



Universitat de Lleida

Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques

Mecanismos moleculares de respuesta al estrés oxidativo mediados por la ruta de integridad celular (vía PKC1-MAP quinasa) de *Saccharomyces cerevisiae*

**Memoria de Tesis Doctoral presentada por
Felipe Vilella Mitjana
para optar al grado de doctor.
Este trabajo ha sido realizado bajo la dirección
de la doctora Maria Angeles de la Torre Ruiz.**

Lérida, Octubre de 2005

MARIA ANGELES DE LA TORRE RUIZ, profesora agregada de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Lleida

CERTIFICA: Que, Don. **FELIPE VILELLA MITJANA** ha realizado en el Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques de la Facultad de Medicina de la Universitat de Lleida, bajo la dirección de la Dra. **MARIA ANGELES DE LA TORRE RUIZ**, el trabajo que presenta para optar al Grado de Doctor con el título: “**Mecanismos moleculares de respuesta al estrés oxidativo mediados por la ruta de integridad celular (vía PKC1-MAP quinasa) de *Saccharomyces cerevisiae***”.

Para que así conste firmo la presente certificación en Lleida, a 28 de octubre de 2005.

Fdo: Dra. Maria Angeles de la Torre Ruiz

A mis padres
A mis hermanos Oriol y Ólguer
A mis abuelos
A Sonia

A quien de mi te alejó
yo le quisiera pedir.
Que me deje sólo un día más
para poder hablar
de lo que eras para mí.
Que me deje disfrutar
de tu voz, y contemplar
tus ojos una vez más.

**Esta Tesis Doctoral está dedicada a la
memoria de mi hermano Oriol
sé que desde donde esté
está muy orgulloso**

Bueno, creo que ha llegado uno de los momentos más difíciles de esta tesis, escribir los agradecimientos, la verdad es que tengo tantas cosas que agradecer a tanta gente que espero no olvidarme a nadie. Como siempre voy un poco a mi "rollo", no voy a ser menos en esta parte, me voy a permitir el lujo de cambiar un poco el orden que generalmente se usa en estos casos. Espero que nadie se ofenda porque lo hago con el corazón.

La verdad es que esta tesis doctoral hubiera sido imposible sin mis padres Felip y Mari Carmen. Ahora cuando recuerdo los millones de veces que hemos reído y llorado juntos con todos mis éxitos y fracasos, y con lo que nos ha deparado la vida, se me estremece el corazón, siempre habéis estado a mi lado, nunca me habéis fallado, me habéis acompañado a todos lados para que no me sintiera solo. Mama, te sabes esta tesis doctoral y mis licenciaturas como si las hubieras hecho tú, y te has pasado horas y horas en "directo" y al teléfono escuchando mis problemas, has sido mi apoyo sentimental más grande. Papa, has sido mi apoyo en la resolución de problemas, me has transmitido siempre mucha calma, a ver las cosas desde un sentido más racional y a no actuar cuando estaba enfadado, para poder tomar buenas decisiones. No cambies nunca, sois todo lo que un hijo necesita. He aprendido a vuestro lado una de las mejores lecciones de la vida, primero hay que ser buena persona y después un buen profesional. Solo puedo deciros una cosa GRACIAS!

Evidentemente mis hermanos han sido uno de mis mejores apoyos. Mi hermano Oriol por desgracia no se encuentra entre nosotros, pero se que siempre está a mi lado, yo lo siento muy cerca de mi, y siempre vela por mi. Mi hermano Oleguer es el apoyo que me hace continuar luchando en esta vida, el poder verte crecer es un regalo para mí. Además, has trabajado mucho para esta tesis doctoral, las horas que te has pasado en el ordenador para que todos los dibujos que hay en este trabajo y en mis presentaciones fueran perfectos, no se pueden pagar con dinero, sólo se puede pagar con el amor que siento por ti.

Al resto de mi familia. A mi abuela "Tate" que siempre la tengo a mi lado apoyándome y dándome buenos consejos, nunca fallas, siempre estas para cualquier cosa que necesite, no te olvides nunca de rezar por mí a las almas más pobres del purgatorio, me va muy bien. A mis abuelos "Pi", Felip y "Pina", por desgracia tampoco están entre nosotros, pero también los siento en mi corazón y sé que están orgullosos de todos mis logros como profesional y como persona. A mis tíos y a mis primas, que también han contribuido en este arduo camino de la vida.

Y Sonia, mi fiel compañera, la que aguanta todos mis arranques de mala leche, todas mis "depres" momentáneas, pero que también comparte conmigo todas mis alegrías, sin ti todo esto también hubiera sido muy difícil, además tienes una paciencia increíble, es difícil que una novia se acostumbre a "no, no puedo ir porque este fin de semana voy ha hacer el experimento de mi vida". No cambies nunca cariño, te quiero mucho.

Ahora sí, llega la hora de hablar de todos mis amigos y compañeros. Vosotros sabéis que habéis sido muy importantes todos estos años, y espero dejarlo claro en las siguientes líneas, son para vosotros.

Primero a mi directora de tesis Maria Ángeles, a tu lado he aprendido mucho, no solo biología molecular, todo este proyecto lo hemos realizado entre los dos y estoy muy orgulloso de ello, agradecerte todas las horas que me has dedicado durante estos cuatro años, y sobre todo el haber corregido hasta el mínimo detalle de esta tesis para que quedara perfecta. A

Nuria, agradecerle que como soy el "mayor" me dejas hacer lo que quiero en el laboratorio, y nunca te quejas, ahora te toca a ti ser la "mayor".

Al grupo de biología molecular de levaduras: A Enric por haberme acogido en tu laboratorio, incluso antes de que tuviera terminada la carrera, has confiado mucho en mí, espero no haberte defraudado. Que voy a decir de mi amiga Lidia, te quiero como si fueras mi hermana mayor, siempre dicen que técnicamente eres perfecta (y lo eres), pero más perfecta eres como persona, no podría haber encontrado mejor "aliada" en estos cuatro años. A mi amigo Jordi, he aprendido mucho a tu lado, siempre me has dado mucha confianza y para mí ha sido muy importante tu respaldo en mi trabajo, y los ánimos que me has dado. A Micaela por aguantar mis discos de Heavy Metal desde las nueve de la mañana, y casi sin quejarse. A Lina, porque generalmente es quien aguanta mi mala leche cuando creo que algo no está bien hecho, y por demostrarme que también me equivoco. Con Ana he estado menos tiempo, pero conectamos desde el primer día, eres una gran persona y una gran profesional y me has enseñado lo que es una "garcerada". A Gema que desde que empecé la tesis aguantó sin rechistar todas las preguntas, algunas muy estúpidas, que le hacía sobre ensayos moleculares. A Maite que siempre que viene nos trae cosas de Alemania. Y a Alicia, se que acabas de empezar, te deseo toda la suerte del mundo. No me puedo olvidar de Nuno, con quien tengo el placer de tener una fuerte amistad, eres grande, y un gran profesional. Y de Ana que siempre me preparaba los medios de cultivo mientras trabajó en el departamento.

Durante estos cuatro años he tenido a dos personas trabajando conmigo. Josep Lluís, que aguantaba mis explicaciones de laboratorio y no tan de trabajo sin quejarse. A mi querido Marcellí, una persona excelente, serás un gran profesional, no me cabe la menor duda, y te deseo toda la suerte del mundo con la tesis que vas a empezar, ya sabes dónde estoy para cualquier cosa.

Al grupo de ciclo celular de levaduras: A Martí y a Carme, que más que compañeros de otro laboratorio habéis sido mis amigos, siempre he tenido refugio en vuestro "casa", he aprendido mucho a vuestro lado. A Eloi que siempre le estoy asaltando con dudas sobre protocolos, y siempre las sabes resolver, y por todas las veces que no hemos hablado de ciencia (las mejores). A mi querido amigo Emili, porque hemos hablado de nuestros problemas millones de veces, y por la gran frase "vale más caer en gracia, que ser gracioso", cuanta razón tienes. A mi querida Sonia, has sido una de mis grandes confesoras y amiga, te echaré de menos en Londres. Mi amigo Serafi, que puedo decir de él, la persona más grande de esta facultad, siempre dispuesto a buscar el lado positivo de las cosas, ha animarme, y ha salir de "marcha". No puedo olvidarme de Neus, que hemos compartida muchas horas juntos, o María, o Isis, que siempre aguantan nuestras "machistadas". Y a todas las nuevas incorporaciones del grupo.

En el grupo de Genética, esta otro de mis amigos, Manuel, que me ha metido el gusanillo de la PSP, y que siempre me recibe con los brazos abiertos en su casa, junto con su novia Silvia y Homer. Por esa cervecilla en la nevera, y lo bien que cocináis. Ha sido un placer conoceros, espero que compartamos nuestra amistad muchos años más. No voy a olvidarme de ti Madri, que lo hemos pasado muy bien juntos y hemos compartido mucha música. Y por supuesto a Juan y Gema.

Al grupo de estadística, a Albert, por enseñarme los primeros pasos de la modelización matemática. A mi amigo Rui, con el que comparto mi primer "paper", nos pasamos muchas horas verdad, pero mereció la pena, siempre me has dado ánimos. A Jaume, con quien he

debatido sobre cualquier cosa, sobre todo, temas del departamento. A Ester que siempre esta dispuesta a escucharme y a intentar ayudarme. A Chema fiel compañero de fines de semana. Y a Montse, la nueva incorporación del grupo.

Al grupo de Bioquímica, A Quím y Elisa, que siempre están para cualquier cosa que uno necesite. A Jordi, que le hinché la cabeza con los grupos sulfidrilo hasta que me salió la técnica. A mi amigo Pedro, porque contigo he compartido muchas confidencias, siempre estas cuando te necesito, da igual la hora, y por las cervezas que nos vamos a tomar a partir de enero juntos. A mi amiga Gemma por que siempre estas cuando te necesito, has sido un gran apoyo. Claro no voy a olvidarme de Vanesa y los demás miembros del grupo. Muchas gracias por todo.

El grupo de Fisiología, que siempre estoy incordiando a Manel y a Reinald con cuestiones médicas, y siempre están para lo que uno necesita. A Maria Josep, por todas las charlas que hemos tenido, y por dejarme fumar algún que otro cigarrillo. A David que siempre tiene la sonrisa en la boca y te anima el día, sigue siendo así de positivo. Y a Vicki y los demás miembros que han pasado por este grupo.

Ya ha llegado el turno de la segunda planta. El Josep y la Dolors, que siempre me habéis tendido la mano cuando lo he necesitado. A Antonio Sainz, con quien siempre he tenido una confianza infinita, he aprendido mucho a tú lado, sobre ciencia y sobre la vida. A Carme, Nuria, Sara y Marta que siempre tenéis una sonrisa en la boca para animarme el día, cuantas horas juntos verdad, hablando de vosotras ya sabes que... muchas gracias, os quiero mucho, y no cambies nunca. Rafa tu sigue tocando la guitarra, será tu fiel amiga, y sigue trabajando duro que las cosas te iran muy bien. Xavi y Ana que siempre tenéis una palabra amable cuando tengo mala cara. A Joan por las largas charlas, en el microscopio de fluorescencia o en el laboratorio. Sin olvidarme de Celia, Jordi, Olga, Jacint, Judit, Inma que también habéis aportado vuestro granito de arena en mi vida.

No voy a olvidarme de los del Arnau (extercera planta), a Joan que siempre tienes un buen consejo cuando lo necesito, a los precarios y técnicos, Miquel, Mari, Maritza, Yolanda, Carme, Carlos, Petar, Sonia, Isu, Ro que hemos compartido horas intentando cambiar el mundo y sobre todo el departamento. A Dani y su mujer que siempre están para resolverme dudas. Y todos los demás miembros del grupo. A Carme Espinet que ha aguantado miles de preguntas sobre que día es la comisión de doctorado.

No voy a olvidarme de los secretarios del departamento, David y Yolanda, no solo tenéis la capacidad de solucionar cualquier problema, sabéis escuchar muy bien, y dar ánimos. Os lo agradezco mucho. Que voy a decir de Emeterio, que eres un "figura", sin ti estos años hubieran sido más aburridos, gracias por tu amistad. Y Araceli que siempre tiene una palabra amable para mí, o Charo y Mari, con quien he compartido largas horas de conversación cuando ya no había nadie en el departamento. Y claro no voy a olvidarme de Josep Maria, Trillo, J.R. y de Juan de manteniment que siempre estáis cuando hay un problema. Y los informáticos, Josep y Toni, que aguantáis que siempre vaya de listillo con los ordenadores.

Saliendo ya del departamento y pasando por terrenos muy personales, de amistad y cariño.

Nacho Moriyón y Begoña sois mis segundos padres, no tengo palabras para expresar lo que siento por vosotros, solo puedo decir que muchas gracias, he aprendido y quiero seguir

aprendiendo mucho de vosotros. Me habéis enseñado todo lo que pone en los libros de microbiología, pero lo más importante, me habéis transmitido todo lo que no se explica en ellos, y no solo en el terreno profesional, sino en el terreno personal.

Y ya que me he ido a Pamplona voy a seguir por este camino. La Dra. Sesma, la Dra. Zabalza y el Dr. Manzini que recogíais mis despojos en momentos de desesperación durante la carrera y me convertíais en un hombre nuevo. Esto tampoco se puede agradecer con palabras.

Mi amigo Jose Vicente, que siempre me ha tratado como a un hermano, te he tenido disponible a todas horas, y me has dado grandes consejos. Solo puedo decirte que te hecho de menos aquí en Lleida. A mis amigos de Cirkus, que con Jon hemos pasado horas y horas escuchando y hablando de música, también con Rudy y con Olga. Mi amigo Victor, que lo hemos pasado muy bien juntos. A mis amigos de la carrera Kike, Borja, Oscar, Wayne, Maite, Gema y Cris. A la familia Zubicoa y la Familia Lacalle, que me enseñaron que un alquiler de un piso o una habitación se pueden convertir en una gran amistad. Y especialmente a los mejores amigos que una persona puede conocer durante una carrera, Javi y Manuel, os quiero mucho a los dos, la verdad es que con amigos como vosotros se necesita poco más en esta vida. Y a toda la gente de Pamplona y Donosti que no cito porque necesitaría otra tesis.

Regresando a Lleida, no puedo olvidarme de los padres de Sonia, Paquita y Rafael, de sus dos hermanos, Maria Teresa y Rafael y sus dos cuñados, Victor y Marta, que siempre lo pasamos muy bien. A mis amigos de cena, Cardus, Moi, Judit y Toni que junto con mis amigos del laboratorio, convertíamos una cena en un sentimiento. A mis amigos Capi y Marta, que me han enseñado que ir a aprender a tocar la guitarra, también se convierte en una gran amistad. A Fernando y a Roser, que siempre me tienen el café a punto y siempre se puede charlar con ellos. A Santi el genio de la electrónica por las largas horas compartidas charlando. Y no voy a olvidar el congreso de la ISSY, que me lo pasé muy bien con el grupo de Valencia, sobre todo con Luis, Sam, Vero, Ana, Yolanda, Leslie y especialmente a Inma, que me ha apoyado mucho durante este último mes. A Burkhard Hassel que es el autor del dibujo de la contraportada de esta tesis. Y a Ana que se ha ofrecido para hacer un aperitivo polaco el día de la presentación. Y especialmente a Luis Aragón, con quien me voy a realizar mi Post-Doc y le tengo que agradecer la confianza que ha depositado en mí en estos últimos meses.

En fin, creo que esto ha sido un poco largo, pero es como tenía que ser, ha sido un placer conocerlos, estaréis siempre en mi corazón.

Resumen

La vía de integridad celular o vía Pkc1-MAP quinasa de *Saccharomyces cerevisiae* posee un papel central en los mecanismos de respuesta celular frente a diferentes estreses ambientales, como son: el estrés térmico, el estrés hipoosmótico o cualquier estrés que afecte a la pared celular. En esta tesis doctoral se demuestra que esta vía de transducción de señal también está implicada en la supervivencia y adaptación frente a los efectos del estrés oxidativo.

Hemos observado que las proteínas Pkc1 y Rom2 son esenciales para la supervivencia celular frente al estrés oxidativo mediado por dos agentes (peróxido de hidrógeno y diamida). Además, el citoesqueleto de actina es una de las dianas de acción del peróxido de hidrógeno y de la diamida, ambos agentes median la despolarización del citoesqueleto de actina con el consecuente efecto en morfogénesis y viabilidad. Este fenómeno ocurre de manera independiente de las proteínas de la vía de integridad celular. Sin embargo, para que el citoesqueleto de actina repolarice en respuesta a agentes oxidantes se requieren las proteínas Mtl1, Rom2 y Pkc1, todas ellas elementos constituyentes de la vía de integridad celular.

La diamida induce la formación de puentes disulfuro en las proteínas de la superficie celular, lo que provoca cambios estructurales en la misma, que en última instancia, causan la activación de la vía de integridad celular. Nuestros estudios han permitido asignar una función al receptor de pared celular Mtl1, como sensor de estrés oxidativo en superficie, y parte integrante de la vía Pkc1-MAP quinasa.

El peróxido de hidrógeno afecta esencialmente a una función celular relacionada con los últimos estadios de secreción y con la morfogénesis celular. Además observamos dos funciones esenciales de la proteína Pkc1 en respuesta al tratamiento con peróxido de hidrógeno: i) Pkc1 regula la biogénesis de ribosomas en respuesta a los problemas en secreción provocado por el agente oxidante. Además, la inhibición de la transcripción de genes ribosomales se lleva a cabo dependiendo de un citoesqueleto en polimerización activa, ii) Pkc1 induce la restauración de los cables de actina y con ello de la morfogénesis y polaridad celular a través de la activación de la profilina Pfy1.

Summary

The cell integrity pathway or Pkc1-MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* plays a central role in the cellular responses against different environmental stresses, such as: heat shock, hipoosmotic shock, starvation stresses, all of them affect the cell wall. This study shows that this transductional pathway is also involved in the survival and the adaptation of the cell against the affects of oxidative stress.

We have observed that the proteins Pkc1 and Rom2 are essential for cell survival against oxidative stress caused by two agents: hydrogen peroxide and diamide. In addition, the actin cytoskeleton is one of the targets of both hydrogen peroxide and diamide, these agents cause depolarization of the actin cytoskeleton with a detrimental effect in cell morphogenesis and viability. This occurs independently on the cell integrity pathway proteins. However, for the actin cytoskeleton to repolarize in response to oxidant agents, the cells need the proteins Mtl1, Rom2 and Pkc1, all of them constitute the cell integrity pathway.

Diamide causes the formation of disulphide bridges in the cell surface proteins, which provokes structural changes in the cell surface, and which finally induces the activation of the cell integrity pathway. In our investigation we have been able to assign a function to the cell wall receptor Mtl1, as a sensor of surface oxidative stress and an integral part of the Pkc1-MAP kinase pathway.

Hydrogen peroxide affects primarily a cellular function related to the last stages of vesicular secretion. We also observe two essential functions of the protein Pkc1 in response to the treatment with hydrogen peroxide: i) Pkc1 regulates ribosomal biogenesis in response to problems in secretion, caused by the oxidant agent. The occurrence of the inhibition of ribosomal genes transcription is dependent on the active polymerization of the actin cytoskeleton, ii) Pkc1 induces the restoration of actin cables then promoting the restauration of cellular polarity and morphogenetic mechanisms through the activation of Pfy1 profilin.

Resum

La via d'integritat cel·lular o via Pkc1-MAP quinasa de *Saccharomyces cerevisiae* té un paper central en els mecanismes de resposta cel·lular enfront de diferents estressos ambientals, com són: l'estrès tèrmic, l'estrès hipoosmòtic o qualsevol estrès que afecti a la paret cel·lular. En aquest treball de tesi doctoral es demostra que aquesta via de transducció de senyal també està implicada en la supervivència i adaptació enfront els efectes de l'estrès oxidatiu.

Hem observat que les proteïnes Pkc1 i Rom2 són essencials per a la supervivència cel·lular enfront de l'estrès oxidatiu generat per dos agents (peròxid d'hidrogen i diamida). A més, el citoesquelet d'actina és una de les dianes d'acció del peròxid d'hidrogen i de la diamida; aquests dos agents provoquen una despolarització del citoesquelet d'actina amb el conseqüent efecte en morfogènesi i viabilitat. Aquest fenomen succeeix de forma independent de les proteïnes de la via d'integritat cel·lular. Per altra banda, perquè el citoesquelet d'actina es repolaritzi com a resposta d'agents oxidants, són necessàries les proteïnes Mtl1, Rom2 i Pkc1, totes elles són elements que constitueixen la via d'integritat cel·lular.

La diamida indueix la formació de ponts disulfur a les proteïnes de la superfície cel·lular. Aquest fet provoca canvis estructurals en la cèl·lula que, en darrer terme, causen l'activació de la via d'integritat cel·lular. Els nostres estudis han permès assignar una funció al receptor de la paret cel·lular Mtl1, com un sensor d'estrès oxidatiu en superfície i part integrant de la via Pkc1-MAP quinasa.

El peròxid d'hidrogen afecta essencialment una funció cel·lular relacionada amb els últims estadis de secreció i la morfogènesi cel·lular. A més, observem dos funcions essencials de la proteïna Pkc1 com a resposta al tractament amb peròxid d'hidrogen: i) Pkc1 regula la biogènesi de ribosomes com a resposta als problemes en secreció que provoca l'agent oxidant. Així mateix, la inhibició de la transcripció de gens ribosomals es du a terme depenent d'un citoesquelet en polimerització activa, ii) Pkc1 indueix la restauració dels cables d'actina i també de la morfogènesi i polaritat cel·lular a través de l'activació de la profilina Pfy1.

INTRODUCCIÓN	1
1. La levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> : Un modelo biológico de estudio desde hace más de cien años.	1
2. La pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	2
3. La vía de integridad celular.	4
4. Componentes de la vía de integridad celular en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	5
4.1 Receptores de la vía.	5
4.2 La proteína G Rho1.	9
4.3 Otras proteínas G: Rho2, Rho3, Rho4 y Rho5.	12
4.4 Proteínas GEF.	12
4.5 Proteínas GAP.	14
4.6 Proteína Pkc1.	16
4.7 Módulo MAP quinasa.	19
5. Proteínas reguladoras de la vía Pkc1-MAP quinasa.	22
5.1 Las quinasas Pkh y Ypk.	22
5.2 Las proteínas Fosfatasas.	23
5.3 Dianas de acción de la MAP quinasa Slt2.	24
6. El citoesqueleto de actina.	26
6.1 Introducción.	26
6.2 Ensamblaje del citoesqueleto polarizado.	27
6.3 Funciones del citoesqueleto de actina.	30
6.4 Organización del citoesqueleto de actina durante el ciclo celular.	30
6.5 Secreción polarizada.	32
7. Funciones de la vía de integridad celular.	34
7.1 Regulación del ciclo celular.	34
7.2 Respuesta a estrés térmico.	35
7.3 Respuesta a choque hipoosmótico.	36
7.4 Respuesta a feromonas.	37
7.5 Respuesta al estrés por agentes que dañan la pared celular.	37
7.6 Respuesta al estrés sobre el citoesqueleto de actina.	38
7.7 Respuesta al estrés oxidativo.	39
7.8 Relación de la vía de integridad celular con la biogénesis de genes ribosomales.	39
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	41

MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Microorganismos utilizados y disrupciones genéticas.	43
Tabla 1	43
Tabla 2	44
2. Plásmidos utilizados.	45
3. Condiciones de cultivo y crecimiento de microorganismos.	45
4. Obtención de extractos de levadura para inmunodetección (Western blotting) y condiciones de uso para los anticuerpos utilizados.	45
5. Análisis de Northern blot.	46
Tabla 3	47
6. Determinación de grupos sulfidrilo libres en células intactas mediante el uso de DTNB.	47
7. Digestión con la enzima zimoliasa.	48
8. Tinción de actina.	48
9. Microscopía electrónica.	49
10. Ensayo de internalización del colorante Lucifer Yellow.	49
11. Ensayo de internalización del colorante FM4-64.	49
12. Tinción de DAPI.	50
RESULTADOS	51
1. Estudio de la relación de la vía de integridad celular en la respuesta adaptativa frente al estrés oxidativo.	51
1.1 El estrés oxidativo inducido por dos agentes oxidantes diferentes: diamida y peróxido de hidrógeno, induce la activación de la vía de integridad celular.	51
1.2 Mtl1, Rom2 y Pkc1 y algunos elementos de la parte superior de la vía de integridad celular, son necesarios para transmitir la señal a Slt2 en condiciones de estrés oxidativo.	55
1.3 Rom2 y Pkc1 son proteínas necesarias para la supervivencia tras un estrés oxidativo.	58
1.4 El módulo MAP quinasa aguas abajo de Pkc1 no es necesario para la viabilidad celular frente a un estrés oxidativo.	60

1.5 La diamida causa su efecto oxidante sobre las células de <i>S. cerevisiae</i> , mayoritariamente a nivel de la pared celular.	63
1.6 Un bloqueo en secreción inhibe la activación de Slt2 en un tratamiento con diamida.	65
1.7 La diamida induce la localización de Pkc1 en la periferia celular, la activación de la vía de integridad celular y el engrosamiento de la pared celular.	68
1.8 La diamida y el peróxido de hidrógeno activan la vía de integridad celular y provocan una despolarización transitoria del citoesqueleto.	69
2. Estudio del efecto del peróxido de hidrógeno sobre la célula y de la implicación de la vía de integridad celular.	74
2.1 El peróxido de hidrógeno afecta a la función celular que tiene relación con los últimos estadios de secreción.	74
2.2 La sobreexpresión de Pkc1 induce una rápida restauración de los cables de actina, de manera específica al efecto provocado por el peróxido de hidrógeno sobre la organización del citoesqueleto.	84
2.3 Efectos del peróxido de hidrógeno sobre la morfogénesis y estructura celular.	86
2.4 La expresión de Pfy1 incrementa la viabilidad celular frente a peróxido de hidrógeno y favorece la restauración de la polaridad del citoesqueleto.	88
2.5 La repolarización del citoesqueleto de actina mediada por Pkc1 tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno es totalmente dependiente de la actividad Pfy1.	89
DISCUSIÓN GENERAL	93
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	106
APÉNDICE 1	128
APÉNDICE 2	139
APÉNDICE 3	141

INTRODUCCIÓN

1. LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*: UN MODELO BIOLÓGICO DE ESTUDIO DESDE HACE MÁS DE CIEN AÑOS.

Levadura es un nombre genérico que agrupa a una gran variedad de hongos, incluyendo tanto especies patógenas para plantas y animales, como especies no solamente inocuas sino de gran utilidad. Algunas especies de levaduras del género *Saccharomyces* son capaces de llevar a cabo el proceso de fermentación, propiedad que se ha explotado desde hace muchos años en la producción de pan y de bebidas alcohólicas. Desde el punto de vista científico, el estudio de las levaduras como modelo biológico ha contribuido de manera muy importante a elucidar los procesos básicos de la fisiología celular.

Dentro del género *Saccharomyces*, la especie *cerevisiae* constituye la levadura y el microorganismo eucariota más estudiado. En 1897, los hermanos Hans y Edward Buchner obtuvieron extractos libres de células moliendo levadura para pan con granos de arena, a los cuales adicionaron grandes cantidades de azúcar de caña para evitar su posible contaminación. Para su sorpresa, encontraron que el azúcar se fermentaba rápidamente: por primera vez se había descubierto un modelo para el estudio de la fermentación alcohólica. Este descubrimiento atrajo la atención de los bioquímicos, que decidieron analizar cada uno de los pasos que conducían a la producción de etanol y dióxido de carbono a partir de la glucosa. Este trabajo implicó el esfuerzo de muchos científicos y dio como resultado el descubrimiento y descripción del metabolismo del carbono.



Figura 1. Imagen de microscopía de barrido de la levadura de gemación *Saccharomyces cerevisiae*.

Así, desde fines del siglo XIX se reconocieron algunas de las ventajas que ofrece el uso de la levadura del pan, *Saccharomyces cerevisiae*, como modelo biológico en la investigación: por un lado, la facilidad con la que se obtienen grandes cantidades de este microorganismo; y por otro, el hecho de que *S. cerevisiae* posee un ciclo de vida que al incluir una fase sexual, permite abordar estudios con las herramientas que provee la genética. Otra característica es el tamaño de su genoma, que por ser pequeño facilitó su secuenciación; y muchas otras virtudes que se han ido haciendo evidentes conforme se han desarrollado nuevos enfoques y métodos de estudio.

2. LA PARED CELULAR DE *Saccharomyces cerevisiae*:

La pared celular es una envuelta externa a la membrana plasmática, que se encuentra presente tanto en organismos procariotas (bacterias) como en eucariotas (hongos y plantas). En levaduras se considera una estructura activa en donde tienen lugar importantes procesos biológicos, entre ellos: la adhesión célula a célula, o el crecimiento pseudohifal (Ruiz-Herrera *et al*, 1999; Cabib *et al*, 2001; Lipke y Ovalle, 1998; Smits *et al*, 1999).

La levadura *S. cerevisiae* es un organismo eucariota unicelular. Por este motivo la pared celular conforma el esqueleto externo de la célula y determina su morfología (Klis *et al*, 1994). Además, proporciona a la célula una protección física y osmótica frente al medio exterior y le confiere resistencia a diversos factores extrínsecos, tales como sustancias tóxicas o enzimas degradadoras procedentes de otros organismos (Smits *et al*, 1999).

La pared celular de *S. cerevisiae* (Figura 2) representa del 15 al 30 % del peso seco de la célula, lo que supone entre un 25 y un 50 % del volumen celular (Lipke *et al*, 1998). Básicamente está constituida por un conjunto de polisacáridos integrados por tres azúcares fundamentales: glucosa, manosa y N- acetil glucosamina.

El β -1,3 glucano es el componente estructural mayoritario en la pared. Presenta una estructura ramificada que confiere propiedades elásticas a la pared. En realidad

dichas ramificaciones son residuos de glucosa unidos por enlaces β -1,6 glucano. El β -1,3 glucano es sintetizado en la membrana plasmática por la glucano sintasa codificada por los genes *FKS1* y *FKS2*. La proteína Fks1 está implicada en la actividad de células vegetativas en crecimiento activo (Parent *et al*, 1993). Fks2 está implicada en el proceso de esporulación (Mazur *et al*, 1995). Rho1 interviene en la regulación de estas enzimas (ver apartado 4.2) funcionando como activador de la β -1,3 glucano sintasa (Bourne *et al*, 1991).

El β -1,6 glucano es un polisacárido presente en menor proporción que el anterior, pero es muy importante porque se encarga de entrelazar los componentes de la pared celular, uniendo proteínas al β -1,3 glucano a través de residuos glicosilfosfatidilinositol (GPI-CWPs). La molécula de β -1,6 glucano es un polímero altamente ramificado y además es el aceptor de la quitina (Collar *et al*, 1997).

Los polisacáridos de manosa unidos a proteínas forman las manoproteínas, que se localizan en las capas externas de la pared y desempeñan una función de filtro de moléculas de elevado peso molecular. Las manoproteínas llegan a tener un contenido glucídico de hasta el 90%, pudiendo tener unidos residuos de asparagina (mediante enlaces de tipo N-glicosídico) cadenas largas de carbohidratos constituidas por residuos de manosa; también pueden unir cadenas más cortas a residuos de serina y/o treonina (mediante enlaces de tipo O-glicosídico). Además, los puentes fosfodiéster presentes en las cadenas N- y O-glicosídicas le confieren a la superficie celular una carga eléctrica neta negativa (Orlean *et al*, 1997).

Finalmente, el componente minoritario de la pared (entre el 1 y el 3%) es el polisacárido lineal de quitina que se concentra en la región del septo. La quitina es un polímero, compuesto de residuos de N-acetilglucosamina unidos por enlaces α -1,4, sintetizado por la quitina sintasa. Las cadenas de quitina se disponen de forma antiparalela formando una estructura fibrilar insoluble que confiere a la pared celular una gran resistencia (Ruiz-Herrera *et al*, 1999). La quitina se encuentra concentrada principalmente en las regiones próxima al punto de citocinesis, aunque también la podemos encontrar de una forma minoritaria dispersa por toda la pared celular (Cabib *et al*, 2001).

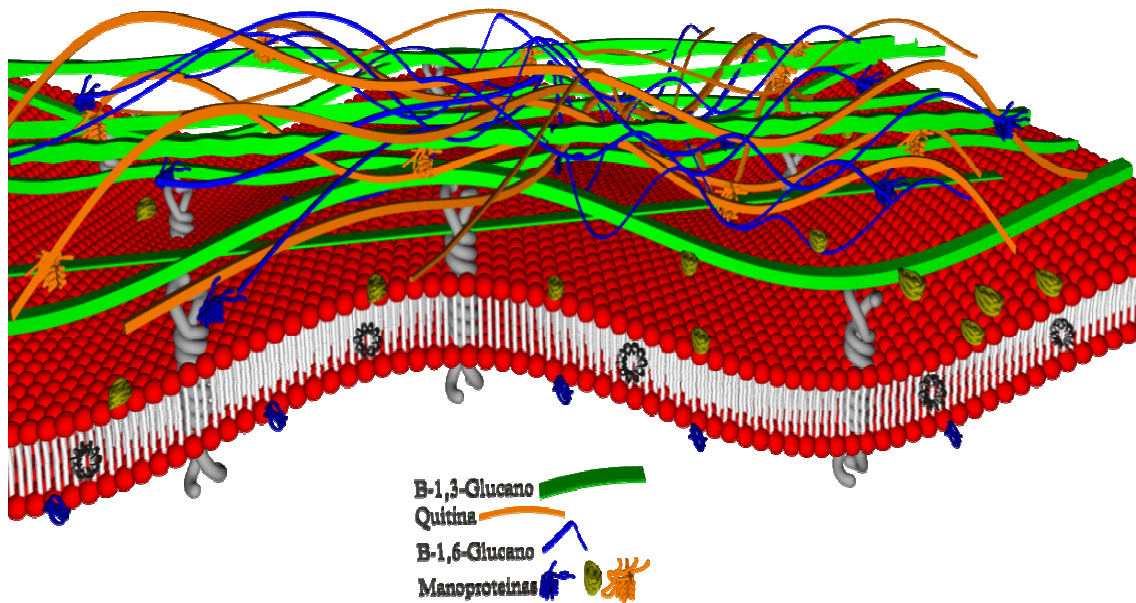


Figura 2. Esquema de la pared celular en *Saccharomyces cerevisiae*.

3. LA VÍA DE INTEGRIDAD CELULAR:

La vía Pkc1-MAP quinasa juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*. Mutaciones en componentes de la vía de integridad celular producen diversos efectos como la lisis celular, sensibilidad a la cafeína, defectos en la progresión del ciclo celular y problemas en la organización del citoesqueleto (Ketela *et al*, 1999; Igual, 1996).

La vía de integridad celular (Figura 3) es activada en respuesta a una gran variedad de estímulos externos que provocan un estrés sobre la pared celular, regulando la biogénesis de la misma en periodos de crecimiento polarizado de las células (Verna *et al*, 1997; véase la revisión de Levin, 2005).

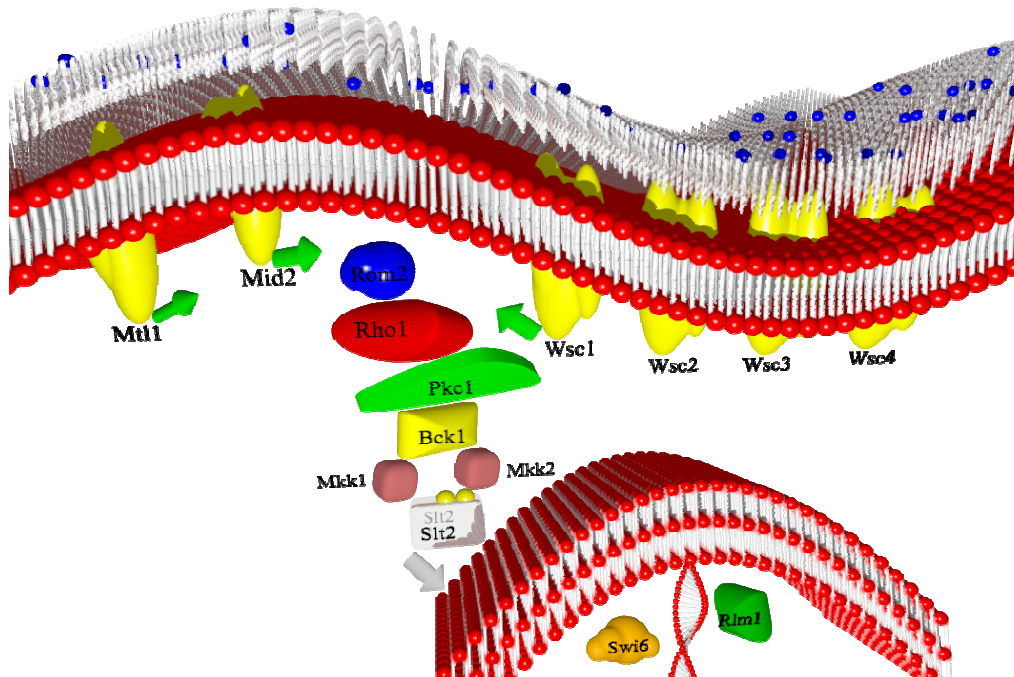


Figura 3. Esquema de la vía de integridad celular de *Saccharomyces cerevisiae*. Los receptores superficie Mtl1, Mid2 y la familia Wsc, detectan cambios a nivel de la envoltura celular y lo transmiten a través de la proteína G Rho1, que es activada por la proteína GEF Rom2. A su vez, Rho1 activa la proteína quinasa Pkc1, la cual transmite dicha señal a un módulo MAP quinasa constituido por Bck1, Mkk1, Mkk2 y Slit2, una vez activado Slit2 éste induce la respuesta transcripcional mediada por Rlm1 y por otro lado la fosforilación de Swi6.

4. COMPONENTES DE LA VÍA DE INTEGRIDAD CELULAR (Pkc1-MAP QUINASA) EN *Saccharomyces cerevisiae*:

4.1 Receptores de la vía:

Los receptores de la vía de integridad celular son proteínas transmembrana. Presentan un dominio hidrofóbico en su extremo N-terminal (que debido a su localización en la membrana plasmática probablemente se trate de un péptido señal), seguido de un dominio cisteína, una zona rica en serinas y treoninas, un dominio transmembrana y una zona C-terminal citoplasmática que contiene un alto número de residuos ácidos. Los receptores se diferencian entre sí porque la parte C-terminal es de longitud variable (Verna *et al*, 1997). El papel fundamental de estas proteínas es el de

detectar diferentes alteraciones en la cubierta externa de las células y transmitir la señal a proteínas integrantes de la vía de integridad celular (ver apartado 4.2).

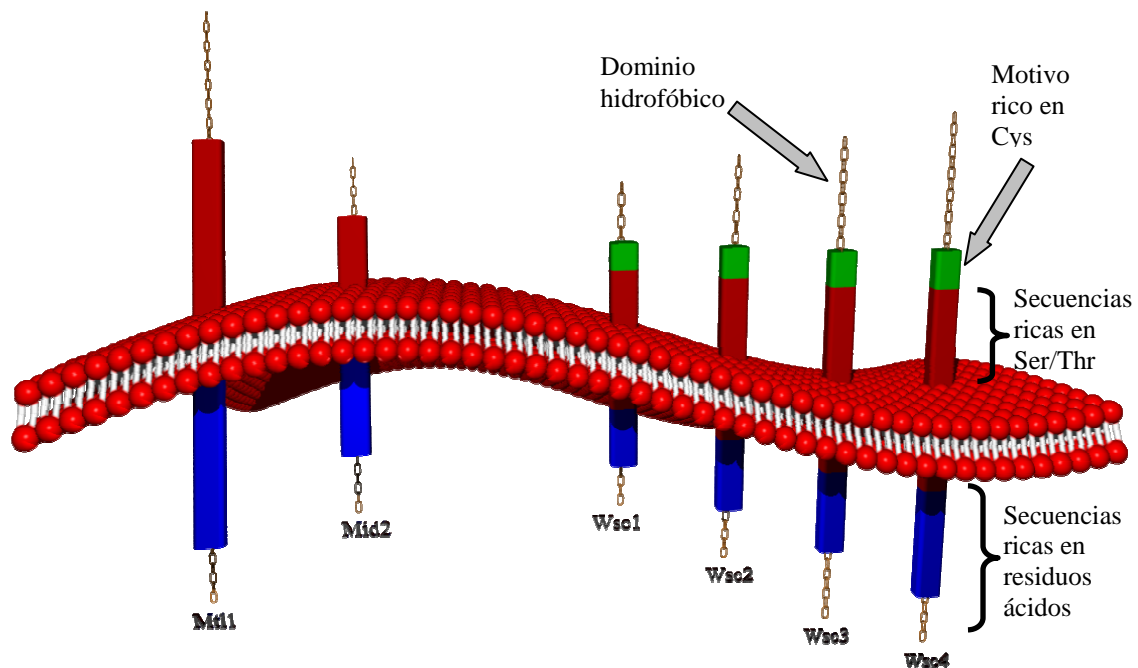


Figura 3. Esquema de la estructura de los receptores de la membrana. Estos receptores presentan una secuencia rica en serinas y treoninas en su extremo N-terminal, un dominio transmembrana y en su cola citoplasmática una zona rica en residuos ácidos. La familia de receptores Wsc presentan así mismo un motivo cisteína en su extremo N-terminal (Esquema adaptado de Verna *et al*, 1997).

La familia de receptores Wsc está integrada por cuatro proteínas: Wsc1 (también llamada Slg1 o Hcs77), Wsc2, Wsc3 y Wsc4. Los genes *WSC1*, *WSC2*, *WSC3* y *WSC4* son componentes de la vía de integridad celular, con una función común entre ellos como es la de detectar cambios en la pared celular provocados por diferentes estreses y transmitir el estímulo a elementos de la mencionada vía (Verna *et al*, 1997; Rajavel *et al*, 1999).

La familia de los receptores Wsc presenta entre ellos un 35% de identidad y un 50% de similitud en su secuencia de aminoácidos. Las proteínas Wsc2 y Wsc3 son las que guardan un nivel máximo de homología. El dominio más altamente conservado entre las cuatro proteínas es el dominio rico en cisteínas (Figura 3), que se encuentra justo debajo del dominio hidrofóbico, en el extremo N-terminal, cuya localización parece ser extracelular según predicciones estructurales (Verna *et al*, 1997). Dichos

residuos cisterna, están presentes en proteínas y en factores transcripcionales, desde el punto de vista bioquímico, están implicados en la unión de ligandos, la dimerización y la coordinación con iones de cinc (Saurin *et al*, 1996).

La proteína Wsc1 se localiza en la membrana plasmática, y su ausencia hace a las células termosensibles en medio rico. La delección de *WSC2* y *WSC3* no causa efectos detectables en la célula; sin embargo el mutante triple *wsc1 wsc2 wsc3* es más termosensible que el mutante simple *wsc1*, lo que indica que los tres genes son parcialmente redundantes. La situación de las proteínas de la familia *WSC* como receptores de superficie dentro de la vía de integridad celular se ha determinado a partir de las siguientes observaciones:

1. La sobreexpresión de la proteína Pkc1 (elemento fundamental de la vía de integridad celular (ver apartado 4.6) suprime el defecto lítico del triple mutante *wsc1 wsc2 wsc3* (Verna *et al*, 1997).
2. La sobreexpresión de *WSC1* o *WSC2* no suprime los defectos de un mutante *pkc1* o *bck1* (ver apartados 4.6 y 4.7), (Verna *et al*, 1997).
3. La delección de *wsc1* es suprimida por la sobreexpresión de las proteínas Rom2, Rho1 o Pkc1, todas ellas integrantes de la ruta de integridad celular. (Gray *et al*, 1997; Verna *et al*, 1997).

En el triple mutante *wsc1 wsc2 wsc3* la MAP quinasa Slt2 (también llamada Mpk1 (ver apartado 4.7) presenta un mayor defecto en su activación en respuesta a choque térmico que la observada en el mutante simple *wsc1* (Verna *et al*, 1997). Se ha descrito que en el cuadruple mutante *wsc1 wsc2 wsc3 wsc4* aun se detecta una actividad residual de la quinasa Slt2. Esto es lo que condujo a pensar en la existencia de otros receptores de membrana relacionados con la vía Pkc1-MAP quinasa, como es el caso de Mid2 (Rajavel *et al*, 1999).

El gen *MID2* fue originalmente clonado como un elemento necesario durante el proceso de apareamiento sexual, ya que su delección ocasiona pérdida de viabilidad en las células tratadas con factor alfa (Ono *et al*, 1994). Mid2 es una proteína O-manosilada integral de la membrana plasmática. La región O-manosilada es extracelular y rica en serinas y treoninas, y se cree que la presencia de los residuos de manosa es

necesaria para la actividad de Mid2 (Ketela *et al*, 1999). Además de esta función, también se ha demostrado que Mid2 activa el factor transcripcional Skn7, directamente relacionado con la biogénesis de la pared celular (Ketela *et al*, 1999). Skn7 forma enlace con Rho1 por su dominio HR1, el significado biológico de esta interacción no ha sido caracterizado por el momento. El gen *SKN7* fue aislado como un supresor del mutante *kre9*, que es deficiente en la síntesis de β -1,6 glucano y la sobreexpresión de *SKN7* suprime los defectos de crecimiento del mutante *pkc1* cuando crece en ausencia de un estabilizador osmótico. Todo esto sugiere que la función que puede tener Skn7 con la vía de integridad celular es que actúe paralelamente con la proteína Pkc1 para regular el crecimiento de la superficie celular (véase revisión Levin, 2005)

La similitud de secuencia entre los receptores Wsc1 y Mid2 y su colocalización celular sugieren cierta redundancia en su función (Rajavel *et al*, 1999). Ambos receptores son necesarios para la activación de la vía de integridad celular en respuesta a un estrés térmico (Gray *et al*, 1997; Ketela *et al*, 1999; Rajavel *et al*, 1999; Verna *et al*, 1997). Así, Philip y Levin (2001) demostraron que Mid2 y Wsc1 funcionan en paralelo en la estimulación de la vía de integridad celular, detectando y transmitiendo el daño generado sobre la pared celular (Philip y Levin, 2001).

Wsc1 y Mid2 interaccionan específicamente con el dominio N-terminal de la proteína GEF Rom2 a través de su dominio intracelular C-terminal (ver apartado 4.4). Dicha interacción regula la actividad de la GTPasa Rho1 (Philip y Levin, 2001), elemento esencial de la ruta Pkc1-MAP quinasa. Otra evidencia de la relación de Mid2 con dicha ruta la constituye el hecho de que su sobreexpresión suprime los defectos en el crecimiento del mutante *rho1* (ver apartado 4.2) (Rajavel *et al*, 1999).

La proteína Mid2 posee una proteína homóloga en *S. cerevisiae*, Mtl1, con una identidad del 50% entre ambas en su secuencia de aminoácidos. En el mutante *mtl1* sufre una pérdida de viabilidad equivalente a la que se observa en el mutante *mid2* en presencia de feromonas (Rajavel *et al*, 1999; Ketela *et al*, 1999). Sin embargo, los mutantes *wsc1*, *mid2* y *mtl1* presentan una disminución en la activación de la vía de integridad celular en respuesta a altas temperaturas (Rajavel *et al*, 1999), este dato es el que sugiere que Mtl1 podría compartir funciones con Wsc1 y Mid2 dentro de la vía de integridad celular.

4.2 La proteína G Rho1:

Diversos procesos celulares como son el establecimiento del crecimiento polarizado y la morfogénesis requieren una correcta regulación espacial y temporal para que tengan lugar en estadios específicos durante el crecimiento vegetativo y durante el proceso de conjugación sexual. En el control de dichos procesos intervienen las proteínas Rho, que son proteínas G, intercambiadores de GTP (guanosina trifosfato) y GDP (guanosina difosfato) y pertenecientes a la superfamilia Ras (Cabib *et al*, 1998 175 /id). Son proteínas de pequeño tamaño (entre 21 y 35 kDa) que funcionan como interruptores moleculares, ya que se activan cuando están unidas a GTP y se inactivan cuando se unen a GDP. Existen tres tipos de proteínas reguladoras que modulan la actividad GTPasa de las proteínas Rho (Figura 4):

1. Las GEFs (factores de intercambio)
2. Las GAPs (proteínas activadoras de GTPasas)
3. Las GDIs (inhibidoras de la disociación de nucleótidos de guanina).

Las GTPasas de la familia Rho son isopreniladas en la región C-terminal por GGTasas (geranil-geranil transferasas) específicas o por las FTasas (farnesil transferasas). Las Proteínas Rho son inactivadas citosolicamente por las GDIs, que bloquean el grupo isoprenil del extremo C-terminal previniendo la asociación a la membrana de las Rho. El cambio de nucleótido es estimulado en la membrana por las GEFs, que catalizan la liberación de GDP de la GTPasa y estabilizan transitoriamente la proteína G en su estado libre de nucleótido. La unión de GTP a las proteínas G permite la liberación de la proteína GEF en su forma activa, la cual queda disponible para comenzar una nueva ronda de activación. Las proteínas GAP estimulan la actividad GTPasa de las proteínas Rho, quienes en su forma inactiva unidas a la forma GDP interaccionan con el inhibidor GDI (Gulli y Peter; 2001; Schmidt *et al*, 2002).

la actividad de la vía de integridad celular, pudiendo ser un regulador negativo de la cascada MAP quinasa (Schmitz *et al*, 2002).

En *S. cerevisiae* la actividad de la proteína Rho1 siempre viene mediada por una activación local a cargo de las proteínas GEFs (Rom2, Rom1, Bem4 y Tus1) o por una inactivación debido a la acción de las proteínas GAPs (Sac7, Bem2, Bag7 y Lrg1) y/o proteínas GDIs (Gulli y Peter; 2001; Cabib *et al*, 1998). Rho1 es un gen esencial; además de intervenir en la organización del citoesqueleto de actina y en la formación de la yema también posee un papel fundamental en el proceso de síntesis de la pared celular a través de la activación de las dos subunidades catalíticas de la β -1,3 glucano sintasa, Fks1 y Fks2 (Drgonova *et al*, 1996; Cabib *et al*, 1998). Rho1 interacciona con la formina Bni1 (ver apartado 6.2) y en consecuencia regula el ensamblaje de los microfilamentos de actina próximos a la superficie celular (Fujiwara *et al*, 1998; Alberts *et al*, 1998; Evangelista *et al*, 2003). Se ha descrito también la interacción genética y bioquímica de Rho1 con Skn7. Skn7 es un factor transcripcional que interviene en la activación de diversos genes en respuesta a varios estreses, como es el estrés térmico o el estrés oxidativo (Lee *et al*, 1999; Delley y Hall, 1999). Otra función esencial de Rho1 es la activación de la proteína quinasa Pkc1 (Kamada *et al*, 1995). La sobreexpresión de Rho1 y Pkc1 restauran la reorganización del citoesqueleto en el mutante *tor2* (Helliwell *et al*, 1998). Tor2 es una proteína fosfatidilinositol quinasa (PI3K) (Keith y Schreiber, 1995) se describió como una proteína relacionada con la respuesta al ayuno de nutrientes (Noda y Ohsumi, 1998), posteriormente se la relacionó con la organización del citoesqueleto de actina (Delley y Hall, 1999).

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se ha observado que la proteína Rho1 también es necesaria para el mantenimiento de la integridad celular y la polarización del citoesqueleto de actina (Arellano *et al*, 1997). Aunque no se conoce la diana de esta proteína, se ha descrito que su mutación provoca lisis celular y dicha pérdida de viabilidad no es suprimible por un estabilizador osmótico (Arellano *et al*, 1997).

Se conoce el mecanismo de transporte intracelular de Rho1 hacia las zonas donde ejerce su función. Así, la forma activa de Rho1 unida a GTP es transportada desde el retículo endoplasmático al aparato de Golgi y de allí por medio de vesículas

secretoras a la membrana plasmática (Abe *et al*, 2003). Una vez en la membrana, la forma activa de Rho1 interacciona con Sec3, quien marca el sitio de secreción polarizado y el establecimiento del polarisoma (Guo *et al*, 2001).

En relación al control molecular de la activación de Rho1, hasta el momento se han descrito dos vías de señalización:

1. La vía Tor, en la que la fosfatidil inositol quinasa Tor2 señala a Rom1 y Rom2, que son dos GAPs de Rho1 (Schmidt *et al*, 1997).
2. La vía de integridad celular, en la que los daños en la pared celular son detectados por el receptor Wsc1 que estimula a la GAP Rom2 quien activa a Rho1 y posteriormente ésta induce la activación de Pkc1 y del módulo MAP quinasa de dicha vía (Delley y Hall, 1999; Philip y Levin, 2001).

4.3 Otras proteínas G: Rho2, Rho3, Rho4 y Rho5

Rho2 esta relacionada con la polaridad celular y la unión entre los microtúbulos. (Madden y Snyder, 1998). Por su parte, Rho3 y Rho4 participan en el mantenimiento de la polaridad celular durante el crecimiento de la yema, interaccionando con forminas y estableciendo la formación de cables de actina (véase la revisión de Madden y Snyder, 1998). La disrupción de Rho3 afecta a la velocidad de crecimiento, pero la disrupción de Rho4 no tiene un fenotipo destacable; aunque *RHO4* es un supresor dependiente de dosis del defecto del mutante nulo *rho3*, la doble delección *rho3 rho4* es letal (Cabib *et al*, 1998). Por último, Rho5 parece que actúa aguas abajo de la última MAP quinasa del módulo de la vía de integridad de señal (Slr2), y parece ser un regulador negativo de la cascada Map quinasa (Schmitz *et al*, 2002).

4.4 Proteínas GEF:

Las proteínas GEF son proteínas activadoras de las proteínas G, uniéndose a éstas a través de su dominio DH (homologo Dbl), y catalizando el intercambio de GDP a GTP (Gulli *et al*, 2001). En *S. cerevisiae* algunas de ellas están relacionadas

directamente con la vía de integridad celular y con la familia de proteínas Rho; se trata esencialmente de Rom2, Rom1 y Bem4.

El gen *ROM2* fue inicialmente identificado como un supresor multicopia del mutante *cik1* (mutante defectivo en la formación de microtúbulos) (Page y Snyder, 1992). Posteriormente fue aislado como un supresor multicopia de la sensibilidad al frío del mutante *rho1* (Ozaki *et al*, 1996) y de la termosensibilidad del mutante *tor2* (Schmidt *et al*, 1997). Más recientemente, se pudo determinar que Rom2 era un supresor de la letalidad causada por los estreses térmico y osmótico en el mutante *ira2* (que es una GAP que regula negativamente a la proteína Ras) (Park *et al*, 2004).

El análisis de la secuencia de la proteína Rom2 indica la presencia de un dominio catalítico DH, característico de todas las proteínas GEFs (Ozaki *et al*, 1996), y un dominio PH que probablemente esté implicado en la localización intracelular de dicha proteína (Whitehead *et al*, 1997).

Rom2 en su forma activa se localiza en los sitios de crecimiento polarizado, como las yemas incipientes, el extremo de las mismas y las proyecciones generadas durante el apareamiento. Rom2 interacciona física y genéticamente con Rho1. Esta interacción permite el intercambio de GDP a GTP que unido a Rho1 la activa en respuesta a problemas en la pared celular (Ozaki *et al*, 1996; Delley y Hall, 1999). Los mutantes *rho1* y *rom2* presentan fenotipos similares como los defectos de crecimiento a 37 °C o la sensibilidad al benomilo, lo que indica que ambas proteínas actúan conjuntamente (Manning *et al*, 1997).

La delección de *rom2* no conduce a una disminución significativa en la cantidad de GTP unido a Rho1 (Philip y Levin, 2001). Esta observación sugiere que otras proteínas GEF, como pueden ser Rom1 y Bem4, podrían estar a cargo de unir GTP a Rho1 activándolo. De hecho Bem4 interacciona físicamente con Rho1 (Hirano *et al*, 1996). En cuanto a Rom1, se observó que el doble mutante *rom1 rom2* es inviable (Ozaki *et al*, 1996), por lo que parece que estas dos proteínas comparten sustratos y funciones relacionadas con el mantenimiento de la integridad celular. Por ello se postula que Rom1 y Rom2 actúan ambas como GEFs para Rho1 (Schmidt *et al*, 1997; Ozaki *et al*, 1996).

El dominio N-terminal de Rom2 interactúa físicamente con el dominio citoplasmático de las proteínas receptoras Wsc1 y Mid2. Por este motivo se ha propuesto que dicha interacción es necesaria para la activación de Rho1 (Philip y Levin, 2001). Una de las incógnitas que todavía quedan por resolver es el mecanismo de transporte de Rom2 a la membrana plasmática donde posteriormente interactúa con Wsc1. Lo que sí parece es que el mecanismo de transporte de Rom2 a la superficie celular es independiente del transporte vesicular normal (Abe *et al*, 2003).

Rom2 también regula negativamente la vía de transducción de señal Ras-cAMP (vía esencial para detectar y responder a un estrés nutricional en la levadura) (Park *et al*, 2004), aunque a su vez regule positivamente la ruta de integridad celular. Esta observación no es extraña puesto que la vía de integridad celular y la vía Ras-cAMP se activan de manera opuesta en respuesta a distintos estreses (Park *et al*, 2004).

El gen *BEM4* se aisló como un supresor multicopia del mutante *cdc42*, al igual que *BEM1*. La delección de *BEM4* a altas temperaturas impide que se forme la yema, y las células presentan una forma alargada y múltiples núcleos (fenotipo que también se observa en los mutantes en *bem1* y *bem2*). El fenotipo anterior permitió relacionar *BEM4* con *CDC42*, que codificada para una proteína G implicada en la emergencia de la yema (Mack *et al*, 1996). A su vez Bem4 también parece que juega un papel en la función de Rho1, puesto que la sobreexpresión de *RHO1* es necesaria, junto con la sobreexpresión de *CDC42*, para suprimir el fenotipo termosensible del mutante *bem4* (Mack *et al*, 1996; Hirano *et al*, 1996).

Estudios mediante la estrategia del doble híbrido demuestran que Bem4 interactúa con Cdc42, Rho1, Rho2 y Rho4. Así pues, parece que Bem4 está relacionada con múltiples vías de transducción de señal en donde participan proteínas de la familia Rho (Mack *et al*, 1996; Hirano *et al*, 1996).

4.5 Proteínas GAP:

Las proteínas GAP son subunidades inactivadoras de las proteínas G que catalizan la hidrólisis de GTP a GDP. Hasta el momento se han identificado cinco

proteínas GAP en *S. cerevisiae* que actúan sobre la familia Rho: Sac7, Bem2, Bem3, Bag7 y Lrg1.

El gen *BEM2* fue originariamente identificado como un gen relacionado con la emergencia de la yema (Bender y Pringle, 1991). Posteriormente se demostró que *BEM2* estaba implicado en la organización del citoesqueleto de actina y en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Wang y Bretscher, 1995; Cid, 1998). *BEM2* es importante para la organización funcional de los microfilamentos de actina (Wang, 1995) y en relación con esta función se ha descrito interacción genética entre *BEM2* y *RHO1*.

El gen *SAC7* se aisló originariamente como un supresor de los mutantes de actina *act1-1* y *act1-4* (Dunn *et al*, 1990), y además su delección restaura el crecimiento de los mutantes *tor2* (Dunn *et al*, 1990). Todo ello parece indicar que Sac7 juega también un papel en el control del citoesqueleto de actina (Schmidt, 1997).

Sac7 y Bem2 actúan como GAPs de Rho1 según experimentos *in vitro* (Schmidt *et al*, 1997). En otros experimentos también *in vitro* se observó que la pérdida de Sac7 o Bem2 incrementaba la fosforilación de la MAP quinasa Slk2. Todos estos datos sugieren que las dos GAPs regulan negativamente la vía Pkc1-MAP quinasa (Martin, 2000).

Bag7 es homólogo de Sac7 y también actúa como una GAP de Rho1. Su sobreexpresión suprime la sensibilidad del mutante *sac7* al frío y la letalidad de la hiperactivación de Rho1 en respuesta a un estrés en la pared celular. El hecho de que la disrupción de Bag7 no produce una activación de la vía Pkc1-MAP quinasa sugiere que dicha proteína juega un papel importante en la regulación de Rho1 pero probablemente no en la regulación de las restantes proteínas de la vía de integridad celular (Schmidt, 2002).

Recientemente se han identificado otras GAP que actúan sobre otras proteínas G diferentes de Rho1. Tal es el caso de Lrg1, que regula a Rho2 (Roumanie *et al*, 2001) y Bem3, que actúa sobre Cdc42 (Caviston *et al*, 2003).

4.6 Proteína Pkc1:

La superfamilia de proteínas quinasa C (PKC), son un grupo de proteínas dependientes de fosfolípidos, que se puede localizar en el citoplasma, en el núcleo y en sitios de crecimiento polarizado (Mellor y Parker, 1998).

Estudios genéticos en mamíferos han permitido definir una superfamilia de hasta 20 genes diferentes que codifican para diversos isotipos de PKC (Mellor y Parker, 1998). La existencia de un elevado número de isotipos de PKC constituye una clave importante para explicar el gran número de funciones en las que intervienen estas proteínas y la amplia gama de sustratos que regulan. Por este motivo, es difícil hablar de una función biológica específica regulada por las proteínas PKC y es preferible tratar por separado cada uno de los procesos regulados por cada una de las isoformas. Los isotipos α , β y γ fueron los primeros identificados a partir de librerías de cDNA de cerebro de ratón y han sido los más estudiados hasta el momento. En el mismo estudio se identificaron también los isotipos δ , ϵ y ζ (Ono *et al*, 1987) . Los isotipos θ , ι , η se aislaron por complementación a partir de librerías de pulmón y músculo esquelético de ratón (Osada *et al*, 1990; Osada *et al*, 1992) y más recientemente ha sido identificada la subfamilia de PRKs quinastas relacionadas con PKC (Mellor y Parker, 1998).

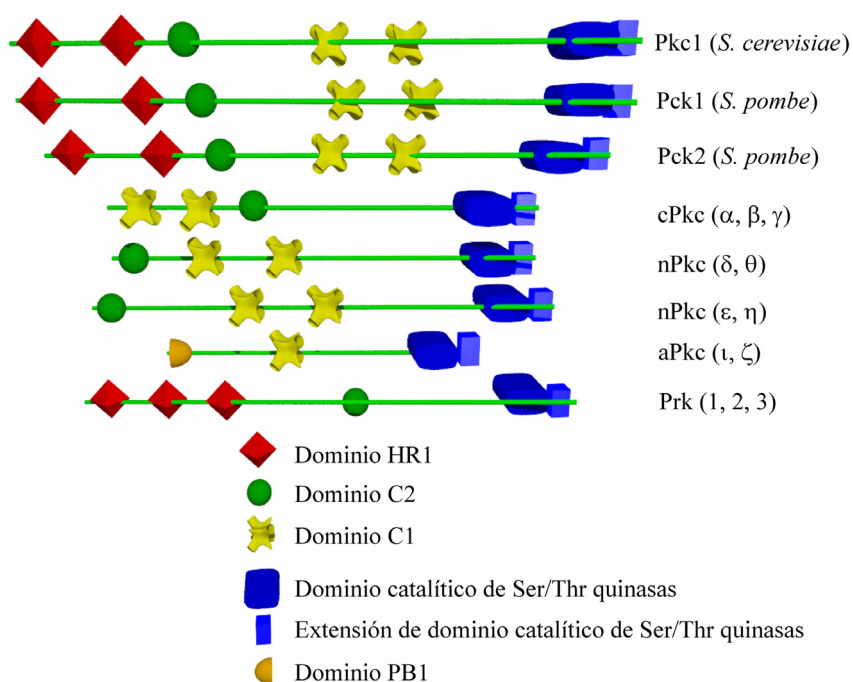


Figura 5. Esquema de los dominios estructurales de la superfamilia de proteínas Pkc.

Los estudios realizados con células procedentes de cerebro de rata permitieron definir inicialmente a PKC como una histona con actividad quinasa (Inoue *et al*, 1977). En los años siguientes se determinó que esta quinasa también podía ser activada por PS (fosfatidilserina), DAG (diacilglicerol) y calcio (Nishizuka, 1984). La activación de receptores de membrana produce la hidrólisis de fosfatidil inositol a DAG y a inositol trifosfato; en conclusión el DAG activa PKC de una forma directa y el inositol trifosfato actúa como un segundo mensajero liberando calcio, ayudando así a la activación de PKC (Mellor y Parker, 1998).

El gen *PKC1* fue identificado mediante análisis de complementación con sondas de PKCs de mamíferos utilizando librerías de *S. cerevisiae* (Levin *et al*, 1990). Dicho gen tiene una alta homología con los isotipos de PKC de mamíferos dependientes de calcio (α , β y γ) aunque en los estudios iniciales Pkc1 no parecía depender de los cofactores DAG y calcio, sí se determinó que presentaba características comunes con las isoformas α , β y γ de mamíferos como la capacidad de autofosforilarse en los residuos serina y treonina (Watanabe *et al*, 1994).

La proteína Pkc1 presenta un dominio C1 (con dos motivos de dedos de zinc) de interacción con Rho1, que podría mediar la activación de dicha proteína G. La proteína también presenta un dominio C2, que probablemente esté relacionado con un dominio de unión a calcio. Además, en su extremo N-terminal posee dos copias del dominio HR1 que en las proteínas PRK de mamíferos está relacionado con la unión a proteínas G (en proteínas donde el dominio C1 es ausente) (Mellor y Parker, 1998). Recientemente se ha demostrado que el dominio HR1 es el que interacciona físicamente con Rho1 (Schmitz *et al*, 2002). Además, Pkc1 puede ser activada por una amplia gama de estímulos diferentes como los cofactores DAG, calcio y PS (Kamada *et al*, 1996).

En la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe* se han descrito dos homólogos de la proteína quinasa Pkc1: Pck1p y Pck2p (Toda *et al*, 1993), no poseen dominios de unión al Ca^{2+} (Mazzei *et al*, 1993) y están implicados en la viabilidad celular. El mutante *pck1* es sensible al blanco de calcofluor y a la equinocandina

(antibiótico que inhibe el glucano) (Arellano *et al*, 1999), sin embargo, la mutación de *pck2* presenta una morfología anormal y muestran una hipersensibilidad a enzimas líticos de la pared celular (Toda *et al*, 1993), también muestra un fenotipo termosensible que es suprimible añadiendo sorbitol al medio (Arellano *et al*, 1999). Hasta el momento no se ha observado que estas dos proteínas homologas de Pkc1, estén directamente regulando Spm1p (proteína homologa a Slr2) en la vía de integridad celular de *S. pombe* (Toda *et al*, 1996). La sobreexpresión de estas dos quinasas incrementan la biosíntesis de la pared celular que se correlaciona con un aumento en el contenido del β glucano y con una activación de la β -1,3 glucano sintasa (Arellano *et al*, 1999).

La función principal de la proteína Pkc1 es proteger la integridad de la pared celular, ya que un mutante nulo *pck1* es inviable en condiciones normales de crecimiento y sólo es viable a temperaturas permisivas en presencia de un estabilizador osmótico como el sorbitol. Además, el mutante *pck1* presenta un fenotipo similar al mutante termosensible *rho1*, lisando con yemas de distintos tamaños (Levin y Bartlett-Heubusch, 1992; Gray *et al*, 1997; Roemer *et al*, 1994). Como consecuencia de un choque térmico o hipotónico, Pkc1 es activada por Rho1, que recibe la señal procedente de los receptores Wsc1 y Mid2, (Davenport *et al*, 1995; Kamada *et al*, 1995; Kamada *et al*, 1996; Philip y Levin, 2001) aunque todavía no se conoce exactamente el mecanismo de activación de Rho1 a cargo de los citados receptores. A su vez Pkc1 activa una cascada MAP quinasa (ver apartado 4.7), lo que como consecuencia induce a su vez al factor transcripcional Rlm1, que a su vez regula la activación de genes relacionados con la biogénesis de la pared celular (ver apartado 5.3) (Heinisch *et al*, 1999; Igual *et al*, 1996; Watanabe *et al*, 1995).

Se ha demostrado que Pkc1 interacciona con Bim1, una proteína que se une a microtúbulos y que retrasa la salida de mitosis cuando el huso es orientado anormalmente (Hosotani *et al*, 2001). Ello sugiere que la proteína Pkc1 podría regular algunos aspectos relacionados con la función de los microtúbulos. Otras posibles funciones de Pkc1 son la posible regulación de *RSCI*, un complejo esencial implicado en la remodelación de la cromatina (Chai *et al*, 2002) y en la relocalización de proteínas nucleares en respuesta a un choque hipertónico (Nanduri y Tartakoff, 2001; Nanduri y Tartakoff, 2001b).

Pkc1 se localiza en el cortex celular y en sitios de secreción polarizada, a lo largo del ciclo celular aparece primero en la yema emergente y después se localiza en el extremo de la yema, antes de que esta alcance la mitad de su tamaño, una vez la yema ha alcanzado la mitad de su tamaño Pkc1 se localiza en el septo entre la célula madre y la célula hija (Andrews y Stark, 2000). Recientemente se ha observado que Pkc1 puede localizarse dentro del núcleo, y se plantea la hipótesis de que esté fosforilando sustratos nucleares como respuesta a algún tipo de estímulo, pero hasta el momento no hay datos concretos sobre este hecho (Denis y Cyert, 2005). Además resultados recientes demuestran que para que Pkc1p se localice en los sitios de crecimiento polarizado es necesario que conserve su actividad catalítica (Denis y Cyert, 2005).

4.7 Módulo MAP quinasa:

Las MAP quinasas son proteínas que se activan fosforilándose en residuos conservados por la acción de diversos agentes mitógenos (Widmann *et al*, 1999). Las cascadas MAP quinasa están constituidas generalmente por tres proteínas que actúan en serie; la primera es la MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK), la segunda es la MAP quinasa quinasa (MAPKK) y la última la MAP quinasa (MAPK) (Cobb, 1999). En respuesta a un estímulo la cascada MAP quinasa se activa del siguiente modo: la MAPKKK fosforila las serinas y treoninas del motivo Ser/Thr/Tyr de la MAPKK, quien a su vez fosforila treoninas y tirosinas del motivo Thr-X-Tyr de la MAPK (Widmann *et al*, 1999). Las cascadas MAP quinasa se encuentran conservadas en animales, plantas y hongos, generalmente fosforilando y activando factores transcripcionales específicos (Gustin *et al*, 1998).

A partir de estudios genéticos y de toda la información proveniente de la completa secuenciación del genoma de *S. cerevisiae* se ha podido demostrar la existencia de cinco módulos MAP quinasas que operan en cinco vías de transducción de señal distintas. Se trata de vías de señalización que regulan: la respuesta a feromonas, la filamentación e invasión (baja concentración de amonio), el crecimiento en alta osmolaridad, la formación de la pared de la espora (ayuno) y la ruta de integridad celular (Gustin *et al*, 1998).

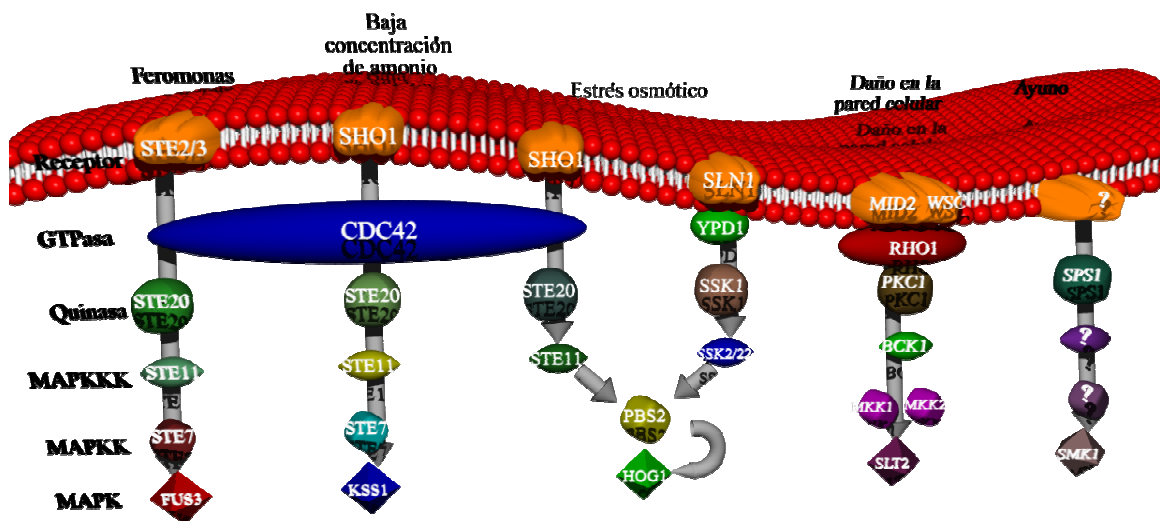


Figura 6. Esquema de las cascadas MAP quinasa descritas en *S. cerevisiae*. En el esquema se muestran los estímulos que las activan.

En la vía de integridad celular se ha identificado un módulo de MAP quinasa constituido por la proteína Bck1 (MAPKKK) (Lee y Levin, 1992), las proteínas redundantes Mkk1 y Mkk2 (MAPKK) (Irie *et al.*, 1993), y Slt2 (MAPK) (Torres *et al.*, 1991) (Figura 2).

El gen *BCK1* se identificó como resultado del aislamiento de una mutación dominante que suprimía los defectos de crecimiento que presentaba el mutante *pkc1*. Además, el mutante *bck1* presenta un fenotipo lítico similar al descrito para *pkc1* (Lee y Levin, 1992). Estas observaciones permitieron concluir que *BCK1* formaba parte de la vía de integridad celular. No obstante y aun cuando no se haya podido demostrar hasta el momento una interacción física entre Bck1 y Pkc1, no se excluye la posibilidad de que Bck1 sea un sustrato biológico de Pkc1, aunque no se ha podido demostrar que exista una interacción entre Pkc1 y Bck1 (Paravicini y Friedly, 1996)

Los genes *MKK1* y *MKK2* fueron detectados como supresores multicopia de los mutantes *pkc1* (Irie *et al.*, 1993). Posteriormente se detectó la interacción física entre Mkk1 y Pkc1 (Paravicini y Friedly, 1996). Los mutantes simples *mkk1* o *mkk2* no provocan ningún defecto aparente en el crecimiento celular; sin embargo el doble mutante *mkk1 mkk2* provoca lisis celular suprimible por estabilizadores osmóticos en el medio de cultivo. Además, la sobreexpresión de ambas proteínas es capaz de suprimir el

fenotipo lítico de *bck1*. Finalmente, el hecho de que el alelo hiperactivo *BCK1-20* no fuese capaz de suprimir los defectos en el crecimiento del doble mutante *mkk1 mkk2* sitúa a ambas quinasas aguas abajo de Bck1 (Irie *et al*, 1993).

El gen *SLT2* (Torres *et al*, 1991), también llamado *MPK1* (Lee *et al*, 1993) fue identificado como un supresor del mutante *lyt2* relacionado con la formación de la pared (Torres *et al*, 1991; Lee *et al*, 1993). También fue identificado como un supresor multicopia del mutante *bck1* (Lee *et al*, 1993). A su vez la sobreexpresión de Slt2 suprimía los defectos del doble mutante *mkk1 mkk2*, lo que sugería que la proteína Slt2 estaba situada aguas debajo de Mkk1 y Mkk2 (Irie *et al*, 1993). De este modo se ha podido definir el módulo MAP quinasa de la ruta Pkc1-MAP quinasa.

El módulo MAP quinasa actúa en diversas funciones biológicas relacionadas con la regulación del ciclo celular, la respuesta a un estrés térmico o hipotónico, respuesta a feromonas, en la regulación de la construcción de la pared, y en la regulación transcripcional (véase la revisión Gustin *et al*, 1998).

La formación de la nueva yema ocurre durante la transición G1/S. Este es un proceso dependiente de la quinasa Cdc28 en complejo con las ciclinas de G1 Cln1, Cln2 y Cln3 (Igual *et al*, 1996). Parece ser que la actividad de Cdc28 se correlaciona con la actividad de Slt2 (Marini *et al*, 1996). Esta observación llevó a pensar que Cdc28 podría tener relación con la vía de integridad celular, y por lo tanto con la inducción de la expresión de genes relacionados con la biogénesis de la pared (Marini *et al*, 1996). La posible conexión molecular de la vía Pkc1-MAP quinasa y la maquinaria de ciclo a nivel molecular está aun por caracterizar.

Las proteínas integrantes del módulo MAP quinasa son necesarias para el crecimiento celular en condiciones de estrés térmico, ya que los mutantes simples *mpk1*, *mkk1*, *mkk2* y *bck1* son termosensibles (Kamada *et al*, 1995) y se requiere la activación de Slt2 en respuesta a un incremento de temperatura (Gustin, 1998).

El descenso en la osmolaridad del medio externo incrementa el gradiente osmótico y la presión de turgencia intracelular, generando un estrés en la membrana plasmática y en la pared celular (Kamada *et al*, 1995). Esta es la razón por la cual en

respuesta a estrés hipotónico se necesitan las proteínas Pkc1, Bck1, Mkk1 y Mkk2 para inducir la activación de Slt2 (Levin y Bartlett-Heubusch, 1992). El tratamiento con factor alfa también causa la activación de la ruta de integridad celular y como consecuencia de ello la fosforilación de Slt2. Esta respuesta es probablemente consecuencia de la activación de la maquinaria de síntesis de pared necesaria para la formación de los “shmoos” previos a la formación del cigoto (Buehrer y Errede, 1997).

5. PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA VÍA Pkc1-MAP QUINASA:

5.1 Las Quinasas Pkh y Ypk:

En *S. cerevisiae* existen tres homólogos de los genes *PDKs* humanos: *PKH1*, *PKH2* y *PKH3* (Casamayor *et al*, 1999). En humanos las *PDKs* responden a inositol-3-fosfato y activan la proteína quinasa PKB (isoforma de la proteína PKC) y las quinasas SGK (quinasa inducida por glucocorticoide del suero). Los genes *YPK1* e *YPK2* codifican para las quinasas homólogas SGK de mamíferos y parece que al igual que en eucariotas superiores, las quinasas Pkh1, Pkh2 y Pkh3 activan a Ypk1 y Ypk2 fosforilandolas (Casamayor *et al*, 1999).

Los mutantes tanto de los genes *PKH* como de los genes *YPK* muestran fenotipos similares a los mutantes de la vía de integridad celular. Así, el doble mutante *pkh1 pkh2* es inviable y no es suprimible por un estabilizador osmótico, aunque el mutante *pkh1^{ts} pkh2* presenta un crecimiento termosensible que sí es suprimible tras la adición de un estabilizador osmótico o mediante la sobreexpresión de genes de la vía Pkc1-MAP quinasa (Inagaki *et al*, 1999). El mutante simple *ypk1* durante un choque térmico muestra un defecto en la activación de la MAP quinasa Slt2 (Schmelzle *et al*, 2002). Por otro lado, el doble mutante *ypk1 ypk2* muestra un defecto en la distribución del citoesqueleto de actina; dicho fenotipo es suprimible con la hiperactivación de Rho1 o de Pkc1.

Así, Pkh1, Pkh2 y Pkh3 son activadoras de Pkc1 mediante fosforilación (Inagaki *et al*, 1999). Sin embargo, parece Ypk1 e Ypk2 actuarían activando otras proteínas

aguas arriba de Rho1, aunque por el momento se desconocen cuales pueden ser estas proteínas (Schmelzle *et al*, 2002).

5.2 Las Proteínas Fosfatasas:

La activación de las vías de transducción celular para responder de forma adecuada a los cambios ambientales es de vital importancia. Por otra parte, también resulta importante que dichas vías se puedan regular de forma negativa, para poder apagarlas una vez la célula se ha adaptado a la nueva situación y para mantener los niveles basales de actividad de la vía de transducción de señal. En este sentido, las proteínas fosfatasas son las que regulan de forma negativa las vías de transducción de señal controlando la actividad de elementos regulados por fosforilación, contrarrestando el efecto de las quinasas.

En la vía Pkc1-MAP quinasa, se ha demostrado que las tirosina fosfatasas Ptp2 y Ptp3 actúan tanto *in vivo* como *in vitro* en la defosforilación e inactivación de Slt2 (Mattison *et al*, 1999). La proteína fosfatasa Msg5 también ha sido implicada en la inactivación de la vía de integridad celular, puesto que el mutante *msg5* presenta niveles elevados de actividad Slt2 (Martin *et al*, 2000). También se ha descrito un papel equivalente para la proteína fosfatasa Sdp1 en cuanto a la inactivación *in vivo* como *in vitro* de Slt2 (Hahn y Thiele, 2002).

La proteína fosfatasa de serinas y treoninas Sit4 también regula de forma negativa las funciones dependientes de Pkc1, como son: la regulación del módulo MAP quinasa, la represión de genes ribosomales por un bloqueo en la secreción y la despolarización del citoesqueleto de actina causada por un choque térmico. Sit4 modula negativamente la vía Pkc1-MAP quinasa a un nivel aguas arriba de Rho1 (M^a Angeles de la Torre-Ruiz *et al*, 2002).

Los genes *PPZ1* y *PPZ2* codifican fosfatasas de serinas y treoninas (Ariño, 2002) que pueden estar implicadas en el mantenimiento de la integridad celular, la tolerancia al estrés salino y la progresión en el ciclo celular (Clotet *et al*, 1999; Posas *et al*, 1995). Estudios genéticos basados en interacciones entre las fosfatasas y los

elementos de la vía Pkc1-MAP quinasa sugieren que estas fosfatasa actúan en una vía paralela a Pkc1 en el mantenimiento de la integridad celular, ya que:

1. La sobreexpresión de elementos de la vía de integridad celular suprime problemas del doble mutante *ppz1 ppz2* (Lee *et al*, 1993).
2. La doble mutación de *ppz1 slt2* tiene un fenotipo termosensible a temperaturas permisivas y el triple mutante *ppz1 ppz2 slt2* es letal (Lee *et al*, 1993).

5.3 Dianas de acción de la MAP quinasa Slt2:

Hasta el momento se han descrito dos factores transcripcionales regulados por Slt2: Rlm1 (Watanabe *et al*, 1997) y Swi4/Swi6 (SBF) (Madden *et al*, 1997).

El factor transcripcional Rlm1 es responsable de la mayoría de respuestas de la vía de integridad celular. El gen *RLM1* fue identificado en un análisis genético de mutantes que podían sobrevivir a la inhibición del crecimiento causada por la sobreexpresión constitutiva de Mkk1 (Watanabe *et al*, 1997). Rlm1 interacciona *in vivo* con Slt2 (Watanabe *et al*, 1995) y es fosforilado *in vivo* e *in vitro* por esta quinasa (Yan *et al*, 2002). El extremo N-terminal de la proteína Rlm1 contiene el dominio de unión a DNA; el extremo C-terminal incluye el dominio de activación transcripcional, y por ultimo en la región central se encuentra el dominio de fosforilación e interacción física con Slt2 (Watanabe *et al*, 1995). Concretamente, Rlm1 es fosforilada por Slt2 en dos residuos (Ser327 y Thr439) que se encuentran localizados en el dominio de activación transcripcional (Jung *et al*, 2002).

La localización de Rlm1 siempre es nuclear (Jung *et al*, 2002). Estudios genéticos relacionados con la vía de integridad celular revelan que Rlm1 regula la expresión de unos 25 genes en respuesta a estrés en la pared celular, la mayoría de ellos codificando para proteínas relacionadas con la biogénesis de la pared celular (Jung y Levin, 1999). El mutante *rlm1* muestra sensibilidad a la cafeína y un fenotipo similar al observado en los mutantes de los genes que integran la cascada MAP quinasa de la ruta Pkc1-MAP quinasa (Watanabe *et al*, 1995).

SBF está constituido por la subunidad reguladora Swi6 y una proteína de unión a DNA denominada Swi4 (Breedon, 2003). El factor transcripcional SBF se activa en la transición G1/S regulando entre otros la expresión de los genes propios de la fase G1 del ciclo celular *CLN1*, *CLN2* y *PCL2* (Moffat y Andrews, 2004). Además, SBF también participa en la inducción de genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular (Iguar *et al*, 1996).

Se ha propuesto que Slt2 podría estar implicado en la regulación de SBF en respuesta a un estrés en la pared celular. Esta hipótesis se basa en las evidencias bioquímicas y genéticas que a continuación se exponen. La lisis celular dependiente de la temperatura elevada en el mutante *slt2* es suprimida por la sobreexpresión de Swi4 (pero no de Swi6) y de las ciclinas Pcl1 o Pcl2 (pero no por Cln1 o Cln2) (Iguar *et al*, 1996; Madden *et al*, 1997). Otra evidencia que relaciona a SBF con la biogénesis de la pared celular es que tanto el mutante *swi4* como el mutante *swi6* muestran una hipersensibilidad al blanco de calcofluor (Iguar *et al*, 1996). Slt2 se ha relacionado con SBF en experimentos de coimmunoprecipitación; además Swi6 es fosforilada *in vitro* por Slt2 e *in vivo* por un estrés en la pared celular, (Madden *et al*, 1997; M^a Angeles de la Torre-Ruiz *et al*, 2002). Recientemente se ha aislado el complejo Slt2/Swi4 mediante cromatografía de afinidad. Dicho complejo parece formar un dímero que activaría a un factor transcripcional alternativo encargado de regular genes relacionados con la biogénesis de la pared celular: *FKS2* y *PCL1* (Baetz *et al*, 2001).

S. cerevisiae posee un sistema de alta afinidad de captura de Ca²⁺ en la membrana plasmática compuesto por dos subunidades, Cch1 y Mid1. Cch1 tiene una proteína homóloga en mamíferos conocida como la subunidad de tipo L α 1 formadora del poro; sin embargo, no se han identificado proteínas homólogas a Mid1 hasta el momento. La activación del canal Cch1-Mid1 conduce a la acumulación de Ca²⁺ intracelular y a la activación de la calcineurina. Dicho canal se activa en respuesta a diversos estímulos como son: el tratamiento con feromonas (Cyert y Thorner, 1992), el estrés térmico moderado (Zhao *et al*, 1998), un choque hipoosmótico (Batiza *et al*, 1996), un estrés en el retículo endoplasmático (Bonilla *et al*, 2002) y un incremento en los cationes extracelulares Li⁺ o Na⁺ (Aramburu *et al*, 2000).

La conexión entre la vía de integridad celular y la ruta del calcio ha sido ampliamente documentada. Así, Slt2 activa Cch1 y Mid1 en respuesta a un estrés en la pared celular (Alberts *et al*, 1998). Además, Rho1-Skn7 activan a Crz1 (Alberts *et al*, 1998). Por último se sabe que Slt2 actúa en cooperación con Crz1 para activar la expresión de *FKS2* en respuesta a un estrés en la pared celular (Zhao *et al*, 1998). Según los trabajos más recientes de Bonilla *et al* (2003), Slt2 es necesario para activar los canales integrados por Cch1 y Mid1 en respuesta al estrés en el retículo endoplasmático. Curiosamente dicho estrés causa también indirectamente un estrés en la pared celular. Estos autores demuestran además que Cch1 es una diana de acción de la calcineurina que actuaría como antagonista de la vía de integridad celular.

Resultados recientes revelan que Msg5 y Slt2 interaccionan tanto *in vivo* como *in vitro* (Flandez *et al*, 2004). Estos autores demuestran que Slt2 fosforila a Msg5 como respuesta a una activación de la vía de integridad celular. Además parece que una de las funciones de Msg5 es la de mantener la actividad basal de Slt2 en ausencia de estrés.

6. EL CITOESQUELETO DE ACTINA:

6.1 Introducción:

En la levadura *S. cerevisiae* el citoesqueleto está compuesto por tres tipos de proteínas filamentosas: microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios. Los microfilamentos son componentes integrantes de todas las células eucariotas y participan en distintas funciones, principalmente en: el movimiento celular, la citocinesis, la fagocitosis y la secreción (Wang y Bretscher, 1995). Están integrados por polímeros de actina y proteínas asociadas, este conjunto constituye el citoesqueleto de actina (Schmidt y Hall, 1998; Winsor y Schiebel, 1997). Los genes relacionados con las moléculas de actina se ha visto que están altamente conservados a lo largo de la evolución (Nefsky y Bretscher, 1992). En las células la molécula de actina se encuentra en forma monomérica (actina globular o actina G) y en estructuras poliméricas (actina filamentosa o actina F). Los monómeros de actina se unen a ATP que es hidrolizado a ADP y de esta forma se une al polímero en formación. Los polímeros de actina son estructuras altamente dinámicas y se ensamblan de forma espontánea mediante uniones

no covalentes entre subunidades no monoméricas. Se ha descrito que el ATP no es imprescindible para la polimerización pero activa el proceso (Engel *et al*, 1977).

6.2 Ensamblaje del citoesqueleto polarizado:

En *S. cerevisiae* el citoesqueleto de actina se organiza en forma de microfilamentos que recorren longitudinalmente la célula madre en un eje axial desde la zona de ensamblaje de la yema hasta el polo opuesto y en forma de “patches” corticales (asociaciones microfilamentosas en forma de punteaduras) que se encuentran en las zonas de crecimiento polarizado, principalmente en la yema emergente (Amberg, 1998). Esta observación sugirió que la actina y no los microtúbulos polarizaban el crecimiento en la levadura (Novick y Botstein, 1985).

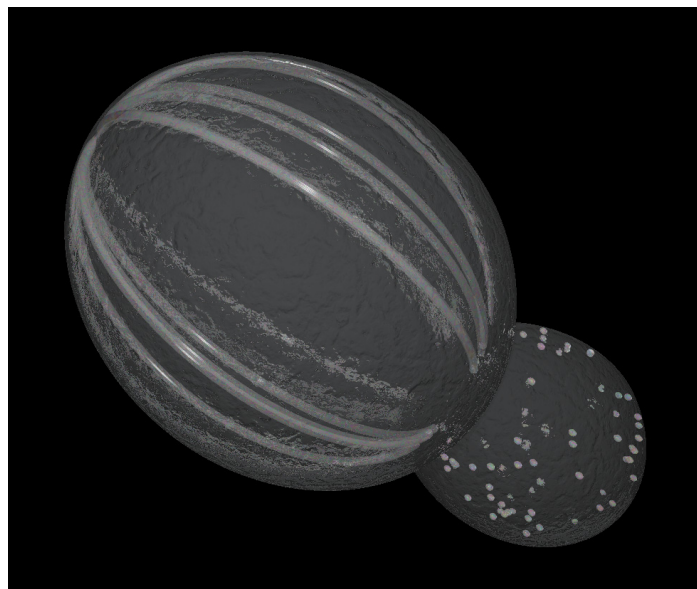


Figura 7. Esquema del citoesqueleto de actina polarizado en una levadura de *S. cerevisiae* en gemación. (Adaptado a partir de observaciones propias en el microscopio de fluorescencia)

Los “patches” corticales están asociados con invaginaciones en la membrana plasmática (Mulholland *et al*, 1994); generalmente se localizan cerca de regiones de exocitosis en células en crecimiento, y estos patches son necesarios para el crecimiento vegetativo, puesto que la pérdida de sus componentes es letal (véase la revisión de Botstein *et al*, 1997). Así Geli y Riezman (1998) proponen que una de las posibles

funciones de las proteínas del “patch” sea la de participar en el proceso de internalización. Esta afirmación está apoyada por un trabajo reciente en donde se demuestra que los complejos endocíticos y los “patches” corticales colocalizan en la superficie celular (Kaksonen *et al*, 2003). El complejo Arp2/3 participa en la nucleación de la actina para formar los “patches” (Evangelista *et al*, 2002).

Los cables de actina están integrados por actina F unida a varias proteínas: actina Act1, actina F que se une con proteínas, fimbrina Sac6 (Adams *et al*, 1991), Abp140 (Asakura *et al*, 1998) y dos isoformas de tropomiosina, Tpm1 y Tpm2. Tpm1 y Tpm2 son importantes para la estabilización de los cables de actina en la levadura, (Drees *et al*, 1995; Liu y Bretscher, 1989). Los cables de actina son estructuras dinámicas en constante proceso de ensamblaje y desensamblaje que se elongan y se anclan en el cortex y en el cuello de la célula de levadura (Yang y Pon, 2002).

Estudios recientes demuestran que los filamentos de los cables de actina son nucleados por las forminas, una familia de proteínas que han sido caracterizadas en levaduras, plantas, insectos, nematodos y vertebrados (Evangelista *et al*, 2003). En la levadura *S. cerevisiae* se han descrito dos genes que codifican para dos forminas, *BNII* (cuyo producto interactúa con el cuello de la yema) (Zahner *et al*, 1996) y *BNRI* (relacionado con *BNII*) (Imamura *et al*, 1997). Las dos forminas interactúan con la parte N-terminal de las GTPasas Rho mediante los dominios C-terminales FH1 y FH2 de dichas forminas (Imamura *et al*, 1997). La mutación de una de estas forminas no produce un fenotipo remarcable, pero la doble mutación es letal (Ozaki-Kuroda *et al*, 2001).

Bni1 interactúa en su región C-terminal con Spa2, y resultados genéticos indican que dicha interacción tiene como consecuencia la localización de Bni1 en el extremo de la yema (Fujiwara *et al*, 1998). Bnr1 depende de las septinas para su localización en el cuello de la yema (Kikyo *et al*, 1999). Se ha visto que la localización de las proteínas del polarisoma y Bni1 dependen de la proteína G Cdc42 (Jaquenoud y Peter, 2000). Se han observado interacciones genéticas entre Bni1 con las proteínas Cdc42, Rho1, Rho3 y Rho4, y entre Bnr1 y Rho4 (Evangelista *et al*, 1997; Imamura *et al*, 1997). Análisis microscópicos y genéticos de mutantes de forminas revelan una clara interacción genética y funcional entre estas proteínas y proteínas G de la familia Rho:

1. Rho3 y Rho4 son necesarias para activar Bni1 y Bnr1 (Imai *et al*, 1996).
2. Rho1 contribuye a la activación indirecta de forminas a través de Pkc1, aunque solo en condiciones de estrés térmico (Dong *et al*, 2003).
3. Cdc42 es necesaria para polarizar las forminas en la fase G1 del ciclo celular (Adams *et al*, 1990).

Se ha observado que hay dos proteínas, la profilina Pfy1 (regulador de la polimerización de la actina) y Bud6 (involucrada en la nucleación de los cables de actina y en el crecimiento polarizado de la célula) que también son importantes para el ensamblaje de cables de actina *in vivo* (Amberg *et al*, 1998; Evangelista *et al*, 2002; Imamura *et al*, 1997) y en experimentos *in vitro*, estimulando la nucleación de la actina con Bni1 (Moseley *et al*, 2004; Sagot *et al*, 2002).

La profilina (Pfy1) es una proteína citoplasmática de pequeño tamaño (13,6 kD). En los primeros estudios *in vitro* se observó que Pfy1 se unía e inhibía la polimerización de los monómeros de actina (Carlsson *et al*, 1977); una vez estos monómeros eran secuestrados, la profilina promovía el intercambio entre ADP y ATP en los mismos, lo que incrementaba el rango de polimerización de la actina (Goldschmidt-Clermont *et al*, 1992). Por todo ello, el papel que juega la profilina en la polimerización de la actina es sustentada por su localización en los lugares activos de crecimiento de los filamentos y su localización en los anillos contráctiles de actina durante la citocinesis (Balasubramanian *et al*, 1994).

La delección de *pfy1* muestra un fenotipo termosensible, una dramática alteración en los filamentos de actina, anormalidad en el crecimiento, aparecen células grandes, problemas en la deposición de la quitina y problemas en la formación de la yema y en la citocinesis ya que es frecuente la presencia de células binucleadas (Marcoux *et al*, 1998). Además este mutante también presenta una pobre distribución de los “patches” corticales tanto en la célula madre como en la célula hija y una carencia de las macroestructuras de cables de actina (Haarer *et al*, 1990). Todos los supresores que aparecen de los mutantes *pfy1* (*MID2*, *MTL1*, *ROM1*, *ROM2*, *SMY1*, *SYPI*, *RHO2* Y *WSC1*) son capaces de restaurar la distribución polarizada de los “patches” corticales,

pero no son capaces de restaurar visiblemente los cables de actina. Esto indica que la profilina solo es esencial para la polimerización de los filamentos de actina que forman los cables de actina (Marcoux *et al*, 2000).

6.3 Funciones del citoesqueleto de actina:

En células de mamífero el citoesqueleto de actina es necesario para la motilidad celular y la remodelación de la superficie; a su vez, media los cambios de la forma celular durante la mitosis y es necesario para ciertas actividades de la célula (como la contracción muscular, o la separación de la célula hija por el anillo contráctil durante la citocinesis). Además participa en la señalización transmembrana, la endocitosis y la secreción (véase la revisión de Schmidt y Hall, 1998).

En *S. cerevisiae* el gen *ACT1*, que codifica para la actina (Gallwitz y Sures, 1980), es esencial ya que mutantes en este gen presentan un fenotipo asimétrico en el ciclo celular dependiente de la distribución de actina. Los primeros mutantes de actina que se observaron presentaban defectos en la formación de la yema, tenían una distribución asimétrica de la actina durante el ciclo celular, y defectos en el movimiento de las vesículas, en la secreción de la invertasa, y en la localización de la quitina. Todas estas observaciones sugirieron que la función principal del citoesqueleto de actina es el crecimiento polarizado hacia la célula hija (Dunn y Shortle, 1990).

Otros estudios mostraron otras funciones del citoesqueleto de actina relacionadas con la división nuclear y la citocinesis (Palmer *et al*, 1992), la endocitosis (Benedetti *et al*, 1994), en la selección del sitio de crecimiento de la yema (Drubin *et al*, 1993). La organización del citoesqueleto de actina es importante para que se lleven a cabo los cambios necesarios en la morfología celular en respuesta a diferentes estreses ambientales como cambios en la osmolaridad, disponibilidad de nutrientes e incluso en el proceso de apareamiento para la formación de los "shmoos" (Kron y Gow, 1995).

6.4 Organización del citoesqueleto de actina durante el ciclo celular:

El citoesqueleto de actina se organiza al menos en cuatro estructuras distintas bioquímica y morfológicamente: "patches" corticales, cables de actina, el anillo

citocinético y una estructura que se encuentra en la submembrana de la zona apical de la yema emergente denominada “cap” (Chant y Pringle, 1995). Los patches corticales son pequeños cuerpos del citoesqueleto, los cables de actina son largas asociaciones de filamentos de actina y el “cap” consiste en acumulaciones polarizadas de proteínas del citoesqueleto (Field *et al*, 1999).

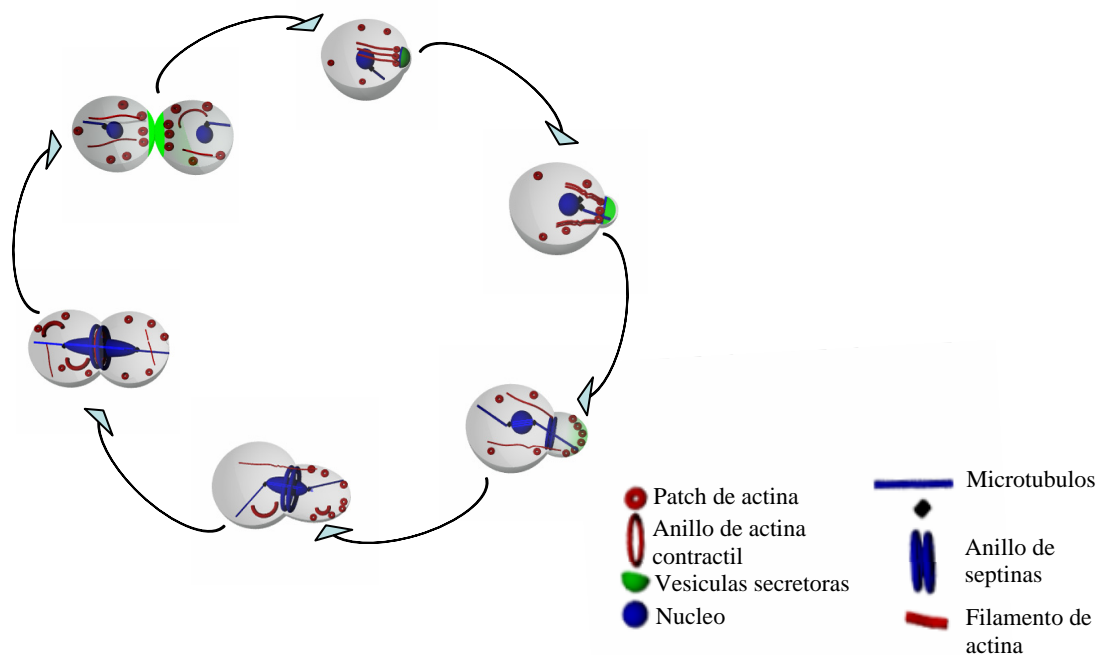


Figura 8. Esquema de la organización de las estructuras del citoesqueleto de actina en el crecimiento polarizado de la célula de la levadura y la contribución de la segregación de orgánulos durante el ciclo celular. (Esquema adaptado de Pruyne *et al*, 2004).

Los “patches” corticales, los cables de actina y el “cap” se sitúan en el cortex celular en una distribución polarizada que se correlaciona directamente con el crecimiento vegetativo (Amberg, 1998). Al principio de la fase G1 los “patches” de actina corticales y los cables se distribuyen uniformemente y se orientan aleatoriamente en el citoplasma de la célula, cuando la levadura inicia un nuevo ciclo celular, los “patches” de actina se concentran en el sitio de crecimiento polarizado de la yema y los cables de actina se orientan hacia esta localización, en estas condiciones empieza el crecimiento de la yema. Durante el crecimiento de la yema, los “patches” de actina se encuentran localizados en la yema mientras que los cables de actina se distribuyen

desde la célula madre hacia la célula hija. Cuando la yema ha adquirido el tamaño necesario finaliza el crecimiento polarizado y comienza el crecimiento isotrópico, en estas condiciones los “patches” de actina se distribuyen alrededor de la superficie de la célula madre y la célula hija y los cables pierden parte de su distribución axial y se evidencian menos cables. Cuando la célula hija adquiere el tamaño final la distribución asimétrica de las estructuras de actina se pierde, y los cables y los “patches” adquieren una distribución uniforme tanto en la célula madre como en la célula hija. Previamente a la citocinesis, los “patches” de actina se concentran en el anillo citocinético en preparación para la división de las dos células (Figura 8) (véase la revisión de Pruyne *et al*, 2004 y la revisión de Schmidt y Hall, 1998).

Una importante diferencia que existe entre *S. cerevisiae* y otros hongos y animales es que en la levadura los microtúbulos presentan un papel importante en el control nuclear y los movimientos cromosómicos en mitosis, pero apenas tienen relevancia en cuanto a su participación en el crecimiento polarizado (véase la revisión de Botstein *et al*, 1997).

6.5 Secreción Polarizada:

El crecimiento polarizado en la superficie celular de la levadura depende de la liberación de vesículas de secreción que son transportadas a lo largo de los cables de actina, lo que está mediado principalmente por la miosina Myo2. Este transporte rápido de vesículas desde el aparato de Golgi y elementos endosómicos de la célula madre hasta la yema emergente conduce a su acumulación final en el “cap”, donde se localizan también los “patches” de actina corticales (Santos y Snyder, 1997). En dicho lugar tiene lugar la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática. Durante el crecimiento apical los procesos de secreción y crecimiento y los acúmulos de actina cortical se concentran en la región apical de la yema emergente, pero posteriormente se sitúan de forma isotrópica a medida que la yema aumenta de tamaño. Por último, al final de la mitosis se forma el anillo de actina citocinético, que se contrae alrededor del cuello de la yema favoreciendo el proceso de septación y segregación celular (Pruyne *et al*, 2004).

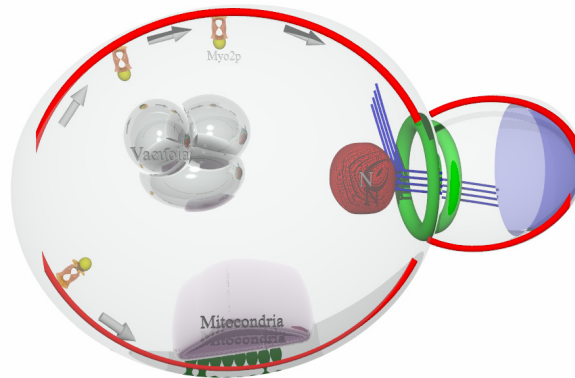


Figura 9. Esquema de la dependencia del crecimiento polarizado de la liberación de vesículas de secreción transportadas a través de los cables de actina por Myo2 (Esquema adaptado de Pruyne *et al*, 2000).

Hay tres proteínas que parecen estar directamente involucradas en el ensamblaje de Myo2 a complejos vesiculares: Smy1, Sec2 y Sec4. Los mutantes carentes de estas proteínas son inviables (Lillie y Brown, 1994; Schott *et al*, 1999). Smy1 es una quinasa que se une a la cola de Myo2 y se cree que ayuda a Myo2 a unir vesículas en la punta de la yema (Benigno *et al*, 2000). Smy1 no es esencial para el crecimiento polarizado, pero su sobreexpresión suprime defectos parciales en los mutantes de miosina (Schott *et al*, 1999). Sec4 es una GTPasa de la familia Rab y es esencial para la fusión de vesículas secretoras a la membrana plasmática (Schott *et al*, 1999). Sec2 es el factor de intercambio de Sec4, y se necesita para unir las vesículas a lo largo de los cables de actina. Esto sugiere que Sec2 o Sec4 ayudan a la unión del complejo Myo2-Smy1 con las vesículas (Walch-Solimena *et al*, 1997).

El mecanismo de exocitosis dirige el transporte vesicular hacia la zona del “cap”. En levadura, la exocitosis requiere del complejo t-SNARE en la membrana plasmática. Dicho complejo interacciona con la proteína Sec1 y con el complejo llamado exocisto (véase la revisión de Finger y Novick, 1998). Aunque t-SNARE está distribuido isotrópicamente por toda la célula cuando Sec1 se polariza regula el ensamblaje del exocisto con el “cap” y traslada la maquinaria de exocitosis a esta región (Pruyne y Bretscher, 2000). La proteína exocística Sec3 se localiza en el “cap”. Aunque

se desconoce el mecanismo de dicha localización, se cree que es necesaria para establecer la señal de inicio de secreción polarizada (Finger *et al*, 1998).

No esta claro cual es el mecanismo de exocitosis dependiente del complejo Sec1p-SNARE, pero la dependencia de GTP-Sec4 asegura que solo vesículas capaces de transportar la proteína Myo2 se conectan con el punto de contacto de Sec3, y esta dependencia refuerza la polaridad (Pruyne y Bretscher, 2000).

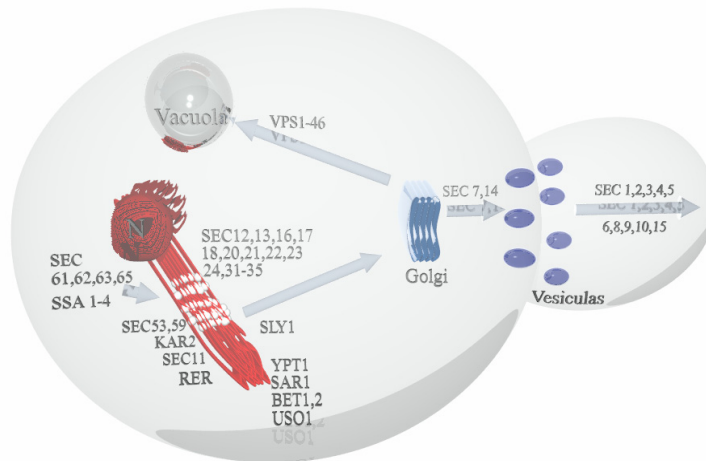


Figura 10. Esquema de las rutas secretoras de la levadura *S. cerevisiae* (Esquema adaptado de Mizuta *et al*, 1994).

7. FUNCIONES DE LA VÍA DE INTEGRIDAD CELULAR:

7.1 Regulación del ciclo celular:

Una de las primeras evidencias de la relación de la vía Pkc1-MAP quinasa con la regulación del ciclo celular viene de la observación de que el doble mutante *slt2 cdc28*, presenta defectos aditivos sobre el crecimiento celular con respecto a los mutantes simples. En este mismo estudio Slt2 fue aislado como supresor del mutante *cdc28-4* (Masón *et al*, 1993). Además, el mutante *slt2* mostraba problemas en el crecimiento polarizado en respuesta a un choque térmico y una acumulación de vesículas secretoras en el citoplasma (Masón *et al*, 1993). En este trabajo se concluye que la función de Slt2 es aguas abajo o en paralelo al proceso de emergencia de la yema dirigida por Cdc28.

La polarización del citoesqueleto de actina en cables y “patches” en las zonas de crecimiento comienza durante la transición G1/S del ciclo celular. En un mutante *rho1* termosensible no se produce la gemación, y a la temperatura restrictiva no es capaz de polarizar el citoesqueleto de actina (Drgonova *et al*, 1996). Los mutantes *pkc1* poseen un fenotipo de lisis celular coincidiendo con el momento de emergencia de la yema; de hecho a temperaturas altas se detiene el crecimiento en una fase del ciclo en la que la célula está gemando (Levin y Bartlett-Heubusch, 1990; Harrison *et al*, 2004). Marini *et al* (1996) describieron que existían interacciones genéticas entre *PKC1* y mutantes termosensibles en *CDC28*. También demostraron que la activación de Cdc28 conduce a la activación de Slf2.

Todas estas observaciones sugieren que la vía Pkc1-MAP quinasa y la maquinaria de ciclo celular están relacionadas, aunque hasta el momento dicha conexión no se conoce en detalle.

7.2 Respuesta a estrés térmico:

La vía de integridad celular se activa en respuesta a temperaturas de crecimiento superiores a 37°C (Kamada *et al*, 1995). La mayoría de los mutantes nulos de la vía sufren una lisis celular a altas temperaturas. Un dato interesante es que Slf2 no se activa inmediatamente en respuesta a un choque térmico; por el contrario, se detecta una clara activación de la quinasa a partir de los 30 minutos después del estímulo (Kamada *et al*, 1995). Este comportamiento ha hecho que algunos autores propongan que la vía de integridad celular realmente se activa como consecuencia de un mecanismo secundario o adaptativo respecto al primer efecto del choque térmico (Klis F. M., 1994). Lo que si se ha demostrado es que para que la vía se active en respuesta a un estrés térmico son necesarios los receptores de la superficie celular (Gray *et al*, 1997; Ketela *et al*, 1999; Martin *et al*, 2000; Rajavel *et al*, 1999).

Los mutantes nulos *pkc1*, *mkk1*, *mkk2* y *bck1* no son capaces de activar Slf2 en respuesta a un estrés en la pared celular (Buehrer y Errede, 1997; Davenport *et al*, 1995; Harrison *et al*, 2004; Kamada *et al*, 1995; Torres *et al*, 2002; Vilella *et al*, 2005). Un mutante *pkc1* con el alelo constitutivamente activo *BCK1-20* es capaz de activar Slf2 en

respuesta a un estrés térmico moderado (Harrison *et al*, 2004 115 /id), y en un mutante *bck1* en donde expresa la forma constitutivamente activa de Mkk1 también se activa Slr2 (Inagaki *et al*, 1999). Estos dos resultados nos sugieren que el módulo MAP quinasa juega un papel importante en la respuesta al estrés térmico. La eliminación de las fosfatasa de la MAP quinasa (Msg5, Sdp1, Ptp2 y Ptp3) permiten que Slr2 permanezca activa más tiempo en respuesta a un estrés térmico (Harrison *et al*, 2004). Existen dos formas distintas de mantener activada la vía de integridad celular en respuesta al estrés de pared:

1. Una de ellas es a través de la continua estimulación de la ruta desde los receptores de la envuelta celular que transmiten la información a través de la vía hasta Slr2.
2. La otra sería inhibiendo la actividad de las fosfatasa que inactivan a Slr2.

7.3 Respuesta a choque Hipoosmótico:

Un choque hipoosmótico tiene como principal efecto el incremento de la turgencia causada por la entrada de agua al interior de la célula, lo que produce un estrés sobre la membrana plasmática y la pared celular.

Un choque hipoosmótico induce una rápida activación de la vía de integridad celular (Davenport *et al*, 1995; Kamada *et al*, 1995). Slr2 es activada en los primeros 15 segundos de disminuir la presión osmótica extracelular, aunque su actividad basal es restaurada después de unos 30 minutos, consecuentemente se concluye que los cambios en la osmolaridad también son capaces de activar la ruta Pkc1-MAP quinasa y que esta es necesaria para la supervivencia celular en estas condiciones. La importancia de la integridad de la pared celular en respuesta a estrés osmótico viene demostrada por el hecho que el osmosensor de superficie Sln1 es activado por un choque hipoosmótico; éste a su vez activa al factor transcripcional Skn7 para ayudar a la biogénesis de la pared celular mediando la activación transcripcional de genes que intervienen en este proceso (Levin, 2005).

7.4 Respuesta a Feromonas:

Las células de levadura haploides secretan feromonas de forma constitutiva cuando están en presencia de una población haploide de sexo opuesto, se activa una vía de transducción de señal específica constituida por los receptores Ste2 y Ste3, que transmiten la señal a las proteínas G Gpa1, Ste4 y Ste18, que activan la cascada MAP quinasa dependiente de feromonas sexuales (véase la revisión de Elion, 2000). Entre otros efectos celulares se induce una parada en G1 previa a la formación de los shmooos necesarios para que tenga lugar el apareamiento y la formación del cigoto. Durante el proceso de formación de los shmooos ocurre una reorganización y polarización del citoesqueleto de actina, se necesita una maquinaria secretora activa y se induce la activación de la vía Pkc1-MAP quinasa (Buehrer y Errede, 1997; Zarzov *et al*, 1996). Mutantes en la vía de integridad celular sufren una lisis celular al ser expuestos a factor alfa debido a problemas en la capacidad para reorganizar la estructura de la pared celular, mecanismo imprescindible para la formación de los shmooos (Errede *et al*, 1995).

Como en el caso del estrés térmico la vía Pkc1-MAP quinasa también se activa en respuesta a feromonas pero de forma más tardía como una respuesta no tanto directa como secundaria (Buehrer y Errede, 1997).

La importancia de la vía de integridad celular en el proceso de apareamiento en levadura también se ve reflejada en el hecho de que Rho1 y Pkc1 se localizan en los extremos de los shmooos; probablemente ambas proteínas sean necesarias en dichas condiciones para el establecimiento de la polaridad (Bar *et al*, 2003).

7.5 Respuesta al estrés por agentes que dañan la pared celular:

Existen diversos agentes que provocan estrés sobre la pared celular. Los más estudiados hasta el momento son el blanco de calcofluor (que se une al β -1,4 glucano y la quitina), el rojo congo (que inhibe la unión del β -1,3 glucano), el enzima zimoliasa (que produce una lisis sobre la pared celular actuando sobre los enlaces β -1,3 glucano) y la cafeína (que hasta el momento no se conoce cual es el mecanismo por el cual produce

un estrés sobre la pared celular, pero se cree que los complejos proteína quinasa Tor pueden ser la diana de esta droga) (de Nobel *et al*, 2000; Jung *et al*, 2002; Ketela *et al*, 1999; Lum *et al*, 2004; Martin *et al*, 2000). Lo que parece estar actualmente aceptado es que cualquier tratamiento o efecto que altere la estructura de la pared celular es suficiente para la activación de la vía Pkc1-MAP quinasa independientemente de la naturaleza del estrés (Levin, 2005; Vilella *et al*, 2005)

Recientemente se han caracterizado unos 80 genes cuyas mutaciones inducen un estrés sobre la pared celular. Entre ellos se encuentran *fks1*, *gas1*, *kre9*, *mnn9* o *knr4*. Paralelamente se han realizado análisis bioinformáticos de las regiones reguladoras de los genes mencionados, revelando que poseen sitios de unión para Rlm1, Swi4, Msn2/4 o Crz1 (García *et al*, 2004). Cabría estudiar la posible relación que puedan tener algunos de estos genes con la vía de la integridad celular.

7.6 Respuesta al estrés sobre el citoesqueleto de actina:

La proteína Rho1 y Pkc1 juega un papel importante en la organización del citoesqueleto de actina, pero aparentemente este efecto no es dependiente de Slt2 (Delley y Hall, 1999). Se observó que un estrés térmico provocaba una despolarización transitoria del citoesqueleto de actina y se observó que dicho proceso y la repolarización de la actina dependían de Pkc1, aunque en este último proceso parecía que podía participar Slt2 (Delley y Hall, 1999). Observaciones posteriores en que la ausencia de la fosfatasa Sit4 provocaba una despolarización mas prolongada del citoesqueleto de actina en respuesta a un estrés térmico, esto indicó que esta fosfatasa regulaba a Pkc1 y por lo tanto todas las funciones mediadas por la quinasa (M^a Angeles de la Torre-Ruiz *et al*, 2002).

Un tratamiento con rapamicina que inhibe la función de las proteínas quinasa Tor1/2, despolariza el citoesqueleto de actina e induce la activación de Slt2. Se observó una disminución de la activación de la vía de integridad celular en los mutantes *wsc1*, *mid2* y *rom2* generado por dicho agente, y se describió que el proceso de despolarización del citoesqueleto de actina generado por la rapamicina estaba parcialmente bloqueado en los mutantes *rom2* y *wsc1* (Torres *et al*, 2002). Estos resultados sugerian que el efecto que provocaba la rapamicina era a nivel de los

receptores de la pared celular y que la vía Pkc1-MAP quinasa estaba relacionada con la organización del citoesqueleto de actina. Además, un tratamiento con latrunculina B, que es un inhibidor de la polimerización de la actina, también inducía la activación de Slt2, aunque se observó que era independiente de los receptores de la pared celular (Harrison *et al*, 2001).

7.7 Respuesta al estrés oxidativo:

Un estrés oxidativo provocado por el hidroperóxido del ácido linoleico, que produce una peroxidación de los lípidos de la membrana plasmática, también es capaz de activar Slt2 (Alic *et al*, 2003). Los autores concluyen que aunque no se conoce el mecanismo mediante el cual sucede dicha activación, ellos proponen que la oxidación a nivel de la membrana plasmática podría generar la señal de estrés en la pared celular (Levin, 2005).

Cohen *et al* (2003) sugieren que un estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno provoca la fosforilación de Ask10 dependiente de Mkk1 y Mkk2 pero no de Slt2. Ask10 media la señal de estrés oxidativo inducido por la destrucción de la ciclina Srb10 de tipo C que es importante para la represión de genes de respuesta a estrés. Este estudio abre la posibilidad de que Mkk1 y Mkk2 quizás tengan una diana alternativa a Slt2 en respuesta a estrés oxidativo (Cohen *et al*, 2003).

7.8 Relación de la vía de integridad celular con la biogénesis de genes ribosomales:

Las levaduras modulan la maquinaria de síntesis proteica en respuesta a sus necesidades fisiológicas a través del control transcripcional de genes ribosomales. Además la regulación de los ribosomas esta sujeta a respuestas ambientales (Mizuta y Warner, 1994). Estos autores demostraron que al bloquear la vía secretora con inhibidores de la misma (Tunicamicina o BFA) se observaba una disminución en la transcripción de genes ribosomales.

En células que presentaban problemas en las vías secretoras, era necesaria la continua síntesis proteica junto con la actividad de Pkc1 para poder reprimir la transcripción de genes ribosomales (Nierras y Warner, 1999). En un trabajo posterior se

describió que la vía de integridad celular era necesaria en la respuesta a problemas en secreción, ya que al inhibir las vías secretoras se producía un aumento de la presión de turgencia que ocasionaba estrés a nivel de la pared celular. Dicho estrés era detectado por los receptores de la vía Pkc1- MAP quinasa con la consiguiente activación de la vía de integridad celular (Li *et al*, 2000).

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

El inicio de este trabajo se basa principalmente en:

1. En la levadura *S. cerevisiae* existen vías de transducción de señal específicas para responder en situaciones de estrés térmico (Kamada *et al*, 1995), estrés hipoosmótico (Davenport *et al*, 1995) o estrés sobre la pared celular (Ketela *et al*, 1999), pero hasta el momento no se ha descrito una vía de transducción de señal implicada en la respuesta a estrés oxidativo.
2. En células eucariotas superiores se ha observado que ciertas isoformas de Pkc responden a peróxido de hidrógeno activando dominios reguladores (C1A y C1B) o inactivando dominios catalíticos (C3 y C4) de la proteína en función de la concentración del agente oxidante (Gopalakrishna y Jaken, 2000). El estrés oxidativo ha sido asociado con enfermedades inflamatorias degenerativas y procesos cancerígenos (Lechner *et al*, 2001). Y cada vez son más estudios que demuestran la implicación de ciertas isoformas de Pkc en tales procesos (Shi *et al*, 2005; Eder *et al*, 2005). Las vías de transducción de señal están bastante conservadas en eucariotas. El hecho de que *S. cerevisiae* sea un organismo eucariota unicelular de genética conocida, de que las bases de datos moleculares actuales de *S. cerevisiae* sean quizás las más completas y de que su manipulación resulte más sencilla que la de otras células eucariotas superiores, hacen que este modelo celular resulte indicado en los estudios de las respuestas celulares frente a estrés oxidativo.
3. En *S. pombe* existe una única vía que transduce la señal detectada tras varios estímulos: térmico, osmótico, daño en DNA y estrés oxidativo. Dado que la vía de integridad celular en *S. cerevisiae* esta implicada en la señalización de más de un tipo de estrés (térmico, nutricional y osmótico) consideramos la posibilidad de su posible participación en la detección de estrés oxidativo. Además existe una conexión genética entre *SKN7* y *RHO1* (Alberts *et al*, 1998). *SKN7* es un factor transcripcional que responde a estrés oxidativo, térmico y osmótico (Brown *et al*, 1993; Brown *et al*, 1994).

Así los objetivos del trabajo han sido:

1. Estudiar la posible función de los diferentes elementos de la vía de integridad celular (Pkc1-MAP quinasa) en la respuesta celular frente a estrés oxidativo exógeno, concretamente el provocado por los agentes oxidantes: peróxido de hidrógeno y diamida. Parte de este objetivo es estudiar el mecanismo de acción de dichos agentes en la célula y las funciones celulares que son afectadas por cada uno de ellos.
2. Avanzar en el conocimiento de las dianas de acción de los agentes oxidantes sobre la célula y como consecuencia de ello elucidar los mecanismos moleculares y celulares que intervienen en la respuesta de supervivencia y adaptación al estrés oxidativo.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Microorganismos utilizados y disrupciones genéticas:

Las cepas utilizadas de *Saccharomyces cerevisiae* se encuentran descritas en la Tabla 1. Las disrupciones genéticas se realizaron por métodos estándares descritos por Ausubel *et al*, 1989, así, *MTL1*, *ROM2*, *WSC2*, *WSC3* y *PFY1* fueron disrupcionados mediante remplazamiento de la ORF por el casete *kanMX4* a través de técnicas de recombinación homóloga (Wach *et al*, 1997), a su vez el gen *WSC4* fue disrupcionado mediante remplazamiento de la ORF por el casete *natMX4* a través de técnicas de recombinación homóloga (Goldstein y McCusker, 1999). Los oligonucleótidos utilizados para estas disrupciones se muestran en la Tabla 2. El doble mutante *mid2wsc1* se construyeron mediante técnicas genéticas de cruzamiento y esporulación tal y como se describe en Kaiser *et al*, 1994.

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

Cepa	Genotipo	Fuente o referencia
AN3-5D	<i>MAT[?] ura3-52, trp1, leu2-3,113, sec1ts</i>	Obtenida de L. Castillo
AN1-7D	<i>MATα ura3-52, trp1, leu2-3,113, sec18-1ts</i>	Obtenida de L. Castillo
CML125	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1^r</i>	Obtenida de C. Casas
CML128	<i>MATa</i> as CML125	Gallego <i>et al</i> , 1997
CML399	<i>MATa slt2::URA3</i> as CML128	de la Torre <i>et al</i> , 2002
DL2357	<i>MATa mtl1::HIS4 mid2::URA3</i>	Obtenida de D. Levin
MML200	<i>MATα bck1::kanMx4</i> as CML128	de la Torre <i>et al</i> , 2002
MML304	<i>MATα pkc1::LEU2(pBCK1-20)</i> as CML128	de la Torre <i>et al</i> , 2002
MML344	<i>MATa pkc1::LEU2</i> as CML128	de la Torre <i>et al</i> , 2002
MML357	<i>MATa wsc1::kanMx4</i> as CML128	de la Torre <i>et al</i> , 2002
MML363	<i>MATα rom2::kanMx4</i> as CML125	Este trabajo
MML384	<i>MATa wsc2::natMx4</i> as CML128	Este trabajo
MML387	<i>MATa mid2::kanMx4</i> as CML128	de la Torre <i>et al</i> , 2002
MML392	<i>MATa wscs1::URA wsc2::natMx4</i> as CML128	Este trabajo
MML393	<i>MATa mid2::kanMx4 wsc1::URA</i> as CML128	Este trabajo
MML411	<i>MATa Galpkc1::kanMx4</i> as CML128	Este trabajo

MML429	<i>MATa wsc3::kanMx4</i> as CML128	Este trabajo
MML431	<i>MATa wsc4::natMx4</i> as CML128	Este trabajo
MML513	<i>MATa mtl1::kanMx4</i> as CML128	Este trabajo
MML550	<i>MATa GFPPkc1</i> as CML128	Este trabajo
X2180-1A	<i>MATa SUC2 gal2 CUP1 ma10</i>	ATCC 204504
MML689	<i>MATa pfy1::kanMx4</i> as CML128	Este trabajo

TABLA 2. Oligonucleótidos utilizados para la interrupción de genes.

Nombre	Secuencia
MMO117	actgctgacttaattgcacaattcatctcttttctgcggttcgtacgctgcaggtcgac
MMO118	attctaaagaaaataaggaaagtctatatacgttgctatctcatcgatgaattcgagctgg
MMO203	ttgaattcttttgaccaacagcattatagaagtgaatttcgtacgctgcaggtcgac
MMO204	gactttgatatgaatatgtagtggttatctaaacctagtcacgatgaattcgagctcg
MMO236	tgtccgatagttgttttttagcagaagacaataaacgtacgctgcaggtcgac
MMO237	agttgattaccattaatggtgagagtttatgaggtttt catcgatgaattcgagctcg
MMO239	aagaaaggctagatacctgaattacaaaacaaaaacgccgtacgctgcaggtcgac
MMO240	ggaatattattacgtataagagctgcagctttattcgtacgatgaattcgagctcg
MMO334	ttaacttactcccagttagatataataagtagttaaggctcagctgaagcttcgtacgc
MMO335	tttaagaagaaaagttatggcaaagctgctttcgtatgagcataggccactagtgat
MMO571	cccaactacgatcgaaattatgtcttgcaaggtatgtgcgtacgctgcaggtcgac
MMO572	ttagtattgaacaccaatcaagtagtcagtcgaattgctcgcacgatgaattcgagctcg

La proteína de fusión GFP-Pkc1 fue construida con un fragmento de 1-kb XhoI-KpnI a partir de pRS416-sGFP (Ferrigno *et al*, 1998) y fue clonado en el sitio SmaI del plásmido pFA6a que contenía el casete *kanMX4*. El plásmido resultante, pCYC86, fue proporcionado por el laboratorio del Dr. Martí Aldea. De este modo tras amplificar mediante PCR el módulo sGFP-*kanMX4* de la cepa pCYC86, se insertó este producto en el extremo 3' de la ORF de PKC1 antes del codon de "stop" para obtener la proteína de fusión Pkc1-GFP. Los oligonucleótidos diseñados fueron MMO218, 5'gcaagaagagtttagaggatttt-CTTTATGCCAGATGATTTGGATTTACCAGCTGAAGC-TTCGTACGC; MMO219, 5'CCGCTTAGATGTTTTATATAAAATTAATAAATC-ATGGCATGACCTTTTCTgcatagggcactagtgatc, las letras minúsculas representan las secuencias que usamos para amplificar el casete *kanMX4*, las letras mayúsculas representan las secuencias homologas del dominio C-terminal de *PKC1* que diseñamos para integrar la recombinación.

2. Plásmidos utilizados:

El plásmido pMM129 es un derivado del plásmido pCM265 en el que se ha clonado la ORF de *PKC1* en los sitios Not1-Pst1 bajo el control del promotor *tetO₇* y con el epítipo HA en fase en el extremo C-terminal. El plásmido pMM473 es un derivado del plásmido pCM265 en el que se ha clonado la ORF de *PFY1* en los sitios Pme1-Pst1 bajo el control del promotor *tetO₇* y con el epítipo HA en fase en el extremo C-terminal. El plásmido YEP352 (p*MPK1HA*) contiene el marco de lectura abierto de *Sl2* y está marcado con el epítipo HA en su región C-terminal (proporcionado por la Dra. María Molina). Todas las cepas usadas en este trabajo fueron transformadas con este plásmido, y la cantidad total de *Sl2* fue determinada usando el anticuerpo monoclonal anti-hemaglutinina, que fue establecido como control de carga. El plásmido p*BCK1-20* contiene el alelo constitutivamente activo *BCK1-20*, conteniendo el marcador TRP (proporcionado por el Dr. Joaquín Ariño). El plásmido pGalPkc1* contiene un alelo de *PKC1* constitutivamente activo bajo el promotor de galactosa en el plásmido YEplac112 (proporcionado por la Dra. María Molina).

3. Condiciones de cultivo y crecimiento de microorganismos:

Todos las células de levadura usadas en esta tesis doctoral crecieron en medio definido SD (0.67% de base nitrogenada de levadura, 2% de glucosa y los aminoácidos auxotróficos necesarios) o en medio definido SC (SD más drop-out) con los requerimientos auxotróficos necesarios. El sorbitol fue añadido al medio de cultivo a una concentración final de 0.8 M. La diamida (Sigma) fue preparada a las concentraciones finales indicados en los resultados de esta tesis doctoral en dimetil sulfoxido (DMSO). El peróxido de hidrógeno y el t-butil hidroperóxido (ambos de Sigma) fueron diluidos con agua Milli Q esteril.

4. Obtención de extractos de levaduras para inmunodetección (Western Blotting) y condiciones de uso para los anticuerpos utilizados:

Para obtener los extractos de levadura para inmunodetección por Western blot, se dejaron crecer los cultivos exponencialmente durante toda la noche, y las células se

recogieron por filtración en membranas de 0.22 μ M (Millipore), se lavaron con el mismo medio de cultivo en que crecieron a 4 °C y se transfirieron a tubos Eppendorf, para ser centrifugados durante 15 s a 12000 rpm. Los extractos de proteína total se prepararon como esta descrito en Gallego *et al*, 1997. Para calcular la concentración de proteína en los sobrenadantes se utilizó el ensayo de proteína Micro DC (Bio-Rad). Cantidades equivalentes de extractos de proteína total se corrieron en geles del 10% o del 7% de SDS-poliacrilamida. En función de los experimentos realizados en el apartado de los resultados se usaron diversos anticuerpos. Para la detección quimioluminiscente se utilizó usando el substrato Supersignal (Pierce) y un equipo de detección Lumi-Imager (Roche Moleculars Biochemicals).

En los anticuerpos anti-fosfo-p44/42 y anti-Swi6 se siguió el protocolo como esta descrito en M^a Angeles de la Torre-Ruiz *et al*, 2002.

El anticuerpo anti-carboxypeptidasa Y (CPY) (Molecular Probes) fue usado en una dilución 1:100 en buffer TBST (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.125 M de NaCl, 0.1% tween 20) en presencia de 5% de leche desnatada. Como anticuerpo secundario se usó anti-mouse a una dilución final de 1:10000 en buffer TBST conteniendo 0.25% de leche desnatada.

El anticuerpo anti-invertasa fue usado a una dilución 1:2000 en TBST. Como anticuerpo secundario se usó anti-rabbit a una dilución final 1:5000 en buffer TBST.

El anticuerpo anti-HA fue usado a una dilución 1:1000 en buffer TBST en presencia de 0.25% de leche desnatada. Como anticuerpo secundario se usó anti-mouse a una dilución final de 1:10000 en buffer TBST conteniendo 0.25% de leche desnatada.

5. Análisis de Northern blot:

La purificación de RNA, la electroforesis, el marcaje con digoxigenina, la hibridación y la detección de la señal se realizó como se describe en Gallego *et al*, 1997. La detección se realizó mediante el uso de un equipo de Lumi-Imager (Roche Moleculars Biochemicals). Las sondas de los genes *PST1*, *SLT2*, *RPS6a*, *RPS28a*, *RPL30* y *UI* se obtuvieron a partir de PCR de DNA genómico, usando oligonucleótidos

(Tabla 3) diseñados para amplificar fragmentos que cubrieran toda la ORF, sin tener en cuenta las secuencias adyacentes.

TABLA 3. Oligonucleótidos utilizados para la obtención de sondas de DNA.

Nombre	Secuencia
CMO265	ctaaggcgacgagttttc
CMO266	gatccaccggttctacc
MMO394	cacttatcgcttcaactgc
MMO395	ccagaactagaaactag
MMO575	ttcatgggattagcaagaagg
MMO576	ttaagccaaggtgtcaaga
MMO577	ccccagtcacttagccaag
MMO578	ctgcaaccttcaatctgcaa
MMO581	gcgtttgtggcgttatttt
MMO582	acagcaaacttgaccaac

6. Determinación de grupos sulfidrilos libres en células intactas mediante el uso de DTNB (Reactivo de Ellman):

Las células de levadura crecieron en medio SC a 25 °C (OD final de 0.6). La técnica se aplicó esencialmente como está descrita en De Nobel *et al*, 1990. Se tomaron alícuotas de 30 ml de cultivo para cada tratamiento que fueron posteriormente centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min y resuspendidas en 2 ml de buffer Tris-Hcl (10 mM, pH 7.4), para ser tratadas e incubadas a 4 °C durante 30 min en las siguientes condiciones:

1. Células control sin tratamiento.
2. Células tratadas con 20 mM de ditionitritol (DTT).
3. Células tratadas con 1 mM de peróxido de hidrógeno.
4. Células tratadas con 2 mM de peróxido de hidrógeno.
5. Células tratadas con 4 mM de diamida.

Después del tratamiento las células fueron lavadas tres veces con el buffer anterior. A continuación, las muestras fueron resuspendidas en 1 ml de buffer 50 mM de fosfato potásico, a pH 7.4, conteniendo 20 µM de 5,5'-ditiobis (ácido 2-nitrobenzoico)

(DTNB o reactivo de Ellman) y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, las células fueron centrifugadas a 10000 rpm durante 3 min, se recogió el sobrenadante y en él se determinó la cantidad de grupos sulfidrilos libres a partir de la medida de la absorbancia a 412 nm. El agente reductor DTT fue usado como control y la valoración de las muestras tratadas con dicho agente constituye el control de máxima concentración de sulfidrilos libres en proteínas de la cubierta externa de la levadura.

7. Digestión con la enzima zimoliasa:

Las células crecieron exponencialmente en medio SC a 25 °C y fueron tratadas con diamida 4 mM y con peróxido de hidrógeno 1 mM durante 30 y 60 min respectivamente. Como control se usaron células sin tratar. Después de los tratamientos, se tomaron 10 ml de cada cultivo y se centrifugaron a 2500 rpm durante 5 min. Los “pellets” resultantes se lavaron primero con 10 ml de agua esteril Milli Q y después con 5 ml de Tris-HCl (50 mM, pH 9.4). Los pellets lavados se volvieron a resuspender en el mismo buffer. Se tomaron muestras de 1 ml de volumen de cada cultivo a los que se añadieron 0.2 o 0.5 unidades de zimoliasa según el experimento, tal y como se indica en el apartado de resultados. La lisis celular se cuantificó espectrofotométricamente a 600 nm.

8. Tinción de actina:

Las células crecieron exponencialmente a 25 °C y fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 10 min. Posteriormente se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min, y fueron fijadas toda la noche en buffer fosfato salino conteniendo formaldehído a una concentración final del 4%. A continuación las células fueron lavadas primero con buffer fosfato conteniendo etanolamina 10 mM, y seguido con el mismo buffer sin etanolamina. Para la tinción de actina se utilizó rodamina-faloidina (Sigma, solución stock: 6.6 µM en metanol) a una concentración final de 0.6 µM. Las células se mantuvieron durante un mínimo de 2 h en la oscuridad, tras lo cual fueron lavadas cinco veces con el buffer fosfato antes de ser resuspendidas en la solución de montaje. Todas las centrifugaciones se realizaron a 3000 rpm para no distorsionar la organización del citoesqueleto de actina.

9. Microscopía electrónica:

Las células crecieron en fase logarítmica y fueron tratadas con diamida 1 mM durante 9 h y con peróxido de hidrógeno 3 mM durante 10 h, como control se utilizaron células a las que no se les habrá sometido a tratamiento oxidante. Las células fueron fijadas con 2.5% de glutaraldehído durante 1 h en un buffer fosfato 0.1 M a pH 7.4, a 4 °C. A continuación fueron lavadas tres veces con el mismo buffer anterior y se les hizo una segunda fijación en agua con el 1% de tetraóxido de osmio durante 2 h a 4 °C. Después de lavados los “pellets” fueron deshidratados con una serie de diluciones seriadas de acetona en un rango entre el 30 y el 100% de concentración seguido de un tratamiento con óxido de propileno. Seguidamente, las muestras fueron incubadas con una resina (resina epoxi Durcupan ACM, de Fluka) de la siguiente forma: óxido de propileno 3:1 durante 45 min, 1:1 durante 45 min y 1:3 durante 45 min antes de ser embebidas en la resina. Las secciones para las preparaciones de microscopía se cortaron y se trataron con citrato antes de visionarlas en un microscopio electrónico de transmisión Zeiss 910.

10. Ensayo de internalización del colorante Lucifer Yellow:

Las células crecieron exponencialmente en medio SD a 28 °C y fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 5 mM durante 1h. Después del tratamiento se tomaron 5 ml para cada ensayo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se concentraron en 1.5 ml, sobre ese volumen se incubaron con 0.2 mg de Lucifer Yellow (Molecular Probes) durante 2h a 28 °C, en ausencia de peróxido de hidrógeno. Después de la incubación las células se lavaron con medio de cultivo y se resuspendieron en buffer azida/succinato de acuerdo con el método de Belmont *et al*, 1999, y se observaron en el microscopio de fluorescencia.

11. Ensayo de internalización del colorante FM4-64:

Las células crecieron exponencialmente en medio SD a 28 °C y fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 5 mM durante 1h. Después del tratamiento se tomaron 5 ml para cada ensayo, se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 min y se concentraron en 1.5 ml y se incubaron con 60 µg de FM4-64 (Molecular Probes) durante 40 min a 28 °C, en

ausencia de peróxido de hidrógeno, pasado el tiempo de incubación, las células se lavaron dos veces con medio de cultivo y se resuspendieron en el mismo medio de cultivo para observarlas en el microscopio de fluorescencia (Vida y Emr, 1995).

12. Tinción de DAPI:

Las tinciones de DAPI se realizaron *in vivo* en células creciendo exponencialmente. Se añadió 1 μg de DAPI por cada ml de medio de cultivo durante 1 h, tras lo cual las células vivas se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia.

RESULTADOS

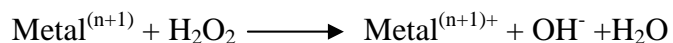
1. ESTUDIO DE LA RELACIÓN DE LA VÍA DE INTEGRIDAD CELULAR EN LA RESPUESTA ADAPTATIVA FRENTE AL ESTRÉS OXIDATIVO

1.1 El estrés oxidativo inducido por dos agentes oxidantes diferentes: diamida y peróxido de hidrógeno, induce la activación de la vía de integridad celular.

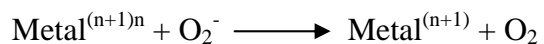
Dado que la vía de integridad celular o vía Pkc1-MAP quinasa está relacionada a distintos niveles con la respuesta celular frente a diversos estreses ambientales (térmico, osmótico y en general agentes que causan daño en la cubierta celular, páginas 34 a 39), nos preguntamos si también estaría implicada en la defensa celular frente a estrés oxidativo.

Para poder estudiar este hecho utilizamos dos agentes oxidantes en concentraciones subletales: diamida y peróxido de hidrógeno. La diamida ($C_6H_5N=NCOOCH_3$) es un tiol oxidante que reacciona con el glutatión oxidándolo a glutatión disulfato (Kosower *et al*, 1969), y bloquea la síntesis de proteínas en los reticulocitos de conejo (Zehavi-Willner *et al*, 1971). El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es generado por la destrucción del anion superóxido a través de la acción de la enzima superóxido dismutasa (Halliwell y Gutteridge, 1984). El peróxido de hidrógeno no es un radical libre porque no posee ningún electrón desapareado, pero puede atravesar la membrana y dar lugar al radical hidroxilo (HO^\cdot) a través de los siguientes mecanismos (Halliwell y Gutteridge, 1984):

1. Descomposición espontánea de H_2O_2 a HO^\cdot .
2. Por medio de la reacción de Fenton, en la cual, gracias a la presencia de un metal como el hierro o el cobre, se genera HO^\cdot a partir de H_2O_2 .



3. Mediante la reacción de Haber-Weiss, que tiene lugar entre las formas oxidadas de Fe^{3+} o Cu^{2+} y el anión superóxido (O_2^-), generando la forma reducida de los metales y estos vía la reacción de Fenton, generan el radical $\text{HO}\cdot$.



Las especies reactivas del oxígeno (ROS) que se forman a partir del peróxido de hidrógeno son tóxicas para la célula, y provocan defectos a distintos niveles, como por ejemplo: la oxidación de proteínas (Storz *et al*, 1987), la peroxidación de lípidos (Coyle y Puttfarcken., 1993) o el daño en el DNA generando roturas en la doble cadena y pérdida de bases nitrogenadas (Storz *et al*, 1987).

Se ha descrito que la señal de activación de la vía Pkc1-MAP quinasa se puede detectar mediante tres aproximaciones distintas:

1. A partir de la determinación de la actividad quinasa de la proteína Slt2, la cual puede ser medida a partir de inmunocomplejos usando como sustrato la proteína básica de mielina bovina (Kamada *et al*, 1995) o el sustrato propio *BCK1* en forma de péptido específico.

2. Mediante el uso del anticuerpo comercial p44/42 que reconoce la doble fosforilación de Slt2 en los residuos Thr^{202} y la de Tyr^{204} (de Nobel *et al*, 2000; Martin *et al*, 2000).

3. Otro método menos directo pero bastante simple, es usar plásmidos bacterianos que expresan *LacZ* bajo el control de promotores regulados por Rlm1, para examinar la respuesta transcripcional de genes individuales en respuesta a estreses de pared (Jung *et al*, 2002).

En este trabajo de tesis doctoral se ha utilizado para nuestros experimentos el anticuerpo comercial p44/42 (Cell Signaling Technology), como indicador de la activación de la quinasa Slt2 y por tanto de la vía de integridad celular (de Nobel *et al*, 2000; Martin *et al*, 2000).

Para determinar la posible activación de la vía de integridad celular tras tratamientos con peróxido de hidrógeno y diamida se recogieron muestras de cultivos creciendo en fase exponencial y se procesaron para Western blot. Las concentraciones elegidas de ambos agentes oxidantes eran subletales, es decir, no afectaban significativamente a la viabilidad celular durante el transcurso de los experimentos diseñados.

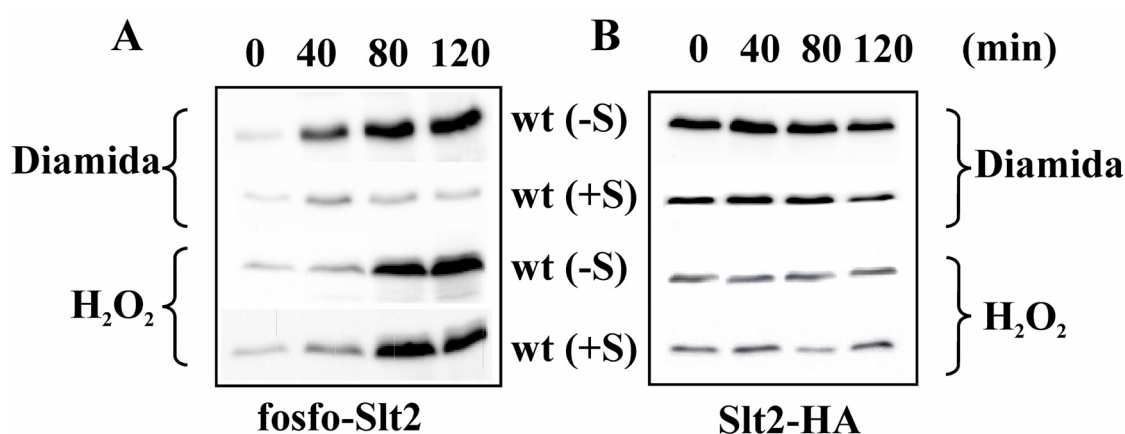


Figura 11. En todos los experimentos realizados en esta tesis doctoral las células proceden de cultivos en fase exponencial creciendo a 25 °C en medio SC con los requerimientos de aminoácidos necesarios. Cultivos de células silvestres tratadas con dos agentes oxidantes; diamida (4 mM) y peróxido de hidrógeno (1 mM). Las muestras fueron recolectadas a los tiempos que se indican en la figura y posteriormente procesadas para Western blot. El panel A corresponde a muestras tomadas de células silvestres. El panel B corresponde a muestras tomadas de células silvestres transformadas con el plásmido *pMPKIHA*. Ambas poblaciones fueron sometidas a tratamientos iguales. Las muestras del panel A se utilizaron para detectar la doble fosforilación de Slt2 con el anticuerpo policlonal p44/42 y las muestras del panel B se usaron como control de carga para detectar la proteína total de Slt2 utilizando el anticuerpo monoclonal HA. “S” se refiere al tratamiento con Sorbitol, a una concentración final de 0.8 M.

Previamente a la elección de las concentraciones elegidas en la Figura 11 testamos las siguientes concentraciones de los respectivos agentes oxidantes: para el peróxido de hidrógeno: 0.5, 1, 2, 2.5, 3 y 5 mM y para la diamida: 1, 2, 4, 6 y 8 mM. Finalmente seleccionamos las concentraciones indicadas en la leyenda de la Figura 11, ya que en el caso del peróxido de hidrógeno pudimos observar que durante las 3 primeras horas de tratamiento, a concentraciones iguales a 1 mM, detectábamos una fuerte inducción en la actividad de Slt2 (Figura 11. A), sin embargo a concentraciones

mayores de 2 mM y menores de 0.5 mM no observamos variación alguna en la activación de la quinasa durante los tiempos estudiados. De forma diferente, el tratamiento con la diamida resultó ser dosis-dependiente, este agente en todos los casos provocaba inducción de Slt2. Seleccionamos la concentración de 4 mM por ser la concentración subletal que inducía los máximos niveles de fosforilación de Slt2.

Como se puede observar en la Figura 11, tanto la diamida como el peróxido de hidrógeno son capaces de activar la vía de integridad celular. La adición de un estabilizador osmótico como el Sorbitol inhibe totalmente la activación de Slt2 dependiente del efecto provocado por la diamida. Este dato sugiere inicialmente que el efecto oxidativo que provoca este agente oxidante podría estar ejerciéndose mayoritariamente a nivel de la pared celular. A diferencia de la diamida, el peróxido de hidrógeno induce la activación de la vía de integridad celular independientemente de la presencia de un estabilizador osmótico, indicando que el efecto oxidante que produce este agente no es a nivel de la cubierta celular. Para poder confirmar este resultado utilizamos otro peróxido, el t-butil hidroperóxido, obteniendo un resultado muy similar al observado con el peróxido de hidrógeno (Figura 12).

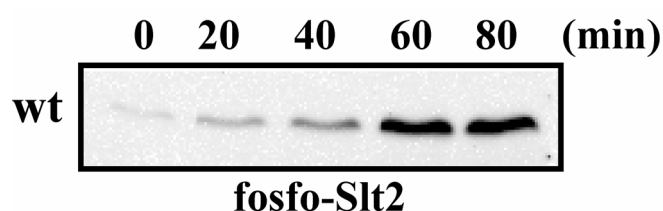


Figura 12. Las células silvestres crecieron logarítmicamente y fueron tratadas con t-butil hidroperóxido a los tiempos indicados en la figura, se recolectaron y se procesaron las muestras para Western blot. La doble fosforilación de Slt2 fue detectada con el anticuerpo p44/42

La activación de la vía de integridad celular y de la quinasa Slt2 se correlaciona con dos procesos distintos:

1. La fosforilación del factor transcripcional Swi6.
2. La activación de Rlm1, un factor transcripcional que regula una serie de genes que intervienen en la biogénesis y reparación de la pared celular.

Con objeto de averiguar si el incremento observado en la fosforilación de Slt2 en respuesta a estrés oxidativo se correlacionaba con un incremento en la actividad quinasa de Slt2 y por tanto, con la activación de la vía de transducción de señal, comprobamos el estado de fosforilación de Swi6 y los niveles transcripcionales de dos de los genes regulados por Slt2 (*SLT2* y *PST1*).

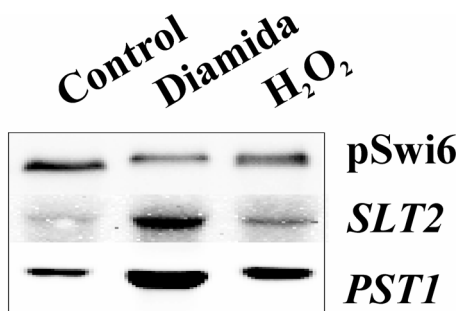


Figura 13. Las muestras fueron tomadas después de 30 minutos, para el Western blot de Swi6p se utilizó el anticuerpo policlonal anti-Swi6 y para las muestras de Northern se usaron las sondas para *SLT2* y *PST1*.

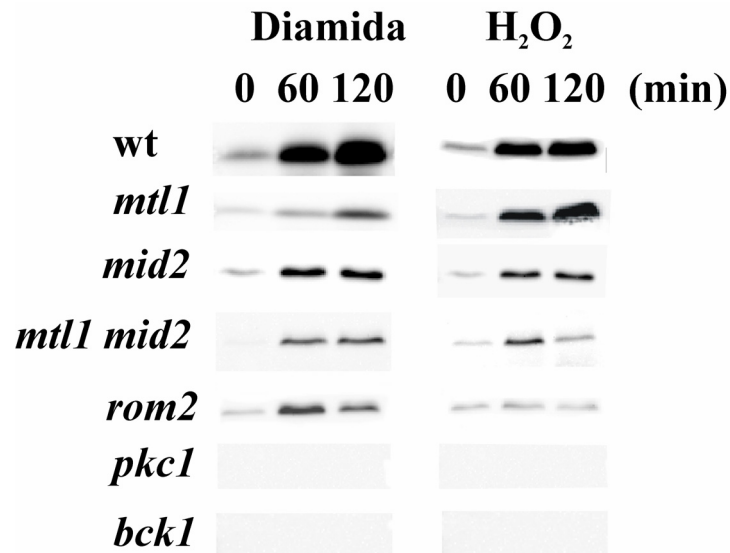
Así, tal y como se observa en la Figura 13 la proteína Swi6 experimenta un retardo en la movilidad electroforética tras el tratamiento con peróxido de hidrógeno o diamida, que se corresponde con una fosforilación. Además, los niveles transcripcionales de *SLT2* y de *PST1* (ambos genes son regulados transcripcionalmente por Rlm1) incrementan tras el tratamiento con ambos agentes oxidantes. Ambos fenómenos son indicadores de la activación de la quinasa Slt2 consecuencia del tratamiento con diamida y peróxido de hidrógeno.

1.2 Mtl1, Rom2, Pkc1 y algunos elementos de la parte superior de la vía de integridad celular, son necesarios para transmitir la señal a Slt2 en condiciones de estrés oxidativo.

Una vez demostrado que la vía de integridad celular era activada frente a un estrés oxidativo, nos planteamos la realización de un rastreo para determinar que elementos de la vía estaban implicados en la activación de Slt2.

Testamos diferentes mutantes de la vía de integridad celular: *rom2*, *pkc1*, *bck1*, *wsc1*, *wsc2*, *wsc3*, *wsc4*, *mid2*, *mtl1*, *mid2 mtl1*, *wsc1 wsc2*, *mid2 wsc1* para estudiar la activación de la vía Pkc1-MAP quinasa tras tratamientos con peróxido de hidrógeno y diamida mediante la fosforilación de Slt2, a su vez, para analizar si alguno de los receptores de la pared celular estaban relacionados con la detección y transmisión de la señal generada por un estrés oxidativo, y finalmente con el objeto de observar si otros genes de la vía Pkc1-MAP quinasa estaban implicados en dicha respuesta.

Para este estudio decidimos hacer un análisis cuantitativo de la activación de Slt2 a partir del siguiente criterio: calculamos el valor de la inducción relativa, como un ratio entre los niveles cuantificados de la fosforilación de Slt2 a los tiempos indicados de tratamiento, frente a los niveles medidos de Slt2 a tiempo 0 (células sin tratar, medidas con el anticuerpo anti-fosfo p44/42). Los valores obtenidos fueron normalizados con respecto a los valores correspondientes a la proteína total (medida con el anticuerpo anti-GST) como controles de carga de proteína. Así los valores numéricos obtenidos correspondían a los niveles relativos de Slt2 activado en las muestras tratadas con los agentes oxidantes en los tiempos de exposición, que se indica en la Figura 14.



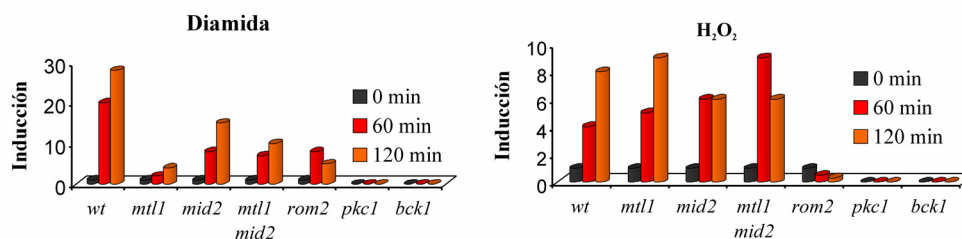


Figura 14. Las células crecieron exponencialmente y fueron tratadas con diamida 4 mM y con peróxido de hidrógeno 1mM, se tomaron las muestras para Western blot después de 1 y 2 horas de tratamiento. La doble fosforilación de Slt2 fue detectada con el anticuerpo p44/42. La inducción de Slt2 fue cuantificada y normalizada respecto al control de carga (la banda fue cuantificada con p44/42 contra la banda con el anticuerpo anti-HA).

Como se puede observar en la Figura 14 la inducción relativa de Slt2 fosforilada es parcialmente defectiva en el mutante *mid2* y prácticamente inexistente en el mutante *mtl1* cuando las células son tratadas con diamida. Ante la posibilidad de que los receptores Mtl1 y Mid2 fueran parcialmente redundantes en la detección del efecto oxidante de la diamida, construimos el doble mutante *mtl1 mid2* y observamos que la función de Mtl1 y Mid2 era independiente en cuanto a la detección del estrés oxidativo provocado por la diamida. Los otros mutantes de los receptores de la pared celular también fueron testados pero no observamos diferencias significativas con respecto a las células silvestres.

Sin embargo, observamos diferentes resultados tras tratamiento con peróxido de hidrógeno, ya que ninguno de los mutantes de los receptores de la pared celular mostraba una deficiencia significativa en la inducción relativa de la fosforilación de Slt2 con respecto a los niveles de las células silvestres. No obstante, se observa una pequeña disminución parcial en la fosforilación de Slt2 en el mutante *mid2* y en el doble mutante *mtl1 mid2* después de dos horas de tratamiento.

Podemos concluir que Mid2 y Mtl1 participan en la transmisión de la señal de estrés oxidativo generado por diamida. Por otra parte no parece que haya un receptor significativamente relacionado con la detección del estrés oxidativo generado por el peróxido de hidrógeno. Puesto que dicho agente puede penetrar dentro de la célula (Chance *et al*, 1979) es posible que el efecto oxidativo se lleve a cabo mayoritariamente a nivel intracelular.

Una vez demostrado que un estrés oxidativo activa Slt2 a partir de los receptores de la pared celular, quisimos analizar que otros elementos de la vía de integridad celular podían estar relacionados en dicha activación. El primer mutante analizado fue *rom2*. En la Figura 14 se observa una clara deficiencia en la activación de Slt2 en el mutante *rom2* con respecto a la cepa silvestre tras tratamiento con ambos agentes oxidantes. En los mutantes *pkc1* y *bck1* tras tratamiento con diamida o con peróxido de hidrógeno la activación de Slt2 esta totalmente eliminada (Figura 14). Este resultado demuestra que la transducción de la señal oxidativa ocurre por la vía tradicional, y confirma que Rom2, Pkc1 y Bck1, son elementos indispensables para dicho proceso.

1.3 Rom2 y Pkc1 son proteínas necesarias para la supervivencia tras un estrés oxidativo.

Con objeto de estudiar el significado biológico de la activación de la vía de integridad celular frente a un estrés oxidativo, realizamos un rastreo de los elementos de la vía que podían ser determinantes en esta respuesta, realizamos un estudio de viabilidad con los mutantes *rom2*, *pkc1*, *bck1* y *slt2*.

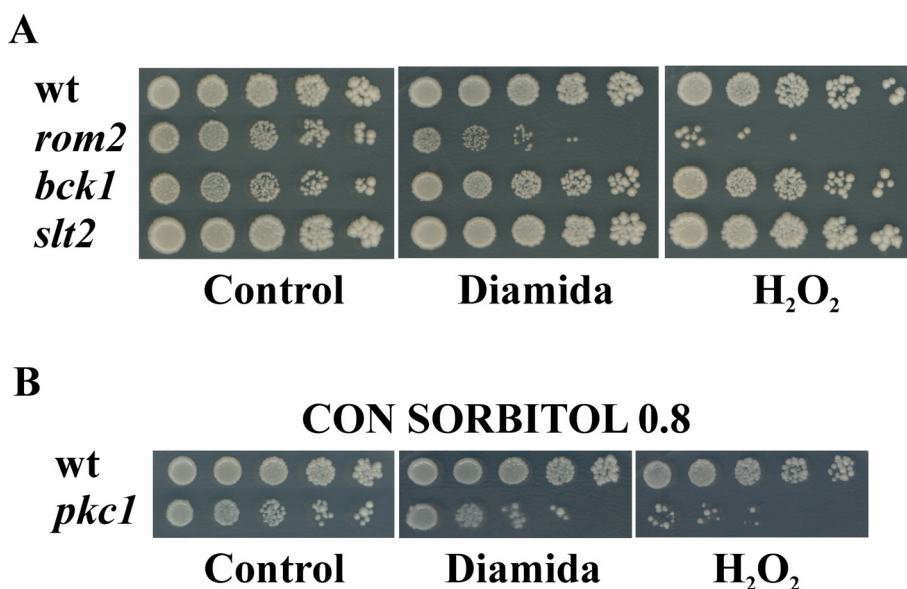


Figura 15. A. Muestras de células creciendo a 25 °C en fase exponencial, fueron recolectadas y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de SC con diamida 0.75 mM, peróxido de

hidrógeno 1 mM, o sin agente oxidante. Las placas fueron incubadas durante 4 días a 25°C antes de tomar las fotografías. B. El experimento se realizó como en el caso anterior pero añadiendo al medio de cultivo sorbitol 0.8 M como estabilizante osmótico para evitar la lisis celular del mutante *pkc1*.

Los mutantes *rom2* y *pkc1* son significativamente sensibles a los tratamientos con peróxido de hidrógeno y con diamida Figura 15 (A y B), mientras que los mutantes *bck1* y *mpk1* no presentan ninguna deficiencia en el crecimiento comparándolo con las células silvestres. Aunque no se muestre en la figura 15 cabe señalar que obtuvimos los mismos resultados (cualitativamente) cuando testamos distintas concentraciones de los dos agentes: 0.5, 1, 1.5, 2 mM en el caso del peróxido de hidrógeno, y 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mM en el caso de la diamida. Es importante remarcar que la pérdida de viabilidad que experimenta el mutante *pkc1* por efecto del peróxido de hidrógeno no es rescatada por la presencia de sorbitol (Figura 15 B). Lo que sugiere que Pkc1 es esencial en respuesta al estrés oxidativo causado por dicho agente oxidante y que el efecto provocado por el peróxido de hidrógeno no se produce mayoritariamente a nivel de la pared celular.

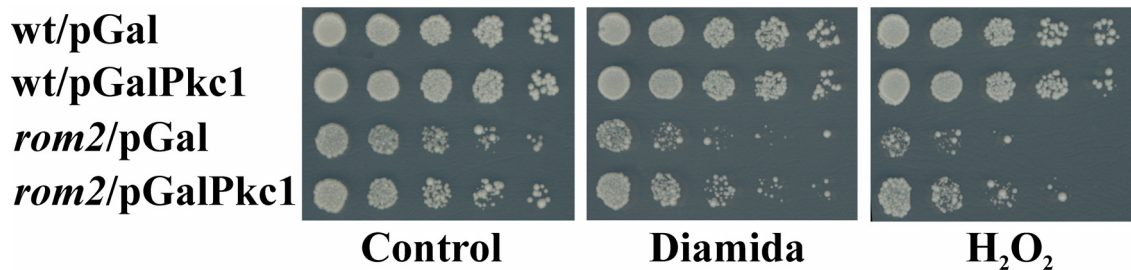


Figura 16. Células silvestres y el mutante *rom2* transformadas respectivamente con el plásmido GalPkc1 o con el plásmido vacío, crecieron hasta fase logarítmica en medio SC, tras lo cual fueron recolectadas y tras realizar diluciones seriadas se sembraron en placas de SC conteniendo los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno y diamida como se describió en la Figura 15.

Para continuar con los estudios sobre la viabilidad transformamos el mutante *rom2* con el plásmido GalPkc1* (plásmido que contiene la proteína Pkc1 bajo el control del promotor Gal1), y observamos que la sobreexpresión de Pkc1 compensaba la muerte celular causada por la ausencia de Rom2 en presencia de diamida y peróxido de hidrógeno (Figura 16). Este resultado nos muestra que la función esencial de la proteína Rom2 en la respuesta a estrés oxidativo es dependiente de la actividad de Pkc1.

En vista de estos resultados nos pareció interesante averiguar si la proteína Pkc1 tenía una importancia directa en la viabilidad frente a un estrés oxidativo. Para ello analizamos la sobreexpresión de Pkc1 bajo el promotor *tetO₇* (Belli *et al*, 1998), e hicimos un análisis de la viabilidad celular en presencia de diamida o peróxido de hidrógeno.

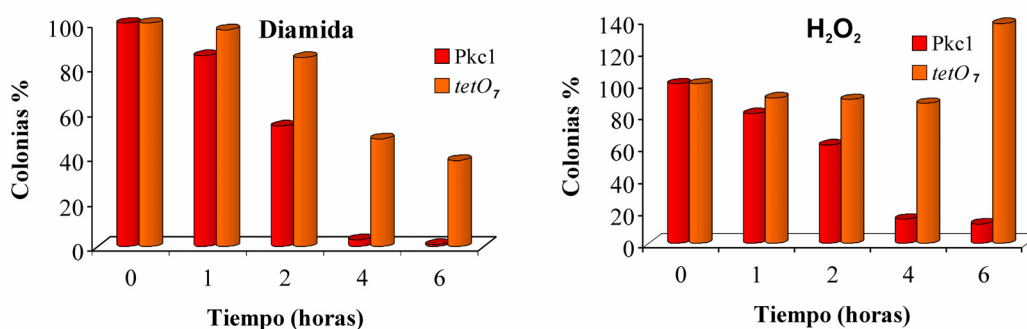


Figura 17. La cepa silvestre transformada con el plásmido centromérico pCM128 conteniendo el gen *PKC1* bajo el promotor inducible *tetO₇* y el epítipo HA construido en fase en el extremo N terminal, creció exponencialmente en medio SD para ser tratadas posteriormente con peróxido de hidrógeno 1 mM y diamida 0.75 mM durante los tiempos indicados. Se tomaron 500 células que fueron sembradas en placas de medio mínimo sin agentes oxidantes para realizar el recuento de células viables a los 3 días de cultivo.

La sobreexpresión de Pkc1 claramente provoca un marcado incremento en la viabilidad celular de las células silvestres al ser expuestas a ambos agentes oxidantes (Figura 17). Sin embargo la sobreexpresión de Pkc1 es significativamente más eficiente en el rescate de la viabilidad celular tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno. Estos resultados fueron de gran interés ya que conferían a la proteína Pkc1 un papel esencial como antioxidante en la respuesta celular frente a un estrés oxidativo.

1.4 El módulo MAP quinasa aguas abajo de Pkc1 no es necesario para la viabilidad celular frente a un estrés oxidativo.

De modo contrario a lo observado con los elementos de la vía anteriormente descritos, Bck1 y Slr2 no resultaron ser necesarios para la viabilidad celular en respuesta a un estrés oxidativo (Figura 15 A). Seguidamente sobreexpresamos Slr2 y el alelo constitutivamente activo *BCK1-20* en los mutantes *pkc1* y *rom2* y observamos que

dicha sobreexpresión no era capaz de rescatar significativamente la letalidad asociada a un estrés oxidativo (datos no mostrados). Este resultado refuerza el modelo sugerido en que la función de Pkc1 juega un papel esencial en la respuesta celular inducida por un estrés oxidativo, independientemente del módulo MAP quinasa.

En este punto decidimos investigar si la señal de oxidación puede inducir la vía activando algunos elementos del módulo MAP quinasa aguas abajo de Pkc1, con independencia de la actividad de los elementos aguas arriba de Pkc1. Para ello transformamos la cepa GalPkc1 con un plásmido en el cual estaba clonado el alelo *BCK1-20* constitutivamente activo. En la cepa GalPkc1 (MML411) el promotor endógeno Pkc1 fue sustituido por el promotor Gal, regulable por galactosa y glucosa. De este modo en presencia de glucosa la expresión de Pkc1 estaba reprimida y la cepa se comportaba como un mutante *pkc1*. La presencia de *BCK1-20* previene la letalidad celular en ausencia de la función de Pkc1 en condiciones no estabilizadas osmóticamente (Lee y Levin, 1992).

El motivo por el cual decidimos no trabajar con un mutante nulo *pkc1* fue el de evitar la aparición de supresores intragénicos, hecho que hemos observado que ocurre con baja frecuencia en los mutantes nulos *pkc1* construidos en el fondo genético utilizado en este trabajo y constatado en otros fondos genéticos como el W303.

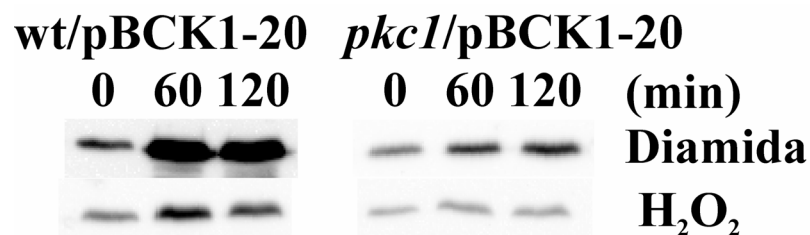


Figura 18. Tanto la cepa silvestre como la cepa GalPkc1 (MML411) ambas conteniendo el plásmido *BCK1-20*, fueron tratadas con diamida 4 mM y con peróxido de hidrógeno 1 mM. A los tiempos indicados se recolectaron muestras y se procesaron para análisis de Western blot.

En la Figura 18 podemos observar que en respuesta a ambos agentes oxidantes la inducción relativa de Slt2 en las células silvestres transformadas con el alelo *BCK1-20*, se comportan de manera similar a las células silvestres que no contienen dicho alelo

(Figura 11), cabe destacar que la inducción basal de Slt2 es superior que en las células silvestres transformadas con el plásmido vacío, dicho aumento se debe a la presencia del alelo constitutivamente activo *BCK1-20* (M^a Angeles de la Torre-Ruiz, 2002). Por el contrario, en las células *pkc1/BCK1-20* que crecieron con glucosa, no se observa una activación significativa de Slt2 tras tratamiento con peróxido de hidrógeno o con diamida. Solo se observa una activación residual tras tratamiento con diamida, que puede ser explicado por el hecho de que el promotor GAL1 no sea reprimido totalmente en presencia de glucosa.

Estos resultados nos indicaron que la activación por un estrés oxidativo es totalmente dependiente de los componentes de la vía de integridad celular que están situados aguas arriba de Pkc1.

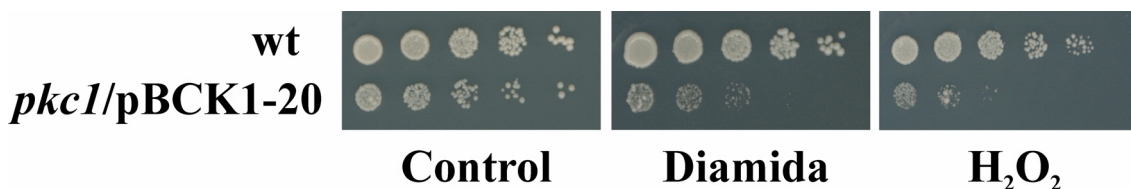


Figura 19: La cepa silvestre y el mutante *pkc1* fueron transformados el plásmido *BCK1-20* y tratadas con peróxido de hidrógeno 1 mM y con diamida 0.75 mM. Las células crecieron en medio mínimo sin estabilizador osmótico (sorbitol).

Como era esperado el alelo *BCK1-20* rescata parcialmente la letalidad celular del mutante *pkc1*, en células no tratadas y en ausencia de sorbitol, tal y como se muestra en la Figura 19. Sin embargo, dicho alelo es incapaz de suprimir la letalidad del mutante *pkc1* asociada al estrés oxidativo que provocan los agentes oxidantes peróxido de hidrógeno y diamida.

Este resultado nos indicó que la función Pkc1 era esencial para la viabilidad celular en respuesta a un estrés oxidativo independientemente de la activación del módulo MAP quinasa.

1.5 La diamida causa su efecto oxidante sobre las células de *Saccharomyces cerevisiae* mayoritariamente a nivel de la pared celular.

Al comienzo de este trabajo de tesis doctoral observamos que el tratamiento con sorbitol era capaz de eliminar casi totalmente la fosforilación de Slt2 en respuesta a la presencia de diamida. Este efecto, se había observado que era característico de ciertos mutantes de pared, en los cuales la presencia de sorbitol o cloruro de potasio en el medio de cultivo, atenuaba defectos fenotípicos y reducía la activación de la vía de integridad celular (Klis et al, 2002).

La diamida produce una oxidación en los grupos sulfidrilo libres de la pared celular que tiene como consecuencia la formación de puentes disulfuro (Kosower y Kosower, 1995). Un incremento en la cantidad de grupos sulfidrilo libres en la pared celular de la levadura causado por el agente reductor DTT (ditiotritiol) disminuye significativamente la resistencia a la digestión enzimática con zimoliasa (De Nobel *et al*, 1990). Estos autores observaron que la formación de puentes disulfuro en proteínas de la pared celular, reducía la porosidad celular y como consecuencia la accesibilidad del enzima zimoliasa hasta su sustrato (β -1,3 glucano). De este modo, De Nobel *et al*, (1990) propusieron que una medida de la porosidad de la pared celular podría ser la tasa de digestión causada por la zimoliasa.

Para evitar el efecto de un mecanismo compensatorio asociado a las proteínas de la vía Pkc1-MAP quinasa (Klis *et al*, 2002; Lagorce *et al*, 2003) usamos los mutantes *pkc1* y *slt2* para estudiar la resistencia de la pared celular a la digestión de la pared celular en dichos mutantes.

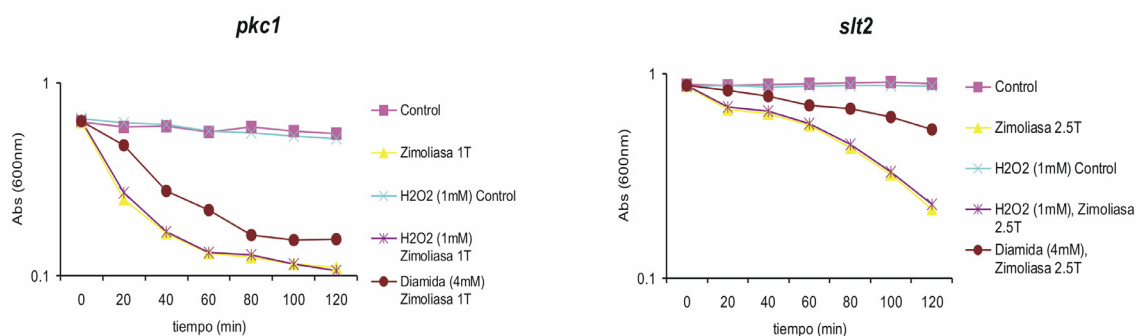


Figura 20. Los mutantes *pkc1* y *slt2* crecieron de forma exponencial en medio SC con los aminoácidos correspondientes a 25°C y ambos cultivos fueron tratados con diamida 4 mM durante 30 minutos o con peróxido de hidrógeno 1 mM durante 1 hora. Tomamos 10 ml de cultivo a una densidad óptica aproximada de 0.6, medida a una absorbancia de 600 nm. Posteriormente las células fueron sometidas a un primer lavado con agua Milli Q y un segundo lavado con el buffer 50 mM Tris-HCl a pH 9.4. Los pellets celulares fueron resuspendidos en 1 ml del mismo buffer y se añadieron 0.2 ó 0.5 unidades de zimoliasa respectivamente. La lisis celular se midió a una absorbancia de 600 nm en los periodos de tiempo indicados en los gráficos. El mutante *pkc1* creció en presencia de un estabilizador osmótico (sorbitol 0.8 M).

En la Figura 20 se observa que el tratamiento con peróxido de hidrógeno no causa diferencias significativas en la resistencia celular frente a la digestión por zimoliasa. Por el contrario el tratamiento con diamida si que provocaba un incremento significativo en la resistencia a la digestión por la zimoliasa en ambos mutantes, *pkc1* y *slt2*. Este resultado indicaba que la diamida produce modificaciones estructurales en la pared celular, hecho que no era observable con peróxido de hidrógeno. Este análisis mostraba una clara diferencia entre la diamida y el peróxido de hidrógeno, en cuanto al mecanismo de acción sobre la célula, la diamida afectaba a la pared celular, mientras que la diana del peróxido de hidrógeno aun estaba por elucidar.

Con objeto de determinar si el incremento en la resistencia a la zimoliasa de los mutantes *slt2* y *pkc1* sometidos al tratamiento con diamida, era debido a un incremento en la formación de puentes disulfuro en las proteínas integrantes de la pared celular, procedimos a la utilización de DTNB (reactivo de Ellman) para determinar el número de grupos sulfidrilos reducidos en la superficie de las células intactas (De Nobel *et al*, 1990).

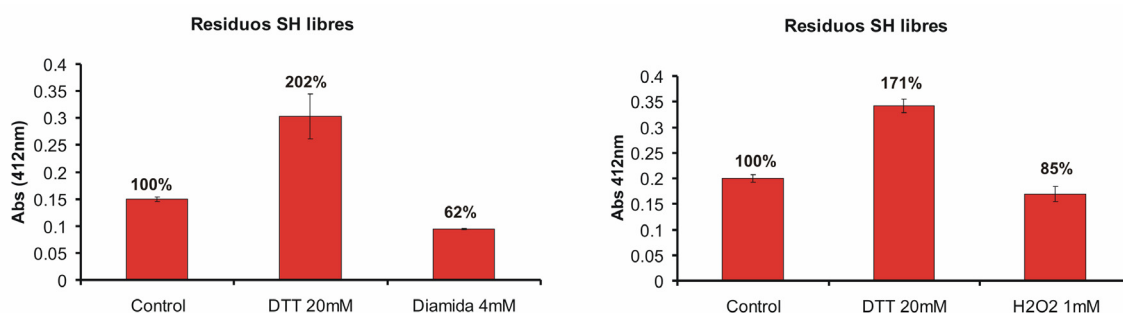


Figura 21. Cuantificación de los residuos libres con DTNB (reactivo de Ellman) mediante la valoración de la densidad óptica a una absorbancia de 412 nm en células control, células tratadas con DTT, diamida 4mM y con peróxido de hidrógeno 1 mM.

Para este experimento usamos el agente reductor DTT (ditiotritiol) como control para cuantificar la cantidad total de grupos sulfidrilo libres existentes en las proteínas de la superficie celular. Como se observa en la Figura 21 en los cultivos tratados con diamida tras 30 minutos hay una reducción significativa en el número de grupos sulfidrilo libres en comparación con los cultivos control (entre el 35 y el 40%, estos valores resultaron ser estadísticamente significativos, ver barras de error en la Figura 21). El valor que obtuvimos con la diamida fue similar al presentado por De Nobel *et al* (1990) tras tratar las células con el agente oxidante tetrionato de sodio. Sin embargo en el caso del peróxido de hidrógeno la disminución de grupos sulfidrilo libres fue del orden del 10 al 12%, este valor no era estadísticamente significativo. Concluimos que el peróxido de hidrógeno no provoca una oxidación significativa en los residuos cisteína de las proteínas de pared.

Estos resultados nos indicaron que la diamida afecta a la estructura de la pared celular induciendo la formación de puentes disulfuro en las proteínas y produciendo cambios en las propiedades estructurales de la superficie celular. Este efecto no es provocado por otros agentes oxidantes como puede ser el peróxido de hidrógeno (o al menos no es significativamente detectable por este ensayo en particular).

1.6 Un bloqueo en secreción inhibe la activación de Slt2 en un tratamiento con diamida.

Si el mayor efecto celular causado por la diamida sucedía en la envuelta celular y era una consecuencia de la oxidación de los residuos sulfidrilo libres. Cabría esperar que se obtendría una activación relativamente rápida de la vía de integridad celular, como suele ocurrir con las vías MAP quinasa. Por el contrario observamos que la diamida inducía un incremento gradual en la actividad de Slt2 (Figura 11), alcanzando niveles máximos tras una o dos horas de exposición al agente químico.

Una posible explicación a estos resultados podrían ser que proteínas de nueva síntesis (en proceso de remodelación de la envuelta celular) integrantes de la pared celular fueran susceptibles de ser modificadas u oxidadas por la diamida, así, este proceso podría ser la causa de la activación de la vía de integridad celular. Con la intención de poder entender este proceso diseñamos dos experimentos.

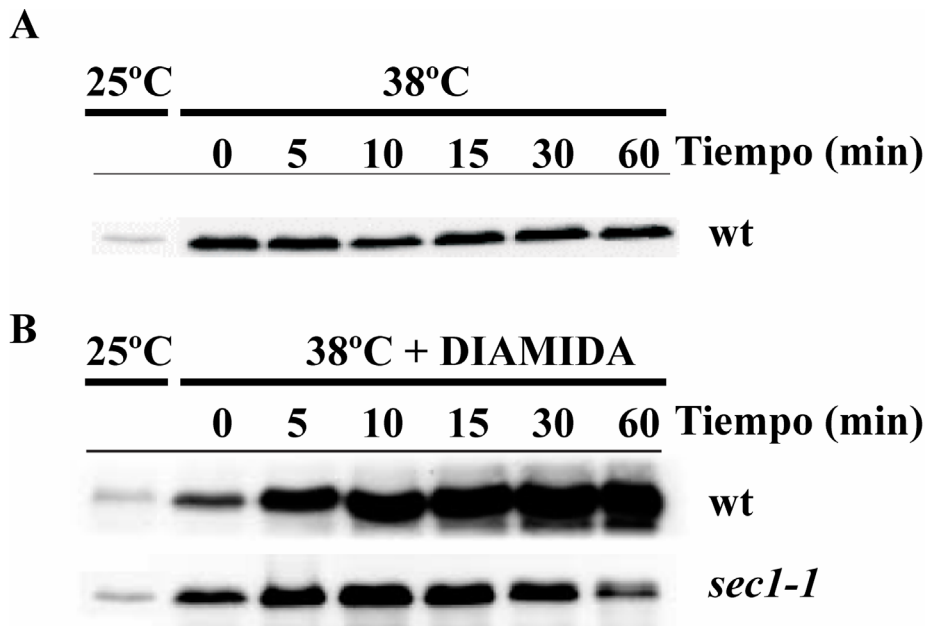


Figura 22. A. Las células silvestres crecieron exponencialmente a 25 °C en medio SC y se les aplicó un choque térmico a 38 °C durante 3 horas, pasado este tiempo se tomaron muestras a los tiempos indicados y se procesaron para Western blot. El anticuerpo p44/42 se utilizó para detectar la forma activada de Slt2. B. Las células silvestres y las del mutante *sec1-1* crecieron a 25 °C en fase logarítmica para ser sometidas a un choque térmico durante 3 horas, y fueron tratadas con diamida 4 mM. Las muestras fueron recolectadas en los tiempos indicados en la figura y procesadas para Western blot. Como en el caso de A.

En el primer experimento bloqueamos la secreción en los últimos estadios de la ruta secretora vesicular utilizando el mutante termosensible *sec1-1*. Células de *sec1-1* creciendo a 25 °C fueron incubadas durante 3 horas a 38 °C, tras lo cual la maquinaria de secreción queda completamente bloqueada. Bajo dichas circunstancias Slt2 se observó fosforilada por el efecto de la temperatura en las células silvestres y en el mutante *sec1-1* (Figura 22 A y B, tiempo 0). Seguidamente se trataron ambos cultivos con diamida y observamos un incremento rápido y transitorio (después de 10 minutos) en la fosforilación de Slt2 en el mutante *sec1-1* comparado con el incremento gradual de

la fosforilación de Slt2 causado por la diamida a tiempos más largos en las células silvestres (Figura 22 B, tiempos 30 y 60 minutos). Una posible interpretación a esta pronta y rápida fosforilación de Slt2 observada en el mutante *sec1-1* podía ser la modificación (oxidación) de proteínas preexistentes que son componentes de la superficie celular en un sistema donde la secreción está bloqueada. Según nuestros resultados, concluimos que el bloqueo en la secreción proteica inhibe la activación continuada de Slt2 por el efecto de la diamida, y ello puede indicar que las proteínas secretadas a la superficie son oxidadas y de este modo la activación continua de Slt2 podría reflejar una continua modificación de la pared resultado de la oxidación continuada de proteínas. Finalmente podemos concluir que la oxidación que provoca la diamida no afecta a la maquinaria de secreción.

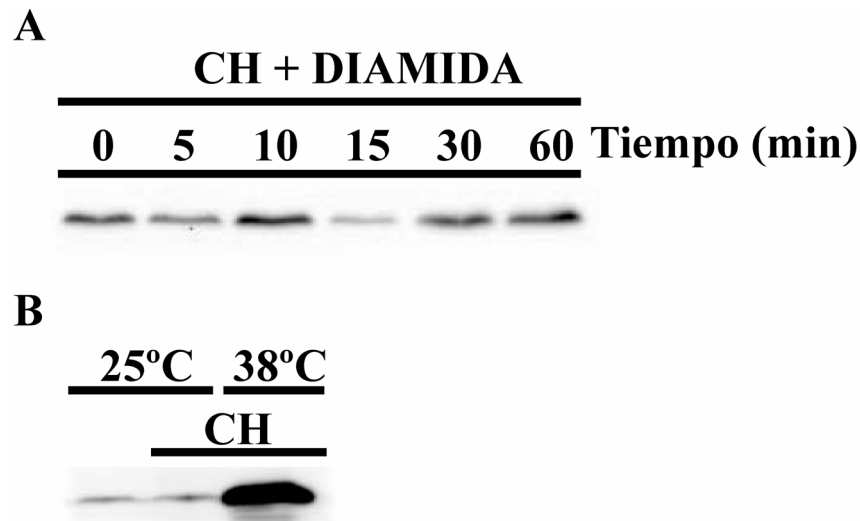


Figura 23. A. Los cultivos crecieron a 25 °C en presencia de cicloheximida durante 1 h y se trataron con diamida 4 mM a los tiempos indicados en la figura, recolectando las muestras para ser procesadas para Western blot. B. Los cultivos crecieron a 25°C con y sin cicloheximida se realizó un choque térmico a 38°C y las muestras fueron procesadas para Western blot.

En un experimento paralelo bloqueamos la síntesis proteica adicionando cicloheximida a las células silvestres, durante 1 hora. Posteriormente las células fueron tratadas con diamida durante 60 minutos como se observa en la Figura 23 A. Pudimos observar que en estas condiciones Slt2 no se activaba en respuesta al tratamiento con diamida. Quisimos comprobar si la falta de activación de la vía de integridad celular, observada en la Figura 23 A se debía al bloqueo en la síntesis de proteínas, para

comprobar este hecho provocamos un estrés térmico a las células tratadas con cicloheximida (Figura 23 B) comprobando que dicho estrés si que era capaz de inducir la activación de Slf2. Concluyendo con estos experimentos que la activación de la vía de integridad celular provocada por la diamida requería de la síntesis de nuevas proteínas.

1.7 La diamida induce la localización de Pkc1 en la periferia celular, la activación de la vía de integridad celular y el engrosamiento de la pared celular.

Andrews y Starck (2000) describieron que en cultivos de *Saccharomyces cerevisiae* creciendo exponencialmente la proteína Pkc1 se localiza en sitios de crecimiento polarizado, es decir, en la yema y en el septo. A su vez, estos autores observaron que cuando la pared celular sufre daños, Pkc1 se localiza en la periferia de la célula, próxima a la membrana celular.

Consideramos que el estudio de la localización de la proteína Pkc1 podría contribuir a una mejor comprensión de los efectos citológicos provocados por el estrés oxidativo. Por esta razón construimos una proteína de fusión entre Pkc1 y GFP (green fluorescence protein) en el dominio C terminal de Pkc1.

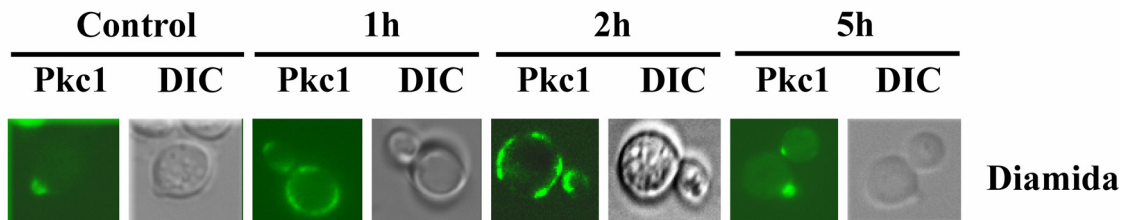


Figura 24. Localización subcelular de GFP Pkc1 en células creciendo en fase logarítmica a 25 °C tras tratamiento con diamida 4 mM.

Como se puede ver en la Figura 24 durante la primera hora de tratamiento con diamida, Pkc1 se deslocalizaba de los sitios de crecimiento polarizado y se translocaba a la periferia celular, durante este tiempo las células cesaban de crecer y dividirse (no mostrado). Después de 5 horas de tratamiento, Pkc1 se relocalizaba en el cuello de la célula. Esta relocalización se correlacionaba con la restauración del crecimiento celular.

La observación de la pared celular mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM) nos reveló que el tratamiento con diamida inducía un considerable incremento en el grosor de la pared celular. La interpretación de este resultado es que como la diamida altera la estructura de la pared celular, dicho efecto induce la activación de la vía de integridad celular y el mecanismo compensatorio, como consecuencia de ello, se activan genes de pared que inducen el incremento del grosor de la capa de glucano, este efecto lo podríamos considerar un efecto adaptativo mediante el cual la célula adquiere mayor resistencia al estrés oxidativo sobre la pared celular (Figura 25).

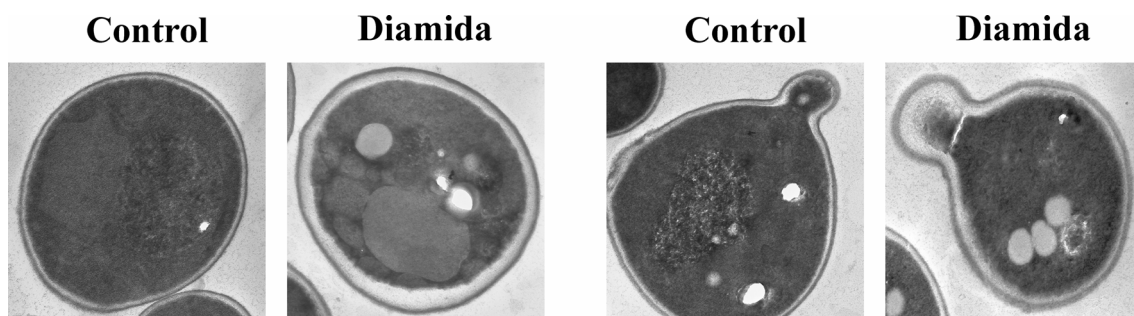


Figura 25. Las células crecieron exponencialmente en medio SD a 25°C en presencia o ausencia de diamida 1 mM durante 10 horas y fueron procesadas para microscopía electrónica. Las imágenes se aumentaron 20000 veces respecto a su tamaño real.

Estos resultados son consistentes con el modelo previo en el cual la diamida alteraba la pared celular, y Pkc1 rápidamente se localizaba en la periferia celular para reparar o ser la diana de reparación del daño oxidativo causado en la envuelta externa celular. Simultáneamente, y probablemente como resultado del mecanismo compensatorio, la actividad de Slt2 induce el incremento del grosor de la pared celular.

1.8 La diamida y el peróxido de hidrógeno activan la vía de integridad celular y provocan la despolarización transitoria del citoesqueleto.

Diferentes tipos de estrés generados sobre la célula, como son: el estrés térmico (Desvivieres *et al*, 1998; Lillie y Brown, 1994), el estrés osmótico (Chowdhury *et al*, 1992), o estreses sobre la pared celular (Delley y Hall, 1999; Torres *et al*, 2002), inducen la despolarización transitoria del citoesqueleto de actina. Por este motivo,

decidimos analizar si el estrés oxidativo también era capaz de alterar la organización del citoesqueleto de actina.

Observamos que tanto el peróxido de hidrógeno como la diamida eran capaces de inducir una despolarización transitoria del citoesqueleto de actina, seguido de una repolarización del mismo a las tres horas de tratamiento, con las concentraciones seleccionadas de ambos agentes. Este efecto observado era dosis dependiente, ya que si incrementábamos las concentraciones de ambos agentes oxidantes, observamos que la actina permanecía despolarizada durante periodos de tiempo más prolongados, hasta llegar a una situación de irreversibilidad y muerte celular.

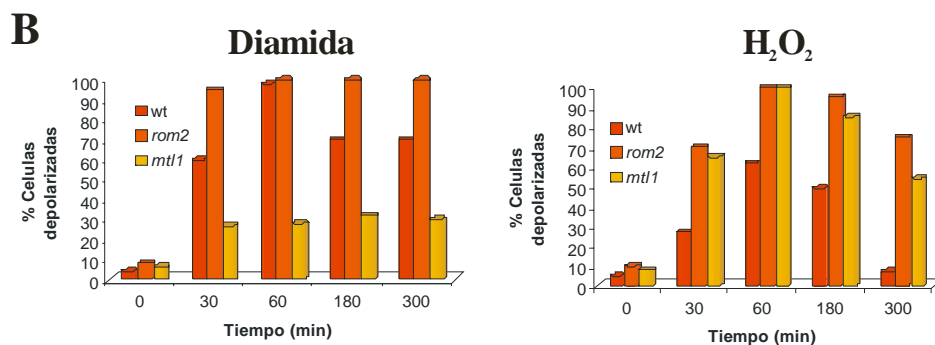
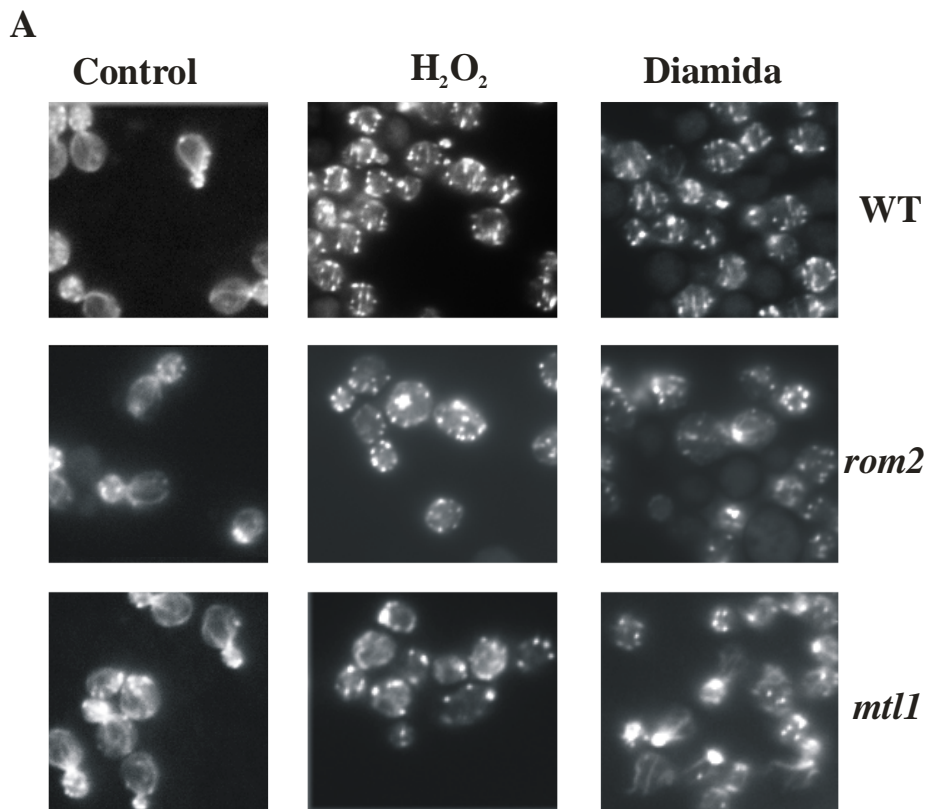


Figura 26 A. Cultivos de células silvestres y de los mutantes *rom2* y *mtl1* fueron crecidas hasta fase exponencial y posteriormente tratadas con peróxido de hidrógeno 1 mM o diamida 4 mM. A los tiempos indicados en el histograma (26 B) se recolectaron las células y se trataron para ser teñidas con rodamina-faloïdina (ver Material y Métodos). En la parte superior de la figura se muestran fotografías tomadas en el microscopio de fluorescencia donde se observa el citoesqueleto de actina. Corresponde a células no tratadas (control) y células tras 1 h de tratamiento. B. Los histogramas representan el porcentaje de células que presentaban el citoesqueleto de actina despolarizado. Se contaron más de 200 células por punto.

Seguidamente analizamos la organización del citoesqueleto de actina en los mutantes *rom2*, *mtl1* y *pkc1* (dato no mostrado por ser muy similar a los obtenidos con el mutante *rom2*). La razón de esta decisión estribaba en el hecho de que Pkc1 y Rom2 eran elementos necesarios para la supervivencia celular, en respuesta tanto a peróxido de hidrógeno como a diamida. Mtl1 era interesante desde el punto de vista biológico puesto que podría ser, al menos funcionalmente, una proteína sensora de estrés oxidativo, dado que en su ausencia, no se transmitía la señal de activación de Slf2 causada por el daño oxidativo (Figura 12). Es por ello que a partir de estas observaciones nos planteamos si dichas proteínas podían ser los elementos de la vía de integridad celular relacionados con la organización del citoesqueleto de actina en respuesta al estrés oxidativo.

Después de ambos tratamientos, observamos la desaparición de los cables de actina y la aparición por toda la célula de patches de actina, el nivel de polimerización inferior a la estructura de filamentos o cables de actina. Una excepción a esta observación fueron las células del mutante *mtl1* tratadas con diamida, en esta población la mayoría de los cables de actina escapaban a la despolarización después de un tratamiento con dicho agente oxidante.

Concluimos que la actina y por tanto la polaridad celular es una de las dianas de acción de los agentes oxidantes, peróxido de hidrógeno y diamida. Otra importante observación fue que Mtl1, Rom2 y Pkc1 son necesarios para que la repolarización ocurra en estas condiciones, ya que con la delección de estas proteínas, a diferencia de lo que ocurre con las células silvestres, a lo largo del tiempo la repolarización fue muy deficiente. Esto nos sugirió que las proteínas Mtl1, Rom2 y Pkc1 son indispensables

para la repolarización del citoesqueleto frente a un estrés oxidativo provocado por ambos agentes.

El resultado que obtuvimos con el mutante *mtl1*, apoya la posible función que podía tener este receptor como sensor de estrés oxidativo a nivel de la cubierta celular, puesto que su ausencia inhibe la activación de la vía Pkc1-MAP quinasa y además evita la transmisión del estímulo oxidativo al citoesqueleto. Para profundizar más en esta caracterización, realizamos análisis de resistencia al tratamiento con diamida en el mutante *mtl1* y en cepas *mtl1* transformadas con el alelo hiperactivo GalPkc1. El mutante *mtl1* resultó ser muy sensible al tratamiento con diamida y dicha sensibilidad se suprimía en condiciones de hiperactivación de Pkc1 (Figura 27). Estos resultados indican que Mtl1 señala hacia Pkc1 y que al menos parte del fenotipo de letalidad frente a la diamida observado en el mutante *mtl1*, se debían a la deficiencia en la activación de la vía de integridad celular.

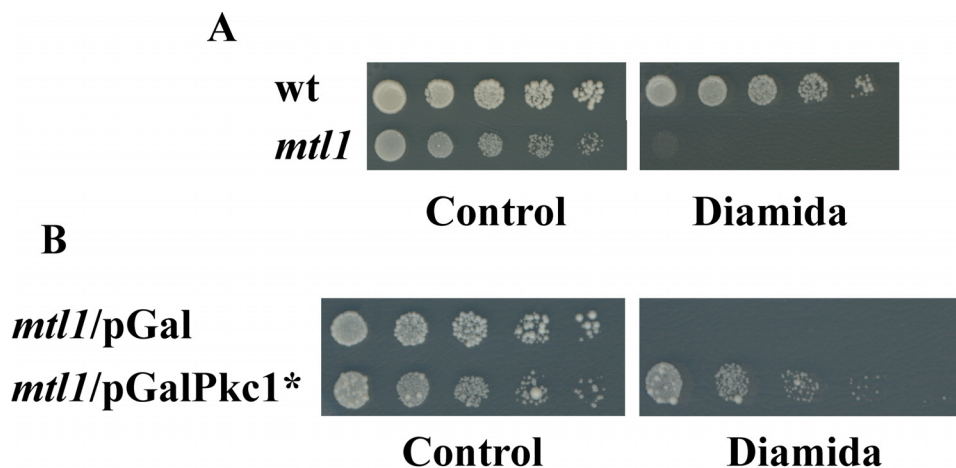


Figura 27. A. Células silvestres y *mtl1* creciendo exponencialmente en medio SC a 25°C, fueron sembradas en placas del mismo medio conteniendo o no diamida 0.75 mM y seguidamente incubadas a 25°C durante 3 días. B. supresión del defecto en supervivencia de *mtl1* por parte de Pkc1, pGalPkc1* es un plásmido en donde la expresión de Pkc1 está regulada por el promotor inducible Gal; el asterisco significa que Pkc1 está constitutivamente activo a causa de una mutación puntual en su secuencia de aminoácidos (Delley y Hall, 1999).

En resumen, teniendo en consideración los resultados anteriormente comentados, podemos concluir que el receptor Mtl1 funciona como receptor de superficie del estrés oxidativo, concretamente es el receptor encargado de detectar los

cambios estructurales en la envuelta celular provocados por la diamida, siendo a su vez el receptor encargado de transmitir la señal al interior de la célula a través de la de la vía Pkc1-MAP quinasa.

Como hemos observado con todos los resultados mostrados hasta el momento se puede concluir que la diamida ejerce un efecto oxidativo sobre las proteínas de la pared celular, incrementando la formación de puentes disulfuro, hecho que disminuye la porosidad y provoca cambios estructurales que son detectados por proteínas sensoras, entre ellas Mtl1, y señalizadas al núcleo a través de la vía de integridad celular o señalizadas hacia el citoesqueleto de actina vía la proteína Pkc1.

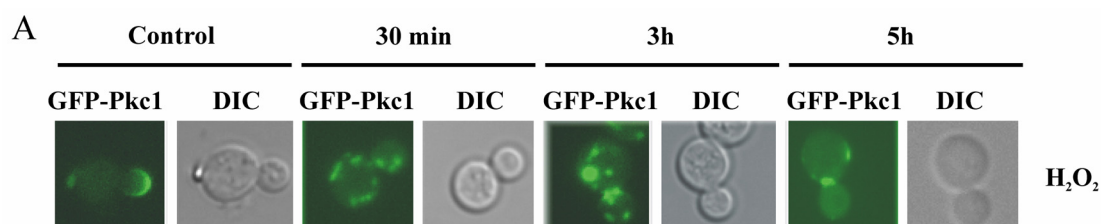
Seguidamente se exponen los resultados obtenidos del estudio realizado sobre el efecto celular que provocado por el peróxido de hidrógeno y su relación con la vía de integridad celular.

2. ESTUDIO DEL EFECTO DEL PERÓXIDO DE HIDRÓGENO SOBRE LA CÉLULA Y DE LA IMPLICACIÓN DE LA VÍA DE INTEGRIDAD CELULAR

2.1 El peróxido de hidrógeno afecta a la función celular que tiene relación con los últimos estadios de secreción.

Observamos que la proteína Pkc1, en respuesta al estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno, también (como en el caso de la diamida, Figura 24) perdía su localización polarizada (en yema y septo), pero a diferencia de lo sucedido con la diamida, Pkc1 no se translocaba a la periferia celular, si no que aparecía dispersa en forma de punteaduras por el citoplasma a partir de los 30 minutos de tratamiento hasta transcurridas 5 horas, a partir de ese momento se observa una relocalización de Pkc1 en zonas de crecimiento polarizado y en septo (Figura 28 A).

Respecto a la activación de Slt2 tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno a una concentración de 5 mM, durante las 5 primeras horas y coincidiendo con la deslocalización de Pkc1 (en punteaduras citoplasmáticas), Slt2 no experimentaba ningún incremento en su actividad quinasa respecto a la actividad basal. Curiosamente y coincidiendo con la relocalización de Pkc1, tras 5 horas de tratamiento con peróxido de hidrógeno, la actividad de Slt2 experimentó una fuerte inducción (Figura 28 B). Esta inducción no se debe a un aumento de la cantidad total de proteína si no a una mera activación. Esto nos sugiere que la localización de Pkc1 es determinante a la hora de activar Slt2 en respuesta a peróxido de hidrógeno.



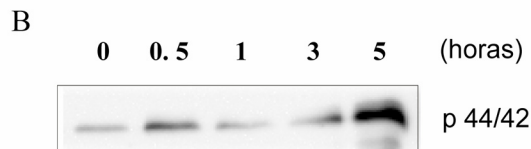


Figura 28. A. La cepa GFP-Pkc1 creció hasta fase exponencial para ser tratada con peróxido de hidrógeno 5 mM. Las células fueron observadas *in vivo* en el microscopio de fluorescencia para caracterizar la localización subcelular de Pkc1. Se muestran fotografías tomadas a los tiempos que se indica en la figura. B. Muestras procedentes del mismo experimento se recolectaron alícuotas para su procesamiento para Western blot a los tiempos indicados en la figura. La doble fosforilación de Slp2p fue detectada con el anticuerpo p44/42.

A partir de este resultado nos planteamos si estas punteaduras citoplasmáticas donde se encontraba localizado Pkc1 (Figura 28), podían ser vesículas endocíticas o vesículas secretoras. Para poder responder a esta pregunta realizamos un estudio de la internalización de los colorantes FM4-64 y Lucifer Yellow. Ambos colorantes son de uso habitual en los estudios de endocitosis en *S. cerevisiae*. La metodología que se siguió para las tinciones y las preparaciones para su posterior observación al microscopio de fluorescencia se realizaron para el FM4-64 según Vida y Emr, 1995 y para el Lucifer Yellow según Belmont *et al*, 1999.

En general los mutantes que presentan problemas en la función de la fase fluida de endocitosis presentan problemas en la internalización y acumulación del colorante Lucifer Yellow en la vacuola (Dulic *et al*, 1991).

LUCIFER YELLOW

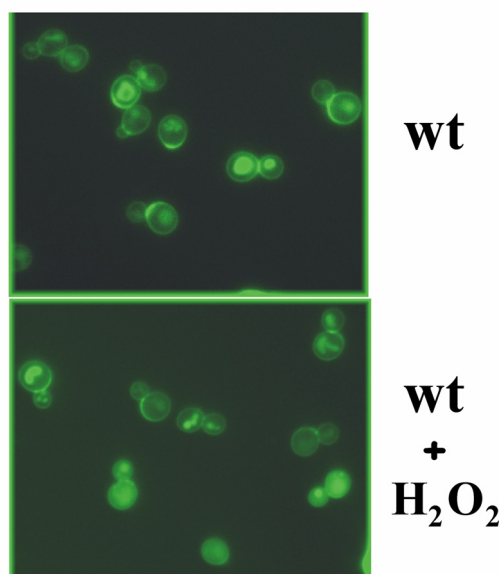


Figura 29. Las células silvestres crecieron exponencialmente en medio SD a 28 °C, al que se añadió peróxido de hidrógeno 5 mM durante 1 h. Tras lo cual se añadió al medio Lucifer Yellow (0.2 mg) y se trataron las muestras como se describe en material y métodos. Posteriormente se realizaron fotografías en el microscopio de fluorescencia para observar la internalización del colorante en muestras tratadas y no tratadas con peróxido de hidrógeno.

Como se puede observar en la Figura 29, el tratamiento con peróxido de hidrógeno no causaba defectos en la internalización del colorante Lucifer Yellow, dado que en la mayoría de las células se observa la acumulación de este colorante en la vacuola. Este resultado nos permitió concluir que dicho agente oxidante no parecía afectar a la función de la fase fluida de endocitosis.

Se ha descrito que para que se inicien los procesos endocíticos se necesita un citoesqueleto en polimerización activa. Con objeto de determinar si podríamos descartar un defecto general en endocitosis causado por peróxido de hidrógeno, realizamos el siguiente experimento. Cultivos exponenciales de células silvestres fueron tratados con latrunculina A (la latrunculina A es una droga que impide la polimerización del citoesqueleto de actina). Tras una hora de tratamiento, el citoesqueleto de actina estaba totalmente despolimerizado (observación realizada tras fijar, tratar y teñir las células con rodamina-faloidina, dato no mostrado). En ese momento añadimos peróxido de hidrógeno 5 mM y observamos que Pkc1 se deslocalizaba en las punteaduras citoplasmáticas como se muestra en la Figura 31. Puesto que para que los procesos de endocitosis tengan lugar es necesario un citoesqueleto en polimerización activa, concluimos que la endocitosis no es un proceso celular que se vea visiblemente afectado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno.

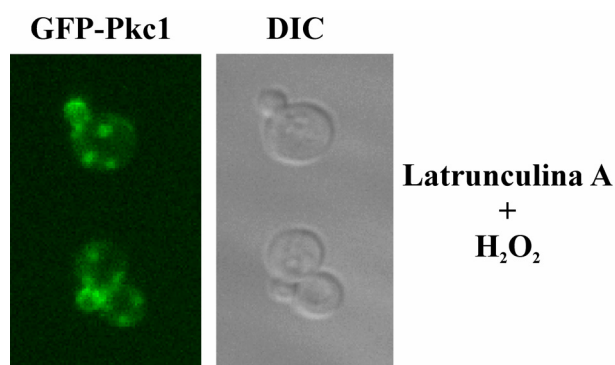


Figura 31. Los cultivos de células silvestres crecieron exponencialmente y fueron tratados con 100 mM de Latrunculina A durante 1 hora. A continuación las células se trataron con peróxido de hidrógeno 5 mM durante 30 minutos para la posterior observación de GFP-Pkc1 en el microscopio de fluorescencia.

El colorante FM4-64 es un colorante lipofílico que se fija y tiñe la membrana de la vacuola, para ver su morfología y dinámica (Vida y Erm, 1995). El tratamiento con peróxido de hidrógeno bloquea casi totalmente la internalización del colorante FM4-64 (Figura 30). Dado que fenotipos de captura similares a este, solo se han descrito en los mutantes *sec1-1*, nos planteamos la hipótesis que el peróxido de hidrógeno afectase a la función secretora. Además se ha descrito que en general los mutantes en endocitosis no presentan problemas en la internalización del colorante FM4-64 y si en el transporte a la vacuola. Este hecho refuerza la anterior hipótesis.

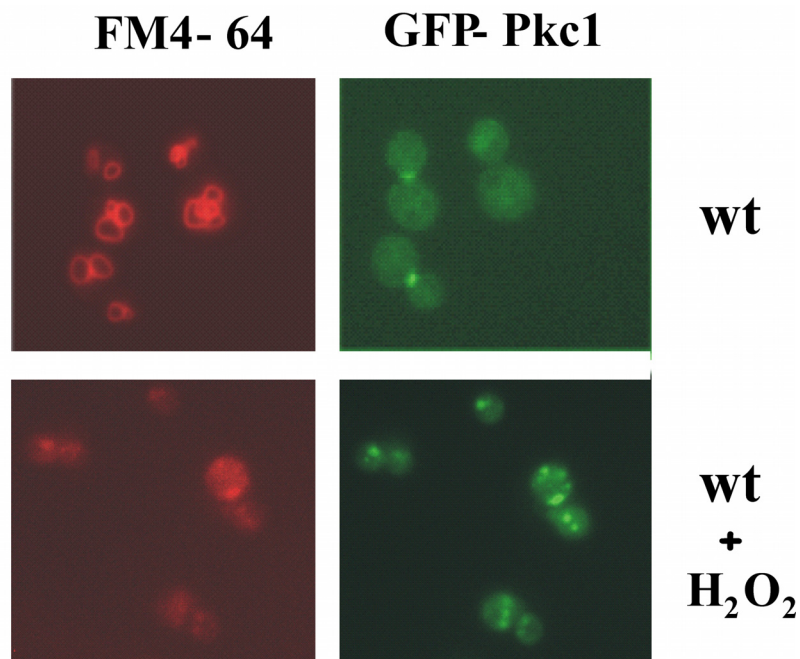


Figura 30. Las células silvestres crecieron exponencialmente en medio SD a 28 °C, y fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 5 mM durante 1 h. Se siguió el método descrito por Vida y Erm, (1995), y se observaron al microscopio de fluorescencia.

Así pues, una posible explicación a la deslocalización de Pkc1 en el citoplasma, es que podría deberse a un problema en secreción. Para confirmar nuestra hipótesis construimos una proteína de fusión genómica GFP-Pkc1 en los mutantes termosensibles

sec1-1 y *sec18-1*. La mutación *sec18-1* bloquea la transición entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi, mientras que el mutante *sec1-1* bloquea la secreción en los últimos estadios de secreción.

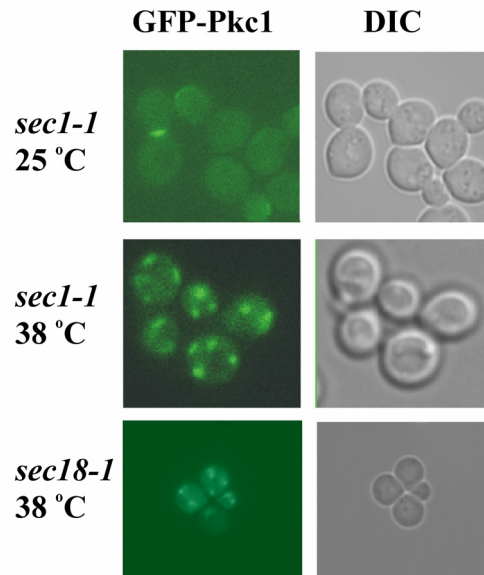


Figura 32. Los mutantes *sec1-1* y *sec18-1* crecieron a 25 °C en fase exponencial y posteriormente crecieron a 38 °C durante 3 horas, tras lo que se procedió a la observación de la proteína de fusión GFP-Pkc1 con el microscopio de fluorescencia.

Podemos observar en la Figura 32 que tanto en el mutante *sec1-1* como en el mutante *sec18-1* tras 2 horas a 38 °C, Pkc1 queda localizada en punteaduras. Este patrón de localización es muy similar al observado en una cepa silvestre tratada con peróxido de hidrógeno (Figura 28), por lo tanto este dato sugiere que el bloqueo en secreción interfiere con la localización de Pkc1, y además indica que la proteína Pkc1 es secretada a la membrana y zonas de crecimiento polarizado por la vía de secreción vesicular mediada por las proteínas Sec. Es importante destacar con este resultado, que un bloqueo en secreción tanto en los primeros estadios como en los últimos estadios, provoca la deslocalización de la proteína Pkc1 dispersa en el citoplasma.

A partir de aquí nos planteamos si el problema que provocaba el peróxido de hidrógeno en la vía secretora sucedía en los primeros estadios de secreción, o por el contrario, era en los últimos estadios de secreción. Para poder realizar este análisis utilizamos los dos mutantes anteriores:

1. Para estudiar a que nivel ocurría el bloqueo en la vía secretora tras tratamiento con peróxido de hidrógeno, utilizamos el mutante termosensible *sec18-1*, que bloquea la vía secretora a un nivel de transición entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y analizamos el transporte de carboxipeptidasa Y (CPY) a la vacuola.
2. Para analizar los últimos estadios de secreción, utilizamos el mutante *sec1-1* y analizamos el transporte y acumulación de la invertasa.

La carboxipeptidasa Y es una glicoproteína con cuatro cadenas de unión N-glicosilo. Análisis en los mutantes *sec1*, *sec7* y *sec18* indicaron que era transportada del retículo endoplasmático al aparato de Golgi y de allí era transportada a la vacuola (Stevens *et al*, 1982). Se describió que un bloqueo en la N-glicosilación provocado por tunicamicina o una mutación en los cuatro sitios de unión a N-glicosilo de la CPY, provocaban que la proteasa no se localizase en la vacuola, sino en el aparato de Golgi (Winther *et al*, 1991). Además, bloqueando el transporte del retículo endoplasmático con el mutante *sec18* se observaron problemas en el transporte de CPY (Finger *et al*, 1993). La forma vacuolar de CPY es la forma madura (M) de mayor movilidad electroforética, también llamada forma procesada. La localización de CPY en el aparato de Golgi se evidencia mediante la determinación de la inmadura o no procesada (P2). Proteína de menor movilidad electroforética que la forma madura. Por este motivo sabiendo que CPY es una proteasa vacuolar se ha usado para estudiar la función de las vías secretoras en los primeros estadios de secreción.

Para poder analizar molecularmente si el peróxido de hidrógeno afectaba a un proceso celular relacionado con los primeros estadios de secreción, utilizamos el anticuerpo monoclonal anti-CPY, dicho anticuerpo detecta todas las formas procesadas y no procesadas de dicha enzima. En una célula silvestre en un Western blot se detecta la forma madura de la CPY, que se encuentra en la vacuola, sin embargo en un mutante *sec18-1* se observa menor cantidad de CPY madura y se detecta la forma inmadura (ya que tienen distinta movilidad electroforética). De este modo, si el peróxido de hidrógeno afectara a los primeros estadios de secreción detectaríamos alguna de las formas inmaduras o no procesadas de CPY, todas ellas de peso molecular superior a la forma madura, y por tanto con menor movilidad electroforética.

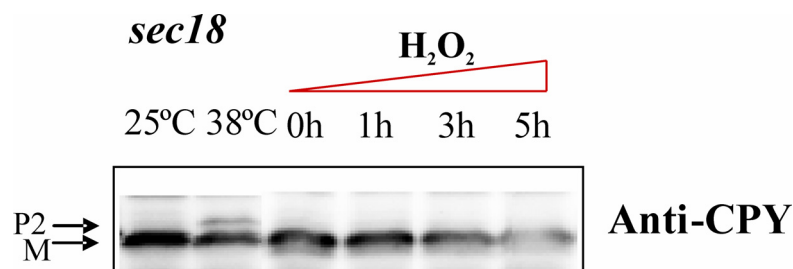


Figura 33. Identificación de las formas madura e inmadura de CPY mediante el anticuerpo monoclonal anti-CPY en el mutante termosensible *sec18-1*, en células no tratadas y tratadas con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno.

El mutante *sec18-1* a 25 °C se comporta como una célula silvestre, de este modo sólo se detectó por Western blot la forma madura vacuolar de CPY (Figura 33). Tras bloquear la secreción a 38 °C se pudieron observar las dos formas de CPY, la forma madura (M, 61 KDa) y la forma inmadura (P2, 70 KDa) localizada en el aparato de Golgi, lo que indicaba en este mutante que el tráfico a vacuola está al menos parcialmente bloqueado, como ya se ha descrito previamente en la página 79. El tratamiento con peróxido de hidrógeno a 25 °C no indujo la aparición de formas no procesadas o inmaduras de CPY. Tras diferentes tiempos de tratamiento con el agente oxidante únicamente la forma madura era detectable (Figura 33). Estos resultados nos indujeron a concluir que el bloqueo en secreción causado por el peróxido de hidrógeno, no se producía en los primeros estadios de secreción mediados por Sec18 ni en el transporte de retículo a vacuola.

Para poder confirmar molecularmente que el peróxido de hidrógeno podría afectar a un proceso celular relacionado con los estadios tardíos de secreción, realizamos Western blot para poder detectar las formas glicosiladas del enzima invertasa. La invertasa o sacarasa es un enzima que cataliza la reacción de hidrólisis de los β -D-fructofuranosidos, en la que se obtiene siempre, como uno de los productos, la D-fructosa.

En *S. cerevisiae* existen dos formas diferentes de invertasa (Gascon y Ottolenghi, 1967): una forma de naturaleza glicoproteica, localizada en la pared celular, conocida como invertasa grande o pesada, y una forma libre de carbohidrato, situada

intracelularmente, a la que se le denomina invertasa pequeña o ligera. La síntesis de las dos formas de la enzima depende de un único gen estructural (*SUC2*) (Perlman y Halvorson, 1981), el cual se transcribe dando lugar a dos mRNAs que difieren parcialmente (Carlson y Botstein, 1982). La traducción de estos dos mensajeros da lugar a dos proteínas idénticas, excepto en su extremo N-terminal, en el cual una de ellas posee una secuencia señal hidrofóbica que le permite insertarse en las membranas del retículo endoplasmático y, después de glicosilarse, ser secretada al espacio periplasmático, constituyendo la forma pesada de la enzima (Perlman *et al*, 1982). La proteína que carece de la secuencia señal hidrófoba permanece no glicosilada en el interior de la célula, constituyendo la forma ligera de la invertasa. Mientras que la síntesis de esta última forma ocurre de manera constitutiva, la forma pesada sólo se sintetiza bajo condiciones de desrepresión catabólica, cuando la concentración de glucosa en el medio es suficientemente baja (Perlman *et al*, 1982).

Si la invertasa que no es secretada, se acumula intracelularmente en su forma no glicosilada, pero si la invertasa se secreta correctamente se glicosila y aparecen multitud de formas con diferentes grados de movilidad electroforética, correspondientes a las formas glicosiladas. Al disminuir notablemente la concentración de glucosa en el cultivo se detectan las formas glicosiladas por medio de Western blot (Figura 34 carril 1). Nuestra hipótesis de trabajo fue la siguiente: si el peróxido de hidrógeno afectara a los últimos estadios de secreción esperaríamos detectar un descenso en la acumulación de las formas hiperglicosiladas de la invertasa, tal y como observamos en un mutante *sec1-1* (Figura 34 carriles 2 y 3).

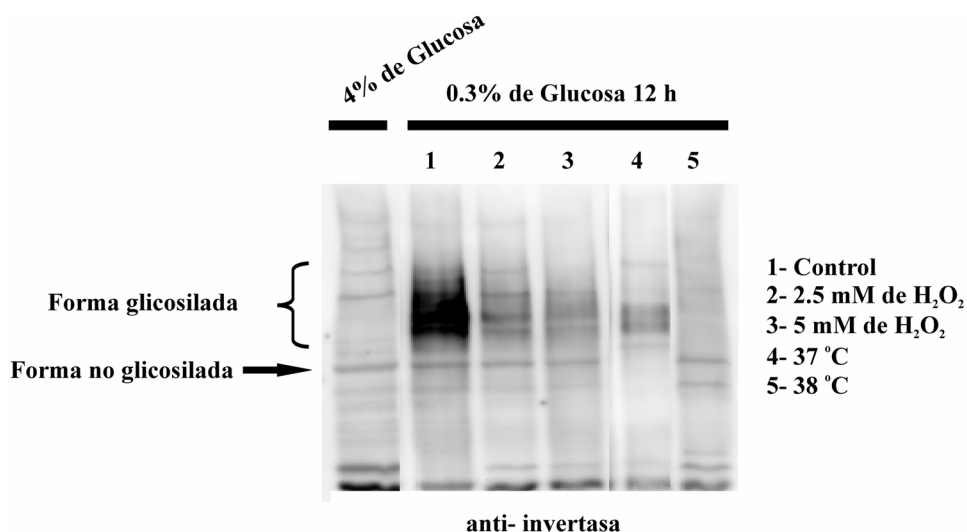


Figura 34. Identificación de las formas modificadas de la invertasa en el mutante termosensible *sec1-1*, en células no tratadas y tratadas con concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno. Para el western blot se utilizó el anticuerpo anti-invertasa.

Los resultados mostrados en la Figura 34 confirman la hipótesis, ya que concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno inducen un claro descenso en los niveles de invertasa glicosilada, de manera similar a lo que ocurre en un mutante *sec1-1* a 38 °C. A la vista de estos resultados concluimos que tanto el bloqueo en secreción como el tratamiento con peróxido de hidrógeno, inhiben la secreción de la enzima invertasa y su posterior modificación. Consecuentemente el peróxido de hidrógeno altera la función secretora en sus estadios finales.

Según estos resultados podemos concluir, que la primera función celular afectada por el peróxido de hidrógeno tiene relación con los últimos estadios de secreción y además como ya hemos observado en la Figura 26 este agente también induce despolarización del citoesqueleto de actina.

Se describió que uno de los mecanismos celulares de respuesta de las levaduras en función de sus necesidades fisiológicas, es la de modular la capacidad de síntesis proteica a través del control transcripcional de genes ribosomales. Además, la regulación de los ribosomas también esta sujeta a respuestas ambientales (Mizuta y Warner, 1994). Se ha descrito que cuando al inhibir la vía secretora con inhibidores de la misma (tunicamicina o BFA), se provocaba una disminución en la transcripción de genes ribosomales. Conociendo estos resultados nos planteamos la posibilidad de que el peróxido de hidrógeno también inhibiera la síntesis de genes ribosomales, ya que anteriormente hemos descrito que el efecto que provocaba el peróxido de hidrógeno sobre la célula, tenía relación con los últimos estadios de secreción. Además, Nierras y Warner (1999) habían observado que en células con problemas en la vía secretora, era necesaria la continua síntesis proteica y la proteína Pkc1 para poder reprimir la transcripción de genes ribosomales. En un trabajo posterior se formulaba la siguiente hipótesis: puesto que la inhibición de las vías secretoras provocaban un incremento en la presión de turgencia, ello daba lugar a un efecto de estrés en la pared celular que era detectado por los receptores de la vía Pkc1-MAP quinasa y transmitido a la proteína

Pkc1 (Li *et al*, 2000). Esta hipótesis permitía explicar la importancia de la función Pkc1 en la biogénesis de ribosomas.

Así pues, y con objeto de comprobar si la regulación transcripcional de genes ribosomales se veía afectada por el peróxido de hidrógeno, tratamos a las células silvestres y al mutante *pkc1* con peróxido de hidrógeno y recolectamos muestras a los tiempos indicados en la Figura 35, para ser procesadas con el fin de realizar análisis de Northern blot.

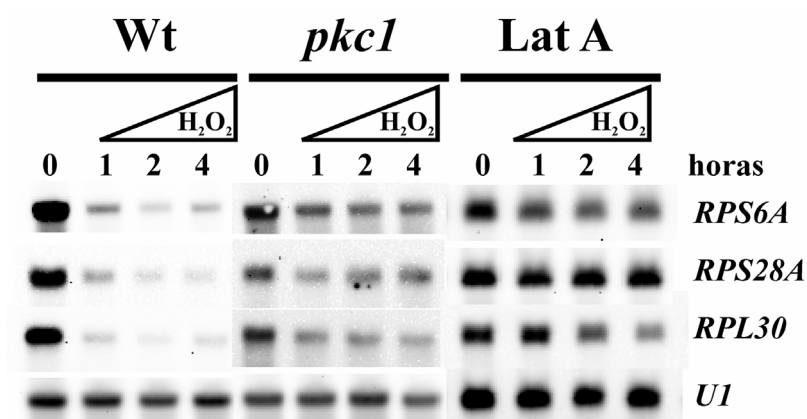


Figura 35. Los cultivos crecieron exponencialmente en medio SD con sorbitol con los aminoácidos correspondientes y se trataron con peróxido de hidrógeno 10 mM a los tiempo indicados. Se utilizaron las siguientes sondas para ver la expresión de genes ribosomales: (*RPS6A*, *RPS28A* y *RPL30*). La sonda *U1* se utilizó como control de carga. En el tercer panel de resultados se trataron células silvestres con 150 μ M de latrunculina A durante 2 h, previo al tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Observamos que el peróxido de hidrógeno inducía una clara represión de la expresión de diversos genes ribosomales. En el mutante *pkc1* sin embargo no se producía una clara y significativa represión transcripcional de los genes testados, únicamente un pequeño descenso en los niveles de mRNA. Para la realización de este experimento tuvimos que añadir sorbitol al medio de cultivo, de otro modo el mutante *pkc1* no hubiera crecido. Ello nos permitió elevar la concentración de peróxido de hidrógeno a 10 mM sin afectar visiblemente la viabilidad celular. Además observamos que el efecto en la represión transcripcional era dosis dependiente. De este modo pudimos concluir que el peróxido de hidrógeno induce un bloqueo en los últimos estadios de secreción y consecuentemente se provoca un descenso en la trascrición de genes ribosomales, este último proceso además, es totalmente dependiente de la función

de Pkc1 y de un citoesqueleto en polimerización activa. Así pues, una de las funciones de la proteína Pkc1 frente al estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno, sería la de regular la biogénesis de genes ribosomales en respuesta a un bloqueo en secreción.

2.2 La sobreexpresión de Pkc1 induce una rápida repolarización del citoesqueleto de actina, de manera específica al efecto provocado por el peróxido de hidrógeno sobre la organización del citoesqueleto.

A partir de los resultados obtenidos, observamos que Pkc1 era necesaria para la viabilidad celular, pero no era requerida su función para la despolarización del citoesqueleto de actina en respuesta al peróxido de hidrógeno. Sin embargo, Pkc1 resultó ser esencial para la repolarización del citoesqueleto tras tratamiento con peróxido de hidrógeno, ya que en el mutante *pkc1* la despolarización del citoesqueleto de actina por efecto de dicho agente oxidante, no era transitoria como en el caso de las células silvestres y a lo largo de todo el experimento, sin la función Pkc1, la actina permanecía despolarizada. Para comprobar si el papel protector de Pkc1 frente a estrés oxidativo mediado por peróxido de hidrógeno era directo, decidimos sobreexpresar la proteína Pkc1 bajo el promotor *tetO₇* (Belli *et al*, 1998) y comprobamos la expresión de la proteína por Western blot.

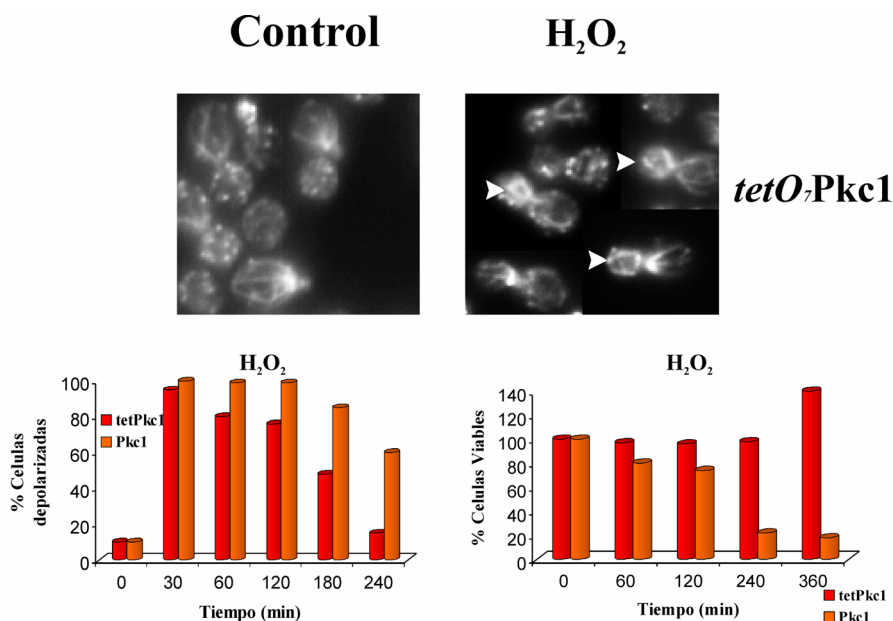


Figura 36. Se tomaron las muestras para la tinción de actina de células silvestres sobreexpresando Pkc1 bajo el promotor regulable por tetraciclina *tetO₇* después de 1 hora de tratamiento con peróxido de hidrógeno 1 mM. El primer histograma representa el tanto por ciento de células despolarizadas y el segundo el tanto por ciento de células viables.

Bajo condiciones de sobreexpresión de Pkc1, el peróxido de hidrógeno induce la despolarización del citoesqueleto durante la primera hora de tratamiento, pero la repolarización del citoesqueleto de actina es evidente a partir de la primera hora de tratamiento, cuando el porcentaje de células despolarizadas disminuye como consecuencia de la sobreproducción de Pkc1 en células silvestres (ver histograma de la Figura 36). Tras 4 horas de tratamiento, la repolarización del citoesqueleto de actina es prácticamente completa en la población de células que superexpresa Pkc1, en comparación con la población de células silvestres en donde únicamente el 30% de las células presentaban un citoesqueleto de actina repolarizado. Además, se observan cables de actina con una mayor intensidad de fluorescencia y la presencia de estructuras filamentosas, similares a cables, en las yemas. Este fenómeno se ha descrito en algunos estudios realizados en alelos hiperactivos de forminas (Evangelista *et al*, 2003). Así pues, este primer análisis sugería que Pkc1 podría activar la función de forminas o profilinas.

En conclusión a esta parte, una de las funciones de la proteína Pkc1 en la respuesta adaptativa al estrés oxidativo, podría consistir en activar proteínas relacionadas con la actina, bien forminas o profilinas, y de este modo inducir la repolarización del citoesqueleto y la formación de cables de actina. Como veremos en resultados posteriores esta hipótesis queda demostrada.

En la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se han descrito dos genes que codifican para dos forminas, *BNII* y *BNR1* (página 28), y se sabe que estas forminas están relacionadas con la vía de integridad celular, ambas interactúan con Rho1 (Imamura *et al*, 1997). La profilina Pfy1 es un regulador de la polimerización de la actina y su activación por parte de las forminas es necesaria para la formación de los cables de actina (Evangelista *et al*, 2002).

Por otro lado, hemos demostrado que Pkc1 actúa como proteína antioxidante, induciendo una mayor supervivencia celular, este efecto es común a ambos agentes oxidantes. Sin embargo, la restauración de la polaridad celular mediada por un citoesqueleto de actina organizado, solo ocurre en respuesta a peróxido de hidrógeno, lo que sugiere un mecanismo de daño oxidativo diferente, causado por cada uno de los agentes oxidantes en los diferentes compartimentos y estructuras celulares.

2.3 Efectos del peróxido de hidrógeno sobre la morfogénesis y estructura celular:

Hemos demostrado que el peróxido de hidrógeno afecta a la morfogénesis celular. La observación microscópica de las células tratadas con peróxido de hidrógeno durante toda la noche, reveló efectos interesantes sobre morfogénesis y estructura celular. Observamos un aumento en el tamaño de las células y algunas de ellas presentaban una morfología característica: la zona del septo aparecía ensanchada, además detectamos un porcentaje (20%) de células binucleadas. Tanto el fenotipo denominado de “células gigantes”, como la frecuencia de células binucleadas con núcleos 2N, han sido descritos en mutantes *pfy1* (Marcoux *et al*, 1998).

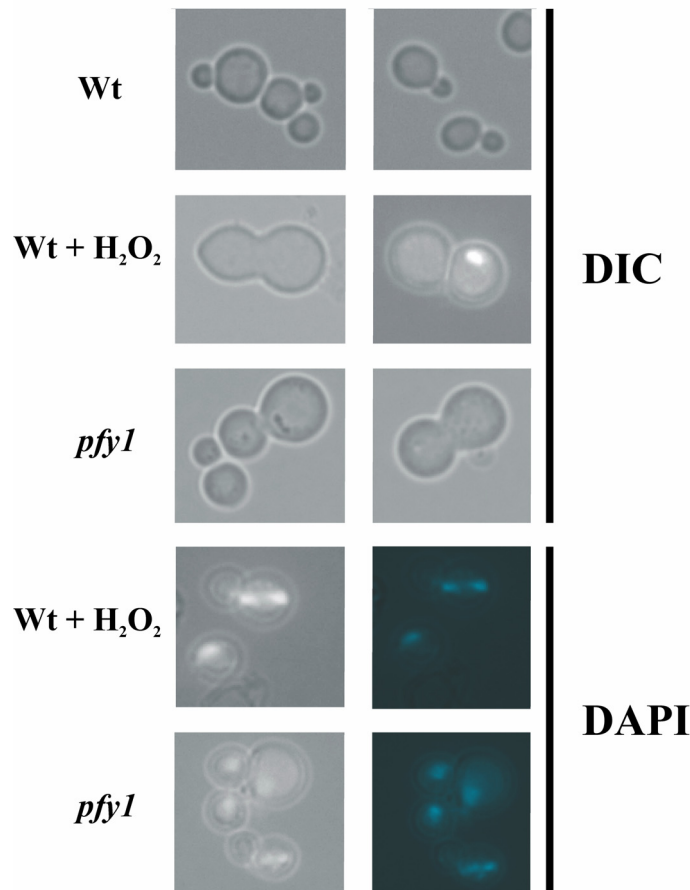


Figura 37. Las células silvestres y el mutante *pfy1* crecieron exponencialmente en medio SC con los aminoácidos correspondientes. Las células silvestres fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 5 mM durante 12 h y se observaron en el microscopio óptico. Para la observación de núcleos se trataron los cultivos con DAPI durante 1 hora, tras lo cual las células se observaron directamente en el microscopio de fluorescencia (ver Material y Métodos).

Análisis ultraestructurales mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), permitieron observar con mayor precisión los defectos en la morfología celular.

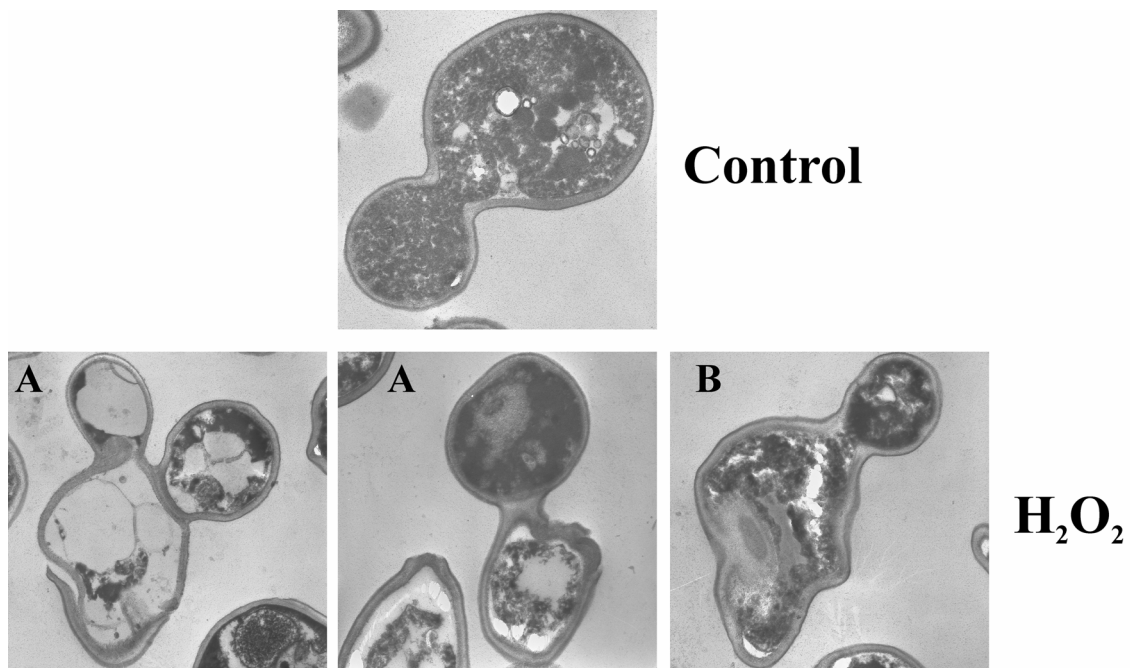


Figura 38. Las células crecieron exponencialmente en medio SC a 25 °C con los respectivos aminoácidos en presencia o ausencia de peróxido de hidrógeno 3 mM durante 10 horas y fueron procesadas para microscopía electrónica de transmisión. Las imágenes se aumentaron 20000 veces respecto a su tamaño real.

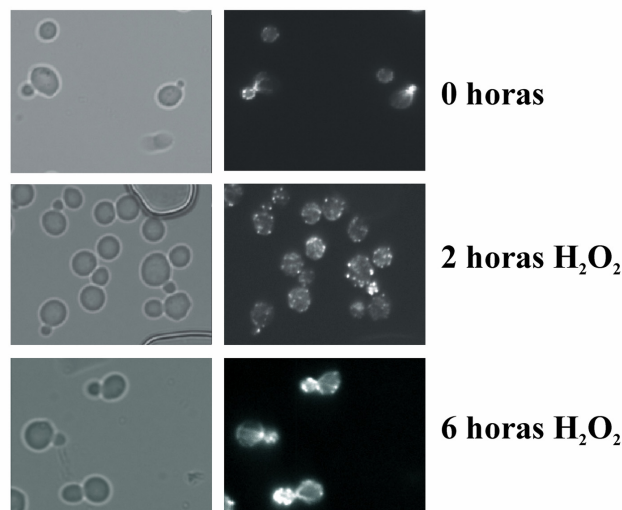
Como podemos observar en la Figura 38, con respecto a la imagen control, las dos Figuras 38 A presentaban problemas en la gemación y en algunos casos se detectan células con dos yemas, en comparación con la morfología normal de una célula gemando (control). En la primera micrografía A, se observa que una de las yemas presenta un defecto en la formación del septo. En la segunda micrografía A, se evidencia la emergencia de una segunda yema en la célula madre, antes de que haya ocurrido la citocinesis y separación de la célula hija. En otras ocasiones se evidenciaba

una clara pérdida de la forma elipsoidal característica de *S. cerevisiae* (Figura 38 B). Parte de los efectos morfogénicos podrían explicarse, como consecuencia de la pérdida de la polarización del citoesqueleto de actina, causado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno. Estos resultados además, sugieren una pérdida de coordinación entre los procesos que conducen a la emergencia y polarización de la yema y la citocinesis. El conjunto de estos fenotipos, en suma, son muy similares a los descritos previamente en el mutante *pfy1* (Marcoux *et al*, 1998). Estas observaciones nos indujeron a considerar la posibilidad, de que uno de los efectos celulares provocados por el peróxido de hidrógeno tuviera como consecuencia la pérdida de la función Pfy1.

2.4 La expresión de Pfy1 incrementa la viabilidad celular frente a peróxido de hidrógeno y favorece la restauración de la polaridad del citoesqueleto.

Dados los resultados anteriores, decidimos estudiar el papel de Pfy1 en la respuesta a estrés oxidativo, así como su relación con la proteína Pkc1. En una primera aproximación, construimos un vector en el cual la expresión de la proteína Pfy1 venía regulada por el promotor *tetO₇*, tal y como previamente hemos descrito con la proteína Pkc1 (página 15). El razonamiento que seguimos fue el siguiente: Si Pfy1 era una proteína cuya función era necesaria para la formación de cables de actina y se veía afectada especialmente por el peróxido de hidrógeno, su sobreexpresión restauraría el efecto sobre la organización del citoesqueleto de actina. Comprobamos que era eso lo que ocurría y además observamos que la sobreexpresión de Pfy1 también restauraba la viabilidad celular tras la adición de peróxido de hidrógeno.

wt + *tetO₇*Pfy1



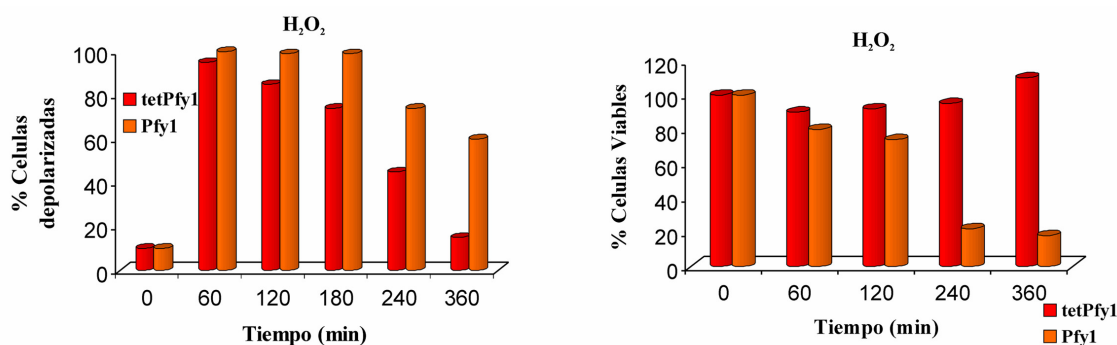


Figura 39. Cultivos en crecimiento exponencial de células silvestres sobreexpresando Pfy1 bajo el promotor regulable por tetraciclina *tetO₇* fueron tratadas con peróxido de hidrógeno 3 mM. Se recolectaron alícuotas correspondientes a los tiempos indicados en la figura y se procesaron para la tinción de actina y para realizar un análisis de viabilidad. El primer histograma representa el tanto por ciento de células despolarizadas (3 repeticiones de 200 células) y el segundo, el tanto por ciento de células viables.

En la Figura 39, se aprecia que a partir de las 4 horas de tratamiento con peróxido de hidrógeno, la sobreexpresión de Pfy1 inducía una clara repolarización del citoesqueleto de actina y la formación de filamentos. En los histogramas se detalla de modo cuantitativo una significativa disminución de células despolarizadas, además también comprobamos que la población de células que contenían el plásmido *tetO₇Pfy1*, adquirirían mayor viabilidad frente al tratamiento con peróxido de hidrógeno que las células silvestres. Estos resultados son similares a los obtenidos con la proteína Pkc1 y nos llevaron a la conclusión de que la profilina era necesaria para el mantenimiento de la polaridad celular y la viabilidad en respuesta a peróxido de hidrógeno y por lo tanto una posible diana de acción del mencionado agente oxidante.

2.5 La repolarización del citoesqueleto de actina mediada por Pkc1 tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno, es totalmente dependiente de la actividad Pfy1.

Curiosamente Pfy1 y Pkc1 ejercían un papel similar en el mantenimiento del citoesqueleto y la viabilidad celular en respuesta a peróxido de hidrógeno. Todo ello sugería una posible relación funcional entre ambas proteínas. Para demostrar esta hipótesis decidimos estudiar si la proteína Pfy1 era capaz de restaurar la viabilidad

celular y de inducir la formación de cables de actina, en respuesta a peróxido de hidrógeno y en ausencia de la proteína Pkc1.

Así, en estas condiciones, determinamos que Pfy1 no era capaz de rescatar la viabilidad ni el defecto en la repolarización del citoesqueleto en ausencia de Pkc1 y sugería que Pkc1 actuaba activando Pfy1 y así induciendo la formación de filamentos de actina (Figura 40).

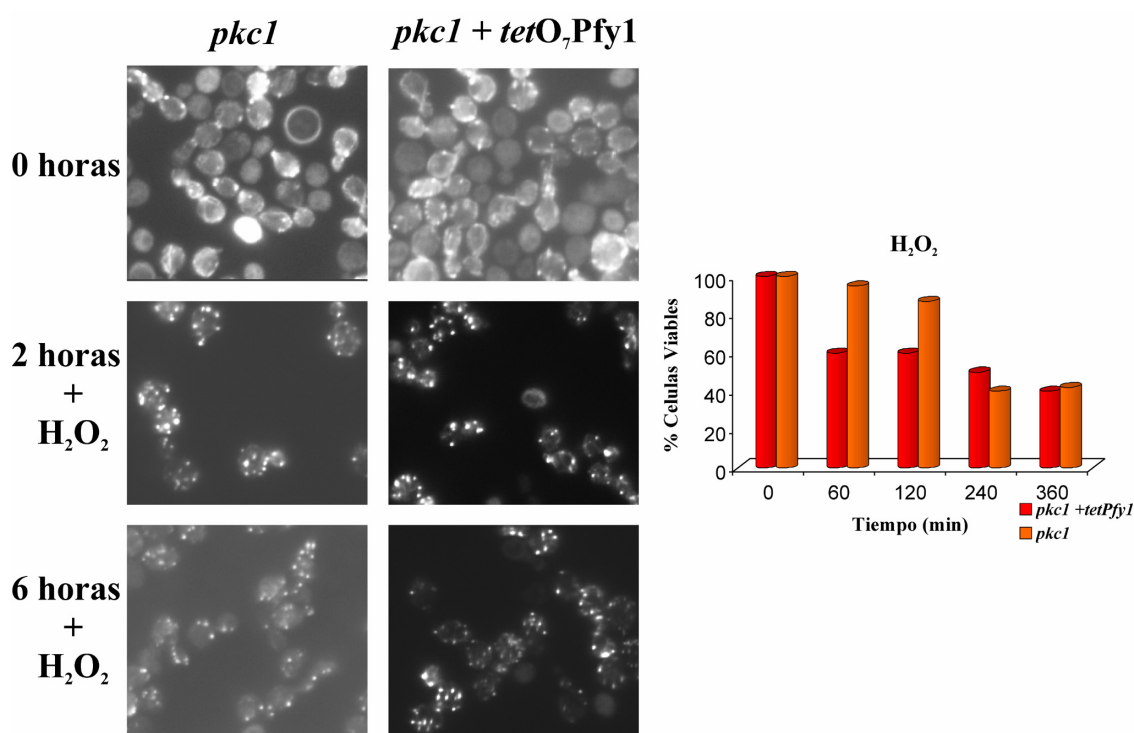


Figura 40. Se tomaron las muestras para la tinción de actina de los mutantes *pkc1* sobreexpresando Pfy1 bajo el promotor regulable por tetraciclina *tetO₇* en los tiempos indicados en la figura con peróxido de hidrógeno 3 mM. El histograma representa el porcentaje de células viabiles.

Como podemos observar en la Figura 40, al añadir peróxido de hidrógeno al medio de cultivo, el citoesqueleto de actina del mutante *pkc1* se desorganiza por completo, es decir, se provocaba la desaparición de cables y aparecían patches de actina distribuidos aleatoriamente por el citoplasma de la célula madre y la yema. Además, la sobreexpresión de la profilina Pfy1, no era capaz de restaurar la polaridad del citoesqueleto de actina. Realizamos un estudio de la viabilidad celular, obteniendo como resultado que la sobreexpresión de Pfy1, no era capaz de restaurar la pérdida de viabilidad que sufría el mutante *pkc1* por efecto del peróxido de hidrógeno.

Cabía la posibilidad de que Pkc1 además de inducir la actividad de Pfy1, también activase otra proteína relacionada con la actina cuya función indujese la polarización del citoesqueleto y que fuera determinante para la viabilidad celular. Para responder a esta duda decidimos sobreexpresar Pkc1 en el mutante *pfy1*.

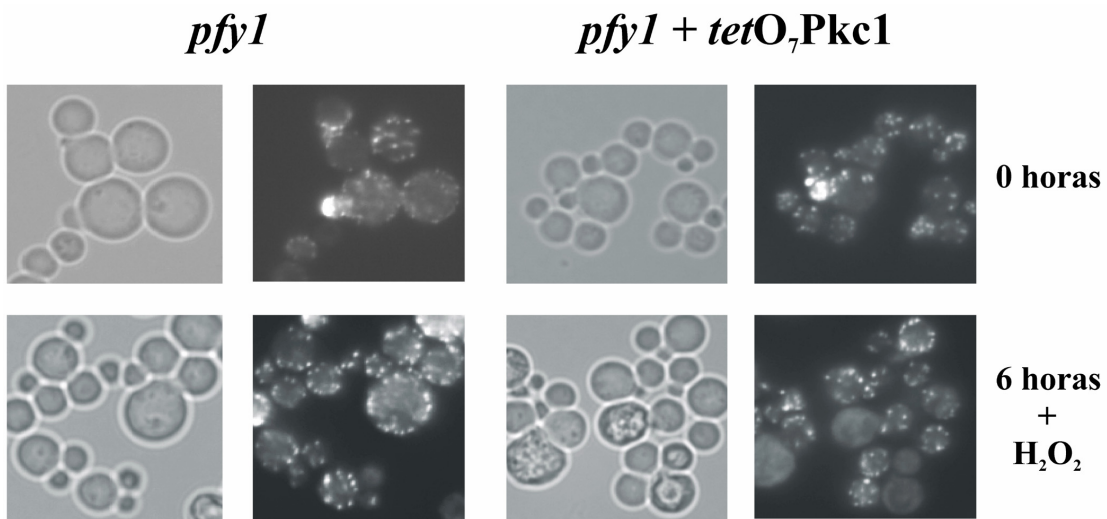


Figura 41. Se tomaron las muestras para la tinción de actina de mutantes *pfy1* y mutantes *pfy1* sobreexpresando Pkc1 bajo el promotor regulable por tetraciclina *tetO₇* después de 1 hora de tratamiento con peróxido de hidrógeno 3 mM.

Un mutante *pfy1* presenta una organización del citoesqueleto de actina característica y en cierto modo defectuosa: no se observan macrofilamentos de actina en la célula madre, sin embargo, en gran parte de la población si se aprecia una polarización de los patches de actina en las yemas. El tratamiento con peróxido de hidrógeno provoca una total despolarización del citoesqueleto, los patches no aparecen polarizados en la yema, sino que se observan distribuidos por toda la célula y la sobreexpresión de Pkc1 no es capaz de inducir la repolarización de los patches en las yemas (Figura 41), esto nos indicaba que las dos proteínas eran necesarias para la restauración de la organización y polaridad del citoesqueleto de actina, como ya habíamos observado en la Figura 36.

El conjunto de los anteriores resultados nos condujo a las siguientes conclusiones: i) la función de las proteína Pkc1 y Pfy1 incrementan la resistencia y

viabilidad celular frente agentes oxidantes e inducen la restauración de la polaridad y organización del citoesqueleto de actina, ii) en respuesta a un estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno, la proteína Pkc1 activa a la profilina Pfy1 que restaura la formación de los cables de actina y con ella la correcta función morfogénica. iii) ambas proteínas son importantes y actúan conjuntamente, es decir, se requiere la presencia y función de ambas para conseguir el efecto protector frente al estrés oxidativo provocado por el peróxido de hidrógeno.

DISCUSIÓN

En esta tesis doctoral se aportan resultados que demuestran que la proteína Pkc1 y los elementos aguas arriba de la vía de integridad celular (Rom2 y Rho1), son esenciales para la respuesta celular frente a un estrés oxidativo. A su vez, los elementos que integran el módulo MAP quinasa son prescindibles para esta función.

En este trabajo hemos utilizado dos agentes oxidantes: diamida y peróxido de hidrógeno. Estos dos agentes afectan diferentes dianas celulares y a su vez inducen diferentes respuestas celulares. Ambos agentes tienen dos importantes propiedades en común respecto a la respuesta celular que inducen: la función de Pkc1 es esencial para la supervivencia celular al daño oxidativo provocado por ellos y además generan una importante desorganización del citoesqueleto de actina.

Además, en esta tesis doctoral se presenta por primera vez una función para la proteína Mtl1, basándonos en las siguientes evidencias:

1. Tras un tratamiento con diamida solo un pequeño porcentaje de células del mutante *mtl1* presentan el citoesqueleto de actina despolarizado a diferencia de la cepa silvestre, en cuya población más del 50% de las células despolarizan el citoesqueleto en las citadas condiciones de tratamiento.
2. La doble fosforilación y consecuentemente la activación de la proteína Slt2, es prácticamente nula en el mutante *mtl1* en comparación con las células silvestres.
3. El mutante *mtl1* es sensible al tratamiento con diamida.
4. La viabilidad celular del mutante *mtl1* es rescatada incrementando la actividad de la proteína Pkc1.

En este trabajo, Mtl1 ha sido caracterizado como un receptor de la cubierta celular que detecta el estrés oxidativo generado por la diamida y que en esta respuesta forma parte integrante de la vía de integridad celular, aguas arriba de Pkc1.

Alic *et al*, (2003) recientemente publicaron que el ácido hidroperóxido linoleico inducía una activación rápida pero corta en el tiempo de la MAP quinasa Slt2. Este resultado difería de nuestras observaciones, ya que con peróxido de hidrógeno o con diamida observamos activaciones más tardías y que perduraban en el tiempo. Este comportamiento se puede asociar tal vez con procesos de adaptación, más que con una respuesta rápida a un estímulo mediado por una vía de transducción de señal. Estos autores además propusieron que Slt2 era necesaria para la viabilidad celular tras el tratamiento con el ácido hidroperóxido linoleico, sin embargo, nuestras observaciones demuestran que Slt2 y los elementos de la vía MAP quinasa son dispensables, además, demostramos que las proteínas Pkc1 y Rom2 son necesarias para la viabilidad celular en respuesta a un estrés oxidativo, provocado por el tratamiento con peróxido de hidrógeno o por la diamida. La explicación a la divergencia de resultados entre el grupo de Alic y nosotros, probablemente se deba a que el peróxido de hidrógeno y la diamida causen efectos celulares diferentes a los ocasionados por el ácido hidroperóxido linoleico. Es decir, que estos tres agentes oxidantes posean diferentes dianas susceptibles de ser oxidadas, induciendo respuestas celulares distintas aunque todas ellas con un denominador común: están relacionadas con la vía de integridad celular, ya que, el ácido hidroperóxido linoleico parece que reacciona con algunas proteínas presentes en la membrana (Alic *et al*, 2003). El peróxido de hidrógeno, sin embargo, es altamente difusible y puede penetrar al interior de la célula mediante un mecanismo de transporte pasivo (Chance *et al*, 1979), mientras que la diamida es un potencial oxidante de los residuos tiol del aminoácido cisteína.

Staleva *et al* (2004) recientemente publicaron una serie de observaciones que se relacionaban con las nuestras, mostradas en el presente estudio. Este grupo describe que un tratamiento con peróxido de hidrógeno inducía la fosforilación de Slt2 y consecuentemente la transcripción de Rlm1. Sin embargo, otros resultados no coincidían con los observados por nosotros. Staleva y colaboradores, describen una fosforilación rápida y transitoria de Slt2 como respuesta a un tratamiento con 5 mM de peróxido de hidrógeno. En nuestro estudio testamos diversas concentraciones de dicho agente oxidante a diferentes tiempos de exposición, incluyendo la concentración de 5 mM. Reproducimos estos experimentos utilizando dos fondos genéticos distintos y no logramos observar una activación significativa de Slt2 antes de los 30 minutos de exposición al agente oxidante (ver Western blot en el apéndice 2). Descartamos la

posibilidad de que las diferencias en los resultados entre el grupo de Staleva *et al* y el nuestro fueran debidos a un efecto dependiente del fondo genético, puesto que nosotros aportamos evidencias de la activación tardía de Slt2 en dos fondos genéticos distintos. Este grupo concluye que el mutante *slt2* era sensible a un tratamiento con peróxido de hidrógeno. Seguidamente testamos la viabilidad celular del mutante *slt2* al peróxido de hidrógeno en dos fondos genéticos distintos y no observamos diferencias significativas con respecto a las células silvestres (ver apéndice 2). En nuestro estudio utilizamos cultivos en crecimiento exponencial, mientras que Staleva *et al* utilizaron cultivos saturados, este podría ser uno de los motivos de las diferencias observadas entre ambos trabajos.

Los resultados presentados en esta tesis doctoral, indican que la diamida induce una mayor resistencia a la degradación de la pared por la enzima zimoliasa en los mutantes *pkc1* y *slt2* (utilizamos estos mutantes para evitar el efecto del mecanismo compensatorio asociado al defecto en la función de la vía de integridad celular, Klis *et al*, 2002; Lagorce *et al*, 2003), que probablemente esté relacionado con una reducción de la porosidad celular, como una consecuencia de la oxidación de los grupos sulfidrilos de las proteínas de la superficie celular (De Nobel *et al*, 1990 27 /id). A su vez los cambios estructurales en la pared celular, generados por la reducción de grupos sulfidrilo libres, afectan a la integridad celular siendo detectada por las proteínas receptoras (Mtl1 y Mid2) que transmiten la señal a los elementos de la vía Pkc1-MAP quinasa, activando la quinasa Slt2.

Si bien el mecanismo de síntesis proteica no parecía esencial para que la activación de Slt2 en respuesta a estrés térmico se llevase a cabo, en condiciones de estrés oxidativo provocado por la diamida no ocurría lo mismo, es decir, la activación de Slt2 en estas condiciones sí dependía de la síntesis proteica. Esta observación nos sugirió que la activación de la vía de integridad celular mediada por diamida, pudiera deberse más a un proceso adaptativo que a una respuesta de activación inmediata frente a un estímulo externo. Por otra parte, quisimos averiguar la razón por la cual la fosforilación de Slt2 en respuesta a la diamida, experimentaba un incremento lento y gradual. Ello podía deberse a una respuesta al daño continuado y acumulativo de la pared celular causada por la diamida. En este caso un bloqueo en secreción no debería afectar al patrón de respuesta. Sin embargo, observamos que un bloqueo en secreción

prácticamente eliminaba la activación de la quinasa Slt2 en respuesta a diamida. Las proteínas secretadas a la periferia celular posiblemente son susceptibles de ser constitutivamente oxidadas por la diamida, presente en el medio de cultivo durante todo el transcurso del experimento. Todo ello daría lugar a la acumulación de modificaciones en la pared celular (presumiblemente la diana de oxidación podrían ser los residuos tiol libres presentes en las proteínas de la superficie celular) y es por lo tanto lo que probablemente originaría la señal que activaría la vía de integridad celular.

Por otra parte, la localización de la proteína Pkc1 en la periferia celular tras un tratamiento con diamida, puede ser atribuible a una respuesta a un daño en la pared celular, como ya plantearon Andrews y Stark (2000). De hecho, observamos que la pared celular de las células tratadas con diamida se volvía más resistente a la digestión por el enzima zimoliasa. Más específicamente, la diamida es responsable de un incremento en la cantidad de glucano, lo que provocaba que la pared celular sea más gruesa, este efecto pensamos que es debido al resultado de la activación del mecanismo compensatorio, después de recibir un daño sobre la pared celular. Además, la diamida provoca un descenso en la cantidad de residuos SH libres, lo que junto con los anteriores datos conduce a pensar que los cambios estructurales causados por dicho agente, señalizan la activación de la vía de integridad celular. En esta tesis doctoral se concluye que este es el efecto mayoritario sobre la célula causado por la diamida, no descartamos la posibilidad de que la diamida además afecte a otros procesos celulares o esté oxidando residuos cisteína de proteínas de pared como Mid2 o Mtl1, todo ello constituye otro trabajo de investigación futuro que de hecho está en marcha, pero que no es objeto de la presente tesis doctoral.

Puesto que la localización de Pkc1 en la periferia celular es dependiente de la actividad de Rho1 (Andrews y Stark, 2000), inferimos que la localización de Pkc1 en la periferia celular tras un tratamiento con diamida, podría depender de la actividad de Rho1 y consecuentemente de la vía de integridad celular. La activación de Rho1 y Pkc1 se describió que causaba una despolarización del citoesqueleto de actina (Delley y Hall, 1999). En nuestro sistema, la despolarización del citoesqueleto de actina que observamos con los agentes oxidantes estudiados, no parece estar directamente relacionada con la hiperactivación de Pkc1 o Rom2, ya que observamos la misma desorganización del citoesqueleto de actina en ausencia de ambas proteínas.

Una conclusión que podemos sacar de este estudio, es que tanto la diamida como el peróxido de hidrógeno (lo discutimos más adelante), provocan una clara despolarización del citoesqueleto de actina, que es independiente de la actividad de los componentes aguas arriba de Pkc1 en la vía de integridad celular. Sin embargo, todos estos elementos poseen una función esencial para que el citoesqueleto se repolarice tras un tratamiento con diamida. Es destacable la importancia de Mtl1, Rom2 y Pkc1 ya que son requeridas para la supervivencia celular en respuesta a ambos estreses oxidativos.

En resumen, nosotros creemos que una exposición constante al agente oxidante diamida induce cambios estructurales de la pared celular, y esto es lo que activa la vía de integridad celular. Esta hipótesis la vemos reflejada en la fosforilación de Slt2 (que es dosis dependiente e incrementa con una mayor exposición al agente oxidante), en la despolarización del citoesqueleto de actina, en la localización de Pkc1 en la periferia celular y en el incremento en el grosor de la pared en todas las células tratadas con diamida.

El posible mecanismo por el cual el peróxido de hidrógeno produce la oxidación de elementos celulares e induce la respuesta de la vía de integridad celular, es distinto al descrito para la diamida. De acuerdo con nuestros resultados, este último agente oxida mayoritariamente proteínas de la envuelta celular, mientras que el peróxido de hidrógeno no produce su mayor daño a nivel de la pared celular.

A partir de los estudios que hemos realizado con el peróxido de hidrógeno pudimos observar que un tratamiento con este agente, provocaba una deslocalización de la proteína Pkc1 en unas punteaduras distribuidas por todo el citoplasma celular, resultado que difiere del que obtuvimos con el agente oxidante diamida. Además, a lo largo del tiempo en que Pkc1 permanecía localizado en estas punteaduras, la quinasa Slt2 mantenía su actividad basal, sin evidenciarse ninguna activación adicional. Este resultado puede ser debido a dos mecanismos: i) que Pkc1 se inactivase por efecto del peróxido de hidrógeno, ii) que la localización subcelular de Pkc1 determinase su capacidad de activar Slt2, tal y como se ha descrito con la proteína Rho1 (Abe *et al*, 2003). Estos autores demostraron que un bloqueo en secreción inducía la

deslocalización citoplasmática de Rho1 en vesículas secretoras, lo que a su vez impedía que Rom2 activase a Rho1.

Una primera aproximación para estudiar el significado de la deslocalización de Pkc1, consistió en estudiar las punteaduras citoplasmáticas en las cuales Pkc1 se localizaba tras tratamiento con peróxido de hidrógeno.

Analizamos la internalización del colorante Lucifer Yellow. Este colorante es de uso común en estudios de endocitosis, puesto que deficiencias en la internalización del mismo a vacuolas, han sido descritos en ciertos mutantes en la fase fluida del proceso de endocitosis (Dulic *et al*, 1991). En este estudio observamos, que las células tratadas con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno y a diferentes tiempos no presentaban problemas en la internalización del colorante, dato que sugería que la fase fluida del proceso endocítico no se veía afectado por el peróxido de hidrógeno. Para contrastar esta observación decidimos realizar el siguiente ensayo: nos basamos en el hecho de que el mecanismo de endocitosis necesita un citoesqueleto dinámico, es decir en polimerización activa. Por lo tanto, un bloqueo en la polimerización de la actina inhibiría la formación de vesículas endocíticas y consecuentemente la internalización de Pkc1 en las mismas. Si Pkc1 se encontrase englobado en vesículas endocíticas, bloqueando la actividad de la actina, estas vesículas no se podrían formar. Sin embargo, observamos que las punteaduras en donde se localizaba Pkc1 seguían detectándose tras tratamiento con peróxido de hidrógeno, independientemente de la polimerización de la actina. Así pues, las dos aproximaciones nos condujeron a una conclusión común: la deslocalización de Pkc1 provocada por el peróxido de hidrógeno, no parecía deberse a una acumulación de la quinasa en vesículas endocíticas.

Siguiendo con nuestro objetivo de caracterizar la localización de Pkc1, analizamos la captura y transporte a la vacuola del colorante FM4-64 (Vida y Emr, 1995). Se trata de un colorante lipofílico que se fija y tiñe la membrana de la vacuola. Vida y Erm (1995) demostraron que este colorante era internalizado activamente a través de canales diferentes a los utilizados por el Lucifer Yellow, ya que se supone que entra en la vacuola por mecanismos no relacionados con la fase fluida del proceso de endocitosis. Además, estos autores observaron que los defectos en la internalización de FM4-64 eran característicos de determinados mutantes de la vía de secreción vesicular,

como son los mutantes *sec1*, *sec6* y *sec15*. Observamos que tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno, las células presentaban problemas en la internalización del colorante FM4-64. Además, nuestra hipótesis vino reforzada por el hecho de que en general los mutantes en endocitosis no presentaban problemas en la internalización del colorante FM4-64 y si en la translocalización del mismo a la vacuola.

Con estos resultados nos planteamos la posibilidad que el peróxido de hidrógeno afectara a la ruta de secreción vesicular. Para desarrollar nuestra hipótesis utilizamos dos mutantes: i) el mutante *sec18-1* que bloquea la transición entre el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi y ii) el mutante *sec1-1* que bloquea la secreción en los últimos estadios de la ruta secretora, a nivel de la fusión de las vesículas secretoras con la membrana plasmática. Un dato interesante que se observa en ambos mutantes que presentaban bloqueo en secreción en diferentes estadios, es que la proteína Pkc1 se localizaba en punteaduras, como en el caso de las células silvestres tratadas con peróxido de hidrógeno. Este dato nos permitió demostrar que Pkc1 era secretada a yemas y septo por la vía de secreción vesicular, de forma similar a lo descrito con la proteína Rho1 (Abe *et al*, 2003).

Para poder analizar molecularmente a que estadio de la ruta secretora vesicular afectaba el peróxido de hidrógeno, utilizamos dos anticuerpos distintos, anti-carboxipeptidasa Y (CPY) y anti-invertasa. Para analizar los primeros estadios de secreción, usamos como marcador la carboxipeptidasa Y, ya que en las cepas que no presentaban problemas en los primeros estadios, por Western blot solo la forma madura de la glicoproteína era detectable. Sin embargo, cuando la ruta secretora está truncada, además de la forma madura, se detecta la forma inmadura. Los resultados que obtuvimos demostraron que el peróxido de hidrógeno no afectaba el transporte de carboxipeptidasa Y a la vacuola. Por este motivo descartamos que este agente oxidante afectara los primeros estadios de secreción.

Para comprobar si el problema se originaba en los últimos estadios de secreción utilizamos como marcador la invertasa, cuando se alteran las rutas secretoras en los últimos estadios, la invertasa no es secretada y se acumula intracelularmente en su forma no glicosilada. Como resultado a este experimento comprobamos que el peróxido de hidrógeno afectaba acumulando una menor cantidad de invertasa glicosilada, de la

misma forma que sucede en las cepas en las que se interrumpe la ruta secretora en sus últimos estadios. Por lo que podemos concluir que una de las primeras funciones afectadas por el peróxido de hidrógeno, tiene relación con los estadios tardíos de secreción.

Las células que presentan problemas en las vías secretoras necesitan una continua síntesis proteica y la actividad de la proteína Pkc1, ya que sin ello no pueden reprimir la transcripción de genes ribosomales (Nierras y Warner, 1999). Como hemos observado que el peróxido de hidrógeno altera la función secretora, nos planteamos si además podía causar problemas en la biogénesis de ribosomas, y si este hecho además dependía de la proteína Pkc1. Observamos que el peróxido de hidrógeno inducía una clara represión de la expresión de genes ribosomales. Sin embargo, en el mutante *pkc1* no observamos una significativa represión transcripcional. Lo que nos condujo a concluir que otra función que esta afectada por el peróxido de hidrógeno, es la represión de la expresión de genes ribosomales, y dicha represión esta mediada por Pkc1 y por el citoesqueleto de actina. Este último dato es interesante puesto que pone de manifiesto la estrecha relación entre la polimerización de la actina y la maquinaria de secreción. Sería interesante elucidar si esta conexión se efectúa por mediación de Pkc1, pero hasta el momento, no tenemos datos claros que nos permitan dar una conclusión a este hecho.

Dado el papel central de Pkc1 en la viabilidad celular frente a peróxido de hidrógeno y dado que dicha proteína no es necesaria para la despolarización del citoesqueleto de actina, pero si para su repolarización, analizamos el efecto de la sobreexpresión de Pkc1 y observamos que un aumento en la cantidad de la proteína provocaba un incremento en la repolarización del citoesqueleto de actina, en células tratadas con peróxido de hidrógeno, efecto no observado con la diamida. Concluimos que Pkc1 es necesaria para la inducción de la formación de cables de actina y para restaurar el crecimiento polarizado de la célula en respuesta a la oxidación causada por el peróxido de hidrógeno.

Dado que el peróxido de hidrógeno en células silvestres provocaba fenotipos que ya habían sido previamente descritos para mutantes en profilina, como son: incremento del tamaño de la célula, acumulación de células binucleadas, pérdida de la polaridad y células con dos yemas. Nos planteamos que Pkc1 estuviese activando forminas o

profilinas en respuesta a peróxido de hidrógeno y por lo tanto que uno de los efectos celulares provocados por el peróxido de hidrógeno tuviera como consecuencia la pérdida de la función Pfy1. Esta hipótesis viene reforzada por los datos siguientes: se tienen evidencias de que las forminas catalizan la unión de las estructuras filamentosas de la actina, este dato se obtuvo a partir de la sobreexpresión de la parte N terminal de Bni1, observando un incremento en la formación de cables de actina (Evangelista *et al*, 2003).

La primera aproximación que realizamos, fue la de intentar restaurar la polarización del citoesqueleto de actina tras un tratamiento con peróxido de hidrógeno, mediante la sobreexpresión de la profilina, ya que si Pfy1 se veía afectada por un tratamiento con este agente oxidante, la sobreexpresión de dicha proteína lograría restaurar la formación de filamentos de actina y la polaridad celular. Sorprendentemente no solo observamos que este efecto se producía, si no que además Pfy1 también restauraba la viabilidad celular. Estos resultados nos llevaron a la conclusión de que la profilina es necesaria para el mantenimiento de la polaridad celular y la viabilidad en respuesta a peróxido de hidrógeno y que la función de la profilina es una diana de este agente.

A partir de lo que hemos descrito, Pkc1 y Pfy1 ejercen un papel similar en el mantenimiento del citoesqueleto de actina y en la viabilidad celular en respuesta a peróxido de hidrógeno, y todo ello nos sugirió una posible relación funcional entre ambas proteínas. Para poder confirmar esta hipótesis, utilizamos el mutante *pkc1* sobreexpresando Pfy1 y como resultado obtuvimos que Pkc1 era necesaria para que Pfy1 restaurara el citoesqueleto de actina y la viabilidad celular.

Evidentemente cabía la posibilidad de que Pkc1 activase a otra proteína diferente a Pfy1, cuya función indujese la polarización del citoesqueleto de actina y fuera determinante para la viabilidad celular. Para poder solucionar esta duda sobreexpresamos Pkc1 en el mutante *pfy1*. El mutante *pfy1* posee un citoesqueleto con un grado de desorganización, no se evidencian cables microscópicos, pero las células muestran polarización de patches en las yemas y zonas de crecimiento polarizado, observamos que el peróxido de hidrógeno introducía una mayor despolarización del citoesqueleto de actina, en esta situación Pkc1 no inducía restauración de la polarización

del citoesqueleto, ni la formación de filamentos de actina. Dong *et al* (2003) demostraron que Pkc1 activa forminas para inducir la formación de cables, pero además, esta señal es restringida a condiciones de choque térmico. En un estudio paralelo ya se apuntó la posibilidad de que la función Pfy1 fuera imprescindible para la formación de cables de actina (Evangelista *et al*, 2002). Y finalmente se ha mostrado recientemente la necesidad de la función Pfy1 para la correcta citocinesis mediada por la actividad de Rho1 (Tolliday *et al*, 2002). En este trabajo se demuestra por vez primera, la relación directa entre Pkc1 y Pfy1 en la función formadora de cables de actina en respuesta a estrés oxidativo, siendo probablemente Pkc1 la quinasa activadora de Pfy1 o de alguna otra proteína intermediaria para la activación de Pfy1, este estudio se encuentra actualmente en curso en nuestro grupo. De nuestro estudio concluimos que tanto Pkc1 como Pfy1 son necesarias para la supervivencia y morfogénesis en respuesta al estrés oxidativo.

En células eucariotas superiores se han publicado diversos estudios que implican a la proteína Pkc en diversas respuestas celulares. Por ejemplo, se ha visto que los ésteres de forbol son activadores de diversas isoformas de Pkc, y estas isoformas promueven diversos cambios en el citoesqueleto de actina para facilitar la migración celular. Los ésteres de forbol se unen y activan proteínas que contienen el dominio C1 (Pkc) y estas son reguladoras de la morfología de los microfilamentos. Además, otra de las funciones de Pkc que se ha descrito, es su implicación en el transporte y la distribución de las integrinas (Larsson, 2005). Estos estudios nos permiten observar la importancia que tiene la proteína Pkc en diferentes tipos celulares regulando el citoesqueleto de actina. Otros estudios han permitido observar otras funciones en las que está implicada la proteína Pkc, a partir de células de rata se ha observado la importancia que tiene dicha proteína en diversos aspectos de la diferenciación neuronal, como son: el desarrollo de los axones y las dendritas o la sinaptogénesis. Aunque no se sabe todavía cuales pueden ser los mecanismos por los cuales Pkc puede regular estos procesos (Akinori, 1998). Además, diversos estudios en eucariotas superiores han evidenciado que la proteína Pkc, es un candidato lógico a ser modificado tanto por agentes oxidantes como antioxidantes. Así los agentes oxidantes reaccionan con el dominio regulador de la proteína, señalizando el crecimiento celular, siendo un promotor de tumores. Por el contrario los agentes antioxidantes reaccionan con el

dominio catalítico de la proteína, inhibiendo la actividad celular de Pkc, interfiriendo con la acción de los promotores tumorales (Gopalakrishna y Jaken, 2000).

He reflejado parte de los mecanismos celulares controlados por las diversas isoformas de Pkc en diferentes tipos eucariotas celulares, en lo que respecta a estructura del citoesqueleto y respuesta a estrés oxidativo, la consecuencia inmediata en la salud humana afecta a diversos procesos neurodegenerativos y cancerosos. Aun hay muchas incognitas que desvelar respecto a todos estos mecanismos reguladores. Nosotros presentamos una pequeña contribución que arroja más información acerca de dichos mecanismos, mediante el uso del modelo eucariota *S. cerevisiae*. La ventaja de este estudio es la elevada conservación en la composición de aminoácidos y dominios estructurales de las proteínas de la actina y Pkc1 en *S. cerevisiae* y las proteínas homólogas en eucariotas superiores.

CONCLUSIONES

1. La vía de integridad celular se induce en respuesta al estrés oxidativo provocado por diferentes agentes oxidantes (peróxido de hidrógeno o diamida).
2. Los receptores de la envuelta celular Mtl1 y Mid2, juegan un papel muy importante en la detección de la señal del estrés oxidativo causado por diamida.
3. Las proteínas Rom2 y Pkc1, son necesarias para la viabilidad celular en respuesta a un tratamiento con peróxido de hidrógeno y diamida.
4. La función esencial de las proteínas Mtl1 y Rom2 en la respuesta a estrés oxidativo, es dependiente de la actividad de Pkc1.
5. Un estrés oxidativo provocado por ambos agentes (peróxido de hidrógeno y diamida), provoca la despolarización transitoria del citoesqueleto de actina.
6. El módulo MAP quinasa aguas abajo de Pkc1 es dispensable para la viabilidad celular frente a un estrés oxidativo.
7. El efecto oxidante que causa la diamida sobre la célula se ejerce mayoritariamente a nivel de la pared celular, induciendo la formación de puentes disulfuro en las proteínas y produciendo cambios en las propiedades estructurales de la superficie celular.
8. La proteína Pkc1 juega un papel esencial como antioxidante en la resistencia celular frente al estrés oxidativo.
9. En respuesta a estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno o por diamida, la función Pkc1 se necesita para reparar el daño provocado por los cambios estructurales en la cubierta celular y para la restauración de la polarización del citoesqueleto de actina.

10. Para que la célula sea capaz de responder a un estrés oxidativo generado por diamida, se necesita que funcione la maquinaria de secreción y de síntesis proteíca.
11. Un tratamiento con diamida induce la localización de Pkc1 en la periferia celular para reparar los efectos del daño oxidativo causado en la envuelta externa celular e induce un engrosamiento de la capa de glucano, como resultado del mecanismo compensatorio.
12. El receptor Mtl1 es un sensor del estrés oxidativo provocado por la diamida.
13. Una función celular afectada por el peróxido de hidrógeno tiene relación con la ruta de secreción vesicular.
14. Pfy1 requiere ser activada por Pkc1 para inducir la formación de cables de actina en respuesta a peróxido de hidrógeno.
15. Se han observado dos respuestas a un estrés oxidativo generado por peróxido de hidrógeno: i) la proteína Pkc1 participa en la biogénesis de ribosomas señalizando la represión de la transcripción de genes ribosomales. ii) La respuesta adaptativa al peróxido de hidrógeno mediante la regeneración de la formación de cables de actina mediado por Pfy1. Todo ello incrementaba viabilidad celular y con ello la resistencia frente a la acción oxidante del peróxido de hidrógeno.

BIBLIOGRAFÍA

Abe,M., Qadota,H., Hirata,A., and Ohya,Y. (2003). Lack of GTP-bound Rho1p in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *162*, 85-97.

Adams,A.E., Johnson,D.I., Longnecker,R.M., Sloat,B.F., and Pringle,J.R. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *111*, 131-142.

Adams,A.E., Botstein,D., and Drubin,D.G. (1991). Requirement of yeast fimbrin for actin organization and morphogenesis in vivo. *Nature* *354*, 404-408.

Alberts,A.S., Bouquin,N., Johnston,L.H., and Treisman,R. (1998). Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J. Biol. Chem.* *273*, 8616-8622.

Alic,N., Higgins,V.J., Pichova,A., Breitenbach,M., and Dawes,I.W. (2003). Lipid hydroperoxides activate the mitogen-activated protein kinase Mpk1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *278*, 41849-41855.

Akinori,M. (1998). Subspecies of protein kinase C in the rat spinal cord. *Prog. eurobiol.* *54*, 499-530.

Amberg,D.C. (1998). Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol. Biol. Cell* *9*, 3259-3262.

Andrews,P.D. and Stark,M.J. (2000). Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J. Cell Sci.* *113 (Pt 15)*, 2685-2693.

Angeles de la Torre-Ruiz, Torres,J., Arino,J., and Herrero,E. (2002). Sit4 is required for proper modulation of the biological functions mediated by Pkc1 and the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *277*, 33468-33476.

Aramburu,J., Rao,A., and Klee,C.B. (2000). Calcineurin: from structure to function. *Curr. Top. Cell Regul.* *36*, 237-295.

Arellano,M., Duran,A., and Perez,P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* *110* (Pt 20), 2547-2555.

Arellano,M., Valdivieso,M.H., Calonge,T.M., Coll,P.M., Duran,A., and Perez,P. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 20), 3569-3578.

Arino,J. (2002). Novel protein phosphatases in yeast. *Eur. J. Biochem.* *269*, 1072-1077.

Asakura,T., Sasaki,T., Nagano,F., Satoh,A., Obaishi,H., Nishioka,H., Imamura,H., Hotta,K., Tanaka,K., Nakanishi,H., and Takai,Y. (1998). Isolation and characterization of a novel actin filament-binding protein from *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* *16*, 121-130.

Ausubel,F.M., Brent, R., Kingston, R.E. (1989). *Current protocols in molecular biology*. Wiley-Interscience, New York, N.Y.

Baetz,K., Moffat,J., Haynes,J., Chang,M., and Andrews,B. (2001). Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slf2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol. Cell Biol.* *21*, 6515-6528.

Balasubramanian,M.K., Hirani,B.R., Burke,J.D., and Gould,K.L. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe* cdc3+ gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J. Cell Biol.* *125*, 1289-1301.

Bar,E.E., Ellicott,A.T., and Stone,D.E. (2003). Gbetagamma recruits Rho1 to the site of polarized growth during mating in budding yeast. *J. Biol. Chem.* *278*, 21798-21804.

Batiza,A.F., Schulz,T., and Masson,P.H. (1996). Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J. Biol. Chem.* *271*, 23357-23362.

Belli,G., Gari,E., Piedrafita,L., Aldea,M., and Herrero,E. (1998). An activator/repressor dual system allows tight tetracycline-regulated gene expression in budding yeast. *Nucleic Acids Res.* *26*, 942-947.

Belmont,L.D., Patterson,G.M., and Drubin,D.G. (1999). New actin mutants allow further characterization of the nucleotide binding cleft and drug binding sites. *J. Cell Sci.* *112 (Pt 9)*, 1325-1336.

Bender,A. and Pringle,J.R. (1991). Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *11* , 1295-1305.

Benedetti,H., Raths,S., Crausaz,F., and Riezman,H. (1994). The END3 gene encodes a protein that is required for the internalization step of endocytosis and for actin cytoskeleton organization in yeast. *Mol. Biol. Cell* *5*, 1023-1037.

Beningo,K.A., Lillie,S.H., and Brown,S.S. (2000). The yeast kinesin-related protein Smy1p exerts its effects on the class V myosin Myo2p via a physical interaction. *Mol. Biol. Cell* *11*, 691-702.

Bonilla,M., Nastase,K.K., and Cunningham,K.W. (2002). Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J.* *21*, 2343-2353.

Bonilla,M. and Cunningham,K.W. (2003). Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4296-4305.

Botstein, D., Amberg, D., Mulholland, J., Huffaker, T., Adams, A., Drubin, D., and Stearns, T., (1997). The yeast cytoskeleton. *In The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*. Cold Spring Harbor. Pp. 1-90

Bourne,H.R., Sanders,D.A., and McCormick,F. (1991). The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* *349*, 117-127.

Breedon,L.L. (2003). Periodic transcription: a cycle within a cycle. *Curr. Biol.* *13*, R31-R38.

Brown,J.L., North,S., and Bussey,H. (1993). SKN7, a yeast multicopy suppressor of a mutation affecting cell wall beta-glucan assembly, encodes a product with domains homologous to prokaryotic two-component regulators and to heat shock transcription factors. *J. Bacteriol.* *175*, 6908-6915.

Brown,J.L., Bussey,H., and Stewart,R.C. (1994). Yeast Skn7p functions in a eukaryotic two-component regulatory pathway. *EMBO J.* *13*, 5186-5194.

Bryan,B.A., Knapp,G.S., Bowen,L.M., and Polymenis,M. (2004). The UV response in *Saccharomyces cerevisiae* involves the mitogen-activated protein kinase Slk2p. *Curr. Microbiol.* *49*, 32-34.

Buehrer,B.M. and Errede,B. (1997). Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *17*, 6517-6525.

Cabib,E., Drgonova,J., and Drgon,T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* *67*, 307-333.

Cabib,E., Roh,D.H., Schmidt,M., Crotti,L.B., and Varma,A. (2001). The yeast cell wall and septum as paradigms of cell growth and morphogenesis. *J. Biol. Chem.* *276*, 19679-19682.

Carlson,M. and Botstein,D. (1982). Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted and intracellular forms of yeast invertase. *Cell* *28*, 145-154.

Carlsson,L., Nystrom,L.E., Sundkvist,I., Markey,F., and Lindberg,U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J. Mol. Biol.* *115*, 465-483.

Casamayor,A., Torrance,P.D., Kobayashi,T., Thorner,J., and Alessi,D.R. (1999). Functional counterparts of mammalian protein kinases PDK1 and SGK in budding yeast. *Curr. Biol.* *9*, 186-197.

Caviston,J.P., Longtine,M., Pringle,J.R., and Bi,E. (2003). The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol. Biol. Cell* *14*, 4051-4066.

Chai,B., Hsu,J.M., Du,J., and Laurent,B.C. (2002). Yeast RSC function is required for organization of the cellular cytoskeleton via an alternative PKC1 pathway. *Genetics* *161*, 575-584.

- Chance,B., Sies,H., and Boveris,A. (1979). Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* *59*, 527-605.
- Chant,J. and Pringle,J.R. (1995). Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *129*, 751-765.
- Chowdhury,S., Smith,K.W., and Gustin,M.C. (1992). Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J. Cell Biol.* *118*, 561-571.
- Cid,V.J., Cenamor,R., Sanchez,M., and Nombela,C. (1998). A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* *144* (Pt 1), 25-36.
- Clotet,J., Gari,E., Aldea,M., and Arino,J. (1999). The yeast ser/thr phosphatases sit4 and ppz1 play opposite roles in regulation of the cell cycle. *Mol. Cell Biol.* *19*, 2408-2415.
- Cohen,T.J., Lee,K., Rutkowski,L.H., and Strich,R. (2003). Ask10p mediates the oxidative stress-induced destruction of the *Saccharomyces cerevisiae* C-type cyclin Ume3p/Srb11p. *Eukaryot. Cell* *2*, 962-970.
- Coyle,J.T. and Puttfarcken,P. (1993). Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* *262*, 689-695.
- Cyert,M.S. and Thorner,J. (1992). Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol. Cell Biol.* *12*, 3460-3469.
- Davenport,K.R., Sohaskey,M., Kamada,Y., Levin,D.E., and Gustin,M.C. (1995). A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* *270*, 30157-30161.
- de Nobel,H., Ruiz,C., Martin,H., Morris,W., Brul,S., Molina,M., and Klis,F.M. (2000). Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* *146* (Pt 9), 2121-2132.

De Nobel,J.G., Klis,F.M., Munnik,T., Priem,J., and Van Den,E.H. (1990). An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 6, 483-490.

Delley,P.A. and Hall,M.N. (1999). Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J. Cell Biol.* 147, 163-174.

Denis,V. and Cyert,M.S. (2005). Molecular analysis reveals localization of *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C to sites of polarized growth and Pkc1p targeting to the nucleus and mitotic spindle. *Eukaryot. Cell* 4, 36-45.

Desrivieres,S., Cooke,F.T., Parker,P.J., and Hall,M.N. (1998). MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 273, 15787-15793.

Dong,Y., Pruyne,D., and Bretscher,A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J. Cell Biol.* 161, 1081-1092.

Drees,B., Brown,C., Barrell,B.G., and Bretscher,A. (1995). Tropomyosin is essential in yeast, yet the TPM1 and TPM2 products perform distinct functions. *J. Cell Biol.* 128, 383-392.

Drgonova,J., Drgon,T., Tanaka,K., Kollar,R., Chen,G.C., Ford,R.A., Chan,C.S., Takai,Y., and Cabib,E. (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* 272, 277-279.

Drubin,D.G., Jones,H.D., and Wertman,K.F. (1993). Actin structure and function: roles in mitochondrial organization and morphogenesis in budding yeast and identification of the phalloidin-binding site. *Mol. Biol. Cell* 4, 1277-1294.

Dulic,V., Egerton,M., Elguindi,I., Raths,S., Singer,B., and Riezman,H. (1991). Yeast endocytosis assays. *Methods Enzymol.* 194, 697-710.

Dunn,T.M. and Shortle,D. (1990). Null alleles of SAC7 suppress temperature-sensitive actin mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 10, 2308-2314.

Eder,A.M., Sui,X., Rosen,D.G., Nolden,L.K., Cheng,K.W., Lahad,J.P., Kango-Singh,M., Lu,K.H., Warneke,C.L., Atkinson,E.N., Bedrosian,I., Keyomarsi,K.,

- Kuo,W.L., Gray,J.W., Yin,J.C., Liu,J., Halder,G., and Mills,G.B. (2005). Atypical PKC $\{\iota\}$ contributes to poor prognosis through loss of apical-basal polarity and Cyclin E overexpression in ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* *102*, 12519-12524.
- Elion,E.A. (2000). Pheromone response, mating and cell biology. *Curr. Opin. Microbiol.* *3*, 573-581.
- Engel,J., Fasold,H., Hulla,F.W., Waechter,F., and Wegner,A. (1977). The polymerization reaction of muscle actin. *Mol. Cell Biochem.* *18*, 3-13.
- Errede,B., Cade,R.M., Yashar,B.M., Kamada,Y., Levin,D.E., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995). Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol. Reprod. Dev.* *42*, 477-485.
- Evangelista,M., Blundell,K., Longtine,M.S., Chow,C.J., Adames,N., Pringle,J.R., Peter,M., and Boone,C. (1997). Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* *276*, 118-122.
- Evangelista,M., Pruyne,D., Amberg,D.C., Boone,C., and Bretscher,A. (2002). Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat. Cell Biol.* *4*, 260-269.
- Evangelista,M., Zigmond,S., and Boone,C. (2003). Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments. *J. Cell Sci.* *116*, 2603-2611.
- Ferrigno,P., Posas,F., Koepf,D., Saito,H., and Silver,P.A. (1998). Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.* *17*, 5606-5614.
- Field,C., Li,R., and Oegema,K. (1999). Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr. Opin. Cell Biol.* *11*, 68-80.
- Finger,A., Knop,M., and Wolf,D.H. (1993). Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur. J. Biochem.* *218*, 565-574.

Finger,F.P., Hughes,T.E., and Novick,P. (1998). Sec3p is a spatial landmark for polarized secretion in budding yeast. *Cell* 92, 559-571.

Finger,F.P. and Novick,P. (1998). Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *J. Cell Biol.* 142, 609-612.

Flandez,M., Cosano,I.C., Nombela,C., Martin,H., and Molina,M. (2004). Reciprocal regulation between Slt2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 11027-11034.

Fujiwara,T., Tanaka,K., Mino,A., Kikyo,M., Takahashi,K., Shimizu,K., and Takai,Y. (1998). Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 9, 1221-1233.

Gallego,C., Gari,E., Colomina,N., Herrero,E., and Aldea,M. (1997). The Cln3 cyclin is down-regulated by translational repression and degradation during the G1 arrest caused by nitrogen deprivation in budding yeast. *EMBO J.* 16, 7196-7206.

Gallwitz,D. and Sures,I. (1980). Structure of a split yeast gene: complete nucleotide sequence of the actin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 77, 2546-2550.

Garcia,R., Bermejo,C., Grau,C., Perez,R., Rodriguez-Pena,J.M., Francois,J., Nombela,C., and Arroyo,J. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 15183-15195.

Gascon,S. and Ottolenghi,P. (1967). Invertase isozymes and their localization in yeast. *C. R. Trav. Lab Carlsberg.* 36, 85-93.

Geli,M.I. and Riezman,H. (1998). Endocytic internalization in yeast and animal cells: similar and different. *J. Cell Sci.* 111 (Pt 8), 1031-1037.

Goldschmidt-Clermont,P.J., Furman,M.I., Wachsstock,D., Safer,D., Nachmias,V.T., and Pollard,T.D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4

and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol. Biol. Cell* 3, 1015-1024.

Goldstein,A.L. and McCusker,J.H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 15, 1541-1553.

Gopalakrishna,R. and Jaken,S. (2000). Protein kinase C signaling and oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 28, 1349-1361.

Gray,J.V., Ogas,J.P., Kamada,Y., Stone,M., Levin,D.E., and Herskowitz,I. (1997). A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* 16, 4924-4937.

Gulli,M.P. and Peter,M. (2001). Temporal and spatial regulation of Rho-type guanine-nucleotide exchange factors: the yeast perspective. *Genes Dev.* 15, 365-379.

Guo,W., Tamanoi,F., and Novick,P. (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat. Cell Biol.* 3, 353-360.

Gustin,M.C., Albertyn,J., Alexander,M., and Davenport,K. (1998). MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62, 1264-1300.

Haarer,B.K., Lillie,S.H., Adams,A.E., Magdolen,V., Bandlow,W., and Brown,S.S. (1990). Purification of profilin from *Saccharomyces cerevisiae* and analysis of profilin-deficient cells. *J. Cell Biol.* 110, 105-114.

Hahn,J.S. and Thiele,D.J. (2002). Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J. Biol. Chem.* 277, 21278-21284.

Hall,A. (1994). Small GTP-binding proteins and the regulation of the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Biol.* 10, 31-54.

Halliwell,B. and Gutteridge,J.M. (1984). Role of iron in oxygen radical reactions. *Methods Enzymol.* 105, 47-56.

Harrison,J.C., Bardes,E.S., Ohya,Y., and Lew,D.J. (2001). A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat. Cell Biol.* 3, 417-420.

Harrison,J.C., Zyla,T.R., Bardes,E.S., and Lew,D.J. (2004). Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J. Biol. Chem.* 279, 2616-2622.

Heinisch,J.J., Lorberg,A., Schmitz,H.P., and Jacoby,J.J. (1999). The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 32, 671-680.

Hirano,H., Tanaka,K., Ozaki,K., Imamura,H., Kohno,H., Hihara,T., Kameyama,T., Hotta,K., Arisawa,M., Watanabe,T., Qadota,H., Ohya,Y., and Takai,Y. (1996). ROM7/BEM4 encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16, 4396-4403.

Hosotani,T., Koyama,H., Uchino,M., Miyakawa,T., and Tsuchiya,E. (2001). PKC1, a protein kinase C homologue of *Saccharomyces cerevisiae*, participates in microtubule function through the yeast EB1 homologue, BIM1. *Genes Cells* 6, 775-788.

Igual,J.C., Johnson,A.L., and Johnston,L.H. (1996). Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* 15, 5001-5013.

Imai,J., Toh-e A, and Matsui,Y. (1996). Genetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RHO3 gene, encoding a rho-type small GTPase, provides evidence for a role in bud formation. *Genetics* 142, 359-369.

Imamura,H., Tanaka,K., Hihara,T., Umikawa,M., Kamei,T., Takahashi,K., Sasaki,T., and Takai,Y. (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 16, 2745-2755.

Inagaki,M., Schmelzle,T., Yamaguchi,K., Irie,K., Hall,M.N., and Matsumoto,K. (1999). PDK1 homologs activate the Pkc1-mitogen-activated protein kinase pathway in yeast. *Mol. Cell Biol.* 19, 8344-8352.

Inoue,M., Kishimoto,A., Takai,Y., and Nishizuka,Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* 252, 7610-7616.

Irie,K., Takase,M., Lee,K.S., Levin,D.E., Araki,H., Matsumoto,K., and Oshima,Y. (1993). MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 13, 3076-3083.

Jaquenoud,M. and Peter,M. (2000). Gic2p may link activated Cdc42p to components involved in actin polarization, including Bni1p and Bud6p (Aip3p). *Mol. Cell Biol.* 20, 6244-6258.

Jung,U.S. and Levin,D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* 34, 1049-1057.

Jung,U.S., Sobering,A.K., Romeo,M.J., and Levin,D.E. (2002). Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol. Microbiol.* 46, 781-789.

Kaiser, C., Michaelis, S., and Mitchell, A., (1994). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbo Laboratory Press, New York.

Kaksonen,M., Sun,Y., and Drubin,D.G. (2003). A pathway for association of receptors, adaptors, and actin during endocytic internalization. *Cell* 115, 475-487.

Kamada,Y., Jung,U.S., Piotrowski,J., and Levin,D.E. (1995). The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 9, 1559-1571.

Kamada,Y., Qadota,H., Python,C.P., Anraku,Y., Ohya,Y., and Levin,D.E. (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J. Biol. Chem.* 271, 9193-9196.

Keith,C.T. and Schreiber,S.L. (1995). PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science* 270, 50-51.

Ketela,T., Green,R., and Bussey,H. (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J. Bacteriol.* *181*, 3330-3340.

Kikyo,M., Tanaka,K., Kamei,T., Ozaki,K., Fujiwara,T., Inoue,E., Takita,Y., Ohya,Y., and Takai,Y. (1999). An FH domain-containing Bnr1p is a multifunctional protein interacting with a variety of cytoskeletal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* *18*, 7046-7054.

Klis,F.M. (1994). Review: cell wall assembly in yeast. *Yeast* *10*, 851-869.

Klis,F.M., Mol,P., Hellingwerf,K., and Brul,S. (2002). Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.* *26*, 239-256.

Kollar,R., Reinhold,B.B., Petrakova,E., Yeh,H.J., Ashwell,G., Drgonova,J., Kapteyn,J.C., Klis,F.M., and Cabib,E. (1997). Architecture of the yeast cell wall. Beta(1-->6)-glucan interconnects mannan, beta(1-->3)-glucan, and chitin. *J. Biol. Chem.* *272*, 17762-17775.

Kosower,N.S., Kosower,E.M., Wertheim,B., and Correa,W.S. (1969). Diamide, a new reagent for the intracellular oxidation of glutathione to the disulfide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *37*, 593-596.

Kosower,N.S. and Kosower,E.M. (1995). Diamide: an oxidant probe for thiols. *Methods Enzymol.* *251*, 123-133.

Kron,S.J. and Gow,N.A. (1995). Budding yeast morphogenesis: signalling, cytoskeleton and cell cycle. *Curr. Opin. Cell Biol.* *7*, 845-855.

Lagorce,A., Hauser,N.C., Labourdette,D., Rodriguez,C., Martin-Yken,H., Arroyo,J., Hoheisel,J.D., and Francois,J. (2003). Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *278*, 20345-20357.

Larsson,C. (2005). Protein kinase C and the regulation of the actin cytoskeleton. *Cell Signal.*

Lechner,M., Wojnar,P., and Redl,B. (2001). Human tear lipocalin acts as an oxidative-stress-induced scavenger of potentially harmful lipid peroxidation products in a cell culture system. *Biochem. J.* 356, 129-135.

Lee,J., Godon,C., Lagniel,G., Spector,D., Garin,J., Labarre,J., and Toledano,M.B. (1999). Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274, 16040-16046.

Lee,K.S. and Levin,D.E. (1992). Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase (BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol. Cell Biol.* 12, 172-182.

Lee,K.S., Irie,K., Gotoh,Y., Watanabe,Y., Araki,H., Nishida,E., Matsumoto,K., and Levin,D.E. (1993). A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol. Cell Biol.* 13, 3067-3075.

Lee,K.S., Hines,L.K., and Levin,D.E. (1993). A pair of functionally redundant yeast genes (PPZ1 and PPZ2) encoding type 1-related protein phosphatases function within the PKC1-mediated pathway. *Mol. Cell Biol.* 13, 5843-5853.

Levin,D.E., Fields,F.O., Kunisawa,R., Bishop,J.M., and Thorner,J. (1990). A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* 62, 213-224.

Levin,D.E. and Bartlett-Heubusch,E. (1992). Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J. Cell Biol.* 116, 1221-1229.

Levin,D.E. (2005). Cell Wall Integrity Signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 69, 262-291.

Li,Y., Moir,R.D., Sethy-Coraci,I.K., Warner,J.R., and Willis,I.M. (2000). Repression of ribosome and tRNA synthesis in secretion-defective cells is signaled by a novel branch of the cell integrity pathway. *Mol. Cell Biol.* 20, 3843-3851.

Lillie,S.H. and Brown,S.S. (1994). Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the

same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 125, 825-842.

Lipke,P.N. and Ovalle,R. (1998). Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180, 3735-3740.

Liu,H.P. and Bretscher,A. (1989). Disruption of the single tropomyosin gene in yeast results in the disappearance of actin cables from the cytoskeleton. *Cell* 57, 233-242.

Lum,P.Y., Armour,C.D., Stepaniants,S.B., Cavet,G., Wolf,M.K., Butler,J.S., Hinshaw,J.C., Garnier,P., Prestwich,G.D., Leonardson,A., Garrett-Engele,P., Rush,C.M., Bard,M., Schimmack,G., Phillips,J.W., Roberts,C.J., and Shoemaker,D.D. (2004). Discovering modes of action for therapeutic compounds using a genome-wide screen of yeast heterozygotes. *Cell* 116, 121-137.

Mack,D., Nishimura,K., Dennehey,B.K., Arbogast,T., Parkinson,J., Toh-e A, Pringle,J.R., Bender,A., and Matsui,Y. (1996). Identification of the bud emergence gene BEM4 and its interactions with rho-type GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16, 4387-4395.

Madden,K., Sheu,Y.J., Baetz,K., Andrews,B., and Snyder,M. (1997). SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* 275, 1781-1784.

Madden,K. and Snyder,M. (1998). Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu. Rev. Microbiol.* 52, 687-744.

Manning,B.D., Padmanabha,R., and Snyder,M. (1997). The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 8, 1829-1844.

Marcoux,N., Bourbonnais,Y., Charest,P.M., and Pallotta,D. (1998). Overexpression of MID2 suppresses the profilin-deficient phenotype of yeast cells. *Mol. Microbiol.* 29, 515-526.

Marcoux,N., Cloutier,S., Zakrzewska,E., Charest,P.M., Bourbonnais,Y., and Pallotta,D. (2000). Suppression of the profilin-deficient phenotype by the RHO2 signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156, 579-592.

Marini,N.J., Meldrum,E., Buehrer,B., Hubberstey,A.V., Stone,D.E., Traynor-Kaplan,A., and Reed,S.I. (1996). A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of Cdc28 at START. *EMBO J.* *15*, 3040-3052.

Martin,H., Rodriguez-Pachon,J.M., Ruiz,C., Nombela,C., and Molina,M. (2000). Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *275*, 1511-1519.

Mattison,C.P., Spencer,S.S., Kresge,K.A., Lee,J., and Ota,I.M. (1999). Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol. Cell Biol.* *19*, 7651-7660.

Mazur,P., Morin,N., Baginsky,W., el Sherbeini,M., Clemas,J.A., Nielsen,J.B., and Foor,F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol. Cell Biol.* *15*, 5671-5681.

Mazzei,G.J., Schmid,E.M., Knowles,J.K., Payton,M.A., and Maundrell,K.G. (1993). A Ca(2+)-independent protein kinase C from fission yeast. *J. Biol. Chem.* *268*, 7401-7406.

Mazzoni,C., Zarov,P., Rambourg,A., and Mann,C. (1993). The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *123*, 1821-1833.

Mellor,H. and Parker,P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* *332* (Pt 2), 281-292.

Mizuta,K. and Warner,J.R. (1994). Continued functioning of the secretory pathway is essential for ribosome synthesis. *Mol. Cell Biol.* *14*, 2493-2502.

Moffat,J. and Andrews,B. (2004). Late-G1 cyclin-CDK activity is essential for control of cell morphogenesis in budding yeast. *Nat. Cell Biol.* *6*, 59-66.

Moseley,J.B., Sagot,I., Manning,A.L., Xu,Y., Eck,M.J., Pellman,D., and Goode,B.L. (2004). A conserved mechanism for Bni1- and mDia1-induced actin assembly and dual regulation of Bni1 by Bud6 and profilin. *Mol. Biol. Cell* *15*, 896-907.

Mulholland,J., Preuss,D., Moon,A., Wong,A., Drubin,D., and Botstein,D. (1994). Ultrastructure of the yeast actin cytoskeleton and its association with the plasma membrane. *J. Cell Biol.* *125*, 381-391.

Nanduri,J. and Tartakoff,A.M. (2001). The arrest of secretion response in yeast: signaling from the secretory path to the nucleus via Wsc proteins and Pkc1p. *Mol. Cell* *8*, 281-289.

Nanduri,J. and Tartakoff,A.M. (2001). Perturbation of the nucleus: a novel Hog1p-independent, Pkc1p-dependent consequence of hypertonic shock in yeast. *Mol. Biol. Cell* *12*, 1835-1841.

Nefsky,B. and Bretscher,A. (1992). Yeast actin is relatively well behaved. *Eur. J. Biochem.* *206*, 949-955.

Nierras,C.R. and Warner,J.R. (1999). Protein kinase C enables the regulatory circuit that connects membrane synthesis to ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *274*, 13235-13241.

Nishizuka,Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. *Nature* *308*, 693-698.

Noda,T. and Ohsumi,Y. (1998). Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast. *J. Biol. Chem.* *273*, 3963-3966.

Novick,P. and Botstein,D. (1985). Phenotypic analysis of temperature-sensitive yeast actin mutants. *Cell* *40*, 405-416.

Ono,Y., Fujii,T., Ogita,K., Kikkawa,U., Igarashi,K., and Nishizuka,Y. (1987). Identification of three additional members of rat protein kinase C family: delta-, epsilon- and zeta-subspecies. *FEBS Lett.* *226*, 125-128.

Orlean, P., (1997). Biogénesis of yeast wall and surface components. In: *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. J. R. Pringle, J. R. Broach and E. W. Jones, eds. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Pp. 229-362.

Osada,S., Mizuno,K., Saido,T.C., Akita,Y., Suzuki,K., Kuroki,T., and Ohno,S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* *265*, 22434-22440.

Osada,S., Mizuno,K., Saido,T.C., Suzuki,K., Kuroki,T., and Ohno,S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell Biol.* *12*, 3930-3938.

Ozaki-Kuroda,K., Yamamoto,Y., Nohara,H., Kinoshita,M., Fujiwara,T., Irie,K., and Takai,Y. (2001). Dynamic localization and function of Bni1p at the sites of directed growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* *21*, 827-839.

Ozaki,K., Tanaka,K., Imamura,H., Hihara,T., Kameyama,T., Nonaka,H., Hirano,H., Matsuura,Y., and Takai,Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* *15*, 2196-2207.

Page,B.D. and Snyder,M. (1992). CIK1: a developmentally regulated spindle pole body-associated protein important for microtubule functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* *6*, 1414-1429.

Palmer,R.E., Sullivan,D.S., Huffaker,T., and Koshland,D. (1992). Role of astral microtubules and actin in spindle orientation and migration in the budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *119*, 583-593.

Paravicini,G. and Friedli,L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol. Gen. Genet.* *251*, 682-691.

Parent,S.A., Nielsen,J.B., Morin,N., Chrebet,G., Ramadan,N., Dahl,A.M., Hsu,M.J., Bostian,K.A., and Foor,F. (1993). Calcineurin-dependent growth of an F. *J. Gen. Microbiol.* *139*, 2973-2984.

Park,J.I., Collinson,E.J., Grant,C.M., and Dawes,I.W. (2004). Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. *J. Biol. Chem.*

Perlman,D. and Halvorson,H.O. (1981). Distinct repressible mRNAs for cytoplasmic and secreted yeast invertase are encoded by a single gene. *Cell* 25, 525-536.

Perlman,D., Halvorson,H.O., and Cannon,L.E. (1982). Presecretory and cytoplasmic invertase polypeptides encoded by distinct mRNAs derived from the same structural gene differ by a signal sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 781-785.

Philip,B. and Levin,D.E. (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol. Cell Biol.* 21, 271-280.

Posas,F., Camps,M., and Arino,J. (1995). The PPZ protein phosphatases are important determinants of salt tolerance in yeast cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13036-13041.

Pruyne,D. and Bretscher,A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 4), 571-585.

Pruyne,D., Legesse-Miller,A., Gao,L., Dong,Y., and Bretscher,A. (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20, 559-591.

Rajavel,M., Philip,B., Buehrer,B.M., Errede,B., and Levin,D.E. (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 19, 3969-3976.

Roemer,T., Paravicini,G., Payton,M.A., and Bussey,H. (1994). Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J. Cell Biol.* 127, 567-579.

Roumanie,O., Weinachter,C., Larrieu,I., Crouzet,M., and Doignon,F. (2001). Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 506, 149-156.

Ruiz-Herrera,J. and Martinez-Espinoza,A.D. (1999). Chitin biosynthesis and structural organization in vivo. *EXS* 87, 39-53.

Sagot,I., Rodal,A.A., Moseley,J., Goode,B.L., and Pellman,D. (2002). An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat. Cell Biol.* 4, 626-631.

Santos,B. and Snyder,M. (1997). Targeting of chitin synthase 3 to polarized growth sites in yeast requires Chs5p and Myo2p. *J. Cell Biol.* 136, 95-110.

Saurin,A.J., Borden,K.L., Boddy,M.N., and Freemont,P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* 21, 208-214.

Schmelzle,T., Helliwell,S.B., and Hall,M.N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol. Cell Biol.* 22, 1329-1339.

Schmidt,A., Bickle,M., Beck,T., and Hall,M.N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531-542.

Schmidt,A. and Hall,M.N. (1998). Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14, 305-338.

Schmidt,A., Schmelzle,T., and Hall,M.N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* 45, 1433-1441.

Schmitz,H.P., Huppert,S., Lorberg,A., and Heinisch,J.J. (2002). Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J. Cell Sci.* 115, 3139-3148.

Schmitz,H.P., Lorberg,A., and Heinisch,J.J. (2002). Regulation of yeast protein kinase C activity by interaction with the small GTPase Rho1p through its amino-terminal HR1 domain. *Mol. Microbiol.* 44, 829-840.

Schott,D., Ho,J., Pruyne,D., and Bretscher,A. (1999). The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J. Cell Biol.* 147, 791-808.

Shi,R.X., Ong,C.N., and Shen,H.M. (2005). Protein kinase C inhibition and x-linked inhibitor of apoptosis protein degradation contribute to the sensitization effect of

luteolin on tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis in cancer cells. *Cancer Res.* 65, 7815-7823.

Sidorova,J.M., Mikesell,G.E., and Breeden,L.L. (1995). Cell cycle-regulated phosphorylation of Swi6 controls its nuclear localization. *Mol. Biol. Cell* 6, 1641-1658.

Smits,G.J., Kapteyn,J.C., Van Den,E.H., and Klis,F.M. (1999). Cell wall dynamics in yeast. *Curr. Opin. Microbiol.* 2, 348-352.

Staleva,L., Hall,A., and Orlow,S.J. (2004). Oxidative stress activates FUS1 and RLM1 transcription in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an oxidant-dependent Manner. *Mol. Biol. Cell* 15, 5574-5582.

Stevens,T., Esmon,B., and Schekman,R. (1982). Early stages in the yeast secretory pathway are required for transport of carboxypeptidase Y to the vacuole. *Cell* 30, 439-448.

Storz,G., Christman,M.F., Sies,H., and Ames,B.N. (1987). Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 8917-8921.

Toda,T., Shimanuki,M., and Yanagida,M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J.* 12, 1987-1995.

Toda,T., Niwa,H., Nemoto,T., Dhut,S., Eddison,M., Matsusaka,T., Yanagida,M., and Hirata,D. (1996). The fission yeast *sts5+* gene is required for maintenance of growth polarity and functionally interacts with protein kinase C and an osmosensing MAP-kinase pathway. *J. Cell Sci.* 109 (Pt 9), 2331-2342.

Tolliday,N., VerPlank,L., and Li,R. (2002). Rho1 directs formin-mediated actin ring assembly during budding yeast cytokinesis. *Curr. Biol.* 12, 1864-1870.

Torres,J., Di Como,C.J., Herrero,E., and De La Torre-Ruiz MA (2002). Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J. Biol. Chem.* 277, 43495-43504.

Torres,L., Martin,H., Garcia-Saez,M.I., Arroyo,J., Molina,M., Sanchez,M., and Nombela,C. (1991). A protein kinase gene complements the lytic phenotype of *Saccharomyces cerevisiae* *lyt2* mutants. *Mol. Microbiol.* 5, 2845-2854.

Vida,T.A. and Emr,S.D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 128, 779-792.

Vilella,F., Herrero,E., Torres,J., and De La Torre-Ruiz MA (2005). *Pkc1* and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, *Rom2* and *Mtl1*, are required for cellular responses to oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 280, 9149-9159.

Wach,A., Brachat,A., Alberti-Segui,C., Rebischung,C., and Philippsen,P. (1997). Heterologous *HIS3* marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 13, 1065-1075.

Walch-Solimena,C., Collins,R.N., and Novick,P.J. (1997). *Sec2p* mediates nucleotide exchange on *Sec4p* and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J. Cell Biol.* 137, 1495-1509.

Wang,T. and Bretscher,A. (1995). The rho-GAP encoded by *BEM2* regulates cytoskeletal structure in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* 6, 1011-1024.

Watanabe,M., Chen,C.Y., and Levin,D.E. (1994). *Saccharomyces cerevisiae* *PKC1* encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J. Biol. Chem.* 269, 16829-16836.

Watanabe,Y., Irie,K., and Matsumoto,K. (1995). Yeast *RLM1* encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the *Mpk1* (*Slt2*) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.* 15, 5740-5749.

Watanabe,Y., Takaesu,G., Hagiwara,M., Irie,K., and Matsumoto,K. (1997). Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, *Rlm1*, which has transcriptional activity regulated by the *Mpk1* (*Slt2*) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell Biol.* 17, 2615-2623.

Whitehead,I.P., Campbell,S., Rossman,K.L., and Der,C.J. (1997). Dbl family proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1332, F1-23.

Widmann,C., Gibson,S., Jarpe,M.B., and Johnson,G.L. (1999). Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 79, 143-180.

Winsor,B. and Schiebel,E. (1997). Review: an overview of the *Saccharomyces cerevisiae* microtubule and microfilament cytoskeleton. *Yeast* 13, 399-434.

Winther,J.R., Stevens,T.H., and Kielland-Brandt,M.C. (1991). Yeast carboxypeptidase Y requires glycosylation for efficient intracellular transport, but not for vacuolar sorting, in vivo stability, or activity. *Eur. J. Biochem.* 197, 681-689.

Yan,Q. and Lennarz,W.J. (2002). Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits: a glycosylatable photoprobe binds to the luminal domain of Ost1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 15994-15999.

Yang,H.C. and Pon,L.A. (2002). Actin cable dynamics in budding yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99, 751-756.

Zahner,J.E., Harkins,H.A., and Pringle,J.R. (1996). Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* 16, 1857-1870.

Zarzov,P., Mazzoni,C., and Mann,C. (1996). The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* 15, 83-91.

Zehavi-Willner,T., Kosower,E.M., Hunt,T., and Kosower,N.S. (1971). Glutathione. V. The effects of the thiol-oxidizing agent diamide on initiation and translation in rabbit reticulocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 228, 245-251.

Zhao,C., Jung,U.S., Garrett-Engele,P., Roe,T., Cyert,M.S., and Levin,D.E. (1998). Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol. Cell Biol.* 18, 1013-1022.

APÉNDICE 1

Pkc1 and the Upstream Elements of the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, Are Required for Cellular Responses to Oxidative Stress*

Received for publication, September 27, 2004, and in revised form, January 4, 2005
Published, JBC Papers in Press, January 6, 2005, DOI 10.1074/jbc.M411062200

Felipe Vilella, Enrique Herrero, Jordi Torres, and Maria Angeles de la Torre-Ruiz‡

From the Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Alcalde Rovira Roure 44, Universitat de Lleida, Lleida 25198, Spain

In this study we analyze the participation of the PKC1-MAPK cell integrity pathway in cellular responses to oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. Evidence is presented demonstrating that only Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway are essential for cell survival upon treatment with two oxidizing agents, diamide and hydrogen peroxide. Mtl1 is characterized for the first time as a cell-wall sensor of oxidative stress. We also show that the actin cytoskeleton is a cellular target for oxidative stress. Both diamide and hydrogen peroxide provoke a marked depolarization of the actin cytoskeleton, being Mtl1, Rom2 and Pkc1 functions all required to restore the correct actin organization. Diamide induces the formation of disulfide bonds in newly secreted cell-wall proteins. This mainly provokes structural changes in the cell outer layer, which activate the PKC1-MAPK pathway and hence the protein kinase Slt2. Our results led us to the conclusion that Pkc1 activity is required to overcome the effects of oxidative stress by: (i) enhancing the machinery required to repair the altered cell wall and (ii) restoring actin cytoskeleton polarity by promoting actin cable formation.

Cells are constantly exposed to a series of environmental stresses, which are sensed by complex signal transduction pathways that are responsible for cellular damage repair and adaptation responses. These responses are mediated by (mitogen-activated protein kinase (MAPK)¹ cascades in eukaryotic cells.

In the *Saccharomyces cerevisiae*, the PKC1-MAPK cell integrity pathway is involved in responses to a wide variety of stresses, including heat-shock (1), hypoosmotic shock (2), nutritional stress (3), and those associated with any other injuries that alter the integrity of the outer layer of cells. These environmental signals are generally sensed by Mid2 (4) and Wsc family (5) cell surface proteins. Mtl1 is a putative cell membrane sensor with 50% homology to Mid2 (6, 4). Mtl1 has been characterized as a multicopy suppressor of the absence of Rgd1,

a protein that functions as a GTPase-activating protein for Rho3 and Rho4 proteins (7) and as a multicopy suppressor of Rho1 functions (8).

Cell surface sensors transmit signals to Rom2, a guanine exchange factor protein of the GTP-binding protein Rho1. Rho1 then activates the Pkc1 protein kinase, which in turn activates an MAPK module; Pkc1 phosphorylates Bck1, a MAPK kinase kinase, which transmits the signal to both MAPK kinases, Mkk1 and Mkk2. Those finally activate the last member of the cascade, Slt2/Mpk1, by phosphorylating both the Thr¹⁹⁰ and Tyr¹⁹² residues of this MAPK (the PKC1-MAPK pathway reviewed in Refs 9 and 10). Rlm1, a transcription factor involved in the activation of cell wall genes, and Swi6 (a transcription factor involved in cell cycle regulation) are both targets for Slt2. Activation of Slt2 correlates to activation of both downstream events (11) (Fig. 1).

The upper elements of the PKC1-MAPK pathway are involved in the organization of the actin cytoskeleton upon cell wall stress. It has been reported that hyperactivation of either Pkc1 or Rho1 alone causes depolarization of actin cables in patches dispersed throughout the cytoplasm (12). In addition, the function of both Rho1 and Pkc1 is necessary for actin to become depolarized following heat stress (12).

Actin cable assembly relies on the activity of the two redundant formins, Bni1 and Bnr1 (13, 14). Rho1 is able to localize to actin patches (15) and is required for the activation of formins at high temperatures through Pkc1 (16). This emphasizes the role of these proteins in polarized growth and morphogenesis.

Oxygen is a vital molecule, but at the same time, it is responsible for provoking oxidative stress in cells, and causing cellular damage to various macromolecules (17). Budding yeast constitutes an optimal eukaryotic model for studying oxidative stress responses (18). However, although in the case of environmental stresses, such as osmotic, nutritional, and heat-shock stresses, there are specific signal transduction pathways that sense and transmit the different signals to specific components in *S. cerevisiae* (19), there are no well characterized MAPK pathways for sensing and signaling oxidative stresses to the cytoplasm and nucleus. Nevertheless, there is considerable information in the literature detailing the nuclear transcriptional factors responsible for the induction of specific genes in response to oxidative stress in yeast. These are Yap1, Skn7, and Msn2/4 (for a review, see Ref. 18).

In this study, we decided to investigate whether the cell integrity pathway in *S. cerevisiae* played a role in oxidative stress responses based on the following observations: (i) Skn7 has been shown to interact with the GTPase Rho1 (20); (ii) it has been reported that Msn2/Msn4 participate with the PKC1-MAPK pathway in the compensatory mechanism that is triggered by cell wall mutations (21); (iii) genome-wide analysis (22) indicates that the agent diamide induces the activation of

* This work was supported by the Spanish Ministry of Science and Technology (Grant BMC2001-1213-C02-01), the Instituto de Salud Carlos III (Spanish Ministry of Health and Consumption, Grant PI030734), and the Generalitat de Catalunya (Grant 2001-SGR-00305). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

‡ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 34-973-702-409; Fax: 34-973-702-426; E-mail: madelatorre@cmb.udl.es.

¹ The abbreviations used are: MAPK, mitogen-activated protein kinase; PKC, protein kinase C; GFP, green fluorescent protein; HA, hemagglutinin; DTNB, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid); DTT, dithiothreitol.

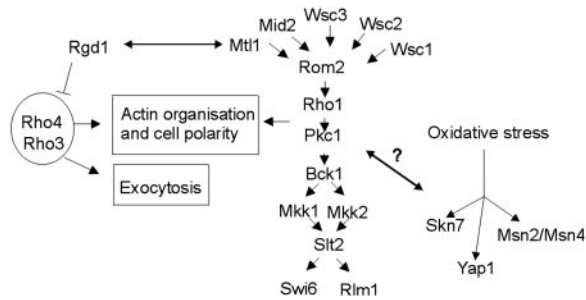


FIG. 1. A schematic diagram showing some elements directly or indirectly related with some of the components of the cell integrity pathway, which play a role in the cellular responses against oxidative stress in *S. cerevisiae*.

genes regulated by Rlm1; and (iv) in human cells, isoforms of PKC are known to be either activated or inactivated by oxidative stress, and this is causally associated with tumorigenesis (for a review see Ref. 23).

We demonstrate that Pkc1, and the upper elements of the cell integrity pathway, are required for survival and adaptation to the oxidative stress provoked by two different oxidizing agents: hydrogen peroxide and diamide. We also report a new function for Mtl1 as a cell membrane receptor for oxidative stress. We present a detailed study demonstrating that the major effect caused by diamide is the oxidation of cell wall proteins, which activates the cell integrity pathway. Hydrogen peroxide exercises its action at the intracellular level, mainly by affecting a cellular function that is closely related to the polarization of the actin cytoskeleton. Finally, we demonstrate that restoration of cell polarity and recovery from oxidative stress occurs in a Pkc1-dependent manner.

MATERIALS AND METHODS

Yeast Strains and Gene Disruptions—The yeast strains used in this study are listed in Table I. *MTL1* was disrupted by the one-step disruption method using the *kanMX4* module (24), whereas the *WSC4* gene was disrupted using the *natMX4* module (25).

GFP-Pkc1 was constructed as follows: a 1-kb XhoI-KpnI fragment from pRS416-sGFP (26) was cloned at the SmaI site of the pFA6a plasmid containing the *kanMX4* cassette. The resulting plasmid, pCYC86, was provided by Dr. Marti Aldea's laboratory. We then used PCR to amplify the sGFP-*kanMX4* module from pCYC86. We did this by using oligonucleotides designed to insert the product in-frame, just before the stop codon of the genomic *PKC1* sequence to obtain the fusion protein Pkc1-GFP. These were: MMO218, 5'-gcaagaagagtttagaggatttt-CCTTTATGCCAGATGATTTGGATTTACCAGCTGAAGCTTCGTA-CGC; MMO219, 5'-CCGCTTAGATGTTTTATATAAAAATTAATAAAT-CATGGCATGACCTTTCTgcatagggcaactagtgatg, where the use of lowercase letters represents the sequence used to amplify the *kanMX4* cassette, and the use of capital letters represents the sequence homologous to the C-terminal domain of *PKC1* designed for recombinational integration.

Plasmids—Plasmid pMM126 contains *PKC1* under the *tetO₇* promoter and is tagged with the HA epitope, as described before (27). To detect the total amount of Slt2 protein in protein extracts, we used yeast strains transformed with a YEP352 plasmid derivative containing the Slt2 open reading frame under its own promoter and tagged with the HA epitope in C-terminal (a gift from Dr. Maria Molina). All the strains used in this report were transformed with this plasmid, and the total amount of Slt2 was determined by using the anti-hemagglutinin monoclonal antibody (right panel), which was established as a loading control throughout this study.

Media and Growth Conditions—Yeasts were grown in SC (0.67% yeast nitrogen base, 2% glucose, and auxotrophic requirements) or SD (SC plus drop-out mixture) media (28) plus the required amino acids. Where needed, sorbitol was added to a final concentration of 0.8 M final concentration. Diamide (Sigma) was prepared in dimethyl sulfoxide, whereas hydrogen peroxide (Sigma) was diluted with sterile Milli Q water.

Yeast Extracts and Immunoblot Analyses and Conditions for the Use of the Anti-phospho-p44/42 and Anti-Swi6—These analyses were per-

formed as described previously (27). The anti-HA antibody was used at a dilution of 1:1000 in TBST buffer (20 mM Tris-HCl, pH 8, 0.125 M NaCl, 0.1% tween 20) in the presence of 0.25% milk fat, and the corresponding horseradish peroxidase-linked anti-mouse secondary antibody, at a dilution of 1:10,000 in TBST containing 0.25% milk fat.

Sulfhydryl Determination with DTNB (Ellman's Reagent)—Yeast cells were grown in SC medium at 25 °C (to an initial $A_{600} = 0.6$). The assay was essentially conducted as described before (29). Aliquots of 30 ml of culture were used for each treatment. They were centrifuged at 3,000 rpm for 5 min and resuspended in 2 ml of Tris-HCl buffer (10 mM, pH 7.4), and then treated and incubated at 4 °C for 30 min as follows: (i) control without treatment; (ii) 20 mM dithiothreitol (DTT); (iii) 1 mM H_2O_2 ; (iv) 2 mM H_2O_2 ; and (v) 4 mM diamide. After that, samples were washed three times with the same buffer. Next, they were resuspended in 1 ml of 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, containing 20 μ M 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB, Ellman's reagent), and incubated for 10 min at room temperature. Finally, samples were centrifuged at 10,000 rpm for 3 min, and the supernatants were used to measure the optical density at 412 nm. The amount of free SH residues was quantified at this wavelength. The reducing agent DTT was used as a control to quantify the maximum amount of free SH residues on cell surfaces. Osmotic stabilization was achieved in *pkc1* and wild type cell cultures by adding sorbitol to a final concentration of 0.8 M.

Zymolyase Digestions—Cells were exponentially grown in SC medium at 25 °C and subsequently treated with 4 mM diamide and 1 mM hydrogen peroxide for 30 and 60 min, respectively. Mock treated cells were used as controls. After the treatments, 10 ml of each cell culture were centrifuged at 2,500 rpm for 5 min. The resulting pellets were washed first with 10 ml of sterile Milli Q water and then with 5 ml of Tris-HCl (50 mM, pH 9.4). The final pellet was resuspended in the last buffer. Samples of 1 ml of volume of each culture were added to 0.2 or 0.5 units zymolyase. Cell lysis was spectrophotometrically quantified at 600 nm.

Actin Staining—Cells growing exponentially at 25 °C were stained with rhodamine-phalloidin as described before (3).

Electron Microscopy—Log phase cells were treated, or mock treated, with 1 mM diamide for 9 h, then fixed with 2.5% glutaraldehyde for 1 h in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4) at 4 °C. Samples were then washed three times in the same buffer followed by a second fixation in osmium tetroxide 1% in H_2O for 2 h at 4 °C. After washing, the pellets were processed by dehydration using a series of acetones from 30–100% followed by propylene oxide treatment. Samples were then incubated in a resin (Durcupan ACM Epoxy Resin, Fluka): propylene oxide 3:1 for 45 min, 1:1 for 45 min, and 1:3 for 45 min, before embedding in resin and curing. Sections were cut and treated with lead citrate before viewing under a Zeiss 910 transmission electron microscope.

RESULTS

Oxidative Stress Provoked by Diamide and Hydrogen Peroxide Activates the Cell Integrity Pathway—Given the role that the cell integrity pathway plays in the response to a wide variety of stresses, we decided to investigate whether this pathway was also involved in the oxidative stress response. Exponentially growing cells were treated either with diamide or hydrogen peroxide for the indicated times (Fig. 2A). Samples were taken for Western blot to detect activated Slt2, using the anti-phospho-p44/42 MAPK antibody raised against dually phosphorylated Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴-p44/42 MAPK. It is generally accepted that detection of the doubly phosphorylated form of Slt2 provides a measure of kinase activation. The concentrations of the two oxidizing agents chosen for this study were sublethal and did not cause cell death during the course of the experiment. We had previously tested the following concentrations for the two agents: 0.5, 1, 2, 2.5, 3, and 5 mM in the case of hydrogen peroxide, and 1, 2, and 4 mM for diamide (not shown). During the first 3 h of treatment, we observed that concentrations of hydrogen peroxide of <1 mM failed to provoke a higher induction in Slt2 activity, whereas concentrations of >2 mM caused no detectable activation whatsoever. Increasing the concentrations of diamide had a different effect in Slt2 activity. Greater concentrations of diamide provoked higher inductions of Slt2 double phosphorylation, although these were concomitant with an increase in cell lethality (results not shown in this study).

TABLE I
Yeast strains used in this work

Strain	Relevant genotype	Reference
AN3-5D	<i>MAT[?], ura3-52, trp1, leu2-3,113, sec1ts</i>	Obtained from L. Castillo
CML125	<i>MATα leu2-3,112 ura3-52 trp1 his4 can1^r</i>	de la Torre, <i>et al.</i> (27)
CML128	<i>MATα as CML125</i>	Gallego, <i>et al.</i> (44)
CML399	<i>MATα slt2::URA3</i>	de la Torre, <i>et al.</i> (27)
DL2357	<i>MATα mtl1::HIS4 mid2::URA3</i>	Obtained from D. Levin
MML200	<i>MATα bck1::kanMx4</i>	de la Torre, <i>et al.</i> (27)
MML304	<i>MATα pkc1::LEU2(pBCK1-20)</i>	de la Torre, <i>et al.</i> (27)
MML344	<i>MATα pkc1::LEU2</i>	de la Torre, <i>et al.</i> (27)
MML357	<i>MATα wsc1::kanMx4</i>	de la Torre, <i>et al.</i> (27)
MML363	<i>MATα rom2::kanMx4</i>	This work
MML384	<i>MATα wsc2::natMx4</i>	This work
MML387	<i>MATα mid2::kanMx4</i>	de la Torre, <i>et al.</i> (27)
MML392	<i>MATα wscs1::URA wsc2::natMx4</i>	This work
MML393	<i>MATα mid2::kanMx4 wsc1::URA</i>	This work
MML411	<i>MATα Galpkc1::kanMx4</i>	This work
MML429	<i>MATα wsc3::kanMx4</i>	This work
MML431	<i>MATα wsc4::natMx4</i>	This work
MML513	<i>MATα mtl1::kanMx4</i>	This work
MML550	<i>GFPPkc1</i>	This work
X2180-1A	<i>MATα SUC2 gal2 CUP1 ma10</i>	ATCC 204504

Diamide and peroxide treatments both significantly induced Slt2 dual phosphorylation, although the kinetics of activation differed, with activation occurring considerably sooner with diamide (Fig. 2A). The addition of the osmotic stabilizer sorbitol almost totally abolished Slt2-dependent diamide activation, suggesting that diamide might affect the cell wall. In contrast, sorbitol did not significantly affect Slt2 induction of activity provoked by peroxide. This seems to indicate that the mechanism that regulates the induction of the PKC1-MAPK pathway mediated by peroxide takes place inside the cells. Interestingly, when we used other peroxides such as *t*-butyl hydroperoxide we obtained similar results to those observed with H₂O₂ (not shown).

Activation of the PKC1-MAPK pathway and the Slt2 kinase was correlated to two different processes: phosphorylation of Swi6 and transcriptional induction of genes regulated by Rlm1. To check whether the increase in Slt2 phosphorylation dependent on oxidative stress could be correlated with the activity of the kinase and the pathway, we tested both processes in cells treated with either diamide or hydrogen peroxide. We thereby confirmed this hypothesis by means of two results. One consisted on the observation that Swi6 became hyperphosphorylated upon both peroxide or diamide treatments as shown in Fig. 2B. In this figure we observe a slower mobility hyperphosphorylated Swi6 band detected with a polyclonal antibody (Dr. Noel Lowndes gift). And the second that the transcriptional levels of *SLT2* and *PST1* (both genes are transcriptionally regulated by Rlm1) increased concomitantly with increases in Slt2 phosphorylation (Fig. 2B). From these results we conclude that when cells sense the oxidative stress provoked by diamide and hydrogen peroxide, Slt2 becomes activated.

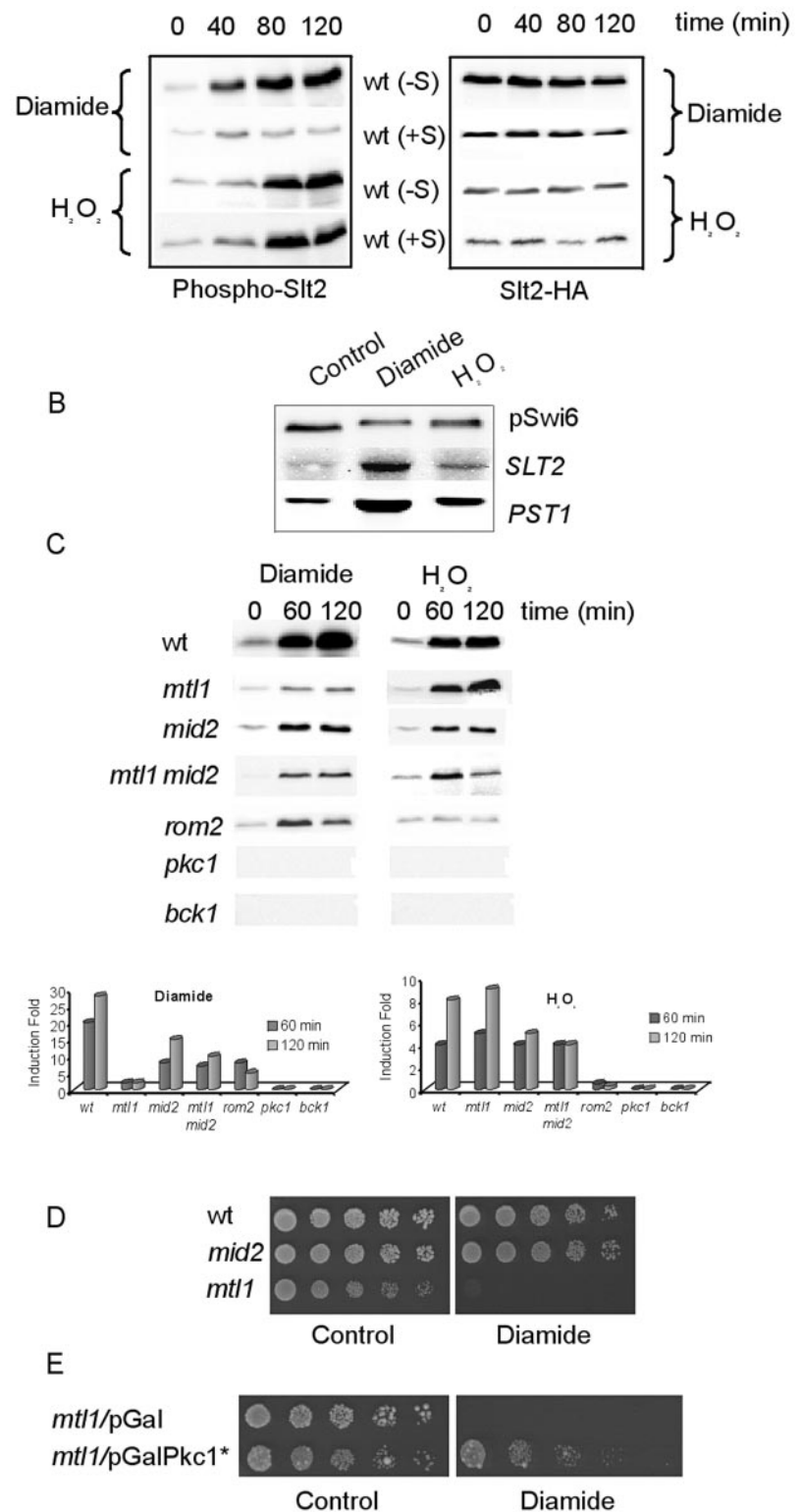
Mtl1 Senses and Transduces the Oxidative Effect Caused by Diamide—We tested *mid2*, *mtl1*, *wsc1*, *wsc2*, *wsc3*, and *wsc4* single mutants together with *wsc1wsc2*, *mid2wsc1*, and *mtl1mid2* double mutants for Slt2 phosphorylation due to the addition of diamide or hydrogen peroxide to check whether any of the known cell receptors related to the cell integrity pathway were involved in sensing and signaling the oxidative stress input. In this study we decided to perform a quantitative analysis of Slt2 activation by using the following criteria: we calculated the value called induction -fold, as the ratio between quantitative levels of Slt2 phosphorylation at either 30 or 60 min and Slt2 phosphorylation level measured at time 0 (untreated cells). All of the single quantified values were also normalized with respect to their respective loading controls (Fig. 2C). Therefore, the numerical values shown in this study

correspond to relative levels of Slt2 activation in samples treated with oxidative agents after different times of exposure. In some of the mutants used in this study the basal levels of Slt2 activity were significantly lower than those estimated for wild type cells. For this reason and to avoid possible misinterpretations we show the numerical values corresponding to Slt2 relative induction for each experiment. Relative induction of Slt2 phosphorylation was partly defective in *mid2* mutant cells treated with diamide, whereas it was almost completely eliminated in *mtl1* cells (Fig. 2C). The latter result led us to consider the possibility of Mtl1 and Mid2 being partly redundant for sensing the oxidative effect caused by diamide. To test this, we checked the status of Slt2 activity in the *mtl1mid2* double mutant and obtained that for this function Mid2 and Mtl1 did not constitute additive sensors of oxidative stress. The other cell wall receptor mutants assayed displayed no significant differences with respect to their respective single mutants and wild type cells (not shown). However, different results were obtained for hydrogen peroxide: none of the mutants showed marked deficiency in the relative induction of Slt2 phosphorylation with respect to wild type levels, although a partial reduction in Slt2 phosphorylation was observed in *mid2* and *mid2mtl1* mutants upon 2 h of exposure to hydrogen peroxide (Fig. 2C). To further characterize the role of Mtl1 and Mid2 as sensors of oxidative stress caused by diamide, we tested cell viability in the presence of diamide. We observed that only the absence of Mtl1 significantly impaired cell viability in response to diamide (Fig. 2D). Moreover, overexpression of the constitutive active Pkc1 allele under the Gal1 promoter (named Gal-Pkc1*, a gift from Dr. M. Hall, for details see Ref. 12) rescued both cell viability in the *mtl1* mutant (Fig. 2E). These results indicate that Mtl1 functions in the cell integrity pathway by sensing and transmitting the oxidative signal. Our results indicate that both Mtl1 and, at least in part, Mid2 are sensors for the diamide-mediated oxidative effect at the cell surface and play a role in the cell integrity pathway for this response. These findings are also consistent with the results shown above and suggest that hydrogen peroxide activates the pathway at the intracellular level.

Pkc1, Rom2, and Mtl1 Are Required for Transmitting the Oxidative Signal to Slt2 and for Cell Viability in Response to Oxidative Stress—Once demonstrated that oxidative stress activates Slt2 mediated by cell wall receptors, we investigated which elements of the cell integrity pathway were involved in this activation. To do this, we treated *rom2* mutant cells with

FIG. 2. Slt2 kinase activity is induced upon oxidative stress via Pkc1.

A, in all the experiments, cells were grown exponentially at 25 °C in SC medium plus amino acids and treated either with 4 mM diamide or 1 mM hydrogen peroxide. Cells harboring the YEP352-Slt2-HA plasmid (see "Materials and Methods") were treated either with diamide or hydrogen peroxide for the indicated times. "S" refers to 0.8 M sorbitol added to the culture medium. Double phosphorylation of Slt2 was detected using the p42/44 antibody (*left panel*), whereas total Slt2 was detected using the anti-hemagglutinin monoclonal antibody (*right panel*), which was used as a loading control in this study. B, samples from the previous experiment were collected after 30 min and processed for Northern (using *SLT2* and *PST1* as probes) and Western blotting (using the polyclonal anti-Swi6 antibody). C, exponentially growing cells from CML128 (wild type), *mtl1*, *mid2*, *rom2*, *pkc1*, and *bck1* strains were treated either with diamide or hydrogen peroxide, and samples were collected for Western blot after 1 and 2 h of treatment. Double phosphorylation of Slt2 was detected using p44/42 antibody. Induction of Slt2 activity was quantified and normalized with respect to the loading control (band quantified with p44/42 versus band quantified with anti-HA antibodies) and represented in the form of a histogram. D, wild type and *mtl1* mutant cells were exponentially grown in SC plus 2% glucose medium at 25 °C and then plated onto SC plates containing or not 0.75 mM diamide. They were subsequently incubated at 25 °C for 3 days. E, *mtl1* cells were transformed with the GalPkc1* plasmid (Delley and Hall (12)) and with the empty vector YE-plac112. Cells were grown in SC plus 2% galactose for 9 h at 25 °C. 4 mM diamide was then added for 4 h, and cultures were serially diluted and spotted on plates containing SC plus 2% glucose. The plates were incubated at 25 °C for 3 days.

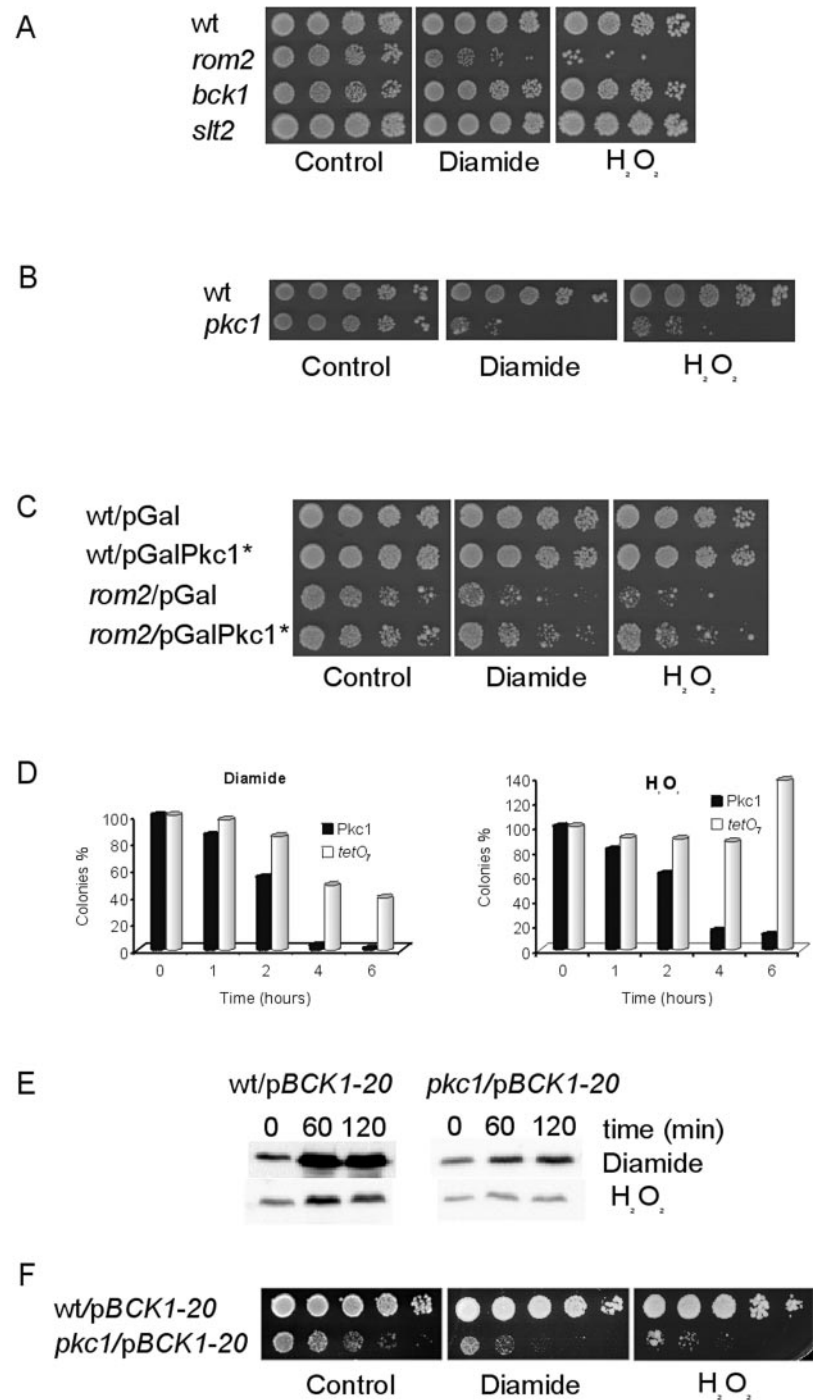


either diamide or hydrogen peroxide, and upon both treatments a marked defect in Slt2 phosphorylation was observed, with respect to wild type cells (Fig. 2C).

We also confirmed that Slt2 activation was totally eliminated in both *pkc1* and *bck1* mutants following treatments with both peroxide and diamide (Fig. 2C). These results demonstrate that upstream Pkc1 elements are required to transduce the activating signal to Slt2 upon oxidative treatment. However, at present we still cannot rule out the possibility of oxidants directly activating elements downstream of Pkc1.

We tested cell viability in various mutants after diamide and peroxide treatment to gain an understanding of the physiological consequences of the involvement of the cell integrity pathway in oxidative stress response (Fig. 3). We observed that *rom2* and *pkc1* deletions were significantly sensitive to the oxidizing agents, whereas *bck1* and *mpk1* cell growth was indistinguishable from that of wild type cells (Fig. 3, A and B). It is relevant to note that we obtained the same results (qualitatively speaking) when checking with different concentrations of the two agents: 0.5, 1, 1.5, 2, 4, and 6 mM

FIG. 3. Rom2 and Pkc1 are directly involved in cell survival after oxidative stress. *A*, cells from CML128, *rom2*, *bck1*, and *slt2* strains were grown at 25 °C to logarithmic phase, and serial dilutions were performed and subsequently spotted onto SC plates, SC plus 1 mM hydrogen peroxide, and SC plus 0.75 mM diamide. Plates were incubated for 4 days before taking photographs. *B*, both CML128 and *pkc1* strains were exponentially grown and plated on SC plates plus 0.8 mM sorbitol containing either 1 mM hydrogen peroxide or 0.75 mM diamide. *C*, wild type and *rom2* cells transformed with the Gal-Pkc1* plasmid, or alternatively with empty plasmids, were treated as in Fig. 1E. *D*, wild type cells and wild type cells transformed with the centromeric plasmid pMM126 harboring the *PKC1* gene under the inducible *tetO7* promoter, tagged in the N terminus with the HA epitope, were exponentially grown in SD medium, and then treated with either 1 mM peroxide or 0.75 mM diamide for the indicated times. About 500 cells were plated on minimum medium plates without the oxidizing agent to count the number of viable cells. These results represent the average of three independent repetitions. *E*, wild type and *pkc1* cells, each harboring the pBCK1-20 plasmid, were treated and processed for Western blot with the p44/42 antibody as in Fig. 1C. *F*, wild type and *pkc1* cells, each harboring the pBCK1-20 plasmid, were treated and processed as in *A*.



in the case of hydrogen peroxide, and 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, and 6 mM in the case of the diamide (data not shown). It is important to note that lack of viability of *pkc1* due to the presence of the oxidizing agents was not totally rescued by sorbitol (Fig. 3B). This strongly suggests that Pkc1 function is essential for cell viability under oxidative conditions on despite of the presence of sorbitol as osmotic stabilizer and cell wall protective agent. We next performed cell viability studies in a *rom2* mutant that had been transformed using the plasmid GalPkc1*. We observed that its overexpression compensated for *rom2* cell death caused by diamide and peroxide (Fig. 3C). These data support that the Rom2 and Pkc1 functions are needed for cell survival against oxidation. The MAPK module downstream of Pkc1 (see Fig. 4A, *bck1* and *mpk1* viability) is dispensable for this cellular response.

We overexpressed Pkc1 under the *tetO7* promoter (30) and subsequently performed cell viability analysis upon addition of diamide or peroxide, to ascertain whether Pkc1 has a direct role in cell viability when subjected to oxidative treatment. In both cases, overproduction of Pkc1 clearly provoked a marked increase in cell viability in wild type cells exposed to either of both oxidizing agents. Nevertheless, we observed that overproduction of Pkc1 was significantly more efficient at rescuing cell viability upon peroxide treatment than it was upon application of diamide (Fig. 3D).

*The MAPK Module Downstream of Pkc1 Is Dispensable for Cell Viability Upon Oxidative Stress—Overexpression of Slt2 or the constitutively active allele BCK1-20 did not significantly rescue lethality associated with the oxidative treatment observed in wild type cells and *pkc1* and *rom2* mutants (not*

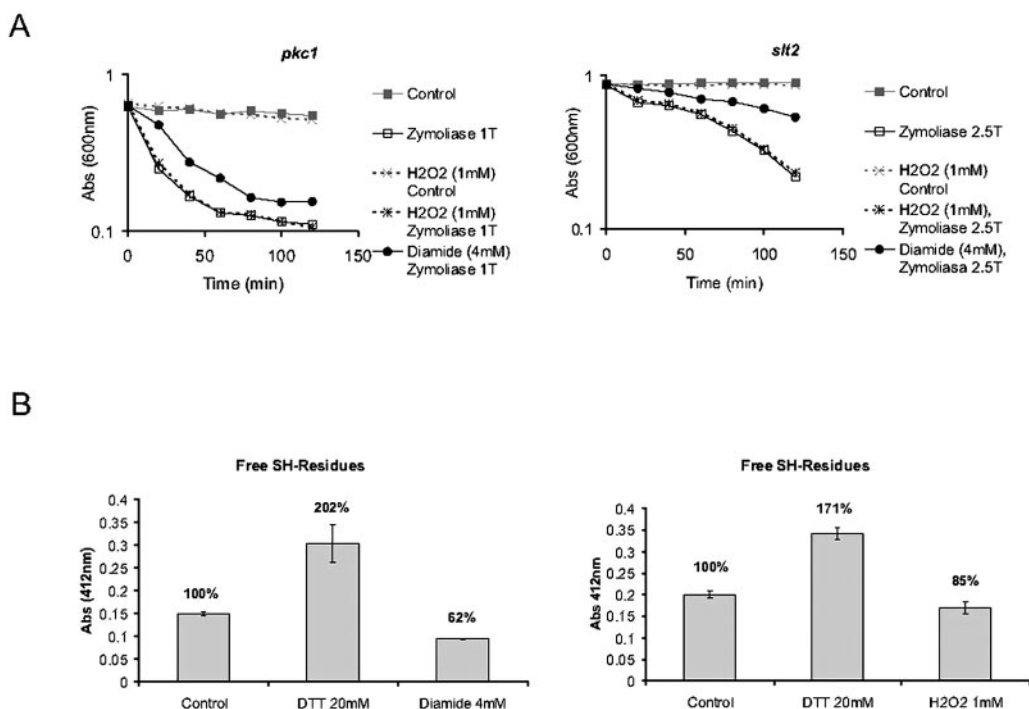


FIG. 4. **Diamide modifies the cell outer layer structure conferring greater resistance to zymolyase digestion and oxidating free-SH residues in cell-wall proteins.** *A*, exponentially growing *pkc1* and *slt2* mutant cells in SC medium at 25 °C were treated with either diamide 4 mM for 30 min or with H₂O₂ 1 mM for 1 h. Subsequently, 10 ml of culture at A₆₀₀ of 0.6 was first washed with H₂O and then with 50 mM Tris-HCl, pH 9.4. Cell pellets were then resuspended in 1 ml of this buffer prior to the addition of either 0.2 or 0.5 units zymolyase. Cell lysis was estimated by measuring at A₆₀₀ for the indicated periods. The *pkc1* mutant was grown in the presence of the osmotic stabilizer sorbitol 0.8 M. *B*, when quantifying free-SH residues with DTNB (see “Materials and Methods”), the A₄₁₂ was determined in intact cells treated with DTT, diamide, or hydrogen peroxide.

shown). These results reinforce the model that suggests that the Pkc1 function plays an essential role in the cellular response induced by oxidative stress.

We next decided to investigate whether the oxidizing signal could induce the pathway by activating some element of the MAPK module downstream of Pkc1, regardless of the activity of the upstream elements. To check this, we used a strain in which the *PKC1* promoter was substituted by the *GAL1* promoter and which contained a plasmid carrying the constitutively activated *BCK1-20* allele. In the presence of glucose, the *GAL1* promoter was repressed and the strain behaved like a *pkc1* mutant. The presence of *BCK1-20* prevented cell lethality due to the absence of the Pkc1 function in non-osmostabilizing conditions, as described before (27). The main reason for not using the *pkc1* null strain transformed with *BCK1-20* in these experiments was the relative high frequency of intragenic suppressors. Upon adding diamide or peroxide to the cell cultures, we observed that the induction of Slt2 in wild type cells carrying the *BCK1-20* allele was similar to that found in normal wild type cells. The only exception was that Slt2 phosphorylation was higher at time 0, due to Slt2 constitutive activity conferred by the presence of the *BCK1-20* allele. However, in *pkc1/BCK1-20* cells growing in glucose, and unlike non-treated cells, no Slt2 activation was detected upon hydrogen peroxide treatment. Only residual activation was detected after the addition of diamide: this may have been due to the function of the repressible *GAL1* promoter (Fig. 3E). These results indicate that Slt2 activation upon oxidative stress is almost entirely dependent on components of the cell integrity pathway that lie upstream of Pkc1.

The *BCK1-20* allele partly rescues cell lethality that is specifically due to the lack of Pkc1. In Fig. 3F we observe that *pkc1* cells were capable to survive in minimum medium without the osmotic stabilizer sorbitol, due to the presence of the *BCK1-20* allele. However, the *BCK1-20* allele is unable to suppress le-

thality in a *pkc1* background associated with either the diamide or the hydrogen peroxide treatment. Thus, *pkc1/BCK1-20* cells lose viability in the presence of each diamide or hydrogen peroxide agents, similarly to what it was observed in *pkc1* cells (Fig. 3, compare *B* and *F*). This indicates that there is a Pkc1 function, essential for the oxidative stress response, that is different from the activation of the MAPK module.

Diamide and Not Hydrogen Peroxide Treatment Increases the Resistance to Zymolyase Digestion by Oxidating Sulfhydryl Groups in Cell Wall Proteins—The results shown above suggest that diamide carries out its action at the level of the cell outer layer. Diamide causes oxidation of free sulfhydryl residues giving rise to the formation of disulfide bonds (31). An increase in free sulfhydryls in the yeast cell wall caused by DTT significantly diminished resistance to zymolyase digestion (29). Because disulfide bridge formation reduces cell porosity and the accessibility of zymolyase to its β -glucan substrate, these authors proposed the use of zymolyase to measure cell wall porosity. In view of the above results, we wondered whether oxidative treatment could affect cell wall integrity. To avoid the effect of the compensatory mechanism associated with members of the PKC1-MAPK pathway (21, 32), we used *pkc1* and *slt2* mutants and monitored cell wall resistance to zymolyase digestion in samples treated and untreated with either diamide or hydrogen peroxide (Fig. 4A). We observed that, although hydrogen peroxide did not cause any significant differences between treated and untreated cells, diamide increased resistance to zymolyase digestion in both *slt2* and *pkc1* mutant cells. It therefore seems evident that diamide caused structural modifications to the cell wall: a function that was not shared with hydrogen peroxide.

To check whether or not the increase in zymolyase resistance detected in *slt2* and *pkc1* mutants subject to diamide treatment was due to the formation of disulfide bridges in cell wall proteins, we used DTNB to determine the number of reduced

sulfhydryls in intact cells (29). In cultures treated with diamide for 30 min, a significant reduction (35–40%) in the number of free sulfhydryls was observed as compared with wild type cells. The value obtained with diamide was similar to that presented by (29) when treating intact cells with the oxidizing agent sodium tetrathionate. It was considered statistically significant in terms of the number of new disulfide bridges formed by the oxidizing agent (see *error bars* in Fig. 4B). However, in the case of hydrogen peroxide, the reduction of free sulfhydryls was of the order of 10–12% (a value that was not statistically significant, as observed in Fig. 4B). The reducing agent DTT was used as a control to quantify the total quantity of free sulfhydryls in cell surface proteins. Our results therefore indicate that diamide affects the cell wall structure by inducing the formation of disulfide bonds in cell wall proteins and thereby changes the structural properties of the cell surface. This effect is not exerted (or at least was not at a significant enough level to be detected in this particular assay) by other oxidizing agents such as hydrogen peroxide. This raises the question as to whether different oxidizing agents activate the PKC1 pathway in different ways.

A Blockage in Secretion Abolishes Slt2 Activation upon Diamide Treatment—In view of the results shown above, we propose that the major cellular effect caused by diamide occurs in the cell outer layer and is a consequence of the oxidation of free sulfhydryl residues. In this context, it would be predictable to obtain a relatively rapid activation of the Pkc1-MAPK pathway, as occurs by MAPK pathways. Nevertheless, upon diamide addition Slt2 activity increases gradually, reaching its maximum levels after 1–2 h of exposure to the chemical agent. One possible interpretation to this result could be that newly synthesized proteins integrant of a cell wall in a constant remodeling process could also be susceptible of being oxidized and modified by diamide thus signaling to the cell integrity pathway. In an attempt to understand this, we designed the next two experiments: For the first one, we blocked secretion by using the *sec1-1* mutant. This thermosensitive mutant is reversibly impaired in the final stages of exocytosis when grown at 38 °C. Following a shift to 38 °C for 3 h, the secretory machinery of these cells is completely blocked. Under these circumstances, Slt2 was found to be phosphorylated by the effect of the temperature in wild type and *sec1-1* cells (Fig. 5, A and B, time 0). We next treated both cultures with diamide and observed a relatively early but transient (after 10–15 min) additional increase in Slt2 activity in *sec1-1* cells as compared with the gradual increase in Slt2 activation caused by diamide in wild type cells, peaking later in time (30–60 min, Fig. 5B). Therefore one speculative interpretation to the early and rapid Slt2 phosphorylation detected in *sec1-1* cells could be the modification, namely oxidation, of pre-existing proteins, components of the cell surface in a system in which secretion was blocked. This supports the previous model by which diamide alters mainly the cell outer layer and indicates that this oxidant does not affect the secretory machinery. In a parallel experiment, we blocked protein synthesis by adding cycloheximide to wild type cells and then treated with diamide or shifted to 38 °C for 30 min (Fig. 5, C and D). We could observe that in these conditions Slt2 did not become activated in response to diamide treatment, although it does as a consequence of the heat shock. We conclude from these observations that the activation of the cell integrity pathway caused by diamide requires protein synthesis.

Diamide Treatment Induces the Localization of Pkc1 to the Cell Periphery and Provokes an Increment in Cell Wall Thickness—It has been demonstrated that, in exponentially growing cells, Pkc1 localizes to sites of polarized growth at pre-bud

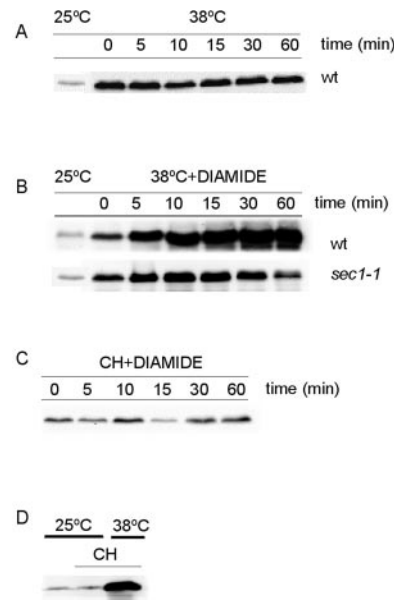


FIG. 5. The slow rate of Slt2 activation upon diamide treatment requires an intact secretory machinery and protein synthesis. *A*, wild type cells growing exponentially at 25 °C in SC culture medium were shifted to 38 °C for 3 h, after that samples were collected at the indicated times for protein extraction and Western blot analysis was performed using the p44/42 antibody to detect the Slt2-activated form. *B*, wild type and *sec1-1* cells were grown at 25 °C, then shifted to 38 °C for 3 h to be subsequently treated with 4 mM diamide for the indicated times. *C*, wild type cells were added to cycloheximide 100 μM (CH) for 30 min to block protein synthesis. Then 4 mM diamide was added, and samples were collected for the indicated times. *D*, wild type cells were grown to logarithmic phase (first line) to be subsequently treated with cycloheximide as in *C*. These cultures were shifted to 38 °C in the presence of CH. All the samples taken from *A* to *D* were processed for protein extraction and Western blot to detect the phosphorylated form of Slt2. All the lanes were evenly loaded upon detection of total Slt2 (not shown).

sites, bud tips and around mother-daughter bud-neck prior cytokines (33). However, when the cell wall is damaged, Pkc1 localizes to specific regions beneath the cell surface, apparently to target proteins involved in repairing the damage. We considered that studying Pkc1 localization could contribute toward a better understanding of the cytological effects of oxidative stress. For this reason, we tagged Pkc1 with GFP in its C-terminal domain and treated cells with either hydrogen peroxide or diamide. We observed that, during a 30-min treatment with diamide, Pkc1 rapidly delocalized through the cell and that after 30–60 min of treatment, Pkc1 delocalized to the cell periphery. Up to 5 h later, Pkc1 then relocated to the cell neck. This relocation was concomitant with renewed cell growth (Fig. 6). Electron microscopy analysis revealed that cells treated with diamide had significantly thicker cell walls (Fig. 7). When Slt2 activity was tested, we observed that this progressively increased and accumulated with treatment time, which was consistent with the mechanism of cell wall damage signaling and the induction of a compensatory mechanism (not shown). These results are consistent with the previous ones and fit into a model in which diamide altered the cell wall, and therefore Pkc1 rapidly localized to the cell periphery to repair or target the reparation of oxidative damage caused in the cell outer layer. Simultaneously, and probably as a consequence of a compensatory mechanism, Slt2 activity increased and the cell wall became thicker (Fig. 7).

Diamide and Hydrogen Peroxide Activation of the Cell Integrity Pathway Both Provoke Transient Actin Cytoskeleton Depolarization—It is well known that different types of stress, such as heat shock (34, 35), osmotic shock (36), and cell wall stress in

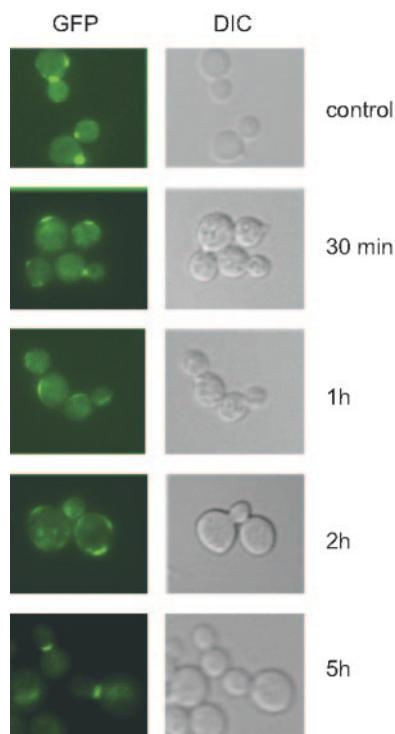


FIG. 6. **Pkc1 cellular localization upon diamide treatment.** Wild type cells in which Pkc1 was tagged with GFP epitope were grown to logarithmic phase (*control*) and treated with diamide 4 mM for the indicated times.

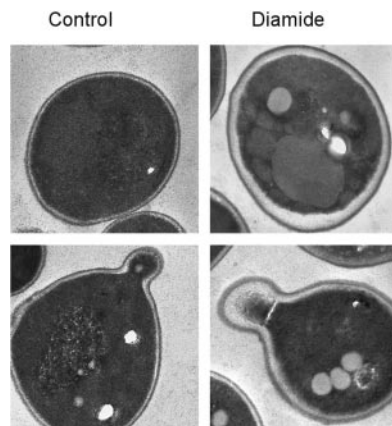


FIG. 7. **Ultrastructural modifications in the cell outer layer caused by diamide.** Cells were exponentially grown in SD medium at 25 °C in the presence, or absence, of 1 mM diamide for 10 h and subsequently processed for electron microscopy. Images have been enlarged 20,000 times with respect to the real size.

general (3, 12), induce a transient depolarization of the actin cytoskeleton. Because both diamide and hydrogen peroxide provoke another type of environmental stress in cells, oxidative stress, we decided to investigate their potential effect on the organization of the actin cytoskeleton. We observed that both hydrogen peroxide and diamide induced a transient depolarization of actin (visualized as randomly distributed actin patches, Fig. 8) followed by a subsequent repolarization after 3 h of treatment. This effect was dosage-dependent, because increasing the doses of diamide or peroxide caused a non-reversible depolarization of actin and consequently cell death (data not shown).

We studied the kinetics of acting polarization in *mtl1*, *pkc1*,²

and *rom2* mutants after both diamide and hydrogen peroxide treatments to determine whether the elements of the cell integrity pathway involved in cell survival upon oxidative stress also played a role in the mechanism driving actin polarization. After the two treatments, actin was visualized in depolarized patches in all the mutants tested except in *mtl1* cells. In the case of the *mtl1* mutant, the majority of the actin cables escaped depolarization after the addition of diamide. This supports the putative function of Mtl1 as a cell wall sensor for diamide damage. Interestingly, the absence of Rom2 and Pkc1 (not shown) provoked a marked descent in the time with respect to actin repolarization from patches to cables, compared with wild type cells, concomitantly with a notable descent in viability (Figs. 8A and 3, A–E). These results indicate that Mtl1, Rom2, and Pkc1 proteins are needed to repolarize and restore the actin cytoskeleton in response to oxidative stress.

Pkc1 Overexpression Induces a Rapid Restoration of Actin Cables Upon Oxidative Stress Caused by H₂O₂ but Not When It Is Caused by Diamide—To determine whether the Pkc1 function is directly involved in actin repolarization and filament formation, we overproduced Pkc1 under the control of the *tetO₇* promoter and chased protein expression by Western blot. We observed that, under conditions of Pkc1 overproduction, hydrogen peroxide also induced actin depolarization (Fig. 8B) during the first hour of treatment. However, actin repolarization occurred earlier and more efficiently. After 1 h of treatment, the percentage of depolarized budded cells was significantly lower in cells overexpressing Pkc1 than in wild type cells. Interestingly, after 4–6 h of treatment, actin cables were clearly observed not only in mother cells, but also in cell buds (Fig. 8B). This suggests that, upon oxidative treatment and consequent actin depolarization, Pkc1 is required to induce actin cable formation and restore normal cell polarity and growth. However, this mechanism seems to be specifically induced by the oxidative stress caused by peroxide, because Pkc1 overexpression did not restore actin cable formation upon treatment with diamide (not shown).

DISCUSSION

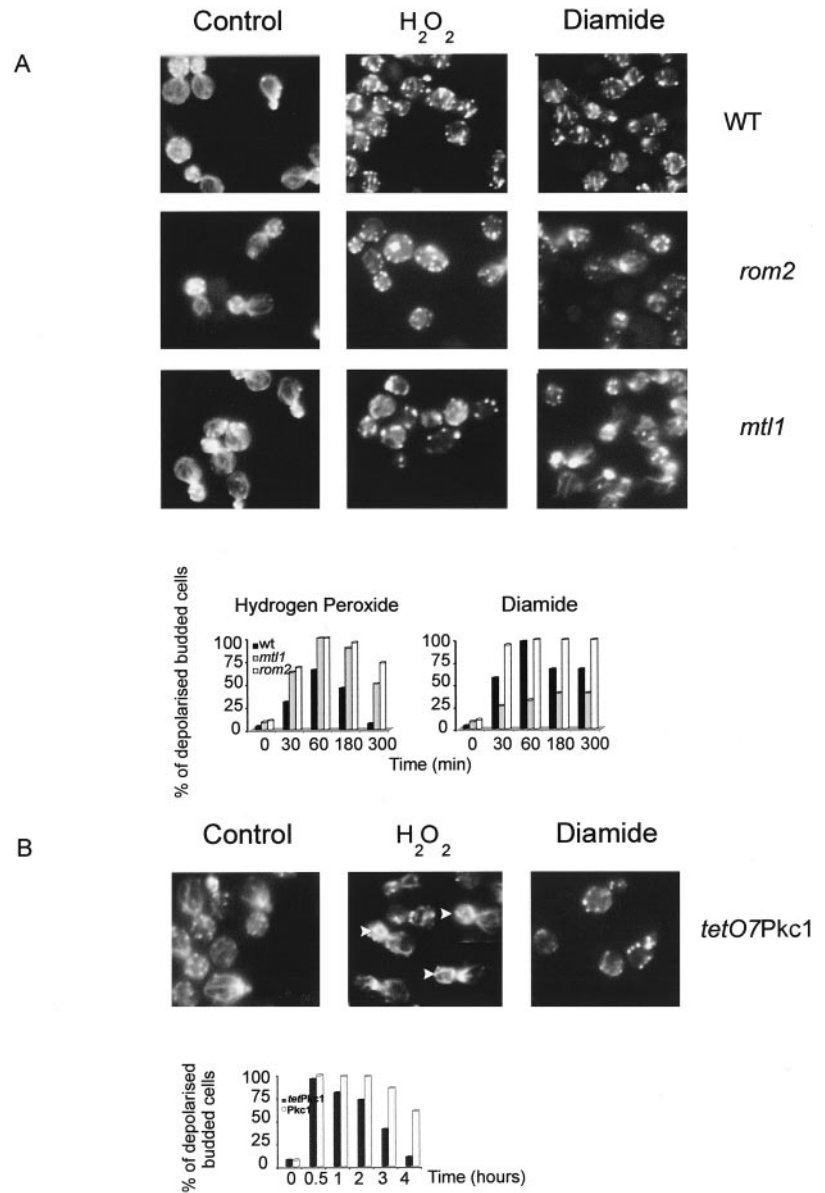
Here we report that the activity of Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway (Rom2 and Rho1) are required for cell survival following oxidative treatment, whereas the elements integrating the MAPK module are dispensable. This suggests that a specific function shared by the upstream Pkc1 elements is essential for the oxidative stress response.

Two different oxidizing agents were used: diamide and hydrogen peroxide. The two agents affect different targets in the cell and induce different responses. Both have two important properties in common with respect to the cellular responses they induce: Pkc1 function is essential for cells to overcome cellular damage, and the organization of their respective actin cytoskeletons is the main cellular function affected by oxidative stress, although, as described below, this is the result of different mechanisms.

We also describe a new function for the protein Mtl1, based on several lines of evidence: (i) after diamide treatment only a very small percentage of *mtl1* cells present actin depolarization in comparison with wild type cells; (ii) the induction of Slr2 phosphorylation is severely impaired in the mutant in comparison with wild type cells; (iii) *mtl1* mutant cells are sensitive to diamide; and (iv) *mtl1* cell viability is rescued by increasing the level and activity of the Pkc1 protein. In this work, Mtl1 is therefore characterized as a cell membrane sensor of oxidative stress in the cell integrity pathway upstream of Pkc1. The fact that the actin cytoskeleton becomes depolarized in the absence of Mtl1 (although only in a very small percentage of cells in the

² F. Vilella, E. Herrero, J. Torres, and M. A. de la Torre-Ruiz, unpublished results.

FIG. 8. Actin cytoskeleton organization in different cell integrity mutants upon oxidative treatment. *A*, actin staining of samples taken from wild type, *rom2*, and *mtl1* cells after 1 h of treatment with either hydrogen peroxide or diamide. Histograms represent the percentage of depolarized budded cells counted during the indicated periods of incubation for each of the oxidizing agents. *B*, actin staining of wild type cells overexpressing Pkc1, after 1 h of treatment with either hydrogen peroxide or diamide. Histograms are as in *A*. The intensity of images, representing filament stains in buds and mother cells in cells overexpressing Pkc1 upon hydrogen peroxide treatment, was markedly more intense than the rest of the images obtained in this study. Therefore, to optimize the quality of the figures, their intensity has been reduced. This is clearly discernible by comparing controls using the naked eye.



culture, see Fig. 8), and the fact that a slight induction of Slt2 phosphorylation is still detectable upon diamide treatment, could be explained by the functional redundancy of other cell wall receptors (such as Mid2) that could possibly replace the Mtl1 function.

Some authors (37) have recently reported that oxidative stress caused by linoleic acid hydroperoxide induces a short, fast induction of Mpk1/Slt2 activity. This differs from our results in which the response to hydrogen peroxide and diamide occurred later and was associated with a recovery process. The authors propose that Mpk1 is required for cell viability upon linoleic acid hydroperoxide treatment, although in our study, Pkc1 and Rho1 functions determined cell viability upon peroxide and diamide treatment. It is possible that different oxidizing agents operate on different targets, inducing specific cellular responses involving the cell integrity pathway. Linoleic acid hydroperoxide is likely to react with membrane components, whereas hydrogen peroxide is highly diffusible and could enter cells passively and act on internal targets. On the other hand, diamide is a potential oxidant of thiol groups.

The results presented in this work indicate that diamide treatment provokes a significant increase in resistance to zymolyase digestion in *pkc1* and *slt2* mutant cells due to it having

a direct effect on the cell wall, where it is probably responsible for a reduction in cell porosity, a consequence of the oxidation of sulfhydryl groups in cell surface proteins (29). Therefore, structural changes in the cell wall, caused by a reduction in the number of free sulfhydryls, affect cell integrity in a way that makes receptor proteins (such as Mtl1 and Mid2) sense these changes and transduce the signal to the elements of the PKC1-MAPk pathway, which, in turn, activates the Slt2 kinase. This mechanism resembles that widely described for cell wall damage. We have observed that protein synthesis is not needed to activate Slt2 in response to cell surface stress induced by heat-shock. However, in the absence of protein synthesis Slt2 did not become phosphorylated as a consequence of diamide treatment. This suggests that the activation of the cell integrity pathway mediated by diamide could be reflecting an adaptive process more than an immediate response driven by an MAPK pathway in response to an external stimulus. We reasoned that, if diamide were to continuously damage the cell wall, even in the absence of secretion, we would expect Slt2 activation to gradually increase with exposure to diamide. The slow rate of Slt2 phosphorylation can also be explained by the fact that new cell surface protein components are continuously synthesized and excreted *de novo* in a cell system whose cell wall is continuously

remodeled. At the time these proteins are secreted to the cell periphery, they could be susceptible to being oxidized by diamide, present in the culture medium during the course of the experiment. This could provoke an accumulative cell wall modification (presumably oxidation of thiol residues present in cell surface proteins) that activates the signaling cascade mediated by the cell integrity pathway.

The observation that, upon blockage of secretion and subsequent treatment with diamide, Slt2 becomes rapidly and transiently phosphorylated is also consistent with the second model. Furthermore, the observation that diamide, in the experimental conditions we use, does not affect the secretory machinery constitutes another novel finding of this study.

The localization of Pkc1 to the cell periphery upon diamide addition could be attributable to a response to cell wall damage, as previously reported (33), although we cannot rule out the possibility of diamide provoking cell wall damage. In fact, the walls of cells treated with diamide become more resistant to enzymatic digestion and significantly thicker than those of untreated cells. More specifically, diamide is responsible for an increase in the amount of glucane (Fig. 7, *light layer* around the plasmatic membrane), which makes the cell walls thicker. Consequently, the final effect observed upon diamide treatment could be the result of the activation of the compensatory mechanism upon cell wall damage.

Pkc1 localization to the cell periphery is dependent on Rho1 activity (33). We therefore inferred that the Pkc1 localization to the cell periphery that takes place upon diamide treatment must also depend on Rho1 activity and consequently on the cell integrity pathway. This means that the Pkc1 function is required at the cell surface upon diamide treatment. Activation of Rho1 and Pkc1 is known to cause depolarization of the actin cytoskeleton (12). In our system, the actin depolarization that we observed upon oxidative stress was not directly due to induction of the activity of the previously mentioned protein members of the cell integrity pathway, because the same actin cytoskeleton disorganization effect was observed in the absence of their function. Interestingly, it has been reported that a point mutation in the Rho1 protein might also provoke depolarization of the actin cytoskeleton into patches (16). We cannot discard the possibility of oxidative stress damaging one of the proteins studied in this report (Rho1 or Pkc1) and this damage producing changes in actin organization: this is one hypothesis currently being studied by our laboratory.

One conclusion that we draw from this study is that diamide (and also hydrogen peroxide, as discussed below) provokes a clear depolarization of the actin cytoskeleton, which is independent of the activity of the protein components of the upper part of the cell integrity pathway. However, even more relevant is the observation that Mtl1, Rho1, and Pkc1 are required to overcome and survive this oxidative stress. In summary, we believe that constant exposure to diamide causes increasingly greater structural changes to the cell wall, which in turn activate the pathway. This is reflected in Slt2 phosphorylation (which is dosage-dependent and increases with exposure to the oxidizing agent), depolarization of the actin cytoskeleton, Pkc1 cell surface localization, and increases in cell wall thickness, in samples treated with diamide.

The mechanism by which hydrogen peroxide oxidizes cellular elements and induces a response from the cell integrity pathway is different to that described for diamide. According to our results, hydrogen peroxide does not cause clear, major damage to the cell wall. Hydrogen peroxide treatment did not render clear differences between wild type cells and each of the *mtl1*, *rom2*, and *slt2* mutants with respect to the expression of genes regulated by *Msn2/4*, *Yap1*, or *Skn7* (not shown). The

cellular function most severely impaired by this oxidizing agent is the organization of the actin cytoskeleton, which implies that hydrogen peroxide mainly operates at an intracellular level. Pkc1 activity is required to overcome the effect of oxidative stress caused by hydrogen peroxide. Actin depolarization mediated by hydrogen peroxide occurs in the absence of Rom2 and Mtl1. However, Rom2, Pkc1, and Mtl1 play an essential role in repolarizing the actin cytoskeleton, and adapting to and recovering from peroxide treatment. Overproduction of Pkc1 significantly rescues cell viability in response to hydrogen peroxide treatment. This is more efficient than in response to diamide, which again points to different cellular targets and repair mechanisms associated with the different oxidizing agents. The observation, that high levels of Pkc1 protein activate the repolarization of actin and induce the formation of actin cables upon hydrogen peroxide treatment, suggests a further activation of the proteins involved in this process. We speculate that candidates could be formins and consequently prophylin (13, 14). However, this hypothesis is currently under study in our group. We are currently developing experimental designs to further characterize a model for oxidative stress caused by hydrogen peroxide. One possible explanation for why overexpression of Pkc1 does not visibly induce actin cable repolarization upon diamide treatment would be that the signal that triggers depolarization of the actin cytoskeleton is more intense than the one mediated by Rho1-Pkc1-formins-prophylin to restore actin cable formation.

In the course of submission of this report, another relevant report was published (38). The authors make a series of observations coincidental with ours; they observed that, upon hydrogen peroxide treatment, Slt2 becomes phosphorylated and that transcription dependent of Rlm1 is induced. However, they also report several conclusions that are not in accordance with ours. They observed an early and transient Slt2 phosphorylation upon treatment with 5 mM hydrogen peroxide. In our study we tested several concentrations of this agent and different times of exposure to the oxidizing agent (as described previously under "Results"), including that of 5 mM. We reproduced these experiments in two independent backgrounds. We could not observe a significant Slt2 activation during the first 30 min of treatment with hydrogen peroxide in any of the conditions tested. Another result shown by Ref. 38 is that a *slt2* mutant is sensitive to hydrogen peroxide. Upon testing cell viability in response to hydrogen peroxide treatment in *slt2* mutant cells (we also performed this experiment in two independent backgrounds and obtained identical results), we could not observe any detrimental effect as compared with wild type cells (data not shown). This is not in accordance with the results published in Ref. 38. However, the fact that we performed the experiments in exponentially growing cells, whereas these authors used saturated cultures, could contribute to the dissimilarities observed between the results of both studies. Finally, we would like to note that, in a previously published article (3), we reported that the absence of *SLT2* seriously affects cell viability when cells enter the stationary phase.

Genome-wide analyses indicated that diamide treatment induced the activation of a number of genes whose expression depends on Rlm1 (22). This induction reflects activation of the pathway, again supporting the model by which diamide mainly affects the integrity of the cell outer layer. The fact that Rom2, Rho1, and Pkc1 functions are all essential for overcoming the effects of diamide upon cell viability, whereas the downstream elements of the pathway are not, suggests that they all share a common cell integrity function required for this response. Gene expression (reviewed by Ref. 18) and "de novo" protein synthesis (39) are required for adaptation to oxidative stress. It is well

characterized that Skn7, Yap1, and Msn2/Msn4 transcriptional factors are involved in the oxidative stress response (18). However, their upstream elements and the factors responsible for transmitting the oxidative signal to them and thereby activating them, have yet to be identified. It has been recently demonstrated that the Ras-cAMP pathway negatively affects the hydrogen peroxide stress response through Msn2/4 (40). Interestingly, genome-wide studies published previously (21) also show a functional connection between Msn2/4 and the PKC1-MAPK module, because both seem to contribute to the cell wall compensatory mechanism. Our study represents another contribution that helps to explain the complex signaling processes, which take place upon oxidative damage, and gives added relevance to the role of the cell integrity pathway in cellular responses to oxidants.

Studies involving human cells describe the role of certain PKC isoforms in the protection of epidermal intestinal cells against oxidative stress by stabilizing F-actin (41). F-actin turnover is required for the correct maturation of macrophages and for the activation of PKC α (42). Thus, PKC α inhibition is related to the establishment of the infection caused by *Leishmania donovani* through the inhibition of macrophage maturation (43).

PKC involvement in actin organization may therefore be related to defense against infections. All these studies, including the present one, underlay the biological relevance of Pkc1 involvement in actin organization upon oxidative stress.

Further studies will be required to ascertain which molecules are most essential in the response to oxidative stress, what the targets for the different oxidative agents are, and what molecular mechanism is responsible for connecting proteins in the Pkc1 pathway with the actin cytoskeleton in response to particular oxidative stresses.

Acknowledgments—We are very grateful to Pilar Pérez for her help reading and commenting on the manuscript. We acknowledge Maria Molina for her comments and advice, Noel Lowndes for anti-Swi6 antibody, and Mike Hall, David Levin, and Marti Aldea for kindly providing strains and plasmids. We also mention the invaluable technical assistance of Lidia Piedrafita and help from Xavier Calomarde with electron microscopy studies.

REFERENCES

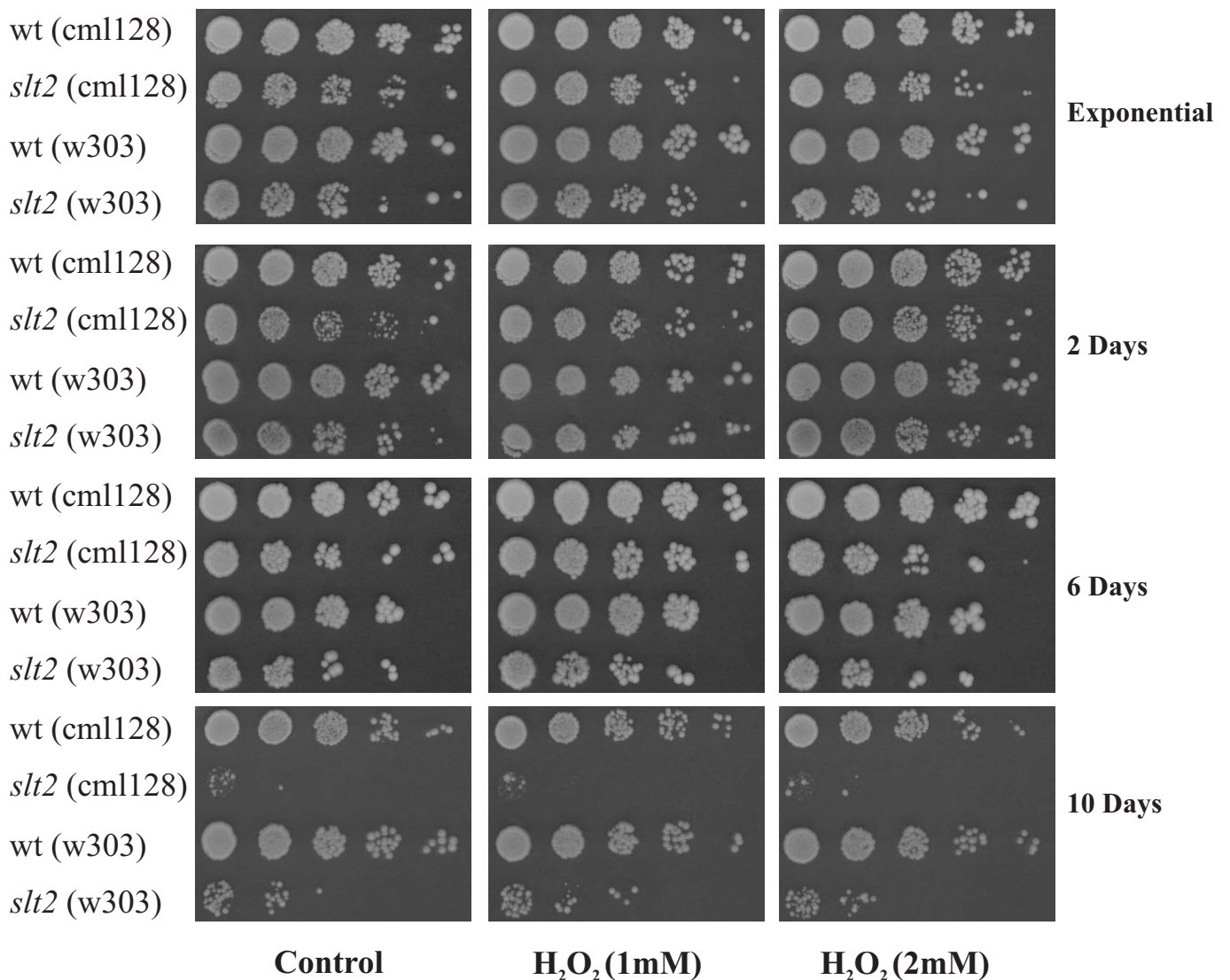
- Kamada, Y., Jung, U. S., Piotrowski, J., and Levin, D. E. (1995) *Genes Dev.* **9**, 1559–1571
- Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E., and Gustin, M. C. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 30157–30161
- Torres, J., Di Como, C. J., Herrero, E., and de la Torre-Ruiz, M. A. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 43495–43504
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B., and Levin, D. E. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 3969–3976
- Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 13804–13809
- Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999) *J. Bacteriol.* **181**, 3330–3340
- De Bettignies, G., Thoraval, D., Morel, C., Peypouquet, M. F., and Crouzet, M. (2001) *Genetics* **159**, 1435–1448
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T., and Ohya, Y. (2002) *Genetics* **162**, 663–676
- Heinisch, J. J., Lorberg, A., Schmitz, H. P., and Jacoby, J. J. (1999) *Mol. Microbiol.* **32**, 671–680
- Hohmann, S. (2002) *Mol. Biol. Rev.* **66**, 300–372
- Martin-Yken, H., Dagkessamanskaia, A., Basmaji, F., Lagorce, A., and Francois, J. (2003) *Mol. Microbiol.* **49**, 23–35
- Delley, P. A., and Hall, M. N. (1999) *J. Cell Biol.* **147**, 163–174
- Evangelista, M., Pruyine, D., Amberg, D. C., Boone, C., and Bretscher, A. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 32–41
- Sagot, I., Klee, S. K., and Pelman, D. (2002) *Nat. Cell Biol.* **4**, 42–50
- Drgonova, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G. C., Ford, R. A., Chan, C. S., Takai, Y., and Cabib, E. (1996) *Science* **272**, 277–279
- Dong, Y., Pruyne, D., and Bretscher, A. (2003) *J. Cell Biol.* **161**, 1081–1092
- Ames, B., Shigenaga, M., and Hagen, T. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**, 7915–7922
- Toledano, M. B., Delaunay, A., Biteau, B., Spector, D., and Azevedo, D. (2003). in *Topics in Current Genetics, Vol. 1* (Hohmann, S., and Hager, P. W. H., eds) pp. 242–303, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg
- Banuett, F. (1998) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 249–274
- Alberts, A. S., Bouquin, N., Johnston, L. H., and Treisman, R. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 8616–8622
- Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D., and François, J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 20345–20357
- Gash, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) *Mol. Biol. Cell* **11**, 4241–4257
- Gopalakrishna, R., and Jake, S. (2000) *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 1349–1361
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* **10**, 1793–1808
- Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999) *Yeast* **15**, 1541–1553
- Ferrigno, P., Posas, F., Koepf, D., Saito, H., and Silver, P. A. (1998) *EMBO J.* **17**, 5606–5614
- de la Torre-Ruiz, M. A., Torres, J., Ariño, J., and Herrero, E. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33468–33476
- Kaiser, C., Michaelis, S., and Mitchel, A. (1994) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- de Nobel, J. G., Klis, F. M., Munnik, T., Priem, J., and van den Ende, H. (1990) *Yeast* **6**, 483–490
- Belli, G., Gari, E., Piedrahita, L., Aldea, M., and Herrero, E. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 942–947
- Kosower, N. S., and Kosower, E. M. (1995) *Methods Enzymol.* **251**, 123–133
- Klis, F. M., Mol, P., Hellingwerf, K., and Brul, S. (2002) *FEMS Microbiol. Rev.* **26**, 239–256
- Andrews, P. D., and Stark, J. R. (2000) *J. Cell Sci.* **113**, 2685–2693
- Lillie, S. H., and Brown, S. S. (1994) *J. Cell Biol.* **125**, 825–842
- Desrivieres, S., Cooke, F. T., Parker, P. J., and Hall, M. N. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 15787–15793
- Chowdhury, S., Smith, K. W., and Gustin, M. C. (1992) *J. Cell Biol.* **118**, 561–571
- Alic, N., Higgins, V. J., Pichova, A., Breitenbach, M., and Dawes, I. W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 41849–41855
- Staleva, L., Hall, A., and Orlow, S. J. (2004) *Mol. Biol. Cell* **15**, 5574–5582
- Collinson, L. P., and Dawes, I. W. (1992) *J. Gen. Microbiol.* **138**, 329–335
- Hasan, R., Leroy, C., Isnard, A. D., Labarre, J., Boy-Marcotte, E., and Toledano, M. B. (2002) *Mol. Microbiol.* **45**, 233–241
- Banan, A., Fields, J. Z., Farhadi, A., Talmage, D. A., Zhang, L., and Kesha-varzian, A. (2002) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 852–866
- Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K. E., Descoteaux, A., and Rasmusson, B. (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **302**, 653–658
- Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K. E., Descoteaux, A., and Rasmusson, B. (2001) *Cell. Microbiol.* **7**, 439–447
- Gallego, C., Gari, E., Colomina, N., Herrero, E., and Aldea, M. (1997) *EMBO J.* **16**, 7196–7206

APÉNDICE 2

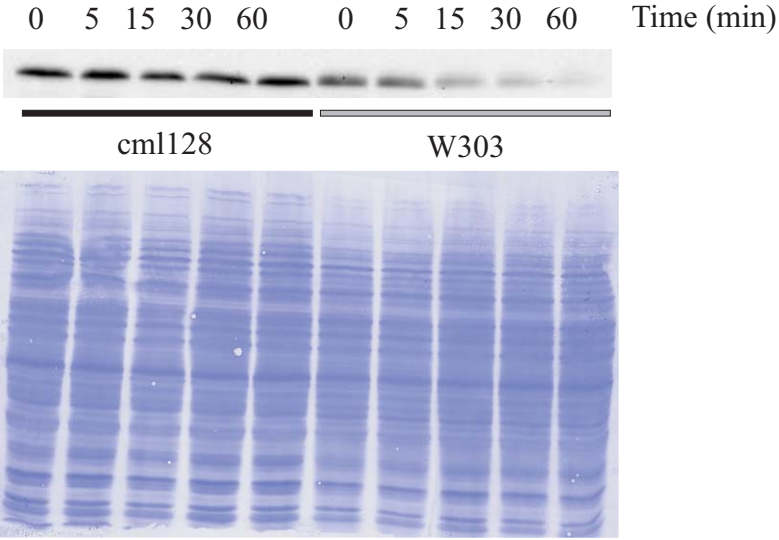
We also include the following results to support our conclusions:

We have performed experiments of cell viability in SC plates with and without hydrogen peroxide (1 and 2mM, respectively). We have done the experiments with cultures growing exponentially and in different conditions of saturation.

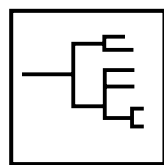
slt2 mutant cells lose viability when they enter stationary phase, but independently on the presence or not of hydrogen peroxide. We have performed the experiment in two different backgrounds, our background (CML128) and (W303), and we have obtained equivalent results, *slt2* cells lose viability when they enter stationary phase but this lost of viability occurs equally with or without hydrogen peroxide. We cannot attribute any significant effect in *slt2* cell viability due to hydrogen peroxide.



We have also repeated another experiment in the same two backgrounds, consisting on treating cells with hydrogen peroxide 5mM for different times and monitor SlT2 phosphorylation. As observed below, we have not detected any transient induction of SlT2 during the first 60 minutes of treatment.



APÉNDICE 3



Research Paper

Evolution and cellular function of monothiol glutaredoxins: involvement in iron–sulphur cluster assembly

Felipe Vilella¹, Rui Alves¹, María Teresa Rodríguez-Manzanaque¹, Gemma Bellí¹, Swarna Swaminathan², Per Sunnerhagen² and Enrique Herrero^{1*}

¹Departament de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Rovira Roure 44, 25198-Lleida, Spain

²Department of Cell and Molecular Biology, Göteborg University, PO Box 462, S-40530 Göteborg, Sweden

*Correspondence to:

Enrique Herrero, Dept. de Ciències Mèdiques Bàsiques, Facultat de Medicina, Universitat de Lleida, Rovira Roure 44, 25198-Lleida, Spain.
E-mail: enric.herrero@cmb.udl.es

Abstract

A number of bacterial species, mostly proteobacteria, possess monothiol glutaredoxins homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial protein Grx5, which is involved in iron–sulphur cluster synthesis. Phylogenetic profiling is used to predict that bacterial monothiol glutaredoxins also participate in the iron–sulphur cluster (ISC) assembly machinery, because their phylogenetic profiles are similar to the profiles of the bacterial homologues of yeast ISC proteins. High evolutionary co-occurrence is observed between the Grx5 homologues and the homologues of the Yah1 ferredoxin, the scaffold proteins Isa1 and Isa2, the frataxin protein Yfh1 and the Nfu1 protein. This suggests that a specific functional interaction exists between these ISC machinery proteins. Physical interaction analyses using low-definition protein docking predict the formation of strong and specific complexes between Grx5 and several components of the yeast ISC machinery. Two-hybrid analysis has confirmed the *in vivo* interaction between Grx5 and Isa1. Sequence comparison techniques and cladistics indicate that the other two monothiol glutaredoxins of *S. cerevisiae*, Grx3 and Grx4, have evolved from the fusion of a thioredoxin gene with a monothiol glutaredoxin gene early in the eukaryotic lineage, leading to differential functional specialization. While bacteria do not contain these chimaeric glutaredoxins, in many eukaryotic species Grx5 and Grx3/4-type monothiol glutaredoxins coexist in the cell. Copyright © 2004 John Wiley & Sons, Ltd.

Received: 11 November 2003
Accepted: 2 March 2004

Keywords: glutaredoxin; mitochondria; oxidative stress; phylogenetic profile; protein docking; thioredoxin

Introduction

Glutaredoxins are thiol oxidoreductases that regulate the redox status of protein sulphhydryl groups using glutathione as hydrogen donor (Holmgren, 1989). They differ from thioredoxins in that the latter use NADH as hydrogen donor via thioredoxin reductase. Dithiol glutaredoxins are small proteins, with a conserved two-cysteine active site, that catalyse the reduction of disulphide bonds in a two-step reaction involving an intermediate mixed disulphide between the target protein and

the glutaredoxin molecule (Bushweller *et al.*, 1992; Holmgren and Aslund, 1995). *Saccharomyces cerevisiae* cells contain two cytoplasmic dithiol glutaredoxins, Grx1 and Grx2, which are involved in the defence against oxidative stress (Luikenhuis *et al.*, 1997). They are not required for normal cell growth, except in the absence of the two cytoplasmic thioredoxins, Trx1 and Trx2 (Draculic *et al.*, 2000). More recently, a family of three monothiol glutaredoxins (Grx3, Grx4 and Grx5) has been described in *S. cerevisiae* (Rodríguez-Manzanaque *et al.*, 1999). They have an active site with a single

cysteine (Cys–Gly–Phe–Ser) that is conserved in homologous proteins identified in many organisms that range from bacteria to humans (Bellí *et al.*, 2002). These monothiol glutaredoxins could participate in the deglutathionylation of mixed disulphides formed between sulphhydryl groups in the target protein and the cysteinyl residue of glutathione, using the single cysteine residue at the active site (Rahlfs *et al.*, 2001; Herrero and Ros, 2002).

Of the three monothiol glutaredoxins in yeast, only Grx5 has been assigned a function in the cell. It participates in the formation of iron–sulphur (Fe–S) clusters in the mitochondria (Rodríguez-Manzanique *et al.*, 2002), together with the matrix mitochondrial proteins Nfs1 (cysteine desulphurase), Isu1/Isu2, Isa1/Isa2, Ssq1 and its co-chaperone Jac1, Yah1 (ferredoxin), Arh1 (ferredoxin reductase), Nfu1 and Yfh1 (reviewed in Lill and Kispal, 2000; Mühlhoff and Lill, 2000; see also Mühlhoff *et al.*, 2002). The ABC transporter Atm1 (localized at the mitochondrial inner membrane) and the intermembrane space protein Erv1 participate in the export of Fe–S clusters for extramitochondrial proteins. All the above proteins constitute the so-called ISC (iron–sulphur cluster assembly) machinery.

Phylogenetic profiling, i.e. the pattern of co-occurrence of genes across genomes, is a tool that allows predictions to be made about the functional relationship of the respective protein products (Gaasterland and Ragan 1998; Pellegrini *et al.*, 1999). Groups of genes that are involved in the same or related functions, or are part of the same cellular structure, tend to co-evolve and to have homologues in the same subset of organisms. Other types of genomic context information can also be used for computational prediction of protein function, such as the fusion of genes into a single open reading frame, the conservation of gene order, the co-occurrence of genes in potential bacterial operons, or the co-occurrence of protein products in the same eukaryotic cell compartment (Marcotte *et al.*, 1999, 2000; Huynen *et al.*, 2000). The evolutionary co-occurrence of genes can help to discriminate between subsets of protein products sharing a general function, and to establish different subprocesses in which members of these subsets would display stronger functional relationships and/or even establish physical interactions (Huynen *et al.*, 2000; Ettema *et al.*, 2001). Phylogenetic

profiling (in parallel with biochemical approaches; Chen *et al.*, 2000; Mühlhoff *et al.*, 2002) has been used to determine that the yeast frataxin protein Yfh1 has a direct role in Fe–S cluster assembly (Huynen *et al.*, 2001), because prokaryotic orthologues of Yfh1 have a similar profile to orthologues of Jac1, Isa1/2 and Yah1.

In this work we determine the phylogenetic profile of Grx5 and its prokaryotic homologues, and compare it with the profiles of other proteins participating in Fe–S cluster synthesis, in order to establish the subset of proteins that display a more similar profile to Grx5. We also make a computational analysis of potential physical interactions between Grx5 and other ISC proteins, which is paralleled by studies of *in vivo* interactions. These data are analysed to specify the functional role of Grx5 in Fe–S cluster biosynthesis. Additionally, we present evidence for the fusion of a thioredoxin gene with a monothiol glutaredoxin gene early in the eukaryotic lineage, leading to differential functional specialization between Grx5 and Grx3/Grx4.

Materials and methods

For homology comparisons of the individual proteins shown in Figure 3, PSI-BLAST (version 2.2.4) searches (Altschul *et al.*, 1997) were done (three iterations, $E = 0.001$), using the National Center of Biotechnology Information (NCBI) GenBank database (Benson *et al.*, 2001; August 2002 version). Positive sequences were inspected manually for the presence of residues that are essential for the biological activity of the proteins, in cases where these were known. Sequences lacking these residues were considered non-homologous.

Multiple sequence alignments were carried out with the ClustalW programme (Thompson *et al.*, 1994). Internal gaps were not eliminated, and the Blosum80 matrix option was used for alignment. ClustalW alignments were bootstrapped 1000 times and, using maximum parsimony, phylogenetic trees were calculated for the bootstrapped sets. Majority consensus trees were built from these sets and are presented in Figures 1C and 2. The treatment of ClustalW alignments to obtain the consensus trees was done using the PHYLIP suite of programmes (Felsenstein, 1993).

Prediction for protein mitochondrial location was done using the Mitoprot programme (Claros and

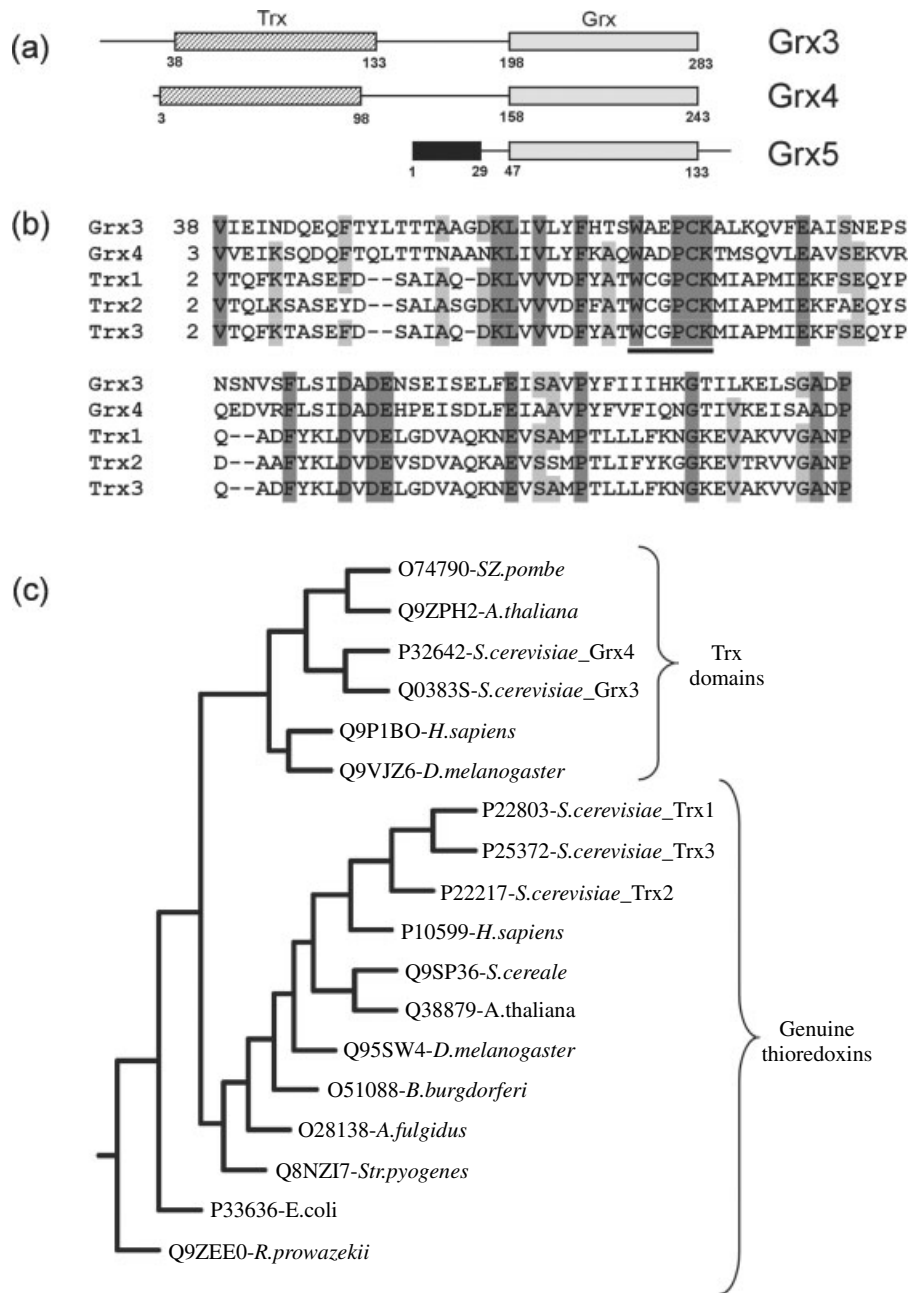


Figure 1. Structural comparison between the three monothiol glutaredoxins of *S. cerevisiae* (Grx3, Grx4 and Grx5). (A) Localization of the thioredoxin-like (Trx) and monothiol glutaredoxin (Grx) domains. The mitochondrial targeting sequence of Grx5 is indicated as a black box. Numbers show the positions of the amino acids that limit the respective domains. (B) ClustalW alignments of the Trx domains of Grx3 and Grx4 and the three genuine thioredoxins of *S. cerevisiae* (Trx1, Trx2 and Trx3). Non-homologous flanking regions are not shown. Conserved residues are shaded. The horizontal line indicates the position of the thioredoxin active site. (C) Phylogenetic tree resulting from maximum parsimony analysis of bootstrapped ClustalW alignments of a number of Trx domains of monothiol glutaredoxins and of genuine thioredoxins from the indicated organisms. SwissProt entries of the respective proteins are shown. Species names: *Schizosaccharomyces pombe*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Secale cereale*, *Borrelia burgdorferi*, *Archaeoglobus fulgidus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Rickettsia prowazekii*

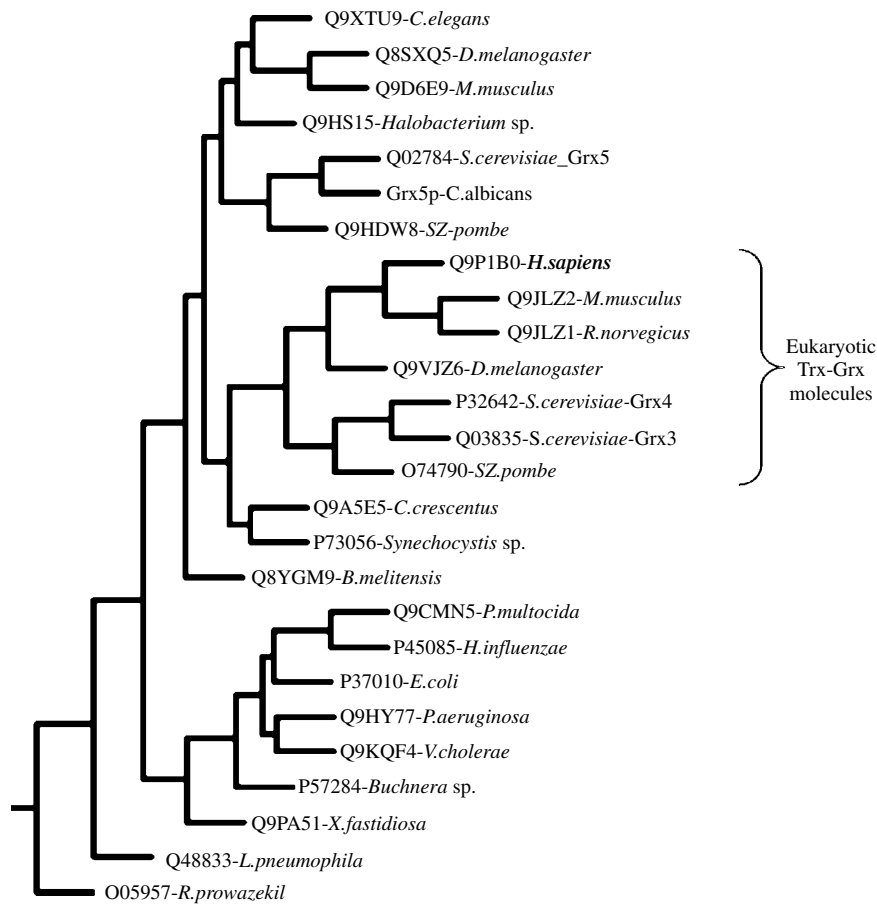


Figure 2. Phylogenetic tree of *S. cerevisiae* Grx5 glutaredoxin and a number of homologues from prokaryotic and eukaryotic organisms, obtained using maximum parsimony analysis of bootstrapped ClustalW alignments of the indicated proteins (SwissProt entries are shown, except for the *C. albicans* Grx5 homologue). Names in bold type correspond to predicted mitochondrial proteins. Alignments were done with the Grx glutaredoxin domain without adjacent sequences. Molecules with the Trx–Grx structure are within the bracket. The other proteins in the tree lack the Trx domain. Species names: *Caenorhabditis elegans*, *Drosophila melanogaster*, *Mus musculus*, *Halobacterium* sp., *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Homo sapiens*, *Rattus norvegicus*, *Caulobacter crescentus*, *Synechocystis* sp., *Brucella melitensis*, *Pasteurella multocida*, *Haemophilus influenzae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Buchnera* sp., *Xylella fastidiosa*, *Legionella pneumophila*, *Rickettsia prowazekii*

Vincens, 1996). Only proteins with scores higher than 0.8 were considered positive.

Whole-proteome phylogenetic profiling was done using proteomes from the Institute for Chemical Research of Kyoto University (KEEG) and GenBank databases. The proteome of all organisms described in the KEGG database (version 23.0) was completed with information from the GenBank database (August 2002 version). Homology searches for each of the *S. cerevisiae* proteins in each of the other proteomes was done running version 2.2.4 of PSI-BLAST locally, with parameters $E = 0.001$ and three iterations. Taking as

reference the vector for the Grx5 protein (or its *Buchnera* homologue), we calculated the index of co-occurrence for all proteins as given by:

$$CI = \sum \delta_{ij-Grx5} / \text{total number of organisms}$$

where $\delta_{ij-Grx5}$ is the Kronecker delta function, taken to be 1 if Grx5 and protein *j* both have (or do not have) homologues in the proteome of organism *i*, and 0 otherwise.

Models for the three-dimensional structure of the proteins of interest have been obtained using 3D-JIGSAW (Bates *et al.*, 2001). The docking

experiments were then performed using GRAMM (Vakser and Jiang, 2001).

Two-hybrid analyses were carried out as described in Rodríguez-Navarro *et al.* (2002), using a pGBT9 derivative that expressed the Gal4 (DNA binding domain)–Grx5 fusion and a number of pACT2 derivatives that expressed the Gal4 (activation domain) fused to individual ISC proteins. *In vivo* interactions between both proteins were determined by measuring β -galactosidase activity (Rupp, 2002).

Results

Structural relationship between the yeast monothiol glutaredoxins Grx3, Grx4 and Grx5

The three monothiol glutaredoxins of *S. cerevisiae* differ in their structure. Grx5 contains a glutaredoxin (Grx) module that is fused to an N-terminal mitochondrial targeting sequence (Figure 1A) (Rodríguez-Manzanaque *et al.*, 2002). The Grx module is conserved in many organisms, from bacteria to humans (Bellí *et al.*, 2002). In the latter, it has been named PICOT homology domain, after the PICOT protein (a negative regulator of protein kinase C- θ) (Witte *et al.*, 2000). Grx3 and Grx4 lack the mitochondrial targeting sequence, a fact that correlates with their non-mitochondrial location (as predicted by MITOPROT analysis) and their failure to rescue the phenotype resulting from Grx5 deletion (Rodríguez-Manzanaque *et al.*, 2002; Bellí *et al.*, 2002).

Grx3 and Grx4, but not Grx5, also contain an N-terminal thioredoxin (Trx) domain (Figure 1A). This domain is present in many eukaryotic homologues of Grx3/Grx4, including the PICOT protein, but it is absent in all their prokaryotic homologues (Bellí *et al.*, 2002). Closer analysis of the Trx domain extension (Figure 1B) shows that it is homologous to a significant part of the thioredoxin molecules, but it lacks the first cysteine residue that is characteristic of the thioredoxin active site (WCGPCK) and is essential for thioredoxin-mediated dithiol protein reduction (Holmgren, 1989; Powis and Montfort, 2001). However, other amino acids in the active site region, including the second cysteine, are conserved when compared with the three genuine thioredoxins of *S. cerevisiae*

(Figure 1B). The above observations strongly suggest that Grx3/Grx4 and their eukaryotic homologues derive from the fusion of a thioredoxin domain to a monothiol Grx module in an eukaryotic ancestor after separation from prokaryotes. Comparing the amino acid sequences from the Trx module in Grx3 and Grx4 with those from a number of genuine thioredoxin molecules provides further support for this prediction. The maximum parsimony phylogenetic consensus tree (calculated using PHILIP; Felsenstein, 1993) for the ClustalW alignment (Figure 1C) shows that the Trx module of the two yeast glutaredoxins has diverged at an early stage from all the eukaryotic genuine thioredoxins included in the analysis. This further supports an early separation of the Grx3/Grx4 Trx module from the other thioredoxin domains within the eukaryotic line, by fusion of Trx to an ancestor monothiol glutaredoxin and separate evolution. The fact that no bacterial species contains molecules with the Trx–Grx structure argues against the presence of this type of molecule in the endosymbiotic ancestor of eukaryotes.

Comparison of prokaryotic and eukaryotic monothiol glutaredoxins

We extended the comparison of proteins containing the monothiol Grx domain characteristic of Grx5 to a total of 26 proteins from the NCBI and KEEG databases. Thirteen of these were prokaryotic (12 bacteria plus one archaean, all of them with a single Grx domain not fused to any Trx domain), and 13 were eukaryotic. Among the latter, seven sequences contained an additional Trx domain in the N-region. Only the Grx domains without extensions were used to generate a tree after ClustalW alignment (Figure 2). In parallel, we predicted the cellular location for each of the eukaryotic protein sequences. All the eukaryotic proteins with the Trx–Grx structure (included Grx3 and Grx4) group together in the tree and none of them is predicted to be mitochondrial.

Grx5 is in a separate group from the eukaryotic Trx–Grx molecules, together with homologues from other eukaryotic organisms (Figure 2). The group includes the only sequenced archaean that has a monothiol glutaredoxin (*Halobacterium* sp.). With the exception of the latter, all the proteins grouped in this cluster have a single monothiol Grx domain and are predicted to be in the mitochondria.

It is significant that the monothiol glutaredoxin of the α -proteobacterium *Rickettsia prowazekii*, proposed to be the closest fully sequenced relative to the endosymbiotic ancestor of mitochondria (Andersson *et al.*, 1998), has separated early from all other sequences (Figure 2).

The above results further support the idea that duplication of an ancestor monothiol glutaredoxin gene, followed by fusion of a Trx module to one of the duplicated Grx genes, occurred early during eukaryotic evolution after endosymbiosis, probably with a *Rickettsia* ancestor. This would explain why molecules with the Trx–Grx structure are found in eukaryotic groups that range from unicellular fungi to plants and mammals. The absence of a Trx–Grx monothiol glutaredoxin gene in some eukaryotic fully sequenced genomes, such as that of *Caenorhabditis elegans*, could be explained by loss of the Trx domain at genome level rather than by repeated Trx–Grx fusion events in the eukaryotic lineage.

Phylogenetic profiles of Grx5 homologues and other proteins involved in Fe–S cluster assembly

Based on the fact that Grx5 participates in the synthesis of Fe–S clusters at the mitochondrial matrix (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 2002), we studied the co-occurrence of Grx5 homologues with homologues of the other yeast mitochondrial proteins participating in the synthesis of the clusters. We used 67 completely sequenced prokaryotic chromosomes (51 bacteria plus 16 archaeans) for the analysis (Figure 3). Grx5 homologues are present in all the proteobacteria except the ϵ group, in common with most of the other Fe–S-assembly proteins studied. Besides proteobacteria, only the two cyanobacteria species analysed plus *Halobacterium* sp., contain Grx5 homologues. Among the other Fe–S cluster synthesis-related proteins, Isa1 and Jac1 have the phylogenetic profiles that are more similar to that of Grx5, followed by Yfh1 and Nfs1 (Figure 3). On the contrary, Arh1 and Ssq1 gave the most dissimilar patterns to Grx5.

Although Grx5 homologues are absent in many bacteria where there are Ssq1 homologues, Ssq1 homologues are always present in bacteria with Grx5 homologues. In *S. cerevisiae*, overexpression of Ssq1 rescue the defects caused by the lack of Grx5, which points to a close functional relationship between Ssq1 and Grx5 in yeast

cells (Rodríguez-Manzanque *et al.*, 2002). Furthermore, low-definition protein docking experiments predict that these two molecules form specific protein complexes that may help to fold/stabilize Grx5 as a functional protein (see below).

The case of Arh1 (ferredoxin reductase) is different from that of Ssq1. Arh1 homologues are found in many organisms where no Grx5 homologues are found and vice versa. This indicates that Arh1 functional homologues are not necessarily sequence homologues, suggesting a case of convergent evolution for the ferredoxin reductase activity between different organisms. To further support this, it is known that Arh1 in *S. cerevisiae* is a sequence homologue to the eukaryotic NADP-dependent adrenodoxin reductase (Manzella *et al.*, 1998) while in many bacteria there is no such homology. For example, the *Buchnera* Arh1 functional homologue (gene BU581, SwissProt entry P57641) has no sequence similarity to the *S. cerevisiae* Arh1 ferredoxin reductase, according to the Iteralign algorithm (Brocchieri and Kerlin, 1998).

As a control, in the study we included three mitochondrial proteins of *S. cerevisiae* that are not involved in Fe–S cluster synthesis. Trx3 is a mitochondrial thioredoxin (Pedrajas *et al.*, 1999), Cox1 is the cytochrome *c* oxidase subunit I, encoded by a mitochondrial gene (Lemaire *et al.*, 1998), and Pdb1 is the pyruvate dehydrogenase β -subunit (Miran *et al.*, 1993). Homologues of these three proteins exist in a wider range of prokaryotic microorganisms than Grx5 homologues (Figure 3), even in the case of a mitochondrially-encoded protein such as Cox1. This shows that the phylogenetic profile of a protein is not necessarily determined by the mitochondrial character of the protein.

The γ -proteobacterium *Buchnera* sp. contains the smallest fully sequenced genome (Shigenobu *et al.*, 2000) that encodes for a Grx5 homologue (Figure 3). Therefore, we made a PSI-BLAST comparison of the products of the 564 coding genes of *Buchnera* sp. APS against all the proteins from 79 genomes (55 bacteria, 14 archaeans and 10 eukaryotes) deposited in non-overlapping KEGG and NCBI databases. For each protein pair formed by the *Buchnera* sp. Grx5 homologue (gene BU187) and any other protein from this bacterium, we calculated the index of co-occurrence, i.e. the fraction of organisms in which homologues of both proteins are simultaneously present

Table 1. Index of co-occurrence between homologues of Grx5 and *S. cerevisiae* mitochondrial proteins

<i>S. cerevisiae</i> ORF	Protein	Index of co-occurrence	Known or predicted function ^a
YAL044w-A	Unknown	0.975	Putative DNA repair protein
YKL134c	Oct1	0.925	Mitochondrial import protein
YPL252	Yah1	0.912	Ferredoxin, Fe-S assembly
YLR239c	Lip2	0.900	Lipoyl ligase
YDR044w	Hem13	0.900	Heme biosynthetic pathway
YGR255c	Coq6	0.887	Monooxygenase, ubiquinone biosynthesis
YPR067w	Isa2	0.862	Fe-S assembly
YMR118c	Unknown	0.862	Unknown
YCL057w	Prd1	0.862	Metalloendopeptidase
YOR065w	Cyt1	0.850	Cytochrome c1 subunit
YMR193w	MrpL24	0.850	Mitochondrial ribosomal protein
YLR316c	Tad3	0.850	tRNA-specific adenosine deaminase subunit
YLL027w	Isa1	0.850	Fe-S assembly
YEL052w	Afg1	0.850	ATPase
YDL004w	Atp16	0.850	Hydrogen-transporting ATPase
YKR087c	Unknown	0.837	Unknown
YKL040c	Nfu1	0.837	Fe-S assembly
YGL136c	Mrm2	0.837	rRNA methyltransferase
YMR234w	Rnh1	0.825	Ribonuclease H
YLR059c	Rex2	0.825	3'-5' RNA exonuclease
YPL132w	Cox11	0.812	Assembly of cytochrome c oxidase
YKL141w	Sdh3	0.800	Succinate dehydrogenase
YDL120W	Yfh1	0.800	Frataxin, Fe-S assembly
YBR026c	Mrf1	0.800	Enoyl-(acyl-carrier protein) biosynthesis

^a From the *Saccharomyces* Genome Database.

of the Fe-S-containing protein cytochrome *bc*₁ has been shown (Isaya and Kalousek, 1995; Nett *et al.*, 1997), as well as the functional interaction between Oct1 and the Yfh1 frataxin (Branda *et al.*, 1999). Altogether, the results suggest that Oct1/Prd1 could be important for Grx5 maturation/import into mitochondria.

Protein interaction prediction between Grx5 and proteins involved in Fe-S cluster assembly

Determining the existence of strong specific protein complexes between Grx5 and other components of the ISC machinery in yeast would support the proposed role of Grx5 and establish hierarchical relationships with a subset of these components. Because there is no available three-dimensional structure (determined by nuclear magnetic resonance or X-ray crystallography analyses) for any of the Fe-S cluster synthesis proteins of *S. cerevisiae*, we used 3D-JIGSAW (Bates *et al.*, 2001) to obtain predictions for these structures. We then used low definition protein docking (Vakser and

Jiang, 2001) to predict the strength and stability/specificity of the strongest complexes between Grx5 and other ISC proteins (Table 2). Highest values for complex strength and specificity were obtained for Grx5 interactions with Arh1, Ssq1 and Isa1. Importantly, these values were comparable with the positive control between Yah1 and its reductase Arh1 (Table 2). We made another test to investigate the validity of the algorithms used. Bovine ferredoxin and ferredoxin reductase form a complex that has been determined by X-ray crystallography (Protein Database, entry No. 1E6E). We applied the GRAMM docking algorithm to the two separate proteins and recovered the same complex as the experimentally determined one (data not shown). A final positive control was done by docking the signal peptide of yeast malate dehydrogenase to its processive protease and recovering a complex that is approximately the crystallized one (Protein Database, entry No. 1HR9).

Other proteins showing high evolutionary co-occurrence with Grx5 in Table 1 were also analysed for their interactions with this glutaredoxin.

Table 2. Prediction of complex strength and complex specificity/stability between Grx5 and other Fe–S cluster biosynthesis proteins or mitochondrial proteins with high index of co-occurrence

Protein complex	Complex strength ^a	Complex specificity ^b
Grx5/Ssq1	517	14
Grx5/Arh1	658	15
Grx5/Isa1	389	12
Grx5/Atm1	497	7
Grx5/Jac1	471	6
Grx5/Nfu1	376	2
Grx5/Isa2	343	5
Grx5/Isu1	334	5
Grx5/Yah1	326	5
Grx5/Yfh1	325	3
Arh1/Yah1	615	17
Grx5/Oct1	1068	13
Grx5/Prd1	1024	7
Grx5/Rex2	497	2
Grx5/Cyt1	468	4
Grx5/Lip2	428	3
Grx5/Atp16	370	2
Grx5/Cox11	321	4

^a The complex strength is measured in arbitrary and consistent energy units (Vakser and Jiang, 2001).

^b The complex specificity is measured as the number of instances in which each protein pair appears within the 20 strongest complexes having approximately the same coordinates for the interacting surface.

Among these, only complexes with Oct1 or Prd1 are predicted to be both strong and stable/specific (Table 2), with Oct1 giving the highest score. Altogether, the results support the direct involvement of Oct1/Prd1 in Grx5 import/maturation. As negative controls, we included the strength and specificity parameters of the respective pairs formed by Grx5 and each of five mitochondrial proteins (Rex2, Cyt1, Lip2, Atp16 and Cox11), which are not related with Fe–S cluster biosynthesis (Table 2).

Two-hybrid analyses confirm the physical interaction between Grx5 and Isa1

In order to confirm the predicted interaction between Grx5 and other ISC components, we carried out directed two-hybrid analyses involving Grx5 (fused to the DNA binding domain of Gal4) and any of the other known ISC components as the partner fused to the Gal4 activator domain. Using β -galactosidase activity as reporter for *in vivo* interactions, we observed positive interaction of Grx5 with Isa1 (Figure 4), but not with

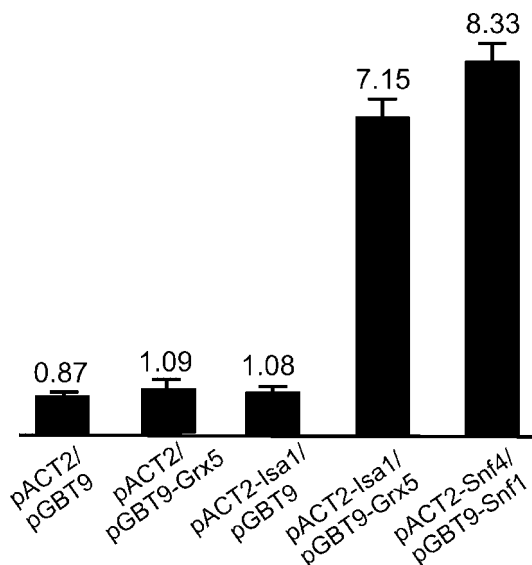


Figure 4. Two-hybrid analysis of the interaction between Grx5 and Isa1. Numbers over bars indicate the β -galactosidase activity (Miller units) in cultures of *S. cerevisiae* cells co-transformed with the indicated plasmids: pGBT9 and pACT2 vectors alone, or derivatives expressing the respective Gal4 fusion proteins with Grx5, Isa1, Snf1 or Snf4. The results are the means of three independent experiments

other ISC components (not shown). It is remarkable that with the above assay, the Grx5/Isa1 interaction was almost as strong as the well known interaction between Snf1 and Snf4 proteins that was used as a positive control. The negative results with other ISC components could reflect the absence of other real *in vivo* interactions, or rather the fact that in the present assay only interactions that are stable in the cell nucleus are readily detected. In any case, our results confirm that Grx5 interacts *in vivo* with some ISC components.

Discussion

Of the three monothiol glutaredoxins in yeast, Grx5 participates in the formation of iron–sulphur (Fe–S) clusters in the mitochondria (Bellí *et al.*, 2002), together with other mitochondrial proteins (Lill and Kispal, 2000; Mühlenhoff and Lill, 2000; Mühlenhoff *et al.*, 2002). These include Nfs1, a cysteine desulphurase that provides sulphur to the Fe–S biosynthetic machinery, as well as Isu1/Isu2 and Isa1/Isa2 (two pairs of proteins that act as

scaffolds for the assembly of iron and sulphur into the clusters), and the chaperone Ssq1 and its co-chaperone Jac1 (respectively from the Hsp70 and Hsp40 types). The process of Fe–S synthesis requires NADH as electron donor (Mühlenhoff *et al.*, 2002), through a transport chain involving the ferredoxin Yfh1 and the ferredoxin reductase Arh1. Nfu1 is another mitochondrial protein with a non-characterized partially dispensable role in the Fe–S cluster assembly. The participation of the frataxin Yfh1 protein in the biogenesis of the clusters is object of discussion. Initially, Yfh1 was proposed to participate in the cellular homeostasis of iron because the lack of Yfh1 leads to iron accumulation in the mitochondria (Babcock *et al.*, 1997). More recent biochemical studies, however, support a direct role of frataxin in the Fe–S cluster assembly, indicating that the mitochondrial accumulation of iron is a secondary consequence of the disruption of the iron assembly into the Fe–S clusters (Chen *et al.*, 2000; Mühlenhoff *et al.*, 2002). Although synthesis of all the Fe–S clusters occurs at the mitochondrial matrix in yeast, two additional proteins are required for the assembly of the clusters into extramitochondrial proteins: Atm1 is an ABC transporter located at the inner mitochondrial membrane (Kispal *et al.*, 1999), while the mitochondrial intermembrane space protein Erv1 would operate downstream of Atm1 in the export of the Fe–S clusters destined to the cytosolic or nuclear apoproteins (Lange *et al.*, 2001). The absence of Grx5 causes phenotypes similar to those caused by the absence of other yeast proteins participating in the synthesis of the clusters, among them defects in the activity of Fe–S enzymes, the incapacity for respiratory growth and the accumulation of iron in the cell (Rodríguez-Manzanares *et al.*, 2002).

The above proteins constitute the so-called ISC machinery, and many of them have orthologues in prokaryotes, which shows that the process of Fe–S cluster formation arose early in evolution (Mühlenhoff and Lill, 2000). In bacteria, most of the genes involved are grouped in a single *isc* operon. *Azotobacter vinelandii* possesses a second *nif* operon that codes for proteins specifically involved in the formation of the Fe–S cluster of the nitrogenase (NIF machinery) (Peters *et al.*, 1995).

No detailed biochemical data exist supporting the idea that Fe–S cluster assembly in *S. cerevisiae* occurs in a multiprotein complex involving several or all of the ISC proteins. However, the fact that the

NFU1 gene has been detected in a synthetic lethal screen with *SSQ1* leads to hypothesize that Nfu1 is a direct or indirect substrate of the Ssq1 chaperone (Schilke *et al.*, 1999). Moreover, physical interaction between Isu1 and Nfs1 has been revealed in a comprehensive mass-spectrometry study of protein–protein interactions in yeast (Ho *et al.*, 2002), in experimental conditions that support the biological relevance of such interaction. Studies on Fe–S cluster synthesis in *Escherichia coli* suggest that stable protein–protein interactions are established among components of the ISC machinery (Agar *et al.*, 2000). According to those studies, IscU (*E. coli* orthologue of Isu1) acts as a scaffold for the ISC components (Agar *et al.*, 2000). In particular, IscS (Nfs1) participates at an early stage of the Fe–S cluster assembly as a cysteine desulphurase that transfers a sulphur atom from L-cysteine to IscU and then to the Fe–S cluster, in a process where a covalently-bound IscS/IscU complex is formed (Urbina *et al.*, 2001; Smith *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2002). The process is specifically assisted by the Hsc66 (Ssq1) chaperone and the Hsc20 (Jac1) co-chaperone (Silberg *et al.*, 2001; Hoff *et al.*, 2002). On the other hand, based on physical chemistry studies, IscA (Isa1) has been proposed as an alternative scaffold to IscU (Krebs *et al.*, 2001) and it forms a functional stable complex with the *E. coli* ferredoxin (Ollagnier-de-Choudens *et al.*, 2001).

The yeast Grx5 protein is a model for monothiol glutaredoxins formed by a single Grx domain. Homologous proteins with the same domain architecture are present both in prokaryotes and eukaryotes, although the only homologue with a known functional role is Grx5. This paper shows that the phylogenetic profile of Grx5 homologues among prokaryotes is similar to the profiles of a subset of proteins of the ISC machinery, suggesting that prokaryotic Grx5 orthologues are also required for the assembly of the Fe–S complexes. Among bacteria, the ISC machinery is characteristically present in the α -, β - and γ -proteobacteria groups (Mühlenhoff and Lill, 2000). Homologues of Grx5 are present in those bacterial groups, but absent in other prokaryotes for which fully sequenced genomes exist, with the exceptions of cyanobacteria and *Halobacterium* sp. The presence of a Grx5 homologue in this archaean may reflect the high frequency of horizontal gene transfer between *Halobacterium* and bacteria (Korbel *et al.*, 2002).

Although Archaea species contain proteins with Fe–S clusters, these are likely to be synthesized by a third mechanism (in addition to the ISC and NIF machineries) recently characterized (Takahashi and Yokumoto, 2002). ϵ -Proteobacteria do not contain homologues of most of the ISC proteins, including Grx5 (Figure 3). In this bacterial group a NIF-like machinery seems to be responsible for the synthesis of the Fe–S clusters (Olson *et al.*, 2000).

Our phylogenetic profile studies extend those of Huynen *et al.* (2001), which were done for Yfh1 frataxin. The present work indicates that Grx5 homologues have not co-evolved in parallel with all the ISC machinery components in all organisms, pointing to functional specializations. The highest indexes of co-occurrence (larger than 0.80) are observed for Yah1, Isa1, Isa2, Nfu1 and Yfh1, in accordance with a previous study that supported co-evolution of Yfh1 with Yah1, Isa1/2 and Nfu1 (Huynen *et al.*, 2001). In addition, for Jac1, an index higher than 0.77 was obtained in our study (data not shown).

The results reported here predict a strong and stable interaction of Grx5 with Ssq1 and Arh1 (the reductase of Yah1) and a stable interaction with Isa1. We have confirmed that the latter interaction occurs *in vivo*, using two-hybrid analysis. The formation of the Fe–S clusters in the yeast mitochondrial matrix is not well understood, although the recent development of an *in vitro* assembly assay (Mühlenhoff *et al.*, 2002; 2003) may help in further elucidating this process. Nevertheless, based on the conservation of the function of the ISC machinery throughout evolution (Mühlenhoff *et al.*, 2000), results from *E. coli* and *A. vinelandii* studies (see Introduction and references therein) can be used to suggest the role of individual ISC components in yeast. Isa1 (maybe forming heterodimers with Isa2; Mühlenhoff *et al.*, 2000) could act as a scaffold for the initial assembly of the Fe–S clusters in a Nfs1-directed manner. The process could be assisted by the Ssq1/Jac1 chaperone. Once formed, the Fe–S clusters could be transferred to the Yah1 ferredoxin in a redox process in which Arh1 would be the NADPH-dependent reductase. The roles of Nfu1 and Yfh1 can not be predicted in this scenario, since their biochemical activities are unknown. Given the probable existence of a stable multiprotein complex where these reactions would occur, Grx5 would be part of this complex. As a monothiol glutaredoxin, it catalyses the deglutathionylation

of mixed disulphides formed between glutathione and protein sulphhydryl groups (Herrero and Ros, 2002). Grx5 could act (using a monothiol mechanism) in the reduction of disulphide bonds in the Isa proteins previous to coordination of iron atoms to the reduced cysteine residues of the protein. Alternatively, Grx5 could be necessary for repairing the inactivating mixed disulphides that could be formed, in oxidative conditions, between glutathione and the cysteine residues responsible for iron chelation. The destabilizing action of glutathione on Fe–S clusters has been shown in *E. coli* (Ding and Demple, 1996). Our theoretical and experimental results support the existence of a physical interaction of Grx5 with Isa1, but not with Isa2. It should be remarked that Isa1 and Isa2 do not necessarily carry out exactly overlapping functions (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002), which could be related to the fact that sequence homology between both proteins is restricted to some specific regions.

Other aspects of Fe–S cluster biosynthesis are emphasized by our results. First, import and processing of Grx5 into the mitochondria would require the activity of the Oct1 and Prd1 mitochondrial intermediate peptidases, which are predicted to form strong and specific interactions with Grx5. Second, an alternative role for Ssq1 (and Jac1) could be their participation in Grx5 folding during mitochondrial import, a role that could be extended to other ISC components. However, no data exist supporting this Ssq1 role during internalization. Third, although Arh1 is the Yah1 reductase in yeast (and this would explain the predicted interaction with Grx5), this is not a conserved trait along evolution. In fact, the index of co-occurrence between Arh1 and Grx5 homologues is rather low. A different ferredoxin reductase would operate in most bacteria.

Taken together, our results indicate that monothiol glutaredoxins with the simple domain structure characteristic of Grx5 were already present in primitive proteobacteria (except the ϵ -group), forming part of the ISC machinery. This function of monothiol glutaredoxins was transferred to early eukaryotes through the endosymbiotic ancestor, maintaining their function in the synthesis of Fe–S clusters, at least in yeast species. Besides Grx5, *S. cerevisiae* cells contain two more proteins (Grx3 and Grx4) in which the monothiol glutaredoxin

domain (Grx) is fused to a N-terminal thioredoxin-like (Trx) domain. Homologues with these characteristics are present in many other eukaryotes, but not in prokaryotes. The limited number of fully sequenced eukaryotic genomes prevents the application of the phylogenetic profile approach to Grx3/Grx4. Sequence analyses support the idea that these Trx–Grx molecules resulted from the duplication, early in the eukaryotic lineage, of an ancestral *GRX* gene followed by the fusion of a *TRX* gene to one of the duplicated copies. The presence of two different Trx–Grx molecules such as Grx3 and Grx4 in *S. cerevisiae* would result from a more recent duplication event, specific to the evolutionary line of budding yeast, as the fission yeast and other eukaryotes contain a single Trx–Grx glutaredoxin. The early addition of a Trx module to a glutaredoxin molecule in eukaryotes would have allowed the functional diversification of these molecules from the original Grx function in the ISC machinery, paralleled by differential compartmentation. In fact, in the case of *S. cerevisiae*, overexpression of Grx3 or Grx4 does not suppress the defects of a null *grx5* mutant (Rodríguez-Manzanares *et al.*, 2002), while when we target either Grx3 or Grx5 to the mitochondria of these *grx5* mutant cells the defects are rescued (our unpublished observations). Therefore, although Grx3 or Grx4 would potentially substitute for the Grx5 function in the ISC machinery, in fact they have separate functions from Grx5. The situation would be similar in other eukaryotes where Grx and Trx–Grx proteins coexist, although in separate compartments. It is interesting to note that the thioredoxin domains of these molecules contain a conserved cysteine in what originally was the thioredoxin active site (Figure 1B). This residue may have a regulatory on the activity of Trx–Grx5 molecules, although further work is needed to elucidate the function of these eukaryotic thioredoxin–glutaredoxin chimaeric proteins.

Acknowledgements

R.A. was supported by a Fellowship SB2000-031 from the Spanish Ministerio de Educacion, Cultura y Deporte. M.R.-M. received a Marie Curie Training Fellowship from the European Union. S.S. received a fellowship from the Swedish Foundation for Strategic Research. This work was supported by the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project No. BMC2001-1213-C02-01) and the Generalitat de Catalunya (Project No. 2001SGR-00305) to

E.H., and by the Swedish Research Council for Science and Technology (grant 2003-3189) to P.S.

References

- Agar JN, Krebs C, Frazzoni J, *et al.* 2000. IscU as a scaffold for iron–sulphur cluster biosynthesis: sequential assembly of [2Fe–2S] and [4Fe–4S] clusters in IscU. *Biochemistry* **27**: 7856–7862.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, *et al.* 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programmes. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389–3402.
- Andersson SGE, Zomorodipour A, Andersson JO, *et al.* 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**: 133–140.
- Babcock M, De Silva D, Oaks R, *et al.* 1997. Regulation of mitochondrial iron accumulation by Yfh1, a putative homolog of frataxin. *Science* **276**: 1709–1712.
- Bates PA, Kelley LA, MacCallum RM, Sternberg MJE. 2001. Enhancement of protein modelling by human intervention in applying the automatic programmes 3D-JIGSAW and 3D-PSSM. *Proteins* **5**(suppl): 39–46.
- Bellí G, Polaina J, Tamarit J, *et al.* 2002. Structure-function analysis of yeast Grx5 monothiol glutaredoxin defines essential amino acids for the function of the protein. *J Biol Chem* **277**: 37 590–37 596.
- Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, *et al.* 2001. GenBank. *Nucleic Acids Res* **30**: 17–20.
- Branda SS, Yang ZY, Chew A, Isaya G. 1999. Mitochondrial intermediate peptidase and the yeast frataxin homolog together maintain mitochondrial iron homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Hum Mol Genet* **8**: 1099–1110.
- Brocchieri L, Karlin S. 1998. A symmetric-iterated multiple alignment of protein sequences. *J Mol Biol* **276**: 249–264.
- Bushweller JH, Aslund F, Wuthrich K, Holmgren A. 1992. Structural and functional characterization of the mutant *Escherichia coli* glutaredoxin (C14-S) and its mixed disulphide with glutathione. *Biochemistry* **31**: 9288–9293.
- Chen OS, Haemmnway S, Kaplan J. 2002. Inhibition of Fe–S cluster biosynthesis decreases mitochondrial iron export: evidence that Yfh1 affects Fe–S cluster synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 12 321–12 326.
- Claros MG, Vincens P. 1996. Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**: 779–786.
- Ding H, Demple B. 1996. Glutathione-mediated destabilization *in vitro* of [2Fe–2S] centers in the SoxR regulatory protein. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 9449–9453.
- Draculic T, Dawes IW, Grant CM. 2000. A single glutaredoxin or thioredoxin is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **36**: 1167–1174.
- Ettema T, van der Oost J, Huynen MA. 2001. Modularity in the gain and loss of genes: applications for function prediction. *Trends Genet* **97**: 485–487.
- Felsenstein J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c: <http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>
- Gaasterland T, Ragan M. 1998. Phyletic and functional patterns of ORF distribution among prokaryotes. *J Microb Comp Genom* **3**: 199–217.

- Herrero E, Ros J. 2002. Yeast glutaredoxins and protection against oxidative stress. *Methods Enzymol* **348**: 136–146.
- Ho Y, Gruhler A, Heilbut A, et al. 2002. Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature* **415**: 180–183.
- Hoff KG, Ta DT, Tapley TL, Silberg JJ, Vickery LE. 2002. Hsc66 substrate specificity is directed toward a discrete region of the iron–sulphur cluster template protein IscU. *J Biol Chem* **277**: 27 353–27 359.
- Holmgren A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J Biol Chem* **254**: 13 963–13 966.
- Holmgren A, Aslund F. 1995. Glutaredoxin. *Methods Enzymol* **252**: 283–292.
- Huynen M, Snel B, Lathe W III, Bork P. 2000. Predicting protein function by genomic context: quantitative evaluation and qualitative inferences. *Genome Res* **10**: 1204–1210.
- Huynen M, Snel B, Bork P, Gibson TJ. 2001. The phylogenetic distribution of frataxin indicates a role in iron–sulphur cluster protein assembly. *Hum Mol Genet* **10**: 2463–2468.
- Isaya G, Miklos D, Rollins RE. 1994. *MIP1*, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**: 5603–5610.
- Isaya G, Kalousek F. 1995. Mitochondrial intermediate peptidase. *Methods Enzymol* **248**: 556–567.
- Kato S, Mihara H, Kurihara T, et al. 2002. Cys-328 of IscS and Cys-63 of IscU are the sites of disulphide bridge formation in a covalently bound IscS/IscU complex: implications for the mechanism of iron–sulphur cluster assembly. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 5948–5952.
- Kispal C, Csere P, Prohl C, Lill R. 1999. The mitochondrial proteins Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *EMBO J* **18**: 3981–3989.
- Korbel JO, Snel B, Huynen MA, Bork P. 2002. SHOT: a web server for the construction of genome phylogenies. *Trends Genet* **18**: 158–162.
- Krebs C, Agar JN, Smith AD, et al. 2001. IscA, an alternate scaffold for Fe–S cluster biosynthesis. *Biochemistry* **40**: 14 069–14 080.
- Lange H, Lisowsky T, Gerber J, et al. 2001. An essential function of the mitochondrial sulphhydryl oxidase Erv1p/ALR in the maturation of cytosolic Fe–S proteins. *EMBO Rep* **2**: 715–720.
- Lemaire C, Robineau S, Netter P. 1998. Molecular and biochemical analysis of *Saccharomyces cerevisiae* *cox1* mutants. *Curr Genet* **34**: 138–145.
- Lill R, Kispal G. 2000. Maturation of cellular Fe–S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem Sci* **25**: 352–356.
- Luikenhuis S, Dawes IW, Grant CM. 1997. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **9**: 1081–1091.
- Manzella L, Barros MH, Nobrega FG. 1998. *ARH1* of *Saccharomyces cerevisiae*: a new essential gene that codes for a protein homologous to the human adrenodoxin reductase. *Yeast* **14**: 839–846.
- Marcotte EM, Pellegrini M, Ng HL, et al. 1999. Detecting protein function and protein–protein interactions from genome sequences. *Science* **285**: 751–753.
- Marcotte EM, Xenarios I, van der Blik AM, Eisenberg D. 2000. Localizing proteins in the cell from their phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 12 115–12 120.
- Miran SG, Lawson JE, Reed LJ. 1993. Characterization of *PDHβ1*, the structural gene for the pyruvate dehydrogenase β-subunit from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**: 1252–1256.
- Mühlenhoff U, Lill R. 2000. Biogenesis of iron–sulphur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1459**: 370–382.
- Mühlenhoff U, Richhardt N, Gerber J, Lill R. 2002. Characterization of iron–sulphur protein assembly in isolated mitochondria. *J Biol Chem* **277**: 29 810–29 816.
- Mühlenhoff U, Gerber J, Richhardt N, Lill R. 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron–sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *EMBO J* **22**: 4815–4825.
- Nett JH, Denke E, Trumpower BL. 1997. Two-step processing is not essential for the import and assembly of functionally active iron–sulphur protein into the cytochrome *bc*₁ complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**: 2212–2217.
- Neupert W. 1997. Protein import into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **66**: 863–917.
- Ollagnier-de-Choudens S, Mattioli T, Takahashi Y, Fontecave M. 2001. Iron–sulphur cluster assembly: characterization of IscA and evidence for a specific and functional complex with ferredoxin. *J Biol Chem* **276**: 22 604–22 607.
- Olson JW, Agar JN, Johnson MK, Maier RJ. 2000. Characterization of the NifU and NifS Fe–S cluster formation proteins essential for viability in *Helicobacter pylori*. *Biochemistry* **39**: 16 213–16 219.
- Pedrajas JR, Kosmidou E, Miranda-Vizuete A, et al. 1999. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 6366–6373.
- Pellegrini M, Marcotte EM, Thompson MJ, Eisenberg D, Yeates TO. 1999. Assigning protein functions by comparative genome analysis: protein phylogenetic profiles. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 42 885–42 888.
- Peters JW, Fisher K, Dean DR. 1995. Nitrogenase structure and function: a biochemical–genetic perspective. *Annu Rev Microbiol* **49**: 335–366.
- Powis G, Montfort WR. 2001. Properties and biological activities of thioredoxins. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **41**: 261–295.
- Rahlfs S, Fischer M, Becker K. 2001. *Plasmodium falciparum* possesses a classical glutaredoxin and a second, glutaredoxin-like protein with a PICOT homology domain. *J Biol Chem* **276**: 37 133–37 140.
- Rodríguez-Manzanique MT, Ros J, Cabisco E, Sorribas A, Herrero E. 1999. Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8180–8190.
- Rodríguez-Manzanique MT, Tamarit J, Bellí G, Ros J, Herrero E. 2002. Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulphur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109–1121.
- Rodríguez-Navarro S, Llorente B, Rodríguez-Manzanique MT, et al. 2002. Functional analysis of yeast gene families involved in metabolism of vitamins B₁ and B₆. *Yeast* **19**: 1261–1276.
- Rupp S. 2002. *LacZ* assays in yeast. *Methods Enzymol* **350**: 112–131.
- Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E. 1999. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria

- of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Nat Acad Sci USA* **96**: 10 206–10 211.
- Shigenobu S, Watanabe H, Hattori M, Sakaki Y, Ishikawa H. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* **407**: 81–86.
- Silberg JJ, Hoff KG, Tapley TL, Vickery LE. 2001. The Fe–S assembly protein IscU behaves as a substrate for the molecular chaperone Hsc66 from *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **276**: 1696–1700.
- Smith AD, Agar JN, Johnson KA, *et al.* 2001. Sulphur transfer from IscS to IscU: the first step in iron–sulphur cluster biosynthesis. *J Am Chem Soc* **123**: 11 103–11 104.
- Takahashi Y, Tokumoto U. 2002. A third bacterial system for the assembly of iron–sulphur clusters with homologs in Archaea and plastids. *J Biol Chem* **277**: 28 380–28 383.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. ClustalW: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**: 4673–4680.
- Urbina HD, Silberg JJ, Hoff KG, Vickery LE. 2001. Transfer of sulphur from IscS to IscU during Fe–S cluster assembly. *J Biol Chem* **276**: 44 521–44 526.
- Vakser IA, Jiang S. 2001. Strategies for modeling the interactions of transmembrane helices of G protein-coupled receptors by geometric complementarity using the GRAMM computer algorithm. *Methods Enzymol* **343**: 313–28.
- Witte S, Villalba M, Bi K, Liu Y, Isakov N, Altman A. 2000. Inhibition of the C-Jun N-terminal kinase/AP-1 and NF- κ B pathways by PICOT, a novel protein kinase C-interacting protein with a thioredoxin homology domain. *J Biol Chem* **275**: 1902–1909.