



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
GENÉTICA MOLECULAR

**Activación de la MAPK Hog1 por las MAP3Ks Ssk2/Ssk22, en la  
ausencia de los osmosensores, no es suficiente para  
desencadenar la osmoadaptación en *Saccharomyces Cerevisiae*.**

**TESIS**  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:  
**M. en C. Aracely Berenice Vázquez Ibarra**

**TUTOR PRINCIPAL**  
Dr. Roberto Coria Ortega  
Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**  
Dr. Jesús Aguirre Linares  
Instituto de Fisiología Celular  
Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

Dr. Jorge Nieto Sotelo  
Instituto de Biología  
Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

Ciudad Universitaria, Cd. Mx, México, Junio 2019



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.

## **AGRADECIMIENTOS**

---

Esta tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Coria Ortega del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en la Cd. MX, México.

La realización de este trabajo recibió la supervisión del comité tutorial, constituido, para el programa de Doctorado en Ciencias Bioquímicas (UNAM), por el Dr. Jesús Aguirre Linares y por el Dr. Jorge Nieto Sotelo.

Aracely Berenice Vázquez Ibarra recibió durante el desarrollo de esta tesis los apoyos CONACyT: CB-254078; PAPIIT, DGAPA, UNAM: IN210616 ; Posgrado en Ciencias Bioquímicas PAEP.

Se reconoce el apoyo técnico de la Dr. Laura Kawasaki y de la técnico Ma. Teresa Lara Ortíz. Se agradece el apoyo y participación de la Unidad de Biología Molecular y de la Unidad de Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM, en la CDMX, México. En particular agradezco el apoyo de la Dr. Laura Ongay Larios, la Lic. María Guadalupe Códiz Huerta, la Lic. Minerva Mora Cabrera, el M. en C. Gerardo Coello Coutiño, la M en C. Ana María Escalante Monsalvo, al Ing. Juan Manuel Barbosa. También agradezco al personal del taller de mantenimiento el Ing. Manuel Ortíz Benavides y al Ing. Aurey Galván Lobato

El jurado que evaluó esta tesis para el examen de obtención de grado fue el siguiente:

Presidente: Dra. González Manjarrez María Alicia., IFC, UNAM.

Secretario: Dr. Trujillo Roldán Mauricio Alberto, IIBO, UNAM.

Vocal: Dr. Pardo Vázquez Juan Pablo, Facultad de Medicina, UNAM

Vocal: Dr. Torres Quiroz José Francisco, IFC, UNAM.

Vocal: Dr. Guevara García Ángel Arturo, IBT, UNAM.

# INDICE

<b>INDICE DE ABREVIATURAS</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN</b>	<b>6</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>7</b>
	Pag.
<b>1.0 INTRODUCCIÓN</b>	<b>8</b>
1.1 <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> y su entorno variable	8
1.2 La vía de HOG.	10
1.3 Internalización nuclear de Hog1 y activación de genes de osmo-respuesta	12
1.4 Regulación del ciclo celular por Hog1	15
1.4.1 Regulación de la fase G1/S en <i>S.cerevisiae</i> .	16
1.4.1.1 Regulación de la fase G1/S por Hog1	17
1.4.2 Control de la fase S en <i>S.cerevisiae</i>	18
1.4.2.1 Control de la fase S por Hog1 en un estrés hiperosmótico	18
1.4.3 Control de la fase G2/M en <i>S.cerevisiae</i>	18
1.4.3.1 Control de la fase G2/M por Hog1	19
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	<b>21</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
<b>4. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>23</b>
4.1. Cepas	23
4.2. Oligonucleótidos	23
4.3. Plásmidos	25
4.4. Anticuerpos utilizados	26
4.5 Antibióticos, ácidos, inhibidores y colorantes	27
4.6. Medios de crecimiento	28
4.7. Condiciones de crecimiento	29
4.8. Ensayos de sensibilidad en caja	30
4.9. Fusión del promotor <i>STL1</i> al gen <i>LACZ</i>	30
4.10. Western-blot y extracción de proteínas	30
4.11. Northern Blot	31
4.12. Determinación de la Actividad de $\beta$ -galactosidasa	32
4.12.1. Obtención del extracto celular	32
4.12.1.1. Ensayo de $\beta$ -galactosidasa	32
4.13. Determinación de glicerol intracelular	32
4.13.1. Preparación del extracto libre de células	33
4.13.1.1. Cuantificación de glicerol en extractos libres de células	33
4.14. geles de Mn <sup>2+</sup> -Phos-tag SDS/PAGE	33
4.15. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)	33
4.16. Microscopía de fluorescencia	34

4.17. Ciclo celular y sincronización de cultivos	35
4.17.1. Sincronización en fase S con hidroxurea	35
4.17.2 Sincronización en fase G2/M con nocodazol	36
4.17.3. Aislación de células en fase G1 mediante elutriación	36
<b>5. RESULTADOS</b>	37
5.1. Hog1 es fosforilado en una mutante <i>ssk1Δste11Δ</i> en presencia de estrés hiperosmótico, y su fosforilación es dependiente de Ssk2/Ssk22	37
5.2. La inactivación de <i>SSK1</i> y <i>STE11</i> afecta el crecimiento celular en presencia de estrés hiperosmótico	40
5.3. La fosfatasa Ptp2 participa en la desfosforilación de Hog1 en la mutante <i>ssk1Δste11Δ</i>	42
5.4. Hog1 es internalizado al núcleo en la mutante <i>ssk1Δste11Δ</i> en presencia de estrés hiperosmótico	43
5.5. La mutante <i>ssk1Δste11Δ</i> no acumula glicerol y no es capaz de unirse a cromatina e inducir la expresión de genes de osmo-respuesta	46
5.6. La ausencia de los genes <i>SSK1</i> y <i>STE11</i> inducen la acumulación del ciclo celular en la fase G2/M.	48
5.7. La mutante <i>ssk1Δste11Δ</i> presenta una G1 más rápida que la WT bajo condiciones isotónicas, y presenta un retraso en la adaptación a estrés hiperosmótico.	50
5.8. La liberación de la fase S en la mutante <i>ssk1Δste11Δ</i> es equivalente al de la mutante <i>hog1Δ</i> en condiciones iso-osmóticas, y ambas presentan una falta de adaptación a estrés hiperosmótico.	53
5.9. Cuando el estrés osmótico ocurre en la fase G2/M, la mutante <i>ssk1Δste11Δ</i> retrasa la progresión del ciclo celular como una mutante <i>hog1Δ</i> .	54
<b>6. DISCUSIÓN</b>	56
<b>7. CONCLUSIONES</b>	62
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	63

## INDICE DE ABREVIATURAS

---

<b>HOG</b>	High Osmolarity Glycerol
<b>MAPK</b>	<i>Proteína quinasa activada por mitógenos</i>
<b>Ser</b>	Aminoácido de Serina
<b>Thr</b>	Aminoácido de Treonina
<b>Tir</b>	Aminoácido de Tirosina
<b>CDK</b>	Quinasa dependiente de ciclina
<b>MCP</b>	punto de control morfogénico
<b>NaCl</b>	Cloruro de Sodio
<b>NADH</b>	Nicotinamida adenina dinucleotido
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato

<b>SDS</b>	Dodecilsulfato sódico
<b>ChiP</b>	Inmunoprecipitación de la cromatina
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>r.p.m</b>	Revoluciones por minuto
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)
<b>ADN</b>	Ácido Dexosirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ORF</b>	Marco abierto de lectura (Open Reading Frame)

## RESUMEN

---

En *S. cerevisiae*, la vía de respuesta al estrés osmótico HOG, es una ruta de señalización que permite a las células generar una respuesta adaptativa de supervivencia ante un aumento en la osmolaridad del medio extracelular. Esta vía se encuentra formada por dos ramas de señalización, la rama de Sln1 y la rama de Hkr1/Msb2-Sho1; ambas ramas de señalización son capaces de desencadenar fosforilación e internalización nuclear de Hog1. En el núcleo, Hog1 regula la transcripción de genes y la progresión del ciclo celular. Esto permite a la célula responder y adaptarse a condiciones hiperosmóticas. En este estudio se muestra que la inactivación de ambas ramas a nivel de Ssk1 y Ste11 respectivamente, provoca que la célula no pueda responder adecuadamente al estrés hiperosmótico. Sin embargo, en estas condiciones, Hog1 es fosforilado y transportado al núcleo, lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de activación en Hog1. En la mutante *ssk1Δste11Δ*, Hog1 fosforilado no se asocia a cromatina y tampoco activa la transcripción de genes de respuesta a osmoestrés. En esta mutante Hog1 también es incapaz de inducir la producción de glicerol al nivel de la cepa silvestre. La inactivación de la fosfatasa Ptp2 induce una recuperación moderada del crecimiento de la mutante *ssk1Δste11Δ* en medios hiperosmóticos. Aun cuando Hog1 se fosforila en la mutante *ssk1Δste11Δ* en condiciones de estrés, no es capaz de regular el ciclo celular. Todas estas observaciones indican que la fosforilación de Hog1 por mecanismos que no son canónicos no es suficiente para desencadenar una respuesta protectora al estrés hiperosmótico.

## ABSTRACT

---

Yeast cells respond to hyperosmotic stress by activating the high-osmolarity glycerol (HOG) pathway, which consists of two branches, Hkr1/Msb2-Sho1 and Sln1, which trigger phosphorylation and nuclear internalization of the Hog1 mitogen-activated protein kinase. In the nucleus, Hog1 regulates gene transcription and cell cycle progression, which allows the cell to respond and adapt to hyperosmotic conditions. This study demonstrates that the uncoupling of the known sensors of both branches of the pathway at the level of Ssk1 and Ste11 impairs cell growth in hyperosmotic medium. However, under these conditions, Hog1 was still phosphorylated and internalized into the nucleus, suggesting the existence of an alternative Hog1 activation mechanism. In the *ssk1Δste11Δ* mutant, phosphorylated Hog1 failed to associate with chromatin and to activate transcription of canonical hyperosmolarity-responsive genes. Accordingly, Hog1 also failed to induce glycerol production at the levels of a wild-type strain. Inactivation of the Ptp2 phosphatase moderately rescued growth impairment of the *ssk1Δste11Δ* mutant under hyperosmotic conditions, indicating that downregulation of the HOG pathway only partially explains the phenotypes displayed by the *ssk1Δste11Δ* mutant. Cell cycle defects were also observed in response to stress when Hog1 was phosphorylated in the *ssk1Δste11Δ* mutant. Taken together, these observations indicate that Hog1 phosphorylation by noncanonical upstream mechanisms is not enough to trigger a protective response to hyperosmotic stress.

## 1.- INTRODUCCIÓN

---

### 1.1 *Saccharomyces cerevisiae* y su entorno variable.

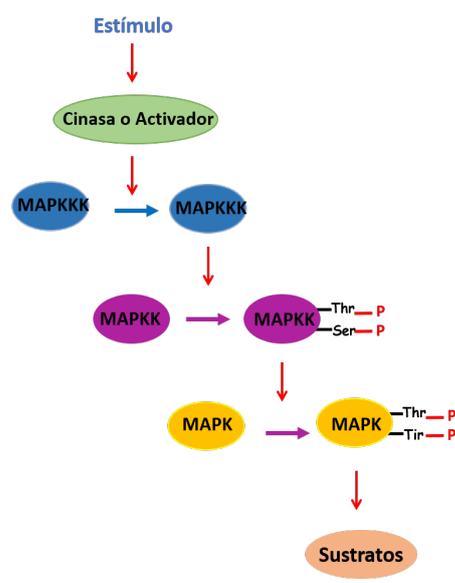
La levadura *Saccharomyces cerevisiae* es un hongo unicelular eucarionte ubicuo. Su genoma contiene 12 156 677 pares de bases (pb), 6275 marcos de lectura abiertos (ORF) y 16 cromosomas; se estima que el 23% de su genoma es similar al genoma humano. El ciclo de vida de *S.cerevisiae* se alterna entre células haploides y diploides. No obstante, ambos tipos celulares son estables y se pueden reproducir de forma asexual mediante mitosis y división por gemación; sin embargo, el apareamiento sexual sólo ocurre entre las células haploides de distintos sexos (tipo sexual **a** y tipo sexual **α**). Cuando las células **a** y **α** se aparean generan una sola célula, en la cual ocurre una fusión de núcleos, formando un diploide estable que es capaz de reproducirse asexualmente. Cuando las condiciones exteriores son desfavorables para las células diploides entran a una fase de división meiótica lo que produce cuatro esporas haploides, dos de las cuales serán de tipo sexual **a** y las otras dos de tipo sexual **α** [1].

*S. cerevisiae* vive como saprófito en plantas y materia animal. Como fuente de energía y carbón cataboliza azúcares, polioles, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos. La levadura se encuentra constantemente expuesta a un ambiente altamente variable de temperatura, de pH, de radiación, de disponibilidad del oxígeno y de nutrientes y especialmente a cambios en la actividad del agua y en la concentración de solutos [2]. La actividad de agua se define como el potencial químico del agua libre en solución. Los organismos para sobrevivir a cambios repentinos en la actividad del agua han desarrollado mecanismos de respuesta de adaptación en los que participan: canales de membrana, la actividad de sensores, osmolitos compatibles, iones, proteínas que transmiten la señal, etc [3].

En un ambiente isotónico, los organismos mantienen una menor actividad del agua en el citosol y en sus organelos que en la del medio circundante, por lo tanto, la célula conserva un volumen celular apropiado y la cantidad adecuada de agua libre y de agua unida a

moléculas para la correcta función celular. En estas circunstancias se mantiene un estado estable entre la presión osmótica y la presión de turgencia [3, 4]. Sin embargo, cuando las condiciones del medio extracelular son hiperosmóticas, la célula pierde agua reduciendo así su tamaño. Para hacer frente al aumento de la osmolaridad, las células inician un complejo programa de adaptación que incluye entre otras cosas una interrupción temporal del ciclo celular, ajustes en los patrones de transcripción y de traducción, y modificaciones en la síntesis y en la retención del glicerol. Estas respuestas de adaptación se regulan principalmente por la vía de señalización de HOG (del inglés High Osmolarity Glycerol). El elemento central de la vía de HOG es la MAP cinasa (MAPK) Hog1 [5, 6].

Las cascadas de MAP cinasa se encuentran presentes en todas las células eucariontes. Estas cascadas se activan por una variedad de estímulos que inducen respuestas específicas adaptativas. La cascada de MAPK se forma por tres cinasas que se activan secuencialmente: una MAPKKK activa a una MAPKK fosforilando los residuos de Ser y Thr que se encuentran en su sitio de activación. La MAPKK activada fosforila a los residuos de Thr y Tir que se encuentran en el sitio de activación de la MAPK. Una vez activa la MAPK fosforila varios sustratos para transmitir efectivamente la señal. La MAPKKK puede ser activada por la fosforilación de una MAPKKKK ó por la unión de proteínas activadoras (**Figura 1**) [7].

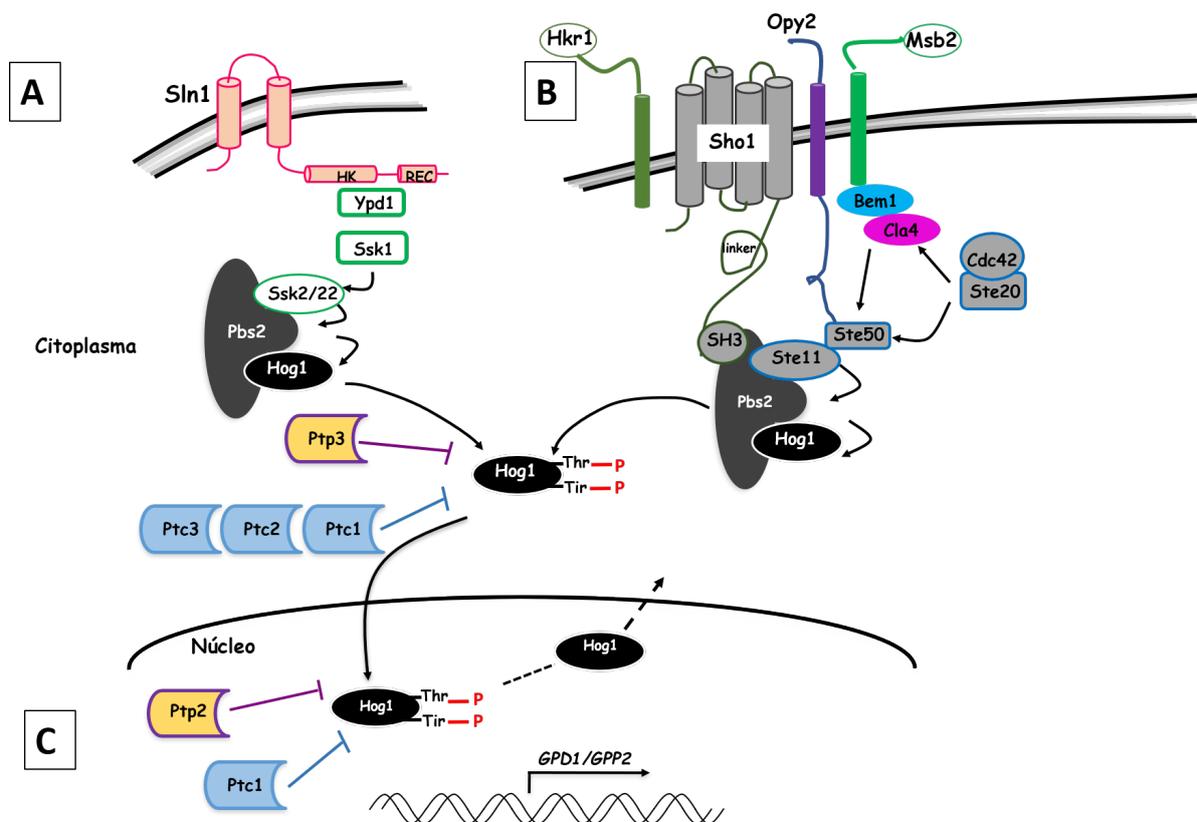


**Figura 1. Esquema de las cascadas de MAP cinasas (MAPK).** La MAPKKK puede ser activada por la fosforilación de una MAPKKK o por la unión de proteínas. Cinasas son activadas en secuencia por la fosforilación de sitios específicos (Ser, Thr, Tir). Figura Modificada de Saito, Y. Posas., 2012 [6].

## 1.2 La vía de HOG.

La fosforilación y la activación de Hog1 es controlada por dos ramas, la rama de Sln1 y la de Sho1, las cuales convergen sobre la MAPKK Pbs2 (**Figura 2**) [8]. La rama de Sln1 es más sensible a cambios osmóticos y puede activar completamente a Hog1 en ausencia de la rama de Sho1 [9]. La rama de Sln1 es controlada por el osmosensor Sln1 (**Figura 2A**); Sln1 es una proteína homóloga al osmosensor EnvZ de los sistemas de dos componentes de las bacterias. Sln1 detecta cambios de tensión en la membrana y/o cambios en la presión de turgencia [10]. Sln1, Ypd1 y Ssk1 forman un sistema de fosforelevo similar a los sistemas de dos componentes de procariontes [11]. La histidina cinasa (HK) Sln1 es una proteína de 1,220 aminoácidos que en condiciones isotónicas se autofosforila en la His-576 de su dominio de histidina cinasa. Este fosfato es luego transferido al Asp-1144 del dominio receptor (REC) que se encuentra en la región C-terminal de la misma proteína. En el N-terminal, Sln1 cuenta con dos segmentos transmembranales, un asa y una región de unión, [12]. El grupo fosfato del Asp-1144 en el dominio receptor de Sln1, es transferido a la His-64 de Ypd1 que es una proteína histidina cinasa de fosfotransferencia (HPT). Ypd1 es una proteína de 167 aminoácidos; el grupo fosfato de Ypd1 se transfiere posteriormente al Asp-554 que se encuentra en el dominio receptor (REC) de la proteína reguladora de la respuesta Ssk1 [13]. Ssk1 es una proteína de 712 aminoácidos que bajo condiciones isotónicas se encuentra fosforilada, sin embargo, cuando la levadura se expone a concentraciones altas de osmolaridad externa la transferencia de grupos fosfatos se ve interrumpida, por lo tanto, Ssk1 se desfosforila y de esta manera induce la activación de las proteínas paralogas y redundantes Ssk2 y Ssk22 [11, 14]. La unión de Ssk1 con Ssk2 induce un cambio conformacional en Ssk2, promoviendo la exposición del dominio catalítico que en condiciones normales se encuentra inhibido por su dominio auto-inhibitorio (AID). El dominio catalítico promueve entonces la autofosforilación de Ssk2 [14]. Las proteínas cinasas Ssk2 y Ssk22 interaccionan con Pbs2 mediante la presencia de un sitio específico de acoplamiento en Pbs2 localizado en la región N-terminal [15]. Esta interacción estimula la fosforilación de Pbs2 en los residuos Ser-514 y Thr-518. Una vez que Pbs2 se fosforila, se

activa y esto promueve su asociación con Hog1 fosforilando la Thr-147 y la Tir-176 que se encuentran en el asa de activación. Esto induce finalmente la internalización nuclear de Hog1 que modula la respuesta transcripcional al estímulo hiperósmótico (**Figura 2A y 2C**) [16].



**Figura 2. Esquema de la vía de HOG.** La vía de HOG se activa por condiciones hiperósmóticas; dos ramas, Sho1 y Sln1, detectan estas condiciones. **(A)** La rama Sln1 mediante Ssk1 activa a Ssk2 y Ssk22. **(B)** La rama Sho1 está compuesta por cuatro proteínas transmembranales, Opy2, Hkr1, Msb2 y Sho1. En la membrana plasmática, la proteína G pequeña Cdc42 y la proteína cinasa Ste20 activan el complejo formado por Ste50, Ste11, y Pbs2. Las ramas Sho1 y Sln1 convergen en Pbs2, que sirve como andamio para Ste11, Ssk2, Ssk22 y la Hog1. **(C)** Hog1 activado se internaliza en el núcleo e induce la transcripción de genes, la producción de glicerol y la detención del ciclo celular. Cuando Hog1 se inactiva se transporta de regreso al citoplasma. Las proteínas responsables de la inactivación de Hog1 son las proteínas fosfatasa de tirosina y de treonina. Ptp2 y Ptp3, inactivan a Hog1 por la desfosforilación del residuo de Tir, mientras que las fosfatasa Ptc1, Ptc2 y Ptc3

desfosforilan el residuo de Thr. (Las flechas indican un flujo de señal positiva, mientras que las barras romas representan una regulación negativa).

En presencia de un estrés hiperosmótico, la respuesta de la rama de Sho1 es iniciada por los osmosensores transmembranales de mucina Msb2 y Hkr1 (**Figura 2B**) [17]; estos osmosensores de mucina conectan al interior de la célula con la matriz extracelular. La activación de la vía de Hog1 por Msb2 requiere de la proteína de andamiaje Bem1 y del citoesqueleto de actina. Bem1 se une al dominio citoplasmático de Msb2 para reclutar en la membrana a las cinasas Ste20 y Cla4. Posteriormente estas cinasas activan la MAPKKK Ste11. El dominio citoplasmático de Hkr1 también contribuye a la activación de Ste11 por Ste20, pero a través de un mecanismo que no involucra a Bem1 ni al citoesqueleto de actina. El co-osmosensor Sho1 también interacciona con Msb2 y Hkr1 promoviendo la unión de Ste20, Cla4 y la proteína G pequeña Cdc42 [18]. Sho1 también recluta en la superficie celular a Ste11 y a Pbs2 [19]. Sho1 y Pbs2 interactúan a través de una región rica en prolinas que se encuentra alrededor de la posición 96 en el N-terminal de Pbs2 y a través del dominio SH3 localizado en el C-terminal hidrofílico de Sho1 [8, 20]. Ste11 se localiza en la membrana a través de la proteína adaptadora Ste50 que a su vez se une a la proteína Opy2 (**Figura 2B**).

Una activación eficiente de Pbs2 por Ste11 parece requerir además de su localización en la membrana, el acoplamiento directo o indirecto entre ambas. Se sabe que Ste11/Pbs2, Ste11/Sho1, y posiblemente Opy2/Sho1 se unen una a la otra formando complejos [20-22]. Esto quiere decir que se requieren interacciones múltiples entre los complejos Opy2/Ste50/Ste11 y los complejos Sho1/Pbs2 para la eficiente activación del sistema. La exitosa ejecución del programa de señalización conduce eventualmente a la disociación del complejo, aparentemente por la fosforilación de Pbs2 y la fosforilación de Hog1, y quizás también por el cambio conformacional de Pbs2 debido a la unión con el ATP [23].

### **1.3 Internalización nuclear de Hog1 y activación de genes de osmo-respuesta**

El transporte de Hog1 al núcleo se relaciona con la fosforilación dual de Hog1 en la Thr-174 y la Tyr-176 (**Figura 2 C**). También depende de la actividad de la GTPasa Ran (Gsp2) y de la importina Nmd5p (karyopherin-beta homolog) [24,25]. La localización nuclear de Hog1 es necesaria para regular la expresión de genes que codifican para las enzimas involucradas en

la síntesis de glicerol. Estas enzimas son, las glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (Gpd1) y las glicerol-3 fosfatasas (Gpp1 y Gpp2). Los genes que codifican para estas enzimas se sobreexpresan en estrés hiperosmótico, mientras que su inactivación genera una alta sensibilidad al estrés [26]. El glicerol es sintetizado a partir de la dihidroxiacetona fosfato (DHAP) por dos etapas enzimáticas: en la primera etapa las glicerol 3 fosfato deshidrogenas (Gpd1/Gpd2) reducen a la DHAP usando NADH como agente reductor; en la segunda etapa las glicerol-3 fosfatasas (Gpp1/Gpp2), remueven el grupo fosfato del glicerol-3-P para generar glicerol [27-29] (**Figura 3**).

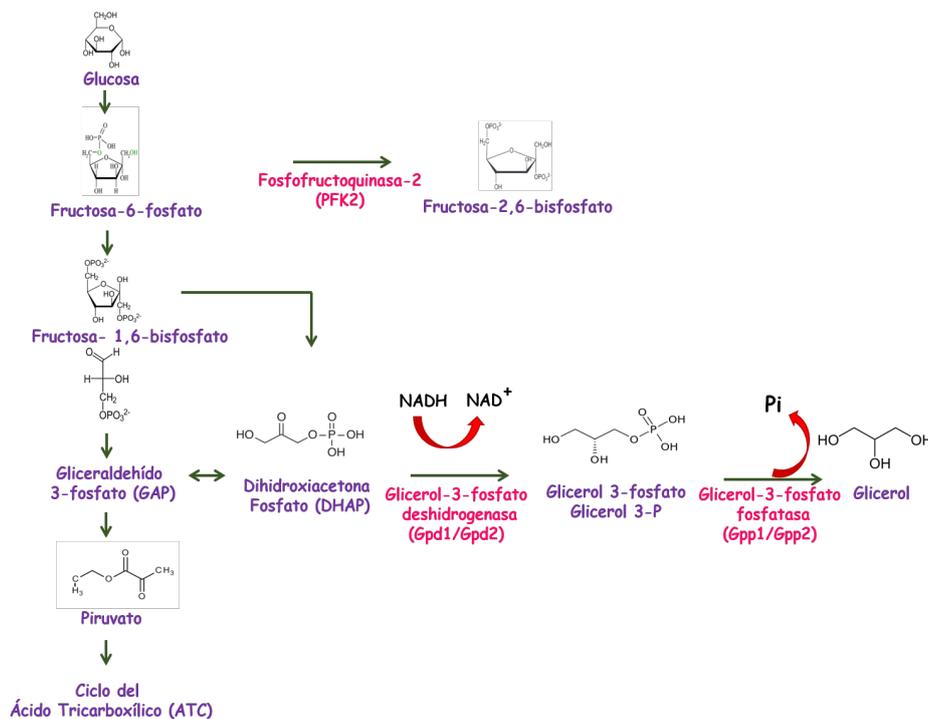
La acumulación de glicerol durante una respuesta adaptativa al estrés también utiliza otros mecanismos como el control del flujo de glicerol a través de la membrana plasmática. Para esto hay dos proteínas importantes. La primera es el simportador Stl1 que transporta glicerol y protones simultáneamente. El gen *STL1* se sobreexpresa significativamente de manera dependiente de Hog1 y en respuesta a un estrés hiperosmótico. El simportador Stl1 contribuye a la acumulación intracelular de glicerol importándolo del medio exterior [30]. La segunda proteína es Fps1 que ayuda a aumentar la concentración intracelular de glicerol. Fps1 es un canal transmembranal de la familia de las acuaporinas. En respuesta a estrés osmótico el poro de Fps1 se cierra para mantener el glicerol intracelular [31].

La activación de Hog1 durante un estrés hiperosmótico también afecta la regulación de genes que participan en procesos de antioxidación y de detoxificación [32, 33]. Los genes involucrados en los mecanismos antes mencionados forman parte del metabolismo redox, de la función mitocondrial, y de la biosíntesis de compuestos antioxidantes como lo son la *TRX2* (Isoenzima tiorredoxina citoplasmática), la *CTT1* (Catalasa citosólica T), la *GRE3* (Aldosa reductasa) y la *SOD2* (Manganeso superóxido dismutasa). También se regulan los genes *HSP12*, *HSP104* y *HSP42* los cuales codifican chaperonas que protegen a la célula del daño por acumulación de proteínas desnaturalizadas [34-36].

Cuando la célula se recupera del estrés hiperosmótico por la restauración del balance iónico provocado por la acumulación de glicerol y otros osmolitos [27,37,38], Hog1 es desfosforilado y exportado al citoplasma (**Figura 2C**). La exportación de Hog1 requiere la actividad del homólogo de importina  $\beta$  XPO1 [39,24]. Las proteínas responsables de la inactivación de Hog1 son las fosfatasas de Ser/Thr tipo 2C y las fosfatasas de Tir o PTPs. Las

fosfatasa de Ser/Thr incluye a la Ptc1, a la Ptc2 y a la Ptc3, las cuales desfosforilan la Thr-174 de Hog1 [40,41]. Las fosfatasa de tirosina son la Ptp2 nuclear y la Ptp3 citoplasmática, las cuales desfosforilan la Tir-176 [42]. La Ptp2 parece ser la principal fosfatasa responsable de la desfosforilación de Hog1 y la Ptp3 es más importante para la desfosforilación de la MAPK Fus3 que está involucrada en la respuesta a feromonas sexuales [43]. Además, las fosfatasa Ptp2 y Ptp3 actúan como proteínas adaptadoras de Hog1 en el núcleo y en el citoplasma respectivamente [42].

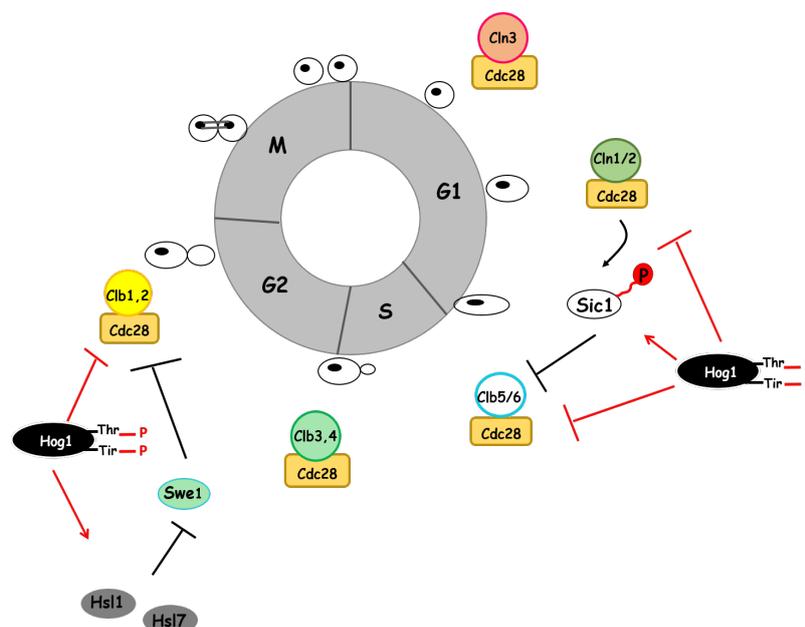
Otras funciones que desempeña Hog1 en respuesta al estrés hiperosmótico es la regulación de la expresión de un subgrupo de genes de osmo-respuesta a través de los factores de transcripción Hot1, Smp1, Msn1, Msn2 y Msn4 y del represor transcripcional Sko1 [44-47]. Todos estos factores pueden actuar solos o en combinación en varios promotores. Los factores de transcripción Msn2 y Msn4 mayormente controlan la inducción de genes ESR (del inglés Environmental Stress Response) uniéndose a elementos de respuesta a estrés (STRE) [48,49]. Por otra parte, el factor de transcripción Hot1 regula la expresión de un pequeño subgrupo de genes dependientes de Hog1. Estos genes incluyen a *GPD1* y *GPP2*, así como también a *STL1* [50,51]. Además, el reclutamiento de Hog1 al promotor de *CTT1* requiere de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 [52].



**Figura 3. Ruta metabólica del Glicerol.** El Glicerol es sintetizado de un intermediario de la glicolisis, dihidroxiacetona fosfato (DHAP), mediante dos reacciones enzimáticas. La primera enzima es glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (Gpd1/Gpd2), la cual reduce DHAP usando NADH como agente reductor. La segunda enzima es Glicerol-3-fosfato fosfatasa (Gpp1/Gpp2), la cual remueve el fosfato del glicerol-3-P para generar glicerol. Figura Modificada de Saito, Y. Posas., 2012 [6].

#### 1.4 Regulación del ciclo celular por Hog1

En *S. cerevisiae*, la progresión del ciclo celular se regula principalmente por la CDK Cdc28 que promueve la síntesis de ciclinas y la degradación de inhibidores de ciclinas [53]. Cuando la célula se encuentra frente algún tipo de estrés como el cambio de pH interno, alta temperatura, alta osmolaridad, etc; la célula detiene su ciclo celular para adaptarse a esas condiciones [54-56]. Como el estrés ambiental puede ocurrir en cualquier etapa del ciclo celular, cada fase del ciclo es regulada por los mecanismos específicos de respuesta a cada tipo de estrés [57,58]. Cuando la levadura se enfrenta a un estrés hiperosmótico, por ejemplo, Hog1 induce el arresto celular en la fase del ciclo en que la célula se encuentra al presentarse el estrés (**Figura 4**). En otras palabras, Hog1 puede arrestar el ciclo celular en varias fases permitiendo la adaptación y supervivencia de la célula, antes de reanudar la progresión del ciclo celular [53, 59].

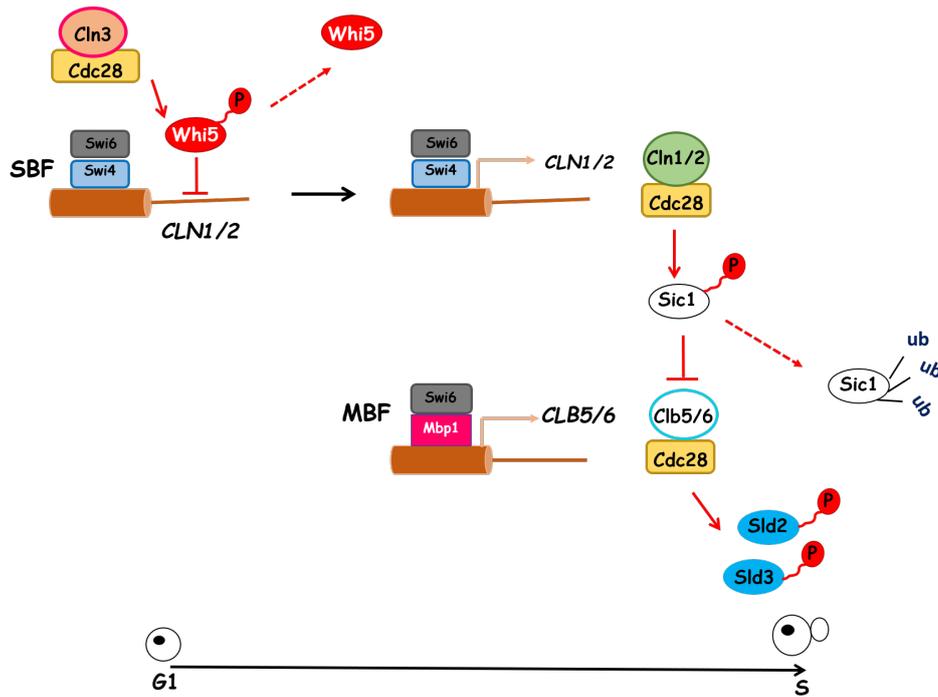


**Figura 4. Control de la progresión del ciclo celular por Hog1.** El complejo Ciclina/Cdc28 es crucial para el ciclo celular. Hog1 activado por osmo-estrés aresta el ciclo celular en varias fases : En la fase temprana de G1, Hog1 inhibe la transcripción de las ciclinas Cln1, 2 y Clb5; en la fase tardía de G1, Hog1 promueve el retraso de ciclo celular fosforilando a Sic1 en la Thr-173; en la fase temprana de S, Hog1 controla la expresión de las ciclinas Clb5,6; en G2, Hog1 inhibe la transcripción de Clb1,2 y disminuye la formación del complejo Clb2/Cdc28 por la fosforilación de Hsl1 que induce la acumulación de Swe1.

#### 1.4.1 Regulación de la fase G1/S en *S.cerevisiae*.

En levadura, la transición G1/S es controlada por la participación de varias ciclinas. En el inicio de G1, la ciclina Cln3 está secuestrada en el citoplasma por el factor de retención Whi3 [60, 61]. En la última fase de G1, la acumulación de Cln3 desencadena la fosforilación del represor transcripcional Whi5 por la unión de Cln3 con Cdc28 (Cln3/Cdc28) (**Figura 5**) [62]. Whi5 fosforilado se disocia del complejo de transcripción SBF y MBF. Estos factores entonces activan la transcripción de las ciclinas Cln1, Cln2, Clb5 y Clb6. Las ciclinas Cln1 y Cln2 son funcionalmente redundantes; lo mismo las ciclinas de tipo B Clb5 y Clb6. La formación de un complejo Cln1,2/Cdc28 estimula la fosforilación del factor de inhibición Sic1, lo que provoca la entrada a la fase S y esto finalmente conduce a la formación de la gema y a la división celular.

Sic1 no fosforilado se une e inhibe al complejo Clb5,6/Cdc28. Cuando varios residuos en Sic1 son fosforilados por el complejo Cln1,2/Cdc28, Sic1 sufre poliubiquitinación y se degrada por el proteasoma [63]. La degradación de Sic1 promueve la liberación y activación del complejo Clb5,6/Cdc28, lo que conduce a la célula a entrar en la fase de síntesis. La replicación del ADN se inicia cuando el complejo Clb5,6/Cdc28 fosforila a las proteínas de replicación Sld2 y Sld3, las cuales forman parte del complejo de pre-iniciación (CPI) [64, 65].



**Figura 5. Regulación de la fase G1/S en *S.cerevisiae*.** El complejo Cln3/Cdc28 fosforila al inhibidor Whi5 para la transcripción de las ciclinas (Cln1, Cln2, Clb5 y Clb6). La actividad de Cln1,2/Cdc28 estimula la formación de la gema y la fosforilación del inhibidor Sic1 para su poliubiquitinación. La degradación de Sic1 remueve la inhibición de Clb5,6/Cdc28. Clb5,6/Cdc28 inducen la entrada a S por fosforilación de Sld2 y Sld3.

#### 1.4.1.1 Regulación de la fase G1/S por Hog1

Cuando la levadura se enfrenta a un estrés hiperosmótico, Hog1 controla la transición G1/S mediante dos diferentes mecanismos [53, 66, 67]. En uno de ellos Hog1 inhibe la transcripción de las ciclinas Cln1, 2 y Clb5 en la etapa temprana de G1 [60]. En el otro, Hog1 promueve el retraso de ciclo celular fosforilando a Sic1 en la Thr-173 de su C-terminal, lo que ocurre en la etapa tardía de G1, (**Figura 4**). La fosforilación de Sic1 por Hog1, inhibe su ubiquitinación, lo que resulta en una prolongada inhibición del complejo Clb5,6/Cdc28. Esto retrasa la entrada a la fase S y por lo tanto retrasa la replicación de ADN y la morfogénesis de la gema [66, 67].

#### 1.4.2 Control de la fase S en *S.cerevisiae*

En la etapa tardía de G1 se forma el complejo pre-replicativo (pre-RC), el cual termina de ensamblarse durante la fase S. En ésta, el complejo de replicación se une a los orígenes de replicación. El complejo replicativo se activa entonces mediante la fosforilación de la subunidad Dpb2 de la ADN polimerasa. Esta fosforilación es producto de la actividad de los complejos de ciclinas Clb5,6/Cdc28 y del complejo Cdc7/Dbf4 [68, 69].

#### 1.4.2.1 Control de la fase S por Hog1 en un estrés hiperosmótico

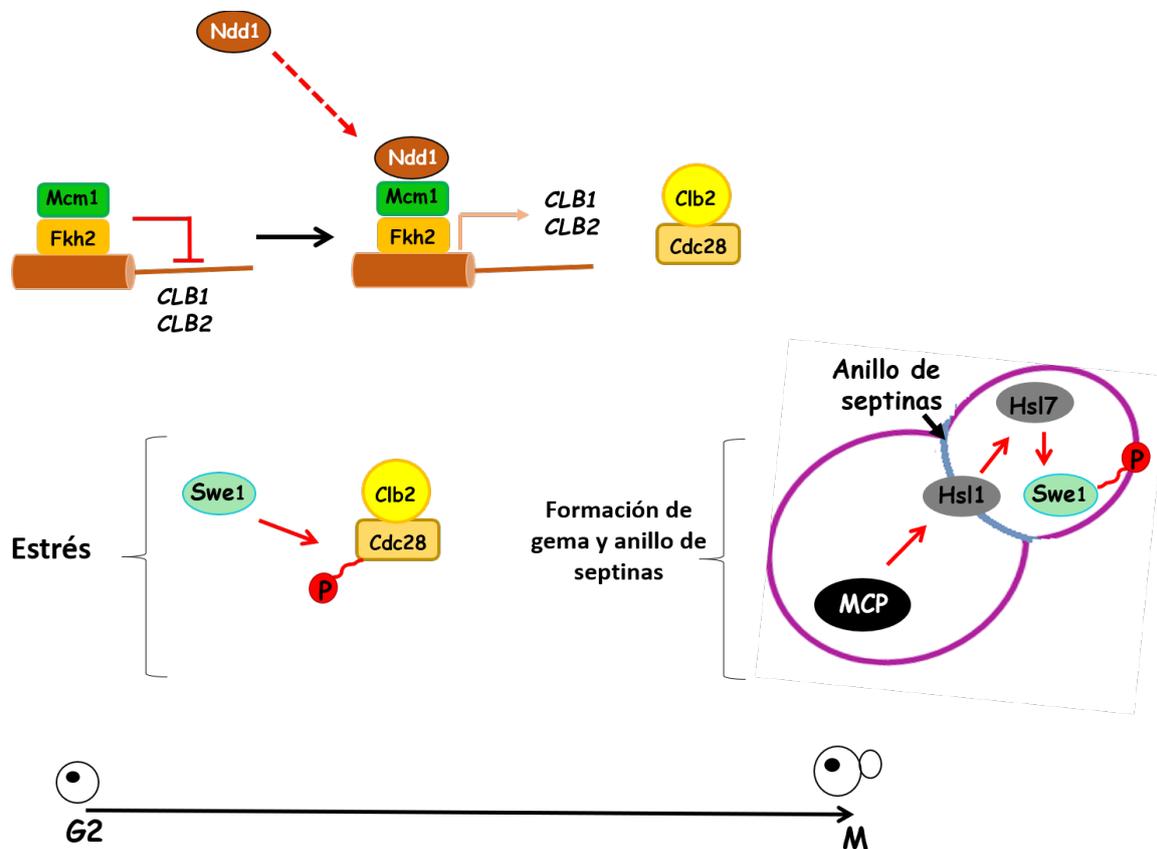
Hog1 también es capaz de modular la progresión de la fase S en presencia de estrés hiperosmótico. Cuando las células se estresan en una fase temprana de S, Hog1 controla la expresión de las ciclinas Clb5,6 (**Figura 4**). Si las células se estresan en una fase tardía de S, Hog1 interacciona con los componentes del complejo de replicación y retrasa la fosforilación de la subunidad Dpb2 de la ADN polimerasa [59]. Se sabe que una razón por la cual se retrasa el ciclo celular en la fase S en presencia de osmoestrés es la necesidad de evitar que la replicación interfiera con la transcripción de genes que se requieren para la adaptación al estrés. Se ha demostrado que una colisión entre la ARN Pol II y la ADN polimerasa conduce a una inestabilidad genómica [68, 69].

#### 1.4.3 Control de la fase G2/M en *S.cerevisiae*

La progresión del ciclo celular de la fase G2 a la fase M depende de las ciclinas mitóticas Clb1,2 y de la asociación del complejo Clb1,2/Cdc28 (**Figura 6**). El complejo Mcm1/Fkh2/Ndd1 es el encargado de regular la expresión de *CLB1* y *CLB2* [70, 71]. También, la progresión del ciclo celular de la fase G2 a la fase M (mitosis) es regulado por el punto de control morfogénico (MCP). Este modula la organización del citoesqueleto de actina, la organización del anillo de septinas entre el cuello de la célula madre y la célula hija, el tamaño celular y el grado de crecimiento de la gema. Cuando hay perturbaciones en estas funciones se acumula Swe1. Swe1 es una proteína cinasa que actúa regulando negativamente la entrada a la fase M mediante la fosforilación de la Tir-19 de Cdc28, inhibiendo así la formación del complejo Clb2/Cdc28 (**Figura 6**) [72].

Cuando se completa la formación del anillo de septinas entre la célula madre y la célula hija, el punto de control morfogénico recluta en el cuello de la gema a un complejo de proteína cinasas dependientes de septina (Hsl1 y Hsl7). Hsl7 fosforila a Swe1, la cual de esta forma se

degrada. La degradación de Swe1 finalmente induce la liberación del complejo Clb2/Cdc28, permitiendo la progresión del ciclo celular [73].



**Figura 6. Regulación de la fase G2/M en *S.cerevisiae*.** Progresión de fase G2 a la fase M depende de las ciclinas Clb1,2 y de la asociación del complejo Clb1,2/Cdc28.El punto de control morfogénético (MCP) en condiciones de estrés induce la acumulación de Swe1. Swe1 fosforila a Cdc28 inhibiendo la formación del complejo Clb2/Cdc28. En la completa formación de la gema y del anillo de septinas, MCP recluta a Hsl1 y Hsl7 para fosforilar a Swe1 y reanudar la progresión del ciclo celular.

#### 1.4.3.1 Control de la fase G2/M por Hog1

La activación de Hog1 en estrés hiperosmótico induce el arresto del ciclo celular en G2 debido a la disminución del complejo Clb2/Cdc28. La formación de éste complejo disminuye debido a una baja transcripción de *CLB2* [56, 74]. No se conoce el mecanismo por el cual Hog1 regula negativamente la transcripción de *Clb2*, pero se sabe que interfiere en la formación del complejo Clb2/Cdc28 en el punto de control morfogénético. Hog1 recluta y fosforila a Hsl1 el cual fosforilado promueve la deslocalización de Hsl7 del cuello de la gema,

lo que resulta en la acumulación de Swe1 y por consiguiente arresto del ciclo en G2 (**Figura 4**). En células mutantes que no cuentan con un sitio de fosforilación en Hsl1, Hog1 no logra promover la deslocalización de Hsl7, ya que no hay acumulación de Swe1 y en consecuencia no se arresta el ciclo celular [56,74].

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

---

En este estudio encontramos que Hog1 se fosforila en respuesta a un estrés osmótico aun cuando se bloqueen las ramas de Sln1 y Sho1 a nivel de las proteínas Ssk1 y Ste11 respectivamente. Sin embargo, en estas condiciones Hog1 no puede inducir una respuesta protectora al estrés hiperosmótico, por lo que en el presente trabajo nos interesa conocer la respuesta a las siguientes interrogantes: ¿en la doble mutante *ssk1Δste11Δ* Hog1 se activa por un mecanismo alternativo? y ¿por qué la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* es incapaz de generar una respuesta al estrés hiperosmótico?

### 3. OBJETIVOS

---

1. Determinar la vía por la cual Hog1 se fosforila en la doble mutante *ssk1Δste11Δ*.
2. Determinar por qué en estas condiciones Hog1 no induce una respuesta al estrés hiperosmótico.
3. Evaluar la cinética de fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ*.
4. Analizar la localización (núcleo/citoplasma) de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ*.
5. Definir el nivel transcripcional de genes de osmo-respuesta en la mutante *ssk1Δste11Δ*.
6. Caracterizar el contenido de glicerol en la mutante *ssk1Δste11Δ* en respuesta a estrés hiperosmótico.
7. Determinar el impacto de la fosforilación de Hog1 en la regulación del ciclo celular en la mutante *ssk1Δste11Δ*.

## 4. MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1. Cepas

Para los experimentos en *E. coli* se utilizó la cepa DH5 $\alpha$ . Las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizaron para todos los experimentos se muestran en la **Tabla 1**. Las dobles, triples y cuádruples mutantes se obtuvieron mediante la inserción por recombinación homóloga de genes de resistencia o de auxotrofia mediante la estrategia de reemplazo por PCR [75].

**Tabla 1.**

Cepa	Genotipo relevante	Referencia
W303-1A	MATa <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15</i>	F.Posas
W1	MATa <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 ssk1<math>\Delta</math>::KanMX</i>	Este estudio
W2	MATa <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 ste11<math>\Delta</math>::KanMX</i>	Este estudio
W3	MATa <i>leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 ssk1<math>\Delta</math>::KanMX ste11<math>\Delta</math>::natMX</i>	Este estudio
BY4741	MATa <i>his3<math>\Delta</math> 1 leu2<math>\Delta</math> 0 met15 <math>\Delta</math>0 ura3 <math>\Delta</math> 0</i>	EUROSCARF deletion library
BY4742	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0</i>	EUROSCARF deletion library
BY1	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 pbs2 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY2	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 hog1 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY3	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 ssk1 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY4	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 ste11 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY5	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 ptp2 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY6	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 ptp3 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY7	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 ptc1 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY8	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 lys2 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 sho1 <math>\Delta</math>::KanMX</i>	EUROSCARF deletion library
BY9	MAT $\alpha$ <i>his3 <math>\Delta</math> 1 leu2 <math>\Delta</math> 0 met15 <math>\Delta</math> 0 ura3 <math>\Delta</math> 0 ssk1 <math>\Delta</math>::KanMX ste11</i>	Este estudio

	$\Delta::natMX$	
BY10	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk2</i> $\Delta::KanMX$ <i>ssk22</i> $\Delta::KanMX$	Este estudio
BY11	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>hog1</i> $\Delta::URA3$	Este estudio
BY12	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>ptp2</i> $\Delta::hph$	Este estudio
BY13	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>ptp3</i> $\Delta::URA3$	Este estudio
BY14	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>ptc1</i> $\Delta::URA3$	Este estudio
BY15	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>sho1</i> $\Delta::URA3$	Este estudio
BY16	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>sln1</i> $\Delta::URA3$	Este estudio
BY17	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>ptp2</i> $\Delta::hph$ <i>ptp3</i> $\Delta::URA3$	Este estudio
BY18	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk2</i> $\Delta::KanMX$ <i>ssk22</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$	Este estudio
BY19	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk2</i> $\Delta::KanMX$ <i>ssk22</i> $\Delta::KanMX$ <i>sho1</i> $\Delta::URA3$	Este estudio
BY20	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>hog1</i> $\Delta::KanMX/pRS416$ - <i>URA3</i>	Este estudio
BY21	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>hog1</i> $\Delta::KanMX/pRS416$ - <i>HOG1-GFP</i> - <i>URA3</i>	Este estudio
BY22	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>hog1</i> $\Delta::pRS416-URA3$	Este estudio
BY23	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ <i>hog1</i> $\Delta::pRS416-HOG1-GFP-URA3$	Este estudio
BY24	BY4742 MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/Yep363- <i>LEU2</i>	Este estudio
BY25	BY4742 MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0/Yep363- pSTL1- lacZ	Este estudio
BY26	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ /YEp363- <i>LEU2</i>	Este estudio
BY27	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>met15</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>ssk1</i> $\Delta::KanMX$ <i>ste11</i> $\Delta::natMX$ /YEp363- pSTL1-lacZ	Este estudio
BY28	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>hog1</i> $\Delta::KanMX$ / YEp363- <i>LEU2</i>	Este estudio
BY29	MAT $\alpha$ <i>his3</i> $\Delta$ 1 <i>leu2</i> $\Delta$ 0 <i>lys2</i> $\Delta$ 0 <i>ura3</i> $\Delta$ 0 <i>hog1</i> $\Delta::KanMX$ / YEp363-- pSTL1-lacZ	Este estudio

## 4.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos que se utilizaron para generar por PCR los diferentes amplificados que se usaron durante este trabajo están enlistados en la **Tabla 2**. Los productos de PCR se emplearon para generar las mutantes de delección mediante recombinación homóloga. Los oligonucleótidos de recombinación cuentan con una zona de homología al gen que se interesa reemplazar (letras mayúsculas), y una región complementaria al vector que se usó como molde para amplificar el marcador de resistencia o de auxotrofia (letras minúsculas). Las letras en negritas representan sitios de corte de enzimas de restricción. La tabla 2 también muestra los oligonucleótidos utilizados para verificar el reemplazo del cada gen mutado.

**Tabla 2.**

<b>Oligo</b>	<b>Secuencia ( 5' - 3' )</b>
<i>ScHOG1_ ura3 pAG60 Fw</i>	GGAACAAAGGGAAAACAGGGAAA <b>ACTACA</b> ACTATCGTATATAATA gtttagcttgccctgtcccc
<i>ScHOG1_ ura3 pAG60 Rv</i>	CATCAAAAAGAAGTAAGAATGAGTGGTTAGGGACATTA <b>AAAAAAC</b> ACGT cgttttcgacactggatggc
<i>ScHOG1 + 15 Fw</i>	ATGACCACTAACGAGGAAT
<i>ScHOG1 +1308 Rv</i>	TTACTGTTGGA <b>ACTCAT</b>
<i>ScPTP3_ ura3 pAG60 Fw</i>	GTATCTCCCTTCTCCATCAGCAACACAGATCTACTTATCATATAGAA C gtttagcttgccctgtcccc
<i>ScPTP3_ ura3 pAG60 Rv</i>	GTTTCGTATTAATAAAATAGAGATCAAATACATTCATATTAGCCTAA cgttttcgacactggatggc
<i>ScPTP3 - 42 Fw</i>	CCCTTCTCCATCAGCAACAC
<i>ScPTP3 +2957 Rv</i>	CTCCAAGGGTAGTGGTAGCA
<i>ScSHO1_ ura3 pAG60 Fw</i>	AACAGAATCGCTAAAAGAAAGGGCGTGTTATTAACAGTAGCCAAC C gtttagcttgccctgtcccc
<i>ScSHO1_ ura3 pAG60 Rv</i>	CCTACAATTACAGAACTATATTCTTCAAACACTACTGTAGAGGGTC cgttttcgacactggatggc
<i>ScSHO1 - 686 Fw</i>	GCATCATATCTTGTGC <b>CC</b>
<i>ScSHO1 +1452 Rv</i>	AATGTGCCGACTTATGG <b>CC</b>
<i>ScPTP2_ hph pAG32 Fw</i>	GTGCTATTAATAGTTTACAATAAAATAGGATCGACGTTGCTATTG gtttagcttgccctgtcccc
<i>ScPTP2_ hph pAG32 Rv</i>	TATCAAAACGAAAAGTGTGGTATAATAGGAGAAAACAATTCTA cgttttcgacactggatggc

<i>ScPTP2</i> - 304 Fw	AATACGCGCCTGCTTTATGGAAC
<i>ScPTP2</i> +2554 Rv	GAACGAAGTTGGAGTGGTGATAACG
<i>ScPTC1_ura3 pAG60</i> Fw	TACTTCATATATCATTTAGGCACTGCATTTATCTTTAAAAATCATT TAgtttagcttgccctgtcccc
<i>ScPTC1_ura3 pAG60</i> Rv	ATATCTCTATGTCTATGCATAATTTTTGCGCGGTTTATAACGGATCC TTCcgttttcgacactggatggc
<i>ScPTC1</i> - 378 Fw	CATCTGAGAGGGTTTGTGTCC
<i>ScPTC1</i> +1459 Rv	TGACTTGTAACCGTGTGTGC
<i>ScSLN1_ura3 pAG60</i> Fw	TAAGAACACGTTGGGTATAATCTACTTTGTTTTGATTTAACAATACA A gtttagcttgccctgtcccc
<i>ScSLN1_ura3 pAG60</i> Rv	GGTGGTATTACGCGCAAGCTTTTGATTTCTTACTATTCTTGGTTG T cgttttcgacactggatggc
<i>ScSLN1</i> - 439 Fw	TAGAGCGTATTCCGACGACTTC
<i>ScSLN1</i> +4049 Rv	TTGGCTTCCAAGTACAACCTGTG
<i>ScSTL1 BamH1_promoter</i> Fw	CGAGCGACCTggatccACTAATCCATATTC
<i>ScSTL1 promoter_LACZ</i> RV	cgacgttgtaaaacgaccatGGTCTAAAACCTTCTATGTTC
<i>LACZ_STL1 promoter</i> Fw	gaacatagaaagtttagaccATGGTCGTTTTACAACGTCG
<i>LACZ SacI</i> Rv	CATCCAGTGCAGgagctcGTTATCGC

### 4.3. Plásmidos

Todos los plásmidos usados en este estudio se encuentran enlistados en la **Tabla 3**.

**Tabla 3.**

Plasmido	Descripción	Fuente
pRS416	Vector centromérico de levaduras, con un marcador de <i>URA3</i> y un SCM derivado del pBLUESCRIPT II	[76]
pRS416-HOG1-GFP	Clonación del ORF GFP y el NUF2 UTR 3' del pPS934 dentro de los sitios <i>Xho1</i> y <i>Kpn1</i> del pRS416. <i>HOG1</i> (-490 al codón de terminación) fue amplificado por PCR usando oligonucleótidos que reemplaza el codón de terminación por el sitio <i>Xho1</i> . El producto se clona en el sitio de <i>Xho1</i> de pRS-GFP para generar HOG1-GFP	[24]
YEp363	Vector episomal de levadura con un marcador <i>LEU2</i> , para fusiones con <i>LacZ</i>	[77]
YEp363- pSTL1-LACZ	Amplificación de promotor de <i>STL1</i> (-937 al codón de ATG); fusión del promotor <i>STL1</i> al gen <i>LACZ</i> de Ecoli y, por último, clonación	Este estudio

	dentro del vector episomal YEp363 usando los sitios <i>BamH1</i> y <i>Sac1</i>	
pAG32	Este plásmido contiene el gen de <i>HPH</i> de <i>Klebsiella pneumoniae</i> , que codifica para la higromicina B fosfotransferasa, la cual confiere resistencia al antibiótico higromicina B en levaduras transformantes.	[78]
pAG60	Este plásmido contiene el gen de <i>URA3</i> de <i>Candida albicans</i> , y confiere prototrofia de uracilo en levaduras que presentan una auxotrofia.	[78]
pGEM	Vector linealizado, con una Timidina 3'-terminal en ambos extremos. Los T salientes mejoran la eficacia de ligación de productos de PCR, y evitan la recircularización del vector y.	Promega

#### 4.4. Anticuerpos utilizados

Para los ensayos de Western blot, inmunoprecipitación de la cromatina (Chip) y phos-tag SDS/PAGE gel se utilizaron los anticuerpos enlistados en la **Tabla 4**

**Tabla 4.**

Blanco	Anticuerpo	Dilución usada
Hog1	Anticuerpo Hog1 (yC-20) primario monoclonal de ratón contra el clon A-8 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA). Se utilizó para el análisis de Hog1 total por Western Blot.	1: 5000
Hog1 fosforilado	Anticuerpo phospho-p38 MAPK (Thr 180/Tir 182) (Cell Signaling Technology). Detecta niveles endógenos de fosforilación en Thr 180 y Tir 182. Se utilizó para el análisis de Hog1 fosforilado por Western Blot.	1: 10 000
Hog1-HA	Anti-HA anticuerpo monoclonal de ratón (Thermo Fisher Scientific). Se utilizó para el análisis de inmunoprecipitación de la cromatina (Chip).	1:20000
Ssk2-TAP	anti-PAP policlonal de cabra (Sigma-Aldrich). Se utilizó para el análisis de Mn <sup>2+</sup> -Phos-tag SDS/PAGE gel.	1:500
Anticuerpo secundario	Anticuerpo de cabra anti conejo IgG (H+L) ,el anticuerpo cuenta con la acoplada peroxidasa de rábano (invirogene). Se utilizó para el analisis del Hog1 fosofrilado y total por western Blot.	1:10 000

#### 4.5 Antibióticos, ácidos, inhibidores y colorantes

Todos los antibióticos, ácidos, inhibidores y colorantes usados en este estudio se encuentran indicados en la **Tabla 5**.

**Tabla 5.**

Reactivo	Descripción
G418 (geneticina) (Sigma)	antibiótico aminoglucósido que bloquea la síntesis de polipéptidos y la elongación de proteínas por la inhibición del complejo 70s y 80s ribosomal. Se usó en cepas de levadura para seleccionar, seguir y mantener la resistencia a <i>Kanamicina</i> del gen de <i>E. coli KanMx</i> . A una concentración final de 100 ug/mL.
Higromicina B (A.G Scientific)	antibiótico aminoglucósido que inhibe la síntesis de proteínas en bacterias y levaduras. Se usó en cepas de levadura para seleccionar y mantener la resistencia a higromicina del gen de <i>Streptomyces Hygroscopicus hph</i> . Se usó a una concentración final de 400 ug/mL.
Nourseothricin (Sigma)	antibiótico aminoglucósido producido por la especie de <i>Streptomyces</i> . Inhibe la síntesis de proteína por la inducción de una errónea codificación. Se usó en cepas de levadura para seleccionar y mantener la resistencia a Nourseothricin (NatMX4). A una concentración final de 200 ug/mL.
Ampicilina (Sigma)	Derivado de la penicilina, es un antibiótico $\beta$ -lactámico, que inhibe la síntesis de la pared celular en las bacterias, por la inactivación de las transpeptidasas en la superficie interna de la membrana celular bacteriana. Se usó para seleccionar bacterias transformadas con vectores que les confieren resistencia a la Ampicilina. A una concentración final de 100 ug/mL.
Hidroxiurea (Sigma)	Inhibidor de la enzima ribonucleótido reductasa, reduce la producción de desoxirribonucleótidos lo que induce de rupturas de doble cadena. Se usó para sincronizar células en S.
Nocodazol (Sigma)	Agente antineoplásico, inhibe la polimerización de los microtúbulos. Se usó para sincronizar células en G2/M.
5FOA (Sigma)	Ácido 5-fluorotico (5FOA), análogo del uracilo que es tóxico para las levaduras URA3 + pero no para las mutantes <i>ura3</i> . Se usó a concentraciones finales de 1g/L.
TCA	Ácido tricloroacético (TCA), se usó para precipitar y fijar proteínas en análisis de western blot.
PCA	Ácido perclórico (PCA), se usó para la desproteinización de muestras biológicas mediante la remoción de proteínas y la estabilización de pequeñas moléculas de analitos como el glicerol. Nosotros lo usamos para la cuantificación de Glicerol intracelular.
ONPG	Es un sustrato colorimétrico para $\beta$ -galactosidasa. La hidrólisis de 2-Nitrophenyl $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG) mediante la enzima $\beta$ -galactosidasa da como resultado la liberación de galactosa y un compuesto cromogénico amarillo.
SYTOX Green	Tinción de contraste verde fluorescente para cromosomas y núcleo,

(Molecular Probes)	impermeable para las células vivas, lo que la convierte en un indicador útil de las células muertas en una población: excitación/emisión (504/523 nm), uso con láser de iones de argón 488 y, funciona con células de mamíferos, bacterias gram-positivas, gram-negativas y levaduras. Se usó como tinción en el análisis del ciclo celular.
Bradford (SIGMA)	Usado para determinar la concentración de proteínas en solución. El procedimiento consiste en la formación del complejo entre el colorante azul brillante, y la proteína en solución. El complejo proteína y colorante, causa un cambio en la absorción del colorante de 465 a 595 nm. La cantidad de absorción es proporcional a la proteína presente. La concentración lineal va de 0.1-1.4 mg/ml de proteína, usando BSA como proteína estándar.
DAPI ThermoFisher	4,6-Diamidino-2-fenilindol (DAPI), es un colorante cromosómico y nuclear que emite fluorescencia azul tras unirse a los pares de AT del ADN. Aunque el colorante es un impermeabilizante celular, unas concentraciones más elevadas pueden entrar en las células vivas.
Solución de Proteasa	Utilizamos pepsina a una concentración final de 5 mg/ml, hidroliza solo los péptidos unidos, pero no hidroliza enlaces éster ni enlaces de amina. Esta proteasa se usó para el análisis del ciclo celular de levaduras.
RNasa A (Sigma)	Nucleasa que degrada RNA de cadena sencilla (ssRNA). La RNase solution se usó a 2 mg/ml.

#### 4.6. Medios de crecimiento

Todos los medios de crecimiento usados en levadura y bacterias se encuentran enlistados en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.**

Medio	Preparación
YPD	1 % de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% glucosa. En el caso de medios sólido se agregó 2% de Agar.
YPD + NaCl	1 % de extracto de levadura, 2% de peptona, 2% glucosa, NaCl de acuerdo con la molaridad requerida para cada experimento.
YEP	1% de extracto de levadura, 2% de peptona.
Mínimo SD	0.17% de base nitrogenada de levadura (YNB) sin aminoácido ni sulfato de amonio, 0.5 % de sulfato de amonio, 2% glucosa.
Completo SC	Medio SD suplementado con los aminoácidos leucina, triptófano, histidina, metionina, aspartato, treonina y las bases nitrogenadas adenina y uracilo. Las concentraciones finales se describen en [79]. Para medios sólidos se agregó 2% de Agar.
Completo SC + FOA	Medio SC suplementado con 1g/L 5-FOA, con la mitad de la concentración de uracilo (10 mg/L). El 5-FOA se agregó al medio estéril cuando la

	temperatura del medio se atempero.
LB	Extracto de levadura al 0.5%, triptona al 1%, NaCl al 1%. Cuando fue necesario se suplementó con 100 ug/ml de ampicilina después de esterilizar. Medio usado para el crecimiento de E. coli

#### 4.7. Condiciones de crecimiento

En todos los casos, las células se crecieron a una temperatura de 30°C. Para el crecimiento en medio sólido, las cajas petri se incubaron durante 72 h y se escanearon. Los cultivos en medio líquido se incubaron el tiempo requerido en cada ensayo y con agitación constante. Las bacterias recombinantes se crecieron a 37°C durante 24 h.

#### 4.8. Ensayos de sensibilidad en caja

Las células se crecieron hasta una densidad de 1 OD<sub>600nm</sub>, y se hicieron diluciones sucesivas de 1:10. 5 µl de cada dilución se depositaron en cajas con YPD y con diferentes concentraciones de NaCl. Las cajas se incubaron a 30° por 72 h y se escanearon.

#### 4.9. Fusión del promotor *STL1* al gen *LACZ*

Para determinar la actividad específica de β-galactosidasa en presencia de estrés hiperosmótico, el gen de *LACZ* se clonó bajo el control del promotor del gen *STL1*. La fusión *STL1-LACZ* se subclonó en el vector YEp363 de la siguiente manera: Para la amplificación del promotor de *STL1* se usó ADN genómico como molde. Se amplificó un producto de 957 pb utilizando el oligonucleótido [Sc*STL1* BamH1\_promoter FW (-937) CGAGCGACCTggatccACTAATCCATATTC(-907)] con un sitio *Bam*HI y el oligonucleótido híbrido Rv, el cual contiene una región complementaria al promotor de *STL1* (-21 pb río arriba de la secuencia codificante) y otra región complementaria a gen de *LACZ* (+18pb a partir del ATG de *LACZ*), el nombre y la secuencia del oligonucleótido es la siguiente: Sc*STL1* promotor\_*LACZ* RV [5'cgacgttgtaaacgacccatGGTCTAAACTTTCTATGTTC 3']. Posteriormente se amplificó el gen de *LACZ* de *E.coli* usando el vector YEp363 como DNA molde, se usó el oligonucleótido híbrido (*LACZ\_STL1* promotor FW)

[5'gaacatagaaagtttagaccATGGTCGTTTTACAACGTCG3'] y el oligonucleótido [(+1915)CATCCAGTGCAGgagctcGTTATCGC(+1941)] que contiene un sitio *SacI*. El producto de PCR es de 1965 pb.

Los fragmentos de PCR de 957pb y el de 1965 pb se unieron mediante una PCR de fusión utilizando la enzima Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA Polymerase. El tamaño de la fusión fue de 2,922pb; la banda se purificó y posteriormente se ligó al vector pGEM-T para su secuenciación. La fusión *STL1-LACZ* se obtuvo a partir de la clona de pGEM-T mediante digestión con las enzimas *BamH1* y *SacI*, y se subclonó en el vector YEp363.

#### **4.10. Western-blot y extracción de proteínas**

Las células se colectaron durante la fase media exponencial de crecimiento, unas células se trataron con 0.8 M NaCl y otras no. Se tomó un 1ml de cultivo de cada muestra para fijarlo con 300 µl de TCA (ácido tricloroacético) al 85% durante 5 min. Se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de TCA. Se agregaron 100 µl de perlas de vidrio a cada muestra, así como 500 µl del amortiguador de lisis (250Mm Tris pH 6.8, 0.5M DTT, 10% SDS, 20% Glicerol y 0.5% Azul bromofenol). Cada muestra se agitó en el vortex durante 5 min y posteriormente se calentó a 95°C durante 5 min.

Los extractos celulares se separaron en geles de poliacrilamida-SDS (10%) y se transfirieron a membranas de PVDF (0.45 µM millipore, Billerica, MA). Posteriormente, las membranas se bloquearon durante una hora en PBS 1X, leche en polvo 6%, y Tween 20 0.05%. Las membranas bloqueadas, se incubaron por 1 hr a temperatura ambiente en PBS 1X, y Tween 20 0.1%. A esta mezcla se agregó el anticuerpo primario policlonal anti-Hog1 (yC-20) (Biotecnología, Santa Cruz), ó, el anticuerpo primario monoclonal específico anti-Phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182) (Cell Signaling Technology). Para la detección se usó el anticuerpo secundario (anti-conejo) acoplado a peroxidasa de rábano (Zimed). Finalmente se visualizó con sustrato de peroxidasa de rábano (Millipore Corporation).

#### 4.11. Northern Blot

El análisis de expresión génica se hizo mediante northern-blot. Para esto las células se cultivaron en YPD hasta alcanzar la fase exponencial. Las células se trataron con 0.8 M de NaCl durante diferentes tiempos. Se extrajo RNA total mediante la técnica convencional de Trizol. El RNA se corrió en condiciones desnaturalizantes en geles de agarosa y se transfirió a membranas de Nylon. La detección de los transcritos se hizo mediante sondas de DNA de los genes de interés marcadas con [ $\alpha$ - $^{32}$ P]dCTP. Las sondas que se utilizaron fueron: *CTT1* (1,7 kb), *STL1* (1,7 kb), *ALD3* (1,5 kb) y *ENO1* (1,3 kb). Las sondas se prepararon con el kit de marcaje de oligonucleótido Prime-It II (Stratagene, La Jolla, CA, EE. UU)]. La expresión del RNA se detectó con un phosphorimager (Typhoon 8600, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, EE. UU.). Para el análisis se utilizó el software IMAGEQUANT (Molecular Dynamics).

#### 4.12. Determinación de la Actividad de $\beta$ -galactosidasa

##### 4.12.1. Obtención del extracto celular

Se crecieron los cultivos en medio SD-Leu hasta una  $DO_{600}$  0.7. Una alícuota del cultivo se trató con 0.8 M de NaCl. Posteriormente las células se colectaron por centrifugación. El pellet se lavó dos veces con agua destilada fría y se resuspendió en 500  $\mu$ l del amortiguador de extracción (solución de fosfatos 1M ( $K_2HPO_4$ ,  $KH_2PO_4$ ), EDTA 0.1M y DTT 1mM). A cada muestra se le agregó 100  $\mu$ l de perlas de vidrio y se agitaron en vortex durante 1 min (5 repeticiones). Por último, las muestras se centrifugaron durante 20 min a 4 °C y se colectó la fase acuosa para su análisis.

##### 4.12.1.1. Ensayo de $\beta$ -galactosidasa

En una placa de microtitulación se agregó 1.5  $\mu$ l de cada muestra y se aforó con 15  $\mu$ l con el amortiguador de extracción. A cada muestra le agregamos 135  $\mu$ l de amortiguador Z ( $Na_2HPO_4$  0.06M,  $NaH_2PO_4$  0.04M, KCl 0.01M,  $MgSO_4$  0.001M) más 1mM de DTT. Se incubó la placa de microtitulación a 30°C por 5 min y se inició la reacción agregando 30  $\mu$ l de ONPG (2- Nitrophenyl  $\beta$  - D galactopyranoside). Se anotó el tiempo exacto en el que se le añadió el ONPG, se incubó la placa hasta observar la presencia de un color amarillo en las muestras, posteriormente se procede a detener la reacción con 75  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$ , anotando el tiempo

exacto en el cual se detuvo la reacción. Por último, la placa de microtitulación se midió a una  $DO_{420nm}$  en un lector de Elisa. La actividad específica de  $\beta$ -galactosidasa se expresó en nanomoles de o-nitrophenol producidos por minuto por miligramo de proteína. La proteína se midió por el método de Bradford, usando albúmina sérica bovina para generar una curva patrón.

#### **4.13. Determinación de glicerol intracelular**

##### **4.13.1. Preparación del extracto libre de células**

Las células de 10 ml de muestra se expusieron a 0.8 M de NaCl por 40 min, posteriormente se colectaron por centrifugación a 5000 r.p.m. (30°C), se lavaron una vez con 0.5 M de Tris-HCl (pH 7.5). El pellet se resuspendió en 700  $\mu$ l de 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5) y se calentó a 95 °C por 15 min, seguido de una centrifugación a 3000 r.p.m a 4 °C por 15 min. El sobrenadante fue desproteinizado con 0.1 ml de ácido perclórico (0.5 mol/l), y posteriormente centrifugado a 3000 rpm, a 4 °C durante 15 min. Al sobrenadante se le ajustó el pH a 9-9.5 con KOH (10 mol/l). El contenido de proteína en el extracto fue determinado por el método de Bradford.

##### **4.13.1.1. Cuantificación de glicerol en extractos libres de células**

Este método está basado en la oxidación del glicerol-3P y en la reducción de  $NAD^+$ , mediante la enzima GPDH (3P- deshidrogenasa) [80]. El incremento de NADH se midió por el cambio de absorbancia a 340 nm, usando un analizador automático (Spec Cary 100 UV/VIS). La mezcla de reacción está compuesta de 70  $\mu$ l del amortiguador (glicina 0.2 mol/l, hidrazina 1 mol/l,  $MgCl_2$  2 mmol/l, pH 9.8), 25  $\mu$ l de  $NAD^+$  20 mmol/l, 25  $\mu$ l ATP 50 mmol/l, 10  $\mu$ l GPDH (1700 KU/l), 250  $\mu$ l del extracto celular y 10  $\mu$ l GK (Glicerol cinasa) (0.85KU/l). Como control positivo, se usó una muestra de glicerol a una concentración de 7.5  $\mu$ mol/l.

#### **4.14. geles de $Mn^{2+}$ -Phos-tag SDS/PAGE**

Los cultivos celulares se crecieron hasta la fase media de crecimiento logarítmica, posteriormente unas células se trataron con 0.8M de NaCl por 5 min. Para la extracción de proteína se tomó un 1ml de cultivo de cada muestra para fijarlo en 300  $\mu$ l de TCA (ácido

tricloroacético) al 85% durante 5 min, se retiró el sobrenadante y se lavó el pellet 2 veces con agua destilada estéril para eliminar los restos de TCA. Se agregó 100 µl de perlas de vidrio a cada muestra, así como 50 ml del amortiguador de lisis (250Mm Tris pH 6.8, 0.5M DTT, 10% SDS, 20% Glicerol y 0.5% Azul bromofenol), se agitó en un vortex cada muestra durante 5 min y posteriormente se calentaron a 95°C durante 5 min. Los extractos proteicos fueron separados en geles de poliacrilamida 6%. A los geles se le agregó 10 µM de Phos-tag (Wako Chemical Industries, Richmond, VA, USA) y 20 µM MnCl<sub>2</sub>. La electroforesis se corrió a 100V por 3 h a 4 °C, posteriormente el gel se lavó a temperatura ambiente durante 20 min con el amortiguador de transferencia 1X NuPAGE (Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) suplementado con 20% de etanol, 5 µM de EDTA, 2.5 mM de persulfato de sodio y 5 mM de bisulfito de sodio. Las proteínas se transfirieron a una membrana PVDF (0.45 uM millipore, Billerica, MA) por 2 hr a 4 °C. El nivel de fosforilación en la proteína Ssk2-TAP se analizó por Western blot usando el anticuerpo anti-PAP (Sigma-Aldrich Quimica, Toluca, México). La proteína Ssk2 etiquetada con TAP se obtuvo de la biblioteca de *S.cerevisiae* de TAP (Open Biosystems, Dharmacon Co., Lafayette, CO, USA).

#### **4.15. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)**

Los cultivos se crecieron hasta la fase logarítmica temprana, posteriormente las células se trataron con 0.8M de NaCl y se procesaron por la técnica de ChIP como se describe en [81]. La proteína Hog1 etiquetada con HA se inmunoprecipitó con el anti-HA. Las células se trataron con 1% de formaldehído por 20 min a 25°C para producir entrecruzamiento proteína-DNA. Para evaluar la unión de Hog1 a los promotores y al ORF de los genes *STL1* y *CTT1* se utilizó PCR en tiempo real usando los siguientes oligonucleótidos: *STL1*(promotor, -372/-112; ORF, 1,475/1,575), *CTT1* (promotor -432/-302; ORF, 736/836); los números y el signo (-) representan las coordenadas de ubicación del oligonucleótido sobre el gen a partir del ATG. La región telomérica del brazo derecho del cromosoma VI se usó como control. Se hicieron tres experimentos independientes. El análisis cuantitativo se realizó con el detector de secuencia (ABI 7700 ViiA7; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La eficiencia de inmunoprecipitación se calculó dividiendo la cantidad del producto de PCR en la muestra

inmunoprecipitada entre la cantidad del producto de PCR en la muestra total. Los datos se presentan como doble inmunoprecipitación respecto al control telomérico (ocupación).

#### **4.16. Microscopía de fluorescencia**

Para examinar la localización nuclear de Hog1-GFP, cultivos en fase exponencial se trataron con 0.8 M de NaCl a diferentes tiempos. Las células se fijaron con 37% de formaldehído durante 10 min, posteriormente se tiñeron con DAPI 1 mg/ml (4,6-diamidino-2-phenylindole) durante 30 seg. Las células se lavaron dos veces con 1 ml de PBS 1x para eliminar el exceso de colorante. Las imágenes se capturaron con el microscopio de epifluorescencia (Olympus BX51), usando el programa QCapture Pro (version 6.0) software (QImages).

#### **4.17. Ciclo celular y sincronización de cultivos**

Las células se cultivaron en YPD hasta OD<sub>600</sub> 0.7, posteriormente las células se sometieron a estrés hiperosmótico con 0.8 M de NaCl. Las células se fijaron durante la noche en etanol al 70% a 4°C, posteriormente se lavaron y se trataron con 2 mg/ml de RNasa (SIGMA) durante 2 h a 37°C. Se añadieron 5 mg/ml de Pepsina (SIGMA) y se incubó durante 45 min. Las células se tiñeron con 1 µM SYTOX Green (Molecular Probes, Thermo Scientific) según lo indicado por el proveedor. Por último, las células se sonicaron a poder bajo y se analizaron en un citómetro de flujo FACScan (BD Biosciences, San Jose, CA, EE. UU.). Se analizaron diez mil células para cada muestra. Los perfiles de FACS se analizaron con el software WINMDI 2.9 (<http://en.bio-soft.net/other/WinMDI.html>).

##### **4.17.1. Sincronización en fase S con hidroxurea**

Las células se crecieron en YPD a 30°C hasta fase exponencial temprana ( $0.7 \times 10^7$  células/ml). Posteriormente, se trataron con 200 mM de hidroxurea (HU), y se incubaron durante 2 h a 30°C. Las células se lavaron dos veces con YPD para eliminar la hidroxurea. Las células se liberaron del arresto resuspendiéndolas en YPD o en YPD con NaCl 0.8 M. Se colectó una alícuota al tiempo cero, y posteriormente se prosiguió a la toma de muestra cada 15 min con la finalidad de monitorear la progresión del ciclo celular.

#### 4.17.2 Sincronización en fase G2/M con nocodazol

Las células se crecieron en YPD a 30 °C, hasta una fase exponencial temprana ( $0.7 \times 10^7$  células/ml). Posteriormente, se arrestaron con 0.2M de nocodazol, incubando las células durante 3 h a 30°C. Los cultivos se lavaron dos veces con YPD para eliminar el nocodazol. Por último, las células se liberaron del arresto resuspendiéndolas en YPD con NaCl 0.8 M y sólo YPD. Se recolectó una alícuota al tiempo cero, y posteriormente se prosiguió a la toma de muestra cada 15 min con la finalidad de monitorear la progresión del ciclo celular.

#### 4.17.3. Aislamiento de células en fase G1 mediante elutriación

Para seleccionar células en G1, se usó el método de elutriación por centrifugación. En éste proceso, las células más pequeñas de un cultivo (que se encuentran en G1) se seleccionaron en un gradiente de sedimentación. Las células se colocaron en una cámara dentro de un rotor giratorio. Debido a la fuerza centrífuga las células se sedimentaron en el fondo de la cámara. El líquido (YEP) que fluye a través de la cámara desde el fondo hasta la parte superior contrarresta la fuerza centrífuga y empuja a las células más pequeñas hacia la salida de la cámara, mientras que las células grandes migran hacia el área de mayor fuerza centrífuga.

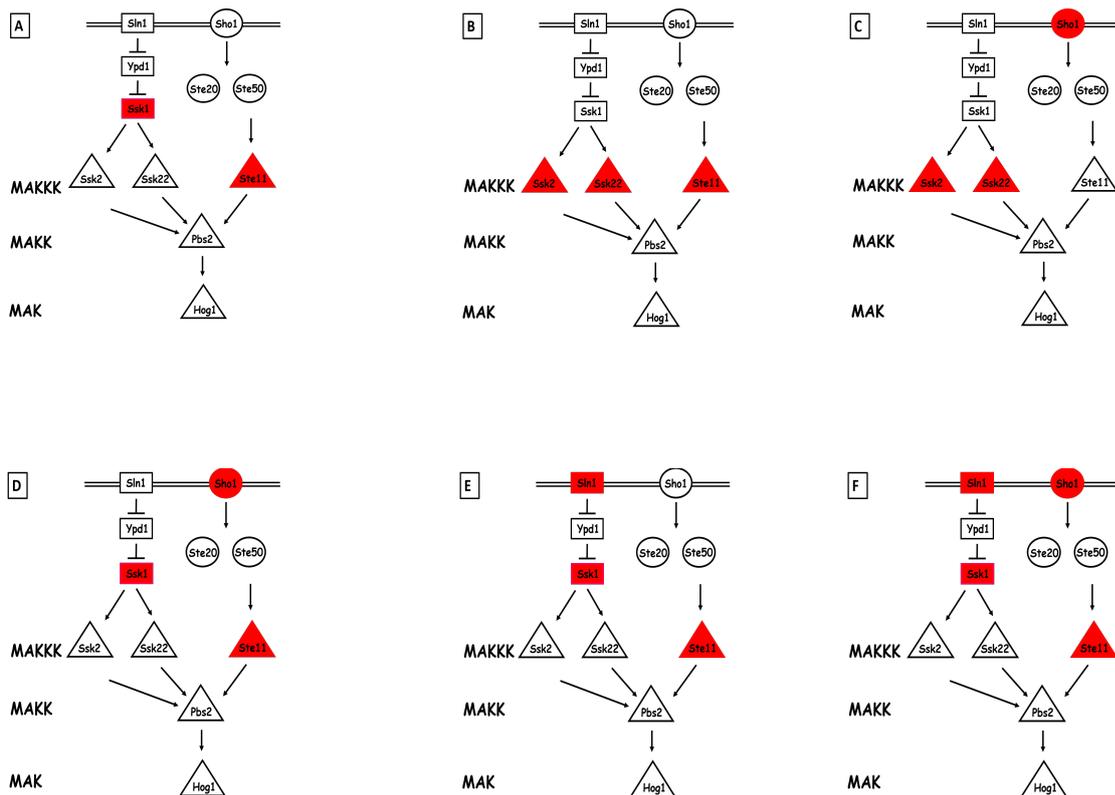
Las células se crecieron en YEP + 2% Rafinosa a 30 °C hasta alcanzar la saturación del cultivo (DO 600 de 2-3). El uso de Rafinosa como fuente de carbono, incrementa el porcentaje de células en G1. Antes de incluir las células, la cámara de elutriación se llenó con medio YEP refrigerado a 4°C. Cuando el sistema se llenó de líquido, la centrífuga se encendió. La velocidad se ajusta a 4000 rpm y la temperatura a 4°C. Una vez que la centrífuga alcanzó las 4000 rpm, la luz estroboscópica se ajustó de modo que la cámara de elutriación sea visible a través del orificio de la tapa de la centrífuga. El elutriador se hizo funcionar durante 15 min a 4000 rpm para establecer el gradiente de sedimentación en la cámara. Y por último se bajó la velocidad de centrifugación para que las células más pequeñas salgan primero de la cámara. Estas se colectaron y se incubaron en YPD durante 100 min con la finalidad de que inicien su crecimiento (un paso antes de entrar a S). Las células sincronizadas de esta manera se crecieron en YPD con o sin NaCl 0.8 M. Se tomaron alícuotas cada 10 min para la determinación de la progresión del ciclo celular.

## 5. RESULTADOS

---

### 5.1. El estrés hiperosmótico induce la fosforilación de Hog1 en una mutante *ssk1Δste11Δ*, y ésta fosforilación es dependiente de *Ssk2/Ssk22*.

El estrés hiperosmótico activa la vía de HOG que está compuesta por las ramas de Sln1 y de Sho1, las cuales convergen en Pbs2 y ésta a su vez fosforila Hog1. Hasta el momento se acepta que Hog1 se activa solo a través de estas dos ramas. Sin embargo, en nuestro laboratorio observamos que el estrés hiperosmótico induce la fosforilación de Hog1 en una doble mutante *ssk1Δste11Δ* en la cual ambas ramas se encuentran interrumpidas. Esto sugiere que la proteína Hog1 puede ser fosforilada por una vía no canónica. Con la finalidad de encontrar cuáles son los elementos involucrados en la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ*, se construyeron mutantes adicionales de algunos componentes que participan en las dos ramas (Sln1 y Sho1) (**Figura 7**). Primero nos preguntamos si alguna de las MAPKKKs que forman las vías que activan a Hog1 son las responsables de esta fosforilación. Para esto construimos las mutantes triples *ssk2Δssk22Δste11Δ* y *ssk2Δssk22Δsho1Δ* y determinamos la fosforilación de Hog1 en estrés hiperosmótico inducido con 0.8 M de NaCl. Como puede verse en la (**Figura 7A**) la triple mutante *ssk2Δssk22Δste11Δ* carece de las 3 MAPKKKs que participan en ambas ramas. La triple mutante *ssk2Δssk22Δsho1Δ* (**Figura 7C**) en cambio, solo tiene a la MAPKKK Ste11. Encontramos que sólo en la mutante *ssk1Δste11Δ* se induce la fosforilación de Hog1, pero no en las mutantes *hog1Δ*, *ssk2Δssk22Δste11Δ* y *ssk2Δssk22Δsho1Δ* (**Figura 8A**). Estos resultados indican que la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* depende de *Ssk2* y/o *Ssk22*, y de la presencia de *Pbs2*.



**Figura 7. Esquema de la vía de HOG. (A)** Doble mutante *ssk1Δste11Δ*. **(B)** triple mutante *ssk2Δssk22Δste11Δ*. **(C)** triple mutante *ssk2Δssk22Δsho1Δ*. **(D)** triple mutante *ssk1Δste11Δsho1Δ*. **(E)** triple mutante *ssk1Δste11Δsln1Δ*. **(F)** cuádruple mutante *ssk1Δste11Δsln1Δsho1Δ*. En rojo se muestran las proteínas que fueron mutadas en cada cepa.

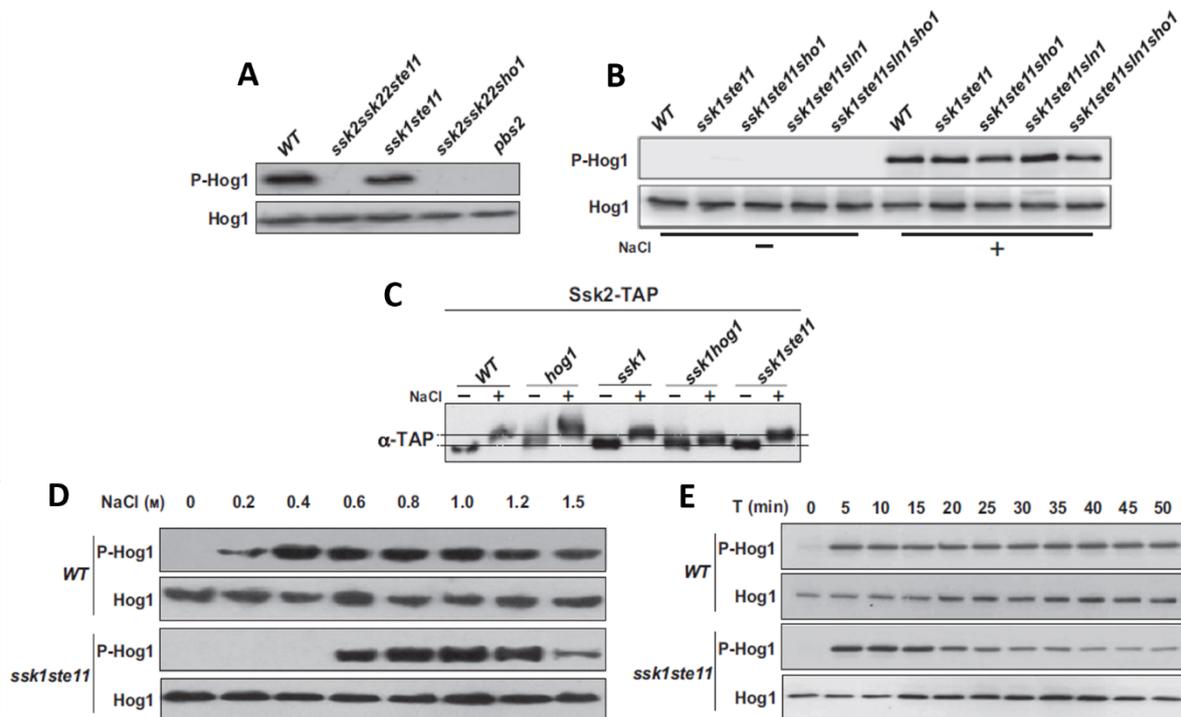
Con la finalidad de conocer si los osmosensores Sho1 o Sln1 podrían de alguna manera estar involucrados en la fosforilación de Hog1; se construyeron las triples mutantes *ssk1Δste11Δsho1Δ*, *ssk1Δste11Δsln1Δ* y la cuádruple mutante *ssk1Δste11Δsln1Δsho1Δ* (**Figura 7D-F**). Encontramos que en estas mutantes persiste la fosforilación de Hog1 al tratar las células con 0.8 M NaCl (**Figura 8B**). Esto nos indica que la fosforilación de Hog1 no requiere de los osmosensores Sln1 y Sho1, pero sí de la MAPKKK Ssk2/Ssk22 y también de Pbs2.

Para responder a la interrogante de si existe algún componente aún no conocido, independiente de Ssk1 y que pueda activar a Ssk2, se analizó el estado de fosforilación de ésta última en condiciones de estrés. Es importante mencionar que la activación de Ssk2 en

condiciones hiperosmóticas depende de su asociación con Ssk1. Al unirse Ssk1, Ssk2 se autofosforila y de ésta manera se activa [82]. El estado de fosforilación de Ssk2 lo evaluamos usando geles Phos-Tag. En este tipo de geles se puede analizar la fosforilación de una proteína por el cambio en su movilidad electroforética. Comparamos el estado de fosforilación de Ssk2 en la cepa WT y en las mutantes *hog1Δ*, *ssk1Δ*, *ssk1Δhog1Δ*, y *ssk1Δste11Δ*. Encontramos que, en estrés hiperosmótico, Ssk2 presentó un cambio de movilidad en las mutantes *ssk1Δ* y *ssk1Δste11Δ*; indicando que la fosforilación de Ssk2 ocurre aún en ausencia de Ssk1 (**Figura 8C**). Esto sugiere que Ssk2 puede ser el blanco de otro factor aún no conocido y cuya unión induce la autofosforilación de Ssk2.

La cinética de activación (fosforilación) de Hog1 varía según la magnitud del estrés osmótico y con el tiempo de exposición al estrés. Con la idea de explorar si la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* ocurre de manera similar a la de la cepa silvestre, evaluamos los efectos de la dosis y del tiempo de exposición al estrés. En la **Figura 8D** puede verse el efecto de la exposición durante 5 min a diferentes concentraciones de NaCl. La fosforilación de Hog1 en la cepa WT se detectó a partir de 0.2 M de NaCl, y ésta alcanza su punto más alto con 0.4 M de NaCl. En esta cepa Hog1 se mantuvo altamente fosforilado hasta una concentración de 1.0 M de NaCl, a partir de la cual disminuye paulatinamente (**Figura 8D**). En la doble mutante *ssk1Δste11Δ*, en cambio, Hog1 requiere una concentración más alta de NaCl (0.6 M) para ser fosforilado, a 0.8 M se observa la máxima fosforilación y esta decae drásticamente a 1.5 M.

El efecto del tiempo de exposición a estrés se determinó con un tratamiento de 0.8 M de NaCl. En éste caso, se observó que en la cepa WT, Hog1 alcanzó su máxima fosforilación a los 5 min y permanece invariable hasta los 50 min (**Figura 8E**). En cambio, en la cepa *ssk1Δste11Δ* la máxima fosforilación de Hog1 que se alcanza en los 5 min permanece en éste nivel solo hasta los 15 min y a partir de éste tiempo decae paulatinamente (**Figura 8E**). Estos datos indican que la cinética de fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* es diferente a la de la cepa silvestre; por un lado, se requiere un estrés más fuerte para fosforilarlo y por el otro es menos estable.



**Figura 8. La fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* en presencia de estrés hiperosmótico depende de *Ssk2/Ssk22*.**

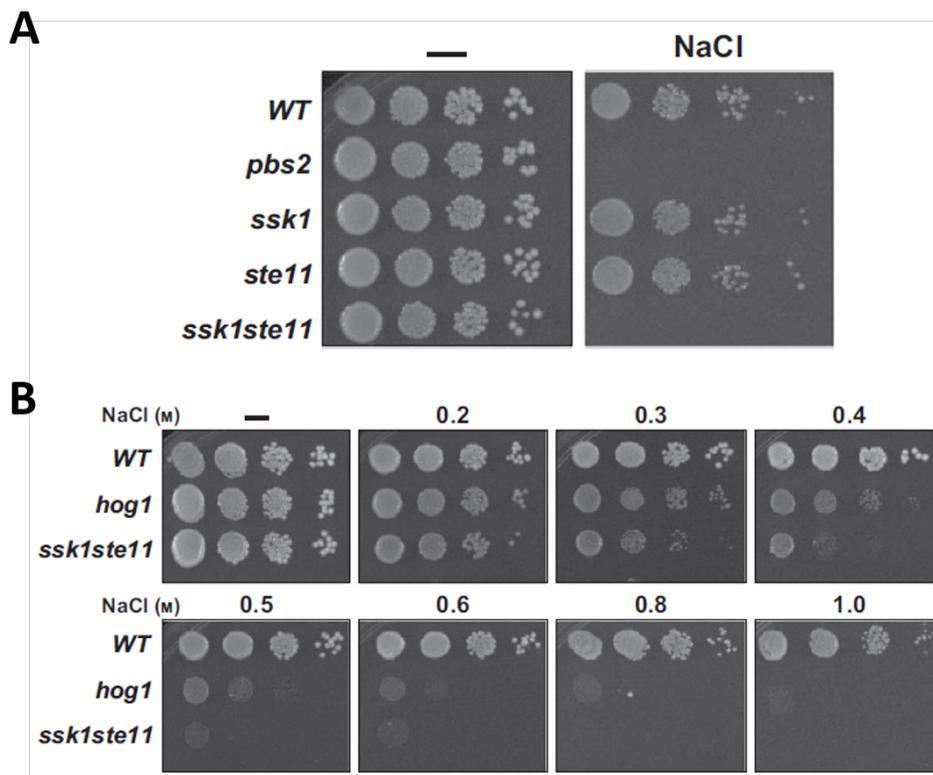
(A) Evaluación de la fosforilación de Hog1 mediante Western Blot; las cepas se trataron con 0.8 M de NaCl durante 5 min. Hog1 fosforilado se detectó con el anticuerpo (phospho-p38 MAPK Thr-174 and Tir-176), y el Hog1 total se observó usando el anticuerpo (anti-Hog1). (B) El experimento se desarrolló como en A. (C). Evaluación de la fosforilación de Ssk1 mediante geles de Phos-Tag. Ssk2 se etiquetó con TAP (Tandem Affinity Purification) y se detectó con el anticuerpo anti-PAP. Las células se trataron con 0.8 M de NaCl durante 5 min (D) Evaluación por Western blot de la fosforilación de Hog1 en diferentes concentraciones de NaCl durante 5 min. (E) Evaluación de la cinética de fosforilación de Hog1 en el transcurso del tiempo. Las cepas WT y la mutante *ssk1Δste11Δ* se trataron con 0.8 M de NaCl en YPD por los tiempos indicados.

## 5.2. La inactivación de *SSK1* y de *STE11* afecta el crecimiento celular en presencia de estrés hiperosmótico.

Con el objetivo de entender si en la mutante *ssk1Δste11Δ*, la fosforilación de Hog1 conduce a una respuesta adecuada al estrés hiperosmótico, se hizo un ensayo de crecimiento mediante diluciones seriadas en placas de YPD con 0.8 M de NaCl durante 72 hrs (ver materiales y métodos). En este ensayo se incluyeron las mutantes sencillas *ssk1Δ* y *ste11Δ* y como control a la mutante *pbs2Δ*. Se observó que el crecimiento de las mutantes sencillas *ssk1Δ* y *ste11Δ* es igual que el de la WT; esto se explica, porque cada mutante cuenta con la

rama complementaria (Sho1 o Sln1 respectivamente) para activar a Hog1 y, por lo tanto, son capaces de crecer adecuadamente (**Figura. 9A**). Como es de esperarse la mutante *pbs2Δ* en cambio, presenta una fuerte deficiencia de crecimiento, lo que se explica porque la activación de hog1 es totalmente dependiente de Pbs2. La mutante *ssk1Δste11Δ* por su parte, no crece en presencia de 0.8 M de NaCl, no obstante que Hog1 se fosforila a ésta concentración.

Para determinar el nivel de sensibilidad al estrés de la mutante *ssk1Δste11Δ* y compararlo con el nivel de sensibilidad que presenta la mutante *hog1Δ* se evaluó su crecimiento en diferentes concentraciones de NaCl. Se observó que la cepa *ssk1Δste11Δ* muestra mayor sensibilidad que la cepa *hog1Δ*, y esto se ve claramente desde una concentración de 0.3 M de NaCl (**Figura. 9B**). Nuevamente, a pesar de que en la mutante *ssk1Δste11Δ* el estrés induce la fosforilación de Hog1 como se mencionó anteriormente. Esto indica que la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* no es suficiente para promover una respuesta adaptativa al estrés hiperosmótico.

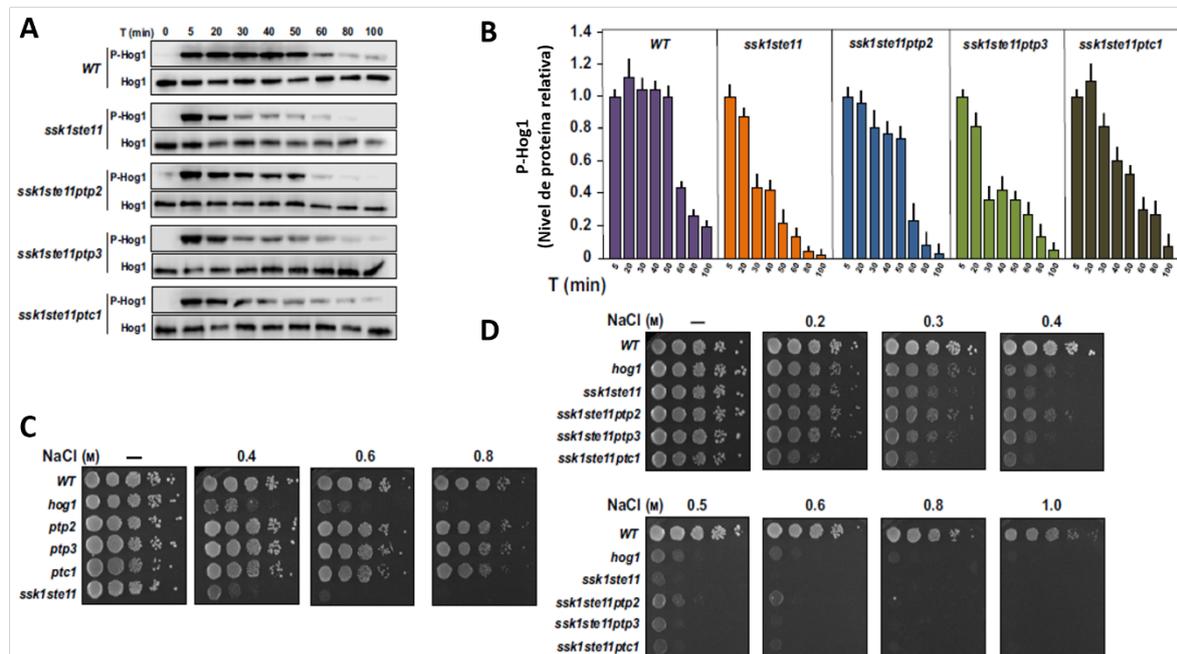


**Figura 9. La inactivación de *SSK1* y *STE11* afecta el crecimiento celular en presencia de estrés hiperosmótico. (A).** Ensayos de crecimiento en gota. La WT y las mutantes *pbs2Δ*, *ssk1Δ*, *ste11Δ* y *ssk1Δste11Δ* se crecieron hasta la fase logarítmica, se ajustó la OD<sub>600</sub>=0.5 y se gotearon en cajas de YPD suplementadas con 0.8 M de NaCl, las cepas se incubaron por 3 días a 30°C. La BY4741 WT se creció como control de crecimiento. **(B).** Diluciones seriadas logarítmicas (de izquierda a derecha en cada panel); la WT, *hog1Δ* y la *ssk1Δste11Δ* se crecieron en YPD con NaCl (0.2 a 1.2 M). Cada caja se incubó a 30°C por 3 días.

### **5.3. La inactivación de la fosfatasa Ptp2 evita la desfosforilación prematura de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ***

Las fosfatasas tipo 2C Ser/Thr (PTCs) y las fosfatasas de tirosina (PTPs) son las encargadas de desfosforilar a Hog1 y de esta manera regulan su actividad. Con el objetivo de evaluar si la inactivación de alguna de estas fosfatasas tiene un impacto sobre la respuesta a estrés hiperosmótico de la mutante *ssk1Δste11Δ* construimos mutantes en los genes que codifican para las fosfatasas *PTP2*, *PTP3* y *PTC1*. Se indujo estrés hiperosmótico a estas mutantes con 0.8 M de NaCl, y se analizó el nivel de fosforilación de Hog1. En este caso se observa que la fosforilación de Hog1 en la cepa WT permanece constante hasta los 50 min y disminuye gradualmente después de los 60 min (**Figura 10A y B**). En la mutante *ssk1Δste11Δ*, en cambio el nivel de fosforilación de Hog1 es primero similar al de la WT, pero luego disminuye a partir de los 20 min. En el caso de las triples mutantes *ssk1Δste11Δptp3Δ* y *ssk1Δste11Δptc1Δ*, la fosforilación de Hog1 no presenta cambios con respecto a la mutante *ssk1Δste11Δ* (**Figura 10A y B**). Esto sugiere que la desfosforilación prematura de Hog1 en la cepa *ssk1Δste11Δ*, no depende de Ptp3 ni de Ptc1. Sin embargo, en la triple mutante *ssk1Δste11Δptp2Δ* la desfosforilación de Hog1 es marcadamente menos acentuada que en la cepa *ssk1Δste11Δ* e incluso es similar a la de la cepa WT (**Figura 10A y B**). Esto sugiere fuertemente que la fosfatasa Ptp2 desfosforila a Hog1 con alta eficiencia en la mutante *ssk1Δste11Δ*. Por otra parte, determinamos el efecto de la inactivación de las fosfatasas en el crecimiento a diferentes concentraciones de NaCl. Observamos que las mutantes sencillas *ptp2Δ*, *ptp3Δ* y *ptc1Δ* crecen igual que la cepa WT (**Figura 10C**). Sin embargo, al mutar los genes *PTP2*, *PTP3* y *PTC1* en la doble *ssk1Δste11Δ*, observamos que solo la inactivación de Ptp2 produce un incremento en la resistencia a estrés hiperosmótico cuando se compara con el crecimiento de la mutante *ssk1Δste11Δ* (**Figura 10D**). Estos datos sugieren que al

menos parte del defecto que tiene la mutante *ssk1Δste11Δ* es que en condiciones de estrés Ptp2 desfosforila eficientemente a Hog1 y esto genera cierta sensibilidad.



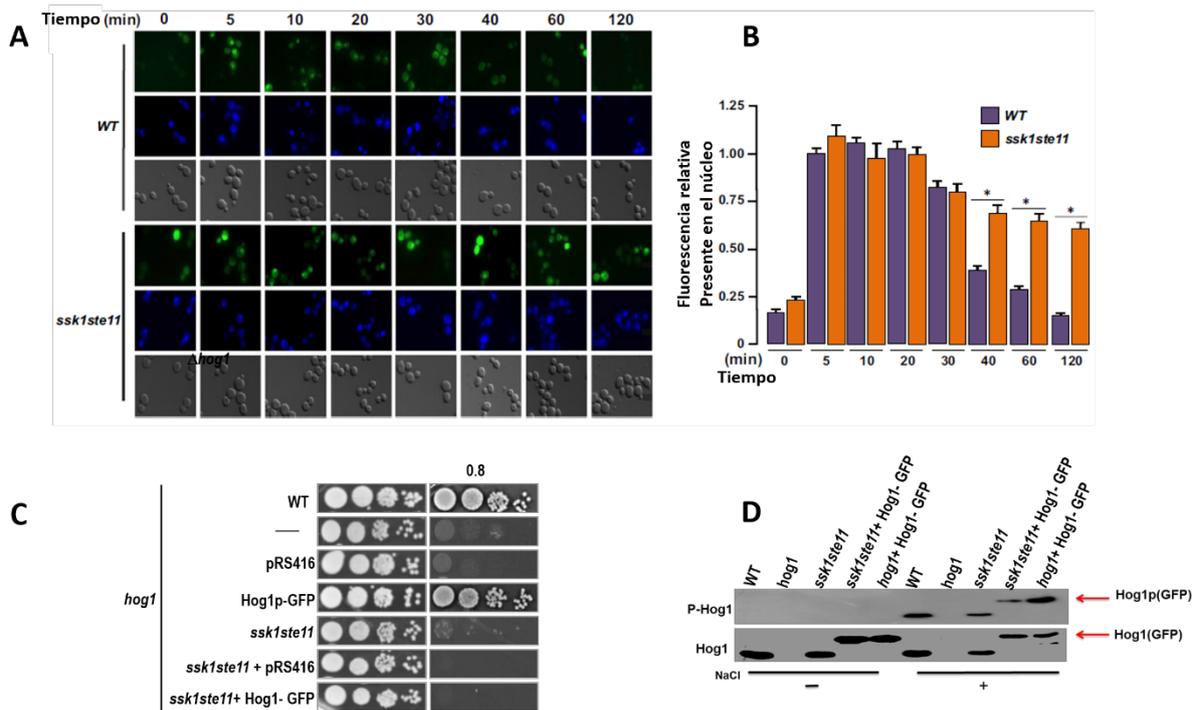
**Figura 10. Inactivación de Ptp2 permite un moderado crecimiento de la mutante *ssk1Δste11Δ* en un estrés osmótico bajo (A).** Uso de western blot para el análisis de la cinética en el tiempo de la fosforilación de Hog1 en la WT y las mutantes *ssk1Δste11Δ*, *ssk1Δste11Δptp2Δ*, *ssk1Δste11Δptp3Δ* y *ssk1Δste11Δptc1Δ*, en presencia de 0.8 M de NaCl (B). Análisis de densitometría del experimento A; la densidad ajustada de cada banda del western-blot, se calculó dividiendo la densidad real de la señal del Hog1 fosforilado entre la densidad real de la señal del Hog1 total. La señal está dada por la cantidad de píxeles de cada banda, considerando el área total y el ruido de fondo; el programa para el análisis fue el Image Studio Digits Ver 5.0. Los datos corresponden a tres experimentos independientes (C). Ensayo de diluciones en gota de la WT, la *ssk1Δste11Δ* y las mutantes sencillas *hog1Δ*, *ptp2Δ*, *ptp3Δ* y *ptc1Δ* en presencia de diferentes concentraciones de NaCl. (D). El experimento fue realizado como en C.

#### 5.4. Hog1 se transporta al núcleo en la mutante *ssk1Δste11Δ* durante el estrés hiperosmótico.

Se sabe que la fosforilación de Hog1 es necesaria para su importación al núcleo y su desfosforilación para su exportación, sin embargo, como se observa en los resultados

anteriores, la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* decae mucho más rápido que en la cepa WT. Es probable entonces que debido a ésta rápida desfosforilación (por la actividad de la Ptp2), el tiempo de permanencia de Hog1 en el núcleo en la mutante *ssk1Δste11Δ* sea menor y por ésta razón no sea capaz de inducir una respuesta adecuada al estrés hiperosmótico. Para responder ésto, evaluamos la localización de Hog1 por medio de la detección de la proteína de fusión Hog1-GFP. Para ésto evaluamos la distribución citoplasma/núcleo de Hog1 en presencia de 0.8 M de NaCl tanto en la cepa silvestre como en la mutante *ssk1Δste11Δ*. Se puede observar que después de 5 min de tratamiento hiperosmótico, Hog1 se transporta al núcleo tanto en la cepa WT como en la mutante *ssk1Δste11Δ* (**Figura 11 A**). La cantidad de Hog1 presente en el núcleo es la misma en ambas cepas hasta los 30 min del tratamiento con NaCl (**Figura 11 B**). Sin embargo, la cantidad de Hog1 que se encuentra en el núcleo en la cepa WT a los 40 min es 50 % menor que la que se encuentra en la mutante *ssk1Δste11Δ* (**Figura 11 A y B**). A los 120 min Hog1 se ha exportado completamente al citoplasma en la cepa WT, mientras que en la mutante *ssk1Δste11Δ* el 75% de la proteína se mantiene dentro del núcleo (**Figura 11 A y B**). Este resultado sugiere que la fosforilación en la doble mutante *ssk1Δste11Δ* es necesaria para inducir la internalización nuclear de Hog1, pero que una vez allí, Hog1 no se exporta al citoplasma a pesar de su rápida desfosforilación.

Para evaluar si Hog1-GFP logra complementar a una mutante *hog1Δ*, se analizó el crecimiento en placa con 0.8 M de NaCl de las mutantes *hog1Δ* y *ssk1Δste11Δhog1Δ* que expresan la fusión Hog1-GFP (**Figura 11 C**). Observamos que la mutante *hog1Δ* Hog1-GFP crece igual que la WT (**Figura 11 C**). Esto indica que Hog1-GFP puede complementar la ausencia de Hog1. También, evaluamos si Hog1-GFP se expresa correctamente para lo cual se evaluó por medio de western-blot. En la figura 11D se observa no sólo que la fusión Hog1-GFP se expresa correctamente, sino que también se fosforila en condiciones de estrés hiperosmótico tanto en la mutante *hog1Δ* como en la mutante *ssk1Δste11Δhog1Δ*. Lógicamente, la fusión de GFP a Hog1, aumenta su masa molecular como se observa en el western blot (**Figura 11 D**).



**Figura 11. Hog1 es internalizado al núcleo en la mutante *ssk1Δste11Δ* en presencia de estrés hiperosmótico. (A).** Distribución Núcleo/ citoplasma de Hog1 en presencia de estrés hiperosmótico. La mutante *hog1Δ* y la mutante *ssk1Δste11Δhog1Δ* se transformaron con el vector pRS416 -Hog1-GFP, las cepas se crecieron hasta una  $DO_{600} = 0.7$  y posteriormente se sometieron a estrés hiperosmótico 0.8 M de NaCl a los tiempos indicados. Hog1-GFP fue detectado por microscopía de fluorescencia. Las células se tiñeron con DAPI; el color azul representa el núcleo de la célula, y el color verde indica el Hog1-GFP. **(B).** Cuantificación de la distribución subcelular de Hog1-FGP en la WT y en la *ssk1Δste11Δhog1Δ*. La proporción de la fluorescencia entre en núcleo y citoplasma se determinó con el software ZEN Widefield 2012 ( $n > 100$  células). Los asteriscos indican las diferencias significativas de tres experimentos independientes. La ANOVA arrojando un  $\alpha$  de 0.05 y una  $p < 0.0001$ . **C.** Evaluación de la función del vector pRS416-Hog1-GFP: Se transformaron las mutantes *hog1Δ* y *ssk1Δste11Δhog1Δ* con el vector pRS416 (vector vacío) y con el vector pRS416-Hog1-GFP. Se crecieron las mutantes en 0.8 M de NaCl para evaluar su crecimiento **(D).** Evaluación de la proteína de Hog1 en el vector pRS416-Hog1-GFP: Se analizó el Hog1 de las mutantes *hog1Δ* y *ssk1Δste11Δhog1Δ* transformadas con el vector pRS416 -Hog1-GFP, mediante western-blot. Se usaron las cepas WT y la *ssk1Δste11Δ* como controles. Las cepas fueron expuestas a 0.8 M de NaCl en YPD durante 5 min. El estado de fosforilación de Hog1 se midió usando el anticuerpo (phospho-p38 MAPK Thr-174 and Tyr-176), y el control de carga de la proteína total se midió usando el anticuerpo (anti-Hog1).

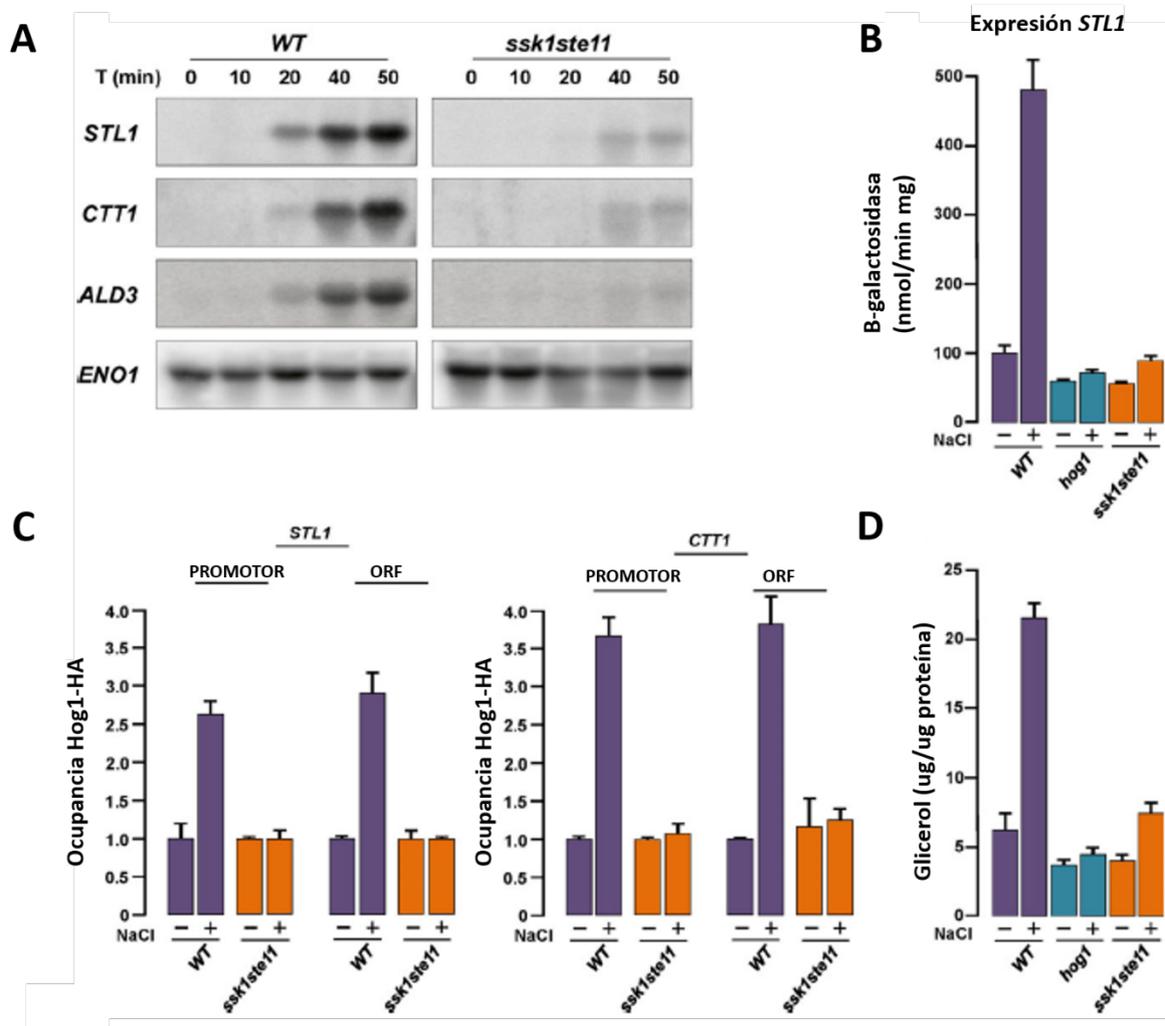
### 5.5. La mutante *ssk1Δste11Δ* no acumula glicerol y no es capaz de unirse a cromatina e inducir la expresión de genes de osmo-respuesta.

El estrés hiperosmótico induce cambios en la transcripción de varios genes que se requieren para una adecuada respuesta. Nosotros evaluamos la transcripción de un grupo de genes que aumentan su expresión en estrés osmótico y que son dependientes de Hog1. Estos genes son *CTT1*, *STL1*, y *ALD3*. Mediante western blot se detectó que el estrés hiperosmótico incrementa significativamente la expresión de los tres genes en la cepa WT, mientras que en la mutante *ssk1Δste11Δ* la expresión de los tres es apenas detectable (**Figura 12A**).

Adicionalmente, evaluamos la expresión de un gen reportero de  $\beta$ -galactosidasa regulado con el promotor del gen de *STL1*. *Stl1* es un transportador de glicerol y su actividad es dependiente de Hog1 y aumenta en respuesta al estrés hiperosmótico. Mientras que la expresión del gen reportero se incrementó hasta 5 veces en la cepa silvestre después del tratamiento con estrés hiperosmótico, en la mutante *ssk1Δste11Δ* permaneció en los niveles basales de expresión (**Figura 12B**). La expresión de *STL1* en la doble mutante fue muy similar a la expresión que tiene en una cepa *hog1Δ*. Estas observaciones indican que, aunque Hog1 se fosforila y se importa al núcleo en la cepa *ssk1Δste11Δ*, es incapaz de activar la transcripción de genes de osmorespuesta durante el estrés.

A continuación, nos preguntamos si la deficiencia en la transcripción de los genes de osmorespuesta en la cepa *ssk1Δste11Δ*, se debía a la falta de asociación de Hog1 a la cromatina. Para esto desarrollamos un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina (ChiP) con Hog1 etiquetado con el epítipo HA (Hog-HA) y evaluamos si Hog1 se une a la región promotora y a los ORFs de *STL1* y *CTT1*. Después de 5 min de exposición al estrés hiperosmótico, se detecta la unión de Hog1 tanto al promotor como al ORF de ambos genes en la cepa silvestre, pero no en la mutante *ssk1Δste11Δ* (**Figura 12C**). La falta de actividad transcripcional de Hog1 en la cepa *ssk1Δste11Δ*, se relaciona con su deficiente unión al ADN en estos genes de respuesta a estrés osmótico.

La producción y la acumulación de glicerol es uno de los mecanismos más importantes para que la célula se proteja del estrés hiperosmótico. Nos preguntamos entonces si la mutante *ssk1Δste11Δ* presenta un defecto en la acumulación de glicerol. Para esto se cuantificó el contenido de glicerol intracelular en la cepa WT y en las mutantes *hog1Δ* y *ssk1Δste11Δ* después de ser expuestas a 0.8 M de NaCl. Como puede verse en la **Figura 12D**, en la mutante *ssk1Δste11Δ* la acumulación de glicerol es equivalente al de la mutante *hog1Δ* y equivale a unas 3 veces menos que la acumulación en la cepa WT. Este resultado comprueba que en la mutante *ssk1Δste11Δ* la fosforilación de Hog1 en estrés hiperosmótico no induce una respuesta apropiada y explica su alta sensibilidad.



**Figura 12.** La mutante *ssk1Δste11Δ* no acumula glicerol y su Hog1 es incapaz de inducir la expresión de genes de osmorespuesta. (A). La WT y la mutante *ssk1Δste11Δ* se crecieron en YPD y se trataron con 0.8 M de NaCl. El RNA total fue colectado a los tiempos indicados, y el nivel de expresión de los genes *STL1*, *CTT1* y *ALD3* se analizó por northern blot; el gen *ENO1* se usó como

control de carga. **(B)**. Ensayo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa; La cepa WT y las mutantes *hog1 $\Delta$*  y *ssk1 $\Delta$ ste11 $\Delta$*  se transformaron con el vector vacío (Yep363-*LEU2*) y con el vector (Yep363- pSTL1-LacZ), las células se crecieron en YPD con 0.8 M de NaCl durante 30 min y la actividad específica se determinó por el método descrito por Miller (ver materiales y métodos). Los valores son el resultado de tres experimentos independientes. **(C)**. Inmunoprecipitación de la cromatina (ChiP), las cepas WT y *ssk1 $\Delta$ ste11 $\Delta$*  expresan a Hog1 etiquetado con HA, las células se expusieron a 0.8 M de NaCl por 5 min. La inmunoprecipitación se realizó usando el anticuerpo anti-HA. La unión a la región promotora y el ORF se detectaron por PCR en tiempo real. **(D)**. La WT y las mutantes *hog1 $\Delta$*  y *ssk1 $\Delta$ ste11 $\Delta$*  se crecieron en YPD con 0.8 M de NaCl durante 40 min. La Determinación de la acumulación de glicerol intracelular se determinó por el método de Hans-Ulrich Bergmeyer (ver metodología).

## 5.6. La ausencia de los genes *SSK1* y *STE11* promueve la acumulación de células en la fase G2/M del ciclo celular.

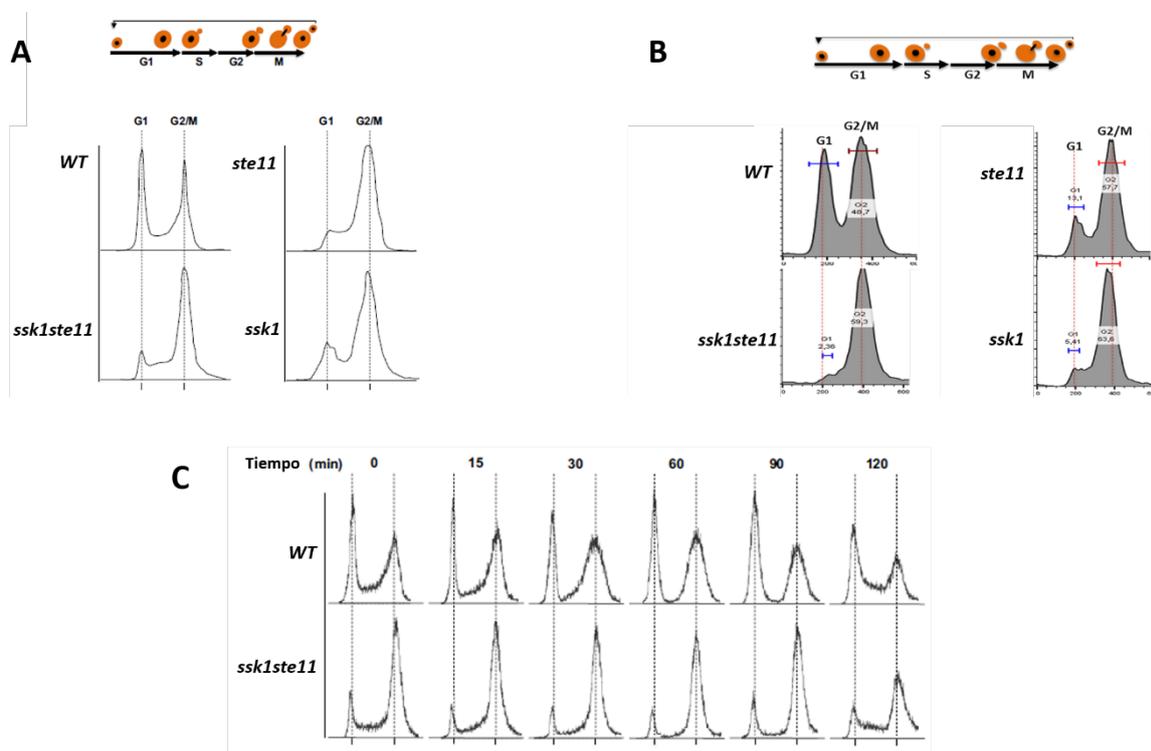
En respuesta a estrés hiperosmótico, las levaduras modulan la duración de las diferentes fases del ciclo celular para permitir su adaptación y supervivencia. Se ha visto que Hog1 está implicado en la regulación de varias fases del ciclo celular. Inicialmente analizamos el efecto que tiene un tratamiento de estrés hiperosmótico en la progresión del ciclo celular en un cultivo asincrónico de la mutante *ssk1 $\Delta$ ste11 $\Delta$*  y lo comparamos con células crecidas en condiciones iso-osmóticas.

En condiciones normales de cultivo, la distribución celular en las fases G1, S y G2/M fue muy diferente entre la cepa WT y las mutantes *ssk1 $\Delta$ ste11 $\Delta$* , *ste11 $\Delta$*  y *ssk1 $\Delta$*  (**Figura 13A**). Una muy pequeña fracción (10%) de las células de la mutante *ssk1 $\Delta$ ste11 $\Delta$*  se encuentran en la fase G1, mientras que la mayoría de las células se encuentran en G2/M (62%). La misma distribución se observó en las mutantes sencillas *ssk1 $\Delta$*  y *ste11 $\Delta$* . En comparación, el cultivo celular de la WT contiene una proporción similar de células en G1 (38%) y en G2/M (40%) (**Figura 13A**).

Con la finalidad de corroborar si los fenotipos en las mutantes *ssk1 $\Delta$ ste11 $\Delta$* , *ssk1 $\Delta$*  y *ste11 $\Delta$*  son reproducibles, se analizó el ciclo celular de estas mutantes, pero ahora en el fondo genético W303. Esta cepa de levadura es la que se usa más comúnmente para el estudio del ciclo celular (**Figura 13B**). Como puede verse en la figura la distribución celular en G1 y G2/M es muy similar en las cepas de la W303 que en las del fondo genético BY4741. La

distribución en la WT fue de 39% en la fase G1 y 40% en la fase G2/M. En la mutante *ssk1Δste11Δ* se repite la alta acumulación de células en G2/M, lo mismo que en las mutantes sencillas *ssk1Δ*, y *ste11Δ* (**Figura 13B**). Posteriormente se determinó el efecto de un tratamiento 0.8 M de NaCl en la distribución celular por fase (**Figura 13C**). Se observó que en la cepa WT la distribución celular no cambia significativamente con el tiempo de tratamiento comparada a la condición iso-osmótica. Lo mismo ocurre en la mutante *ssk1Δste11Δ*, esto es, el estrés hiperosmótico no genera cambios en la distribución celular comparada a la condición iso-osmótica y la mayor población celular se encuentra en fase G2/M (**Figura 13C**).

Estos resultados sugieren, que la ausencia de los genes *SSK1* y *STE11*, producen una acumulación celular en la fase G2/M del ciclo. Este es una observación muy interesante, ya que sugiere que la falta de estas proteínas de la vía de HOG repercute en la funcionalidad correcta del ciclo celular sin importar si la célula se encuentra en un estado isotónico o hipertónico.



**Figura 13. La ausencia de los genes *SSK1* y *STE11* inducen la acumulación del ciclo celular en la fase G2/M. (A).** La WT y las mutantes *ssk1Δste11Δ*, *ssk1Δ* y *ste11Δ*, se crecieron en YPD hasta una  $DO_{600}=0.7$ , posteriormente las células se fijaron y se tiñeron con SYTOX® Green (ver metodología), el contenido de DNA se analizó por citometría de flujo. En el eje Y se representa el contenido celular, y en el eje X se representa el contenido de ADN: 1C para la fase G1 y 2C para la fase G2/M. **(B).** Mismo experimento que A, pero la diferencia es que las cepas provienen del fondo genético W303. **(C).** La WT y la mutante *ssk1Δste11Δ* se crecieron en YPD con 0.8 M de NaCl. Evaluación del ciclo celular en el transcurso del tiempo. La *ssk1Δste11Δ* se acumula en G2 en todo el tiempo. Hay que recalcar que los experimentos A, B y C parten de cultivos asincrónicos.

### **5.7. La mutante *ssk1Δste11Δ* presenta una fase G1 más rápida que la WT bajo condiciones isotónicas, y presenta un retraso en la adaptación a estrés hiperosmótico.**

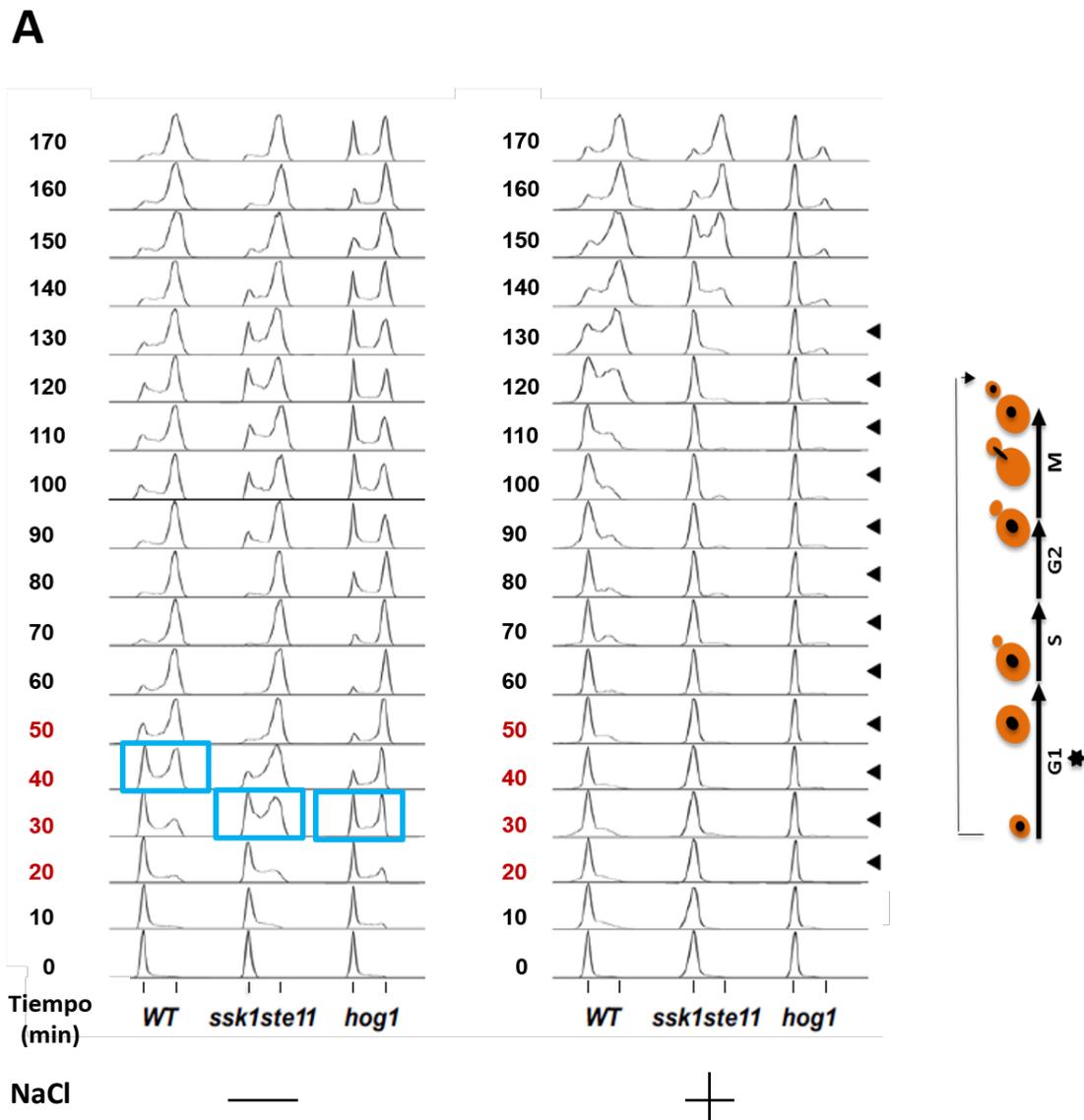
La acumulación en la fase G2/M que presenta la doble mutante *ssk1Δste11Δ*, puede deberse a dos fenómenos: uno es que la mutante presenta una G1 corta y transitoria y por lo tanto las células no se acumulan en ésta fase y por ende vemos su acumulación en G2/M; el segundo es que la mutante *ssk1Δste11Δ* presenta un problema para salir de la fase G2/M. Con la finalidad de abordar éste problema, medimos las transiciones de fases en células sincronizadas, con el propósito de que todas las células empiecen su ciclo celular desde el mismo punto.

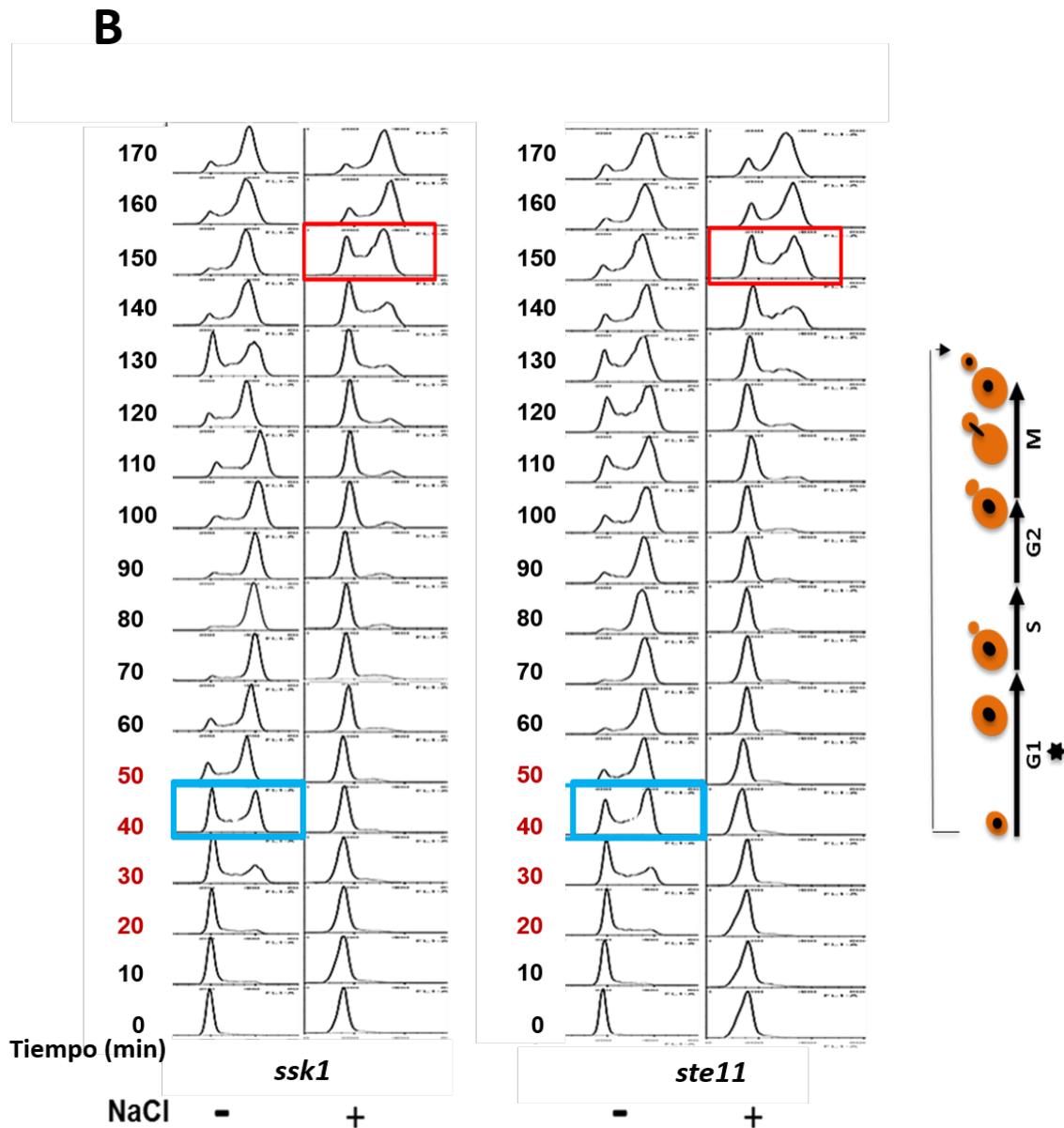
Inicialmente evaluamos la transición de las fases del ciclo partiendo de G1. Para esto se seleccionaron células en esta fase por el método de elutriación. La elutriación permite estudiar la progresión del ciclo desde G1 sin el uso de drogas que lo interrumpan, por lo que es un método limpio y muy confiable y consiste en separar y seleccionar células por su tamaño mediante centrifugación diferencial (Ver metodología).

Se separaron células en fase G1 de las cepas WT, *ssk1Δste11Δ*, *hog1Δ*, *ssk1Δ* y *ste11Δ* y se crecieron en condiciones iso-osmóticas y en condiciones de estrés hiperosmótico (0.8 M de NaCl). Se observó que en condiciones iso-osmóticas la salida de G1 fue unos 20 min más rápida en la mutante *ssk1Δste11Δ* que en la cepa WT (**Figura 14A**). Después de 50 min, muchas células de *ssk1Δste11Δ* ya han alcanzado la fase G2/M, mientras la cepa WT contiene una significativa proporción de células en G1.

En estrés hiperosmótico, observamos que, en la cepa WT el retraso para salir de la fase G1 fue de 60 min, mientras en la mutante *ssk1Δste11Δ* este retraso duró cerca de 130 min. El

comportamiento de ésta mutante fue muy similar al de la mutante *hog1Δ* la cual permaneció en la fase G1 después del tratamiento hiperosmótico (**Figura 14A**). Al analizar el comportamiento del ciclo celular de las mutantes sencillas *ssk1Δ* y *ste11Δ*, observamos que en condiciones iso-osmóticas presentan el mismo comportamiento que el de la WT (**Figura 14B**). Sin embargo, fue sorprendente observar, que en presencia de estrés hiperosmótico el ciclo celular fue similar al de la doble mutante *ssk1Δste11Δ* (**Figura 14B**).





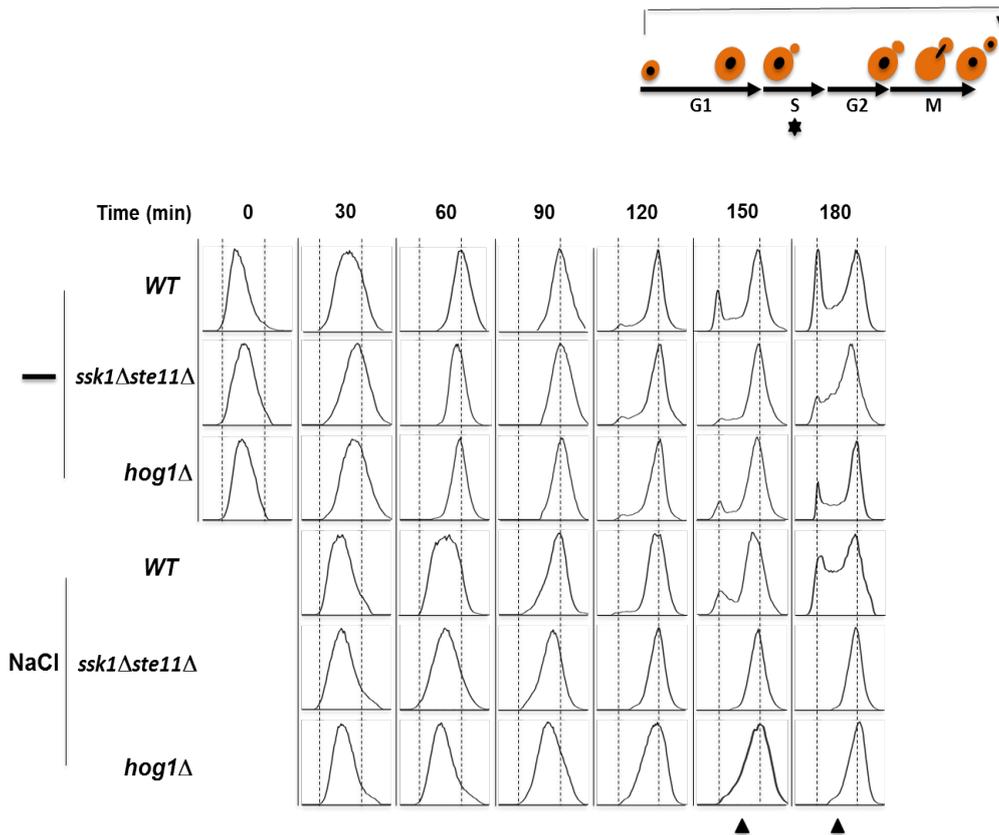
**Figura 14.** La mutante *ssk1Δste11Δ* presenta una fase G1 más rápida que la WT bajo condiciones isotónicas, y presenta un retraso en la adaptación a estrés hiperosmótico. **(A).** Las células fueron sincronizadas en fase G1 por elutriación (Ver metodología). Las células fueron liberadas del arresto en YPD y en YPD con 0.8 M de NaCl. El ciclo celular se evaluó cada 10 minutos en la WT y en las mutantes *ssk1Δste11Δ* y *hog1Δ*. Las células se tiñeron con SYTOX<sup>®</sup> green y el contenido de ADN se analizó por citometría de flujo. **(B).** El mismo experimento que A, pero para las mutantes sencillas *ssk1Δ* y *ste11Δ*.

**5.8. La salida de la fase S en la mutante *ssk1Δste11Δ* es equivalente al de la mutante *hog1Δ* en condiciones iso-osmóticas, y ambas presentan una falta de adaptación a estrés hiperosmótico.**

Hog1 también modula la progresión de la fase S en respuesta a un estrés hiperosmótico. Con la finalidad de estudiar el efecto del estrés en la fase S de la mutante *ssk1Δste11Δ* se sincronizaron células usando hidroxIUrea, la cual inhibe la replicación del ADN (ver metodología). Posteriormente liberamos las células creciéndolas en YPD y en YPD con 0.8 M de NaCl.

Cuando las células silvestres se trataron con hidroxIUrea, las células salieron de la fase S después de 60 minutos en condiciones iso-osmóticas y la fase G1 se empezó a observar a los 120 min; a los 180 min alcanzaron una distribución homogénea entre la fase G1 y la fase G2/M (**Figura 15**). En cambio, en condiciones iso-osmóticas las mutantes *ssk1Δste11Δ* y *hog1Δ* se comportaron de una manera muy similar, esto es, ambas salieron de la fase S 30 min más rápido que las células WT, y a los 180 min solo un 10 % de la población celular alcanzó la fase G1.

El estrés hiperosmótico por otro lado retrasó por 30 min la salida de la fase S en la cepa silvestre y la población G1 aparece hasta los 120 min, alcanzando una distribución homogénea en G1 y G2/M después de 180 min. En cambio, en la doble mutante *ssk1Δste11Δ* y en la mutante *hog1Δ*, la salida de la fase S fue aproximadamente 30 min más lenta que en la cepa WT, y aún después de 180 min nunca se observó la fase G1 (**Figura 15**).



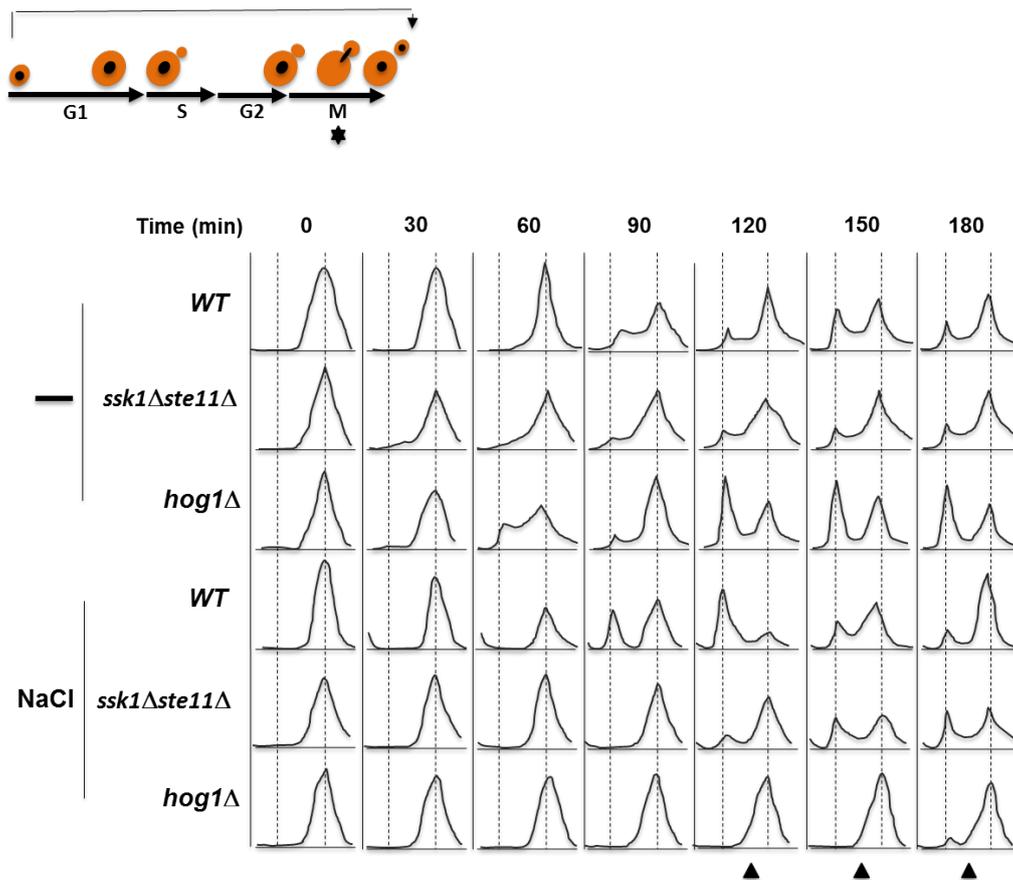
**Figura 15. La liberación de la fase S en la mutante *ssk1Δste11Δ* es equivalente al de la mutante *hog1Δ* en condiciones iso-osmóticas, y ambas presentan una falta de adaptación a estrés hiperosmótico.** Sincronización en fase S de la WT y la mutante *ssk1Δste11Δ* y *hog1Δ* con 200 mM de HU (Hidroxiurea) durante 2 hrs. Las células fueron liberadas de la HU y posteriormente resuspendidas en YPD o YPD con 0.8 M de NaCl. Las células se tiñeron con SYTOX® green y el contenido de ADN fue analizado por citometría de flujo; presentado como el contenido celular (en el eje Y) y el contenido de ADN (en el eje X).

### 5.9. El estrés hiperosmótico retrasa la salida de G2/M en la mutante *ssk1Δste11Δ*.

Finalmente estudiamos la última etapa del ciclo celular (G2/M), usando nocodazol para sincronizar las células en esta fase. El nocodazol interfiere con la formación del huso acromático en la metafase. Nosotros encontramos que, las células de las mutantes *ssk1Δste11Δ* y *hog1Δ* y de la cepa WT presentan un patrón similar en la salida de ésta fase en condiciones iso-osmóticas, excepto que la mutante *hog1Δ* alcanza la fase G1 30 min más rápido. En cambio, en la doble mutante sólo se logra apreciar una pequeña porción de células en G1 (**Figura 16**). En estrés hiperosmótico en cambio, la mutante *ssk1Δste11Δ*

muestra un retraso de unos 30 min en progresar a la fase G1 del ciclo celular, comparada con la silvestre y hasta los 120 min acumula una proporción significativa de células en G1. Las células de la mutante *hog1Δ* en cambio, no salen de G2/M hasta los 180 min de tratamiento (**Figura 16**).

De estos resultados se infiere que la mutante *ssk1Δste11Δ* presenta un defecto para salir de la fase G2/M, después de un tratamiento hiperosmótico.



**Figura 16.** Cuando el estrés osmótico ocurre en la fase G2/M, la mutante *ssk1Δste11Δ* retrasa la progresión del ciclo celular como una mutante *hog1Δ*. La WT y las mutantes *ssk1Δste11Δ* y *hog1Δ* se sincronizaron en la fase G2/M mediante la exposición a 0.2 M de nocodazol durante 3 hrs. Las células se liberaron del arresto en YPD y en YPD con 0.8 M de NaCl. Las muestras se tomaron a los tiempos indicados y se analizaron por citometría de flujo.

## 6. DISCUSIÓN

---

La fosforilación de Hog1 por mecanismos diferentes de los que involucran a las ramas de Sho1 y Sln1 se encuentran muy poco estudiada. Sólo unos pocos reportes indican que Hog1 puede ser fosforilado por un mecanismo no canónico [83, 84]. Van Wuytswinkel *et al.*, (2000) observaron experimentalmente, que Hog1 es fosforilado en presencia de un muy alto estrés hiperosmótico (NaCl 1,4 M) cuando las ramas Sho1 y Sln1 se encuentran inactivas; observaron también que las células son incapaces de crecer en estas condiciones y que Hog1 ingresa al núcleo de una manera mucho más lenta que en condiciones silvestres. Así mismo, observaron que Hog1 es incapaz de inducir la transcripción de genes de osmo-respuesta. Otro grupo de investigación observó que un estrés hiperosmótico moderado Hog1 es capaz de inducir la transcripción de genes en una mutante *ssk1Δste11Δ*, aunque en menor medida que la cepa silvestre [85].

En otro reporte [84] se observó que Hog1 se fosforila en una doble mutante *ssk1Δste11Δ* y que puede inducir una respuesta transcripcional, la cual, permitió el crecimiento de la doble mutante en 0.125 M de KCl, pero no en 0.5 M. En éste mismo reporte se observa que la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* fue más transitoria que en la cepa silvestre, pero fue suficiente para permitir un crecimiento moderado en un medio con alto contenido de sorbitol [84]. En el presente trabajo, sin embargo, nosotros ofrecemos una descripción mucho más precisa de los mecanismos que pueden explicar la duración de la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ*, y a diferencia de los otros reportes, explicamos porque en estas condiciones Hog1 no es capaz de generar protección contra el estrés. Aquí demostramos que, aunque la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* se da en condiciones de estrés un poco más altas que en la cepa silvestre, alcanzó niveles muy similares en tiempos cortos de exposición al estrés. También, describimos que la fosforilación de Hog1 en la cepa *ssk1Δste11Δ* es dependiente no solo de la MAPKK Pbs2, sino también de la MAPKKK Ssk2/22. Sin embargo, esta fosforilación se da aún en ausencia de las proteínas que definen a las dos ramas de la vía de HOG, Sln1 y Sho1. Estos resultados coinciden parcialmente con los reportados por Maeda *et al.*, 1995 y Zhi, *et al.*, 2013.

El estrés hiperosmótico induce la fosforilación de Ssk2 por al menos dos mecanismos diferentes: EL primer mecanismo incluye la presencia de un sistema de retroalimentación negativa que es mediado por Hog1; para esto Hog1 fosforila a Ssk2 en respuesta al estrés y como un mecanismo de atenuación [86]. El otro mecanismo es la autofosforilación de Ssk2 provocada por su asociación con Ssk1. Esto ocurre en condiciones normales y por la activación de la vía de Sln1 en respuesta al estrés [14]. En el presente trabajo mostramos que Ssk2 se fosforila en ausencia tanto de Ssk1 como de Hog1 y bajo un tratamiento de 0.8 M de NaCl. Estos resultados nos indican que Ssk2 se puede fosforilar por un mecanismo alternativo, el cual podría consistir en la interacción de alguna proteína aún desconocida con la región del N- terminal de Ssk2. Esta interacción podría ocasionar un cambio conformacional en Ssk2 que a su vez favorezca su autofosforilación y por lo tanto su activación. La activación de Ssk2 en ausencia de Ssk1 no es un fenómeno atípico ya que se ha observado que el reensamblaje del citoesqueleto de actina, después de un choque hiperosmótico requiere de la actividad de Ssk2, pero no de Ssk1, [87,88]. Nuestras observaciones sugieren que, en condiciones hiperosmóticas se forma un complejo en el cual participan Ssk2, Pbs2 y Hog1 y quizás una proteína desconocida y en el cual Ssk2 podría activarse por autofosforilación aún en ausencia de Ssk1 y de Ste11. En estas circunstancias Hog1 se fosforila, pero no se activa óptimamente, por lo que no genera protección al estrés. Esta observación coincide parcialmente con la de O'Rourke y Herskowitz [89].

Aunque en respuesta a estrés hiperosmótico Hog1 puede ser fosforilado y transportado al núcleo en la mutante *ssk1Δste11Δ*, no es capaz de asociarse con la cromatina, ni puede desencadenar la expresión de genes de osmo-respuesta y tampoco puede inducir la acumulación de glicerol en la célula. Esto sugiere que la asociación de Hog1 a la cromatina en la mutante *ssk1Δste11Δ*, requiere de factores adicionales que están ausentes o inactivos en ésta cepa. Esto explicaría la deficiente respuesta al estrés que se observa en ésta mutante, y no sólo eso, nuestras observaciones indican que la cepa *ssk1Δste11Δ* es ligeramente más sensible a estrés que la mutante *hog1Δ*, aun teniendo a Hog1 fosforilado durante el estrés hiperosmótico. Esto puede deberse a la presencia de un fuerte mecanismo de retroalimentación negativa ejercido por Hog1 fosforilado en la doble mutante; se sabe que Hog1 una vez fosforilado puede regular negativamente a las MAP

cinastas de otros sistemas como Fus3 y Kss1. Estas cinastas en condiciones particulares, como lo es en ausencia de Hog1, pueden activarse promiscuamente en condiciones de estrés hiperosmótico y activar en cierto grado genes de osmo resistencia generando una osmo-protección muy limitada [89, 90, 99, 100]. En las cepas que tienen Hog1 fosforilado como es el caso de la mutante *ssk1Δste11* esto no ocurriría por la fuerte regulación negativa que ejerce Hog1 sobre estas MAP cinastas.

Otra probable explicación, de porque el Hog1 fosforilado en la mutante *ssk1Δste11Δ* no puede inducir osmo-protección sería porque puede estar sujeto a una fuerte actividad de las proteínas fosfatasas. En nuestros experimentos encontramos que sólo la fosfatasa nuclear Ptp2 tuvo un efecto en la fosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ*. El tiempo en que Hog1 se mantuvo fosforilado aumentó aproximadamente 30 min en la mutante *ssk1Δste11Δptp2Δ* con respecto a la mutante *ssk1Δste11Δ* y ésto provocó un ligero aumento en su resistencia al estrés hiperosmótico. Esta observación indica que la falta de actividad de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* no se debe únicamente a una fuerte retroalimentación negativa dependiente de la Ptp2, y en todo caso, este mecanismo sólo contribuye parcialmente. El crecimiento de la mutante *ssk1Δste11Δptp2Δ* en medio de alta osmolaridad fue el mismo que el de la mutante *hog1Δ*, lo que sugiere que el Hog1 fosforilado en el mutante *ssk1Δste11Δptp2Δ* es equivalente a una falta de Hog1.

En los primeros 30 minutos después de un estrés hiperosmótico, el Hog1 fosforilado de la doble mutante presentó la misma cinética de importación nuclear que el Hog1 de la cepa silvestre. Sin embargo, a diferencia de una cepa silvestre en la cual Hog1 se exporta de vuelta al citoplasma, en la mutante *ssk1Δste11Δ* una alta proporción de la proteína permanece en el núcleo aún a tiempos muy largos. Esta observación contradice de cierta manera el hecho de que Hog1 en la doble mutante se desfosforila más rápido que en la cepa silvestre y por lo tanto, debería de salir más rápido del núcleo [91, 92]. Esta mayor retención de Hog1 dentro del núcleo se asemeja a la que presenta una mutante de la proteína que carece de la actividad cinasa. Se ha visto que esta mutante de Hog1 se transloca normalmente al núcleo, pero allí se retiene por su fuerte asociación con Ptp2 [24, 42, 93]. Por lo tanto, se puede inferir que la retención nuclear prolongada de Hog1 en la cepa

*ssk1Δste11Δ*, es consistente con su falta de actividad en la inducción de una respuesta protectora contra el estrés hiperosmótico.

Una de las actividades de Hog1 en respuesta a estrés hiperosmótico es la modulación del ciclo celular en sus diferentes fases. Esto es importante para la fisiología de la célula porque de esta manera se promueve la adaptación de la célula al estrés sin comprometer la sobrevivencia de la célula [6,94,95]. La doble mutante *ssk1Δste11Δ* tiene alteraciones en el ciclo celular aún en condiciones iso-osmóticas y tanto la falta de Ssk1 como de Ste11 contribuyen a este fenotipo. Una alta proporción de células de la mutante *ssk1Δste11Δ* se encuentran acumuladas en las fases G2 / M. Esto se debe a que en ésta mutante la fase G1 es muy corta. En la literatura no hay datos que indiquen que Ssk1 y Ste11 participan en la regulación de ésta fase del ciclo y como éste defecto se observa en ausencia de estrés, no se espera que Hog1 esté involucrado. El tratamiento con estrés hiperosmótico de la mutantes *ssk1Δste11Δ*, *ssk1Δ* y *ste11Δ*, no presentaron un cambio significativo en cuanto a la cantidad de células acumuladas en las fases G2/M, muy probablemente porque las células ya muestran un retraso en esta fase del ciclo celular.

Durante el estrés hiperosmótico Hog1 regula transitoriamente la expresión de las ciclinas de G1 [60, 95] y fosforila a Sic1 que es un inhibidor de la Cdk, lo que resulta en la prolongada inhibición de las ciclinas [66, 67], y esto retrasa de forma transitoria la entrada a la fase S. Eventualmente, una vez que las células han respondido y se han adaptado al estrés hiperosmótico, se reanuda el ciclo celular y las células ingresan a la fase S [53]. Cuando las células de la mutante *ssk1Δste11Δ* se sincronizan en la fase G1 y posteriormente se someten a estrés hiperosmótico se comportan de manera muy similar a las de la mutante *hog1Δ* durante un largo período de tiempo. Esto sugiere que, en estrés hiperosmótico, Hog1 fosforilado en la cepa *ssk1Δste11Δ* no puede regular la transición G1-S como sí ocurre en la cepa silvestre [66, 94].

Se sabe que Hog1 también induce un retraso transitorio en la fase S en presencia de un choque osmótico para evitar la replicación del ADN. Esto se consigue por el retraso que genera Hog1 en la expresión de la ciclina Clb5, y fosforilando directamente a la proteína Mrc1. Mrc1 es una proteína del complejo de replicación del ADN y actúa como punto de

control en la fase S. Mrc1 se fosforila en respuesta al daño al ADN y se fosforila también por la acción de Hog1 en estrés osmótico. Mrc1 fosforilada retrasa la formación del complejo de replicación y por lo tanto retrasa la entrada a la fase S [69, 60]. Una vez que hay adaptación al estrés osmótico, en la cepa silvestre, Hog1 disminuye su actividad y aumenta la expresión de Clb5 lo que promueve la transición y la salida de la fase S. En cambio, la mutante *ssk1Δste11Δ* expuesta a estrés hiperosmótico, presenta defectos en esa transición, tal como ocurre con la mutante *hog1Δ* lo que sugiere que Hog1 fosforilado en la cepa *ssk1Δste11Δ* es incapaz de regular la expresión de la ciclina Clb5 y de regular la actividad de Mrc1.

Hog1 también se requiere para la regulación de la transición de la fase G2 a la fase M y para la salida de la fase M. Esto lo hace regulando la acumulación de la proteína Swe1 a través de la fosforilación de Swe1 por Hsl1. Swe1 es una proteína cinasa que regula negativamente la entrada a la fase M porque fosforila a Cdc28, inhibiendo así la formación del complejo Clb2/Cdc28 [72, 74]. Cuando se completa la formación del anillo de septinas entre la célula madre y la célula hija, el punto de control morfogénético recluta en el cuello de la gema a un complejo de proteínas de cinasas dependientes de septina, entre ellas Hsl1 y Hsl7. Hog1 recluta y fosforila a Hsl1 y éste fosforilado promueve la deslocalización de Hsl7 del cuello de la gema, resultando de la acumulación de Swe1 y arrojando el ciclo en G2 [73]. Hog1 también, actúa indirectamente activando la fosfatasa Cdc14, la cual promueve la degradación de ciclinas tipo B y la desfosforilación de sustratos de Cdk lo que en su conjunto promueve la salida de la mitosis [96, 97]. En éste estudio observamos que la mutante *ssk1Δste11Δ* también presenta defectos en regular la salida de la fase M después de un estrés hiperosmótico. En éste caso vale la pena señalar que Hog1 también controla la expresión de Cdc28 mediante la regulación de la expresión de un lncRNA. Los RNA largos no codificantes (lncRNAs) influyen en la expresión genética porque interfieren en la transcripción y en la distribución de los nucleosomas, y modulan el estado epigenético de la cromatina. Hog1 coordina directamente la transcripción de un lncRNA se encuentra orientado de manera antisentido al gen de Cdc28 [98]. La regulación de Cdc28 parece ser importante para la entrada al ciclo celular después del retraso causado por el estrés. En la doble mutante *ssk1Δste11Δ* muy probablemente, existe una deficiente regulación transcripcional de Cdc28 y por consiguiente no puede salir adecuadamente de G2/M y progresar en el ciclo celular.

En éste estudio se proporcionan evidencias de que cuando Hog1 se fosforila en una cepa con una defectuosa conexión con los osmosensores, no es capaz de inducir una respuesta adecuada al estrés osmótico y las células no pueden adaptarse lo que compromete su viabilidad. Esto implica que la fosforilación de Hog1 y su ingreso al núcleo no es suficiente y que se requiere de otros elementos que promueven su actividad en los procesos de adaptación al estrés.

## 7. CONCLUSIONES

---

1. Hog1 se fosforila en una mutante *ssk1Δste11Δ* en presencia de estrés hiperosmótico, y su fosforilación es dependiente de Ssk2/Ssk22.
2. La inactivación de *SSK1* y *STE11* afecta el crecimiento celular en presencia de estrés hiperosmótico.
3. La fosfatasa Ptp2 participa en la desfosforilación de Hog1 en la mutante *ssk1Δste11Δ* y su Inactivación permite un moderado crecimiento de ésta mutante en estrés hiperosmótico.
4. Hog1 es internalizado al núcleo en la mutante *ssk1Δste11Δ* en presencia de estrés hiperosmótico.
5. La mutante *ssk1Δste11Δ* no acumula glicerol y en ésta cepa Hog1 no es capaz de unirse a cromatina e inducir la expresión de genes de osmo-respuesta.
6. La ausencia de los genes *SSK1* y *STE11* acorta la fase G1 y genera la acumulación de las células en la fase G2/M.
7. La mutante *ssk1Δste11Δ* presenta defectos en cada una de las fases del ciclo celular y de manera general se comporta como una mutante *hog1*.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

---

- [1] Kurtzman, C., Fell, J.W. and Boekhout, T. eds., 2011. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- [2] Hohmann, S. and Mager, W.H. eds., 2007. *Yeast stress responses* (Vol. 1). Springer Science & Business Media.
- [3] Saxena, A. and Sitaraman, R., 2016. Osmoregulation in *Saccharomyces cerevisiae* via mechanisms other than the high-osmolarity glycerol pathway. *Microbiology*, 162(9), pp.1511-1526.
- [4] Soveral, G., Madeira, A., Loureiro-Dias, M.C. and Moura, T.F., 2007. Water transport in intact yeast cells as assessed by fluorescence self-quenching. *Appl. Environ. Microbiol.*, 73(7), pp.2341-2343.
- [5] Krantz, M., Becit, E. and Hohmann, S., 2006. Comparative analysis of HOG pathway proteins to generate hypotheses for functional analysis. *Current genetics*, 49(3), pp.152-165.
- [6] Saito, H. and Posas, F., 2012. Response to hyperosmotic stress. *Genetics*, 192(2), pp.289-318.
- [7] Chen, R.E. and Thorner, J., 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1773(8), pp.1311-1340.
- [8] 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(5223), pp.554-558.
- [9] O'Rourke, S.M. and Herskowitz, I., 2004. Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Molecular biology of the cell*, 15(2), pp.532-542.

- [10] Reiser, V., Raitt, D.C. and Saito, H., 2003. Yeast osmosensor Sln1 and plant cytokinin receptor Cre1 respond to changes in turgor pressure. *The Journal of cell biology*, 161(6), pp.1035-1040.
- [11] 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(6), pp.865-875.
- [12] Ota, I.M. and Varshavsky, A., 1993. A yeast protein similar to bacterial two-component regulators. *Science*, 262(5133), pp.566-569.
- [13] Janiak-Spens, F., Sparling, D.P. and West, A.H., 2000. Novel role for an HPt domain in stabilizing the phosphorylated state of a response regulator domain. *Journal of bacteriology*, 182(23), pp.6673-6678.
- [14] 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(5), pp.1385-1394.
- [15] 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. *The EMBO Journal*, 22(14), pp.3624-3634.
- [16] Brewster, J.L. and Gustin, M.C., 1994. Positioning of cell growth and division after osmotic stress requires a MAP kinase pathway. *Yeast*, 10(4), pp.425-439.
- [17] Tanaka, K., Tatebayashi, K., Nishimura, A., Yamamoto, K., Yang, H.Y. and Saito, H., 2014. Yeast osmosensors Hkr1 and Msb2 activate the Hog1 MAPK cascade by different mechanisms. *Sci. Signal.*, 7(314), pp.ra21-ra21.
- [18] Lamson, R.E., Winters, M.J. and Pryciak, P.M., 2002. Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Molecular and cellular biology*, 22(9), pp.2939-2951.

- [19] Raitt, D.C., Johnson, A.L., Erkine, A.M., Makino, K., Morgan, B., Gross, D.S. and Johnston, L.H., 2000. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Molecular biology of the cell*, 11(7), pp.2335-2347.
- [20] Posas, F. and Saito, H., 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science*, 276(5319), pp.1702-1705.
- [21] Zarrinpar, A., Bhattacharyya, R.P., Nittler, M.P. and Lim, W.A., 2004. Sho1 and Pbs2 act as coscaffolds linking components in the yeast high osmolarity MAP kinase pathway. *Molecular cell*, 14(6), pp.825-832.
- [22] Tatebayashi, K., Tanaka, K., Yang, H.Y., Yamamoto, K., Matsushita, Y., Tomida, T., Imai, M. and Saito, H., 2007. Transmembrane mucins Hkr1 and Msb2 are putative osmosensors in the SHO1 branch of yeast HOG pathway. *The EMBO journal*, 26(15), pp.3521-3533.
- [23] Reiser, V., Salah, S.M. and Ammerer, G., 2000. Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmostress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nature Cell Biology*, 2(9), p.620.
- [24] Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. and Silver, P.A., 1998. Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin  $\beta$  homologs NMD5 and XPO1. *The EMBO journal*, 17(19), pp.5606-5614.
- [25] Reiser, V., Ruis, H. 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*, 10(4), pp.1147-1161.
- [26] Hohmann, S., 2002. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiology and molecular biology reviews*, 66(2), pp.300-372.

- [27] 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. *Molecular and cellular biology*, *14*(6), pp.4135-4144.
- [28] Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M. and Adler, L., 1997. The two isoenzymes for yeast NAD<sup>+</sup>-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by GPD1 and GPD2 have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *The EMBO journal*, *16*(9), pp.2179-2187.
- [29] Ericksson, P., Andre, L., Ansell, R., Blomberg, A. and Adler, L., 1995. Molecular cloning of GPD2, a second gene encoding sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase (NAD<sup>+</sup>) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol*, *17*, pp.95-107.
- [30] Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E. and Arino, J., 2000. The transcriptional response of yeast to saline stress. *Journal of Biological Chemistry*.
- [31] Tamás, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C.W., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J. and Gustafsson, L., 1999. Fps1p controls the accumulation and release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. *Molecular microbiology*, *31*(4), pp.1087-1104.
- [32] Mager, W.H. and Varela, J.C., 1993. Osmostress response of the yeast *Saccharomyces*. *Molecular microbiology*, *10*(2), pp.253-258.
- [33] Yancey, P.H., 2005. Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *Journal of Experimental Biology*, *208*(15), pp.2819-2830.
- [34] Bicknell, A.A., Tourtellotte, J. and Niwa, M., 2010. Late phase of endoplasmic reticulum stress response pathway is regulated by Hog1 MAP kinase. *Journal of Biological Chemistry*, pp.jbc-M109.

- [35] Torres-Quiroz, F., García-Marqués, S., Coria, R., Randez-Gil, F. and Prieto, J.A., 2010. The activity of the yeast HOG1 MAP kinase is required during endoplasmic reticulum stress induced by tunicamycin exposure. *Journal of Biological Chemistry*, pp.jbc-M109.
- [36] Eraso, P., Mazón, M.J., Posas, F. and Portillo, F., 2011. Gene expression profiling of yeasts overexpressing wild type or misfolded Pma1 variants reveals activation of the Hog1 MAPK pathway. *Molecular microbiology*, 79(5), pp.1339-1352.
- [37] Brewster, J.L., de Valoir, T., Dwyer, N.D., Winter, E. and Gustin, M.C., 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*, 259(5102), pp.1760-1763.
- [38] Klipp, E., Nordlander, B., Krüger, R., Gennemark, P. and Hohmann, S., 2005. Integrative model of the response of yeast to osmotic shock. *Nature biotechnology*, 23(8), p.975.
- [39] Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. and Weis, K., 1997. Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, 90(6), pp.1041-1050.
- [40] Warmka, J., Hanneman, J., Lee, J., Amin, D. and Ota, I., 2001. Ptc1, a type 2C Ser/Thr phosphatase, inactivates the HOG pathway by dephosphorylating the mitogen-activated protein kinase Hog1. *Molecular and Cellular Biology*, 21(1), pp.51-60.
- [41] Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S. and Ota, I., 2002. Role of Ptc2 type 2C Ser/Thr phosphatase in yeast high-osmolarity glycerol pathway inactivation. *Eukaryotic cell*, 1(6), pp.1032-1040.
- [42] 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 & Development*, 14(10), pp.1229-1235.
- [43] Zhan, X.L. and Guan, K.L., 1999. A specific protein–protein interaction accounts for the in vivo substrate selectivity of Ptp3 towards the Fus3 MAP kinase. *Genes & development*, 13(21), pp.2811-2827.

[44] Molin, C., Jauhainen, A., Warringer, J., Nerman, O. and Sunnerhagen, P., 2009. mRNA stability changes precede changes in steady-state mRNA amounts during hyperosmotic stress. *Rna*.

[45] Romero-Santacreu, L., Moreno, J., Pérez-Ortín, J.E. and Alepuz, P., 2009. Specific and global regulation of mRNA stability during osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*.

[46] Miller, C., Schwalb, B., Maier, K., Schulz, D., Dümcke, S., Zacher, B., Mayer, A., Sydow, J., Marcinowski, L., Dölken, L. and Martin, D.E., 2011. Dynamic transcriptome analysis measures rates of mRNA synthesis and decay in yeast. *Molecular systems biology*, 7(1), p.458.

[47] de Nadal, E. and Posas, F., 2007. Regulation of gene expression in response to osmotic stress by the yeast stress-activated protein kinase Hog1. In *Stress-Activated Protein Kinases* (pp. 81-97). Springer, Berlin, Heidelberg.

[48] Martinez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schüller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. and Estruch, F., 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *The EMBO journal*, 15(9), pp.2227-2235.

[49] Schmitt, A.P. and McEntee, K., 1996. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(12), pp.5777-5782.

[50] Rep, M., Albertyn, J., Thevelein, J.M., Prior, B.A. and Hohmann, S., 1999. Different signalling pathways contribute to the control of GPD1 gene expression by osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 145(3), pp.715-727.

[51] Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C. and Brandt, A., 2005. A member of the sugar transporter family, Stl1p is the

glycerol/H<sup>+</sup> symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 16(4), pp.2068-2076.

[52] Alepuz, P.M., Jovanovic, A., Reiser, V. and Ammerer, G., 2001. Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Molecular cell*, 7(4), pp.767-777.

[53] Clotet, J. and Posas, F., 2007. Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. *Methods in enzymology*, 428, pp.63-76.

[54] Flattery-O'Brien, J.A. and Dawes, I.W., 1998. Hydrogen peroxide causes RAD9-dependent cell cycle arrest in G2 in *Saccharomyces cerevisiae* whereas menadione causes G1 arrest independent of RAD9 function. *Journal of Biological Chemistry*, 273(15), pp.8564-8571.

[55] Li, X. and Cai, M., 1999. Recovery of the Yeast Cell Cycle from Heat Shock-induced G1 Arrest Involves a Positive Regulation of G1 Cyclin Expression by the S Phase Cyclin Clb5. *Journal of Biological Chemistry*, 274(34), pp.24220-24231.

[56] Alexander, M.R., Tyers, M., Perret, M., Craig, B.M., Fang, K.S. and Gustin, M.C., 2001. Regulation of cell cycle progression by Swe1p and Hog1p following hypertonic stress. *Molecular Biology of the Cell*, 12(1), pp.53-62.

[57] Dmitrieva, N.I., Bulavin, D.V., Fornace, A.J. and Burg, M.B., 2002. Rapid activation of G2/M checkpoint after hypertonic stress in renal inner medullary epithelial (IME) cells is protective and requires p38 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(1), pp.184-189.

[58] Joaquin, M., Gubern, A., González-Nuñez, D., Ruiz, E.J., Ferreiro, I., De Nadal, E., Nebreda, A.R. and Posas, F., 2012. The p57 CDKi integrates stress signals into cell-cycle progression to promote cell survival upon stress. *The EMBO journal*, 31(13), pp.2952-2964.

- [59] Yaakov, G., Duch, A., García-Rubio, M., Clotet, J., Jimenez, J., Aguilera, A. and Posas, F., 2009. The stress-activated protein kinase Hog1 mediates S phase delay in response to osmostress. *Molecular biology of the cell*, 20(15), pp.3572-3582.
- [60] Bellí, G., Garí, E., Aldea, M. and Herrero, E., 2001. Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular microbiology*, 39(4), pp.1022-1035.
- [61] Garí, E., Volpe, T., Wang, H., Gallego, C., Futcher, B. and Aldea, M., 2001. Whi3 binds the mRNA of the G1 cyclin CLN3 to modulate cell fate in budding yeast. *Genes & development*, 15(21), pp.2803-2808.
- [62] Costanzo, M., Nishikawa, J.L., Tang, X., Millman, J.S., Schub, O., Breikreuz, K., Dewar, D., Rupes, I., Andrews, B. and Tyers, M., 2004. CDK activity antagonizes Whi5, an inhibitor of G1/S transcription in yeast. *Cell*, 117(7), pp.899-913.
- [63] Verma, R., Annan, R.S., Huddleston, M.J., Carr, S.A., Reynard, G. and Deshaies, R.J., 1997. Phosphorylation of Sic1p by G1 Cdk required for its degradation and entry into S phase. *Science*, 278(5337), pp.455-460.
- [64] Masumoto, H., Muramatsu, S., Kamimura, Y. and Araki, H., 2002. S-Cdk-dependent phosphorylation of Sld2 essential for chromosomal DNA replication in budding yeast. *Nature*, 415(6872), p.651.
- [65] Tanaka, S., Umemori, T., Hirai, K., Muramatsu, S., Kamimura, Y. and Araki, H., 2007. CDK-dependent phosphorylation of Sld2 and Sld3 initiates DNA replication in budding yeast. *Nature*, 445(7125), p.328.
- [66] Escoté, X., Zapater, M., Clotet, J. and Posas, F., 2004. Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nature cell biology*, 6(10), p.997.

- [67] Zapater, M., Clotet, J., Escoté, X. and Posas, F., 2005. Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. *Cell cycle*, 4(1), pp.6-7.
- [68] Aguilera, A. and Gómez-González, B., 2008. Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), p.204.
- [69] Duch, A., Felipe-Abrio, I., Barroso, S., Yaakov, G., García-Rubio, M., Aguilera, A., de Nadal, E. and Posas, F., 2013. Coordinated control of replication and transcription by a SAPK protects genomic integrity. *Nature*, 493(7430), p.116.
- [70] Althoefer, H., Schleiffer, A., Wassmann, K., Nordheim, A. and Ammerer, G., 1995. Mcm1 is required to coordinate G2-specific transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular biology*, 15(11), pp.5917-5928.
- [71] Jorgensen, P. and Tyers, M., 2000. The fork'ed path to mitosis. *Genome biology*, 1(3), pp. reviews1022-1.
- [72] Amon, A., Surana, U., Muroff, I. and Nasmyth, K., 1992. Regulation of p34CDC28 tyrosine phosphorylation is not required for entry into mitosis in *S. cerevisiae*. *Nature*, 355(6358), pp.368-371.
- [73] McNulty, J.J. and Lew, D.J., 2005. Swe1p responds to cytoskeletal perturbation, not bud size, in *S. cerevisiae*. *Current biology*, 15(24), pp.2190-2198.
- [74] Clotet, J., Escote, X., Adrover, M.À., Yaakov, G., Garí, E., Aldea, M., de Nadal, E. and Posas, F., 2006. Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. *The EMBO journal*, 25(11), pp.2338-2346.
- [75] Wach, A., 1996. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *S. cerevisiae*. *Yeast*, 12(3), pp.259-265

- [76] Sikorski, R.S. and Boeke, J.D., 1991. [20] In vitro mutagenesis and plasmid shuffling: From cloned gene to mutant yeast. In *Methods in enzymology* (Vol. 194, pp. 302-318). Academic Press.
- [77] Hill, J.E., Myers, A.M., Koerner, T.J. and Tzagoloff, A., 1986. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast*, 2(3), pp.163-167.
- [78] Goldstein, A.L. and McCusker, J.H., 1999. Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(14), pp.1541-1553.
- [79] Sherman, F., Fink, G.R. and Hicks, J.B., 1986. Laboratory course manual for methods in yeast genetics.
- [80] Aebi, H. and Bergmeyer, H.U., 1984. Methods of enzymatic analysis. Catalase.
- [81] Nadal-Ribelles, M., Conde, N., Flores, O., González-Vallinas, J., Eyras, E., Orozco, M., de Nadal, E. and Posas, F., 2012. Hog1 bypasses stress-mediated down-regulation of transcription by RNA polymerase II redistribution and chromatin remodeling. *Genome biology*, 13(11), p.R106.
- [82] 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(5), pp.1385-1394.
- [83] Van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M.C., Ammerer, G., Ruis, H. and Mager, W.H., 2000. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Molecular microbiology*, 37(2), pp.382-397.
- [84] Zhi, H., Tang, L., Xia, Y. and Zhang, J., 2013. Ssk1p-independent activation of Ssk2p plays an important role in the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*: alternative activation of Ssk2p in osmotic stress. *PLoS One*, 8(2), p. e54867.

- [85] O'Rourke, S.M. and Herskowitz, I., 2004. Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Molecular biology of the cell*, 15(2), pp.532-542.
- [86] 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. *Integrative Biology*, 7(4), pp.412-422.
- [87] Yuzyuk, T. and Amberg, D.C., 2003. Actin recovery and bud emergence in osmotically stressed cells requires the conserved actin interacting mitogen-activated protein kinase kinase kinase Ssk2p/MTK1 and the scaffold protein Spa2p. *Molecular biology of the cell*, 14(7), pp.3013-3026.
- [88] Bettinger, B.T., Clark, M.G. and Amberg, D.C., 2007. Requirement for the polarisome and formin function in Ssk2p-mediated actin recovery from osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*.
- [89] O'Rourke, S.M. and Herskowitz, I., 2004. Unique and redundant roles for HOG MAPK pathway components as revealed by whole-genome expression analysis. *Molecular biology of the cell*, 15(2), pp.532-542.
- [90] O'Rourke, S.M. and Herskowitz, I., 1998. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*, 12(18), pp.2874-2886
- [91] Pitoniak, A., Birkaya, B., Dionne, H.M., Vadaie, N. and Cullen, P.J., 2009. The signaling mucins Msb2 and Hkr1 differentially regulate the filamentation mitogen-activated protein kinase pathway and contribute to a multimodal response. *Molecular biology of the cell*, 20(13), pp.3101-3114.

- [92] Westfall, P.J. and Thorner, J., 2006. Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. *Eukaryotic cell*, 5(8), pp.1215-1228.
- [93] Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A. and Saito, H., 1997. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 and PTP3 protein tyrosine phosphatases. *Molecular and Cellular Biology*, 17(3), pp.1289-1297.
- [94] Adrover, M.À., Zi, Z., Duch, A., Schaber, J., Gonzalez-Novo, A., Jimenez, J., Nadal-Ribelles, M., Clotet, J., Klipp, E. and Posas, F., 2011. Time-dependent quantitative multicomponent control of the G1-S network by the stress-activated protein kinase Hog1 upon osmostress. *Sci. Signal.*, 4(192), pp.ra63-ra63.
- [95] González-Novo, A., Jiménez, J., Clotet, J., Nadal-Ribelles, M., Cavero, S., de Nadal, E. and Posas, F., 2015. Hog1 targets Whi5 and Msa1 transcription factors to down-regulate cyclin expression upon stress. *Molecular and cellular biology*, pp.MCB-01279.
- [96] Stegmeier, F. and Amon, A., 2004. Closing mitosis: the functions of the Cdc14 phosphatase and its regulation. *Annu. Rev. Genet.*, 38, pp.203-232.
- [97] Reiser, V., D'aquino, K.E., Ee, L.S. and Amon, A., 2006. The stress-activated mitogen-activated protein kinase signaling cascade promotes exit from mitosis. *Molecular biology of the cell*, 17(7), pp.3136-3146.
- [98] Nadal-Ribelles, M., Solé, C., Xu, Z., Steinmetz, L.M., de Nadal, E. and Posas, F., 2014. Control of Cdc28 CDK1 by a stress-induced lncRNA. *Molecular cell*, 53(4), pp.549-561.
- [99] Hao, N., Behar, M., Parnell, S.C., Torres, M.P., Borchers, C.H., Elston, T.C., and Dohlman, H.G. (2007). A systems-biology analysis of feedback inhibition in the Sho1 osmotic-stress-response pathway. *Current biology : CB* 17, 659-667.

[100] Macia, J., Regot, S., Peeters, T., Conde, N., Sole, R., and Posas, F. (2009). Dynamic signaling in the Hog1 MAPK pathway relies on high basal signal transduction. *Science signaling* 2, ra13.

