entre ambas levaduras. Aunque en estudios previos realizados en nuestro laboratorio se han observado algunas diferencias notables al estudiar la rama de SHO1, se demostró que las mutantes sencillas  $\Delta Klste11$  y  $\Delta Klste50$  son incapaces de crecer en condiciones de estrés hiperosmótico, pese a que se encuentre la rama de SLN1. Se encontró que las mutantes  $\Delta Klsho1\Delta Klssk2$  y  $\Delta Klste11$  son incapaces de responder y adaptarse al estrés hiperosmótico aun cuando KlHog1 se fosforila y se internaliza en el núcleo en respuesta al estrés (Velázquez *et al.*, 2015). Los datos obtenidos en este trabajo respecto al papel que tiene el sistema de fosforrelevo en la respuesta a estrés hiperosmótico de *K. lactis* arrojan datos muy interesantes. Por ejemplo, la delección de los genes *KISLN1* y *KIYPD1* ocasiona células viables e insensibles al estrés hiperosmótico (Fig. 20C). Estos datos concuerdan con los fenotipos mostrados en las levaduras *S. pombe* y *C. albicans* (Nakamichi *et al.*, 2002 & Yamada-Okabe *et al.*, 1999), para los cuales la inactivación de la cinasa de histidina y de la proteína de fosfotransferencia no afectan la viabilidad celular. La explicación podría ser que en ambas levaduras existe más de una cinasa de histidina. Por otro lado, la

eliminación del regulador de la respuesta KISsk1 no afecta aparentemente la respuesta al estrés.

Sorprendentemente, en las mutantes del sistema de fosforrelevo de *K. lactis*, KIHog1 se fosforila de manera similar a la cepa silvestre, que se fosforila sólo en condiciones de estrés hiperosmótico, mientras que en condiciones iso-osmóticas no se observa fosforilación. Esto es opuesto a lo que sucede en *S. cerevisiae* donde la delección de *ScSLN1* o *ScYPD1* genera fosforilación constitutiva de ScHog1 (Saito & Posas 2012). Los resultados plantean dos posibilidades: una es que el sistema de fosforrelevo de *K. lactis* no tenga participación en la respuesta al estrés hiperosmótico o bien que tiene un papel diferente al descrito en *S. cerevisiae*. La primera hipótesis fue descartada al analizar la doble mutante  $\Delta Klsln1\Delta Klsho1$  y descubrir que es altamente osmosensible comparada con las cepas sencillas  $\Delta Klsho1$  y  $\Delta Klsln1$ , lo que indica que ambas ramas participan en paralelo en la adaptación al estrés hiperosmótico. Es de notarse que contrario a lo que se esperaba, KIHog1 se fosforila en la mutante  $\Delta Klsln1\Delta Klsho1$  en condiciones de estrés hiperosmótico, sin embargo KIHog1 fosforilado en estas condiciones no induce protección ni adaptación al estrés hiperosmótico. La fosforilación de KIHog1 en dobles mutantes de *K. lactis* también se ha observado en otros estudios (Velázquez *et al.*, 2015). Así mismo, se sabe que en *S. cerevisiae* la cepa  $\Delta ScsSk1\Delta Scste11$  es incapaz de crecer en condiciones de alta osmolaridad aunque ScHog1 se fosforila y entra al núcleo, pero es incapaz de asociarse a la cromatina y tampoco puede activar la transcripción de los genes relacionado al estrés hiperosmótico (Vázquez *et al.* 2018).

Para analizar la segunda hipótesis se realizaron diversos experimentos entre ellos se analizó la conexión entre el sistema de fosforrelevo y el módulo de MAP cinasas. En *S. cerevisiae* se sabe que la sustitución del aspartato 554 por alanina impide que ScSsk1 reciba el fosfato de ScYpd1 (Posas *et al.* 1996) y se ha visto que esta forma de la proteína es capaz de interactuar con la MAPKKK ScSsk2 (Posas and Saito 1998). El ensayo de interacción por doble híbrido nos permitió determinar que la forma no fosforilable KISsk1<sup>DA</sup> interacciona más eficientemente con KISsk2.



Los experimentos de fosfotransferencia *in vitro* demostraron que este sistema es funcional y que en efecto se trata de la transferencia de un fosfato entre His-Asp-His-Asp. En *S. cerevisiae*, el sistema de fosforrelevo se encuentra activo en condiciones osmóticas normales y se apaga al presentarse el estrés hiperosmótico, lo que implica que el sistema regula negativamente la vía de HOG (Saito & Posas 2012). En *K. lactis* los ensayos de fosforilación *in vivo* mostraron que el sistema de fosforrelevo se encuentra activo en condiciones iso-osmóticas y se apaga en condiciones de estrés, lo cual indica que en *K. lactis* el sistema de fosforrelevo también tiene un papel negativo sobre la vía de HOG (Fig. 20A y B). La ausencia de fosfotransferencia en las mutantes  $\Delta Klsln1$  y  $\Delta Klypd1$  no inducen la activación constitutiva de KIHog1. Incluso al eliminar la fosfatasa KIPtp2, en la mutante  $\Delta Klsln1$  tampoco se induce una fosforilación constitutiva de KIHog1. Estos hallazgos indican que probablemente exista otra forma de regular a KIHog1. Sería interesante estudiar la regulación de KIHog1 por componentes río arriba en la cascada de señalización (Fig. 20C).

Nuestros datos mostraron que *K. lactis* acumula 10 veces menos glicerol respecto a lo que acumula *S. cerevisiae* en condiciones de estrés hiperosmótico. También se observó que *S. cerevisiae* acumula glicerol de manera constitutiva al eliminar ScSln1, inclusive en condiciones iso-osmóticas, lo cual implica que en aquellas mutantes que carecen del sistema de fosforrelevo la activación constitutiva de ScHog1 conduce a la producción y acumulación de glicerol (Maeda *et al.*, 1994). Sin embargo, en *K. lactis* este fenómeno no se observa en las cepas  $\Delta Klsln1$  y  $\Delta Klypd1$ , ya que acumulan glicerol de manera muy similar a la cepa silvestre. Esto último correlaciona con el hecho de que no exista fosforilación constitutiva de KIHog1 en dichas mutantes y que por lo tanto sean viables.

Por otro lado, al comparar la cantidad de glicerol que acumulan ambas especies. Se observó que en *S. cerevisiae* la mutante  $\Delta Schog1$  acumula diez veces menos que la cepa silvestre, mientras que en *K. lactis* la cepa  $\Delta Klhog1$  acumula la mitad de glicerol respecto a su cepa silvestre.

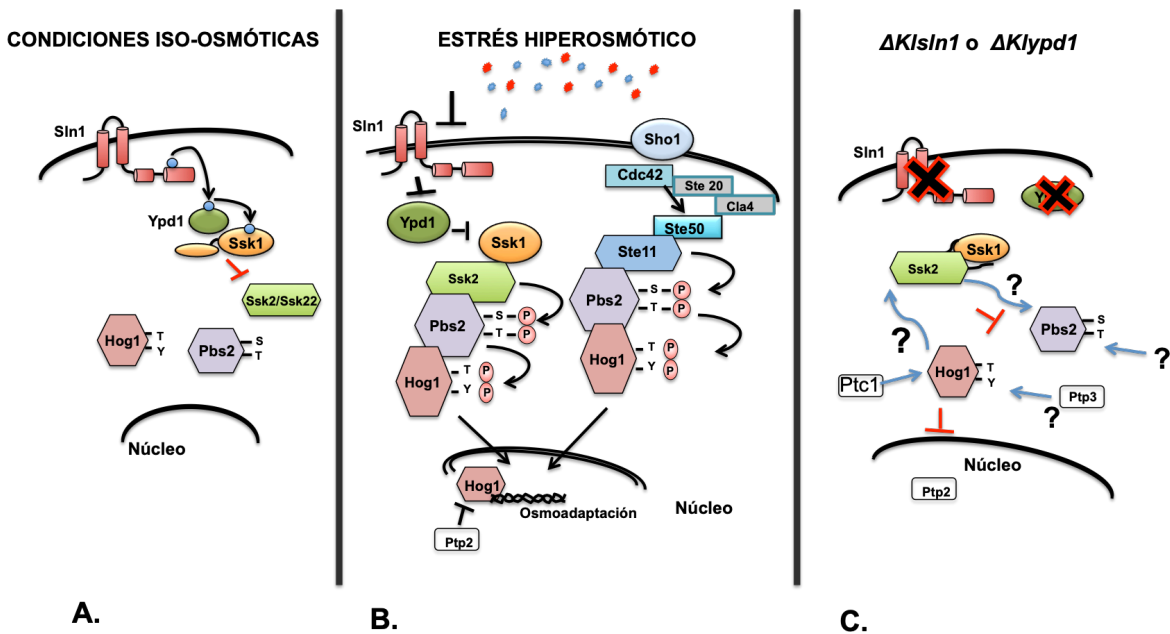
Aunque en ambas levaduras el estrés hiperosmótico ocasiona la acumulación de glicerol, resulta llamativo que en *K. lactis* dicha acumulación es mucho menor. Quizá en *K. lactis* el glicerol producido sea suficiente para generar una osmoprotección, o bien, esta especie utiliza otros osmolitos para contrarrestar el estrés hiperosmótico. En otras especies de levadura se ha reportado que la trehalosa puede ser usada como un osmolito compatible (Parrou et al. 1997). Se ha documentado que ésta se acumula en condiciones de estrés calórico, estrés por frío, o estrés hídrico, entre otros tipos de estrés (Argüelles, 2000 & Sampedro and Uribe, 2004). Sin embargo, en *K. lactis* sin embargo, encontramos que no hay un aumento significativo en la cantidad de trehalosa después de un choque hiperosmótico, tanto en la mutante de KIHog1 como en la cepa silvestre. Una manera de extender las observaciones sobre la importancia del glicerol y de la trehalosa en la protección al estrés hiperosmótico sería con la construcción de mutantes en las cuales se afecte la síntesis y transporte de ambos osmolitos. Por ejemplo, se puede inactivar a la trehalosa 6-fosfonato sintasa (Tps1) y la trehalasa neutra (Nth1) para el caso de la síntesis de trehalosa y a la glicerol-3 fosfato deshidrogenasa (Gpd1) que participa en la síntesis de glicerol (Parrou et al., 1997 & Albertyn et al., 1994).

En este estudio hemos demostrado que KIHog1 es capaz de complementar y permitir el crecimiento de las células en condiciones de estrés hiperosmótico en una cepa  $\Delta$ Schog1 de *S. cerevisiae*. Sorprendentemente, KIHog1 se fosforiló constitutivamente induciendo letalidad al expresarse en células de *S. cerevisiae* donde se apaga el sistema de fosforrelevo. Por otro lado los experimentos de expresión de ScHog1 en *K. lactis* mostraron que de igual manera esta proteína es capaz de acoplarse y sustituir a KIHog1. Además, ScHog1 no afectó el crecimiento de la cepa  $\Delta$ Klypd1 $\Delta$ Klhog1. Es decir, ScHog1 no induce letalidad en *K. lactis* al inactivar el sistema de fosforrelevo. Estos datos dejan claro que las proteínas tienen la misma función y que son intercambiables, sin embargo no explican el por qué en *K. lactis* la eliminación del sistema de fosforrelevo no ocasiona letalidad celular. Uno de los aspectos que podrían explicar dicho fenómeno podría ser la existencia de algún mecanismo de retroalimentación negativa sobre la vía de respuesta a

estrés hiperosmótico en *K. lactis*. Dicho mecanismo podría ser lo suficientemente eficiente como para ocasionar la inactivación de KlHog1 aún en condiciones donde el sistema de fosforrelevo se encuentra inactivo. En diversos estudios realizados en *S. cerevisiae* se ha reportado la existencia de una retroalimentación negativa sobre ScHog1 a distintos niveles. El más importante es por la acumulación de glicerol, que permite una disminución del estrés hiperosmótico; en este sentido la síntesis de glicerol y el cierre del canal Fps1 (una proteína encargada de la entrada y salida de glicerol) permiten la acumulación del glicerol intracelular lo que regula negativamente la vía (Dihazi *et al.*, 2004). De manera interesante se ha propuesto que la síntesis de glicerol dependiente de la actividad de Hog1 está mediada por la disponibilidad de glucosa en las células (Sharifian *et al.*, 2015). Es probable que en *K. lactis* el principal mecanismo de retroalimentación no sea la acumulación de glicerol, ya que la concentración de este osmolito en esta especie no es alta. Otro mecanismo de retroalimentación negativa descrito en *S. cerevisiae* se da por la acción de fosfatasa que actúan sobre los residuos treonina 174 y tirosina 176 de ScHog1. Se sabe que la fosfatasa Ptc1 de la familia de las fosfatasas serina/treonina, desfosforila el residuo treonina 174 de ScHog1 en el citoplasma, y la fosfatasa nuclear Ptp2 desfosforila a la tirosina 176 (Warmka *et al.*, 2001). En *K. lactis*, al inactivar el gen para la fosfatasa KlPtp2, en la mutante  $\Delta KlSn1$  no se modifica ni el crecimiento de las células ni la fosforilación de KlHog1, por lo que no se puede atribuir a esta proteína un papel importante en el mecanismo de retroalimentación negativa. Sería adecuado estudiar también el papel de la fosfatasa KlPtc1 y analizar la posible contribución de ambas en la retroalimentación negativa en *K. lactis*. Un tercer mecanismo de retroalimentación negativo descrito en *S. cerevisiae* es la fosforilación de ScHog1 dependiente de elementos que se encuentran río arriba. Se sabe que ScHog1 fosforila directamente a ScSho1 en un residuo de serina y a ScSte50 en varios residuos de serina y treonina (Haoet *al.*, 2008). Estas fosforilaciones están relacionadas con el tiempo que ScHog1 permanece activo (Yamamoto *et al.*, 2010; Macia *et al.*, 2009). Recientemente se ha descrito la existencia de un bucle de retroalimentación dependiente de ScHog1 dirigido principalmente a ScSsk2, aunque también se ha detectado fosforilación sobre ScSn1 y

ScSsk1. La fosforilación de ScSsk2 por ScHog1 sucede principalmente en residuos de serina de la región N-terminal, que es justo la región de interacción con ScSsk1 (Sharifian *et al.*, 2015). También se sabe que al eliminarse dicha región en ScSsk2, se genera letalidad celular (Tatebayashi *et al.*, 2003). No sabemos hasta este momento, si KISsk2 es blanco de fosforilación de KIHog1 en *K. lactis*, ni qué efecto podría tener la eliminación del extremo amino terminal en esta proteína, por lo que no podríamos descartar que éste sea un mecanismo importante de retroalimentación negativa en esta especie. Aunque no lo hemos demostrado, la interpretación actual es que la inactivación del sistema de fosforrelevo en *K. lactis* no induce la activación constitutiva de KIHog1 y por consiguiente tampoco induce letalidad, debido a la existencia de un fuerte control de retroalimentación negativa que de alguna manera inactiva a KIHog1 en esta especie.

Por último es importante mencionar que en *S. cerevisiae* se ha demostrado que existe una señalización basal de la vía de HOG que depende de la rama de SLN1, la cual permite una respuesta más rápida y eficiente al estrés hiperosmótico, aunque se desconoce cómo es que sucede exactamente y cómo se regula (Macia *et al.*, 2009). Quizá la rama de SLN1, y en específico el sistema de fosforrelevo, tengan un papel similar en *K. lactis* y la señalización basal esté directamente relacionada con el papel regulatorio que el sistema de fosforrelevo tiene sobre la vía de HOG. Nuestros datos indican que a pesar de la alta conservación en los componentes y en la arquitectura, la vía de respuesta a estrés hiperosmótico de *K. lactis* opera bajo diferentes mecanismos de regulación (Fig. 20C).



**Fig. 20. Sistema de fosforelevo en respuesta a estrés hiperosmótico de *K. lactis*.** **A.** Condiciones iso-osmóticas el sistema de fosforrelevo se encuentra activo, Ssk1 fosforilada no interacciona con su blanco Ssk2 (MAPKKK's) por lo que la rama de SLN1 se encuentra apagada, KIHog1 se encuentra inactivo. **B.** Condiciones de estrés hiperosmótico. KIYPd1 se pierde fosforilación; el sistema de fosforrelevo esta inactivo. La forma desfosforilada de KISsk1 interacciona con KISsk2 y entonces KIHog1 puede desatar la osmoadaptación. La rama de Sho1 se activa bajo estas condiciones. **C.** Mutantes  $\Delta Klsln1$  o  $\Delta Klypd1$ . Al eliminar alguno de los componentes del sistema de fosforrelevo en *K. lactis* no genera letalidad por sobre activación de KIHog1, pese a que KISsk1 se encuentra desfosforilada. Las posibles vías de regulación de Klog1 podrían ser: las proteínas Ptp3 y Ptc1 que son fosfatasa que en *S. cerevisiae* regulan negativamente a Hog1, KISsk2 y KIPbs2 podrían ser blancos de fosforilación de la misma KIHog1 y por ultimo el papel que KISsk2 tiene sobre KIPbs2 no es claro, quizá este pueda ser otro mecanismo de retroalimentación sobre KIHog1.

## CONCLUSIONES

---

- En este estudio demostramos que en la levadura *Kluyveromyces lactis*, el sistema de fosforrelevo está compuesto por KISln1-KIYpd1-KISsk1 y que la ausencia de sus componentes no genera activación constitutiva de Hog1 y, por tanto, las células son viables.
- El sistema de fosforrelevo de *K. lactis* participa en la respuesta a estrés hiperosmótico.
- El sistema de fosforrelevo de *K. lactis* presenta actividad de fosfotransferencia tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*.
- El sistema de fosforrelevo de *K. lactis* regula negativamente la vía de HOG.
- *K. lactis* produce cantidades limitadas de glicerol y trehalosa en respuesta al estrés hiperosmótico y una buena proporción es independiente de KIHog1.
- La fosfatasa KIPtp2 no participa en la atenuación de la actividad de Hog1 en las mutantes que carecen del sistema de fosforrelevo.
- KIHog1 es capaz de sustituir de manera eficiente a ScHog1 en *S. cerevisiae*, inclusive induce letalidad en las cepas de *S. cerevisiae* carentes del sistema de fosfotransferencia.
- De manera equivalente, ScHog1 es capaz de complementar a una cepa de *K. lactis* carente de Hog1 durante el estrés hiperosmótico y no es capaz de inducir letalidad en las mutantes que carecen del sistema de fosforrelevo.

## PERSPECTIVAS

---

Como hemos mencionado en la discusión, resulta muy interesante estudiar el papel que pueda tener una retroalimentación negativa sobre KIHog1 que nos aporte información acerca de la viabilidad en las cepas que carecen del sistema de fosforrelevo. En ese sentido, podríamos estudiar diversos aspectos que enlistamos a continuación:

- Eliminar la fosfatasa Ptc1 y Ptp3 en mutantes  $\Delta Klypd1$  o  $\Delta Klsln1$  y analizar el crecimiento celular y la fosforilación de KIHog1.
- Estudiar a KISsk2 mediante ensayos de fosforilación dependiente de KIHog1 y la elaboración de construcciones donde se elimine la región N-terminal para observar si se afecta el crecimiento y la fosforilación de KIHog1.
- Realizar ensayos de fosforilación dependiente de KIHog1 sobre otros posibles blancos como KISln1, KIYpd1 y KISsk1.
- Estudiar el papel que pueden tener algunas enzimas involucradas en la síntesis o acumulación de glicerol y de trehalosa, tales como la trehalosa 6-fosfato sintasa (Tps1), la trehalasa neutra (Nth1) y la glicerol-3fosfato deshidrogenasa (Gpd1).
- Eliminar el gen que codifica para el transportador de glicerol KIFps1 y estudiar su papel en las mutantes que carecen del sistema de fosforrelevo.

## REFERENCIAS

---

Adams A., Gottschling D. E., Kaiser C. A., and Stearns T. (1997). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 177pp.

Ausubel F. M., Brent R., Kingston R. E., Moore D. D., Seidman J. G., Smith J. A., and Struhl K. (1996). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons. Nueva York. 456 pp.

Alvarez A., and Georgellis D. (2010). In vitro and in vivo analysis of the ArcB/A redox signalling pathway. *Methods in Enzymology*. 471: 205-228.

Argüelles J.C. (2000). Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: comparative analysis. *Arch Microbiol* 174: 217–224.

Aoyama K., Aiba H. and Mizuno T. (2001). Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65: 2347-2352.

Bergmeyer H.U. (1984). *Methods of Enzymatic Analysis: Metabolites 1: Carbohydrates*. Wiley-Blackwell USA, p. 701.

Campbell I. (1987). *Brewing Microbiology*. Edited by F.G. Priest and I. Campbell. Elsevier Applied Science. England. Cap. 1 "Systematics of yeast" 1-47.

Calera JA and Calderone R. (1999). Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative CaHK1 two component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiology* 145: 1431–1442.

Calera J.A., Herman D. and Calderone R. (2000). Identification of YPD1, a gene of *Candida albicans* which encodes a two component phosphohistidine intermediate protein. *Yeast* 16: 1053–1059.

Chauhan N., Inglis D., Roman E., Pla J., Li D., Calera J.A. and Calderone R. (2003). *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell* 2: 1018–1024.

de Nadal E., Alepuz P.M. and Posas F. (2002). Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep.* Aug;3(8):735-40. Review.



Dickinson J.R. and Schweizer M. (2004). *The Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces cerevisiae*. Segunda edición. CRC Press. 459 pp.

Downward J. (2000). The ins and outs of signalling. *Nature* 411: 759-62.

Georgellis D., Lynch S.A. and Lin E.C. (1997). In vitro phosphorylation study of two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179: 5429-5435

Hao N., Behar M., Parnell S. C., Torres M. P. and Borchers C. H. (2007). A systems biology analysis of feedback inhibition in the Sho1 osmotic-stress-response pathway. *Curr. Biol.* 17: 659–667.

He X.J., Mulford K.E., and Fassler J.S. (2009). Oxidative stress function of the *Saccharomyces cerevisiae* Skn7 receiver domain. *Eukaryot. Cell* 8, 768–778.

Hoffman C. S. and Winston F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* 57 (2-3):267-272.

Hohmann S., (2002). Osmotic stress signalling and osmoadaptation in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*, Jun; 66(2); 300-72.

Hounsa, C., Brandt, E., Thevelein, J., Hohmann, S. and Prior, B. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* 144: 671–680.

Horie T., Tatebayashi K., Yamada R. and Saito H. (2008). Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol Cell Biol* **28**, 5172-5183.

Jiménez L. F., (2003). Capítulo 7, Transducción de Señales. *Biología celular y molecular*. Editorial PEARSON.

Johnson E. and Echavarrri C. (2011). Chapter 3. The Yeast Biotechnology. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier. 8.2.2  $\beta$ -Galactosidase

Jones E.W., Pringue J.R., and Broach J.R. (1992). *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*, gene expression. Cold Spring Harbor Laboratory Press Nueva York. 810 pp.

Kawasaki L., Castañeda M., Sánchez-Paredes E, Velázquez-Zavala N., Torres-Quiroz F., Ongay-Larios L., Coria R. (2007). Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryotic Cell*, Jan; 7(1):78-85.

Krantz M., Becit E. and Hohmann S. (2006). Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet*, Mar; 49: 137-51.

Macia J., Regot S., Peeters T., Conde N, Solé R. and Posas F. (2009). Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Sci Signal*. Mar 24; 2(63): 13.

Maeda T., Wurgler-Murphy S. and Saito H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369:242-245.

Nasim A., Young P., and Johnson B.F. (1989). *Molecular Biology of the Fission Yeast*. Academic Press Inc. California. 469 pp.

Ostrander D. B., and J. A. Gorman. (1999). The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *J. Bacteriol*. 181:527–2534.

Pawson T. (1995). Protein modules and signalling networks. *Nature* 373: 573-80.

Posas F., Wurgler-Murphy S., Maeda T., Witten A., Cam Thai T. and Saito H. (1996). Yeast HOG1 MAP Kinase Cascade Is Regulated by a Multistep Phosphorelay Mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 “Two-Component” Osmosensor. *Cell*; 86: 865-75.

Posas F., and Saito H. (1998). Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *The EMBO Journal* 17:1385-1384

Posas F. and Saito H. (1997). Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*. Jun 13;276(5319):1702-5.

Posas F., Witten E.A. and Saito H. (1998). Requirement of STE50 for osmostress-induced activation of the STE11 mitogen-activated protein kinase kinase kinase in the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol*. Oct;18(10):5788-96.

Reiser V., Raitt D.C. and Saito H. (2003). Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* 161, 1035-1040.

Reiser V., Ruis Helmut and 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*. *Molecular Biology of the cell*. Vol. 10, 1147-1161.

Rep M., Krantz M., Thevelein J. M. and 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 similarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol. Chem.* 275 (12): 8290-300.

Rodríguez-Escudero I., Roelants F.M., Thorner J., Nombela C., Molina M. and Cid V.J. (2005). Reconstitution of the mammalian PI3K/PTEN/Akt pathway in yeast. *Biochem J.* 390:613-23.

Rodríguez-Peña J.M., García R., Nombela C. and Arroyo J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast.* Aug; 27(8):495-502. Review.

Saito H., (2001). Histamine Phosphorylation and Two-Component Signaling in Eukaryotic Cells. *Chem. Rev;* 101: 2497-2509

Saito H. (2010). Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr Opin Microbiol.* Dec; 13(6):677-83. Epub 2010 Sep 27.

Saito H., and Posas F. (2012). Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192:289-318.

Sambrook J., Fritsch E. F., and Maniatis T. (1989). *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Segunda edición. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. EUA.

Sampedro, J.G., and Uribe, S. (2004). Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* 256/ 257: 319–327.

Schaffrath R. and Breuning K. D. (2000). *Genetics and Molecular Physiology of the Yeast Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genetics and Biology*, 30: 173-190.

Schaller E., Shiu S. and Armitage J. (2011) Two-component system and their co-option for eukaryotic signal transduction. *Current Biology* 21:320-330.

Serrano R. (1996). SALT tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense response. *Int. Rev. of Cyt.* 165: 1-52.

Sharifian H., Lampert F., Stojanovski K., Regot S., Vaga S., Buser R., Lee S.S., Koepl H., Posas F., Pelet S. and Peter M. (2015). Parallel feedback loops control the basal activity of the HOG MAPK signaling cascade *Integr Biol (Camb)* Apr; 7(4):412-22.

Sherman F., Fink G.R. and Hicks J. (1986). *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, NY.

Singh P., Chauhan N., Ghosh A., Dixon F. and Calderone R. (2004). SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* 72: 2390–2394.

Tamas M.J., Rep M., Thevelein J.M. and Hohmann S. (2000). Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett.* Apr 21; 472(1): 159-65.

Tatebayashi K., Takekawa M. and Saito H. (2003). A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J.* 22: 3624–3634.

Tatebayashi K., Yamamoto K., Tanaka K., Tomida T., Maruoka T., Kasukawa E. and Saito H. (2006). Adaptor functions of Cdc42, Ste50, and Sho1 in the yeast osmoregulatory HOG MAPK pathway. *EMBO J.* Jul 12;25(13):3033-44. Epub 2006 Jun 15.

Tao W., Deschesnes R.J. and Fassler J.S. (1999). Intracellular glycerol levels modulate the activity of Sln1p, a *Saccharomyces cerevisiae* two-component regulator. *J. Biol. Chem.* 274:360-367.

Thomason P. and Kay R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. *Journal of Cell Science* 113, 3141-3150.

Vazquez-Ibarra A. Subirana L., Ongay-Larios L., Kawasaki L., Rojas-Ortega E., Rodríguez-González M., de Nadal E., Posas F. and Coria R. (2018). Activation of the Hog1 MAPK by the Ssk2/Ssk22 MAP3Ks, in the absence of the osmosensors, is not sufficient to trigger osmostress adaptation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.* 285(6):1079-1096

Vendrell A., Martínez-Pastor M., González-Novo A., Pascual-Ahuir A., Sinclair D.A., Proft M. and Posas F. (2011). Sir2 histone deacetylase prevents programmed cell death caused by sustained activation of the hog1 stress-activated protein kinase. *EMBO Rep.* 12: 1062-1068

Velázquez-Zavala N., Rodríguez-González M., Navarro-Olmos R., Ongay-Larios L., Kawasaki L., Torres-Quiroz F. and Coria R. (2015). Ineffective phosphorylation of mitogen-activated protein kinase Hog1p in response to high osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* 14: 922-930.

Warmka, J., J. Hanneman, J. Lee, D. Amin, and I. Ota, (2001) Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Mol. Cell. Biol.* 21: 51–60.

Wolfe K. and Shields D. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387: 708-713.

Yamada-Okabe T., Mio T., Ono N., Kashima Y., Matsui M., Arisawa M. and Yamada-Okabe (1999). Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol* 181 (23): 7243-7.

Zarrinpar A., Bhattacharyya R.P., Nittler M.P., Lim W.A. (2004). Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Mol Cell*. Jun 18;14(6):825-32.

Zhou X., Ma Y., Sugiura R., Kobayashi D., Suzuki M., Deng L. and Kuno T. (2010). MAP kinase kinase kinase (MAPKKK)-dependent and -independent activation of Sty1 stress MAPK in fission yeast. *J Biol Chem*. Oct 22; 285(43):32818-23.

---

**APÉNDICE  
ARTÍCULO**

**ROLE OF THE SLN1-PHOSPHORELAY SYSTEM IN THE  
RESPONSE TO HYPEROSMOTIC STRESS IN THE YEAST**

***Kluyveromyces lactis***

Miriam Rodríguez, Laura Kawasaki, Nancy Velázquez, Eunice Domínguez, Abraham Trejo,  
Natalia Martagón, Emilio Espinoza, Araceli Vázquez, Laura Ongay, Dimitris Georgellis,  
Eulália de Nadal, Francesc Posas and Roberto Coria.

2017. Molecular Microbiology

## Role of the Sln1-phosphorelay pathway in the response to hyperosmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*

Miriam Rodríguez-González,<sup>1#</sup> Laura Kawasak,<sup>1#</sup> Nancy Velázquez-Zavala,<sup>1</sup> Eunice Domínguez-Martín,<sup>1</sup> Abraham Trejo-Medecigo,<sup>1</sup> Natalia Martagón,<sup>1</sup> Emilio Espinoza-Simón,<sup>2</sup> Araceli Vázquez-Ibarra,<sup>1</sup> Laura Ongay-Larios,<sup>3</sup> Dimitris Georgellis,<sup>1</sup> Eulàlia de Nadal,<sup>4</sup> Francesc Posas<sup>4</sup> and Roberto Coria<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

<sup>3</sup>Unidad de Biología Molecular, Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México.

<sup>4</sup>Cell Signaling Research Group, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, E-08003, Spain.

### Summary

The *Kluyveromyces lactis* SLN1 phosphorelay system includes the osmosensor histidine kinase Sln1, the phosphotransfer protein Ypd1 and the response regulator Ssk1. Here we show that *K. lactis* has a functional phosphorelay system. *In vitro* assays, using a heterologous histidine kinase, show that the phosphate group is accepted by KLYpd1 and transferred to KISsk1. Upon hyperosmotic stress the phosphorelay is inactivated, KLYpd1 is dephosphorylated in a KISln1 dependent manner, and only the version of KISsk1 that lacks the phosphate group interacts with the MAPKKK KISsk2. Interestingly, inactivation of the KIPt2 phosphatase in a  $\Delta KISln1$  mutant did not lead to KIHog1 constitutive phosphorylation. KIHog1 can replace ScHog1p and activate the hyperosmotic response in *Saccharomyces cerevisiae*, and when ScSln1 is inactivated, KIHog1 becomes phosphorylated and induces cell lethality. All these observations indicate that the phosphorelay

negatively regulates KIHog1. Nevertheless, in the absence of KISln1 or KLYpd1, no constitutive phosphorylation is detected and cells are viable, suggesting that a strong negative feedback that is independent of KIPt2 operates in *K. lactis*. Compared with *S. cerevisiae*, *K. lactis* has only a moderate accumulation of glycerol and fails to produce trehalose under hyperosmotic stress, indicating that regulation of osmolyte production is different in *K. lactis*.

### Introduction

The HOG pathway from *Saccharomyces cerevisiae* consists of two branches (SHO1 and SLN1) that sense osmotic changes in the environment. The Sho1 branch contains one scaffold protein localized to the plasma membrane (Sho1). Sho1 recruits Pbs2 (Maeda *et al.*, 1995; Reiser *et al.*, 2000), which is also a scaffold protein with MAPKK activity (Posas and Saito, 1997). Several other proteins, including Ste11 (MAPKKK), Ste50, Ste20, Cla4 and Cdc42 are needed to activate Pbs2 in the SHO1 branch (Saito and Posas, 2012). The SLN1 branch consists of a phosphorelay system that is analogous to bacterial two-component systems. It is composed of a hybrid histidine sensor kinase, Sln1, an intermediate phosphotransfer protein, Ypd1, and two response regulators, Ssk1 and Skn7. Sln1 is distributed uniformly throughout the plasma membrane. At its N-terminus, Sln1 has two transmembrane segments connected by an extracellular loop (Ostrander and Gorman, 1999). In isosmotic conditions, the kinase domain of Sln1 is catalytically active. It appears that the active form of Sln1 is dimeric (Ostrander and Gorman, 1999), which suggests that activation is promoted by trans-autophosphorylation. The His-P residue of the kinase domain donates the phosphoryl group to an aspartate residue located in the C-terminus receiver domain (Saito and Posas, 2012). The phosphoryl group of Sln-Asp-P is then transferred to the intermediate phosphotransfer protein, Ypd1, which is a cytoplasmic protein that contains a histidine phosphotransfer domain (Hpt). The histidine residue located in the Hpt domain is the acceptor of the phosphoryl group, which in turn is delivered to an aspartate residue of the response regulator. In the cytosol

Accepted 7 March, 2017. \*For correspondence. E-mail: rcoria@ic.unam.mx; Tel. (+52) 55 56 22 56 52; Fax (+52) 55 56 22 56 52. #These authors contributed equally to this work.

and under isosmotic conditions, Ypd1 transfers the phosphoryl group to the response regulator Ssk1. Ssk1 phosphorylation by Ypd1 under isosmotic conditions renders Ssk1 inactive, which indicates that the phosphorelay plays a negative role in the hyperosmotic response (Posas *et al.*, 1996). Under hyperosmotic stress, turgor pressure decreases, inhibiting Sin1 kinase with subsequent dephosphorylation of Ssk1 (Reiser *et al.*, 2003). Unphosphorylated Ssk1 may bind and promote autophosphorylation of the redundant MAPKKs Ssk2 or Ssk22 (Posas and Saito, 1998; Horie *et al.*, 2008). These proteins in turn phosphorylate and activate the scaffold MAPKK Pbs2, which finally phosphorylates and activates MAPK Hog1. Phosphorylated Hog1 is imported into the nucleus, where it regulates transcription and cell cycle progression (Gustin, *et al.*, 1998; Clotet and Posas, 2007; de Nadal and Posas, 2015). Iso-osmotic conditions keep the SLN1 phosphorelay system active and therefore Hog1 remains unphosphorylated. Permanent inactivation of Sin1 and/or Ypd1 induces constitutive Hog1 phosphorylation and ultimately cell lethality through uncontrolled Hog1 activity (Maeda *et al.*, 1994; Vendrell *et al.*, 2011).

The mechanisms to signal stress conditions in other yeast species have diverged significantly. For instance, the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* has a phosphorelay system composed of three cytosolic sensor kinases, including Mak1, Mak2 and Mak3, one phosphotransfer protein, Mpr1, and two response regulators, Mcs4 and Prr1 (Santos and Shiozaki, 2001). These proteins are connected to Sty1, which plays a role analogous to Hog1. Although a variety of stress conditions may activate the STY1 pathway (George *et al.*, 2007), the pathway seems to be dedicated mainly to the adaptation to oxidative stress (Degols *et al.*, 1996). In contrast to *S. cerevisiae*, null mutations that eliminate sensor kinases are viable but result in early entry into the mitotic phase of the cell cycle (Aoyama *et al.*, 2001; Nakamichi *et al.*, 2002). In addition, mutants of the Mpr1 phosphotransfer protein are viable but the cell shows a stubby phenotype (Aoyama *et al.*, 2000).

Although *Candida albicans* is more closely related to *S. cerevisiae* than *S. pombe*, the phosphorelay system is mainly implicated in the detection of oxidative stress (Santos and Shiozaki, 2001; Chauhan *et al.*, 2003). *C. albicans* contains three different histidine kinases, Sin1, which is homologous to *S. cerevisiae* Sin1 (Nagahashi *et al.*, 1998), Chk1 which is homologous to Mak2 and Mak3 from *S. pombe* (Calera and Calderone, 1999a), and Nik1, which seems to be more closely related to the histidine kinase Nik1 from *Neurospora crassa*, which was implicated in osmosensing (Alex *et al.*, 1998; Nagahashi *et al.*, 1998). *C. albicans* contains one phosphotransfer protein, Ypd1 (Calera *et al.*, 2000a), and three response regulators, Ssk1 (Calera and Calderone, 1999b), Skn7

(Singh *et al.*, 2004), and Srr1 (Desai *et al.*, 2011). Inactivation of phosphorelay components in *C. albicans* does not affect cell viability but significantly reduces virulence (Yamada-Okabe *et al.*, 1999; Calera *et al.*, 2000b).

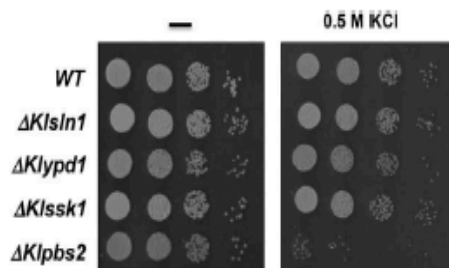
*Kluyveromyces lactis* contains a similar repertoire of proteins dedicated to respond to hyperosmotic stress (Krants *et al.*, 2006); however, it diverged before the genome duplication that gave rise to *Saccharomyces* species (Wolle and Shields, 1997), therefore *K. lactis* displays lower gene redundancy. MAPKKK Ssk22, which is not present in the *K. lactis* genome, is a good example of that lower redundancy (Krants *et al.*, 2006). When *K. lactis* cells are exposed to hyperosmotic stress the KIHog1 is phosphorylated and accumulated in the nucleus (Kawasaki *et al.*, 2008; Velázquez-Zavala *et al.*, 2015). KIHog1 activation minimally depends on the activity of a SHO1 branch consisting of the transmembrane protein KISho1, the PAK Ste20, the MAPKK Kiste11 and its adaptor protein KISte50, which are connected to the MAPKK KIPbs2. KIPbs2 is essential for activation by phosphorylation of MAPK KIHog1 (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015). In addition, genomic analysis has determined that *K. lactis* contains a phosphorelay system that is composed of the histidine kinase sensor KISln1, the phosphotransfer protein KIYpd1, and the response regulator KISSsk1. This system is presumably connected to the MAPKK KIPbs2 via the MAPKKK KISSsk2 (Krants *et al.*, 2006). In this study, we describe the participation of the phosphorelay system in the response of *K. lactis* cells to hyperosmotic stress and discuss differences and similarities with the model yeast *S. cerevisiae*.

## Results

### *Disruption of KISLN1, KIYPD1 or KISSK1 genes produces viable cells with no sensitivity to high osmotic stress*

In *S. cerevisiae*, inactivation of either the histidine-kinase Sin1 or the phosphotransfer protein Ypd1 induces cell lethality (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996). This lethality is due to constitutive activation of Hog1, which generates cell growth arrest and uncontrolled glycerol production and promotes cell death that resembles apoptosis. The high conservation of the phosphorelay proteins in *K. lactis* prompted us to study the effects of the mutation of the proteins involved in this system. We constructed *Kisln1* and *Klypd1* disruption mutants in diploid cells by introducing an *URA3* cassette to generate the disrupted alleles. Surprisingly, meiotic segregation of diploid cells transected with both *sln1::URA3* and *ypd1::URA3* constructs produced four viable spores, two of which were *URA3*<sup>+</sup> (Supporting Information Fig. 1). Southern blot analysis showed that meiotic segregants b and c carried





**Fig. 1.** Hyperosmotic stress does not affect growth of cells lacking proteins of the *K. lactis* phosphorelay system. Cells of the indicated strains were grown overnight at 30°C in liquid YPD, collected, washed and diluted in fresh medium. Cells were grown until  $OD_{600}$  was 0.4 and spotted as 10-fold serial dilutions onto YPD with or without 0.5 M KCl. The plates were incubated at 30°C for 48 h and photographed.

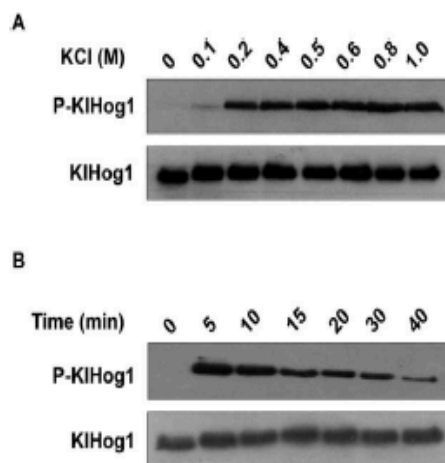
the disrupted allele for *KLSLN1* and meiotic clones a and c carried disrupted *KIYPD1*. This outcome shows that in contrast to *S. cerevisiae*, inactivation of either *KLSLN1* or *KIYPD1* does not induce cell lethality in *K. lactis*. In addition, we tested the  $\Delta Klsln1$  and  $\Delta Klypd1$  haploid mutants by their ability to grow under high osmotic conditions. While inactivation of the scaffold kinase *KIPBS2* resulted in severe growth deficiency in high salt medium, we found that  $\Delta Klsln1$  and  $\Delta Klypd1$  mutants showed a similar resistance to 0.5 M KCl as wild type cells when the mutants were tested in a spot dilution assay (Fig. 1). Finally, we disrupted the *KISSK1* gene, which encodes the response regulator in *K. lactis*, and found that, similar to the above results, the disruption did not affect growth in high salt media (Fig. 1). These results indicate that elimination of both *KLSLN1* and *KIYPD1* does not affect the viability of *K. lactis* haploid cells.

#### *KIHog1* is not constitutively phosphorylated in the $\Delta Klsln1$ , $\Delta Klypd1$ and $\Delta Klsln1\Delta Ktp2$ mutants

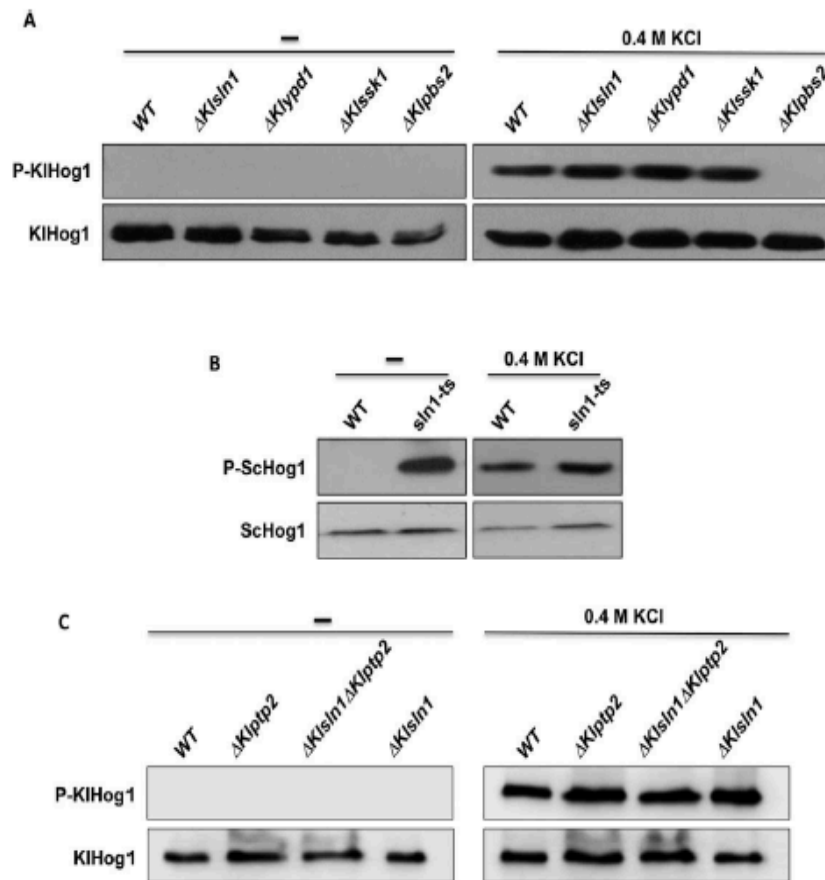
It has been shown that *Hog1p* becomes phosphorylated and constitutively active when the phosphorelay system is inactivated in *S. cerevisiae* (Maeda *et al.*, 1994; Posas *et al.*, 1996), and the lack of *Sln1* or *Ypd1* is lethal for the cells. Therefore, we decided to analyze the phosphorylation status of *KIHog1* in the  $\Delta Klsln1$  and  $\Delta Klypd1$  mutants. First, we established the conditions in which *KIHog1* could be phosphorylated by a hyperosmotic treatment. When *K. lactis* wild type cells were exposed to increasing KCl concentrations for 5 min, *KIHog1* became barely phosphorylated at 0.1 M KCl. Robust phosphorylation was reached at approximately 0.2 M KCl, and did not seem to vary much with higher concentrations (Fig. 2 panel A). When cells were exposed to 0.4 M KCl in a time course, *KIHog1p* phosphorylation reached its maximum within 5 min and then gradually decreased (Fig. 2 panel B).

Then, we tested whether *KIHog1* was phosphorylated in the *K. lactis* mutants that lacked the phosphorelay components *KLSLN1*, *KIYPD1* and *KISSK1*. We did not observe constitutive phosphorylation of *KIHog1* in the  $\Delta Klsln1$ ,  $\Delta Klypd1$  and  $\Delta Klssk1$  mutants under iso-osmotic conditions (Fig. 3 panel A). Interestingly, *KIHog1* phosphorylation was induced in the mutants that lacked the phosphorelay system after a treatment with high osmolarity (Fig. 3 panel A). For comparison, we tested *S. cerevisiae* *Hog1* phosphorylation in a strain carrying a thermo-sensitive allele of *SLN1* (*sln1-ts*) (Maeda *et al.*, 1994). When the cells were incubated in an iso-osmotic medium at 37°C for 30 min (which inactivated the *sln1-ts*), *ScHog1* became phosphorylated and this phosphorylation did not vary when a hyperosmotic treatment was used (Fig. 3 panel B). Taken together, these observations indicate that in contrast to *S. cerevisiae*, *KIHog1* is not constitutively phosphorylated in *K. lactis* cells when *KLSLN1* or *KIYPD1* have been inactivated.

In *S. cerevisiae* cells, negative feedback of the HOG signaling system is obtained by *Hog1* dephosphorylation (Martin *et al.*, 2005). The tyrosine phosphatases, *Ptp2* and *Ptp3*, inactivate *Hog1* by dephosphorylation of Tyr-176. *Ptp2* is found in the nucleus and exerts a major feedback on *Hog1* activity (Mattison and Ota, 2000). To analyse the participation of *KIPT2* in the regulation of the HOG signalling pathway in *K. lactis*, we constructed the single  $\Delta Ktp2$  and the double  $\Delta Klsln1\Delta Ktp2$



**Fig. 2.** *K. lactis* *Hog1p* phosphorylation kinetics upon hyperosmotic stress. Wild type cells were grown in YPD medium until the  $OD_{600}$  reached 0.4. Cells were washed, suspended in fresh YPD medium and treated or not treated with KCl. Cells were lysed, and 20  $\mu$ g of protein extracts were loaded in each lane and subjected to SDS-PAGE, transferred to nylon membranes, and probed with anti-p38 antibody (P-KIHog1). Membranes were stripped and re-probed with anti-Hog1 antibody. (A) *KIHog1* phosphorylation after treatment for 5 min with the indicated KCl concentrations. (B) *KIHog1* phosphorylation after treatment with 0.4 M KCl for the indicated times.

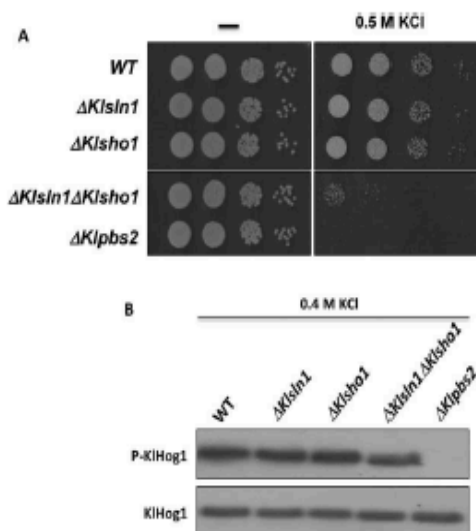


**Fig. 3.** *K. lactis* Hog1 phosphorylation in mutants lacking components of the Sln1 phosphorelay system. Protein extracts were obtained from wild type and mutant cells and subjected to western blot as described in the legend of Figure 2. (A) KIHog1 phosphorylation in wild type and in the indicated mutant strains treated or not treated with 0.4 M KCl for 5 min.  $\Delta Kltps2$  strain was included as a control of lack of KIHog1 phosphorylation. (B) Hog1 phosphorylation in *S. cerevisiae* wild type and *sln1-ts* strains. Cells were incubated 5 min at 37°C in YPD or YPD containing 0.4 M KCl and subjected to Western blot analysis. (C) *K. lactis* Hog1 phosphorylation in mutants lacking the KIP2 phosphatase. Cells of the indicated strains were treated or not treated with 0.4 M KCl for 5 min and subjected to Western blot analysis.

mutants as described in the methods section. Both, the single and double mutants grew normally in iso-osmotic medium (data not shown). Phosphorylated KIHog1 was detected when the cells were treated with hyperosmotic stress (Fig. 3 panel C). Interestingly, the level of phosphorylation of these mutants was similar to that observed in the wild type and  $\Delta Klsln1$  mutant. Under iso-osmotic conditions no phosphorylation was detected in any of the mutants. These results showed that KIHog1 could not be constitutively phosphorylated in cells lacking the phosphorelay system, even in the absence of KIP2, which indicates that a strong feedback is still present in cells where the KIP2 phosphatase has been inactivated.

#### Strong sensitivity to hyperosmotic stress is obtained by inactivation of both branches of the *K. lactis* HOG pathway

In *S. cerevisiae*, inactivation of either SLN1 or SHO1 branches has no effect on growth under hyperosmotic conditions, but inactivation of both branches results in strong sensitivity (Posas and Saito, 1997). Our results showed that in *K. lactis* inactivation of the phosphorelay system alone had no effect on either viability or the hyperosmotic response. We then evaluated whether inactivation of both branches in *K. lactis* had the same effects as those seen in *S. cerevisiae*. For this purpose, we constructed a double mutant,  $\Delta Klsln1 \Delta Klsho1$ , and evaluated its growth in high osmotic medium compared with



**Fig. 4.** Hyperosmotic stress induces growth defects in a mutant strain lacking both *KISLN1* and *KISHO1* genes. (A) Cells of the indicated strains were grown overnight at 30°C in liquid YPD, collected, washed and diluted in fresh medium. Cells were grown until  $OD_{600}$  was 0.4 and spotted as 10-fold serial dilutions onto YPD with or without 0.5 M KCl. The plates were incubated at 30°C for 48 h and photographed. (B) *K. lactis* Hog1p phosphorylation in mutant strains upon hyperosmotic stress. Protein extracts were obtained from wild type and mutant cells and subjected to western blot as described in the legend of Figure 2. Cells of the indicated strains were treated with 0.4 M KCl for 5 min and subjected to Western blot analysis.

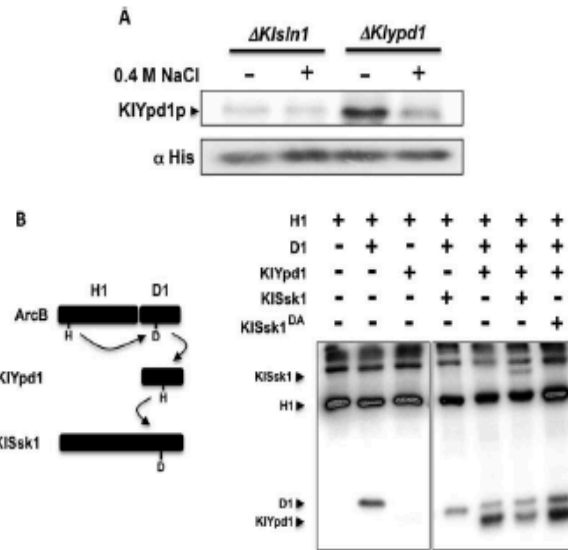
the single mutants (Fig. 4A). We observed that the double  $\Delta Kisln1\Delta Kisho1$  mutant showed strong sensitivity to hyperosmotic conditions while the single mutants had similar growth to the wild type strain. This observation indicates that *K. lactis* responds to hyperosmotic stress by activating both the SLN1 and SHO1 branches and that *KISln1* is required to generate an appropriate response to the hyperosmotic stress. In addition, we determined the effects of high salt concentration on the *KIHog1* phosphorylation in these mutants. We found that *KIHog1* became phosphorylated after 5 min of treatment with 0.4 M KCl not only in the single mutants but also in the double  $\Delta Kisln1\Delta Kisho1$  mutant (Fig. 4B), even though this mutant was highly sensitive to hyperosmotic stress. This observation agreed with the amount of *KIHog1* phosphorylation that was detected in the double  $\Delta Kist11\Delta Klssk2$  mutant (Velázquez-Zavala et al., 2015).

#### Phosphorylation of *KIYpd1* occurs under iso-osmotic conditions and is dependent on *KISln1*

It has been shown that the phosphorelay system works as a negative regulator of the HOG pathway in *S. cerevisiae*. Therefore, the phosphorelay is activated

by iso-osmotic conditions and it is turned off when cells are exposed to high osmolarity (Maeda et al., 1994). The phenotypes observed in the *K. lactis*  $\Delta Kisln1$  and  $\Delta KIYpd1$  mutants might suggest that the phosphorelay system is working differently in this yeast species compared with the one in *S. cerevisiae*. To address this question, we measured the phosphorylation of *KIYpd1* under iso-osmotic and hyperosmotic conditions and in absence and presence of *KISln1*. We established an *in vivo* metabolic labelling system in the absence and presence of 0.4 M KCl in  $\Delta KIYpd1$  or  $\Delta Kisln1$  mutants that expressed a His(6)-tagged *KIYpd1* protein. His(6)-tagged *KIYpd1* protein was purified in nickel columns as described in the methods section. A gel containing cell extracts from the different strains that was used as input of the nickel column is shown in Supporting Information Fig. 2. We observed that *KIYpd1* was phosphorylated in cells growing under normal conditions and that it became un-phosphorylated when the cells were treated with high osmotic medium (Fig. 5A). As expected, phosphorylation of *KIYpd1* was dependent on the presence of *KISln1*. These observations indicate that *KISln1* is catalytically active under iso-osmotic conditions and under these conditions, a phosphate group may be transferred to *KIYpd1*. In contrast, when *KISln1* was inactivated by the hyperosmotic shock, *KIYpd1* became unphosphorylated. Taken together, the above observations indicate that the molecular transfer of the phosphate in the phosphorelay system in *K. lactis* seems to be working similar to *S. cerevisiae*.

To understand the activity of the SLN1 phosphorelay system in *K. lactis*, we determined if *KIYpd1* was able to accept phosphate groups from a donor protein and transfer them to *KISsk1*. For this experiment, we expressed and purified these proteins according to the strategy described in the Experimental procedures section. A purification profile of *KISsk1* and *KIYpd1* is shown in Supporting Information Fig. 3A and B. First, we tried to use a recombinant cytoplasmic portion of *KISln1* as a donor protein, but it showed high instability when it was purified from bacterial extracts (data not shown). Therefore, we tested whether *KIYpd1* could be phosphorylated by a heterologous donor. For this approach, we used the purified hybrid histidine-kinase *ArcB* from *Escherichia coli* (Georgellis et al., 1997). In our assays, we used the *ArcB* histidine-kinase H1 transmitter domain (*ArcB*<sup>78-521</sup>) and the D1 receiver domain (*ArcB*<sup>521-661</sup>) which were purified separately. The H1 domain was able to transfer a phosphate group to the receiver D1 domain when they were incubated with a radiolabeled ATP nucleotide (Alvarez and Georgellis, 2010). We tested if the D1 domain could donate the phosphate group to *KIYpd1* and if this protein, in turn, might phosphorylate *KISsk1* as depicted in the scheme shown in Fig. 5B. *KIYpd1* was phosphorylated



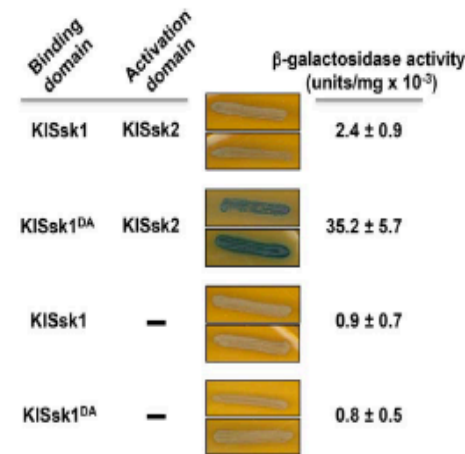
only when incubated with both, the H1 and the D1 domains. When the response regulator KISsk1 was added to the reaction mix, it became phosphorylated only when KIYpd1 was present, which indicated that the phosphate group cannot go directly from the D1 domain of ArcB to KISsk1p (Fig. 5B). These observations indicate that KIYpd1 is capable of accepting a phosphate group from a receiver domain and transferring it to KISsk1. In addition, we constructed a KISsk1 mutant in which the Asp(444) residue was replaced by Ala to create KISsk1<sup>DA</sup>. It has been shown that in *S. cerevisiae* the substitution of the equivalent Asp(554) residue prevents Ssk1 from being phosphorylated by Ypd1 (Posas *et al.*, 1996; Horie *et al.*, 2008). We observed that the *K. lactis* mutant protein was not phosphorylated in our *in vitro* assay (Fig. 5B), which indicates that the Asp(444) residue is the acceptor of the phosphate group in *K. lactis* Ssk1.

#### The unphosphorylated form of KISsk1 interacts with the MAPKKK KISsk2

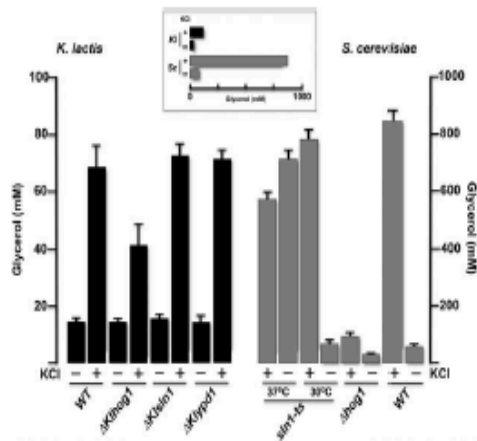
Next, we investigated if the *K. lactis* phosphorelay system is connected to the MAPK module as it is in *S. cerevisiae* (Posas and Saito, 1998). For this experiment, we measured KISsk1 and KISsk2 interaction using the two-hybrid system in which we fused KISsk1 to the LexA binding domain and KISsk2 to the B42 activator domain. It is worth noting that *K. lactis* lacks an Ssk22, which is redundant for Ssk2 in *S. cerevisiae*. We observed that the wild type versions of KISsk1 and KISsk2 proteins failed to interact (Fig. 6), as shown by the lack of blue color from the  $\beta$ -galactosidase reporter.

**Fig. 5.** *In vivo* and *in vitro* phosphorylation assays. (A) *K. lactis* strains were transfected with YEpKDGaH-His-KIYPD1. Transformants were grown in phosphate-depleted media and pulsed with [<sup>32</sup>P]orthophosphate. Cell aliquots were treated or not treated with 0.4 M NaCl for 1 min at RT. KIYpd1-His was purified using a Nickel column and applied to SDS-PAGE. Proteins were transferred to nylon membranes and analysed with a phosphorimager scanner. The nylon membrane was subjected to western blot analysis using an anti-His antibody. (B) *In vitro* phosphotransfer assay. ArcB (fragments H1 and D1), KIYpd1, and KISsk1 or KISsk1<sup>DA</sup> were purified as described in the methods section. ArcB (H1) was incubated at RT for 10 min with [<sup>32</sup>P]ATP and then ArcB (D1), His-KIYpd1 and Mal-KISsk1 or Mal-KISsk1<sup>DA</sup> were added in the depicted combination. After 10 min incubation at RT, proteins were applied to SDS-PAGE and the dried gel was analyzed with a phosphorimager scanner.

However, when we tested the KISsk1<sup>DA</sup> mutant, which cannot be phosphorylated by KIYpd1, there was a very strong interaction between KISsk1 and the MAPKKK KISsk2. Taken together, the above results indicate that, similar to *S. cerevisiae*, the *K. lactis* phosphorelay system acts on the HOG pathway when it is inhibited by hyperosmotic stress.



**Fig. 6.** Physical interaction determined by the two-hybrid system. The binding domain corresponds to LexA-fused proteins cloned into pEG202 and the activation domain corresponds to B42-fused proteins cloned into pJG4-5. Two-hybrid plasmids were introduced into strain EGY48, and two independent clones were plated on SGal plates containing 1 mg/ml X-Gal. Photographs were taken 24 h after incubation at 30°C. Quantitation of  $\beta$ -galactosidase activity was determined as described (Ongay-Larios *et al.*, 2000). The  $\beta$ -galactosidase activity corresponds to the average value of three independent clones.



**Fig. 7.** Comparison of glycerol accumulation in *K. lactis* and *S. cerevisiae* strains. Cultures of the indicated strains were grown in YPD at 30°C until  $OD_{600}$  0.4. Cells were transferred to the same medium with or without 0.4 M KCl and incubated for 6 h at 30°C, except for one aliquot of strain *sln1-ts* which was incubated at 37°C. Glycerol content was determined as described in the methods section. Insert; comparison of intracellular glycerol content in wild type cells of *K. lactis* and *S. cerevisiae*.

#### *Kluyveromyces lactis* osmolyte production to cope with osmotic stress differs from that of *S. cerevisiae*

Activation of Hog1 in *S. cerevisiae* cells induces growth arrest and accumulation of several osmolytes, especially glycerol, to avoid plasmolysis (Saito and Posas, 2012). Moreover, inactivation of Sin1 causes constitutive activation of Hog1 and therefore, uncontrolled glycerol production (Hohmann, 2002). To determine whether glycerol accumulation occurs in *K. lactis* cells following hyperosmotic stress, we measured glycerol content in wild type and mutant strains and compared it to glycerol production in *S. cerevisiae*. We found that the glycerol content in *K. lactis* wild type cells increased approximately 5- to 7-fold under hyperosmotic stress, which is in agreement with previous reports (Cialfi et al., 2011). The glycerol content under osmotic stress in *K. lactis* slightly decreased in the  $\Delta Kihog1$  mutant and remained unaltered in the  $\Delta Klsn1$  and  $\Delta Klypd1$  mutants (Fig. 7). Furthermore, mutants with an inactivated phosphorelay in *K. lactis* did not have sustained production of glycerol under iso-osmotic conditions, which was consistent with the lack of Hog1 phosphorylation in these mutants.  $\Delta Klsn1$  and  $\Delta Klypd1$  mutants accumulated as much glycerol as the wild type strain only when they were treated with a hyperosmotic stimulus (Fig. 7). In contrast, *S. cerevisiae* wild type strain accumulated glycerol approximately 18- to 20-fold when cells were treated with a hyperosmotic shock. The *S. cerevisiae* *hog1* mutant was unable to produce glycerol under hyperosmotic stress, while the cells carrying the *sln1-ts*

allele accumulated glycerol, under the restrictive temperature, at a similar level compared with the wild type strain. In this assay, we found that *K. lactis* wild type cells accumulated ten times less glycerol than *S. cerevisiae* wild type cells (Fig. 7, insert). This result suggests that this amount of glycerol is sufficient to protect *K. lactis* cells against the hyperosmotic stress or that this strain uses alternative osmolytes, in addition to glycerol, to cope with high osmolarity. It has been proposed that trehalose might act as osmolyte in *S. cerevisiae*. Previous studies have shown that *S. cerevisiae* accumulated approximately 10 times more trehalose when cells were exposed to hyperosmotic stress (Hounsa et al., 1998). With this in mind, we determined whether trehalose could be used as osmoprotectant in *K. lactis* cells. For this assay wild type cells were grown until early stationary phase and treated with 0.4 M NaCl for 6 h. In these conditions, we found that *K. lactis* cells did not accumulate trehalose, instead, a 50% reduction of trehalose concentration was detected after the NaCl shock, as compared with untreated cells (Table 1). The  $\Delta Kihog1$  mutant behaved as the wild type strain, suggesting that *Kihog1* does not play a significant role in trehalose production in these conditions. In contrast, in wild type *S. cerevisiae* cells the trehalose content increased 15-fold upon hyperosmotic stress. This increment was dependent on Hog1, since the  $\Delta hog1$  mutant failed to increase the trehalose content under hyperosmotic stress.

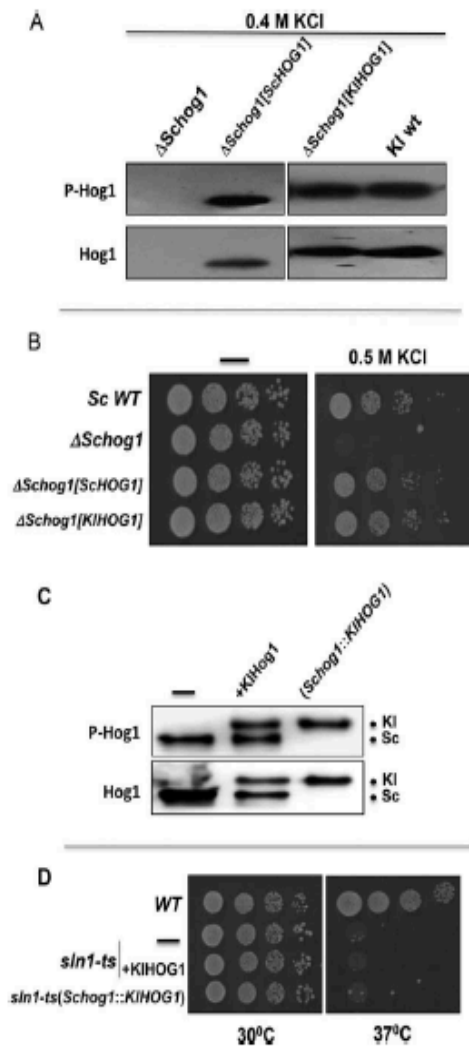
#### *Kihog1* rescues a $\Delta Schog1$ mutant from its sensitivity to hyperosmotic stress

In *S. cerevisiae*, Hog1 participates in a feedback regulatory mechanism to regulate the basal signaling in the pathway and the fine tuning of the signaling (Macia et al., 2009; Sharifian et al., 2015). To understand the basis for the differential outcomes of the inactivation of the phosphorelay in *K. lactis*, we assessed whether this result could be attributed to Hog1. Thus, we asked if *Kihog1* could substitute for *Schog1* in the *S. cerevisiae*

**Table 1.** Comparison of trehalose production between *K. lactis* and *S. cerevisiae* cells. Trehalose concentration is given in [mg/g dry wt]. Cells were grown as described in the Experimental procedures section and treated or not treated with 0.4 M NaCl for 6 h.

		-	NaCl
<i>K. lactis</i>	WT	0.54 ± 0.06	0.22 ± 0.05
	<i>hog1</i>	0.63 ± 0.07	0.28 ± 0.05
<i>S. cerevisiae</i>	WT	0.20 ± 0.03	3.02 ± 0.09
	<i>hog1</i>	0.32 ± 0.05	0.27 ± 0.08

Numbers are the average value of three-independent experiments (± SD).

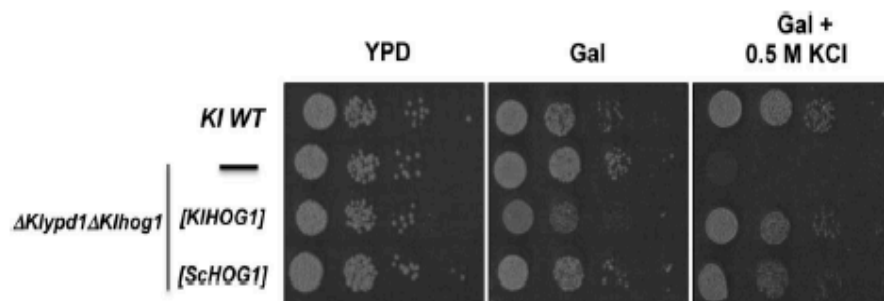


**Fig. 8.** Effect of KIHog1 expression on the *S. cerevisiae* *hog1* and *sin1-ts* strains. The strains were transformed with empty pYES2 (-) or pYES2 containing either *KIHOG1* or *ScHOG1*. Transformants were grown overnight in SD medium at 30°C. Cells were collected, washed and suspended in fresh SD medium and allowed to reach  $OD_{600}$  0.4. Cells were then used for western blot or plating. (A) Cells were washed and transferred to SGal medium for 4 h to allow expression of *KIHOG1* and *ScHOG1*. Cultures were treated or not treated with 0.4 M KCl for 5 min. Protein extracts were obtained from wild type and mutant cells and subjected to western blot as described in the legend of Figure 2. An extract protein aliquot from the *K. lactis* wild type strain was used as a control. (B) Mid-log cells were collected, washed and spotted as 10-fold serial dilutions onto YPD with or without 0.75 M KCl. The plates were incubated at 30°C for 48 h and photographed. Sc WT strain is BY4742. (C) Cells of the indicated strains were washed and transferred to SGal medium for 3 h to allow expression of *KIHOG1*, followed by incubation at 37°C for 3 h. Cells were lysed and protein extracts were obtained and subjected to Western blot analysis as described. (D) Mid-log cells of strain TM141 or its isogenic *sin1-ts* with empty plasmid (dash), pYES-*KIHOG1* or with integrated *KIHOG1* were spotted as 10-fold serial dilutions onto YPD plates. Plates were incubated at 30°C or 37°C for 48 h and photographed.

HOG pathway. First, we investigated whether KIHog1 could be phosphorylated in *S. cerevisiae* when expressed in the  $\Delta Schog1$  mutant. For this test, we cloned the *K. lactis* gene into the pYES2 vector and expressed it under the *GAL1* promoter. We found that after 5 min of a hyperosmotic treatment, KIHog1 was phosphorylated in *S. cerevisiae* at a similar level as ScHog1 (Fig. 8 panel A). We observed that expression of *KIHOG1* was able to reverse the sensitivity to hyperosmotic stress displayed by the *S. cerevisiae*  $\Delta hog1$  mutant to the same level as *ScHOG1* (Fig. 8 panel B). We also tested if KIHog1 was phosphorylated in the absence of stress in *S. cerevisiae* cells when the phosphorelay system was inactivated. For this experiment, we expressed KIHog1 in the cells carrying the thermo-sensitive *sin1-ts* allele and monitored phosphorylation at 37°C. We took advantage of the differences in MW between KIHog1 and ScHog1 to distinguish them in the same gel. KIHog1 and endogenous ScHog1 were both phosphorylated at the same level when the cells were shifted to 37°C (Fig. 8 panel C). When the growth of these strains was analyzed, we observed that the *sin1-ts* strain carrying the plasmid copy of *KIHOG1* were unable to grow at 37°C in YPD medium due to constitutive activation of endogenous ScHog1 (Fig. 8 panel D). To evaluate the effects of KIHog1 alone on the growth of the *sin1-ts* strain, we integrated the *KIHOG1* gene into the *ScHOG1* locus (*sin1-ts(Schog1::KIHOG1)*), and placed it under the control of the *ScHOG1* promoter. Under these conditions, we observed that when the temperature shifted to 37°C, KIHog1 phosphorylation was induced (Fig. 8 panel C), and the temperature shift also induced cell lethality in the *sin1-ts* strain (Fig. 8 panel D). Taken together, these results indicate that Hog1 from *K. lactis* can replace ScHog1 in terms of its capability to respond to hyperosmotic stress, and its ability to induce cell lethality when the phosphorelay is inactivated.

#### *ScHog1p* does not induce lethality in *K. lactis* upon inactivation of the phosphorelay

We finally asked if ScHog1 would be able to induce cell lethality in *K. lactis* upon phosphorelay inactivation as it does in *S. cerevisiae*. For this experiment, we used the double mutant  $\Delta Klypd1\Delta Kihog1$ . When overexpressed, both KIHog1 and ScHog1 proteins were able to reverse the sensitivity to hyperosmotic stress that was displayed in the cells transformed with the vector alone (Fig. 9). In the absence of the hyperosmotic stimulus, KIHog1 slightly impaired the growth of the double mutant strain (which probably occurred due to a KIHog1 overdose). However, ScHog1p did not affect the growth of the



**Fig. 9.** Effect of ScHog1 expression on *K. lactis* Ypd1 and Hog1 deficient mutant. The  $\Delta KIYpd1\Delta KIHog1$  strain was transfected with empty YEpKD-Gal or YEpKD-Gal containing either *KIHOG1* or *ScHOG1*. Transformants were grown overnight in SD medium at 30°C. Cells were collected washed and suspended in fresh SD medium and allowed to reach  $OD_{600}$  0.4. Cells were collected, washed and spotted as 10-fold serial dilutions onto YPD or YPGal with or without 0.75M KCl. The plates were incubated at 30°C for 48 h and photographed.

$\Delta KIYpd1\Delta KIHog1$  strain. These results indicate that ScHog1 is able to replace KIHog1 when *K. lactis* cells are under hyperosmotic stress and the substitution does not induce lethality when the *K. lactis* phosphorelay is inactivated.

## Discussion

*Saccharomyces cerevisiae* has been considered a useful yeast model organism for studying the osmotic stress response pathway. Previous studies have shown that the SLN1 phosphorelay system plays a negative regulatory role for Hog1, and null mutants of *SLN1* and *YPD1* showed constitutive phosphorylation of Hog1 and cell death due to overactivation of the HOG pathway (Posas *et al.*, 1996; Hohmann, 2000). *K. lactis*, which is a close relative of *S. cerevisiae*, contains most of the proteins required for the hyperosmotic stress response, except the ortholog of redundant MAPKKK Ssk22 (Krantz *et al.*, 2006). All *K. lactis* proteins have high structural similarity to the proteins in *S. cerevisiae*. This similarity suggests that *K. lactis* has a similar architecture and mechanisms to cope with hyperosmotic stress. We constructed deletion mutants of both, *KISln1* and *KIYpd1* in diploid cells to determine their contribution to the stress response. To our surprise, we found that haploid null mutants of either gene were viable and insensitive to hyperosmotic stress. The observed phenotypes agreed with the phenotypes of *S. pombe* (Nakamichi *et al.*, 2002) and *C. albicans* (Yamada-Okabe *et al.*, 1999), for which, inactivation of the sensor kinase and the phosphotransfer proteins did not affect cell viability. In addition, we found that a mutant of the response regulator KISsk1 was also insensitive to hyperosmotic stress. When we tested the effects of the elimination of *KISln1* and *KIYpd1* on KIHog1 phosphorylation, KIHog1 remained unphosphorylated when grown under iso-osmotic conditions. This would mean that in *K. lactis*,

the phosphorelay system either does not participate in the response to hyperosmotic stress or that the *K. lactis* phosphorelay pathway acts in a different manner in this yeast species. The first hypothesis was discarded since a double  $\Delta KISln1 \Delta KISHo1$  mutant was osmosensitive, which contrasted the observed phenotype of the single  $\Delta KISHo1$  mutant, which was osmoresistant (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015). This indicated that both *K. lactis* branches were active and worked in parallel for hyperosmotic adaptation.

Surprisingly, we observed that in cells where both *KISln1* and *KISHo1* were eliminated, Hog1 was in fact phosphorylated when the cells were grown in high osmotic medium. However, this phosphorylation failed to protect the cells against hyperosmotic stress, which was contrary to the outcome we expected. These results correlate with the phenotype displayed by a  $\Delta KISsk2\Delta KISte11$  mutant (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015) in which KIHog1 was phosphorylated under hyperosmotic stress. This could mean that phosphorylation of KIHog1, under these conditions, was performed in a different manner that made the reaction inefficient for an osmotic stress response or that KIHog1 activity has not reached a threshold to trigger an osmotic response. Nevertheless, our results showed that KIYpd1 and KISsk1 had phosphotransfer activity *in vitro*, which indicated that those proteins were functional and conserved the structural characteristics to accept and transfer phosphate groups. Moreover, substitution of the Asp444 residue from the response regulator KISsk1, failed to hyper-activate the *K. lactis* HOG1 pathway as observed in *S. cerevisiae* (Horie *et al.*, 2008), although it did eliminate its capacity to accept phosphate groups from KIYpd1p. In addition, we found that KIYpd1 could be phosphorylated *in vivo* and that this phosphorylation was dependent on the presence of KISln1 and could occur under iso-osmotic conditions, which indicated that the SLN1 system in *K. lactis* conserved activation properties similar to *S. cerevisiae* (Maeda *et al.*, 1994). In this study,

we also demonstrated that KISsk1 made contact with KISsk2 when the Asp444 residue was substituted, while the wild type KISsk1 was unable to interact with KISsk2. This result suggested that the un-phosphorylated form of KISsk1p was the one that was associated with KISsk2. These data showed that activation properties of the SLN1 system in *K. lactis* were similar to *S. cerevisiae*, and, that the connection between the phosphorelay system and the MAPK module in *K. lactis* could be carried out in a similar manner as in *S. cerevisiae*.

Interestingly, in contrast to the high glycerol accumulation observed in *S. cerevisiae* cells upon hyperosmotic stress, *K. lactis* cells treated with high salt accumulated 10 times less glycerol. Moreover, while elimination of thermosensitive Sln1 activity by a temperature shift induces constitutive glycerol accumulation in *S. cerevisiae*, even under iso-osmotic conditions, *K. lactis* cells devoid of phosphorelay proteins failed to increase the glycerol concentration. Finally, glycerol production decreased approximately ten times in the *S. cerevisiae*  $\Delta hog1$  mutant under hyperosmotic treatment, while it decreased just to half in the *K. lactis*  $\Delta hog1$  mutant. Although hyperosmotic stress increased glycerol production in *K. lactis* cells, its level was significantly lower compared with *S. cerevisiae*, which suggests that this amount of glycerol is sufficient to exert osmotic protection, or that other compatible solutes are used by this yeast species. In *S. cerevisiae* the activity of the glycerol-3-phosphate dehydrogenase (Gpd1) is required to provide osmotic stress resistance (Albertyn *et al.*, 1994), therefore inactivation of the ortholog protein in *K. lactis* will be a useful approach to determine if this amount of glycerol is serving as osmoprotectant in this yeast species. It has been demonstrated that trehalose plays a role in protecting yeast cells from different stress insults (Argüelles, 2000; Sampedro and Uribe, 2004). For this reason, we determined production of trehalose in *K. lactis* cells grown under hyperosmotic stress. We found that trehalose did not accumulate in *K. lactis*, which is in contrast with the accumulation observed in *S. cerevisiae* (Parrou *et al.*, 1997). This observation could mean that this osmolyte is not used as osmoprotectant in *K. lactis* or that the conditions used in this study did not allow trehalose accumulation. An important observation is that hyperosmotic stress induces recycling of trehalose due to increased synthesis by the trehalose 6-phosphate synthase (Tps1) and increased degradation by the neutral trehalase (Nth1) (Parrou *et al.*, 1997). Therefore, it will be interesting to construct mutants that inactivate these enzymes in *K. lactis* to determine their contribution to the hyperosmotic response.

It is important to mention that KIHog1 conserves structural similarities with ScHog1. In fact, as we have shown here, it can fully complement the lack of Hog1 in *S.*

*cerevisiae* and allow for growth of  $\Delta hog1$  cells in high osmotic medium. In addition, KIHog1 was phosphorylated constitutively and induced lethality when expressed in *S. cerevisiae* cells devoid of phosphotransfer activity. In the same manner, ScHog1 can substitute for KIHog1 and does not induce lethality in *K. lactis* lacking the phosphorelay system. All these observations suggest that Hog1 of either species could induce negative feedback efficiently in *K. lactis*, which would allow the cells to survive, even if they lack an active phosphorelay (Sharifian *et al.*, 2015). However, in *S. cerevisiae* KIHog1, as well as ScHog1, is not capable of establishing this negative feedback and would be constitutively active in *sln1* cells. Several mechanisms participate in the negative feedback that attenuates Hog1 activity (Saito and Posas, 2012). Among these, activity of Hog1 phosphatases contribute to downregulate the hyperosmotic transduction system. The nuclear phosphatase Ptp2 is responsible for Hog1 dephosphorylation in the nucleus (Mattison and Ota, 2000). Accordingly, we deleted the gene that encodes the Ptp2 phosphatase in *K. lactis* and we found that KIHog1 was not phosphorylated in cells grown in iso-osmotic conditions, surprisingly, this was true even in cells where the phosphotransfer systems had also been inactivated ( $\Delta Klsln1\Delta Kiptp2$  mutant). The KIPtp2 inactivation in the  $\Delta Klsln1$  mutant did not affect growth on iso-osmotic conditions. These observations suggest that KIPtp2 does not participate in the negative feedback or that it has a marginal contribution in this mechanism. It would be important to investigate which negative feedback mechanisms are present in *K. lactis* and what will be their contribution to the regulation of the hyperosmotic response pathway.

In this study, we showed that the phosphorelay system composed of KISln1-KIYpd1-KISsk1 had phosphotransfer activity both *in vitro* and *in vivo*, that was active under normal osmotic conditions and that was turned off under hyperosmotic stress. These observations indicate that this system negatively regulates KIHog1p. However, the absence of the transfer of phosphate in the  $\Delta Klsln1$  and  $\Delta KIypd1$  mutants did not induce constitutive activation of KIHog1p. Furthermore, phosphorylation of KIHog1 was not observed in the  $\Delta Klsln1$  mutant even when the KIPtp2 phosphatase was inactivated. In *S. cerevisiae*, inactivation of Sln1 leads to constitutive Hog1 phosphorylation and to cell lethality due to hyperactivation of the HOG pathway. In this condition, the activity of Ptp2 phosphatase, which dephosphorylates Hog1, seems to be insufficient to attenuate Hog1 activity. In contrast, in *K. lactis*, our results indicate that a strong feedback mechanism, independent of Ptp2 is operating and will inactivate Hog1 in a mutant lacking KISln1. Our data suggest that the attenuation of the KIHog1 activity could take place in the cytoplasm and might be carried out by either KIPtp3 or by the type 2C Ser/Thr phosphatases. In resting conditions, inactivation



of the phosphorelay system would not be sufficient to overtake the negative feedback imposed by these phosphatases, and under hyperosmotic shock the activation of KIHog1 would trigger a canonical osmo-response. Our data indicate that despite the high conservation in components and architecture, the high osmolarity pathway in *K. lactis* operates under different mechanisms.

## Experimental procedures

### Strains and media

The *K. lactis* strains used in this study were MD2/1 (*MAT $\alpha$* , *argA lysA ura3*), 12/8 (*MAT $\alpha$* , *lysA*, *argA*, *ura3*) and 155 (*Mat $\alpha$* , *ade2*, *his3*, *uraA*), which have all been described in a previous study (Saviñón-Tejeda et al., 2001). *K. lactis* diploids were obtained by crossing strains MD2/1 and 155. The *S. cerevisiae* strains were BY4742 (*MAT $\alpha$* , *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*), and its isogenic  $\Delta$ *hog1* mutant (*MAT $\alpha$*  *his3*, *leu2*, *lys2*, *ura3*, *hog1::G418*). The TM141 (*Mata*, *ura3*, *leu2 trp1 his3*) and *sln1<sup>ts</sup>* (*Mata*, *ura3*, *leu2 trp1 his3*, *sln1<sup>ts</sup>*) strains were described in (Maeda et al., 1994; Posas et al., 1996). The EGY48 (*MAT $\alpha$*  *his3 trp1 ura3 leu2:pLeu-LexAop6*) strain (Golemis et al., 1997) was used for the two hybrid assays. *E. coli* strain DH5 $\alpha$  was used to propagate plasmids. BL21 (New England Biolabs) was used to express and purify KISSk1p and M15 2Z291 (Qiagen) was used for KYPd1p expression and purification. YPD medium consisted of 1% yeast extract, 2% Bacto-peptone and 2% Glucose. YPGal medium was the same as YPD except that it contained galactose instead of glucose. YPGal-Pi is a phosphate depleted medium and was prepared as previously described (Warner, 1991). SD minimal medium consisted of a 0.67% yeast nitrogen base without amino acids (Difco) and 2% glucose. SGal was the same as SD except for the substitution of glucose with galactose. For plasmid selection SD and SGal were supplemented with the required amino acids and nitrogen bases (50  $\mu$ g/ml). 1 mg/ml 5-fluoroorotic acid (FOA) was added to YPD for negative selection of the URA3 marker. Sporulation medium consisted of 5% Malt extract (Difco) and 3% agar. Media were supplemented with KCl at different concentrations for osmosensitivity assays. LB medium supplemented with ampicillin (100  $\mu$ g/ml) was used to propagate recombinant bacteria.

### Gene constructs and mutagenesis

A fragment of *KISLN1* was amplified by PCR from genomic DNA employing the forward primer Sln1F +2321 AGTCGAATCCGAAACG +2306 and the backward primer Sln1R +3570 GGAAACCATCCATTCC +3585, which generated a 1083-base pair product. The product was subcloned into pGEM-T Easy (Promega) to yield pGEM-SLN1. A 1037-bp *EcoRI-EcoRI* fragment was obtained from pGEM-SLN1 and subcloned into Ylp352 (Saviñón-Tejeda et al., 2001), which was opened at the *EcoRI* site. This construct was digested with *BglII*, which cuts twice into *SLN1*. The resulting molecule was integrated into the *KISLN1* locus in diploid cells and yielded a 600 bp deletion.

*KYPD1* was amplified from genomic DNA using primers Ypd1F -231 TTGTATACACCCGGGTTTCTTTTGT -257 and Ypd1R +529 CAGCACAGATCCCGGGTCAATA +552, which contained *SmaI* restriction sites (underlined). The 809-bp product was cloned into pGEM-T Easy. The resulting pGEM-YPD1 plasmid was digested with *SmaI* and ligated into Ylp352, which was opened at the *SmaI* site. Ylp352-YPD1 was digested with *EcoRI* and employed for transformation of diploid cells. This step produced a 243 bp deletion in *KYPD1*.

*KISSK1* was amplified by PCR using the primers SSK1F -47 TGTGAATTCTGCAGAA -65 and SSK1R +2079 AAGATGTTGAATTCGTGATG +2060. Both primers contained an *EcoRI* restriction site (underlined). The PCR product was subcloned into the pGEM-T Easy vector and sequenced in full. A 2131-bp fragment obtained by *EcoRI-EcoRI* digestion was subcloned into Ylp352 digested with the same enzymes. The resulting construct was opened at the *Clal* site and used for transformation.

To construct the unphosphorylated form of KISSK1 (*KISSK1<sup>DA</sup>*) we designed the mutagenic primer SSK1MF +1318 CTTATCCTTATGGCTTTGCAATTGCC +1344, and its reverse complement SSK1MR, which had A instead of C at position +1331 (underlined) and produced alanine instead of the aspartate at position 444 of Ssk1p. We used the mutagenic primers along with SSK1R and SSK1F, respectively, in separated PCR reactions. Amplified products were mixed together for a second PCR reaction using SSK1F and SSK1R primers. The final PCR product was ligated into the pGEM-T Easy vector and sequenced in full.

Both wild type and mutated KISSK1 were obtained from a pGEM-T Easy plasmid and subcloned into YEpKDGal for *K. lactis* expression. For the two hybrid assays, we separately subcloned the genes encoding KISSK1 and KISSK1<sup>DA</sup> into pJG4-5. This cloning was achieved by PCR mediated amplification using primers Ssk1DHF -12 TAACGCGAATTCATGCAAGAA +9 and Ssk1DHR +1920 CCATGGCTCGAGTCACGG +1900, which introduced *EcoRI* and *XhoI* sites to the construct respectively (underlined). The PCR products were ligated back into the pGEM-T Easy plasmid. Both KISSK1 genes were obtained as *EcoRI* and *XhoI* fragments and subcloned into pJG4-5, which was opened at the same sites. This fused both forms of KISSk1 with the B42 activation domain. KISSK2 was amplified from genomic DNA using primers Ssk2DHF -12 TCGTCCCGGGCATGTCGCAA +9 and Ssk2DHR +4662 TTATGTCGCGGCCGCTAGTTATG +4639, which introduced *SmaI* and *NofI* sites respectively (underlined). The PCR product was ligated into pGEM-T Easy. KISSK2 was obtained with *SmaI* and *NofI* restriction enzymes and ligated into pEG202, which was opened with the same enzymes. This fused KISSk2 with the LexA binding domain. The construct pJG4-5-CTS1 (Ongay-Larios et al., 2000) was used as a negative interaction control.

KYPD1 was subcloned into *E. coli* expression vector pQE30 (Qiagen) by amplifying it from the pGEM-T Easy clone. For this step, we used primers YPD1A -16 AAAAGCACAAAGAGCTCATGTCCCAAACA +12 and YPD1B +445 AGAGAAAAGCTTGCCCTG +429 which contained *SacI* and *HindIII* restriction sites respectively (underlined). The PCR product was cloned back into the pGEM-T Easy vector and sequenced in full. This construct was digested with *SacI*

and *Hind*III and subcloned into pQE30, which was opened with the same enzymes. The product was a KIYpd-His(6) tagged protein. The KIYpd-His(6) encoding gene was obtained from the pQE30 plasmid as a *Xho*I-*Hind*III fragment and was subcloned into YEpkDGal opened at the *Eco*RI site (filled in) for expression in *K. lactis*.

The plasmids pMAL-KISSK1 and pMAL-KISSK1<sup>DA</sup> were constructed by PCR using the pGEM-T Easy clones as templates. Primers SSK1rrA -1138 GGATCCGATAAGCAAGGCAA -1158 and SSK1rrB +1943 AAATATTCTTGCGGCCGCAAGCTTCTGTGACCAT +1908 introduced the *Bam*HI and *Hind*III sites, respectively (underlined), which were used in a standard PCR reaction. The PCR products were cloned into a pGEM-T Easy vector and sequenced. *Bam*HI-*Hind*III fragments were obtained from these plasmids and subcloned into pMAL (which was opened with the same enzymes) (New England Biolabs).

*KIHOG1* was obtained from a pGEM-T Easy clone (Kawasaki *et al.*, 2008) as an *Eco*RI and *Xho*I fragment, and it was ligated into pYES2 opened with the same enzymes. SchOG1 was obtained from a pGEM-SchOG1 clone as a *Hind*III-*Xba*I fragment and subcloned into pYES2 opened at the same restriction sites. This step placed both HOG1 genes under the control of the *GAL1* promoter for *S. cerevisiae* expression. *KIHOG1* and SchOG1 were obtained from the pYES2 clones as *Hind*III-*Xho*I and *Hind*III-*Xba*I fragments respectively. These fragments were filled with Klenow and were ligated into YEpkDGal opened at *Eco*RI site (filled in) for expression in *K. lactis*.

The *ptp2-donNAT* construct was obtained by PCR employing the following hybrid primers: PTP2-Nat-F: tggtcgctatactgctgcttcaatcaccAAATAAAGAAC that contains 20 nucleotides complementary to the *donNAT* promoter (lowercase) and 22 nucleotides complementary to the *KIPTP2* gene, coordinates +2189 to +2210 (uppercase); PTP2-Nat-R: aagctaacaagatctggcgCACCTTCGATTAAGCTGATC that contains 19 nucleotides complementary to the *donNAT* terminator (lowercase) and 20 nucleotides complementary to the *KIPTP2* gene, coordinates +622 to +603 (uppercase). These primers were used to amplify the full *donNAT* cassette including its promoter using the pAG25 plasmid (obtained from Dr. Francisco Torres) as template. Extension of PTP2 recombinant ends was performed by PCR using the *donNAT* PCR product and primers: PTP2-F, +1 ATGAGAATGCAAATGAGTATG +21, and PTP2-R +2712 TTATATGTGCTCCTCAAATA +2691, using genomic DNA as template. The PTP2-*donNAT* final product contained the *donNAT* cassette flanked by 622 bp and 523 bp recombinant PTP2 ends.

#### Gene disruptions and gene integrations

*KISLN1*, *KIYPD1* and *KISSK1* gene disruptions were achieved by homologous recombination using the Ylp352 clones. Disruption of *KISLN1* and *KIYPD1* genes were performed in *K. lactis* diploid cells by introducing the *sln1::URA3* and *ypd1::URA3* cassettes, respectively, and selecting for *URA3*<sup>+</sup> transformants. Disruption of *KIPTP2* was performed in wild type and diploid *sln1::URA3/KISLN1* strains introducing the *ptp2::donNAT* cassette and selecting

for *donNAT* resistant transformants. Diploids were sporulated by incubation in sporulation medium for 24 to 48 h. Tetrad dissection was achieved by micromanipulation using standard protocols (Sherman *et al.*, 1986). Spores were germinated in YPD and tested for the *URA3* marker ( $\Delta KISLN1$ ,  $\Delta KIYPD1$ ,  $\Delta KIPTP2$ ) and *URA3* + *donNAT* resistance ( $\Delta KISLN1\Delta K(PTP2)$ ).

The *KISSK1* disruption was obtained by introducing the Ylp352-*KISSK1* plasmid (opened at the *Cla*I site) into the haploid MD2/1 strain and selecting for *URA3*<sup>+</sup> transformants.

Both  $\Delta KISHO1\Delta KISLN1$  and  $\Delta KIYPD1\Delta KIHOG1$  double mutants were obtained by introducing the *sln1::URA3* or *hog1::URA3* cassettes, by homologous recombination, into the 5-FOA resistant mutants  $\Delta KISHO1$  and  $\Delta KIHOG1$  respectively. All gene disruptions were confirmed by standard Southern blot hybridization. Disruption of the genes *KIHOG1*, *KIPBS2* and *KISHO1* has been previously described (Kawasaki *et al.*, 2008; Velázquez-Zavala *et al.*, 2015).

The  $\Delta Schog1$  mutant was obtained from the Yeast Knockout Collection. The integration of the *KIHOG1* gene was accomplished through homologous recombination by selecting for the hygromycin resistance cassette.

#### KIYpd1p and KISSk1p purification

The *E. coli* M15 strain was transformed with the pQE30-KIYPD1 construct. A purified clone was then grown overnight in 100 ml LB plus ampicillin medium at 37°C. When OD<sub>600</sub> reached 0.6, isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactoside (IPTG) was added to a final concentration of 1 mM, and the culture was shaken for 4 h at 37°C. The cells were harvested and resuspended in 8 ml of buffer A containing 1% NP40, 500 mM NaCl, 40 mM Tris-HCl, 5 mM imidazole. Bacteria were lysed by sonication, and the suspensions were centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C. Then, 1 ml of the supernatant was applied to a nickel resin (Novagen) that was previously washed, loaded and balanced with buffer A. KIYPD1-His purification was performed following the instructions of the Novagen His Bind purification kit. KIYpd1p-His was eluted with buffer A, which contained 100 mM imidazole.

The *E. coli* BL21 strain was transformed separately with pMAL-KISSK1 and pMAL-KISSK1<sup>DA</sup> constructs. The cells were grown in 250 ml of LB plus ampicillin at 37°C. When the OD<sub>600</sub> reached 0.5, IPTG was added to a final concentration of 0.3 mM, and the cultures were incubated for additional 12 h at 15°C with shaking. The cells were concentrated by centrifugation at 5000 rpm for 15 min at 4°C, and the supernatant was removed. Bacteria were resuspended in 20 ml of buffer B (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 7.5). The cells were lysed by sonication and the lysates were centrifuged at 5000 rpm for 15 min at 4°C. The supernatant (3 ml) was applied to the amylose resin. Mal-KISSk1 and Mal-KISSk1<sup>DA</sup> were purified according the New England Amylose Resin protocol.

#### Osmotic stress assays

The strains to be tested were grown overnight at 30°C on SD supplemented with the required amino acids. The cells

were washed and suspended in YPD or YPGal (for strains carrying plasmids) at  $OD_{600}$  0.1 and were grown until  $OD_{600}$  0.5. Serial dilutions were spotted on YPD or YPGal plates containing 0.5 or 0.75 M KCl and incubated at 30°C for 48 h.

#### Protein interactions

Assays of physical interactions were performed with a LexA-B42 two-hybrid system, as described previously (Ongay-Larios *et al.*, 2000). Strain EGY48 was transfected with two-hybrid plasmids and grown on an SD plate for 48 h at 30°C. Selected clones were streaked on SGal medium containing 1 mg/ml XGal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside; pH 7.0) and incubated for 24 h at 30°C. The protein interactions were determined by the ability of hybrid proteins to induce blue colonies through expression of a *LACZ* reporter. Quantification of  $\beta$ -galactosidase activity was done as described previously (Ongay-Larios *et al.*, 2000).

#### Phosphorylation assays and immunoblotting

The amounts of total and phosphorylated KIHog1p were detected in exponentially growing cells that were treated or not treated with different concentrations of KCl for different periods of time. The cells were then treated with 85% trichloroacetic acid (TCA). The cells were concentrated by centrifugation, and the supernatant was removed. The yeasts were lysed with SB-DTT buffer, as described previously (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015). When needed, protein concentration was determined by the Bradford assay. The proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-Polyvinylidene difluoride membrane (Millipore). The total and dually phosphorylated KIHog1p were detected with an anti-Hog1p antibody (yC-20 Santa Cruz Biotechnology) and with a monoclonal anti-phospho-p38 antibody (Cell Signaling Technology) respectively as previously described (Velázquez-Zavala *et al.*, 2015). K1Ypd1-His protein was detected with a conjugated anti-His6-Peroxidase antibody (Roche). All Westerns were repeated three times and representative blots are shown in figures. Total Hog1 was used as loading control.

#### In vitro phosphotransfer assay

*Escherichia coli* ArcB<sup>78-521</sup> (H1) and ArcB<sup>521-661</sup> (D1) domains were purified as described previously (Alvarez and Georgellis, 2010). K1Ypd1-His, Mal-KISsk1 and Mal-KISsk1<sup>DA</sup> were expressed and purified as described above. ArcB<sup>78-521</sup> (H1) protein was incubated with 0.05 mM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP (specific activity 2 Ci/mmol) in phosphorylation buffer (165 mM HEPES, 250 mM KCl, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM DTT, 50% glycerol, pH 7.5) at room temperature, and after 10 min ArcB<sup>521-661</sup> (D1), His-K1Ypd1 and Mal-KISsk1 or Mal-KISsk1<sup>DA</sup> were added to the reaction. Phosphotransfer reactions were carried out at RT for 10 min. The reactions were stopped by the addition of loading buffer (10% SDS, 0.2 M Tris pH 7.5, 10% glycerol, 0.14 M  $\beta$ -Mercaptoethanol, 0.04 mM of bromophenol blue). The

samples were subjected to SDS-PAGE, and the dried gels were analyzed with a phospho-imager scanner.

#### In vivo phosphotransfer assay

The *K. lactis*  $\Delta$ K1sln1 and  $\Delta$ K1ypd1 strains were transfected with YEpKDGal-HIS-K1YPD1 or empty YEpKDGalHis plasmids. Transfected cells were grown in liquid YPGal-Pi (phosphate-depleted selective) medium until  $OD_{600}$  0.6. The cells were centrifuged and resuspended in 1 ml of YPGal-Pi. *In vivo* K1Ypd1p labelling with [<sup>32</sup>P]orthophosphate and osmotic shock were conducted as previously described (Posas *et al.*, 1996). The cells were treated with 85% TCA, centrifuged briefly and the supernatant was removed by aspiration. The cells were suspended in lysis buffer (250 mM Tris pH 6.8, 0.5 M DTT, 10% SDS, 20% glycerol, 0.5% bromophenol blue) and lysed with 0.5-mm glass beads with 3 min of vigorous vortexing. The extracts were centrifuged for 1 min and the supernatant was transferred to a clean tube and incubated at 95°C for 5 min. Purified His-K1Ypd1 protein using a Nickel column was applied to 15% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nylon membranes. The membranes were rinsed with water, dried and analyzed with a phospho-imager scanner. In addition, His-Ypd1 was detected by Western blot using an anti-His antibody (Santa Cruz Biotechnology) according to the manufacturer's directions.

#### Glycerol and trehalose quantification

Intracellular glycerol was determined enzymatically as described previously (Bergmeyer, 1984). The cells were grown to  $OD_{600}$  of 0.5 in YPD at 30°C, washed and suspended in fresh YPD. All cell cultures were treated or not treated for with 0.4 M KCl for 6 h at 30°C, except for one aliquot of strain *sln-ts* which was incubated at 37°C. The cells were concentrated by centrifugation and washed with water. The cells were resuspended in 1 ml of water, boiled for 15 min and centrifuged at 14000 rpm for 2 min. Aliquots of supernatant were mixed with 137 mM Glycine, 686 mM Hydrazine, 1.37 mM MgCl<sub>2</sub>, 1.23 mM ATP, 0.49 mM NAD<sup>+</sup>, and 2–15  $\mu$ M of glycerol and 17 kU/l Glycerol-3-phosphate dehydrogenase and the  $OD_{340}$  was determined ( $A_1$ ). After addition of 0.85 kU/l glycerol kinase, a second reading was obtained ( $A_2$ ). The subtraction between  $A_2$  and  $A_1$  was used to calculate the glycerol concentration according to the formula  $C = [V/dv]\Delta A \text{ mmol/l}$ , where  $V$  is the final reaction volume;  $\epsilon$  is the NADH Molar Extinction Coefficient at 340 nm;  $d$  is the distance across the beam (cm) and  $v$  is the sample volume.

Trehalose accumulation was determined according to the protocol described previously (Hounsa *et al.*, 1998), except that cells were grown and treated with NaCl as described for the glycerol determination. Trehalase, glucose oxidase and radish peroxidase were obtained from SIGMA.

#### Acknowledgments

This research was supported by grant IN206513 from PAPIIT-DGAPA, UNAM and grant CB-166734 from CONACyT (México). MR received a student fellowship from CONACyT

and was a PhD student of the Biochemical Science Program while working in this project. The laboratory of FP is supported by grants from the Spanish Government BFU2015-64437 P and FEDER, the Catalan Government (2014 SGR 599) and supported by Fundación Botín, by Banco Santander through its Santander Universities Global Division. FP and EdN are recipients of an ICREA Acadèmia (Generalitat de Catalunya). We received invaluable technical assistance from Laia Subirana (UPF); Guadalupe Codiz and Minerva Mora at the Molecular Biology Unit (IFC); and from Gerardo Coello, Ana María Escalante and Juan Manuel Barbosa at the Computer Unit, (IFC).

### Conflict of Interest

The authors have no conflict of interest to declare.

### References

- Albertyn, J., Hohmann, S., Thevelein, J.M., and Prior, B.A. (1994) GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway. *Mol Cell Biol* **14**: 4135–4144.
- Alex, L.A., Korch, C., Selltreinikoff, C.P., and Simon, M.I. (1998) COS1, a two-component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *Candida albicans*. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7069–7073.
- Alvarez, A., and Georgellis, D. (2010) *In vitro* and *in vivo* analysis of the ArcB/A redox signalling pathway. *Methods Enzymol* **471**: 205–228.
- Aoyama, K., Aiba, H., and Mizuno, T. (2001) Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**: 2347–2352.
- Aoyama, K., Mitsubayashi, Y., Aiba, H., and Mizuno, T. (2000) Spy1, a histidine-containing phosphotransfer signaling protein, regulates the fission yeast cell cycle through the Mcs4 response regulator. *J Bacteriol* **182**: 4868–4874.
- Argüelles, J.C. (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeast: comparative analysis. *Arch Microbiol* **174**: 217–224.
- Bergmeyer, H.U. (1984) *Methods of Enzymatic Analysis: Metabolites 1: Carbohydrates*. Wiley-Blackwell USA, p. 701.
- Calera, J.A., and Calderone, R.A. (1999a) Flocculation of hyphae is associated with a deletion in the putative CaHK1 two component histidine kinase gene from *Candida albicans*. *Microbiology* **145**: 1431–1442.
- Calera, J.A., and Calderone, R.A. (1999b) Identification of a putative response regulator two-component phosphorelay gene (CaSSK1) from *Candida albicans*. *Yeast* **15**: 1243–1254.
- Calera, J.A., Herman, D., and Calderone, R.A. (2000a) Identification of YPD1, a gene of *Candida albicans* which encodes a two component phosphohistidine intermediate protein. *Yeast* **16**: 1053–1059.
- Calera, J.A., Zhao, X.J., and Calderone, R.A. (2000b) Defective hyphal development and avirulence caused by a deletion of the SSK1 response regulator gene in *Candida albicans*. *Infect Immun* **68**: 518–525.
- Chauhan, N., Inglis, D., Roman, E., Pla, J., Li, D., Calera, J.A., and Calderone, R.A. (2003) *Candida albicans* response regulator gene SSK1 regulates a subset of genes whose functions are associated with cell wall biosynthesis and adaptation to oxidative stress. *Eukaryot Cell* **2**: 1018–1024.
- Cialfi, S., Uccelletti, D., Carducci, A., Wésolowski-Louvel, M., Mancini, P., Heipieper, H.J., and Saliola, M. (2011) KIH1 is a component of glycerol response pathways in the milk yeast *Kluyveromyces lactis*. *Microbiology* **157**: 1509–1518.
- Clotet, J., and Posas, F. (2007) Control of cell cycle in response to osmotic stress: lessons from yeast. *Methods Enzymol* **428**: 63–76.
- Degols, G., Shiozaki, K., and Russell, P. (1996) Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **16**: 2870–2877.
- de Nadal, E., and Posas, F. (2015) Osmotic stress-induced gene expression – a model to understand how stress-activated protein kinases (SAPKs) regulate transcription. *FEBS J* **282**: 3275–3285.
- Desai, C., Mavrianos, J., and Chauhan, N. (2011) *Candida albicans* SRR1, a putative two-component response regulator gene, is required for stress adaptation, morphogenesis and virulence. *Eukaryot Cell* **10**: 1370–1374.
- George, V.T., Brooks, G., and Humphrey, T.C. (2007) Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Mol Biol Cell* **18**: 4168–4179.
- Georgellis, D., Lynch, S.A., and Lin, E.C.C. (1997) *In vitro* phosphorylation study of two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **179**: 5429–5435.
- Golemis, E.A., Serebriiskii, Gyuris, I.J., and Brent, R. (1997) Interaction trap/two-hybrid system to identify interacting proteins. *Curr. Protoc. Neurosci* Chapter 4: 4.4.1–4.4.36.
- Gustin, M.C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. (1998) MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1264–1300.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300–372.
- Horie, T., Tatebayashi, K., Yamada, R., and Saito, H. (2008) Phosphorylated Ssk1 prevents unphosphorylated Ssk1 from activating the Ssk2 mitogen-activated protein kinase in the yeast high-osmolarity glycerol osmoregulatory pathway. *Mol Cell Biol* **28**: 5172–5183.
- Hounsa, C.-G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S., and Prior, B.A. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144**: 671–680.
- Kawasaki, L., Castañeda-Bueno, M., Sánchez-Paredes, E., Velázquez-Zavala, N., Torres-Quiroz, F., Ongay-Larios, L., and Coria, R. (2008) Protein kinases involved in mating and osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* **7**: 78–85.
- Krantz, M., Becht, E., and Hohmann, S. (2006) Comparative genomics of the HOG-signalling system in fungi. *Curr Genet* **49**: 137–151.

- Macia, J., Regot, S., Peeters, T., Conde, N., Solé, R., and Posas, F. (2009) Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Sci Signal* 2: ra13.
- Maeda, T., Takekawa, M., and Saito, H. (1995) Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* 269: 554–558.
- Maeda, T., Wurgler-Murphy, S., and Saito, H. (1994) A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast. *Nature* 369: 242–245.
- Martín, H., Flández, M., Nombela, C., and Molina, M. (2005) Protein phosphatases in MAPK signalling: we keep learning from yeast. *Mol Microbiol* 58: 6–16.
- Mattison, C.P., and Ota, I.M. (2000) Two protein tyrosine phosphatases, Ptp2 and Ptp3, modulate the subcellular localization of the Hog1 MAP kinase in yeast. *Genes Dev* 14: 1229–1235.
- Nagahashi, S., Mio, T., Ono, N., Yamada-Okabe, T., Arisawa, M., Bussey, H., and Yamada-Okabe, H. (1998) Isolation of CaSLN1 and CaNIK1, the genes for osmosensing histidine kinase homologues, from the pathogenic fungus *Candida albicans*. *Microbiology* 144: 425–432.
- Nakamichi, N., Yamada, H., Aoyama, K., Ohmiya, R., Aiba, H., and Mizuna, T. (2002) His-to-asp phosphorelay circuitry for regulation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 2662–2672.
- Ongay-Larios, L., Saviñón-Tejeda, A., Williamson, M., Durán-Avelar, M.J., and Coria, R. (2000) The Leu132 of the Ste4(G $\beta$ ) subunit is essential for proper coupling of the G protein with the Ste2  $\alpha$ -factor receptor during the mating pheromone response in yeast. *FEBS Lett* 467: 22–26.
- Ostrander, D.B., and Gorman, J.A. (1999) The extracellular domain of the *Saccharomyces cerevisiae* Sln1p membrane osmolarity sensor is necessary for kinase activity. *J Bacteriol* 181: 527–2534.
- Parrou, J.L., Teste, M.-A., and Francois, J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* 143: 1891–1900.
- Posas, F., and Saito, H. (1997) Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* 276: 1702–1705.
- Posas, F., and Saito, H. (1998) Activation of the yeast SSK2 MAP kinase kinase kinase by the SSK1 two-component response regulator. *EMBO J* 17: 1385–1394.
- Posas, F., Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., Thai, T.C., and Saito, H. (1996) Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* 86: 865–875.
- Reiser, V., Raitt, D.C., and Saito, H. (2003) Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *J Cell Biol* 161: 1035–1040.
- Reiser, V., Salah, S.M., and Ammerer, G. (2000) Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat Cell Biol* 2: 620–627.
- Saito, H., and Posas, F. (2012) Response to hyperosmotic stress. *Genetics* 192: 289–318.
- Sampedro, J.G., and Uribe, S. (2004) Trehalose-enzyme interactions result in structure stabilization and activity inhibition. The role of viscosity. *Mol Cell Biochem* 256/257: 319–327.
- Santos, J.L., and Shiozaki, K. (2001) Fungal histidine kinases. *Science STKE* 2001: re1.
- Saviñón-Tejeda, A., Ongay-Larios, L., Valdés-Rodríguez, J., and Coria, R. (2001) The *KIGpa1* gene encodes a G-protein  $\alpha$  subunit that is a positive control element in the mating pathway of the budding yeast *Kluyveromyces lactis*. *J Bacteriol* 183: 229–234.
- Sharifian, H., Lampert, F., Stojanovski, K., Regot, S., Vaga, S., Buser, R., et al. (2015) Parallel feedback loops control the basal activity of the HOG MAPK signaling cascade. *Integr Biol (Camb)* 7: 412–422.
- Sherman, F., Fink, G.R., and Hicks, J. (1996) *Laboratory Course Manual for Methods in Yeast Genetics*. Plainview, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Singh, P., Chauhan, N., Ghosh, A., Dixon, F., and Calderone, R.A. (2004) SKN7 of *Candida albicans*: mutant construction and phenotype analysis. *Infect Immun* 72: 2390–2394.
- Velázquez-Zavala, N., Rodríguez-González, M., Navarro-Olmos, R., Ongay-Larios, L., Kawasaki, L., Torres-Quiroz, F., and Coria, R. (2015) Ineffective phosphorylation of mitogen-activated protein kinase Hog1p in response to high osmotic stress in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Eukaryot Cell* 14: 922–930.
- Vendrell, A., Martínez-Pastor, M., González-Nowo, A., Pascual-Ahuir, A., Sinclair, D.A., Proft, M., and Posas, F. (2011) Sir2 histone deacetylase prevents programmed cell death caused by sustained activation of the hog1 stress-activated protein kinase. *EMBO Rep* 12: 1062–1068.
- Warner, J. (1991) Labeling of RNA and phosphoproteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 246: 423–428.
- Wolfe, K.H., and Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* 387: 708–713.
- Yamada-Okabe, T., Mio, T., Ono, N., Kashima, Y., Matsui, M., Arisawa, M., and Yamada-Okabe, H. (1999) Roles of three histidine kinase genes in hyphal development and virulence of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J Bacteriol* 181: 7243–7247.

### Supporting information

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.