Biblioteca Digital FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL ELOIR

Tesis Doctoral

Estudio integrativo de vías de señalización de MAP quinasas de Saccharomyces cerevisiae

Baltanás, Rodrigo

2012-07-27

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Baltanás, Rodrigo. (2012-07-27). Estudio integrativo de vías de señalización de MAP quinasas de Saccharomyces cerevisiae. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Baltanás, Rodrigo. "Estudio integrativo de vías de señalización de MAP quinasas de Saccharomyces cerevisiae". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012-07-27.

EXACTAS Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar









Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular

Estudio integrativo de vías de señalización de MAP quinasas de *Saccharomyces cerevisiae*

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: Ciencias Biológicas

Lic. Rodrigo Baltanás

Director de tesis: Dr. Alejandro Colman-Lerner Consejero de estudios: Dr. Alberto R. Kornblihtt

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (IFIBYNE-CONICET, FCEyN-UBA)

Buenos Aires, 2012

Estudio integrativo de sistemas de señalización de MAP quinasas de Saccharomyces cerevisiae

Resumen

El objetivo principal de esta tesis fue estudiar la interacción entre las vías de MAP quinasas de *Saccharomyces cerevisiae*. Estas vías están representadas en humanos, donde su mal funcionamiento puede conducir a patologías tales como cáncer o problemas en el desarrollo.

La complejidad de los circuitos de señalización de MAP quinasas en células de mamíferos dificulta la comprensión de como estas integran las señales que los activan. Para resolver este problema, una estrategia es analizar sistemas biológicos más simples que comparten propiedades con los más complejos. En este sentido, nos propusimos caracterizar exhaustivamente sistemas de señalización de MAP quinasas en un sistema biológico simple, la levadura *S. cerevisiae*.

En esta tesis decidimos determinar los puntos de flujo de información entre las vías de "Respuesta a Shock Hiperosmótico" (HOG) y de "Respuesta a Feromona" (PR) de levaduras, ya que estas vías comparten componentes en sus vías de señalización y existe controversia sobre sus interacciones. A su vez, estudiamos estas vías en células individuales, estimulando las mismas controlando la dosis de los estímulos utilizados y en una variada serie de condiciones experimentales. Finalmente, medimos las respuestas de estas vías de un modo cuantitativo, estudiando su dinámica temporal y analizando el mayor número de respuestas posible en cada célula.

Resumiendo los resultados obtenidos, podemos decir, que la vía de HOG no presenta osmoadaptación perfecta como se había afirmado previamente y permanece activa en estado estacionario. Su activación es mayor cuanto mayor es la osmolaridad externa, y también depende del gradiente químico de glicerol. Además, vemos una alta variabilidad de la respuesta de HOG en células individuales.

A nivel de las interacciones entre las vías de MAP quinasas, determinamos que la vía PR es capaz de activar a la vía HOG en células adaptadas a alta osmolaridad. Esta compleja activación requiere de la MAPK de la vía de integridad de la pared celular (CWI) Slt2/Mpk1 y del polarisoma. La activación de HOG es pulsátil y presenta una alta variabilidad en células individuales. Los picos de actividad de HOG coinciden con eventos morfogenéticos inducidos por PR en los cuales se activa Slt2/Mpk1. La vía PR induce una salida de glicerol, que estaría mediada por Slt2/Mpk1, y este sería el mecanismo que llevaría a la activación de la vía HOG. La inducción de HOG también puede lograrse a través de la activación de Slt2/Mpk1 mediante shock térmico. Ambos tipos de activaciones (por feromona o alta temperatura) son proporcionales a la osmolaridad externa y dependen del gradiente químico de glicerol. Una consecuencia fisiológica de esta activación de HOG promovida por la vía PR es que las células en estas condiciones presentan una mejor capacidad de osmoadaptación.

Finalmente, podemos agregar que los shocks hiperosmóticos inhiben a la vía PR durante la etapa de respuesta aguda, pero no hemos establecido aún los actores moleculares que median esta inhibición. Sin

embargo, podemos descartar algunos componentes de la vía de HOG como Sho1, Ssk1 y Hog1. Para terminar, la alta osmolaridad, a largo plazo, en células ya adaptadas, cambia la dinámica de la respuesta de la vía PR reduciendo su sensibilidad a α factor. Esta reducción es proporcional a la osmolaridad externa.

Esperamos que los resultados encontrados en este sistema biológico sean de utilidad, para pensar de una manera más integrativa, como se comporta la dinámica de la respuesta en un dado sistema frente a múltiples señales externas, de acuerdo a como el mismo las integra globalmente.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae,* Levadura, Biología cuantitativa, Transducción de señales, MAPK, MAP quinasas, Respuesta a estrés, Respuesta de desarrollo, Vía HOG, Vía de Respuesta a Shocks Hiperosmóticos, Vía PR, Vía de Respuesta de Apareamiento, Vía CWI, Vía de Integridad de Pared Celular.

Integrative study of MAPK signaling pathways in *Saccharomyces* cerevisiae

Abstract

The main objective of this thesis was to study the interaction between MAPK signaling pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. These pathways are represented in humans, were the malfunction of them can lead to pathologies such as cancer or developmental problems.

The complexity of MAPK signaling circuits in mammalian cells difficult the understanding of how they integrate the signals activating them. As a means to solve this problem, one strategy is to analyze simpler biological systems that share properties with the more complex ones. In these sense, we ought to characterize thoroughly MAPK signaling pathways in a simple biological system, the yeast *S. cerevisiae*.

In this thesis we decided to determine the points of information flow between the yeast "High Osmolarity" (HOG) and the "Pheromone Response" (PR) pathways, because they share components in their signaling cascades and there is controversy in how they interact. In addition to these, we studied these pathways in individual cells, stimulating them by controlling the stimulus doses and under a several experimental conditions. Finally, we measured the output of these pathways in a quantitative way, studying their temporal dynamics and analyzing the most number of possible readouts.

Summing up the results obtained, we can say that, the HOG pathway does not present perfect adaptation as it was previously stated and it remains active in steady state. Its activation is higher the higher the external osmolarity and it also depends on the chemical gradient of glycerol. Besides, we see high variability in the HOG output of individual cells.

At the level of interactions between the MAPK pathways, we determined that the PR pathway can activate the HOG pathway in cells adapted to high osmolarity. This complex activation requires the Cell Wall Integrity (CWI) MAPK Slt2/Mpk1 and the polarisome. This HOG activation occurs in pulses and presents high variability in single cells. The peaks of HOG activity coincide with PR induced morphogenetical events where Slt2/Mpk1 is activated. The PR pathway induces a glycerol efflux, which would be controlled by Slt2/Mpk1, and that would be the mechanism leading to HOG pathway activation. HOG induction can also be achieved through Slt2/Mpk1 heat shock activation. Both kinds of activations (by pheromone or high temperature) are proportional to the external osmolarity and depend on the glycerol chemical gradient. One physiological consequence of these PR promoted HOG activation is that the cells present a better osmoadaptation capacity in these conditions.

Finally, we can add that hyperosmotic shocks inhibit PR pathway during the acute hyperosmotic phase, but we have not established yet the molecular actors that mediate this inhibition. However, we can rule out some of HOG pathway components like, Sho1, Ssk1 and Hog1. To finish, high osmolarity, at longer times in cells already adapted, changes the dynamics of PR response reducing its sensitivity to α factor. This reduction is proportional to the external osmolarity.

We hope the results found in this biological system are helpful, to think in a more integrative way, how the output dynamics of a system behaves, facing multiple external signals, depending on how it integrates them globally.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae,* Yeast, Quantitative Biology, Signal Transduction, MAPK, Stress response, Developmental response, HOG, Hyperosmotic shock Pathway, PR pathway, Pheromone Response Pathway, CWI Pathway, Cell Wall Integrity Pathway.

Agradecimientos

Dedicada a todos los que hicieron posible que pudiera llegar hasta este punto, especialmente a mi familia, a mis compañeros de laboratorio y del instituto, a mis amigos, parientes que me apoyan y soportan todo el tiempo. Además quiero agradecer a mi director y a todos mis profesores y a su vez quiero reivindicar la educación publica, gratuita y de excelencia. Gracias a mi patria. Como diría Rubén Blades, "Patria, son tantas cosas bellas", soy el producto de una de ellas ...

Letra de la canción "Patria" (Rubén Blades)

Hace algún tiempo Me preguntaba un chiquillo Por el significado De la palabra patria Me sorprendió con su pregunta Y con el alma en la garganta Le dije así

Flor de barrio, hermanito Patria, son tantas cosas bellas Como aquel viejo árbol Que nos habla y renueva Como el cariño que guardas Después de muerta la abuela Patria, son tantas cosas bellas Son las paredes de un barrio De su esperanza morena Es lo que lleva en el alma Como aquel cuando se aleja Son los mártires que gritan Bandera, bandera, bandera, bandera

No memorices lecciones Dictaduras o encierros La patria no la define Los que suprimen a un pueblo La patria es un sentimiento En la mirada de un viejo Son la entera primavera brisa de hermanita nueva Te contesto, hermanito, Patria son tantas cosas bellas.

Abreviaturas más utilizadas

MAPK: Quinasas Activadas por Agentes Mitogénicos. Del ingles, "Mitogen Activated Protein Kinase". PR: Vía de respuesta a feromona. Del ingles, "Pheromone response" pathway. HOG: Vía de respuesta a shocks hiperosmóticos. Del ingles, "High Osmoalrity Glicerol" pathway. CWI: Vía de integridad de pared celular. Del ingles, "Cell Wall Integrity" pathway. Fus3: MAPK de la vía PR. Kss1: MAPK de la vía PR. Hog1: MAPK de la vía HOG. Slt2/Mpk1: MAPK de la vía CWI. CFP: Proteína cian fluorescente. Del ingles, "Cyan Fluorescent Protein". YFP: Proteína amarilla fluorescente. Del ingles, "Cyan Fluorescent Protein". PCR: Reacción en cadena de Polimerasa. DNA: Ácido deoxiribonucléico. RNA: Ácido ribonucléico. mRNA: RNA mensajero. ORF: Marco abierto de lectura. Del ingles, "Open reading frame". ATP: Adenosina trifosfato. dNTPs: deoxiribonucleotidosnucleotidos. NADH: Nicotinamida Adenina Dinucleótido. NaCI: Cloruro de sodio. *Cl₂Mg*: Cloruro de magnesio. OD: Densidad óptica.

Índice

Resumen.	2
Abstract.	4
Abreviaturas.	7
Introducción	4-30
1.1. ¿Porqué Saccharomyces cerevisiae?	14
1.2. Ciclo de vida de S. cerevisiae.	15
1.3. Ciclo de mitótico de <i>S. cerevisiae</i> .	16
1.4. Respuesta de apareamiento.	16
2. Sensado de señales extracelulares. Vías de MAP quinasas	17
2.1. Vía de Respuesta a Feromona (Vía PR).	19
2.2. Vía de señalización de Integridad de la Pared Celular (Vía CWI, "Cell Wall Integrity")	20
2.3. Vía de señalización a Alta Osmolaridad-Glicerol (Vía HOG, "High Osmolarity Glycerol")	22
3. Respuestas adaptativas.	24
4. Propiedades dinámicas de las respuestas de HOG y PR	25
5. Interacciones entre las vías HOG y CWI.	. 26
6. Interacciones entre las vías PR y HOG	26
7. La importancia del estudio de células individuales.	27
8. Biología cuantitativa y modelado de sistemas biológicos	28
Objetivos.	29
Resultados	1-86
1. Comportamiento de las vías de respuesta a feromona (PR) y de respuesta a shocks hiperosmóticos	
(HOG) y constitutiva (BMH2) frente a estímulos específicos.	31
2. La vía de respuesta a shocks hiperosmóticos (HOG) no presenta osmo-adaptación perfecta. Respuesta	
transcripcional de P _{STL1} -YFP y activación a nivel de fosforilación y cambio de localización de la MAPK Hog1.	33
3. La osmolaridad externa disminuye la respuesta de la vía PR	36
3.1. Coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa salvaje. Efectos sobre transcripción de la vía PR	,
агеа у тогтоюдіа	36

3.2. Preadaptación a alta osmolaridad y posterior estimulación con $lpha$ factor	38
3.3. Pretratamiento con α factor y posterior coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa salvaje.	
Efectos sobre transcripción de la vía PR y BMH2, fosforilación de MAPKs y reclutamiento de Ste5-YFP	40
3.4. Pretratamiento con α factor y posterior coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa Δ <i>hog1</i> .	
Efectos sobre la transcripción de la vía PR y BMH2 y morfología. 3.5. Pretratamiento con $lpha$ factor	
y posterior coestimulación con $lpha$ factor y shock osmótico en cepas: Δ <i>ssk1,</i> Δ <i>sho1</i> y <i>HOG1-AS1.</i> Efectos	
sobre la fosforilación de MAPKs	44
4. La vía PR activa a la vía HOG	47
4.1. Coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa salvaje. Efectos sobre la vía de HOG	47
4.2. Preadaptación a alta osmolaridad y posterior estimulación con $lpha$ factor. La estimulación con $lpha$ factor	
activa la vía HOG	49
4.3. Activación de la vía HOG mediada por feromona. Fus3 es necesaria para que se active la transcripción	
de P _{STL1} -YFP.	52
4.4. Activación de la vía HOG mediada por feromona. Componentes de la vía de HOG necesarios	53
4.5. La activación de la vía HOG mediada por feromona es mayor cuanto mayor es la osmolaridad a la que	
fueron adaptadas las células	55
4.5.1. Activación de HOG a nivel transcripcional de P _{STL1} .YFP.	55
4.5.2. Activación de HOG a nivel de la translocación de Hog1-Venus al núcleo	57
4.6. La activación de la vía HOG mediada por feromona está correlacionada con la aparición de la morfolog	çía
"shmoo"	58
4.6.1. Estimulación de células preadaptadas a alta osmolaridad con distintas concentraciones de feromona	. 59
4.6.2. La vía de integridad de pared celular (vía CWI) y el "polarisoma" son necesarios para activación de	
la vía HOG mediada por la vía PR	61
4.6.2.1. Disrupción del "polarisoma". Estimulación de células preadaptadas a alta osmolaridad con dosis	
saturante de α factor	61
4.6.2.2. Una "cascada de cascada de MAP quinadas": La vía PR activa a la vía HOG a través de la vía CWI	62
4.7. Correlación entre activación de las vías PR y HOG a nivel de células individuales.	62
4.7.1. A nivel de células individuales se observa mucha variabilidad en la activación de HOG	62
4.7.2. El estado estacionario de activación de la vía de HOG muestra mucha variabilidad	64
4.7.3. La activación de la vía HOG mediada por la vía PR ocurre en forma de picos transcripcionales en	
periodos de tiempo discretos.	66

4.7.3.1. La activación de HOG mediada por la vía PR es muy variable. El agrupamiento jerárquico de las	
respuestas de HOG de células individuales permite analizar comportamientos grupales similares	66
4.7.3.2. El primer pico de activación transcripcional de la vía HOG ocurre antes cuando las células	
están en G1	69
4.7.3.3. Los picos de activación transcripcional de la vía HOG correlacionan con la morfología "shmoo" en	
células individuales. No todos los "shmoos" producen activación de HOG	69
4.7.4. La activación de HOG mediada por feromona involucra una entrada al núcleo de Hog1-Venus cuando	las
células presentan morfología "shmoo"	72
5. "Hipótesis de desbalance osmótico"	73
5.1. Contraste de la hipótesis de desbalance osmótico: la vía HOG se activa debido a que hay un eflujo de	
glicerol inducido por la vía PR	74
5.2. Contraste del modelo. Análisis de la activación de las MAPK implicadas por ensayo de Western	77
5.3. Todas las mutantes estudiadas son capaces de activar al reportero transcripcional de HOG luego de un	
shock hiperosmótico agudo	79
6. Consecuencias fisiológicas que emergen del sistema. La activación de la vía de HOG mediada por feromon	าล
permite a las mismas una mayor capacidad de osmoadaptación.	80
7. El shock térmico también es capaz de activar la vía de HOG	83
7.1 Activación de la vía de HOG mediada por shock térmico. La activación de HOG es mayor cuanto mayor es	S
el gradiente osmótico.	83
7.2. Mecanismo de la activación de la vía de HOG mediada por shock térmico	84
8. La activación de la vía de HOG mediada por la vía PR y por shock térmico son aditivas. Rgc1 es componen	te
específico de la activación mediada por la vía PR.	86
Discusión	00
1. HOG inhibe la respuesta de la vía PR	89
2. Actividad basal y "adaptación perfecta" en la vía de HOG	91
3. La vía PR activa a la vía HOG	92
3.1. La activación no se debe a cross talk a nivel de la rama de señalización Sho1	92
3.2. Una "cascada" de cascadas de MAPK controla la tasa de recambio de glicerol	93
3.3. El estímulo que activa a HOG es la disrupción del feedback homeostático de esta vía	93
3.4. Solo es necesaria la rama de señalización SIn1 durante activación de HOG mediada por feromona	94

3.5. ¿Cuál es el estímulo que activa a Slt2/Mpk1? ¿Es la forma lo que activa a Slt2/Mpk1 o es el estiramien	to
de la membrana inducido por el crecimiento?	. 95
3.6. Rol de los reguladores Rgc1 y Ask10.	96
3.7. La función de la liberación de glicerol	. 98
4. Integración de señales en eucariotas.	100
Conclusiones	-104
1. Modulación de la vía PR	102
2. Modulación de la vía HOG	102
2.1. Actividad de HOG en estado estacionario.	102
2.2. Modulación de la vía HOG por la vía PR.	102
2.3. Modulación de la vía HOG por shock térmico.	103
3. Conclusión final	103
Materiales y métodos	-123
1. Cepas de Levaduras y plásmidos	106
1.1. Cepas	106
1.1.1. Cepa LD3342	106
1.1.2. Cepas "knock out".	107
1.2. Plásmidos	110
2. Métodos de microscopía	110
2.1. Condiciones de experimentales.	110
2.2. Adquisición de imágenes.	111
2.3. Procesamiento de imágenes con VCell-ID y análisis de imágenes con Rcell	111
2.4. Cálculo de fluorescencia total.	112
2.5. Gráficos de distribución de frecuencia.	112
2.6. Cuantificación de la localización nuclear de Hog1. Métodos de microscopía confocal	113
2.6.1. Procesamiento de las muestras.	113
2.6.2. Adquisición de imágenes confocales	113
2.6.3. Procesamiento de imágenes y cuantificación. Análisis de variables de VCell-ID para cuantificar fluorescencia nuclear y citoplasmática.	113

2.6.4. Cuantificación de fluorescencia nuclear en distintos planos focales de células individuales	114
2.7. Métodos para experimentos de agrupamiento jerárquico ("Hierarchical clustering") de células	
individuales	115
2.8. Experimentos de cinética de recuperación de volumen	116
2.8.1. Preparación de las muestras.	116
2.8.2. Adquisición de imágenes	116
2.8.3. Procesamiento de imágenes y análisis de datos	117
2.9. Cuantificación de "shmoos".	117
3. Medición de glicerol extracelular.	118
3.1. Experimento y preparación de muestras.	118
3.2. Cuantificación de glicerol	118
4. Métodos de manipulación de proteínas	119
4.1. Preparación de muestras proteicas	119
4.2. Electroforesis, transferencia y cuantificación.	120
5. Métodos de manipulación de DNA	121
5.1. Primers	121
5.2. PCRs	121
5.2.1. PCR común	121
5.2.2. "Colony PCR"	122
5.2.3. Purificación de DNA de geles de agarosa	123
5.2.4. Purificación de DNA plasmídico.	123
5.2.5. Cuantificación de DNA	123
5.2.6. Ensayos de Halo	123
6. Determinación de osmolaridad de los medios.	123
Referencias.	-134

Introducción

Introducción

1.1. ¿Porqué Saccharomyces cerevisiae?

La levadura *Saccharomyces cerevisiae*, también conocida como "levadura de gemación" -para distinguirla de otra especie de levadura muy estudiada, la "levadura de fisión" *Schizosaccharomyces pombe*es sin lugar a dudas la especie de los hongos de la cual se tiene más información y se suma a la lista de los "organismos modelo" más estudiados, que incluye a representantes todos los reinos de la vida, como las **plantas dicotiledóneas**: *Arabidopsis thaliana*, **monocotiledóneas**: *Zea Mays*, **bacterias**: *Escherichia coli,* **insectos**: *Drosophila melanogaster*, **gusanos**: *Caenorhabditis elegans*, **peces**: *Danio rerio*, **anfibios**: *Xenopus laevis*, **aves**: *Gallus gallus* y **mamíferos**: *Rattus norvegicus o Mus musculus* (Muller y Grossniklaus). Gracias al estudio de estos "organismos de referencia" hemos ampliado nuestros conocimientos en los campos de la genética y heredabilidad, desarrollo, fisiología, biología celular y biología molecular.

Existen muchas cualidades que hacen de *S. cerevisiae* un modelo ideal. En primer lugar es un organismo unicelular fácil de cultivar a gran escala y en medios de cultivo baratos. Segundo, tiene un ciclo de vida haplo-diploide que permite realizar fácilmente estudios genéticos (ver más adelante). Tercero, se pueden hacer manipulaciones genéticas transformando las levaduras de un modo sencillo de forma tal de expresar genes heterólogos, ya sea de forma episomal en plásmidos replicativos o bien integrando los genes exógenos en los cromosomas. Más aún, es relativamente fácil mutar, delecionar o insertar cualquier secuencia de interés gracias a la, extraordinariamente eficiente, maquinaria de recombinación homóloga de *S. cerevisiae* (Petranovic y Nielsen, 2008). A su vez, resulta práctico estudiar este organismo ya que luego de tantos años de estudio se cuenta con muchísima información del mismo y diversas herramientas de biología molecular para su manipulación. En 1996 el genoma de *S. cerevisiae* fue el primero en ser completamente secuenciado. Además de contar con la secuencia del genoma "on-line", es posible acceder a diversas colecciones como todas las cepas de deleciones únicas de todos los genes no esenciales, o bien la colección de cada gen fusionado a la proteína verde fluorescente (GFP). A su vez se dispone de una enorme cantidad de datos como resultado de estudios a gran escala de transcriptómica, proteómica, metabolómica, interactomas, análisis de flujo metabólico, localización subcelular e interacciones genéticas y estudios epistáticos (Figura 11).



Project/method	Goal
Transposon tagging	Gene expression; protein localization; disruption phenotypes
DNA microarrays	Gene expression
Systematic knockouts	Phenotypes
Protein localization using directed tagging	Subcellular protein localization
Biochemical protein characterization	Biochemical activities
Protein microarrays	Biochemical activities; protein modifications; interactions
Mass spectrometry	Protein profiling; Quantitative protein levels
Protein-protein Interactions two hybrid	Protein interaction maps; protein function prediction
Protein-protein interactions complex purification	Protein interaction maps; protein function predication
Genetic interactions	Global synthetic screens
Phosphorylation	Kinase substrate map; large-scale phosophylation mapping
Other post-translational modifications	Mapping of glycosylation; SUMO, acetylation, ubiquitination

Figura I1. Megaproyectos en S. cerevisiae Figura y tabla extraídas de Snyder et al. 2009 (Snyder y Gallagher, 2009).

Estos megaproyectos han permitido asignarle identidad a los genes y descubrir sus funciones. En el año 1996 luego de que se completara la secuenciación completa del genoma de la levadura solo se conocía la función del 30% de los genes secuenciados. Hoy, luego de 15 años conocemos la función de más del 90% de ellos (Snyder y Gallagher, 2009).

Además de su importancia como organismo modelo para estudiar mecanismos moleculares conservados con eucariotas superiores y en particular con humanos, *S. cerevisiae* se ha estudiado mucho por su importancia en la industria alimenticia para la producción de cerveza, vino, pan e incluso la levadura misma como probiótico y en biotecnología destacándose su rol en la producción de etanol y biodiesel. El mercado de las levaduras involucra unos 3000 millones de dólares anuales con un crecimiento del 8% anual y una proyección para 2015 de 5000 millones de dólares anuales (Bcc-Research, 2010).

1.2. Ciclo de vida de S. cerevisiae.

La levadura *S. cerevisiae,* perteneciente al filum de los *ascomycetes*, tiene un ciclo de vida haplodiploide (Figura I2). A lo largo de este ciclo puede proliferar dividiéndose por mitosis, ya sea en las etapas donde presenta un complemento genómico haploide o diploide (Herskowitz, 1988).

Segundo, puede atravesar etapas donde las células cambian su ploidía como durante el apareamiento entre dos levaduras de distinto sexo, o durante la esporulación de una célula diploide que sufre meiosis (ver figura a la derecha). Tercero, puede realizar reproducción sexual de tipo homotálico o heterotálico. Este aspecto tiene que ver con que las levaduras son capaces de sufrir un rearreglo a nivel genómico que resulta en un cambio de sexo de las células (ver más adelante). Esta capacidad permite que una célula haploide de un solo sexo sea capaz de transitar todos los pasos del ciclo ya que podría sufrir un cambio de sexo posterior apareamiento para formar una célula diploide y finalmente esporular (esto sería un ciclo homotálico). El gen responsable del rearreglo génico se llama *HO* (por "homotallism") y cabe resaltar que las cepas que se usan en el laboratorio han sido modificadas para ser cepas *ho*, es decir, son incapaces de efectuar estos rearreglos génicos del tipo de sexo ("mating type").



Figura 21. Ciclo de vida de *S. cerevisiae* (Herskowitz, 1988). Las células haploides *MAT*a y *MAT* α pueden dividirse por mitosis y también pueden aparearse para formar una zigota diploide *MAT*a/ α . La zigota se divide por mitosis formando células diploides o bien puede entrar en meiosis y esporular. En esta etapa se forma un asco que contiene 4 esporas haploides (dos *MAT*a y dos *MAT* α). Luego de que las esporas germinan inician un nuevo ciclo haploide.

1.3. Ciclo de mitótico de *S. cerevisiae*.

Leland Hartwell y Paul Nurse recibieron el premio Nobel en 2001 por sus estudios sobre el ciclo celular en S. cerevisiae y S. pombe. Hartwell describió más de 100 genes que arrestaban a las células en distintos puntos del ciclo celular a los cuales denomino "cdc" ("Cell Division Cycle"). Posteriormente se descubrió que algunos de estos genes modulan la actividad de la quinasa Cdc28, que es la quinasa dependiente del ciclo celular (CDK, "Cyclin dependent kinase") más importante de S. cerevisiae. Nurse más adelante describió la CDK homóloga de S. pombe y varias homologas de humanos. Hartwell llamó la atención sobre la importancia de estas mutantes cdc, en relación al cáncer, resaltando que estas mediaban puntos de control a lo largo del ciclo celular y que cuando estaban mutadas se podían producir por ejemplo aberraciones genéticas (Barnett y Robinow, 2002).



Figura I3. Diagrama del ciclo celular de *S. cerevisiae* extraído de Hartwell et al. 1974 (Hartwell, 1974). IDS, inicio de síntesis de DNA; BE, inicio de gemación ("bud emergence"); DS, Período completo de síntesis de DNA; NM, Migración nuclear; mND, división nuclear; IND, estadio final de migración nuclear; CK, citocinesis; CS, separación celular. Fases: G1, intervalo entre citocinesis previa e inicio de síntesis de DNA; S, período de síntesis de DNA; G2, tiempo entre síntesis de DNA e inicio de mitosis; M, período de mitosis.

1.4. Respuesta de apareamiento.

Cuando los nutrientes son abundantes las células de *S. cerevisiae* haploides se dividen cada aproximadamente 100 minutos y si los mismos se agotan pueden arrestarse en G1 y permanecer en esa etapa del ciclo hasta que los mismos estén disponibles nuevamente (Herskowitz, 1988). Otra señal extracelular que provoca el arresto en G1 es el sensado de feromona proveniente de una compañera de apareamiento (figura l4) (Hartwell, 2002). Las células del tipo sexual *MAT* α secretan el "factor α ", un péptido de 13 Aa (WHWLQLKPGQPMY) mientras que las células *MAT* α secretan la feromona "factor a", que es un péptido de 12 Aa (YIIKGVFWDPAC), unido covalentemente a un grupo farnesilo. Tanto la feromona "factor a" como "factor α " solo pueden ser sensadas por las células del sexo opuesto.

Para lograr un apareamiento exitoso, la levadura de un sexo debe ser capaz de detectar la posición de su futura compañera de apareamiento. Para lograrlo, esta debe detectar eficientemente la dirección del gradiente de feromona secretada por la misma. Luego, al ser un organismo sésil, esta célula se aproximará hacia su compañera creciendo en dirección a la misma.

Una vez que se encuentran suficientemente cerca las células de ambos sexos *MAT*a y *MAT* α , ambas células degradan su pared celular y se fusionan para formar una zigota 2n (Figura I4) que dará inicio al ciclo diploide (Figura I2). En caso de haber escasez de nutrientes las células diploides iniciarán el programa morfogenético de esporulación en el cual ocurre una meiosis y se forma un asco que contendrá cuatro ascosporas haploides, dos del tipo sexual *MAT*a y dos *MAT* α .



Figura 14. Apareamiento en *S. cerevisiae.* a) Dibujo esquemático de un apareamiento. La células *MAT*a y *MAT* α secretan las feromonas a factor y α factor respectivamente. Las feromonas son sensadas por cada célula y las mismas emiten proyecciones hacia su compañera de apareamiento. Luego las células se fusionan formando una zigota 2n. b) Película de un apareamiento. La célula *MAT* α en celeste y la *MAT* α en verde, además puede verse la membrana plasmática teñida con el colorante FM4-64 en rojo. Puede verse la formación de la zigota y como la misma gema para formar una célula hija 2n (película propia).

2. Sensado de señales extracelulares. Vías de MAP quinasas.

Las levaduras crecen típicamente en la superficie de las flores y los frutos de las plantas. Debido a esto, las mismas son muy susceptibles a cambios del medio ambiente. Los mismos pueden ocurrir de un modo drástico y ser de diversa índole como temperatura, pH, osmolaridad, disponibilidad de nutrientes y diversas otras señales físico-químicas. Como consecuencia de esto las células han desarrollado sistemas de transducción de señales para poder sensar y responder a la información extracelular que las rodea. Esta capacidad ha sido seleccionada a través de un proceso evolutivo que ha modulado la sensibilidad y precisión de los sistemas celulares de sensado. A su vez, estos sistemas de sensado son dinámicos y modulables. Los distintos escenarios extracelulares provocarán cambios en la maquinaria molecular de las células como en la abundancia y/o actividad de proteínas y otras macromoléculas y habitualmente desencadenan cambios en la expresión génica. Los sistemas de transducción de señales han sido tradicionalmente estudiados y sus fronteras delimitadas estimulando a las células con un estímulo por vez, bajo condiciones experimentales nutricionalmente favorables y fuera de cualquier estrés que pudiera perturbar la interpretación de las respuestas estudiadas. Sin embargo, los hábitats naturales a menudo presentan múltiples señales que activarán muchos sistemas de sensado y respuesta simultáneamente. En ciertas situaciones las respuestas gatilladas por estos sistemas podrían ser contradictorias, como en el caso de células simultáneamente expuestas a factores de crecimiento y de arresto. En general no queda claro como las células integran toda la información para finalmente responder adaptativamente.

Existen muchas vías de señalización para el sensado de las señales extracelulares. Muchas de ellas se encuentran altamente conservadas entre levaduras y otros organismos eucariotas. Podemos nombrar por

ejemplo, la vía TOR (del inglés, "Target of Rapamycin") que es modulada por estrés nutricional y otros estímulos como cafeína, la vía PKA, regulada por glucosa y otras señales nutricionales (Rubio-Texeira et al., 2009) y también las vías de MAPKs (del ingles, "Mitogen Activated Protein Kinases") que serán el tema de investigación de esta tesis.

S. cerevisiae en su estado haploide presenta al menos cuatro vías de señalización mediadas por MAP quinasas. **Primero**, "vía de respuesta a shocks hiperosmóticos" (en ingles, "HOG pathway", por "High Osmolarity Glycerol pathway" - de aquí en adelante referida como "**Vía HOG**"), cuya MAPK es Hog1. **Segundo**, la "vía de integridad de la pared celular" (en ingles "CWI pathway", por "Cell Wall Integrity pathway", resumida como "**Vía CWI**"), cuya MAPK es Slt2/Mpk1. **Tercero**, la "Vía de Respuesta a Feromona" (en ingles "PR pathway" por "Pheromone Response pathway", de aquí en más "**Vía PR**"), que tiene dos MAP quinasas Fus3 y Kss1. **Finalmente** la "Vía de Filamentación" ("FG pathway" por "Filamentous Growth Pathway") controlada por Kss1. Las vías de señalización de MAP quinasas bajo estudio son relevantes para las *S. cerevisiae*, ya que afectan importantes decisiones de diferenciación celular (como apareamiento, en el caso de la vía PR y filamentación a través de la vía FG), de respuestas a estrés ambiental (vías HOG y CWI) y virulencia en el caso de otras levaduras patógenas del género *Candida*. Las MAPKs de estas vías de señalización de *S. cerevisiae* bajo estudio tienen sus homólogas en humanos, Kss1 y Fus3 son homólogas a *ERK1* y *ERK2*, Hog1 es homóloga a las MAPK *p38α, p38β, p38γ y p38δ* y Slt2/Mpk1p es homóloga a ERK5 (Chen y Thorner, 2007; Hohmann, 2002). El mal funcionamiento de estas vías (por ejemplo *ERK, p38 o p42/44*) en mamíferos puede conducir a patologías tales como cáncer y problemas en el desarrollo (Bradham y McClay, 2006).

Estas vías de MAP quinasas se caracterizan por un sistema modular donde existe una cascada de activaciones de tres quinasas: una MAPKKK que activa a una MAPKK que a su vez activa a una MAPK, que es la efectora final de estas rutas de señalización y es capaz de fosforilar cientos de blancos que incluyen factores de transcripción que cambiarán la expresión de cientos de genes. Los módulos de MAPKs a su vez están acoplados a otros sistemas de señalización que incluyen receptores de membrana acoplados a proteínas G, proteínas de andamiaje (del ingles, "scaffolding"), o sistemas de "phosphorelay", etc.

Luego de activarse la MAPKKK fosforila a su MAPKK blanco en dos residuos de serina o treonina de su "loop" de activación. En segundo lugar la MAPKK activada, que es una quinasa de especificidad dual (fosforila tanto Ser/Thr como Tyr), fosforila a su MAPK blanco en dos residuos del motivo Thr-X-Tyr en su dominio de activación causando un cambio conformacional que la activa.

Las MAP quinasas interaccionan con sus sustratos y enzimas modificadoras reconociendo una región llamada zona de "docking". Esta presenta uno o dos aminoácidos básicos que interactúan con aminoácidos ácidos de la MAPK y luego hay aminoácidos hidrofóbicos que se insertan dentro de bolsillos hidrofóbicos de la MAPK. El patrón de "docking" general de los sustratos de MAPKs es $(Arg/Lys)_{1-2}-(X)_{2-6}-\emptyset_A-X-\emptyset_B$, donde \emptyset_A y \emptyset_B son residuos hidrofóbicos como Leu, Ile y Val. En levaduras puede haber una tercera zona de interacción hidrofóbica \emptyset_C $(Arg/Lys)_{1-2}-(X)_{2-6}-\emptyset_A-X-\emptyset_B-X-\emptyset_C$. En levaduras se ha estudiado un motivo que es específico de Fus3; este es $(Arg/Lys)_{1-2}-(X)_{2-6}-P-(X)_2-\emptyset_B-X-\emptyset_C$ (Remenyi et al., 2005; Rodriguez Limardo et al., 2011). Además se sabe que las MAPKs fosforilan en una Thr o Ser que precede a una Pro. Fus3, Kss1 y Hog1 fosforilan los motivos PT-X-[ST]P y Slt2/Mpk1 R-(X)-2-[ST]P, habiéndose visto que *Fus3* es la más rigurosa en cuanto a este requisito de secuencia de los sitios blanco posibles (Lam et al., 2010; Mok et al., 2010).

2.1. Vía de Respuesta a Feromona (Vía PR).

Como ya se dijo las células del tipo *MAT*a pueden sensar la feromona "factor α " y desencadenar los pasos de arresto del ciclo celular, inducción de la transcripción de múltiples genes y cambios morfológicos. A nivel molecular, la maquinaria involucrada es prototípica de los sistemas eucarióticos. Sus componentes incluyen un receptor de siete pasos transmembrana (Ste2 en el caso del tipo sexual *MAT*a y Ste3 en el caso de las tipo *MAT* α , capaz de sensar la feromona "a factor"), acoplado a una proteína G heterotrimérica (cuyas subunidades α , β y γ son, Gpa1, Ste18 y Ste4 respectivamente) y una cascada de MAPKs acoplada a una proteína de andamiaje llamada Ste5 (figura I5). Las MAPKs finales de la cascada se llaman Fus3 y Kss1 (Dohlman y Thorner, 2001).



Figura I5. Vía PR.

La transducción de señales se desarrolla del siguiente modo. El factor α se une a Ste2 e induce la disociación de la proteína G, subunidad α (Gpa1) de la $\beta\gamma$ (Ste18, Ste4). Luego $\beta\gamma$ recluta a la membrana a la proteína de andamiaje Ste5 que se une a Ste4. Ste5 es capaz de unirse a la MAPKKK Ste11, a la MAPKK Ste7 y también a la MAPK Fus3. Una vez que Ste5 recluta a Ste11 a la membrana, se posibilita el acercamiento de Ste20 a Ste11, ya que Ste20 también se une a Ste4. Luego, la quinasa Ste20 fosforila y activa a Ste11. Posteriormente, Ste11 activado fosforila a Ste7 que finalmente fosforila a Fus3 y a Kss1. Fus3 y Kss1 activadas regulan sus blancos citoplasmáticos y nucleares. En el núcleo son las responsables de liberar al factor de trascripción Ste12 de la inhibición mediada por Dig1 y Dig2 llevando a la inducción de alrededor de 200 genes (Bardwell, 2005; Roberts et al., 2000). Entre los genes inducidos se incluyen reguladores positivos de la vía de señalización (*STE2, FUS3, FAR1*), reguladores negativos de la vía (*SST2, MSG5*) y genes que codifican para proteínas necesarias durante el paso de fusión celular (*PRM1, FUS1, FUS2, FIG1, AGA1*). En el citoplasma Fus3 y Kss1 son capaces de modular la actividad de Far1 posibilitando la inhibición de Cdc28 y el arresto en G1. No se conoce con exactitud como Far1 inhibe a Cdc28. Además de esto Fus3 fosforila mucho más eficientemente a Far1 que Kss1, por esta razón las células $\Delta fus3$ no se arrestán tan eficientemente comparadas con las salvajes o las $\Delta kss1$ (*Bardwell, 2005*).

Otro punto de regulación de la vía de feromona son las fosfatasas de las MAP quinasas. Si bien las fosfatasas de Kss1 no se conocen con exactitud se sabe que Fus3 es defosforilado por la fosfatasa dual Msg5 y las fosfatasas de fosfotirosina Ptp2 y Ptp3 (Bardwell, 2005; Zhan y Guan, 1999).

2.2. Vía de señalización de Integridad de la Pared Celular (Vía CWI, "Cell Wall Integrity").

Como ya se ha mencionado las células de *S. cerevisiae* crecen directamente expuestas al medio ambiente. Por esta razón, además de solucionar el problema de poder sensar los cambios del mismo, las células deben primero ser lo suficientemente robustas como para sobrevivir a violentas agresiones físicoquímicas (cambios de pH, osmolaridad, shock térmico, radiación, etc.). Como una primera barrera de resistencia las levaduras poseen una pared celular por fuera de la membrana plasmática. Esta pared extracelular está formada por polímeros de glucanos y quitina y por mano-proteínas altamente glicosiladas (Figura I6) (Levin, 2005, 2011).



Figura 16. Estructura de pared celular de *S. cerevisiae* (Levin, 2011). CWP: Proteínas de la pared celular ("Cell Wall Proteins"). CWP-GPI, son proteínas a las que se adosan anclas de glucosil fosfatidil inositol (GPI) en su extremo carboxilo terminal para que el sistema secretorio las exporte al exterior de la membrana plasmática. Luego las mismas se unen covalentemente a los polimeros de β -1,6-glucanos. CWP-Pir, son otra familia de proteínas compuesta principalmente por Pir1 a Pir5.

Por otra parte, las levaduras acumulan osmolitos, principalmente glicerol y en menor medida trehalosa, para mantener una osmolaridad intracelular ligeramente mayor a la externa, y de este modo hay una tendencia a la entrada de agua y consecuentemente una presión de turgencia distribuida sobre toda la superficie de la pared celular. Dado que la presión se ejerce homogeneamente, para crecer polarizadamente las células direccionan, a través del citoesqueleto de actina, enzimas hidrolíticas (como glucanasas y quitinasas) que debilitan la pared celular localmente. El debilitamiento, sumado a la presión de turgencia permite el crecimiento en una dirección determinada.

Un estímulo que se puede presentar de modo violento es el de cambios en el potencial osmótico. Por ejemplo las células pueden recibir un shock hipo-osmótico luego de una lluvia, o bien un shock hiperosmótico si los osmolitos de la solución donde están inmersas se concentran por la evaporación del agua o si la cáscara de la uva donde están creciendo se rompe (figura 17). Un shock hipo-osmótico drástico provocará un ingreso de agua masivo y un aumento de volumen de la célula (figura I7). Sin embargo, las mismas no estallan ya que están provistas de una pared rígida que resiste la presión de turgencia y además, si bien es elástica, limita el hinchamiento hasta un cierto nivel tolerable. El shock hipo-osmótico produce un estiramiento de la membrana plasmática de la célula y este es sensado por mecanoreceptores de la membrana que inducen una rápida activación (15 segundos) de la MAPK de la vía de integridad de la pared (CWI) Slt2/Mpk1 (Kamada et al., 1995). La respuesta homeostática para poder volver al volumen original se lleva a cabo abriendo los canales, Fps1. De este modo la salida de glicerol por los mismos disminuye la concentración de osmolitos intracelulares y permite la salida de agua.



Figura 17. Respuestas fisiológicas a shocks hipo- e hiper- osmóticos (ver texto para más detalles). La vía CWI se activa durante shocks hipo-osmóticos mientras que la vía HOG lo hace luego de shocks hiperosmóticos.

La vía CWI también puede ser activada por agentes que dañan la pared celular como zimoliasa, quitinasas, rojo congo y CW ("calcofluor white", que se une a quitina). A su vez, es activada por alta temperatura y agentes que aumentan la fluidez de la membrana plasmática (Kamada et al., 1995) y también se ha descripto que puede ser activada por cambios morfogenéticos inducidos por feromona (Buehrer y Errede, 1997). Finalmente la actividad de la vía CWI está regulada a lo largo del ciclo celular, por cambios en el patrón de deposición de pared celular a lo largo del mismo. Las hijas jóvenes crecen isotrópicamente, depositando pared en la matriz preexistente. Luego en el momento de gemación el patrón de deposición de pared cambia de uno isotrópico a uno polarizado (apical) en el sitio de la gema. Estudios donde monitoreaban la actividad de Slt2/Mpk1 mostraron un pico de actividad cuando las células están en empezando a gemar, esto es, en el momento de máxima polarización celular (Zarzov et al., 1996).

No todos estos estímulos activan la vía CWI de la misma manera. Los sensores varían en cada caso pero en general las señales convergen en la proteína G pequeña, Rho1. Río abajo de Rho1 se transduce la señal hacia Pkc1 y luego una cascada de MAP guinasas compuesta por la MAPKKK Bck1, luego las MAPKK Mkk1 y Mkk2 y finalmente la MAPK, Slt2/Mpk1 que es capaz de fosforilar al factor de transcripción Rlm1 o de unirse al complejo SBF, formado por Swi4 y Swi6. La transducción de señales suele ser bastante variable y por ejemplo la activación mediada por feromona sería independiente de Bck1 (MAPKKK) (Buehrer y Errede, 1997). Tampoco se ha establecido completamente el rol de la proteína de andamiaje Spa2 en la activación de Slt2/Mpk1 por feromona. Por ejemplo en Sheu y colaboradores (Sheu et al., 1998) demuestran que durante la activación por feromona Spa2 interactúa con Mkk1, Mkk2, Ste7, Ste11 pero no con Slt2/Mpk1. En tanto que más adelante un trabajo llevado a cabo por Van Droguen y col. estableció que Spa2 interactuaría con Slt2/Mpk1 y la posicionaría en los sitios de crecimiento polarizado (van Drogen et al., 2001).

Vía de integridad de pared celular (CWI)



Figura I8. Vía CWI.

Finalmente las fosfatasas que regulan a Slt2/Mpk1 son las fosfatasas de tirosina Ptp2 y Ptp3 y las fosfatasas duales Msg5 y Sdp1, siendo la segunda específica de Slt2/Mpk1.(Collister et al., 2002; Hahn y Thiele, 2002). Ptp2, Ptp3 y Msg5 son capaces de regular la actividad basal de esta vía mientras que Sdp1 solo regularía la actividad máxima alcanzada por la misma (Martin et al., 2005).

2.3. Vía de señalización a Alta Osmolaridad-Glicerol (Vía HOG, "High Osmolarity Glycerol").

Un incremento en la osmolaridad en el exterior genera un shock hiperosmótico. Cuando esto ocurre las células se deshidratan rápidamente (Figura 17 e 19a). La pérdida de agua hace que aumente la concentración intracelular de todas las sustancias osmóticamente activas, principalmente el glicerol. Además de esto el encogimiento de las células genera de un modo mecánico el cierre de los canales de glicerol Fps1 (Luyten et al., 1994; Luyten et al., 1995) (Figura 17 e 19a y b). Para recuperar el volumen original las células deberán aumentar sus niveles de glicerol intracelular. Esto se logra activando las enzimas metabólicas encargadas de la síntesis de dihidroxiacetona-P (DHAP), como Pfk2 (Dihazi et al., 2004), induciendo genes implicados en convertir DHAP a glicerol, como *GPD1* (que convierte DHAP en glicerol-3-fosfato) y *GPP2* (que convierte glicerol-3-fosfato a glicerol) (Rep et al., 1999b), e inhibiendo las enzimas que direccionan el flujo metabólico del mismo hacia la glucólisis como por ejemplo Tdh1, Tdh2 y Tdh3 (gliceraldehido-3-P a 1,3-bifosfoglicerato) (Dihazi et al., 2004; Hohmann, 2002; Westfall et al., 2008). A su vez también se induce el gen *STL1* que codifica para un transportador simporter de glicerol/H⁺ (Ferreira y Lucas, 2007; Ferreira et al., 2005; Rep et al., 2000).Cabe señalar que la proteína Stl1 se degrada rápidamente en presencia de glucosa (Ferreira et al., 2005).

Vía de respuesta a shocks hiperosmóticos (HOG)



Figura I9. Respuesta a shocks hiperosmóticos. a) Luego de un shock osmótico las células se deshidratan y se encogen. b) Puntos de regulación de la MAPK Hog1. I!, E!, S! y D!, representan la importación, exportación, síntesis y degradación de glicerol respectivamente c) Vía se transducción de señales HOG. a, b y c) Ver texto para más detalles.

El achicamiento de las células es sensado por mecanoreceptores que activan la vía de HOG. Hay dos ramas de señalización en esta vía que convergen en una MAPKK llamada Pbs2 que luego activará a la MAPK Hog1. La primera rama de señalización llamada Sho1, está conectada río arriba con glicoproteínas sensoras llamadas Hrk1 y Msb2. Esta rama se activa cuando las mucinas Hrk1 y Msb2 transducen la señal hacia Sho1, por un mecanismo aún no identificado. Río abajo en la vía de señalización, el ancla de membrana Opy2 recluta a Cdc42 acomplejado con Ste20. Por otra parte Opy2 es capaz de reclutar a Ste50 que es capaz de unirse por otro dominio a la MAPKK Ste11. Luego, Ste11 se activa por la fosforilación de Ste20. Sho1 junto con Opy2-Ste50 reclutan a la MAPKK Pbs2 permitiendo que Ste11 la fosforile. Pbs2 es además una proteína de andamiaje que se une a Ste11, Ssk2/22 y a Hog1. Una vez fosforilada Pbs2 es capaz de fosforilar a Hog1 en Thr y Tyr en su "loop" de activación para permitir su actividad (de Nadal y Posas, 2010).

La segunda, llamada rama Sln1, está compuesta por un sistema de tipo "phosphorelay" -híbrido, similar a los sistemas de dos componentes bacterianos, Sln1-Ypd1-Ssk1 (Wang et al., 2003). En este sistema hay una histidina quinasa de membrana, Sln1 que se encuentra activa normalmente bajo las condiciones de crecimiento normal. La misma se autofosforila en histidina, luego transfiere este fosfato a un aminoácido de ácido aspártico de ella misma y posteriormente transfiere este fosfato al dominio de fosfotransferencia de histidina de la proteína Ypd1. Finalmente Ypd1 cede el mismo a Ssk1. Ssk1 fosforilada inhibe a las MAPKKK Ssk2 y Ssk22 en tanto que Ssk1 no fosforilada se compleja y activa a Ssk2 y Ssk22. Cuando hay un shock hiperosmótico Sln1 se inhibe y de esta manera Ssk2 y Ssk22 se liberan de la represión por Ssk1 activando a Pbs2 y posteriormente a través de esta a Hog1 (Kruppa y Calderone, 2006; Kruppa et al., 2003; Kruppa et al., 2004a; Kruppa et al., 2004b; Thomason y Kay, 2000).

Una vez activada Hog1 es capaz de fosforilar a factores de transcripción como Hot1 o Sko1 y también se transloca al núcleo (Mettetal et al., 2008; Muzzey et al., 2009). En el núcleo Hog1 es necesaria para

complejarse con Hot1 y dirigir la transcripción de genes de respuesta a shocks hiperosmóticos como *STL1*, *GPD1 y GPP2* (Alepuz et al., 2003; Alepuz et al., 2001; Hohmann, 2002; Rep et al., 1999a). Es importante resaltar que esta transcripción no es necesariamente fundamental para las células para poder recuperarse de un shock hiperosmótico agudo como demostraron Mettetal y col. al tratar a las levaduras con cicloheximida (inhibidor de traducción) y ver que las mismas eran capaz de recuperar su volumen y sobrevivir (Mettetal et al., 2008; Muzzey et al., 2009). Inmediatamente después de que la respuesta de HOG ha terminado, se ha publicado que el volumen celular y la localización subcelular de Hog1 vuelven exactamente a los niveles anteriores al shock osmótico, llamando a este fenómeno *"adaptación perfecta"* (ver más adelante definición).

Las fosfatasas que regulan la vía a Hog1 son las fosfatasas de treonina y serina: Ptc1, Ptc2 y Ptc3 y las fosfatasas de tirosina: Ptp2 y Ptp3. Ptc1, Ptp2 y Ptp3 son capaces de regular la fosforilación basal de Hog1 en tanto que el resto solo puede regular la fosforilación máxima de esta MAPK (Martin et al., 2005).

3. Respuestas adaptativas.

La vía de respuesta a shocks hiperosmóticos (HOG) es una respuesta adaptativa. Es decir frente a un cambio en las condiciones externas que genera un dado estímulo, las células son capaces de adaptarse y regresar a un estado interno similar al inicial. Operativamente una respuesta adaptativa puede definirse como se detalla a continuación (Ma et al., 2009). Cuando las células reciben un estímulo (*E*) se activa una vía de señalización y se desencadena una respuesta (*R*). Cuando las células están adaptadas a un estimulo inicial (*E inicial*), presentan una cierta respuesta basal de activación (*R inicial*), luego al aumentar la intensidad del estímulo (*E final*) las mismas responderán y alcanzarán un valor de respuesta máximo (*R máx.*). Una vez activada la vía homeostática de respuesta a este estímulo, las células inducen una serie de mecanismos compensatorios que permiten que la vía de respuesta se apague y regrese a un nivel de respuesta final en estado estacionario (*R final*) idéntico a *R inicial*, en cuyo caso se habla de que la respuesta adaptativa desempeñada es "perfecta", o bien *R final* es mayor a *R inicial* y se habla de adaptación imperfecta.

El grado de activación alcanzado respecto a un dado cambio de la condiciones externas se puede denominar "sensibilidad". En tanto que se denomina "precisión" a la capacidad del sistema de retornar a un nivel de respuesta idéntico al inicial. Un sistema con "adaptación perfecta" presenta "precisión" infinita. Contrariamente un sistema con precisión cero no se adapta a la respuesta y responde de modo continuo frente a



respuesta y responde de modo continuo frente a Figura I10. Respuesta adaptativa en términos operativos (Ma un estímulo constante. et al., 2009). Ver texto.

En este punto, es pertinente señalar que las conclusiones obtenidas respecto de la adaptación de un dado sistema podrían modificarse dependiendo de la variable de respuesta que se utilice al estudiar el mismo.

Esta respuesta podría en principio medirse a distintos niveles y no todos ellos tienen porque responder de la misma manera. Así por ejemplo en la vía de HOG uno podría medir respuestas a nivel de la vía de transducción de señales como el reclutamiento de Ste50 a la membrana, la fosforilación de la MAPKK, Pbs2 o de la MAPK Hog1 o de su factor de transcripción Hot1, etc. O bien, consecuencias fisiológicas como el cambio de volumen celular.

Finalmente, se debe tener en cuenta que la respuesta analizada se da a nivel de un dado módulo de respuesta, por ejemplo la vía HOG. Sin embargo es importante tener en mente que este módulo de respuesta puede interactuar con otros módulos dependiendo de las condiciones del ambiente. Entonces, la simultaneidad de múltiples estímulos puede modificar la topología de las interacciones entre módulos del sistema y finalmente afectar la respuesta final de la vía estudiada.

4. Propiedades dinámicas de las respuestas de HOG y PR.

Los tipos de respuestas fisiológicas controladas por la vía de HOG y de PR son muy diferentes y conllevan a una respuesta dinámica completamente distinta. Mientras que el agregado de feromona lleva a una respuesta sostenida durante muchas horas y sin que ocurra des-sensibilización (siempre y cuando la concentración de feromona no cambie) (Colman-Lerner et al., 2005), un shock hiperosmótico provoca una activación transitoria rápida, seguido de una fase de desactivación lenta a medida que las células recuperan la presión de turgencia (que hace desaparecer la señal) (Hohmann, 2002; Muzzey et al., 2009). En términos de la nomenclatura presentada más arriba se podría pensar que la vía de PR tiene *precisión* igual a cero, en tanto que la vía de HOG tendría *precisión* infinita.

Ambos sistemas muestran un estado basal de señalización, reflejado en un leve estado de fosforilación de sus MAPKs terminales (Macia et al., 2009; Yu et al., 2008), y un nivel de transcripción basal dependiente de cada sistema. Este nivel basal de señalización es causado por la disociación espontánea de la proteína G en el caso de la vía PR (Hughes et al., 2000) y en el caso de la vía HOG quizás por fluctuaciones en la turgencia celular causadas por una pérdida de glicerol que podrían ser sensadas por mecanorecetores (Luyten et al., 1995).

También hay diferencias en la forma como estas vías transmiten la información extracelular. En la vía PR, una mayor cantidad de α factor en el exterior provocará una mayor activación en todos los niveles de la cascada de señalización de este sistema (hay una codificación de la información donde solo importa la *amplitud* del estímulo). Esto se evidencia al observar que hay un muy buen correlato entre la proporción de receptor ligado a feromona y las curvas de "dosis-respuesta" monitoreadas en varios niveles a lo largo de la vía de señalización: disociación de la proteína G, fosforilación de la MAPK Fus3 o Kss1 e inducción del reportero de expresión génica (*Yu et al., 2008*). Por ejemplo cuando la concentración de feromona es tal que hay un 10% de receptor ocupado se observa un 10% del máximo de la respuesta transcripcional. A esta propiedad se la llama DoRA ("*Dose Response Alignement*" - en español, "*Alineamiento Dosis - Respuesta*") (Yu et al., 2008).

En la vía HOG la respuesta en la fosforilación y la translocación al núcleo de Hog1 van a depender de la intensidad del shock osmótico y, la codificación de la información de la respuesta, en este caso, depende de la

amplitud y de la *duración* del mismo. Por ejemplo, cuanto mayor es el shock hiperosmótico mayor es la fosforilación de Hog1 y mayor es la translocación al núcleo, pero alcanzado un nivel umbral de shock se llega a un máximo de fosforilación (Macia et al., 2009) y entrada al núcleo (Muzzey y van Oudenaarden, 2006; Pelet et al., 2011). Luego, una vez que el sistema no puede aumentar más su amplitud de respuesta, lo que aumenta es la duración de la respuesta máxima, es decir, el estado fosforilación máxima y el tiempo de permanencia en el núcleo duran más tiempo. Se observa una relación lineal entre el shock hiperosmótico y la integral de enriquecimiento de Hog1 nuclear (Muzzey y van Oudenaarden, 2006). Así, cuanto mayor sea el shock, mayor será la activación de Hog1 y más tiempo durará la activación. La codificación en amplitud estaría controlada por la rama Sln1 mientras que la temporal estaría mediada por la rama Sho1 (Macia et al., 2009).

5. Interacciones entre las vías HOG y CWI.

En general las vías HOG y CWI se activan por estímulos antagónicos. Como ya se mencionó HOG se activa por shocks hiperosmóticos (de Nadal et al., 2011; Hohmann, 2002) y CWI por shocks hipo-osmóticos (Davenport et al., 1995). Además HOG se activa por frío y agentes rigidificantes que disminuyen la fluidez de la membrana plasmática como DMSO (Panadero et al., 2006), en tanto que CWI se activa por shock térmico y agentes que aumentan la fluidez de la membrana y estiramiento de la membrana (Davenport et al., 1995). Sin embargo se ha reportado que el tratamiento con zimoliasa es capaz de activar a la vía CWI utilizando componentes de la vía de señalización de HOG a través de las mucinas Msb2 y Hrk2 y la rama de señalización Sho1 de la vía HOG (Bermejo et al., 2008; Rodriguez-Pena et al., 2010).

6. Interacciones entre las vías PR y HOG.

La rama Sho1 de la vía de HOG comparte varios componentes con la vía PR como la MAPKKKK Ste11, su co-factor Ste50 y su activador río arriba, la quinasa tipo PAK Ste20, propiciando varios posibles puntos de contacto entre ambas vías. Sin embargo, trabajos previos han demostrado que cada estímulo aplicado de modo independiente solo activa a su vía de señalización específica (McClean et al., 2007; O'Rourke y Herskowitz, 1998, 2002). Hay mecanismos de control que evitan que haya un direccionamiento equivocado de la información. Por ejemplo, si se "knockea" el gen de la MAPK Hog1 o bien su MAPKK, Pbs2 y luego se estimula con alta osmolaridad estas cepas se observa una activación de la vía PR a nivel de fosforilación de sus MAPK, transcripción de los genes de esta vía y morfología de respuesta a feromona. Esta activación no se observa en la doble "knock out" Δhog1 Δste11 o Δpbs2 Δste11 (O'Rourke y Herskowitz, 1998, 2002). Luego también se demostró esto usando una variante mutante de Hog1 que es inhibible por análogos de ATP (NM-PP1 o SPP86), Hog1-AS2 (Hog1-T100A), en estos trabajos muestran que Hog1 inhibe su propia fosforilación y la de las MAPK Fus3 y Kss1 a nivel de Ste11 (Westfall y Thorner, 2006). El modo como se regula la especificidad de la señal en el caso de la estimulación con feromona se ha estudiado menos y no está totalmente claro. Se han propuesto explicaciones que se basan en el secuestro ("insulation") de Ste11 por parte de la proteína de andamiaje Ste5 de la vía PR, que evitaría que Ste11 este disponible para transducir la señal hacia la vía HOG (Patterson et al., 2010).

Hay controversia en cuanto a como se comportan las vías de HOG y PR cuando se presentan ambos estímulos simultáneamente. Un trabajo llevado a cabo por McClean y colaboradores, afirma que ambas vías se inhiben mutuamente a través de sus MAPKs y que las células individuales responden, ya sea a la vía PR, o bien, a la vía HOG (McClean et al., 2007). Otro trabajo posterior de Patterson y col. ha sugerido que los resultados del primer trabajo serían un artefacto y que las células individuales son capaces de responder a ambas vías simultáneamente y además no interactúan de un modo inhibitorio entre sí y que sus respuestas son iguales que las obtenidas usando estímulos individuales aislados de cada vía (Patterson et al., 2010). Por último, un reciente trabajo de Nagiec y col. afirma que la vía HOG inhibe a la PR a nivel de la proteína Ste50 y de la inducción de Fus3 (Nagiec y Dohlman, 2012) y no concluyen nada sobre los efectos de la vía PR sobre la vía HOG. A lo largo de esta tesis se estudian interacciones entre las vías PR y HOG.

7. La importancia del estudio de células individuales.

Clásicamente se ha estudiado a sistemas biológicos analizando medias poblacionales bajo la susición de que el comportamiento de la población es en general casi idéntico. Sin embargo, luego de estudiar por décadas el comportamiento de células individuales resulta claro que la heterogeneidad de las respuestas de las células parece ser más la regla que la excepción (Altschuler y Wu, 2010). Teniendo en cuenta esto, la pregunta biológicamente relevante ha dejado de ser, si existen células o subpoblaciones cuyos comportamientos son diferentes de los del resto de la población, sino, más bien, cuales son las propiedades biológicas que presentan estas subpoblaciones diferentes (Altschuler y Wu, 2010).

Las células individuales presentan cierta heterogeneidad en la expresión de sus componentes. Esta heterogeneidad puede surgir debido a fuentes estocásticas que afectan la síntesis de los mismos, llamándose a esta variabilidad "ruido intrínseco" (Elowitz et al., 2002; Ozbudak et al., 2002; Raser y O'Shea, 2004), o bien, otra que surge por diferencias en la abundancia de componentes que afectan a todos los genes en general, desde su transcripción, hasta la generación de sus proteínas (por ejemplo, número de ribosomas), llamada "variabilidad de la capacidad de expresión" o "ruido extrínseco" (Colman-Lerner et al., 2005; Elowitz et al., 2002; Raser y O'Shea, 2004). En tercer lugar puede haber otro grado de variabilidad que afecta específicamente a la expresión de ciertos genes, a nivel de la regulación de la cromatina o de los factores de transcripción que regulan su expresión, por ejemplo (Pelet et al., 2011). Esta tercer fuente de variabilidad es específica de un dado proceso y definiría a una dada subpoblación (la separaría del resto de la población).

Las células cancerosas presentan una alta heterogeneidad poblacional. Si bien la misma surge de fuentes genéticas como aneuploidías y aberraciones cromáticas (deleciones, translocaciones, inserciones), también se ha observado una alta variabilidad en poblaciones clonales genéticamente idénticas (Cohen et al., 2008; Gascoigne y Taylor, 2008). Esta heterogeneidad presenta desafíos a la hora de desarrollar tratamientos contra el cáncer basados en las medias poblacionales. En este ejemplo vemos de que modo la identificación de las fuentes de variación específicas de una población permitiría desarrollar blancos farmacológicos que ataquen a subpoblaciones dentro de la misma.

8. Biología cuantitativa y modelado de sistemas biológicos.

La caracterización de un dado sistema biológico debería llevarse a cabo idealmente de un modo cuantitativo para poder definir el comportamiento del mismo de algún modo específico. En segundo lugar, su estudio debería hacerse de un modo **dinámico** estudiando la respuesta del sistema a lo largo del tiempo. Esto permite estudiar nuevas propiedades del mismo como la velocidad a la cual el sistema responde, o bien, si el sistema presenta algún "feedback", etc. En tercer lugar, teniendo en cuenta la heterogeneidad poblacional comentada, es necesario estudiar las **respuestas en células individuales** y además idealmente **estudiando el mayor número de respuestas posibles simultáneamente** en células individuales (por ejemplo, usando reporteros fluorescentes de varios colores que reportan como se comportan las respuestas de cada uno en única célula, como se hace en la tesis).

Es posible hacer abstracciones del sistema estudiado y hacer modelos del mismo. Una vez que se cuantifican las respuestas del sistema estas se pueden contrastar con los modelos planteados y luego corregirlos. Luego, con estos modelos corregidos se pueden hacer predicciones del comportamiento del sistema frente a nuevas condiciones, o también al interferir con el mismo de algún modo (por ejemplo, delecionando genes o inhibiendo enzimas del mismo). Al contrastar estas predicciones con los datos obtenidos en estas nuevas condiciones se corrige el modelo de nuevo. Este proceso iterativo continua hasta que el modelo satisface los datos observados. A veces, cuando la intuición del investigador no es suficiente para comprender el sistema usando modelos clásicos, es necesario generar modelos matemáticos más sofisticados. En este punto pasa a ser imprescindible tener información cuantitativa y de la dinámica del sistema para contrastar los modelos.

La generación de estos modelos y los estudios de la dinámica de los mismos permite analizar las propiedades de los sistemas y afrontar el desafío de explicar comportamientos diferentes de células individuales que desembocan en respuestas finales completamente distintas. Otro de los objetivos de la biología de sistemas es hacer abstracciones de propiedades de un sistemas biológico en un organismo que sean extrapolables a otros. Con el advenimiento de la biología sintética será posible generar organismos nuevos, modificados no ya a nivel de el agregado de un único transgén, sino más bien a nivel de la introducción de rutas metabólicas enteras, o pequeños circuitos o sistemas biológicos, para lo cual será necesario previamente, capturar las propiedades de estos de modo aislado. Pensando que cada circuito o sistema se puede pensar de un modo modular y que estos módulos tienen cierta autonomía y pueden combinarse de una manera predecible. El estudio integrativo de sistemas pone a prueba esta hipótesis. ¿Los módulos siempre se comportan de la misma manera o dependiendo de las condiciones cambian sus propiedades? Durante esta tesis ponemos a prueba esta pregunta.

Objetivos.

Como objetivo general de la tesis nos propusimos estudiar la interacción entre las vías de MAP quinasas de *S. cerevisiae* PR y HOG. En levaduras estas vías regulan decisiones de desarrollo y estrés respectivamente y a su vez están representadas en humanos, donde intervienen en importantes procesos de desarrollo, crecimiento y respuesta a estrés e inflamación (Cargnello y Roux, 2011). El mal funcionamiento de estas vías (por ejemplo *ERK*, *p38* o *p42/44*) en mamíferos puede conducir a patologías tales como cáncer y problemas en el desarrollo (Bradham y McClay, 2006; Cargnello y Roux, 2011; Santos et al., 2007).

Nos propusimos determinar los puntos de flujo de información entre las vías PR y HOG, ya que estas vías comparten componentes en sus vías de señalización y existe controversia sobre sus interacciones. Para esclarecer estos resultados contradictorios decidimos analizar las interacciones entre estas vías con el siguiente enfoque metodológico:

Estimulando las células en condiciones muy variadas, bajo estímulos aislados o combinados y controlando la dosis de los mismos.

Estudiando las respuestas de estas vías de un modo cuantitativo, analizando su dinámica temporal, en células individuales siempre que esto fuera posible, y cuantificando el mayor número de respuestas en cada célula.

Perturbando al sistema utilizando mutantes de deleción de genes implicados en las vías de señalización de MAPKs de la célula.

Resultados

Resultados.

1. Comportamiento de las vías de respuesta a feromona (PR) y de respuesta a shocks hiperosmóticos (HOG) y constitutiva (BMH2) frente a estímulos específicos.

Como objetivo general nos propusimos estudiar la interacción entre la vía de respuesta a feromona (PR) y la de respuesta a shocks hiperosmóticos (HOG). Para estudiar esto, construimos una cepa haploide de levaduras del tipo sexual *MAT*a conteniendo tres reporteros transcripcionales: P_{PRM1}-mCherry, inducible por feromona (Heiman y Walter, 2000), P_{STL1}-YFP inducible por HOG (O'Rourke y Herskowitz, 1998), P_{BMH2}-CFP, de expresión constitutiva (ver figura R1) (Colman-Lerner et al., 2005).

Para poder controlar con precisión la concentración de feromona agregada externamente, deletamos el gen *BAR1*, que codifica para una proteasa del factor α. Cuantificamos la fluorescencia de mCherry, YFP y CFP en un gran número de células genéticamente idénticas, por la técnica de citometría de fluorescencia microscópica (Chernomoretz et al., 2008; Colman-Lerner et al., 2005; Gordon et al., 2007).



Figura R1. Cepa salvaje LD3342, utilizada para estudiar las vías de señalización de respuesta a feromona (PR) y HOG. La misma posee 3 genes reporteros, Promotor *PRM1:* inducible por feromona, promotor *STL1:* inducible por shocks hiperosmóticos y promotor *BMH2:* constitutivo.

Primero determinamos la respuesta de los reporteros frente a cada estímulo aplicado aisladamente, para analizar la especificidad de los mismos. En estas condiciones cada estímulo activó solo a su gen reportero (Figura R2 a-c).



Figura R2. Especificidad de reporteros transcripcionales P_{PRM1} -mCherry, P_{STL1} -YFP y P_{BMH2} -CFP frente a estímulos de alta osmolaridad y de α factor en dosis saturante (1 μ M).

a-c). Células estimuladas con α factor 1 μ M o bien shock osmótico 0.25 M o 0.5 M NaCl. Respuesta transcripcional de la vía de respuesta: a) a feromona (PR), b) de HOG y c) BMH2. Se grafica la transcripción total del reportero P_{PRM1}mCherry (a), P_{STL1}-YFP (b) y P_{BMH2}-CFP (c). Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

d-e). Respuesta de la vía PR (d) o HOG (e) a un estímulo externo constante. d) La respuesta, *R2*, de la vía PR (transcripción de *PRM1*) frente a un estímulo externo constante, *E2* -concentración de α factor constante- no cambia en el tiempo. e) la respuesta de la vía HOG tiene un valor inicial, *Rp.s.* (respuesta <u>previa</u> al <u>shock</u>) frente a un estímulo externo constante, *E2* -osmolaridad elevada- alcanza un máximo *Rmáx*. (respuesta <u>máx</u>ima) y luego disminuye hasta alcanzar un valor en estado estacionario *Re.e.* (respuesta en <u>e</u>stado <u>e</u>stacionario). *Re.e.* - *Rp.s.* \neq 0 denota que la precisión de la respuesta no es infinita y la adaptación no es perfecta (ver R3). Cabe aclarar que R representa la respuesta del sistema como tasa transcripcional. Por esta razón la misma es constante en el tiempo en el caso de la respuesta de la vía PR.

La activación de cada reportero muestra una dinámica muy distinta frente a cada estímulo específico (ver figura R2). Al estimular con α factor en dosis saturante (1 μ M), la respuesta del reportero de la vía PR es lineal y continua en el tiempo (Figura R2a y d). Considerando que la tasa de degradación de estas proteínas

fluorescentes es despreciable en las condiciones experimentales usadas (Colman-Lerner et al., 2005; Gordon et al., 2007), y que las células están arrestadas luego de la estimulación con α factor, el aumento lineal de fluorescencia total de mCherry indica que el sistema PR ha alcanzado un nivel de activación estacionario ("steady state"). Esto se representa en la Figura R2d como una respuesta de la tasa transcripcional de *PRM1* constante (R2) frente a un estímulo constante (E2), de modo que mientras este presente el α factor habrá una respuesta continua en el tiempo, y de esto se desprende que no hay desensibilización de la vía PR a nivel transcripcional. Luego del tratamiento con α factor el reportero P_{BMH2}-CFP aumenta su nivel de fluorescencia total ya que las células están arrestadas y a los 270 minutos post estimulación la fluorescencia sube 4.3 veces respecto del valor inicial (Figura R2c) en el tiempo cero. Compárese este valor con el cociente de activación del reportero P_{PRM1}-mCherry que alcanza un valor de 86.2 veces (Figura R2a) mayor al inicial y con el reportero P_{STL1}-YFP que sube 4.4 veces (Figura R2b) en el mismo lapso de tiempo luego de tratar con feromona. Un aumento de los niveles de YFP y CFP coincidente indica que la tasa basal de transcripción del promotor STL1 y BMH2 se afectan del mismo modo por el tratamiento con feromona (es decir no se afectan o se afectan en el mismo grado).

El agregado de cloruro de sodio (o sorbitol) causa un shock hiperosmótico que genera un aumento violento de YFP hasta alcanzar un pico de activación o respuesta máxima, Rmáx. (Figura R2e) seguido de una disminución de la fluorescencia por dilución de la misma a medida que las células se dividen (Figura R2b). La fluorescencia debida a la transcripción mediada por la vía de HOG alcanzará un valor estable en estado estacionario, *Re.e.* (respuesta en estado estacionario) a largo plazo luego de que las células se adaptan a crecer en alta osmolaridad por un tiempo prolongado. Esta respuesta en estado estacionario puede ser idéntica a la inicial, *Rp.s.* (respuesta previa al shock), en cuyo caso se habla de que existe una adaptación perfecta del sistema, a nivel del parámetro de respuesta que se esta midiendo, o puede ser mayor a la inicial (*Re.e. - Rp.s. > 0*) si la adaptación es imperfecta (Figura R2e) (Ma et al., 2009). A continuación analizamos como es la adaptación de la vía de HOG a tiempos prolongados.

2. La vía de respuesta a shocks hiperosmóticos (HOG) no presenta osmo-adaptación perfecta. Respuesta transcripcional de P_{STL1}-YFP y activación a nivel de fosforilación y cambio de localización de la MAPK Hog1.

Para analizar el estado estacionario de activación alcanzado por la vía de HOG a tiempos largos decidimos crecer células a altas osmolaridades durante varias generaciones. Se crecieron células toda la noche (unas 15-20 horas) en distintos tubos conteniendo medio SC más el agregado de sorbitol en osmolaridades crecientes, y se analizó el estado estacionario de respuesta de la vía HOG (*Re.e.*) a nivel transcripcional (Figura R3a-b), y también a nivel de la activación a de la MAPK de esta vía, Hog1 por fosforilación dual (Figura R3h) y por cambio de localización del citoplasma al núcleo de la misma (Figura R3c-g). Usamos sorbitol en lugar de cloruro de sodio para afectar solo la osmolaridad del medio y no la fuerza iónica que podría tener otros efectos fisiológicos (Hohmann, 2002).



Figura R3. Estado estacionario de activación de la vía de HOG en células adaptadas a distintas osmolaridades.

a-h) Células crecidas por 15-20 hs. en medio con alta osmolaridad, con los osmolitos y osmolaridades que se indican en cada caso. a-b y h) Cepa 3342 -P_{PRM1}-mCherry, P_{STL1}-YFP y P_{BMH2}-CFP, c-g) Cepa SPy69 -Hog1-Venus, Hta2-CFP.

a) Transcripción de la vía HOG. Cepa LD3342, promedio de transcripción total de *P_{STL1}*-YFP por célula. a, inset) Respuesta de la vía HOG a un estímulo externo constante *E2* -osmolaridad externa-. La respuesta de la vía HOG tiene un valor inicial, *Rp.s.* (<u>r</u>espuesta <u>p</u>revia al <u>s</u>hock) frente a un estímulo externo constante, *E2* -osmolaridad elevadaalcanza un máximo *Rmáx.* (<u>r</u>espuesta <u>m</u>áxima) y luego disminuye hasta alcanzar un valor en estado estacionario *Re.e.* (<u>r</u>espuesta en <u>e</u>stado <u>e</u>stacionario).

b) Transcripción de la vía BMH2. Mismas células que en a, promedio de transcripción total de P_{BMH2}-CFP por célula.

c-g) Localización nuclear de Hog1-Venus. c) Cuantificación de fluorescencia nuclear y citoplasmática. Primer panel) Fotomontajes de canales de fluorescencia. Los núcleos pueden verse en el canal de fluorescencia de CFP gracias a que la histona Hta2 está fusionada a CFP, en tanto que Hog1-Venus se observa en el canal de fluorescencia de YFP. Segundo panel) Solo canal de Hog1-Venus. Tercer panel, célula más grande para mostrar zona cuantificada. Cuarto panel) Dibujo de célula señalando las variables usadas para cuantificar Hog1-Venus en núcleo y citoplasma (ver materiales y métodos). d) Fotomontajes canal de fluorescencia YFP mostrando Hog1-Venus. e) Promedio de intensidad de fluorescencia nuclear y citoplasmática por célula. f) intensidad de fluorescencia nuclear y citoplasmática por célula promedio (valores obtenidos de *e*) normalizada al valor de medio SC. g) Promedio del cociente de intensidad de fluorescencia nuclear sobre citoplasmática por célula a distintas osmolaridades.

h) Fosforilación dual de Hog1. Células adaptadas a distintas osmolaridades o bien a los 5 minutos luego de un shock osmótico agudo. Abajo, tinción de proteínas totales.

a, b, f y g) Las barras de error representan s.e.m.

En la Figura R3 puede verse que el estado de activación en estado estacionario de la vía de HOG es más elevado a mayor concentración de sorbitol agregado. Esto se observa en los tres niveles de respuesta analizados, fosforilación de Hog1 (Figura 3h), translocación de Hog1 al núcleo (Figura 3c-g) y transcripción de P_{STL1}-YFP (Figura 3a). Estos resultados indican que no hay una "adaptación perfecta" luego de que termina la respuesta al shock hiperosmótico agudo, en contraposición a lo propuesto por Muzzey y colaboradores (Muzzey et al., 2009).

A nivel transcripcional se ve más transcripción de P_{STL1} -YFP cuanto mayor es el gradiente osmótico, al aumentar la concentración de sorbitol agregado al medio (Figura R3a). Contrariamente, el reportero constitutivo P_{BMH2} -CFP no es afectado por la osmolaridad externa indicando que este efecto es específico del promotor *STL1* (Figura R3b).

Es interesante que si las células se adaptan a una osmolaridad elevada, pero se reemplaza el osmolito extracelular sorbitol por glicerol, el estado estacionario de transcripción mediada por HOG obtenido es significativamente menor cuanto mayor es la proporción de glicerol. Compárese, en Figura R3a la transcripción dependiente de *STL1* alcanzada usando 1 M sorbitol, 1 M glicerol o bien una mezcla de 0.5 M sorbitol más 0.5 M glicerol. Una explicación de esto sería que, al crecer en un ambiente con una osmolaridad más elevada la vía de HOG debe mantenerse más activa para redireccionar el flujo metabólico hacia la producción de glicerol y así aumentar los niveles del mismo y mantener la turgencia celular. El glicerol a su vez es capaz de ingresar a través de la acuagliceroporina Fps1, de este modo al usar este osmolito en el medio extracelular no se observa un impacto en la activación de HOG. Se puede concluir que el aumento del
gradiente osmótico lleva a una mayor transcripción de P_{STLI} -YFP debido a que se aumenta la diferencia en el gradiente químico de glicerol que induce una pérdida del mismo y una activación de HOG.

Para analizar la activación a otro nivel estudiamos la locación subcelular de Hog1. En este caso usamos la cepa SPy69 que expresa una proteína de fusión entre la histona Hta2 y CFP, de modo de marcar la ubicación del núcleo y además, Hog1 fusionada a Venus (variante fluorescente derivada de YFP) (Figura R3c). En la figura R3d se muestran fotomontajes de células adaptadas a SC más el agregado de sorbitol a osmolaridades crecientes. En el canal de fluorescencia correspondiente a Hog1-Venus puede verse que la intensidad de fluorescencia nuclear aumenta a mayores osmolaridades. En la Figura 3e y f, se muestran cuantificaciones de la intensidad de fluorescencia nuclear y citoplasmática, y puede verse que ambas aumentan a mayores osmolaridades. La intensidad de fluorescencia nuclear siempre es más elevada que la citoplasmática (Figura 3e) pero el cociente de intensidad de fluorescencia nuclear sobre citoplasmática de las células individuales es mayor en 0.75 M y 1 M sorbitol respecto de concentraciones menores de sorbitol (Figura 3g). Una mayor cantidad de Hog1 en el núcleo explicaría el aumento de transcripción observado en 3a.

Para confirmar que el estado de activación de la vía HOG era más elevado a mayores osmolaridades estudiamos la fosforilación dual de Hog1 (Figura 3h). Del mismo modo que en el caso de las respuestas de transcripción y localización subcelular, Hog1 está más activo a nivel de fosforilación cuanto mayor es la osmolaridad externa. El grado de fosforilación alcanzado por Hog1 en 1 M y 1.5 M sorbitol en estado estacionario equivale a un nivel de fosforilación de respuesta máxima (*Rmáx.,* 5 minutos post shock) de un shock agudo del orden de 100 mOsm.

3. La osmolaridad externa disminuye la respuesta de la vía PR.

A continuación nos propusimos analizar como se comportaban las vías de señalización en experimentos donde hay más de un estímulo presente. En esta sección analizaremos una serie de experimento donde nos centraremos en los efectos sobre la vía PR mientras que en la sección 4 volveremos a analizar algunos de estos experimentos y otros adicionales para estudiar los efectos sobre la vía de HOG con más detalle.

3.1. Coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa salvaje. Efectos sobre transcripción de la vía PR, área y morfología.

Trabajos previos han sugerido que existe una inhibición de la vía de HOG sobre la vía de feromona (McClean et al., 2007; O'Rourke y Herskowitz, 1998). Sin embargo otros mantienen que esta interacción no existiría (Patterson et al., 2010).

Para evaluar la modulación de la vía PR por parte de la vía HOG llevamos a cabo experimentos de coestimulación con α factor en dosis saturantes (1 μ M) y shocks hiperosmóticos de intensidad creciente. Para este experimento usamos la cepa salvaje LD3342 mencionada previamente. En la Figura R4a puede verse que hay una inhibición sobre la respuesta transcripcional de la vía PR. Esta es mayor cuanto mayor es el shock hiperosmótico aplicado, posiblemente debido a que la activación de la vía de HOG es mayor y más duradera

cuanto mayor es el shock hiperosmótico aplicado (Macia et al., 2009). A su vez también se observa un retraso en la aparición de la respuesta morfogenética dirigida por α factor, manifestada como aparición de la morfología "shmoo" (Figura R4b). Esta respuesta de desarrollo trae aparejado un arresto del ciclo celular en G1 y un crecimiento en tamaño. Como puede verse en la Figura R4c, este aumento de tamaño está retrasado en las células tratadas con cloruro de sodio 0.5 M y el retraso es mayor cuanto mayor es la concentración de esta sal.



Figura R4. Células coestimuladas con α factor 1 μ M y NaCl (0.25 o 0.5 o 1 M).

a) Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry. Izquierda, Medias vs. tiempo. Derecha, distribuciones de frecuencia relativa de células (n/total) vs. respuesta transcripcional PR a distintos tiempos (60, 90 y 150 minutos).

b) Aparición de morfología "shmoo" vs. tiempo.

c) Cambio de área vs. tiempo, promedio de área total de cada célula. Izquierda, Medias vs. tiempo. Derecha, distribuciones de frecuencia relativa de células (n/total) vs. área a distintos tiempos (60, 90 y 150 minutos). Las barras en a y c representan el error estándar de la media (s.e.m.).

d) Esquema representando el bloqueo ejercido sobre respuestas de la vía PR luego del shock osmótico.

Si bien en este experimento también analizamos la respuesta transcripcional de la vía HOG en las mismas células, por el momento solo diremos que la misma se activo normalmente durante la etapa de shock hiperosmótico agudo. Por ahora, solo nos enfocaremos en los efectos sobre la vía PR en esta sección. Más adelante avanzaremos sobre el/los posibles efectos moduladores de la vía de PR sobre la vía HOG.

De estos experimentos concluimos que un shock hiperosmótico agudo bloquea la respuesta de la vía de feromona, posiblemente a través de la vía de HOG (Figura R4d).

3.2. Preadaptación a alta osmolaridad y posterior estimulación con α factor.

A continuación estudiamos la respuesta de la vía PR en células donde previamente activamos la vía de HOG. De este modo se puede estudiar si hay un bloqueo de la vía PR cuando la vía HOG es más activa. Para hacerlo llevamos a cabo un experimento donde se adaptaron células a distintos medios con agregado de sorbitol a distintas concentraciones, del mismo modo que en los experimentos descriptos en la Figura R3. Como demostramos en aquellos experimentos, el estado estacionario de activación (Re.e.) de HOG es mayor a mayores osmolaridades (Ver también Figura R16b, esquemas de estado estacionario de la respuesta de HOG a distintas osmolaridades). Una vez que las células alcanzaron su respuesta estacionaria, estimulamos las mismas con α factor y estudiamos el efecto sobre la respuesta de la vía PR. Puede verse en la Figura R5a que la respuesta de P_{PRM1}-mCherry fue menor cuanto mayor fue la concentración de sorbitol presente en el medio. En la Figura R5c-e se observa también la inhibición debida a alta osmolaridad sobre la transcripción dependiente de *PRM1*, pero solo para dosis elevadas de α factor 10 nM a 100 nM. Finalmente, analizamos la susceptibilidad de las células a α factor en ensayos de Halo. En estos ensayos se plaquéan células en medio sólido, luego se agrega α factor en una concentración elevada en el centro de la placa. Una vez agregada, la feromona difunde radialmente y de este modo puede analizarse la susceptibilidad de las células a distintas concentraciones de la misma, ya que el α factor induce un arresto del ciclo celular. En el panel 5b puede verse que los halos son más pequeños cuanto mayor es la concentración de sorbitol o manitol agregado, pero no así cuando se usa glicerol como osmolito. Esto es consistente con los resultados presentados en el experimento de la Figura R3a, ya que una menor actividad de la vía HOG inhibiría menos a la vía PR. A su vez también se observa que el efecto ejercido por agregar 0.5 M sorbitol es igual al de 0.5 M sorbitol + 0.5 M glicerol, de modo que el glicerol externo no evita el bloqueo ejercido sobre la vía PR, como podría especularse si el glicerol ingresara por el canal Fps1.



Figura R5. La osmolaridad elevada inhibe la respuesta de la vía PR.

a,c-e) Células crecidas por 15-20 hs. en medio SC líquido más alta osmolaridad, con los osmolitos y osmolaridades que se indican en cada caso o bien en medio sólido 2 días en b.

a) Células estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M). Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

b) Ensayos de halo. Se plaquearon 1.10^6 células cada una placa de Petri conteniendo el medio que se indica. Luego se agregaron 3 µL de α factor 1 mM en el centro de un disco de papel Whatman de 4 mm de diámetro y se midió el halo de inhibición. Se señala en cada recuadro el cociente entre el diámetro del halo en cada medio respecto del halo en medio SC.

c-d) Células estimuladas con distintas concentraciones de α factor. Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry a los 90 (c), 180 (d) y 240 (e) minutos post estimulación con feromona. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

3.3. Pretratamiento con α factor y posterior coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa salvaje. Efectos sobre transcripción de la vía PR y BMH2, fosforilación de MAPKs y reclutamiento de Ste5-YFP.

A continuación decidimos preactivar la vía PR antes de coestimular con alta osmolaridad y feromona. Previamente se a reportado que la vía HOG es capaz de arrestar células en varios puntos del ciclo celular, G1, S y G2 (Clotet et al., 2006; Clotet y Posas, 2007; Escote et al., 2004; Zapater et al., 2005). Luego de que las células terminan de recuperarse de los shocks osmóticos las mismas son capaces de dividirse nuevamente, sin embargo su velocidad de división es menor cuanto mayor es la osmolaridad externa (Macia et al., 2009), presumiblemente debido al gasto energético que se produce luego de que ocurre un redireccionamiento del flujo metabólico hacia la síntesis de osmolitos intracelulares, como glicerol o trehalosa, necesarios para la turgencia celular y el crecimiento (Oliveira y Lucas, 2004). De modo que los efectos observados durante la coestimulación con α factor y alta osmolaridad podrían deberse a efectos generales de la vía de HOG sobre la transcripción, traducción y flujos metabólicos y no necesariamente efectos específicos sobre la vía de feromona. Por otra parte, las células que se encuentran en la transición G1/S no son capaces de responder a feromona (Colman-Lerner et al., 2005; Oehlen y Cross, 1994, 1998; Wassmann y Ammerer, 1997). Para eliminar la fuente de variación de los distintos estadios del ciclo celular decidimos pre-tratar células con α factor durante 90 minutos para tener una respuesta de la vía PR completamente activada y todas las células arrestadas en G1 y luego estudiar el efecto del shock osmótico sobre estas. Se analizó la respuesta de la vía PR a distintos niveles: transcripción (Figura R6), fosforilación de MAPKs (Figura R7) y reclutamiento de la proteína de andamiaje Ste5 (Figura R8).

En la Figura R6 puede verse que las células respondiendo a α factor 1 μ M (línea roja) muestran una acumulación de fluorescencia dependiente del reportero transcripcional P_{PRM1}-mCherry constante en el tiempo (al igual que en la Figura R2). Si estas células se someten a un shock osmótico puede verse una interrupción en el aumento de fluorescencia (línea rosada). Este bloqueo de la respuesta es transitorio y luego de 30 minutos, post shock osmótico, comienza a aumentar nuevamente la fluorescencia de P_{PRM1}-mCherry (línea rosada) aparentemente con la misma pendiente que la de las células solo estimuladas con feromona (línea roja).



Figura R6. Células pre-tratadas con α factor 1 μ M y luego coestimuladas con α factor 1 μ M y NaCl 0.5 M (línea rosada o gris) o control sin estimular con shock osmótico (línea roja o negra). Izquierda) Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry. Derecha) Respuesta transcripcional de la vía constitutiva, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry P_{BMH2}-CFP. Las barras representan el error estándar de la media (s.e.m.).

En este mismo experimento también analizamos que ocurría con el reportero transcripcional de BMH2 (Figura R6 derecha). La fluorescencia total de CFP dependiente del mismo aumenta en el tiempo ya que las células se arrestan en G1 por el tratamiento con feromona y no hay una dilución de la fluorescencia por división celular. El shock agudo con NaCl 0.5 M no parece afectar reportero P_{BMH2}-CFP.

Seguidamente se analizó el efecto del shock osmótico sobre la activación de Fus3, principal MAPK de respuesta a feromona. A su vez también se monitoreó la activación de las MAPKs Hog1 y Slt2/Mpk1. En todos los casos la activación se detectó usando anticuerpos que reconocen la fosforilación dual, en Thr-X-Tyr, en el "loop" de activación de las MAPKs. Este análisis se llevó a cabo haciendo Westerns semi cuantitativos usando un equipo de escaneo capaz de excitar fluoróforos infrarrojos acoplados a anticuerpos secundarios y de detectar la fluorescencia emitida por estos. Con este se pueden analizar simultáneamente hasta dos canales de fluorescencia (700 nm y 800 nm) y de este modo detectar proteínas que están colocalizadas, por ejemplo en un canal una proteína fosforilada y en otro la misma proteína total. Además de analizar las variantes fosforiladas de las MAPKs también se detectó Fus3 total y Hog1 total. En la figura R6 puede verse que Fus3 total y Fus3 activada (Fus3pp) aumentan durante el pretratamiento de 100 minutos con feromona. Ya ha sido reportado que el gen *FUS3* se induce al estimular con α factor (Nagiec y Dohlman, 2012; Roberts et al., 2000). Además de esto, también se observa un aumento de Slt2/Mpk1 activada (Slt2/Mpk1pp), en esta etapa del experimento. Como ha sido descripto en la literatura, Slt2 es necesaria durante la respuesta a feromona para coordinar una remodelación de la pared celular en las zonas de crecimiento polarizado que se localizan en las proyecciones de apareamiento. Su bloqueo lleva a la muerte celular debido a un aumento de fragilidad en la

zona de la pared que está sufriendo remodelación que sumada a la turgencia de la célula llevan a las células a estallar.

Al estimular con NaCl 0.5 M puede verse un aumento muy rápido de Hog1pp a los 2 minutos (Figura R7). Luego Hog1 disminuye su grado de fosforilación a medida que las células recuperan su presión de turgencia mediante la síntesis de glicerol (Muzzey et al., 2009). Al mismo tiempo que Hog1pp alcanza su pico de activación, Slt2/Mpk1pp comienza a disminuir y alcanza un mínimo de fosforilación a los 5-10 minutos post shock. Esta desfosforilación rápida quizás podría estar mediada por la fosfatasa dual específica de Slt2/Mpk1, llamada Sdp1 (Collister et al., 2002; Hahn y Thiele, 2002). Fus3pp también se desfosforila pero la desfosforilación es más lenta que la de Slt2/Mpk1 y comienza a bajar a partir de los 5 minutos luego del shock, alcanzando un mínimo entre los tiempos de 10, 20 y 30 minutos (Figura R7, arriba a la derecha). Notablemente Fus3 total aumenta durante el shock osmótico alcanzando un pico rápidamente a los 10 minutos hasta los 20 minutos. Este rápido aumento podría explicarse a partir de una reciente publicación donde se describe que ciertos RNA mensajeros son traducidos más activamente durante shocks osmóticos de un modo dependiente de Hog1. Hog1 fosforila y activa a una quinasa llamada Rck2 que luego fosforila y reprime al factor de elongación de la traducción EF2 evitando así la síntesis de proteínas de la mayoría de los mensajeros (Warringer et al., 2010). Esto se refleja en una disminución de los poliribosomas. En estos estudios se ve que la disminución de poliribosomas comienza a los 30 segundos post shock 0.4 M NaCl alcanzando un mínimo a los 4-6 min. Los mensajeros que no son reprimidos muestran un enriquecimiento en la fracción de poliribosomas remanente y por esta razón se traducen más. Este mecanismo podría explicar el aumento transitorio de Fus3 ya que su cinética es compatible con la del mismo. A pesar de que Fus3 aumenta, Fus3pp total baja, de este modo podemos concluir que durante la etapa de respuesta aguda a un shock osmótico se bloquea la activación de la vía de feromona pero a nivel de la fosforilación de Fus3.

Como ya se describió la respuesta de la vía HOG al shock hiperosmótico puede monitorearse viendo la fosforilación de Hog1. La cinética de fosforilación cambia según el grado del shock hiperosmótico aplicado (Macia et al., 2009). En el experimento de la Figura R7 vemos que la misma aumenta rápidamente, presenta un pico a los 2 minutos y luego disminuye a medida que las células se adaptan aumentando sus niveles internos de glicerol. Luego de que termina la respuesta al shock osmótico Hog1pp alcanza un mínimo, esto ocurre alrededor de los 30 minutos. A este tiempo podemos ver que las células recobran la capacidad de activar la vía de respuesta a feromona y que tanto Fus3pp como Slt2pp suben nuevamente a partir de los 50 minutos. Notablemente los niveles de Hog1pp también suben a partir de los 50-100 minutos, a diferencia de lo que ocurre normalmente frente a un shock hiperosmótico agudo, donde los niveles de Hog1pp van disminuyendo progresivamente a lo largo del tiempo (Macia et al., 2009). Esta reactivación de la vía de HOG será analizada con más detalle posteriormente.



Figura R7. Células pretratadas con α factor 1 μM y luego coestimuladas con α factor 1 μM y NaCl 0.5 M. Activación de MAPKs analizada por Western semi cuantitativo. Las MAPK fosforiladas se detectaron en el canal infrarrojo de 700 nm (anti-rabbit conjugado a fluoróforo) en tanto que Hog1 y Fus3 totales se detectaron en el canal de 800 nm (anti-goat). Barras representan el desvio estándar de dos experimentos independientes.

Seguidamente nos preguntamos si el bloqueo de la respuesta de la vía PR ocurría en uno de los primeros pasos en la vía de transducción de señales de la misma, el reclutamiento de la proteína de andamiaje Ste5 (ver Figura R8, derecha). Esta proteína es necesaria para que las quinasas de la vía PR Ste11 (MAPKKK), Ste7 (MAPKK) y Fus3 (MAPK) señalicen correctamente. Para este experimento se usó la cepa PP3362 que expresa una proteína quimérica compuesta de Ste5 fusionada a tres proteínas amarillas fluorescentes en tándem [Ste5-YFP(3x)]. Esta variante de Ste5 se expresa bajo el promotor endógeno del gen *STE5*. Al igual que en los experimentos de las figuras R6 y R7 pretratamos células con α factor en una concentración saturante durante 90 minutos y luego estimulamos las células con NaCl 0.5 M manteniendo la concentración de α factor constante. En la Figura R8 se muestran 3 campos con células representativas. Como puede verse en las fotos de transmisión las células presentan una morfología de tipo "shmoo", ya que fueron tratadas por un tiempo prolongado con feromona. Al analizar las fotos de fluorescencia puede verse una mayor intensidad de fluorescencia en la punta de las proyecciones de apareamiento donde se concentran las moléculas de Ste5, ya que Ste5 es reclutada a los sitios donde se localiza el receptor de α factor, Ste2 y el mismo a su vez se localiza en los lugares de crecimiento polarizado. Luego aplicar el shock hiperosmótico vemos que Ste5-YFP(3x) se mantiene en los sitios de mayor concentración. Su reclutamiento a la membrana plasmática no es bloqueado.



Figura R8. Células pretratadas con α factor 1 μ M y luego coestimuladas con α factor 1 μ M y NaCl 0.5 M. Reclutamiento de Ste5-YFP(3x) (cepa PP3662). Arriba, Canal de fluorescencia Ste5-YFP(3x) y de transmisión versus tiempo. Abajo, esquema representando la vía de señalización PR. Ste5 se recluta a la membrana plasmática cuando las células son estimuladas con α factor.

3.4. Pretratamiento con α factor y posterior coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa Δ *hog1.* Efectos sobre la transcripción de la vía PR y BMH2 y morfología.

Para analizar si Hog1 está involucrada directamente en la inhibición de Fus3 decidimos repetir el experimento anterior en una cepa $\Delta hog1$. Para esto se delecionó el gen de HOG1 en la cepa WT LD3342, que se usó previamente. En la figura R9 puede verse que la cepa $\Delta hog1$ (RB3801) responde a α factor normalmente aumentando los niveles de fluorescencia del reportero P_{PRM1}-mCherry. Luego, al estimular con alta osmolaridad se observa una fuerte inhibición transcripcional sobre la vía PR. Si bien, basados en la acumulación del reportero P_{PRM1}-mCherry parecería que las células bloquean la respuesta PR casi completamente (Figura R9a, izquierda), al analizar las fotografías de fluorescencia y de transmisión en detalle puede verse que la inducción de P_{PRM1}-mCherry se recupera luego de un retraso de unos 75 minutos y que las células presentan más proyecciones de apareamiento a tiempos más largos post shock. Por ejemplo en 100 min. post shock hay dos proyecciones y a 250 minutos tres proyecciones. Además de esto podemos señalar que las células tratadas con shock hiperosmótico presentan una alta tasa de muerte celular, pero muchas sobreviven al shock y recuperan su capacidad de responder a feromona. Finalmente, cabe señalar que se ha reportado que, células $\Delta hog1$ estimuladas con alta osmolaridad solamente presentan una activación de la vía PR por "cross talk" a través de la MAPKKK, Ste11, sin embargo en estas condiciones la respuesta de la vía PR estimulada con alta osmolaridad activa solo levemente al reportero PRM1 y no se observa la morfología de tipo "shmoo" y mucho menos múltiples "shmoos" [(O'Rourke y Herskowitz, 1998, 2002) y nuestras observaciones].

De este experimento podríamos concluir que la ausencia de Hog1 no evita el bloqueo del shock osmótico sobre la vía PR, sino que, contrariamente a lo esperado, lo exacerba. El bloqueo por lo tanto sería independiente de Hog1 y Hog1 ayudaría a que el mismo sea menos prolongado, posiblemente debido a que el tiempo de adaptación post shock es menor en una cepa salvaje comparado con una $\Delta hog1$. De nuevo no se observa un efecto del shock agudo sobre el reportero P_{BMH2}-CFP (Figura R9a, derecha).



Figura R9. Células $\Delta hog1$, pre-tratadas con α factor 1 μ M y luego coestimuladas con α factor 1 μ M y NaCl 0.5 M (línea rosada) o control sin estimular con shock osmótico (línea naranja).

a) Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1} -mCherry. Las barras representan el error estándar de la media (s.e.m.). b) Fotomontajes de tratamiento α factor 1 μ M 100 minutos y luego α factor 1 μ M y NaCl 0.5 M o control sin estimular con shock osmótico, fotos de canal de fluorescencia P_{PRM1} mCherry y de transmisión (BF).

3.5. Pretratamiento con α factor y posterior coestimulación con α factor y shock osmótico en cepas: Δ *ssk1,* Δ *sho1* y *HOG1-AS1.* Efectos sobre fosforilación de MAPKs.

Seguidamente analizamos el estado de fosforilación de las MAPKs Fus3 y Hog1 en un experimento de preactivación de la vía de respuesta PR seguido de shock hiperosmótico (Figura R10) en la cepa salvaje y en

tres cepas mutantes: Δ*ssk1*, Δ*sho1* y *HOG1-AS*. Las dos primeras cepas portan deleciones que interfieren con cada una de las ramas de señalización de la vía HOG y la tercera, *HOG1-AS*, es una variante mutante de Hog1 que es susceptible a un inhibidor químico, que es un análogo de ATP (el nombre *HOG1-<u>AS</u>*, es por "<u>A</u>nalog <u>S</u>ensitive"). Esta variante mutada del gen *HOG1* codifica para una proteína que tiene mutado el aminoácido número 100 del bolsillo de unión a ATP, de treonina a alanina. A este aminoácido se lo denomina "gatekeeper", ya que el mismo modula la entrada de ATP al bolsillo de unión a este nucleótido (Bishop et al., 1998; Bishop y Shokat, 1999). La alanina al ser un aminoácido muy pequeño convierte a la MAPK en una variante susceptible a inhibición, ya que el análogo de ATP es más voluminoso que el ATP.

En las cuantificaciones de la Figura R10 puede verse que la cepa WT aumenta el nivel de Fus3 fosforilado al estimular con feromona, luego, al recibir un shock hiperosmótico (tiempo 0), Hog1 se fosforila a la vez que Fus3 disminuye su nivel de fosforilación a los 15 minutos post shock, para luego volver a aumentar su grado de fosforilación en 30 y 45 minutos post shock (esto es similar a lo observado en la Figura R7).



Figura R10. Células salvajes (LD3342), Δ *ssk1* (RB3382a), Δ *sho1* (RB3703) o Hog1AS2 (SR3865) pretratadas con α factor 1 μ M y luego coestimuladas con α factor 1 μ M y NaCl 0.5 M o control estimuladas solo con shock osmótico.

Izquierda, arriba) Esquema del experimento. Izquierda, medio y abajo) Cuantificación de la fosforilación dual de Hog1 (medio) y Fus3 (abajo) en el tiempo. Derecha) Westerns usados para la cuantificación de la izquierda y tinción de proteínas totales con "Coomassie blue".

En la cepa $\Delta ssk1$ puede verse que Hog1 se fosforila menos que en la cepa salvaje luego del shock osmótico, pero sin embargo la desfosforilación de Fus3pp sigue ocurriendo. De hecho la desfosforilación de Fus3pp que se observa es ligeramente menor que en la cepa WT. La cepa Δ sho1 presenta una fosforilación de Hog1 que es igual a la de la capa salvaje (como ya se ha reportado para un shock 0.5 M NaCl) (Macia et al., 2009) y también se observa desfosforilación de Fus3pp. La cepa mutante HOG-AS, sensible al inhibidor 1NM-PP1, aumenta la fosforilación de Hog1 luego del shock agudo y los niveles de Hog1pp no decaen, ya que como ha sido reportado la actividad de Hog1 es necesaria para activar a sus propias fosfatasas Ptp2 y Ptp3 (Macia et al., 2009; Wurgler-Murphy et al., 1997). Notablemente, en esta cepa Fus3pp también se desfosforila a los 15 minutos, indicando que hay un mecanismo independiente de Hog1 activando alguna fosfatasa de Fus3, no compartida con Hog1 (ya que en este caso Hog1 está altamente fosforilado), que podría ser por ejemplo Msg5. Este mecanismo independiente de Hog1 podría estar mediado, quizás, por una vía de activación paralela que ocurre durante un shock hiperosmótico, tal como la despolarización de actina y subsiguiente asociación de Ssk2 al polarisoma (Bettinger y Amberg, 2007; Bettinger et al., 2007; Yuzyuk y Amberg, 2003). Esta vía es independiente de la rama de señalización Sln1 y no precisa Ssk1 para que se active la actividad de quinasa de Ssk2, y controla la cinética de repolarización luego de shocks hiperosmóticos (Bettinger y Amberg, 2007; Bettinger et al., 2007; Yuzyuk y Amberg, 2003).

4. La vía PR activa a la vía HOG.

En esta sección analizaremos los efectos sobre la vía HOG de algunos de los experimentos presentados en la sección anterior.

4.1. Coestimulación con α factor y shock osmótico en cepa salvaje. Efectos sobre la vía de HOG.

Previamente vimos que al coestimular levaduras con feromona y alta osmolaridad existe un efecto inhibitorio sobre la vía PR a nivel transcripcional, de aparición de morfología shmoo y cambio de tamaño inducidos por arresto del ciclo celular mediado por α factor (Figura R4, R11b y R11c medio y derecha). Sorprendentemente, al analizar el efecto de la coestimulación a nivel de la respuesta transcripcional de la vía HOG observamos un cambio en la dinámica de la misma. Luego de un rápido aumento inicial provocado durante la respuesta aguda, post shock hiperosmótico, la tasa de transcripción mediada por el promotor *STL1* no mostró la disminución de fluorescencia típica de la etapa de adaptación e inactivación del reportero. Es decir, la respuesta en estado estacionario constante (*Re.e.*) no retornó a un nivel bajo similar al inicial (*Rp.s.*) luego del pico de respuesta máxima (*Rmáx.*) como ocurre en las células estimuladas solo con alta osmolaridad (Figura R11a y c izquierda y derecha). En términos de la nomenclatura presentada en la introducción y como se muestra en la Figura R11c observamos que la respuesta de la vía de HOG a nivel de su tasa transcripcional presentaría la misma "sensibilidad", (*Rmáx. - Rp.s.*) tanto para el caso de shock osmótico aislado como en de shock combinado con α factor. En tanto que la respuesta de HOG cambió su "precisión", pasando de una precisión elevada (<u>pero no infinita</u> como demostramos en la Figura R3) a una mucho más baja (*Re.e. > Rp.s.*) aumenta). Una opción que se desprende de esta observación es que

las células podrían tener problemas para adaptarse a la alta osmolaridad externa si hay feromona presente en el medio.

A nivel de vía de respuesta a feromona si bien la misma no es una respuesta adaptativa podríamos pensar que la misma redujo su "sensibilidad" ya que la respuesta transcripcional en estado estacionario R3 es menor a R2.



Figura R11. El estado estacionario de activación de la vía HOG se modifica a tiempos prolongados en presencia de α factor.

a y b) Células coestimuladas con α factor 1 μ M, NaCl 0.5 M y ambos estímulos simultáneamente.

a) Respuesta transcripcional de la vía HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STL1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

b) Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

c) Representación esquemática de estímulos y respuestas de los sistemas de HOG y PR (como en I9 y R1). R representa la respuesta del sistema como tasa transcripcional. Respuestas frente a estímulo de alta osmolaridad aislado (izquierda), α factor aislado (centro) o ambos (derecha). Estímulos. Vía HOG) *O1 y O2*: osmolaridad 1 y 2. Vía PR) α 1 y α 2: concentración de α factor 1 y 2 (α 1=0). Respuestas. Vía HOG) *Rp.s.*: <u>r</u>espuesta <u>p</u>revia al <u>s</u>hock, *Rmáx.*: <u>r</u>espuesta <u>máx</u>ima y *Re.e.*: <u>r</u>espuesta en <u>e</u>stado <u>e</u>stacionario. Vía PR) R1, 2 y 3.

4.2. Preadaptación a alta osmolaridad y posterior estimulación con α factor. La estimulación con α factor activa la vía HOG.

Del último experimento surgió la posibilidad de que la vía PR estuviera interfiriendo con la adaptación de las células a osmolaridad elevada. Luego esta interferencia a la adaptación estaría generando un desbalance osmótico que activaría finalmente a HOG. Para testear esta posibilidad realizamos un segundo experimento donde preactivamos la vía de HOG hasta que la misma alcanzó un estado estacionario constante y luego estimulamos la vía PR para estudiar el efecto sobre la vía HOG. Se crecieron células 15-20 hs en medio líquido SC más sorbitol 1 M, luego al día siguiente se estimuló con α factor en dosis saturante y tomamos muestras a distintos tiempos para analizar la transcripción de los reporteros fluorescentes y también el estado de activación de las MAPKs (por fosforilación dual). Consistentemente con el experimento anterior la estimulación con feromona activó a la vía de HOG (Figura R12a y c). Se observa una inducción estable del reportero P_{STL1}-YFP (Figura R12a, línea violeta). La transcripción dependiente de HOG a nivel poblacional sube establemente y parece seguir una cinética de activación igual a la activación del reportero transcripcional P_{PRM1} -mCherry por feromona (Figura R12a, línea rojo). Es decir que, a diferencia de lo que ocurre durante un shock hiperosmótico agudo la respuesta de la vía de HOG a pasado de ser una de tipo activaciónadaptación/inactivación a una de activación constante (Figura R12b). Es importante resaltar aquí que el inicio de la respuesta transcripcional de la vía HOG es apreciable solo a tiempos largos, ya que comienza a inducirse alrededor de 100 minutos post estimulación con α factor; y posteriormente se induce establemente en el tiempo (Figura R12a y b). En cambio la inducción de la vía PR empieza antes, a los 50 minutos (que fue el primer tiempo analizado post estimulación con α factor) ya se observa acumulación del reportero P_{PRM11}mCherry.



Figura R12. La vía PR es capaz de activar la vía HOG en células adaptadas a alta osmolaridad.

Células crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M). a y b) cepa LD3342, d) cepa SPy69.

a) Arriba) Esquema del experimento. Abajo) Respuesta transcripcional de la vía PR y HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry y P_{STL1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

b) Esquema representando las dinámicas de los estímulos y respuestas de la vía HOG (violeta) y PR (rojo). R representa la respuesta del sistema como tasa transcripcional. Arriba) Esquema del experimento. Respuestas frente a estímulo de alta osmolaridad aislado (izquierda), α factor aislado (centro) o ambos (derecha). Estímulos. Vía HOG) *O1 y O2*: osmolaridad 1 (medio SC) y 2 (SC + sorbitol). Vía PR) α 1 y α 2: concentración de α factor 1 y 2 (α 1=0). Respuestas. Vía HOG) *Rp.s.*: <u>r</u>espuesta <u>p</u>revia al <u>s</u>hock, *Rmáx*: <u>r</u>espuesta <u>máx</u>ima y *Re.e.*: <u>r</u>espuesta en <u>e</u>stado <u>e</u>stacionario. Vía PR) R1 y 2.

c) Western blot. Fosforilación dual de MAPKs: Fus3 y Kss1 (vía PR), Hog1 (vía HOG) y Slt2/Mpk1 (vía CWI) (arriba). Tinción de proteínas totales (abajo).

d) Localización subcelular de Hog1-Venus (ver cuantificación en Figura R17).

La activación de la vía HOG también se observa a nivel de la fosforilación de Hog1pp. Como se observa en el Western de la Figura R12c luego de estimular con α factor las MAPKs específicas de la vía PR Fus3 y Kss1 se activan fuertemente a partir de los 40 minutos alcanzando un máximo a los 100 minutos post estimulación. Notablemente, y en contraposición a lo que ocurre en medio SC sin alta osmolaridad agregada, se observa que Hog1 comienza a fosforilarse a los 40 minutos y que llega a un máximo de activación a los 100 minutos (figura R12c). Finalmente, también puede verse que la cinética de fosforilación alcanzada por Mpk1/Slt2pp es similar a las anteriores. Véase que Mpk1pp aumenta a los 40 minutos, llega a un máximo a los 100 minutos y queda en ese máximo de fosforilación en 200 minutos. Es interesante que en este experimento se observan todas las vías de MAP quinasas activas simultáneamente, en particular es notable que se encuentre activada la vía CWI y HOG ya que se ha reportado previamente que estas vías son antagónicas y los estímulos que activan la vía HOG pueden inactivar a la vía CWI y viceversa. Como mencionamos en la introducción, la vía CWI se activa por: alta temperatura (Kamada et al., 1995), shock hipo-osmótico (Davenport et al., 1995), estiramiento de la membrana (Kamada et al., 1995), aumento de la fluidez de membrana mientras que la vía HOG por los estímulos exactamente opuestos: frío (Hayashi y Maeda, 2006; Panadero et al., 2006), shock hiperosmótico o agentes rigidificantes que disminuyen la fluidez de membrana (como DMSO) (Panadero et al., 2006).

En la Figura R12d podemos ver que la adaptación a alta osmolaridad y posterior estimulación con α factor generó también un cambio en la respuesta de la vía HOG a nivel de localización de la proteína de fusión Hog1-Venus. Puede verse claramente en los fotomontajes del canal de fluorescencia YFP que las células en medio con sorbitol 1 M presentan una mayor concentración de Hog1 en el núcleo que en el citoplasma tanto en el tiempo cero como luego de 180 minutos post estimulación con α factor (ver cuantificación en Figura R17).

Como control del experimento anterior también se usó otro osmolito para pre-adaptar a las células a alta osmolaridad. En la figura R13 se observa que usando NaCl 0.5 M en lugar de Sorbitol 1M (misma osmolaridad final 1000 mOsmolar) también se observa activación de la vía HOG por la vía PR en células pre-adaptadas a alta osmolaridad.



Figura R13. La activación de la vía de HOG mediada por la vía PR también se observa adaptando las células a osmolaridad elevada pero intercambiando el osmolito sorbitol por NaCl, manteniendo la misma osmolaridad final constante. Células crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más NaCl 0.5 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μM). a) Arriba) Esquema del experimento. Abajo) Respuesta transcripcional de la vía PR y HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry y P_{STL1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

De estos experimentos surgen varias preguntas. ¿Cómo activa la vía PR a la vía HOG?, ¿Interfiere la vía PR con los mecanismos de adaptación a alta osmolaridad?, si es así ¿Cómo lo hace?, ¿Porqué cambia la dinámica de activación de la vía HOG de una tipo *activación/adaptación* a una de *activación persistente*?, ¿Porqué tarda 100 minutos en activarse la vía de HOG?, ¿Cómo es posible que Hog1 y Slt2/Mpk1 estén activos simultáneamente?, ¿Es necesaria la vía CWI para que ocurra activación de la vía HOG?, etc.

A continuación analizaremos todos estas preguntas.

4.3. Activación de la vía HOG mediada por feromona. Fus3 es necesaria para que se active la transcripción de *P*_{STL1}-YFP.

Fus3 es la MAPK más importante de la vía PR. Cuando se deleciona el gen *FUS3* se observa una menor transcripción de los genes inducidos por feromona y además las células tratadas presentan un crecimiento menos polarizado (Hao et al., 2008) (Figura R14). Decidimos generar una cepa Knock-out para el gen *FUS3* en la cepa LD3342. Como era esperable (Colman-Lerner et al., 2005), las células Knock-out tratadas con α factor presentaron menos inducción del reportero P_{PRM1} -mCherry (Figura R14c) y no presentan morfología "shmoo". Además, en estas mutantes no ocurre activación de la vía de HOG (Figura R14b).



Figura R14. Células salvajes (LD3342) y $\Delta fus3$ (RB3712) crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M).

a) Diagrama de activaciones mediadas por PR. b, arriba) Esquema del experimento. b, abajo) Respuesta transcripcional de la vía HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STLI}-YFP. c) Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry . b y c) Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

Además de reducirse los niveles transcripcionales del reportero *STL1*, experimentos de Western mostraron que, en la cepa $\Delta fus3$, Hog1 estaba unas 3 veces menos fosforilada luego de la estimulación con feromona. Adicionalmente tampoco se observó fosforilación de Slt2/Mpk1 (ver Figura R28c). La activación de Mpk1/Slt2pp por feromona se ha demostrado que es consecuencia del crecimiento polarizado cuando las células tienen la morfología "shmoo" (Buehrer y Errede, 1997). De modo que este experimento no nos permite saber si la falta de activación de la transcripción de la vía de HOG se debe a la falta de Fus3 directamente o a otras consecuencias de la deleción de este gen (por ej. activación menor de Slt2/Mpk1 o falta de morfología "shmoo"). Cabe resaltar además que el experimento control de estimulación con shock agudo en la cepa $\Delta fus3$ activa la transcripción del reportero P_{STL1}-YFP normalmente (Figura R29).

4.4. Activación de la vía HOG mediada por feromona. Componentes de la vía de HOG necesarios.

Para saber cuál/es de las ramas de señalización de la vía de HOG estaba actuando en las condiciones de activación mediada por la vía de PR, decidimos delecionar genes que codifican para proteínas clave de estas cascadas de señalización (figura R15).

Para bloquear la rama Sho1 usamos la cepa $\Delta sho1$ (RB3703) y para deshabilitar la rama Sln1 la cepa $\Delta ssk1$ (RB3382) y también la $\Delta ssk2$ (RB3642). En ninguna de estas cepas notamos diferencias en la activación transcripcional de la vía PR o del reportero BMH2. Sin embargo la activación de la transcripción mediada por

HOG fue bloqueada en las cepas $\Delta ssk1$ y $\Delta ssk2$, indicando que la rama Sln1 *es* fundamental para la activación de HOG.

Por otra parte Nelson y col. reportaron previamente que la estimulación con α factor podría bloquear la rama Sho1, ya que este tratamiento promueve la inducción del gen *FUS1*, y la proteína Fus1 interaccionaría con Sho1 e inhibiría su capacidad de señalizar (Nelson et al., 2004). De este modo existe la posibilidad de que la deshabilitación de la rama Sln1 en cepa *Δssk1*, sumada al bloqueo reportado de la rama Sho1, por la inducción de *FUS1*, conjuntamente anulen toda señalización hacia Hog1. Para testear esta posibilidad generamos una cepa *Δssk1 Δfus1*, en la cual Sho1 no sería más bloqueada por Fus1. En esta cepa doble "knock out" tampoco vimos activación del reportero de HOG mediada por feromona (Figura R15a), de modo que la rama Sho1 no se activa en las condiciones bajo estudio.



Figura R15. Componentes de la vía HOG necesarios para activación mediada por la vía PR.

Células salvajes (LD3342), $\Delta sho1$ (RB3703), $\Delta ssk1$ (RB3382), $\Delta ssk2$ (RB3642) y $\Delta ssk1 \Delta fus1$ (RB3401) crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1 M, o bien 0.5 M en el caso de la cepa $\Delta hog1$ (RB3801), y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M). a, arriba) Esquema del experimento. a, abajo y b) Respuesta transcripcional de la vía HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STLI}-YFP, en las mutantes que se indican. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

c) Vía de respuesta de HOG mostrando proteínas involucradas en paneles a y b. d) Western blot. Fosforilación dual de Hog1. Izquierda: Células crecidas por 16 hs. en Sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor 1 μ M; derecha: Shocks hiperosmóticos agudos. La muestra fue sacada a los 5 minutos post shock. e) Diagrama de activaciones mediadas por PR. La vía PR activa la vía HOG a través de la rama SIn1 y Hog1.

En la Figura 15b puede verse que las células de la cepa $\Delta hog1$ (RB3801) luego de preadaptarse a alta osmolaridad y ser estimuladas con α factor 1 μ M no activan la transcripción mediada por el reportero P_{STL1}-YFP. En este experimento se usó una osmolaridad de 0.5 M sorbitol ya que a osmolaridades más elevadas la activación basal de la ruta de HOG provoca un arresto del ciclo celular en las células que no poseen Hog1. Esto ocurre ya que se ha reportado las cepas $\Delta hog1$ activan la vía de respuesta a feromona por "cross talk" al ser estimuladas con alta osmolaridad y de este modo las células se arrestan en G1 (O'Rourke y Herskowitz, 1998, 2002; Westfall y Thorner, 2006).

Al analizar el grado de fosforilación de Hog1 alcanzado durante la activación mediada por feromona, comparado con el alcanzado durante shocks hiperosmóticos agudos vemos que el mismo es equivalente a un shock un poco mayor a 200 mOsm (la intensidad está entre 200 y 400 mOsm) (Figura R15d). Se ha reportado que para este grado de shocks osmóticos la transducción de señales se transmite a través de la rama de señalización Sln1, con lo cual la similitud en el grado de fosforilación de Hog1 alcanzado por ambos tipos de estímulos (shock agudo o tratamiento con α factor en células preadaptadas a alta osmolaridad), sería consistente con nuestros resultados donde solo los mutantes de la vía de señalización Sln1 bloquean la transcripción mediada por Hog1 (Figura R15a).

4.5. La activación de la vía HOG mediada por feromona es mayor cuanto mayor es la osmolaridad a la que fueron adaptadas las células.

4.5.1. Activación de HOG a nivel transcripcional de P_{STL1}-YFP.

Del experimento de 4.2 surgió la posibilidad de que el tratamiento con feromona estuviera activando la vía HOG a través de la generación de un desbalance osmótico. Sugerimos que la feromona es la causante de la activación de HOG ya que la inducción de P_{5TL1} -YFP comienza a observarse a tiempos largos post estimulación con feromona y en segundo lugar, el desbalance osmótico es el estímulo habitual para activar al reportero P_{5TL1} -YFP. Para estudiar con mayor detalle la activación mediada por feromona nos propusimos repetir el experimento de 4.2 pero esta vez preactivando la vía HOG con distintas osmolaridades. Se preadaptaron las células en medio SC más el agregado de sorbitol a distintas molaridades como en el experimento descripto en la sección 3.2 Figura R5 y R16b. De este modo la respuesta de la vía HOG alcanza un estado estacionario (Re.e.) mayor cuanto mayor es la osmolaridad externa (Figura R5 y R16b). Luego de preactivar la vía HOG estimulamos las células con una dosis saturante de α factor. En la figura se muestra la respuesta transcripcional dependiente de la vía HOG luego de estimular con feromona y también de la vía PR (Figura R16a medio y abajo -mismo gráfico que en R5-).



Figura R16. Células crecidas por 15-20 hs. medio SC más el agregado de Sorbitol en distintas concentraciones, luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M).

a) Arriba) Esquema del experimento. Medio y abajo) Respuesta transcripcional de la vía PR y HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry y P_{STL1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

b) Esquema representando las dinámicas de los estímulos y respuestas de la vía HOG (violeta) y PR (rojo). R representa la respuesta del sistema como tasa transcripcional. Arriba) Esquema del experimento. <u>Estímulos</u>. Vía HOG) *O1*: osmolaridad de medio SC, O2 a O5: SC + osmolito, a distintas concentraciones. Vía PR) $\alpha 1 y \alpha 2$: concentración de α factor 1 y 2 (α 1=0). <u>Respuestas</u>. Vía HOG) *Rp.s.*: <u>r</u>espuesta <u>p</u>revia al <u>s</u>hock, *Rmáx.*: <u>r</u>espuesta <u>máx</u>ima, *Re.e.*: <u>r</u>espuesta en <u>e</u>stado <u>e</u>stacionario post adaptación al shock osmótico, *Re.e.'*: respuesta en estado estacionario post activación por α factor. Vía PR) R1 a 5: respuestas a osmolaridades O1 a O5. En estas condiciones experimentales vimos una mayor activación de la vía HOG cuanto mayor fue la osmolaridad a la cual estaban adaptadas las células (Figura R16a, medio). Como se describió en 4.2, la respuesta transcripcional dependiente de la vía PR mostró una tendencia opuesta y fue menor a mayores osmolaridades, indicando algún tipo de inhibición de la vía de HOG sobre la vía de respuesta a feromona (Figura 16a, abajo).

En este experimento observamos que un estímulo constante, α factor en dosis saturante, activa la vía de HOG más intensamente cuanto mayor es la osmolaridad externa. Esta activación mayor quizás esta relacionada con el aumento de la actividad basal de la vía de HOG observado en 3.2 (a nivel transcripcional, de fosforilación Hog1pp y localización de Hog1-Venus). En esa sección, propusimos que el aumento de actividad basal de glicerol más elevada cuanto mayor es el gradiente osmótico en el medio, ya que en esas condiciones las células necesitan acumular más glicerol para mantener la turgencia celular y esto provoca una diferencia en el gradiente químico de glicerol más alta que induce una perdida mayor del mismo. Entonces, si la feromona produjera un efecto constante, como por ejemplo la inducción de pérdida de glicerol, este efecto sería favorecido por un gradiente químico del mismo más elevado.

4.5.2. Activación de HOG a nivel de la translocación de Hog1-Venus al núcleo.

Seguidamente analizamos la activación de la vía de HOG mediada por feromona a nivel de la localización subcelular de Hog1. Para esto utilizamos la cepa SPy69, presentada anteriormente en la Figura R3, que expresa la MAPK Hog1 fusionada a Venus y además posee el núcleo marcado con la histona Hta2-CFP (Figura R17). Como ya se había mostrado antes, las células completamente adaptadas al medio extracelular presentan un estado estacionario de localización nuclear de Hog1-Venus mayor cuanto más elevada es la osmolaridad externa (Re.e. mayor a mayores osmolaridades). Al estimular estas células con una dosis saturante de α factor vimos que aumentó la relación núcleo citoplasma de Hog1-Venus (Figura R17b). Vemos en la Figura R17c que el aumento del enriquecimiento nuclear de Hog1-Venus es similar a distintas osmolaridades (*Re.e. post* α factor - *Re.e.* es constante). Es decir que el <u>aumento</u> de la respuesta de HOG en estado estacionario luego del tratamiento con feromona es igual, pero dado que las respuestas partieron de niveles de estado estacionario diferentes (*Re.e.* previa al tratamiento con α factor es mayor a mayores osmolaridades) la respuesta final post estimulación con feromona es mayor (véase también esquema de R16b). Asumiendo que la tasa transcripcional es mayor a mayor localización de Hog1 en el núcleo se deduce que la acumulación de fluorescencia dependiente del reportero P_{STL1}-YFP debería ser mayor a mayores osmolaridades debería ser mayor, tal como observamos en R16. Si bien el cociente de intensidad núcleo/citoplasma es constante entre 0.25 M y 0.5 M sorbitol la intensidad total de Hog1-Venus presenta una tendencia positiva a mayores osmolaridades (Figura R17c derecha).



Figura R17. Localización nuclear de nogi-venus (cepa sryos). Celulas, crecidas por 15-20 hs. medio se mas el agregado de Sorbitol en distintas concentraciones, luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M).

a) Esquema del experimento. Las células dibujadas señalan como cambia la intensidad de fluorescencia de Hog1-Venus en el núcleo y citoplasma.

b) Fotomontajes canal de fluorescencia YFP, mostrando Hog1-Venus a distintas osmolaridades (nota: estas células también expresan la histona Hta2 fusionada a CFP marcando los núcleos, pero no se muestran las fotos de este canal de fluorescencia).

c, izquierda) Promedio del cociente de intensidad de fluorescencia nuclear sobre citoplasmática por célula a distintas osmolaridades. c, derecha) Promedio de intensidad de fluorescencia nuclear y citoplasmática por célula. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.) en ambos gráficos.

4.6. La activación de la vía HOG mediada por feromona está correlacionada con la aparición de la morfología "shmoo".

En el experimento de la sección 4.5, nos llamó la atención que la activación transcripcional dependiente de la vía HOG nunca comienza antes de los 100 minutos. Justamente, este lapso de tiempo coincide con el tiempo en el que las células adoptan una morfología llamada "*shmoo*" (ver Figura R18b). Esta morfología se caracteriza por tener proyecciones de apareamiento ahusadas con un estrangulamiento pronunciado en su base (ver Figura R18b y M7). Dada esta correlación, nos preguntamos si la morfogénesis inducida por la vía PR estaba involucrada en la activación de la vía HOG. Para estudiar esto hicimos dos tipos de experimentos. **1**- Experimentos de dosis respuesta donde adaptamos las células a 1 M Sorbitol y luego

estimulamos a distintas dosis de α factor, o bien, **2**- Analizamos cepas "knock out" de genes que codifican para proteínas que forman parte de un complejo multiprotéico llamado "polarisoma".

4.6.1. Estimulación de células preadaptadas a alta osmolaridad con distintas concentraciones de feromona.

Llevamos a cabo el experimento de preadaptación de células a un medio con osmolaridad elevada (SC más sorbitol 1M) y luego estimulamos las mismas con distintas concentraciones de α factor (Figura R18a). Previamente se ha demostrado que células estimuladas con distintas concentraciones de α factor adoptan una morfología diferente dependiendo de la dosis de la misma (Hao et al., 2008). A dosis saturantes de feromona las mismas presentan morfología "shmoo", como se mencionó esta consiste en células con proyecciones de apareamiento ahusadas (ver Figura R18b y M8). Luego, a dosis intermedias cercanas a la Kd del receptor de α factor Ste2, las mismas crecen con una morfología elongada con forma de maní, o en ingles "peanut" (Hao et al., 2008).

En este experimento se puede observar que las dosis de feromona de 10, 32 y 100 nM provocan la misma transcripción total del reportero de la vía PR (Figura R18a y c), sin embargo al mirar la transcripción total dependiente de P_{STL1} -YFP (HOG) la misma se activa más intensamente en las dosis 32 y 100 nM (Figura R18a y d). Estas son las dosis en las cuales ocurre crecimiento más polarizado y se forman "shmoos" (Figura R18a abajo y b). De hecho, si observamos la curva de respuesta de la vía de HOG a distintas dosis de feromona a los 240 minutos post estimulación (curva violeta en la Figura R18a medio) y la comparamos con el porcentaje de células con morfología tipo "shmoo" (histogramas naranjas en la Figura R18a medio), vemos una excelente correlación de ambas respuestas. Finalmente, se debe señalar que el volumen celular varía según la dosis de α factor. Se observa que el volumen aumenta a la vez que aumenta la respuesta transcripcional del reportero de la vía PR, P_{PRM1} -mCherry. El volumen alcanza un pico en las concentraciones de α factor de 5 y 10 nM y luego disminuye en 32 y 100 nM. Las células estimuladas con dosis intermedias de α factor (5 y 10 nM) crecen elongadamente y adoptan la morfología "peanut" (ver figura R18b y M8) (Hao et al., 2008).

De este experimento podemos concluir que podría existir una causalidad entre la morfología "shmoo" y el aumento de respuesta de la vía HOG, o bien entre un factor producido por la respuesta de feromona que se acumula y gatilla la respuesta de la vía de HOG. Esta segunda posibilidad surge como consecuencia de que en las últimas tres dosis de α factor la respuesta total del reportero de PR está saturada pero las células son más pequeñas, de modo que la presunta molécula que activaría la vía de HOG se concentraría más en estas concentraciones más elevadas.



Figura R18. Células crecidas por 16 hs. medio con Sorbitol 1M, luego estimuladas con distintas concentraciones de α factor.

a) Arriba) Esquema del experimento. Medio) Respuesta transcripcional de la vía PR y HOG. Promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1} -mCherry y P_{STL1} -YFP normalizadas a valor máximo y mínimo versus concentración de α factor. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.). Además, se señala el porcentaje de "shmoos" a distintas dosis de feromona. En este caso las barras de error representan el desvio estándar de la media (se analizaron aproximadamente 800 células en total para cada dosis de feromona). La línea gris representa el volumen promedio en femtolitros (barras de error representan s.e.m.). Abajo) Fotomontajes mostrando la morfología celular a distintas concentraciones de α factor.

b) Cuantificación de "shmoos". Criterio de cuantificación para un pequeño campo de una imagen para la dosis 10 nM de α factor luego de 180 minutos post estimulación con feromona (para más detalles ver Materiales y métodos).

c) Respuesta transcripcional de la vía PR, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

d) Respuesta transcripcional de la vía HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STL1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

4.6.2. La vía de integridad de pared celular (vía CWI) y el "polarisoma" son necesarios para activación de la vía HOG mediada por la vía PR.

4.6.2.1. Disrupción del "polarisoma". Estimulación de células preadaptadas a alta osmolaridad con dosis saturante de α factor.

Teniendo en cuenta que la morfología "peanut" no presentó activación de la vía HOG mediada por feromona decidimos investigar la relación entre la morfología y la activación en más detalle. Se sabe que ciertos mutantes de un complejo multiprotéico llamado "polarisoma" son necesarios para la generación adecuada de la morfología "shmoo" en dosis saturantes de α factor. Cuando se mutan los componentes del polarisoma las células tratadas con α factor adoptan morfología "peanut". Generamos cepas "knock out" para genes que codifican para componentes del polarisoma: $\Delta spa2$ y $\Delta pea2$ y luego llevamos a cabo experimentos para testear la activación de la vía HOG mediada por PR (Figura R19).



Figura R19. Componentes del polarisoma y de la vía CWI necesarios para activación mediada por la vía PR.

Células salvajes (LD3342), $\Delta pea2$ (RB3838), $\Delta spa2$ (RB3837) y $\Delta slt2/mpk1$ (RB3376) crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M).

a y b, arriba) Esquema del experimento. a y b abajo) Respuesta transcripcional de la vía HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STL1}-YFP, en las mutantes que se indican. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

a y b, abajo) Fotomontajes de células antes y después de la estimulación con α factor.

c) Vía de respuesta de integridad de pared celular mostrando proteínas involucradas en paneles a y b.

d) Diagrama de activaciones mediadas por PR. El α factor activa la vía PR, luego se activa la vía CWI a través del polarisoma. La vía CWI finalmente activa la vía HOG.

En la Figura R19 vemos que las cepas $\Delta spa2$ y $\Delta pea2$ mostraron un crecimiento característico con forma de "maní" en lugar de la típica forma "shmoo" (el nombre de los genes *PEA1* (sinónimo *SPA2*) y *PEA2*, es por la morfología de maní, - del inglés "peanut"), al ser estimuladas con α factor en dosis saturante. En ambos casos se observó un nivel basal más alto tanto de la transcripción de la vía HOG como del estado de fosforilación de Hog1pp (Figura R28). A su vez, al estimular con α factor se observó una menor activación de la vía HOG (Figura R19). Cabe remarcar finalmente, que la activación de la MAPK Mpk1/Slt2pp fue menor en estas cepas (Figura R28). Concluyendo, el polarisoma es necesario durante la activación de HOG mediada por feromona.

4.6.2.2. Una "cascada de cascada de MAP quinasas": La vía PR activa a la vía HOG a través de la vía CWI.

Teniendo en cuenta que la proteína Spa2 es una proteína de andamiaje involucrada en la vía de señalización de la vía de integridad de pared celular (CWI) (van Drogen et al., 2001), surgió la posibilidad de que la MAPK Slt2/Mpk1 estuviera involucrada en la activación de HOG, ya como dijimos más arriba observamos una correlación entre la activación de ambas vías.

Efectivamente la cepa $\Delta slt2/mpk1$ mostró un fuerte fenotipo de pérdida de activación de la vía HOG por la vía PR (figura R19a y ver también Figura R28a). Esto se observó tanto a nivel de transcripción como de activación por fosforilación dual Hog1pp. A diferencia de las mutantes $\Delta pea2$ y $\Delta spa2$, estas células sí crecen con la morfología "shmoo", de modo que se podría decir que no alcanzaría tener la morfología "shmoo" para activar la vía HOG. Por lo tanto, Slt2/Mpk1 parece estar río abajo del polarisoma o bien al mismo nivel.

4.7. Correlación entre activación de las vías PR y HOG a nivel de células individuales.

4.7.1. A nivel de células individuales se observa mucha variabilidad en la activación de HOG.

Varios de los experimentos anteriores sugieren una causalidad entre la activación de la vía PR y la de HOG. Decidimos analizar ahora la activación de HOG mediada por feromona a nivel de células individuales. Una forma de estudiar la correlación de las respuestas de las vías PR y HOG se puede llevar a cabo graficando, para cada célula individual, la respuesta de los reporteros P_{STL1}-YFP y P_{PRM1}-mCherry usando estas variables en los ejes cartesianos x-y (ver Figura R20). Si existiera una buena correlación se observaría que una dada célula con respuesta baja del reportero *PRM1* también presentaría una respuesta baja de *STL1*, y lo mismo para respuestas más intensas, una dada célula con altos niveles *PRM1* debería tener a su vez altos niveles de *STL1*. Al graficar muchas células se observaría una nube de puntos, a la que se podría ajustar una función con pendiente positiva y poca dispersión (Colman-Lerner et al., 2005). Esto es lo que se ve al analizar las respuestas entre la vía PR y constitutiva mirando el reportero BMH2 (Colman-Lerner et al., 2005). Sin embargo al observar los reporteros de las vías PR y HOG no observamos una buena correlación en las células individuales (Figura R20). Se puede ver que la respuesta del reportero de actividad transcripcional dependiente de la vía HOG es muy variable, véase la dispersión en el eje y (P_{STL1} -YFP). Como se ve en Figura R20b y c hay células con una misma respuesta transcripcional de P_{PRM1} -mCherry que presentan alta transcripción dependiente de *STL1* (célula 1) y otras contrariamente bajos niveles del mismo reportero de la vía de HOG (célula 2). Notablemente ambas células tienen niveles similares del reportero constitutivo BMH2 (Figura R20c). Un problema al analizar este experimento con esta estrategia resulta de que la fluorescencia dependiente de la vía de HOG es diferente en las distintas células antes de estimularlas con feromona (ver sección siguiente).





Figura R20. Activación de la vía de HOG mediada por feromona en células individuales. Alta variabilidad entre células.

Células salvajes (LD3342), crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1 M (o sin sorbitol en b, puntos azules) y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μM).

a y b, arriba) Esquema del experimento. a y b, abajo) Gráfico de dispersión. Eje y. Respuesta transcripcional de la vía HOG, fluorescencia total del reportero P_{STL1}-YFP dividida por área. Eje x. Respuesta transcripcional de la vía PR, fluorescencia total del reportero P_{PRM1}-mCherry dividida por área. Cada punto representa una célula individual. A los 240 minutos todas las células están respondiendo a feromona pero muchas no muestran respuesta a HOG. b) La activación de HOG mediada por feromona requiere alta osmolaridad. Mismo experimento mostrado en (a) pero se incluye la respuesta de células en medio SC sin el agregado de alta osmolaridad.

c) Fotomontaje de células mostradas en b. Canal de transmisión y fluorescencia de los reporteros de la vía de PR (mCherry), HOG (YFP) y BMH2 (CFP). Superposición de canales de fluorescencia de YFP (HOG) y mCherry (PR).

4.7.2. El estado estacionario de activación de la vía de HOG muestra mucha variabilidad.

Como analizamos antes, las células adaptadas a distintas osmolaridades durante 16 horas activan la vía de HOG a nivel de P_{STL1}-YFP y alcanzan una cierta respuesta en estado estacionario *-Re.e.-* a nivel poblacional (Figura R3a). Al analizar con más detalle esta respuesta mirando el comportamiento de las células individuales vemos una gran variabilidad en su respuesta (Figura R21 b-d). En la Figura R21 b-d se puede comparar la variabilidad en las intensidades de fluorescencia debida a P_{STL1}-YFP y P_{BMH2}-CFP.



Figura R21. Estado estacionario de activación de la vía de HOG en células adaptadas a distintas osmolaridades. El estado estacionario de activación de las distintas células es muy variable.

Células salvajes (LD3342), crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol a distintas concentraciones.

a) Transcripción de la vía HOG. Cepa LD3342, promedio de transcripción total de *P_{STL1}*-YFP por célula en estado estacionario (*Re.e.*) (ver Figura R3). Las barras de error representan s.e.m.

b) Fotomontajes de células de a. Arriba) Se muestra la fluorescencia del reportero *P_{STL1}*-YFP en verde y *P_{BMH2}*-CFP en azul, a 5 osmolaridades. Abajo) se muestran los fotomontajes de las células en SC + sorbitol 1.2 M más grandes, para comparar la variabilidad de la fluorescencia producida por los reporteros STL1 (verde) y BMH2 (azul). También se muestra la superposición de la fluorescencia de ambos canales a la derecha.

c) Distribuciones de frecuencia relativa de células (n/total) vs. respuesta transcripcional de la vía constitutiva normalizada (fluorescencia total del reportero P_{BMH2}-CFP dividida por área normalizada a media poblacional) a distintas osmolaridades (n=354 para todas las osmolaridades).

d) Distribuciones de frecuencia relativa de células (n/total) vs. respuesta transcripcional de la vía constitutiva normalizada (fluorescencia total del reportero P_{STL1} -YFP dividida por área normalizada a media poblacional) a distintas osmolaridades (n=354 para todas las osmolaridades). d, inserto) Variabilidad. Coeficiente de Variación=CV=SD/media de fluorescencia total del reportero P_{STL1} -YFP (cuadrados violetas) o P_{BMH2} -CFP (círculos negros) dividida por área.

Al mirar las distribuciones de fluorescencia de BMH2 a distintas osmolaridades en la Figura R20c vemos que las mismas no varían entre sí (para ver las respuestas promedio ver Figura R3). El coeficiente de variación (desviación estándar dividido por la media de la respuesta, inserto en R21d) es constante. En cambio en el caso de la respuesta de P_{STL1}-YFP, a medida que el promedio de la misma comienza a subir a partir de 0.8 M sorbitol se empieza a ver cada vez más variabilidad en las distribuciones de fluorescencia normalizadas (Figura R20d). Este aumento de la variabilidad en los niveles de fluorescencia de P_{STL1}-YFP podría deberse a una estocasticidad en alguno de los pasos regulatorios que desembocan finalmente en la transcripción del reportero STL1, ya sea a nivel de la fosforilación de Hog1, translocación al núcleo o interacción con la cromatina. Recientemente Pelet y col. (Pelet et al., 2011) demostraron que cuando se aplica un shock hiperosmótico de una osmolaridad baja, cercana a 0.1 M NaCl (0.2 Osmolar) el reportero STL1 muestra una respuesta bimodal. Algunas células activan la transcripción y otras no. Esta activación está controlada a nivel de la accesibilidad de la cromatina. Como vimos en la Figura R3h el grado de fosforilación alcanzado por Hog1 en estado estacionario en medio SC más 1 M y 1.5 M sorbitol es similar al que se observa en un shock hiperosmótico de 0.1 Osmolar. Por esto, podríamos especular que al estar en el mismo rango de activación de Ho1pp la variabilidad en los niveles de fluorescencia de P_{STL1-}YFP estaría relacionada con una estocasticidad en la expresión de STL1 a nivel de la transcripción (Pelet et al., 2011).

De cualquier modo, la variabilidad en los niveles iniciales de fluorescencia de P_{STL1} -YFP hacen que sea imposible analizar los comportamientos de células individuales a nivel de la correlación entre la respuesta de la vía PR y HOG utilizando solamente la información de un tiempo fijo post estimulación con α factor. Para abordar esta pregunta de otra manera decidimos analizar la activación de HOG mediada por PR, pero esta vez siguiendo a las mismas células a lo largo del tiempo para conocer su comportamiento de principio a fin. 4.7.3. La activación de la vía HOG mediada por la vía PR ocurre en forma de picos transcripcionales en periodos de tiempo discretos.

4.7.3.1. La activación de HOG mediada por la vía PR es muy variable. El agrupamiento jerárquico de las respuestas de HOG de células individuales permite analizar comportamientos grupales similares.

Previamente vimos que la estimulación con α factor de células preadaptadas a alta osmolaridad activa la vía de HOG. En la Figura R12 vimos que la respuesta transcripcional promedio del reportero P_{STL1}-YFP en la población de células muestra un aumento sostenido en el tiempo similar al del reportero P_{PRM1}-mCherry. Sin embargo al mirar las células individuales nos llevamos una sorpresa, pues a diferencia de la vía de feromona la activación de la vía HOG es pulsátil, es decir ocurre en ventanas temporales discretas (figura R22a medio). La tasa de transcripción mediada por la vía PR es constante y no se detiene, en cambio la de la vía HOG es muy variable y comienza a distintos tiempos en las distintas células (Figura R22). La misma además puede activarse, luego detenerse y después volver a activarse o permanecer detenida (Figura R22 a y b izquierda).



Figura R22. Activación de la vía de HOG mediada por feromona en células individuales. Hay picos transcripcionales de P_{STL1}-YFP descoordinados.

Células salvajes (LD3342), crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M).

a, arriba) Esquema del experimento. a, medio) Respuesta transcripcional de la vía HOG normalizada, en células individuales, fluorescencia total del reportero P_{STL1}-YFP dividida por área. a, abajo) Respuesta transcripcional de la vía PR normalizada, fluorescencia total del reportero P_{PRM1}-mCherry dividida por área. Cada traza representa una célula individual. La normalización es al valor máximo y mínimo para cada célula ([FP]t-[FP]máx./[FP]máx.-[FP]mín.]).

b) Agrupamiento jerárquico de células individuales en base a respuesta transcripcional de HOG. Cada fila representa una célula individual. Cada columna representa un intervalo de tiempo. La variable que se grafica es Δ YFP/ Δ t. Es decir la diferencia de la intensidad de fluorescencia de un tiempo (t) menos la del tiempo anterior (t-1) dividida por el intervalo de tiempo Δ t. Los valores de Δ YFP/ Δ t se representan en una escala de colores donde blanco es cero, rojo es un valor positivo y azul uno negativo, en tanto que cuanto más intenso sea el color más alto será el valor de Δ YFP. Izquierda) Patrón de expresión de las células sin ordenar sin agrupar. Derecha) Patrón de expresión de las células luego de aplicar el algoritmo de agrupamiento jerárquico (ver Materiales y métodos). Se señalan 5 grupos (verde) y 7 subgrupos (celeste) que se grafican en c y d.

c y d) Respuesta transcripcional de la vía HOG promedio de grupos y subgrupos obtenidos por agrupamiento jerárquico. Promedio de fluorescencia total del reportero P_{STL1}-YFP dividida por área por célula. Los polígonos semitransparentes de colores representan el s.e.m. de cada grupo o subgrupo.

Para entender mejor el patrón de expresión dependiente de la vía de HOG decidimos llevar a cabo un agrupamiento jerárquico de las células individuales en base a su patrón de expresión del reportero P_{STL1} -YFP. Decidimos usar como variable para el ordenamiento jerárquico la diferencia de intensidad de fluorescencia de P_{STL1} -YFP entre un tiempo y el anterior (Figura R22b). Usamos esta variable ya que decidimos ordenar las células en base al momento en que ocurren los picos de activación.

Cabe señalar una serie de observaciones para comprender la estrategia que usamos al agrupar las células. Como se dijo antes, en estado estacionario las células adaptadas a SC más alta osmolaridad presentan niveles iniciales de fluorescencia dependiente de HOG muy variables. Segundo, en las películas observamos que, luego de estimular con feromona, las células con niveles de fluorescencia más elevados en el tiempo inicial no necesariamente terminaron el experimento con una fluorescencia mayor. Esta diferencia es el producto de dos factores. En primer lugar, los picos de activación pueden ser más o menos intensos alcanzándose distintos ordenes de acumulación de fluorescencia para cada pico de activación transcripcional. En segundo lugar, algunas células presentan más picos de activación que otras. Finalmente, el número de activaciones y el grado de activación no correlacionan con los niveles iniciales de fluorescencia. Así por ejemplo, una célula que empieza con valores bajos de P_{STLI}-YFP a tiempo cero puede activar más intensamente, o en repetidas oportunidades la transcripción de la vía HOG y terminar con altos valores de fluorescencia.

En la Figura R22b, puede verse que luego de realizar el agrupamiento jerárquico se puede observar una línea roja oblicua que va de abajo hacia arriba y de izquierda a derecha. Esto es, las células se han ordenado en base a un pulso de activación de una ventana temporal de aproximadamente 80 minutos. Fuera de este patrón general se sigue viendo mucha variabilidad en la expresión de P_{STL1}-YFP. Seguidamente, observamos el comportamiento de algunos de los grupos que se generaron en el ordenamiento. Graficamos la respuesta media para la intensidad de fluorescencia del reportero de HOG (Figura R22c) y en este caso se ve claramente que las respuestas medias son muy diferentes entre los grupos y no presentan un aumento sostenido constante como la respuesta de la vía PR. Notablemente se ven grupos con más de una activación (grupo 2, 4 y 5). Al ver el grupo 5 vemos que el mismo tiene muchos comportamientos diferentes. Si se miran las medias de algunos subgrupos dentro de este grupo podemos ver de nuevo que hay algunos con dos activaciones (subgrupos 1, 4, 5 y 7) y otros que presentan solo una activación a tiempos largos: subgrupo 2 cerca de los 180 minutos y subgrupo 3 alrededor de los 240 min.

4.7.3.2. El primer pico de activación transcripcional de la vía HOG ocurre antes, cuando las células están en G1.

Analizando con más en detalle lo que ocurre con los grupos 1 y 2, vimos que si bien el método de agrupamiento jerárquico se llevó a cabo en base a la respuesta de HOG, estos grupos fueron separados también en cuanto a su inicio de activación de la respuesta transcripcional de la vía PR (reportero P_{PRM1}-mCherry) (Figura R23 b). El grupo 1 empieza a responder a la vía PR antes que el grupo 2 (alrededor de 40 minutos antes). Al mirar las fotografías de transmisión de las células individuales, vemos que las células agrupadas en el grupo 1 ya estaban en G1 (o en algunos casos entraron a G1 en el segundo tiempo del experimento) en tanto que las células del grupo 2 se encontraban en otras etapas del ciclo, como G2 o S, o bien eran una gema que luego se convirtió en una célula capaz de responder en G1. Esto se puede comprobar observando su morfología a lo largo del tiempo. Las células en las fases G2 o S se observaran gemando en las fotografías (Figura R23d).

4.7.3.3. Los picos de activación transcripcional de la vía HOG correlacionan con la morfología "shmoo" en células individuales. No todos los "shmoos" producen activación de HOG.

Es momento de decir que cuando las células de *S. cerevisiae* se exponen a α factor en dosis saturantes las mismas emiten múltiples proyecciones de apareamiento, observándose que las mismas emiten una proyección de apareamiento cada aproximadamente 90 minutos. Si bien no lo hemos cuantificado en detalle, hemos visto que el periodo de tiempo que transcurre entre proyección y proyección es mayor cuanto mayor es la osmolaridad a la cual están creciendo las células. En particular con sorbitol 1 M estas ocurren cada aproximadamente 120 minutos.

Al observar las cuantificaciones de las respuestas de HOG y PR en estas células individuales en R23d vemos que hay células que responden más de una vez a HOG tanto en el grupo 1 como en el grupo 2. Estos picos de activación siempre son precedidos por el comienzo de una proyección de apareamiento. En la Figura R24 vemos varios ejemplos de células activando HOG en distintos momentos y en R24f se muestra un esquema de lo que ocurre. En todas las células se observa que los picos de activación son precedidos por el inicio de un nuevo "shmoo", sin embargo no todos las proyecciones de apareamiento garantizan transcripción dependiente de HOG.



Figura R23. Activación de la vía de HOG mediada por feromona en células individuales. Hay picos transcripcionales de P_{STL1}-YFP descoordinados.

a) Mismo experimento que Figura R22. Se muestran solo los grupos 1 (azul) y 2 (rojo).

b y c) Respuesta transcripcional de la vía PR y HOG de grupos 1 (azul) y 2 (rojo). Promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{PRM1}-mCherry y P_{STL1}-YFP. Los polígonos semitransparentes de colores representan el s.e.m.

d) Respuestas de células individuales de grupo 1 y 2, señalando el momento de: entrada a G1 (verde), emisión de proyecciones de apareamiento (azul), y respuestas transcripcionales esquemáticas de PR (rojo) y HOG (negro). A la derecha se muestra la cuantificación de las respuestas de PR y HOG y los momentos en los que ocurren las proyecciones de apareamiento ("shmoos").

Adicionalmente no observamos muchas células con tres activaciones de P_{STL1}-YFP, en tanto que, de las células que activaron la transcripción dos veces, el tiempo entre dos picos sucesivos más frecuente fue de entre 240 y 260 minutos (25% de las células). Indicando que lo más frecuente parece ser que las células con dos picos activarían P_{STL1}-YFP en el primer "shmoo", luego no lo activarían en el segundo "shmoo" y volverían a activarlo en el tercer "shmoo". Se debe tener en cuenta que esto solo señala la ventana temporal más frecuente entre dos activaciones (de más de 250 unidades de intensidad de fluorescencia de YFP) y no necesariamente nos habla de los niveles de fluorescencia totales alcanzados.

A su vez cabe mencionar que se ha reportado que la activación de Slt2/Mpk1 también es pulsátil y correlaciona muy bien con las proyecciones de apareamiento (Buehrer y Errede, 1997; Errede et al., 1995; Zarzov et al., 1996), de modo que creemos que los picos de activación de HOG correlacionarían con picos de actividad de Slt2/Mpk1 durante los momentos de crecimiento de las proyecciones de apareamiento.



Figura R24. Los picos de activación de la vía HOG mediada por la vía PR correlacionan con los momentos de crecimiento de los "shmoos". Hay estocasticidad en la activación transcripcional.
Mismo experimento que Figura R22. a-e) Se muestran ejemplos de células individuales que activan P_{STL1}-YFP luego del 1er "shmoo" (a), 2do "shmoo" (b) únicamente o bien dos veces (d y e) o bien 3 veces (c).

f) Esquema señalando modelo propuesto de activación. Células adaptadas a SC + sorbitol 1 M alcanzan un estado estacionario de respuesta de HOG (*Re.e.*). Luego, al estimular con α factor constante (α 2) se observa una respuesta de la vía PR constante (*R*2, línea roja, abajo) y se observan activaciones de la vía de HOG en los momentos en los que ocurren las proyecciones de apareamiento ("shmoos").

4.7.4. La activación de HOG mediada por feromona involucra una entrada al núcleo de Hog1-Venus cuando las células presentan morfología "shmoo".

A continuación nos propusimos analizar qué ocurría a nivel de la localización subcelular de Hog1 durante la activación mediada por feromona. Para esto utilizamos la cepa SPy69 que se usó en la sección 4.5.2. La misma como ya se describió expresa Hog1-Venus y además la histona Hta2-CFP (figura R3). De modo similar al experimento de la figura R17, crecimos las células en medio SC más sorbitol 1 M y estimulamos con una dosis saturante de α factor pero ahora fotografiamos a las mismas células a lo largo del tiempo. En este experimento pudimos ver que la entrada de Hog1-Venus al núcleo ocurrió luego de que las células ya estaban polarizadas y presentaban morfología "shmoo", en algún momento durante el crecimiento de la proyección de apareamiento (ver fotomontajes de canal de transmisión en la Figura R25c y d). También vimos que el cambio de localización de Hog1-Venus inducido por la vía PR es muy dinámico. Hog1-Venus entra al núcleo y puede permanecer en el mismo durante unos 5-10 minutos o permanecer en el mismo por más tiempo. Hacen falta más experimentos para determinar la variabilidad poblacional en cuanto a la entrada de Hog1-Venus al núcleo y también para realizar este mismo análisis en experimentos más largos donde las células tengan múltiples proyecciones de apareamiento. Como se describió en el trabajo de Pelet y col. frente a un shock hiperosmótico bajo 0.1 M NaCl la entrada de Hog1-Venus al núcleo es muy homogénea a nivel poblacional pero la transcripción dependiente de *STL1* es muy variable (Pelet et al., 2011).



Figura R25. Localización nuclear de Hog1-Venus (cepa SPy69). La entrada de Hog1-Venus al núcleo correlaciona con la morfología "shmoo". Células, crecidas por 15-20 hs. medio SC más el agregado de Sorbitol y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μM).

a, arriba) Esquema del experimento. Las células dibujadas señalan como cambia la intensidad de fluorescencia de Hog1-Venus en el núcleo y citoplasma (ver Figura R17a).

b) Cuantificación de intensidad de fluorescencia nuclear de Hog1-Venus de células seguidas a lo largo del tiempo. Se muestra un grupo de células donde se observa translocación de Hog1-Venus al núcleo aproximadamente al mismo tiempo. Cada traza corresponde a una célula distinta. La traza roja más intensa representa el promedio del grupo y el polígono semitransparente rojo representa el s.e.m.

c y d) Ejemplo de dos células individuales. Izquierda) Fotomontajes canal de fluorescencia YFP, mostrando la superposición de los canales de fluorescencia de Hog1-Venus (en verde) y Hta2-CFP (en rojo). Medio) Fotomontaje de canal de transmisión mostrando la morfología celular. Derecha) Cuantificación de intensidad de fluorescencia nuclear de Hog1-Venus.

5."Hipótesis de desbalance osmótico".

Hasta aquí sabemos que la vía PR es capaz de activar a la vía HOG luego de que las células están adaptadas a alta osmolaridad, también sabemos que son necesarias la MAPK de la vía CWI y componentes del polarisoma. A su vez identificamos detalles referentes al mecanismo de activación de la vía HOG. Ahora nos interesó indagar más sobre cómo se alcanza finalmente la activación de HOG luego de la activación de Slt2/Mpk1 y el polarisoma. Dado que Slt2/Mpk1 y Hog1 se activan habitualmente por estímulos fisicoquímicos opuestos, en particular por ejemplo: shocks hipo- o hiper- osmóticos, donde la respuesta fisiológica implica disminuir los niveles de glicerol en el primer caso y aumentarlos en el segundo, propusimos una *hipótesis* donde la vía PR al activar a Slt2/Mpk1 generaría un *desbalance osmótico*. ¿Cómo? Supusimos que la activación de Slt2/Mpk1 podría estar causando una apertura del canal de glicerol Fps1, luego de lo cual habría un escape de glicerol hacía el exterior, debido al gradiente químico (no hay glicerol afuera) del mismo. La perdida de glicerol sería acompañada de una salida de agua, produciendo una disminución de la presión de turgencia sobre la pared celular que finalmente activaría a la vía de HOG (figura R26).



Figura R26. Hipótesis del desbalance osmótico. La respuesta de la vía PR activa a HOG interfiriendo con su regulación homeostática a nivel del control de la concentración de glicerol. La estimulación con feromona provocaría la apertura de la acuagliceroporina Fps1.

a) Diagrama de activaciones sucesivas mediadas por α factor. E!: exportación de glicerol vía acuagliceroporina Fps1, S!: flujo metabólico hacia síntesis de glicerol (producto de disminución de degradación y aumento de síntesis de DHAP), P τ : Presión de turgencia. La flecha de Slt2/Mpk1 hacia la exportación de glicerol señala una estimulación de la exportación y es punteada ya que es especulativa. b) Diagrama de activaciones sucesivas mediadas por α factor más esquemático.

5.1. Contraste de la hipótesis de desbalance osmótico: la vía HOG se activa debido a que hay un eflujo de glicerol inducido por la vía PR.

Decidimos testear la hipótesis de que la activación de HOG mediada por la vía PR se debería a un desbalance osmótico inducido durante la respuesta de apareamiento. Se hicieron varios experimentos. En primer lugar testeamos qué ocurría si en lugar de adaptar las células a una alta osmolaridad externa usando sorbitol o NaCl como osmolito usábamos el osmolito intracelular mayoritario de las levaduras, glicerol. Si nuestra hipótesis fuera correcta, la apertura de Fps1 mediada por la vía PR en estas condiciones no generaría un desbalance osmótico, ya que al haber mucha concentración de glicerol externo la diferencia en el gradiente químico del mismo sería mínima. Efectivamente al adaptar a las células a glicerol 1 M no se observó activación de la vía de HOG mediada por la vía de PR (Figura R27a y b). Como habíamos visto en R3 la respuesta de HOG en estado estacionario de las células adaptadas a glicerol 1 M es igual a la respuesta del sistema previa al shock osmótico (*Re.e. = Rp.s.*). En este experimento vemos además que la respuesta de HOG luego de estimular con α factor células adaptadas a glicerol 1 M, tampoco aumenta (*Re.e.' = Re.e. = Rp.s.*). Véase más adelante también, que la fosforilación de Hog1pp es casi despreciable si se usa glicerol 1 M en lugar de sorbitol 1 M y luego se estimula con feromona durante 260 minutos (Figura R28a) a pesar de que el reportero transcripcional P_{PRM1}-mCherry se activa aun más en glicerol 1 M que en sorbitol 1 M (Figura R28d y también Figura R5b).

En segundo lugar, medimos la concentración de glicerol extracelular producido por células que habían sido preadaptadas creciéndolas en un medio con alta osmolaridad y luego estimuladas con α factor (Figura R27c). Pudimos ver que la cantidad de glicerol extracelular producido por célula aumentó significativamente comparado con las células no tratadas con feromona. Como control en este experimento también medimos la cantidad de glicerol liberado por las células al someterlas a un shock hipo-osmótico (ver materiales y métodos). En estas condiciones las células deberían liberar violentamente la mayoría de su glicerol a través del canal Fps1, como se describió antes en la introducción. El valor de glicerol medido luego del shock hipo-osmótico fue de 166 ng/µL, que correspondería a una cantidad de 130 pmoles/célula. Significativamente menor al valor de glicerol liberado durante la estimulación con feromona (Figura R27c). Además, si bien se ha descripto que hay un porcentaje elevado de células que muere durante la respuesta a feromona (Patterson et al., 2010), el aumento de glicerol en el medio extracelular que medimos es muy elevado. De hecho, la cantidad teórica de glicerol liberado que se obtendría si murieran todas las células del cultivo simultáneamente, considerando un volumen celular de 80 femtolitros (sobreestimado (Uchida et al., 2011)) y una osmolaridad interna de glicerol de 1.5 M (sobreestimando (Oliveira y Lucas, 2004)) es de 170 $ng/\mu L$ (considerando un valor de células de 1.5.10⁷ cel./mL y 50 mL de cultivo, ver figura M8 en materiales y métodos). Muy similar al valor que medimos luego del shock hipo osmótico.

En tercer lugar, deletamos el gen *FPS1* que codifica para el canal de glicerol (Figura R27d). En esta cepa el tratamiento con α factor no indujo el reportero de la vía de HOG en células adaptadas a SC más 1 M sorbitol. La falta de inducción se debería a que en esta cepa no habría pérdida de glicerol, confirmando que la perdida de este osmolito ocurriría a través de este canal y no por ejemplo por un aumento de la permeabilidad al glicerol a nivel de cambios en la composición lipídica de la membrana plasmática (Figura R27d).

En cuarto lugar, testeamos que ocurría al delecionar los genes *RGC1 y ASK10/RGC2* que codifican para proteínas involucradas en la regulación positiva del canal de glicerol Fps1 (*Beese et al., 2009*). Estos genes parálogos, han sido descriptos como redundantes para algunas funciones y las cepas $\Delta rgc1 \Delta ask10$ se ha reportado que acumulan glicerol intracelular y que tienen una hiperactivación de la vía de CWI (más fosforilación dual de Slt2/Mpk1), que se traduce en una pared celular más robusta (más resistente a zimoliasa). Esto último sería una consecuencia de la acumulación de glicerol en esta cepa doble mutante, que aumentaría la presión de turgencia y estimularía la vía CWI. Todos estos fenotipos son iguales a los observados en las cepas $\Delta fps1$ y por esta razón se describe a los genes *RGC1 y ASK10/RGC2* como reguladores positivos de Fps1. Como esperábamos vimos un bloqueo de la activación de la vía de HOG mediada por α factor en la cepa $\Delta rgc1 \Delta ask10$ (Figura 27d). Sorpresivamente vimos que es suficiente delecionar ya sea uno u otro gen ($\Delta rgc1 o \Delta ask10$) para que haya bloqueo de la activación de HOG mediada por PR (Figura 27d y e). Por el momento no sabemos a que nivel de la ruta de activaciones estarían actuando los reguladores Rgc1 y Ask10/Rgc2 (Figura R27e).



Figura R27. Contraste de hipótesis del desbalance osmótico: La vía HOG se activa debido a que hay un eflujo de glicerol inducido por la vía PR.

a) Reducción del gradiente químico de glicerol. Células salvajes (LD3342), crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más glicerol 1 M o bien sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M).

a, arriba) Esquema del experimento. a, abajo) Respuesta transcripcional de la vía HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STL1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

b) Esquema representando las dinámicas de los estímulos (HOG: violeta, PR: rojo) y respuestas (HOG: violeta para sorbitol y gris para glicerol, PR: rojo). R representa la respuesta del sistema como tasa transcripcional. Arriba) Esquema del experimento. *Estímulos*. Vía HOG) *O1*: SC *y O2*: SC + sorbitol 1M o glicerol 1M -la osmolaridad total es constante. Vía PR) $\alpha 1 y \alpha 2$: concentración de α factor 1 y 2 (α 1=0). *Respuestas*. Vía HOG) En violeta se muestra la respuesta a sorbitol y en gris (línea punteada) la respuesta a glicerol. La respuesta en estado estacionario, *Re.e.,* frente a sorbitol es mayor a la previa al shock, *Rp.s.,* mientras que la de las células adaptadas a glicerol es igual. La respuesta luego de estimular con feromona aumenta en el caso de las células en presencia de sorbitol 1 M. Contrariamente *Re.e.* es constante en las células creciendo en un medio con glicerol 1 M. Vía PR) En línea llena: respuesta a sorbitol (R2) y en línea punteada: respuesta a glicerol (R3).

c) Medición de glicerol extracelular. Células salvajes (LD3342), crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M) o no estimuladas (control). Las células estimuladas con feromona liberan glicerol al medio extracelular. Las barras de error representan el desvio estándar calculado a partir de tres experimentos independientes. Test Student (*) p<0.05, (**) p<0.005.

d) La activación de la vía HOG mediada por feromona desaparece en cepas mutantes que regulan la apertura del canal de glicerol o en la mutante del canal Fps1. Células salvajes (LD3342), Δ fps1 (RB3396a), Δ rgc1 (RB3710), Δ ask10 (RB3717), Δ rgc1 Δ ask10 (RB3722) crecidas por 16 hs. en medio SC líquido más sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 µM).

d, arriba) Esquema del experimento. d, abajo) Respuesta transcripcional de la vía HOG, promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STLI}-YFP, en las mutantes que se indican. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

e) Esquema de activaciones mediadas por feromona. Los reguladores positivos de Fps1 son necesarios para la activación de HOG mediada por feromona, más no conocemos a que nivel actúan (signos de pregunta).

5.2. Contraste del modelo. Análisis de la activación de las MAPK implicadas por ensayo de Western.

Para analizar mejor el mecanismo de activación de la vía HOG por la vía PR observamos otro nivel de activación, la fosforilación dual de las MAPK de cada vía, *vía PR*: Fus3 y Kss1, *vía HOG*: Hog1 *vía CWI*: Mpk1/Slt2. y en simultaneo analizamos la transcripción de los reporteros de la vía de PR (P_{PRM1}-mCherry), HOG (P_{STL1}-YFP) y la vía constitutiva BMH2 (P_{BMH2}-CFP) (figura R28).

En general vemos un buen correlato de lo que ocurre a nivel de la fosforilación de Hog1 y la activación del reportero P_{STLI} -YFP. *Primero, a nivel de la vía de PR* vemos que la cepa $\Delta fus3$ que activa muy poco la vía PR -ver Western donde no hay Fus3pp pero si hay Kss1pp (Figura R28c) y transcripción de P_{PRMI} -mCherry (Figura R28d)- y tampoco activa Hog1 (Figura R28a y b) . *Segundo, a nivel de la vía de HOG* vemos que Hog1 no está fosforilada en la cepa $\Delta ssk1$ y su fosforilación está reducida en la $\Delta ssk2$, mientras que la cepa $\Delta sho1$ se fosforila como la salvaje. *Tercero, a nivel de la vía de CWI* vemos que la cepa $\Delta slt2/mpk1$ que no activa la vía CWI -ver Western donde no hay Slt2/Mpk1pp- tiene un fuerte efecto en la falta de activación de Hog1pp. *Cuarto,* en cuanto a los componentes del complejo multiprotéico, "polarisoma", vemos que hay un nivel basal de Hog1pp más alto (esto también lo vimos en experimentos de transcripción) pero que el cambio en el grado de fosforilación de *Hog1* por el tratamiento con feromona es muy bajo. *Quinto,* en cuanto a los componentes implicados en regulación del flujo de glicerol, vemos que las células crecidas en glicerol 1 M no activan Hog1 prácticamente (junto con $\Delta ssk1 y \Delta slt2/mpk1$ son los de fenotipo de bloqueo más fuerte). Las cepas $\Delta fps1$, $\Delta rgc1 \Delta ask10$ se comportan todas muy parecido. Tienen disminuida la activación de la vía de HOG notablemente a nivel de la fosforilación de Hog1, pero parecería que el efecto sobre la transcripción es más intenso.

a Vía de respuesta de HOG - Hog1pp



Figura R28. Análisis de la activación de la vía de HOG por la vía PR en todas las mutantes estudiadas en el trabajo. Células salvajes y mutantes crecidas por 15-20 hs. en medio SC más sorbitol 1 M (o bien glicerol 1 M) y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M).

a) Fosforilación dual de Hog1 en tiempo 0 y 260 min. post estimulación con α factor. b) Respuesta transcripcional de dependiente de la vía de HOG (P_{S7L1}-FP). c) Fosforilación dual de Slt2/Mpk1, Kss1 y Fus3. d) Respuesta transcripcional

dependiente de la vía de PR (P_{PRM1}-mCherry). Cepas usadas: salvaje (LD3342), Δ *sho1* (RB3703), Δ *ssk1* (RB3382a), Δ *ssk2* (RB3642) y Δ *fus3* (RB3712), Δ *fps1* (RB3396a), Δ *rgc1* (RB3710), Δ *ask10* (RB3717) y Δ *rgc1* Δ *ask10* (RB3722), Δ *pea2* (RB3838), Δ *spa2* (RB3837) y Δ *slt2* (RB3376a).

5.3. Todas las mutantes estudiadas son capaces de activar al reportero transcripcional de HOG luego de un shock hiperosmótico agudo.

A lo largo de la tesis hemos analizado una serie de mutantes que presentan defectos en la activación de la vía de HOG mediada por feromona. A continuación se muestra un experimento control para demostrar que los defectos en la activación de la vía de HOG en estas mutantes son específicos del estímulo que estamos estudiando -activación mediada por α factor- y no se deben a una falta de activación frente a estímulo clásico de shock hiperosmótico o a alguna falla en el reportero transcripcional de *STL1*. En la figura R29 estudiamos la dinámica de la respuesta del reportero transcripcional de HOG dependiente del promotor *STL1* frente a un shock de cloruro de sodio 0.4 M. Todas las cepas mostraron activación del reportero. Notablemente en las cepas $\Delta fps1$ y $\Delta rgc1 \Delta ask10$ no observamos un pico de respuesta máxima de activación de HOG. Esto podría deberse a que estas cepas presentan altos niveles de glicerol intracelular (Beese et al., 2009; Levin, 2011) y de este modo el shock osmótico -definido como la diferencia entre la osmolaridad externa menos la interna- que experimentarían sería menor. Adicionalmente no observamos activación del reportero constitutivo BMH2 en ninguna de las cepas estudiadas (Figura R29e).



Figura R29. Respuesta a shock hiperosmótico agudo en todas las mutantes analizadas. Se crecieron células salvajes y mutantes durante 16 horas en medio SC. Al día siguiente las células fueron estimuladas con NaCl hasta una osmolaridad final de 0.4 M.

a-d). Respuesta transcripcional dependiente de la vía HOG.

a. Cepas "knock out" de genes de la vía de HOG y PR $\Delta fus3$. Cepas: Salvaje (LD3342), $\Delta sho1$ (RB3703), $\Delta ssk1$ (RB3882a), $\Delta ssk2$ (RB3642) y $\Delta fus3$ (RB3712).

b. Cepas "knock out" de genes involucrados en la homeostasis de glicerol. Cepas: Salvaje (LD3342), $\Delta fps1$ (RB3396a), $\Delta rgc1$ (RB3710), $\Delta ask10$ (RB3717) y $\Delta rgc1 \Delta ask10$ (RB3722).

c&d. Cepas "knock out" de genes de la vía de CWI y del polarisoma. Cepas: Salvaje (LD3342 o bien RB3406), $\Delta pea2$ (RB3838), $\Delta spa2$ (RB3837) y $\Delta slt2$ (RB3376a).

e. Respuesta transcripcional del reportero P_{BMH2}-CFP en las mismas células de los experimentos a hasta d (control.

a-e). Los puntos representan la fluorescencia promedio por célula de cada reportero. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

6. Consecuencias fisiológicas que emergen del sistema. La activación de la vía de HOG mediada por feromona permite a las mismas una mayor capacidad de osmoadaptación.

De acuerdo a nuestro modelo la activación de la vía de HOG mediada por la vía de PR traería aparejada cambios fisiológicos intracelulares que podrían afectar la capacidad de respuesta de las células al ser sometidas a nuevos cambios osmóticos externos. Esto es, la estimulación con α factor de células creciendo en un ambiente con alta osmolaridad provoca una perdida de glicerol periódica que activa la vía de HOG, luego esta activación aumentaría las tasa de síntesis de glicerol ya que se transcribirían los genes y se activarían las rutas metabólicas necesarias para una compensación fisiológica frente a este desbalance osmótico (Figura R26a). Cabe aclarar que, si bien solo medimos la liberación de glicerol y no los niveles intracelulares del mismo, es razonable proponer que las células deberían aumentar su tasa de síntesis ya que de otro modo las mismas no podrían mantener la turgencia celular y crecer. Alternativamente podría especularse que las células podrían acumular algún otro osmolito como trehalosa reemplazando al glicerol. Sin embargo esta posibilidad no sería compatible con los experimentos hechos utilizando glicerol en lugar de sorbitol o la falta de activación en la cepa "knock out" $\Delta fps1$. Si nuestra hipótesis fuera correcta, las células adaptadas a alta osmolaridad y estimuladas con α factor deberían presentar una alta tasa de síntesis de glicerol y una alta tasa de liberación del mismo, provocando conjuntamente una alta "tasa de recambio" comparadas con las no tratadas con feromona -baja "tasa de recambio"- (Figura R30a). Para testear este modelo llevamos a cabo un experimento de shock hiperosmótico y análisis de cambio volumétrico celular (Figura R30). Ya se ha dicho que cuando las células sufren un shock hiperosmótico se deshidratan y se encogen y que además esto provoca un cierre mecánico de los canales de glicerol Fps1 (Figura I8). La velocidad de recuperación frente a un shock hiperosmótico depende directamente de la tasa de síntesis de glicerol, que permite el reingreso de agua, de modo que la predicción sería que: células adaptadas creciendo en alta osmolaridad, tratadas con α factor (alta tasa de recambio de glicerol), recobrarán su volumen original más rápido, frente a un shock osmótico respecto a estas mismas células no tratadas α factor (baja tasa de recambio de glicerol) (Figura R30b, izquierda). Efectivamente esto es lo que se verifica al hacer este experimento. Las células con alto "turnover" (estimuladas con α factor) se recuperan al **doble** de la velocidad respecto de las de bajo "turnover" (no estimuladas) (Figura R30b, izquierda). A su vez hicimos este mismo experimento con la cepa "knock out" de la proteína reguladora Rgc1, donde previamente mostramos que la transcripción mediada por la vía HOG no se induce por la vía PR. En este caso no observamos diferencias entre las células tratadas y no tratadas con α factor (Figura R30b, izquierda).



Figura R30. La activación de HOG mediada por la vía PR mejora la osmoadaptación de las células frente a shocks osmóticos sucesivos. a-d) Experimentos de velocidad de recuperación de volumen.

a) Modelo. La activación de HOG mediada por feromona en células creciendo en alta osmolaridad provoca un estado de alta tasa de recambio de glicerol, alta tasa de pérdida y alta tasa de síntesis de glicerol, mientras que las células no estimuladas con feromona poseen un baja tasa de recambio de glicerol.

b, arriba) Esquema del experimento. Primero, las células son crecidas por 15-20 hs. en medio SC más sorbitol 1 M. Segundo, son estimuladas o no (control) α factor 1 μ M por 4 horas. Tercero, se somete a las células a un shock con 1 M NaCl y se analiza el cambio de volumen en el tiempo. b, abajo) Cuantificación de cambio de volumen de células de la cepa salvaje (LD3342) o $\Delta rgc1$ (RB3710), en las condiciones descriptas previamente. Las mutantes $\Delta rgc1$ no presentan mejor osmoadaptación luego de ser estimuladas con feromona. c) En tratamiento con α factor de células creciendo en medio SC sin el agregado de alta osmolaridad no mejora la capacidad de osmoadaptación de las células. c, arriba) Esquema del experimento. . Primero, las células son crecidas por 15-20 hs. en medio SC. Segundo, son estimuladas o no (control) α factor 1 μ M por 4 horas. Tercero, se somete a las células a un shock con 0.6 M NaCl y se analiza el cambio de volumen en el tiempo.

d) Cinética de recuperación de volumen en experimentos de shock hiperosmótico a distintas osmolaridades: 0.2, 0.4 y0.8 M NaCl.

c-d) Se grafica el volumen normalizado al volumen inicial promedio. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

Como control repetimos el mismo experimento pero preadaptando a las células a un medio sin osmolaridad elevada. En estas condiciones el tratamiento con α factor no activa la vía de HOG como vimos previamente. Consistentemente no observamos una mejor capacidad de osmoadaptación de las células tratadas con α factor (Figura R30c). Finalmente, es interesante que el tiempo de recuperación de volumen de las células respondiendo a feromona sometidas a un shock 1 M de NaCl en el experimento de R30b es equivalente al de un shock hiperosmótico de 0.4 M NaCl aplicado sobre células creciendo en medio SC (sin alta osmolaridad) -tiempo medio de recuperación del 50% del volumen original \approx 20 minutos- a pesar de que el shock fue mucho más intenso (1 M NaCl) (Figura R30d). Como se ve en R30d para un shock 0.8 M NaCl el tiempo medio de recuperación del 50% del volumen original es de \approx 45 minutos, de modo que también se concluye que las células adaptadas a alta osmolaridad en medio SC más sorbitol se recuperan más eficientemente a shocks hiperosmóticos futuros, como ya se había sugerido en trabajos previos (Mettetal et al., 2008; Mettetal et al., 2006; Muzzey et al., 2009) y que el tratamiento con α factor mejora aun más esta capacidad de osmoadaptación.

7. El shock térmico también es capaz de activar la vía de HOG.

7.1 Activación de la vía de HOG mediada por shock térmico. La activación de HOG es mayor cuanto mayor es el gradiente osmótico.

Teniendo en cuenta el modo de activación de la vía de HOG mediado por feromona nos propusimos analizar si era posible activar la respuesta de HOG adaptando las células a alta osmolaridad y luego estimulando las mismas con alta temperatura en vez de α factor (Figura R31). El shock térmico como ya se había dicho antes activa a la MAPK Slt2/Mpk1 de la vía CWI (Kamada et al., 1995).





a, izquierda) Esquema de activación mediada por α factor. La estimulación de células adaptadas a alta osmolaridad, con α factor activa la vía de HOG a través de la activación de la MAPK de la vía CWI, Slt2/Mpk1. a, derecha) ¿Será posible activar a HOG con otro estímulo capaz de activar la vía CWI como es el shock térmico?

b) Células crecidas por 15-20 hs. en medio SC más sorbitol a distintas osmolaridades (se muestran 0.2 hasta 0.7 M) y luego estimuladas con un shock térmico subiendo la temperatura de 30 ^oC a 37 ^oC.

b, arriba) Esquema del experimento. Abajo) Respuesta transcripcional de la vía HOG: promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{S7L1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

c) Esquema representando la dinámica de respuesta de HOG frente a los estímulos de: la vía HOG (violeta) y shock térmico (naranja). R representa la respuesta del sistema como tasa transcripcional. Arriba) Esquema del experimento. <u>Estímulos</u>. Vía HOG) *O1*: osmolaridad de medio SC, *O2 a O5*: SC + osmolito, a distintas concentraciones. Temperatura) 30 y 37 ⁰C. <u>Respuesta</u>. Vía HOG) *Rp.s.*: <u>r</u>espuesta <u>p</u>revia al <u>s</u>hock, *Rmáx.*: <u>r</u>espuesta <u>máx</u>ima, *Re.e.*: <u>r</u>espuesta en <u>e</u>stado <u>e</u>stacionario post adaptación al shock osmótico, *Re.e.*': respuesta en estado estacionario post activación por calor.

Al estimular con alta temperatura vimos que se activa la vía de HOG y que la activación es mayor cuanto mayor es la osmolaridad a la que fueron pre-adaptadas las células (Figura R31). Esta activación más

potente, proporcional a la osmolaridad externa puede deberse a un estado más alto de señalización de la vía de HOG a mayores osmolaridades o más probablemente al hecho de que, en un gradiente osmótico más elevado, una posible inducción de la salida de glicerol mediada por la vía CWI sería más elevada. Por ejemplo si Slt2/Mpk1 facilitara la apertura del canal Fps1 por un tiempo fijo determinado, la salida de glicerol sería mayor cuanto mayor fuera el gradiente osmótico. Es notable que la dinámica de activación de la vía de HOG en este caso es similar a la dinámica de activación de la vía de CWI. Fue reportado ya por Kamada y col. (Kamada et al., 1995) que Slt2/Mpk1 sube su grado de actividad a mayor temperatura y que permanece en un nuevo nivel de mayor actividad proporcional a la temperatura externa, es decir, no solo no hay "adaptación perfecta" (Muzzey et al., 2009) sino todo lo contario, sería un caso con adaptación cero ya que la respuesta en estado estacionario es igual a la respuesta máxima (Re.e. = Rmáx.) a nivel de la señalización de Mpk1/Slt2pp y esto impacta en una señalización sostenida hacia la vía de HOG que induce su reportero transcripcional. Además de esto, una diferencia entre esta activación y la mediada por feromona es que en este caso las células no se arrestan y por lo tanto la fluorescencia se diluye al dividirse las células.

7.2. Mecanismo de la activación de la vía de HOG mediada por shock térmico.

Sorbitol 1M Shock térmico (30 a 37 °C)

Lo siguiente que hicimos fue analizar las vías de señalización necesarias para la activación de HOG por alta temperatura (Figura R32).



Mutantes de genes la vía de CWI y del polarisoma.



Figura R32. Activación de la vía de HOG mediada por shock térmico. Dependencia de osmolaridad e identidad del osmolito y comportamiento de cepas "knock out" para genes necesarios en la activación mediada por feromona.

a-d, arriba) Esquema del experimento. a-d) Respuesta transcripcional de la vía HOG: promedio de fluorescencia total por célula del reportero *STL1*. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

a) Células salvajes (LD3342) crecidas por 15-20 hs. en medio SC más sorbitol 0.5 o 1 M y glicerol 1M y luego estimuladas con un shock térmico subiendo la temperatura de 30 °C a 37 °C.

b-d) Cepas salvaje (LD3342) y mutantes "knock out" crecidas por 15-20 hs. en medio SC más sorbitol 1 M luego estimuladas con un shock térmico subiendo la temperatura de 30 ^oC a 37 ^oC. a-d). Los puntos representan la fluorescencia promedio por célula de cada reportero. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

b) Cepas salvaje (LD3342) y mutantes "knock out" de genes de la vía de HOG: $\Delta ssk1$ (RB3382) y $\Delta ssk2$ (RB3642).

c) Cepas salvaje (LD3342) y mutantes "knock out" de genes involucrados en la homeostasis de glicerol: $\Delta rgc1$ (RB3710), $\Delta ask10$ (RB3717) y $\Delta rgc1 \Delta ask10$ (RB3722).

d) Cepas salvaje (LD3342) y mutantes "knock out" de genes de la vía de CWI y del polarisoma. d, izquierda) Salvaje (LD3342) y $\Delta slt2$ (RB3376a). d, medio) salvaje (LD3342) y $\Delta pea2$ (RB3838). d, derecha) salvaje (RB3406) y $\Delta spa2$ (RB3837).

Encontramos similitudes y diferencias entre la activación de HOG mediada por shock térmico y la mediada por la vía PR. *Primero*, la rama Sln1 de la vía HOG es necesaria, ya que las mutantes $\Delta ssk1 y \Delta ssk2$ no activaron la transcripción del reportero de la vía de HOG P_{STL1}-YFP (Figura R32b). *Segundo*, el gradiente químico de glicerol afecta la activación mediada por alta temperatura, ya que si las células son crecidas en alta osmolaridad pero se usa glicerol como osmolito, en lugar de sorbitol o NaCl, el shock térmico no activa HOG (Figura R32a en gris). Es decir que la activación de la vía de HOG sería por un desbalance osmótico generado por el shock térmico al igual que en el caso de la activación mediada por afactor. *Tercero*, la MAPK de la vía CWI Slt2/Mpk1 es indispensable para la activación de HOG por shock térmico (Figura R32d, izquierda). *Cuarto*, en el caso de la activación de Slt2/Mpk1 mediada por calor, se sabe que el polarisoma *no* es necesario, consistentemente vimos que los componentes de este complejo Spa2 y Pea2 no son necesarios para activar HOG (Figura R32d, medio y derecha). *Quinto*, notablemente, solo el regulador Ask10 es necesario para la activación de la vía de HOG sería con la cepa salvaje, así que su rol en la activación de la vía de HOG sería específico de la activación mediada por feromona.

8. La activación de la vía de HOG mediada por la vía PR y por shock térmico son aditivas. Rgc1 es componente específico de la activación mediada por la vía PR.

A continuación nos preguntamos si la activación de la vía HOG mediada por feromona y por alta temperatura eran aditivas (Figura R33). Como puede verse en la Figura R33a la coestimulación con feromona y alta temperatura induce niveles más elevados del reportero P_{STL1} -YFP que los niveles alcanzados por los estímulos aplicados en forma individual. Además estos niveles más elevados no se deben solo al arresto del ciclo celular inducidos como puede comprobarse al ver el comportamiento de la mutante $\Delta rgc1$ que solo es capaz de activar la vía de HOG mediante shock térmico (Figura R33b).

Concluimos de este experimento que las activaciones de HOG mediadas por feromona y shock térmico son aditivas y que el regulador Rgc1 es específico de la activación mediada por feromona.



Figura R33. Las activaciones de HOG mediadas por shock térmico y feromona son aditivas.

Células salvajes (LD3342) (a y b) o $\Delta rgc1$ (RB3710) (b) crecidas por 15-20 hs. en medio SC más sorbitol 1 M y luego estimuladas con α factor en dosis saturante (1 μ M) o shock térmico, subiendo la temperatura de 30 °C a 37 °C o bien ambos estímulos simultáneamente.

a y b, arriba) Esquema del experimento. a y b, abajo) Respuesta transcripcional de la vía HOG: promedio de fluorescencia total por célula del reportero P_{STL1}-YFP. Las barras de error representan el error estándar de la media (s.e.m.).

c) Las activaciones de HOG mediadas por shock térmico y feromona son aditivas. Esquema representando la dinámica de respuesta de HOG frente a los estímulos de: la vía HOG (violeta), vía PR (rojo) y shock térmico (naranja). R, representa la respuesta del sistema como tasa transcripcional. Arriba) Esquema del experimento. Estímulos. Vía HOG) *O1*: osmolaridad de medio SC, *O2*: osmolaridad de medio SC + sorbitol 1 M. Vía PR) α 1 y α 2: concentración de α factor (α 1=0). Shock térmico) Temperatura: 30 y 37 °C. <u>Respuesta</u>. Vía HOG) *Rp.s.*: respuesta <u>previa</u> al <u>shock</u>, *Rmáx.*: respuesta <u>máx</u>ima, *Re.e.*: respuesta en <u>estado estacionario post adaptación al shock osmótico, *Re.e.*': respuesta en estado estacionario post activación por α factor o bien shock térmico. c, izquierda) Estimulación con α factor y shock térmico.</u>

Discusión

Discusión

1. HOG inhibe la respuesta de la vía PR.

En nuestros experimentos de coestimulación con α factor y alta osmolaridad observamos una inhibición de la vía PR mediada por alta osmolaridad a nivel de fosforilación de Fus3, de expresión del reportero P_{PRM1}-mCherry, así como también del tiempo de respuesta para el arresto celular y el cambio morfológico del tipo "shmoo" (Figura R4). Estos resultados sugirieron un rol negativo de la vía HOG sobre la vía PR. De acuerdo con esta hipótesis, en los experimentos de pretratamiento con feromona y luego coestimulación con shock hiperosmótico y feromona, vemos una caída en los niveles de fosforilación de Fus3 (Figura R7 y R10) y una interrupción en el aumento de la respuesta transcripcional de P_{PRM1}-mCherry. Sin embargo, el mínimo de fosforilación de Fus3 está desfasado respecto del pico de fosforilación de Hog1 que ocurre entre 2 y 5 minutos post shock (0.5 M NaCl) observándose típicamente a los 15 minutos. Esto difiere del caso de Slt2/Mpk1 que se desfosforila inmediatamente después del shock. La falta de correlación entre el máximo de fosforilación de Hog1 y el mínimo de Fus3 podría deberse a un paso de regulación extra posterior a la fosforilación de Hog1 o bien podría sugerir que Hog1pp no es responsable directo de la desfosforilación de Fus3. En este sentido vemos que la desfosforilación de Fus3 sigue ocurriendo tanto en una cepa deficiente de la rama de señalización SIn1, cepa $\Delta ssk1$ como de la rama Sho1, cepa $\Delta sho1$, e incluso en una cepa con Hog1-AS2 inhibida (Figura R10). A estos resultados podríamos sumarle la observación de que la cepa $\Delta hog1$ muestra un retraso en el aumento de la respuesta de P_{PRM1}-mCherry post shock, más importante que la cepa salvaje (Figura R9), indicando un rol positivo de Hog1 en la capacidad de respuesta de la vía PR, en vez de un rol inhibitorio.

Recientemente Nagiec y colaboradores (Nagiec y Dohlman, 2012) reportaron que HOG bloquea la respuesta de la vía de feromona tanto a nivel de la fosforilación de Fus3 como a nivel del aumento de Fus3 total. Este grupo sugiere que la inhibición sobre la vía PR depende del estrés osmótico, y se debe a que Hog1 fosforila e inhibe Ste50. Si el efecto inhibitorio de HOG sobre Fus3 fuera a nivel de Ste50 esto explicaría porque no vemos cambios en reclutamientos de Ste5 a la membrana (Figura R8). Ste50 es necesaria en un paso independiente del reclutamiento de Ste5. Su rol es unirse por un extremo a Ste11 (que se encuentra asociado a Ste5) y por otro dominio se une a Cdc42 que se encuentra asociada a su vez a Ste20. El rol de Ste50 sería el de acercar a la quinasa Ste20 a Ste11 para fosforilarla y activarla. Sin embargo, el hecho de que vemos desfosforilación de Fus3 en la cepa con Hog1-AS2 inhibida sugiere que este bloqueo a nivel de Ste50 no es el responsable de la desfosforilación de Fus3.

Según el trabajo de Nagiec y col., la inhibición a nivel de la inducción de Fus3 estaría mediada por la fosforilación de Rck2 por Hog1. Rck2 es un represor de la elongación durante la traducción de mensajeros. En este caso la inhibición de Hog1 sería más general ya que Rck2 reprime la traducción de muchos otros genes. A la luz de los resultados de este grupo se podría pensar que el desfasaje entre el mínimo de fosforilación de Fus3 (5-15 minutos) y Slt2/Mpk1 (2-5 minutos) se podría deber a una reducción de los niveles de Fus3 totales

que tomarían más tiempo en ocurrir. Sorprendentemente, como vimos antes los niveles de Fus3 totales aumentan cuando disminuye su fosforilación descartando esta posibilidad.

Finalmente, Nagiec y colaboradores (Nagiec y Dohlman, 2012) observaron al igual que nosotros que la transcripción dependiente de la vía de feromona está disminuida durante la respuesta a un shock hiperosmótico y que esta disminución es proporcional al shock aplicado. A su vez también observaron un retraso en el tiempo de "shmooing" que es mayor cuanto mayores son los shocks hiperosmóticos. Nagiec y col. demuestran que el retraso en el tiempo de "shmooing" se debe a que en presencia de shocks osmóticos hay una menor inducción de Far1, proteína responsable de mediar el arresto del ciclo celular reprimiendo a la quinasa Cdc28. Estas observaciones sí serían consistentes con nuestros ensayos de halo a altas osmolaridades, donde vimos que a mayores osmolaridades la sensibilidad a feromona fue menor. Cabe señalar además, que la disminución del tamaño de los halos podría deberse a dos factores: una disminución de la sensibilidad a feromona que llevaría a un grado de arresto arresto celular más bajo o bien a una tasa de muerte menor (Patterson et al., 2010). La cuantificación de la transcripción del reportero transcripcional P_{PRM1}-mCherry es compatible solo con la primera posibilidad.

Compilando las observaciones de esta sección surge el interrogante de como se regula la desfosforilación de Fus3 luego de shocks hiperosmóticos. Una posibilidad que no exploramos sería que el shock osmótico inhibiera a Fus3 pero a través de Ssk2. Se ha demostrado que el shock osmótico activa a Ssk2 de un modo independiente de Ssk1 y desfasado de la cinética de fosforilación de Hog1 (Yuzyuk y Amberg, 2003) a través de la despolarización de actina y posterior asociación de Ssk2 con Pea2 y Spa2 (Bettinger y Amberg, 2007; Bettinger et al., 2007; Yuzyuk y Amberg, 2003; Yuzyuk et al., 2002). Entonces se podría especular que la desfosforilación de Fus3 estuviera controlada por alguna fosfatasa de Fus3 activada por Ssk2 como por ejemplo Msg5, Ptp2 o Ptp3 (Ver Figura D1).

Hacen falta más experimentos para apoyar los resultados presentados y para testear esta hipótesis.





Figura D1. Modelo de interacciones mediadas por shock hiperosmótico sobre la vía PR. a) Fosfatasas compartidas de las MAPKs de la vía PR: Kss1 y Fus3, HOG: Hog1 y CWI: Slt2/Mpk1. Las líneas azules representan interacción entre las fosfatasas y las MAPKs.

b) Modelo de interacción de vía HOG con PR compatible con las observaciones. El shock osmótico activa la vía de HOG y la activación de Hog1 podría tener un efecto en la desfosforilación de Fus3 ya que activa Ptp2. Hog1 también es necesaria para que se pueda defosforilar Fus3 ya que media un feedback fisiológico adaptativo que apaga la señal (desbalance osmótico). La activación paralela de Ssk2, independiente de Ssk1, a través de la despolimerización de actina está desfasada de la de Hog1 (Yuzyuk y Amberg, 2003) y podría activar alguna fosfatasa de Fus3.

c a f) Efecto de mutantes de la vía de HOG y de Hog1-AS1 inhibida, sobre del modelo propuesto

2. Actividad basal y "adaptación perfecta" en la vía de HOG.

Nuestro trabajo demuestra que existe una activación mayor de la vía de HOG cuando las células están creciendo en un ambiente con alta osmolaridad. Observamos esto, tanto a nivel de la fosforilación de Hog1, como de su localización nuclear y de la transcripción del reportero P_{STL1} -YFP. Este resultado es contrario a la noción general de que la activación final de HOG es transitoria y desaparece una vez que las células se han adaptado a un shock osmótico agudo (de Nadal et al., 2011; Muzzey et al., 2009).

Saito y col. demostraron que existe una actividad basal sobre la fosforilación de Hog1, ya que la deleción de las fosfatasas Ptc1 y Ptp2 aumenta los niveles de fosforilación de Hog1 (Saito y Tatebayashi, 2004; Young et al., 2002). Dos trabajos posteriores demostraron que la actividad de Hog1 es necesaria para activar a sus propias fosfatasas para disminuir su propia fosforilación (Macia et al., 2009; Westfall y Thorner, 2006). Finalmente Macia y col. demostraron que la actividad de señalización basal hacia la fosforilación de Hog1 se ejerce constantemente a través de la rama de señalización SIn1 (Macia et al., 2009). Sin embargo todos estos trabajos señalan que a pesar de haber una fosforilación constante de Hog1 también existe una desfosforilación constante que hace que la respuesta final de la vía sea la misma a distintas osmolaridades señalándose que la ventaja de mantener este costoso sistema de activación e inactivación de Hog1 sería una

mayor velocidad de respuesta frente a estímulos ambientales y una mayor sensibilidad a los mismos (Macia et al., 2009).

Un trabajo experimental y teórico realizado por Muzzey y colaboradores (Muzzey et al., 2009) sugiere que la maquinaria de síntesis de glicerol posee memoria luego de un shock osmótico: la vía HOG configura la tasa de producción de glicerol al nuevo nivel deseado durante la respuesta al shock osmótico agudo y posteriormente su actividad ya no es necesaria. Nuestros resultados indican que, al menos en una población de células continuamente dividiéndose este no es el caso. Vemos que, si bien la actividad de HOG presenta un pico y decae luego del shock hiperosmótico agudo, este decaimiento no regresa a los niveles de actividad previos al shock, en cambio el grado de activación en el estado estacionario es proporcional a la osmolaridad externa y probablemente es necesario para lograr mantener una concentración interna de glicerol apropiada.

La necesidad de una activación sostenida de HOG dependiente de la osmolaridad externa aparece lógica, ya que cuando el volumen celular aumenta, durante el crecimiento, la tasa de síntesis de las enzimas productoras de glicerol debe necesariamente aumentar, caso contario las mismas se diluirían. Es razonable postular entonces que la actividad de HOG es necesaria continuamente para poder mantener una tasa de síntesis de glicerol elevada, en parte regulando la tasa de expresión de los genes involucrados para su síntesis (como *GPD1 y GPP2*) y su importación (como *STL1*) para equiparar la osmolaridad externa.

Resumiendo, vemos que la dinámica de respuesta de HOG no se asimila a aquella de un sistema con "adaptación perfecta", en el cual la actividad regresa de HOG debería regresar al nivel de partida.

3. La vía PR activa a la vía HOG.

Nuestros estudios demuestran una interacción imprevista entre la vía de respuesta a feromona (PR) y la vía de respuesta a shocks hiperosmóticos (HOG): en células adaptadas a alta osmolaridad la estimulación con feromona activa a la vía HOG.

3.1. La activación no se debe a cross talk a nivel de la rama de señalización Sho1.

Nuestros estudios demuestran que la activación de HOG por feromona no se debe a una interacción directa sobre la vía de transducción de señales de HOG, como podría esperarse del hecho de que ambas vías comparten componentes (como por Ej. Ste11) (McClean et al., 2007). Ya que, en primer lugar, vimos que la cepa mutante $\Delta sho1$, activa HOG del mismo modo que la cepa WT y es esta rama de señalización la que comparte componentes con la vía de transducción de respuesta a feromona. En segundo lugar, la cepa $\Delta fus3$ no es capaz de activar a HOG, si bien en esta cepa no está afectada la señalización a nivel de la unión de α factor a su receptor y posterior activación de la MAPKKK, Ste11 que podría transducir la señal hacia la vía de HOG. A su vez observamos que el tiempo requerido para observar la activación máxima de HOG es de alrededor de 100 minutos, por lo tanto es poco probable que la interacción entre PR y HOG ocurra nivel de las vías de señalización (ver más abajo). En este sentido el mecanismo involucrado requeriría efectos mediados por feromona a largo plazo.

Trabajo previos afirman que las vías PR y HOG responden independientemente luego de la coestimulación con α factor y shock osmótico (McClean et al., 2007; Patterson et al., 2010). Patterson y col. no detectaron activación de la vía de HOG por feromona y concluyeron que la señalización por la vía de HOG está "aislada" de la señalización por la vía de feromona. Si bien esto es cierto a tiempos cortos, nosotros demostramos que a tiempos largos la respuesta de la vía de HOG cambia dramáticamente y sufre una reactivación demostrando la importancia del pasado celular en cuanto a su comportamiento.

Trabajos previos han sugerido que existe una inhibición de la vía de HOG por la vía PR a nivel de la rama Sho1 (McClean et al., 2007; Yamamoto et al., 2010). Nosotros y otros grupos (Patterson et al., 2010; Pelet et al., 2011), no hemos visto ninguna inhibición de la respuesta de HOG por parte de la vía PR durante la etapa de shock hiperosmótico agudo (esto puede verse comparando los niveles de fluorescencia del reportero P_{STL1} -YFP en experimentos de coestimulación vs. shock osmótico solamente).

3.2. Una "cascada" de cascadas de MAPK controla la tasa de recambio de glicerol.

Una serie de observaciones nos llevó a pensar que la MAPK Slt2/Mpk1 de la vía CWI estaba involucrada en la activación de HOG mediada por la vía PR. Primero, vimos en el experimento de respuesta de HOG a concentraciones variables de feromona (Figura R18) que había una relación entre la morfología "shmoo" y la activación de HOG. Segundo, vimos que las mutantes Δ*pea2* y Δ*spa2*, que bloquean este tipo de morfología muestran una activación reducida de la vía HOG (Figura R19). Tercero, Spa2 es una proteína de andamiaje relacionada con la señalización hacia Slt2/Mpk1 señalando una conexión hacia la vía CWI. Cuarto, observamos que en células individuales hay múltiples activaciones de HOG que correlacionan con los momentos de formación de nuevos "shmoos" (Figura R24) y trabajos previos han señalado que Slt2/Mpk1 presenta picos de activación en estos momentos de crecimiento (Buehrer y Errede, 1997; Errede et al., 1995; Levin, 2011; Zarzov et al., 1996).

Apoyando esta hipótesis vimos que la cepa $\Delta slt2/mpk1$ no presenta activación de HOG mediada por feromona a pesar de tener morfología "shmoo" y notablemente otro estímulo capaz de activar a Slt2/Mpk1 como es el shock térmico también activa la vía HOG. Pero en este caso, no hay morfología "shmoo" (obviamente) y los componentes del polarisoma no son necesarios.

3.3. El estímulo que activa a HOG es la disrupción del feedback homeostático de esta vía.

Teniendo en cuenta que la MAPK, Slt2/Mpk1 se activa durante shocks hipo osmóticos, donde es necesario compensar fisiológicamente el aumento de la turgencia celular estimulando la liberación de glicerol, propusimos que: la activación de HOG mediada por feromona es gatillada por una pérdida de glicerol estimulada por Slt2/Mpk1. Esta pérdida de glicerol generaría una disminución de la presión de turgencia que estaría activando a HOG.

Apoyando esta teoría cuando reducimos la perdida de glicerol en una mutante del canal Fps1 o en los mutantes Rgc1 o Ask10 involucrados en la apertura del mismo vemos que la activación de HOG por feromona desaparece. A su vez si se mantiene el gradiente osmótico constante pero se intercambia el osmolito externo

sorbitol por glicerol, no se ve activación de HOG mediada por la vía PR ya que la disminución del gradiente químico de glicerol desfavorecería la perdida del mismo. Concordantemente si se aumenta el gradiente osmótico, subiendo la concentración de osmolito (sorbitol) externa la activación de HOG por feromona es más intensa a mayores osmolaridades. Esto también sería una consecuencia de que aumenta el gradiente químico de glicerol ya que células adaptadas osmolaridades más elevadas poseen una concentración interna de glicerol más alta como ya se ha reportado (Oliveira y Lucas, 2004). Finalmente el shock térmico también activa la vía HOG de un modo dependiente del gradiente osmótico total y también del gradiente químico de glicerol.

Parece factible pensar que la activación de la vía CWI induciría una pérdida de glicerol a través de Fps1. Sin embargo, no se ha demostrado que Slt2/Mpk1 actúe sobre Fps1 ni sobre los reguladores de la acuagliceroporina Rgc1 o Ask10. Más bien lo contrario, las interacciones genéticas entre *FPS1 y SLT2/MPK1* indicarían que ambos genes actúan en paralelo ya que la cepa doble "knock out" Δ*fps1* Δ*slt2/mpk1* presenta un fragilidad exacerbada y precisa de un osmoprotector para ser viable (Philips y Herskowitz, 1997; Tamas et al., 1999) (esta interacción letal sintética se ha atribuido a la combinación de una alta acumulación de glicerol debida a la falta de Fps1 combinada con una pared celular débil provocada por la falta de la MAPK Mpk1/Slt2). Sería posible entonces que nuestros resultados sean consecuencia de interacciones más complicadas, por ejemplo la regulación de Fps1 por la vía PR podría no involucrar a la vía CWI directamente.

3.4. Solo es necesaria la rama de señalización Sln1 durante activación de HOG mediada por feromona.

A nivel del mecanismo de activación de Hog1 vimos que solo la rama de señalización SIn1 es necesaria. Una posibilidad que explicaría la transducción de la señal solo por esta rama sería que, como ya se dijo antes, Ssk2 interactúa con el polarisoma e incluso también con Slt2/Mpk1 (Breitkreutz et al., 2010) y podría señalizar hacia la vía CWI directamente. En este sentido, el ensayo de Western de la Figura R28 se ve un poco menos de fosforilación de Slt2/Mpk1 en las mutantes Δssk1 y Δssk2. En contraposición a esta posibilidad en la activación mediada por shock térmico los componentes del polarisoma Pea2 y Spa2 no son necesarios pero seguimos viendo una dependencia de Ssk1 y Ssk2. Otra explicación que surge, como se describió en el texto, sería que solo la rama SIn1 es capaz de sensar shocks hiperosmóticos leves (Macia et al., 2009) y como mostramos en la Figura R15 los niveles de fosforilación que vemos en nuestros experimentos equivalen a un shock hiperosmótico débil (entre 100 y 200 mOsm). Esto también explicaría la alta variabilidad que vemos en la activación del reportero P_{STL1}-YFP mediada por feromona. Si bien todas las activaciones de HOG mediadas por feromona coinciden con la formación de las proyecciones de apareamiento ("shmoos"), no todas las proyecciones, incluso en la misma célula, llevan a una inducción del reportero transcripcional de HOG. Este comportamiento podría deberse a una variabilidad en el estado de la cromatina en los loci inducibles por Hog1 activado, que varían estocásticamente entre un estado abierto (inducible) y cerrado (no inducible) (Pelet et al., 2011). Estos cambios son lentos, del orden de decenas de minutos, y por lo tanto son compatibles con las ventanas temporales entre "shmoos". Como demostraron Pelet y colaboradores (Pelet et al., 2011) este efecto es más evidente cuando las células se someten a un shock osmótico suave. Si esta

explicación fuera correcta, la actividad de HOG tendría picos de activación luego de cada "shmoo" pero solo se podrían detecta algunos de los incrementos de actividad usando este reportero. Para analizar esta posibilidad sería interesante analizar con más detalle en el futuro la correlación entre la entrada de Hog1-Venus al núcleo en películas siguiendo a las mismas células para ver la dinámica de translocación nuclear en células desarrollando "shmoos" múltiples. Se podría analizar el tiempo de permanencia en el núcleo y también la correlación entre la formación de los shmoos y la entrada de Hog1-Venus al núcleo. A su vez también sería interesante analizar los cambios de localización de Hog1-Venus en las cepas mutantes que no presentan activación de P_{STL1}-YFP por feromona.

3.5. ¿Cuál es el estímulo que activa a Slt2/Mpk1? ¿Es la forma lo que activa a Slt2/Mpk1 o es el estiramiento de la membrana inducido por el crecimiento?

Vemos que la activación de HOG mediada por feromona ocurre de modo pulsátil en los momentos en que crecen las proyecciones de apareamiento, además se ha descripto que Slt2/Mpk1 se activa en estos momentos (Buehrer y Errede, 1997). Sumado a estas observaciones se sabe que esta MAPK se activa durante el ciclo celular en momentos de crecimiento polarizado, cuando debe ocurrir una expansión celular en los puntos de gemación donde se posiciona el polarisoma (Levin, 2011). En estos momentos hay un debilitamiento transitorio de la pared celular en estos sitios que posibilita el crecimiento en volumen y genera un estiramiento de la membrana plasmática. A medida que la gemación crece su crecimiento cambia gradualmente de un crecimiento polarizado a uno isotrópico y luego en el momento de la citocinesis el polarisoma cambia de lugar y se posiciona en el cuello de la madre para dirigir la formación del anillo de septinas. De un modo similar Slt2/Mpk1 podría ser necesaria para debilitar la pared celular en los sitios de crecimiento polarizado durante respuesta a feromona cuando comienzan a formarse las proyecciones de apareamiento. Luego al crecer las proyecciones el estiramiento de la membrana activaría fuertemente a Slt2/Mpk1 (Kamada et al., 1995; Levin, 2011). En este caso la expansión en volumen durante el crecimiento sería un estímulo para Slt2/Mpk1.

Otro resultado que mostramos fue que la activación de HOG ocurre cuando las células presentan la morfología "shmoo" y no la de forma "peanut". Esto podría señalar que existe una relación entre la forma y la activación de HOG. La forma "shmoo" se caracteriza por tener una concavidad pronunciada en su base. Esta concavidad se genera por un anillo de septinas en la base de las proyecciones de apareamiento que produce un estrangulamiento en este sitio. Existen varias mutaciones que afectan la forma "shmoo" como la de los genes *SPA2 y PEA2* que ya habíamos visto y también la de un gen llamado *AFR1* (Arkowitz, 2009). *AFR1* es inducido por feromona (al igual que Pea2) y su producto Afr1 se une fuertemente a la septina Cdc12 (Giot y Konopka, 1997) y a la MAP quinasa Slt2/Mpk1. Las cepas $\Delta a fr1$ forman estructuras de septinas aberrantes, lo cual generaría las proyecciones de apareamiento aberrantes. Además la deleción del dominio carboxilo terminal de Afr1 impide su unión a Cdc12 y las células forman múltiples proyecciones de apareamiento al ser estimuladas con dosis saturantes de α factor, pero en una menor proporción que las salvajes (55% con al menos una proyección vs. 100% en las salvajes) y con una morfología alterada -con su base menos cóncava,

tipo "peanut". Finalmente un estudio mostró que las cepas ∆afr1 no posicionan a Slt2/Mpk1 en la punta de la proyección de apareamiento pero Spa2 se ubica normalmente (Changwei et al., 2007). Podía pensarse que las septinas nuclean por un lado al polarisoma y por el otro a Afr1 y que luego Afr1 posiciona a Slt2. Sería interesante analizar la activación de HOG mediada por feromona en cepas mutantes de Afr1 y de las septinas.

Finalmente otra observación interesante es que Hog1 es capaz de fosforilar al componente del anillo de septinas Hsl1. Esta quinasa Hsl1 es capaz de afectar al anillo de septinas de modo que la fosforilación por Hog1 podría actuar quizás como un feedback negativo, interfiriendo, quizás, con la hipotética activación de Slt2/Mpk1 mediada por la forma.



Figura D2. a) Interacciones físicas entre proteínas involucradas en la formación del anillo de septinas (amarillo), del polarisoma (rojo), MAP quinasas (naranja) y reguladores RGC (verde). Las líneas azules señalan las interacciones físicas entre las proteínas [obtenido de la página www.genemania.com (Warde-Farley et al., 2010)]. b) Modelo de activación de Hog1 mediado por la morfología shmoo. La interacción del anillo de septinas con los componentes del polarisoma y los reguladores RGC inducen una perdida de glicerol que activaría a Hog1 indirectamente a través de un desbalance osmótico. Hog1 podría mediar un feedback negativo similar al que desarrolla durante shocks hiperosmóticos fosforilando a Hsl1 (Clotet y Posas, 2007) y bloqueando al anillo de septinas y así afectando a Afr1 y a Slt2/Mpk1.

3.6. Rol de los reguladores Rgc1 y Ask10.

El requerimiento de Rgc1 y Ask10 en la activación de HOG mediada por feromona es muy interesante. Ya que en el pasado los fenotipos asociados a estas proteínas se habían visto pero solo cuando ambos genes estaban mutados simultáneamente. Beese y colaboradores describieron estas proteínas parálogas Rgc1 y Ask10 como reguladoras positivas del canal de glicerol Fps1, ya que la cepa doble mutante $\Delta rgc1 \Delta ask10$ acumula glicerol, tiene una turgencia incrementada que provoca una pared más reforzada debido a una hiperactivación de la vía CWI. Si bien no lograron identificar una interacción directa con Fps1 todos los fenotipos anteriores son iguales a los que presenta una cepa $\Delta fps1$ y por esta razón concluyeron que las proteínas serían reguladoras positivas de la apertura del canal (Beese et al., 2009). En nuestros estudios vemos que la falta de al menos uno de estos genes es suficiente para abolir la activación de HOG mediada por la vía PR. Estas proteínas poseen unos dominios llamados F-BAR por los cuales pueden dimerizar y sensar zonas de la membrana plasmática con una cierta curvatura y a su vez pueden inducir la curvatura de la membrana plasmática (Olivera-Couto et al., 2011; Saengsawang et al., 2012). Se ha demostrado interacción física entre Rgc1 y Ask10, de modo que si estuvieran heterodimerizando la falta de al menos una de ellas sería suficiente para evitar la apertura de Fps1 mediada por feromona (Breitkreutz et al., 2010). Rgc1 y Ask10 además poseen dominios PH que sensan PIP de modo que podrían también reclutarse a la membrana plasmática por este dominio y quizás luego en un segundo paso dimerizar.

Otra observación es que se ha descripto que los dominios BAR podrían localizar a las proteínas a zonas donde se encuentran las septinas como por ejemplo el cuello de una nueva gemación ("bud neck") durante la mitosis (Meitinger et al., 2011). De modo que esta propiedad estructural de los dominios BAR podría conectar la morfología "shmoo" con la activación de HOG mediada por feromona, ya que el anillo de septinas en la base del "shmoo" podría estar reclutando a los reguladores RGC. Además, del interactoma presentado en la Figura D2 vemos que la fosfatasa Glc7 se une a Ask10, así que esta interacción podría ser un nexo entre las septinas y los reguladores RGC (Figura D2) (Breitkreutz et al., 2010).

Sumado a todo lo anterior Breitkerutz y colaboradores han publicado que existe una interacción física entre Fus3, Kss1 e incluso Hog1 con Rgc1 y Ask10 (Breitkreutz et al., 2010). De modo que Rgc1 y Ask10 podrían estar siendo fosforiladas por estas MAPKs. De modo que una posibilidad sería que Rgc1 sea exclusivo de la respuesta a feromona porque Fus3 o Kss1 por ejemplo la fosforilan directamente (Figura D2).

Finalmente el hecho de que Rgc1 sea solo necesario en la activación de HOG mediada por feromona y Ask10 también en la activación mediada por shock térmico podría sugerir una conexión entre la forma de los "shmoos" y la activación de Rgc1. En este panorama Rgc1 se activaría primero y luego Ask10 sería reclutada o activada o formaría heterodímeros pero, epistáticamente estaría río abajo del primer paso mediado por Rgc1, mediando finalmente la apertura de Fps1 (Figura D2). Sin embargo, la observación de que la activación de HOG mediada por ambos estímulos sea aditiva descartaría esta posibilidad aisladamente. Podría haber más de un camino desde Slt2/Mpk1 hasta Ask10 o bien otras rutas hacia Fps1. Lo que si sabemos es que epistáticamente Rgc1 y Ask10 actúan río abajo o en paralelo de Slt2/Mpk1 ya que como vemos en la Figura R28 en estas mutantes RGC Slt2/Mpk1 se fosforila.



Figura D3. Modelos de activación de HOG por α factor y temperatura en células adaptadas a alta osmolaridad. No conocemos aún donde actúan los reguladores RGC. Rgc1 es exclusivo de la activación de HOG mediada por feromona. Estímulos, a) α factor aislado, b) shock térmico aislado c) ambos.

3.7. La función de la liberación de glicerol.

¿Porqué se induce la liberación de glicerol en células adaptadas a alta osmolaridad respondiendo a feromona? ¿Tiene alguna función la liberación de glicerol al medio extracelular o el glicerol liberado *per se*?

Proponemos que la liberación de glicerol medida, inducida por feromona es la causa de la activación de la vía de HOG. Las células deben desarrollar una respuesta homeostática para restablecer la presión de turgencia necesaria para poder crecer. Es decir para mantener una concentración interna de glicerol constante, frente a un aumento de la tasa de pérdida del mismo será necesario aumentar los niveles del mismo ya sea: aumentando su síntesis, disminuyendo su degradación y/o aumentando su importación. La disminución de la tasa de degradación no alteraría la tasa de recambio de glicerol en tanto que el aumento de la tasa de importación del mismo aumentarían la tasa de recambio. Sin embargo el aumento de la tasa de importación solo es posible si hay niveles de glicerol extracelular elevados. En nuestros experimentos medimos un aumento en el reportero transcripcional de HOG P_{57L1}-YFP, que sería compatible con un aumento de otros genes típicamente inducidos por HOG, entre los que se encuentran genes involucrados en la síntesis de glicerol (*GPD1, GPP2*) (Gasch et al., 2000; O'Rourke y Herskowitz, 2002; Rep et al., 1999a; Rep et al., 1999b; Warringer et al., 2010). En experimentos futuros se podrían medir los niveles internos de glicerol así como también la abundancia de Gpd1 y Gpp2 en las condiciones experimentales que usamos.

Los experimentos de cinética de recuperación de volumen son compatibles con nuestra hipótesis de que células adaptadas a alta osmolaridad respondiendo a feromona poseen un mayor "turnover" de glicerol que las no tratadas, ya que luego de un segundo shock osmótico las tratadas con α factor recuperan su volumen el 50% de su volumen en la mitad del tiempo que las no estimuladas.

Además de esto, vimos que una de las mutantes "knock out" que no presenta activación de HOG mediada por la vía PR, la mutante $\Delta rgc1$, no es capaz de mejorar su capacidad de osmoadaptación a nivel de la recuperación de volumen celular. Esto suponemos, se debería a que las células $\Delta rgc1$ serían incapaces de liberar glicerol a través de Fps1 y luego acumularían el osmolito (Beese et al., 2009). De este modo el tratamiento con α factor en estas mutantes no aumentaría la tasa de síntesis de glicerol vía HOG y por esta razón las mismas no aumentan su velocidad de recuperación de volumen.

Una tasa de recambio elevada de glicerol podría ser importante durante el apareamiento para controlar precisamente los desbalances osmóticos. Previamente Philips y Herskowitz mostraron que la incapacidad de controlar los desbalances osmóticos (en células $\Delta fps1$) impide el apareamiento en el paso de prezigota, previo a la degradación de la pared celular (Philips y Herskowitz). Además se ha visto que las células pueden morir en el paso de fusión celular luego de que se degrada la pared celular. Este paso es muy delicado y cuando hay deficiencias en las proteínas encargadas de mediar la fusión de las compañeras de apareamiento puede ocurrir que una de ellas emita una proyección hacia dentro de la otra causando su lisis (Aguilar et al., 2007; Jin et al., 2004).

Podría haber otros roles para el aumento de liberación de glicerol inducido por feromona en las condiciones analizadas. Una posibilidad sería que el glicerol producido tuviera un rol parácrino sirviendo a las células circundantes para mejorar su sensibilidad a feromona por ejemplo. Testeamos esta hipótesis en los ensayos de halo donde evaluamos la sensibilidad de las células a α factor en medios con alta osmolaridad incluyendo o no glicerol (por ejemplo, usando sorbitol 0.5 M o bien una mezcla de sorbitol 0.5 M más glicerol 0.5 M -ver Figura R5). La sensibilidad a feromona no cambió por el agregado de glicerol en ninguna de las condiciones testeadas. En este sentido podemos concluir que en las condiciones testeadas el glicerol no ayuda a mejorar la sensibilidad a feromona. Aunque debería tenerse en consideración que quizás en un medio sin glucosa, donde no hay represión del transportador St11, el glicerol externo sí podría ser efectivo.

Otra posibilidad sería que la producción de glicerol sea simplemente un producto colateral necesario para mantener el balance redox celular, ya que durante la síntesis del mismo se consume NADH (Valadi et al., 2004a; Valadi et al., 2004b; Westfall et al., 2008). A su vez, ha sido reportado que la estimulación con altas dosis de feromona provoca un aumento de los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Zhang et al., 2006). De este modo una tasa de recambio de glicerol elevada podría servir como un circuito alternativo a la reoxidación mitocondrial de NADH, ayudando a reducir las especies reactivas de oxigeno producidas por la mitocondria durante el apareamiento (Hohmann, 2002). Consistentemente con esta observación, las células deficientes en componentes de la vía de integridad de pared celular (CWI), que no pueden activar HOG, son por lo tanto incapaces de aumentar la tasa de recambio de glicerol producen niveles elevados de ROS (Zhang et al., 2006).

4. Integración de señales en eucariotas.

Cabe resaltar que durante la respuesta de apareamiento en alta osmolaridad un evento morfogenético discreto "shmooing" resulta en la activación de las cuatro MAPK haploides de la levadura: Fus3 y Kss1 como parte de la vía de respuesta a feromona propiamente, y una activación periódica de Slt2/Mpk1 (Buehrer y Errede, 1997) y Hog1 (descripto en esta tesis) por los cambios morfológicos periódicos inducidos por feromona.

Hasta el momento de esta tesis nunca se había visto un único estímulo pudiera activar a todas estas MAP quinasas simultáneamente en levaduras, mostrando la importancia de la integración de señales a la hora de predecir la respuesta final de un sistema.

Así como observamos interacciones entre las vías PR de respuesta a shock térmico y HOG de levaduras, que responden a distintos tipos de estímulos (de desarrollo y de estrés), muchas vías de señalización aparentemente independientes de células eucariotas podrían haber desarrollado mecanismos de interacción. Estos mecanismos solo serían aparentes bajo contextos de señales apropiados (apareamiento en alta osmolaridad en nuestro caso o aún más a alta temperatura). Las consecuencias de la activación de un sistema por otro son las de incorporar nuevas propiedades funcionales al comportamiento del sistema en su conjunto. En nuestro caso, la activación del sistema de HOG provee la capacidad de controlar más eficientemente el volumen celular (como discutimos más arriba podría haber otras nuevas propiedades incorporadas). Este tipo de interacciones es probable que sean comunes tanto en condiciones normales como patológicas. Por ejemplo, durante el desarrollo factores de crecimiento y morfógenos pueden modular la diferenciación celular y a menudo esta trae aparejados cambios de la forma celular y de las interacciones célula-célula y célulamatriz extracelular. Estos cambios resultan en estrés que podrían activar sistemas de señalización apropiados. La activación de los últimos podría modular la respuesta de los primeros. Similarmente durante el cáncer, las señales de proliferación dirigen el crecimiento tumoral en un ambiente limitado en oxígeno y nutrientes, resultando en la activación de respuestas de estrés. Esta multiplicidad de señales se modulan entre sí, resultando en un comportamiento a nivel del sistema que, a priori, es difícil de predecir. En este contexto, comprender la naturaleza y las consecuencias de estas interacciones podría ayudar a diseñar nuevas terapias para bloquear (o aumentar) la habilidad de una vía para reclutar a otra.

Conclusiones

Conclusiones.

1. Modulación de la vía PR.

Si bien falta investigar con más profundidad los efectos de la vía HOG sobre la vía PR, podemos concluir que durante la etapa aguda de un shock hiperosmótico se inhibe la respuesta de la vía PR a nivel de la fosforilación de Fus3, la transcripción de P_{PRM1}-mCherry, arresto del ciclo celular, aparición de morfología "shmoo". En el caso de los tres últimos niveles, vimos que esta inhibición es transitoria y su duración es coincidente con el tiempo de respuesta de la etapa aguda de un shock hiperosmótico. Cuanto mayor es el shock hiperosmótico más tiempo dura la inhibición. Además, Hog1 sería necesaria para ayudar a la recuperación transcripcional y morfogenética de la respuesta a PR.

A nivel de la fosforilación de Fus3 vimos que el shock hiperosmótico disminuye la misma, durante la etapa de respuesta aguda. Esta desfosforilación no desaparece en las mutantes Δ *sho1*, Δ *ssk1* ni en una variante de Hog1 inhibida. Esta observación sumada a que existe un desfasaje entre el pico de fosforilación de Hog1 y el mínimo de fosforilación de Fus3 podría indicar que existe otro regulador distinto de Hog1, relacionado con el shock osmótico regulando la desfosforilación de Fus3.

A largo plazo la osmolaridad elevada también reduce la respuesta de la vía PR y esta inhibición depende de la osmolaridad externa. El glicerol no es capaz de inhibir la respuesta de la vía PR en este caso ni revierte la inhibición ejercida por la osmolaridad elevada de otros osmolitos.

2. Modulación de la vía HOG.

2.1. Actividad de HOG en estado estacionario.

La vía de HOG no presenta osmoadaptación perfecta. Observamos que la actividad de HOG es mayor cuanto mayor es la osmolaridad externa. Observamos esto a nivel de la fosforilación de Hog1, la localización nuclear y la transcripción de P_{STL1} -YFP. Además vemos que el osmolito glicerol no es capaz de subir la respuesta de HOG en estado estacionario. La activación de P_{STL1} -YFP en estado estacionario es muy variable y la variabilidad es mayor cuanto mayor es el grado de activación en estado estacionario. Contrariamente reportero constitutivo P_{BMH2} -CFP niveles de activación y variabilidad constantes a distintas osmolaridades.

2.2. Modulación de la vía HOG por la vía PR.

La vía PR no modifica respuesta de la vía de HOG durante la etapa de shock hiperosmótico agudo, pero sí afecta la misma en estado estacionario induciendo una reactivación de HOG.

En células adaptadas a alta osmolaridad la vía PR es capaz de activar a la vía HOG a nivel de la fosforilación de Hog1, la localización nuclear y la transcripción de P_{STL1} -YFP.

Gracias al análisis del comportamiento de células individuales determinamos que el mecanismo de activación de HOG involucra la morfogénesis inducida por feromona, llevando a que los "shmoos" activen periódicamente a HOG. Observamos una alta variabilidad a nivel de la activación del reportero de HOG, P_{S7L1}-

YFP en células individuales a pesar de que el reportero de la vía PR presenta respuestas muy similares. Creemos que esta variabilidad podría explicarse con la estocasticidad de la respuesta de HOG reportada cuando hay shocks hiperosmóticos de baja intensidad (Pelet et al., 2011), ya que los niveles de fosforilación de Hog1 que observamos durante la activación de HOG por feromona son equivalentes a los de un shock de esta intensidad. Además apoya esta teoría que solo la rama de señalización SIn1 es necesaria para la activación de HOG mediada por la vía PR y esta rama es la que modula la amplitud de activación de Hog1 frente a shocks hiperosmóticos de baja intensidad.

En cuanto al mecanismo, la MAPK de la vía CWI Slt2/Mpk1 y componentes del polarisoma que afectan la morfología son indispensables para la activación de HOG. La morfogénesis inducida por feromona activa a Slt2/Mpk1 a través del polarisoma y creemos que Slt2/Mpk1 induciría una pérdida de glicerol a través de la acuagliceroporina Fps1. Luego la pérdida de glicerol generaría una disminución de la presión de turgencia que activaría a Hog1. Apoyan esta teoría en primer lugar, la observación de un aumento de la liberación de glicerol inducido por feromona. Segundo, no observamos activación de HOG en mutantes que regulan la salida de glicerol como $\Delta fps1$, $\Delta rgc1$, $\Delta ask10$ y $\Delta rgc1$ $\Delta ask10$. Tercero, la sustitución de glicerol como osmolito extracelular evita la activación de HOG pues disminuiría el gradiente químico del mismo reduciendo la salida por Fps1. Cuarto, el aumento del gradiente osmótico genera una activación de HOG más intensa ya que para un tiempo de apertura constante de Fps1 inducido por Slt2/Mpk1 se perdería más glicerol.

La activación de HOG mediada por feromona tiene consecuencias a nivel de la capacidad de osmoadaptación de las células. Las células adaptadas a alta osmolaridad respondiendo a feromona son capaces de recuperar su volumen celular a una velocidad significativamente mayor que las no estimuladas. Creemos que esta mejor capacidad de osmoadaptación se debe a que estas células tienen una alta tasa de recambio de glicerol.

2.3. Modulación de la vía HOG por shock térmico.

Mecanísticamente proponemos que la vía PR activa a HOG a través de Slt2/Mpk1. Apoya esta teoría que otro estímulo capaz de activar a Slt2/Mpk1 como es el shock térmico también induce la activación de HOG de un modo que depende del gradiente químico de glicerol y del gradiente osmótico. Además en este caso no hace falta el polarisoma y la activación también se lleva a cabo por la rama de señalización Sln1 de la vía HOG.

Finalmente vimos que las activaciones de HOG mediadas por feromona y shock térmico son aditivas y que el regulador Rgc1 es específico de la activación mediada por feromona.

3. Conclusión final.

Concluyendo podemos decir que la respuesta de las células cambia dramáticamente dependiendo del modo como se le presentan los estímulos externos. Por ejemplo, las células responderán más fuertemente a HOG si en el exterior hay una temperatura más elevada o si están apareándose. A su vez, la dosis de los estímulos es importante a la hora de regular la activación de la vía de HOG, será mayor cuanto mayor sea la osmolaridad en la cual están creciendo las células y cuanto mayor sea la temperatura a la cual crecen. Pero no siempre la respuesta es proporcional a la dosis del estímulo. Al estimular con feromona, por ejemplo, el inicio de la activación de la vía HOG mediado por la vía PR no se modifica si las células están creciendo en un ambiente con mayor temperatura, ya que la activación mediada por feromona depende del tiempo necesario para ejecutar la respuesta morfogenética que resulta en la morfología "shmoo".

Esperamos que los resultados encontrados en este sistema biológico sirvan para pensar de una manera más integrativa, como será la dinámica de la respuesta en un dado sistema frente a señales externas, de acuerdo a como el mismo las integra globalmente.

Materiales y métodos

Materiales y métodos.

1. Cepas de Levaduras y plásmidos.

En general las técnicas de biología molecular y los métodos usados para manipulación y construcción de cepas de levaduras, que no se describen en detalle, fueron obtenidas/os siguiendo las instrucciones de los tratados de Guthrie y Fink (Guthrie y Fink, 1991) y de Ausubel et al. (Ausubel et al., 1987-2006; Guthrie y Fink, 1991).

1.1. Cepas.

Las cepas que se usaron se detallan en la tabla 1. Usamos como cepa parental a la ACL379, que es la cepa parental de la gran mayoría de las cepas usadas en nuestro laboratorio. La misma deriva de la cepa YAS245-5C (*MATa can1::HO-CAN1 ho::HO-ADE2 ura3 ade2 leu2 trp1 his3*) a la cual se le delecionó el gen *BAR1* (Colman-Lerner et al., 2005). Cabe remarcar que la cepa YAS245C-5C, a su vez, desciende de la cepa W303a. Ésta junto con las cepas s288c y Σ 1281 son las más estudiadas y sus genomas han sido completamente secuenciados.

1.1.1. Cepa LD3342

Generamos la cepa YLD3342 en tres pasos. Primero, transformamos la cepa ACL379 con el plásmido pRS406-P_{STL1}-YFP, que posee un reportero fluorescente compuesto por del zona promotora del gen *STL1* dirigiendo la expresión del gen que codifica para la proteína fluorescente YFP. Este gen es inducible por la vía de señalización de HOG. Luego cortamos el plásmido con una enzima de restricción que corta en la zona del promotor STL1, transformamos y seleccionamos en base a la capacidad de crecer en placas sin uracilo. Verificamos la integración del reportero transcripcional estimulando células de varias colonias con shocks hiperosmóticos y viendo la inducción de YFP por microscopia de fluorescencia.

Segundo, transformamos esta primera cepa generada con un producto de PCR que contiene la secuencia codificante para la proteína fluorescente mCherry seguida del "cassette" de resistencia al antibiótico higromicina. Para esta PCR usamos como molde el plásmido pRY22060hph-mCherry y utilizamos "primers" que poseen 20 bases de homología con las zonas flanqueantes al producto a amplificar (como se indica en la figura) y 40 bases de homología con el locus donde se quiere integrar el producto de PCR, en este caso el "primer" F1 tiene homología hasta el codón "STOP" (no incluido) del ORF del gen inducible por feromona *PRM1* (Colman-Lerner et al., 2005) mientras que el "primer" R1 tiene homología desde el codón "stop" en adelante.



Figura M1. Estrategia para integrar el reportero mCherry río abajo del promotor (en verde claro) del gen *PRM1* (ver texto).

Luego de transformar con este producto de PCR se seleccionamos las células en placas suplementadas con higromicina. Verificamos la integración estimulando células de varias colonias con α factor y viendo la inducción de mCherry por microscopia de fluorescencia. La cepa resultante es la RB3341.

Tercero, transformamos la cepa RB3341 con el plásmido pBMH2-CFP-404 cortado con una enzima de restricción en el promotor BMH2. Luego, plaqueamos las células transformadas en placas SD sin triptófano ni uracilo. Confirmamos la integración por la expresión constitutiva de la proteína CFP dirigida por el promotor BMH2. Además verificamos que la cepa final obtenida, LD3342 inducía YFP y mCherry.

1.1.2. Cepas "knock out".

Usamos la cepa parental LD3342 para generar la mayoría de las cepas "knock out" del trabajo. Las deleciones se generaron por recombinación homóloga usando productos de PCR amplificados a partir de cepas obtenidas de la biblioteca de deleciones de levaduras (Giaever et al., 2002; Winzeler et al., 1999). Estas cepas de la colección de deleción fueron generadas también por la técnica de recombinación homóloga usando el "cassette" *KanMX4* que provee resistencia al antibiótico G418. La correcta deleción de los genes en estas cepas fue verificada usando "primers" locus específico que flanquean al "cassette" *KanMX4* en combinación con "primers" que hibridan dentro del "cassette" *KanMX4*, a saber "primer" *KanB*, que hibrida en el promotor que dirige al gen *KAN y KanC* que hibrida dentro del ORF *KAN* ver (Longtine et al., 1998).


Figura M2. Estrategias para sintetizar "cassettes" para delecionar genes. a. partiendo de una cepa "knock out" de la colección de mutantes de deleción (ver texto), b. partiendo de los plásmidos pFA6a-KanMX6, His3MX6 o -NatMX6 (ver texto) (Longtine et al., 1998).

Con el fin de amplificar "cassettes" de selección para delecionar un dado gen específico, partimos de una cepa "knock out" de la colección de "knock outs" que tiene delecionado este gen de interés. Luego usamos "primers" que hibridan 150 pb río arriba del codón de inicio y 150 pb río abajo del codón "stop" del gen de interés, en estos casos previamente reemplazado por el "cassette" *KanMX4* (Giaever et al., 2002; Winzeler et al., 1999).

En los casos en que las cepas de la colección se verificaron negativas para la deleción del locus deseado, o bien para generar sucesivas mutaciones en cepas que ya portaban resistencia a G418 amplificamos el "cassette" *KanMX6, His3MX6* o *NatMX6* a partir de plásmidos de la serie pFA6a descritos en el trabajo de Longtine et al. (Longtine et al., 1998). En este caso amplificamos el "cassette" con el marcador de selección usando "primers" con 50 bases de homología a 100 pb río arriba del codón de inicio y 100 pb río abajo del codón "stop" del gen de interés a delecionar.

Una vez que obtuvimos el producto de PCR con el marcador de selección, transformamos la cepa salvaje LD3342, y plaqueamos en medio selectivo. La correcta deleción de los genes en estas cepas transformadas fue verificada usando "primers" locus específico que flanquean al "cassette" *KanMX4* (o bien *KanMX6, His3MX, NatMX*) en combinación con "primers" que hibridan dentro del "cassette" *KanMX4,* a saber "primer" *KanB,* que hibrida en el promotor que dirige al gen *KAN y KanC* que hibrida dentro del ORF *KAN* ver (Longtine et al., 1998).

Generamos la cepa RB3801 delecionando el gen *HOG1* por recombinación homóloga transformando con el "cassette" *KanMX*. Luego verificamos la deleción analizando la morfología de las cepas putativas estimuladas con alta osmolaridad (medio SC líquido o sólido suplementado con sorbitol 1M). Las cepas

positivas se arrestan en alta osmolaridad debido a que la vía de HOG activa la vía de respuesta a feromona. Como consecuencia de esto las células presentan morfología tipo "shmoo". Esta cepa $\Delta hog1$ es la RB3801.

Tabla 1. Cepas.

Сера	Genotipo relevante	Referencia
RB3341	MATa bar1_prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3	Esta tesis
LD3342	MATa bar1∆ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} - CFP::TRP1	Esta tesis
RB3376a	MATa mpk1Δ::kanMX, bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3703	MATa sho1Δ::kanMX, bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3382a	MATa ssk1∆::kanMX, bar1 prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3401	MATa ssk1Δ::kanMX, fus1Δ::hisMX, bar1 prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} - YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3642	MATa ssk2Δ::HisMX, bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3712	MATa fus3Δ::KanMX, bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{sTL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3710	MATa rgc1Δ::KanMX, bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3717	MATa rgc2Δ::KanMX, bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3722	MATa rgc1Δ::KanMX rgc2Δ::HisMX bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} - YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3396a	MATa fps1Δ::His bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3406	MATa bar1∆ stl1::P _{STL1} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3837	MATa spa2Δ::KanMX bar1Δ stl1::P _{STL1} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3838	MATa pea2Δ::KanMX, bar1Δ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3801	MATa hog1∆::KanMX, bar1∆ prm1::P _{PRM1} -mCherry::hygB stl1::P _{STL1} -YFP::URA3 bmh2::P _{BMH2} -CFP::TRP1	Esta tesis
RB3836	MATa HOG1T100Q::hog1, bar1∆ prm1::Pprm1-mRFP:hygB Pstl1::Pstl1-YFP::URA3 Pbmh2::Pbmh2::CFP::TRP1	Esta tesis
ySP69	W303a, MATa hta2::HTA2-CFP-no marker Hog1-Venus::TRP1 leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15	Pelet et al 2011
yGP1281	BY4742 s288c MATa P _{ACT1} -mRFP -URA3 in lyp1	Pesce G.
PP3662	ACL379, MATa bar14 TRP1::STE5-YFPx3	Pricyak P.
SR3865	W303, MATa HOG1-AS2::hog1 no marker	Regot S.

1.2. Plásmidos.

Los plásmidos pRS404-P_{STL1}-CFP o pRS406-P_{STL1}-YFP se usaron para integrar el reportero transcripcional de la vía HOG. Estos plásmidos poseen el promotor *STL1* (1000 pares de bases río arriba del codón de inicio) dirigiendo la expresión de CFP o YFP. Los mismo se integraron, en el locus *TRP1* y *URA3* respectivamente. El plásmido pRY22060hph-mCherry se usó para integrar mCherry río abajo del promotor *PRM1*, dirigiendo la expresión de mCherry en el locus *PRM1*. pP_{BMH2}-CFP-TRP1 se usó para integrar la construcción P_{BMH2}-CFP en el locus *BMH2* (Colman-Lerner et al., 2005). Fps1∆::HIS3-long se usó para delecionar *FPS1* (Tamas et al., 1999).

2. Métodos de microscopía.

2.1. Condiciones de experimentales.

Crecimos las células por, al menos, 15-20 horas controlando la OD (densidad óptica) de modo tal que las células se encontraran en fase de crecimiento exponencial. Para lograr esto, típicamente realizamos dos o tres diluciones en los medios correspondientes a cada experimento, de modo tal que luego de aproximadamente 15 horas los cultivos tuvieran una OD entre 0.05 y 0.1. Esta baja OD es importante para minimizar la autofluorescencia inespecífica especialmente debida a la vacuola (Colman-Lerner et al., 2005; Gordon et al., 2007; Yu et al., 2008).

Llevamos a cabo dos tipos de experimentos temporales. En un caso se fotografiamos en el microscopio las mismas células a lo largo del tiempo luego de estimularlas (películas), mientras que en el segundo tratamos cultivos y recolectamos muestras a distintos tiempos. En este caso las células fotografiadas son diferentes a distintos tiempos y no se puede comprobar su evolución temporal. Para la recolección de muestras del segundo tipo de experimento, tomamos un volumen de cultivo de 100 µL y lo mezclamos con una solución conteniendo el inhibidor traduccional cicloheximida, de modo tal que la concentración final de cicloheximida fuera de 100 µg/mL. Antes de fotografiar las células dejamos las muestras a temperatura ambiente por al menos 3 horas (o bien a 4 ^oC toda la noche) de modo tal que las proteínas fluorescentes, YFP, CFP y mCherry pudieran "madurar" completamente (Colman-Lerner et al., 2005).

Para las películas sonicamos los cultivos para separar las agrupaciones de células (10 segundos a una potencia de 5 en un equipo Misonix[®] Sonicator 3000 o bien 15 segundos, a una amplitud de 15% en un equipo Sonic Dismembrator, Fisher Scientific[®], USA) y pipeteamos 100 μ L de cada suspensión celular de OD \cong 0.05-0.1 (aproximadamente 2.10⁵ células) en un posillo (área del posillo 81 mm²) de una placa con fondo de vidrio para microscopía de 96 posillos (BD FalconTM Glass-Bottom Imaging Plates, número de catálogo 357308). Previamente agregamos concanavalina A (concanavalin A type V, Sigma-Aldrich) en los posillos. La concanavalina es una lectina que se une a la pared celular de las levaduras y sirve para que las células permanezcan inmóviles durante el transcurso de la película. Agregamos, al posillo 100 μ l de una solución 100 μ g/ml de concanavalina en agua (para preparar la concanavalina usamos agua milliQ o destilada estéril y sonicamos 30 segundos, a una amplitud de 50% en un equipo Sonic Dismembrator, Fisher Scientific[®], USA) y centrifugamos la placa de microscopia en una centrifuga de placas al máximo 1 minuto y se incuba 15 minutos

a temperatura ambiente (o alternativamente toda la noche a 4 ^oC). Luego lavamos tres veces con agua estéril. Agregamos las células y se centrifuga a 3000 rpm durante 30-60 segundos. Inmediatamente después, lavamos una vez con el mismo medio que crecimos las células para eliminar las células no adheridas. Luego de esto seleccionamos una serie de campos dentro de un mismo posillo o en distintos posillos, cada uno con un tratamiento diferente y procedimos a fotografiar las células y a estimularlas para comenzar el experimento.

Para controlar la concentración de α factor más precisamente agregamos al medio de cultivo caseina (Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, IN) en una concentración final de 20 µg/mL, de este modo se evita el pegado inespecífico de α factor al plástico. Esto es fundamental para obtener experimentos reproducibles a dosis bajas de α factor.

2.2. Adquisición de imágenes.

Para la adquisición de fotos usamos un objetivo de inmersión en aceite 60X PlanApo (N.A.=1.4, Olympus[®]) con un microscopio invertido Olympus IX81. El mismo estaba equipado con una lámpara de mercurio y motorizado en XYZ. Usamos una cámara refrigerada CCD Cool Snap HQ2 (Photometrix, Tucson AZ). Las fotos se tomaron a temperatura ambiente. Usamos el sorfware MetaMorph 7.5 para controlar la adquisición de fotos (Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA).

Para cada campo adquirimos: imágenes de transmisión (BF), e imágenes para colectar la señal de los fluoróforos: "rojos": mCherry, mCherry, DsRed o FM4-64, "amarillos": YFP, Venus o GFP, "cyan": CFP o UV: DAPI o "calcofluor white". Para adquirir las imágenes de los distintos canales de fluorescencia usamos filtros de fluorescencia. Estos filtran las longitudes de onda del haz de luz de excitación, proveniente de la lámpara de mercurio y luego del haz de emisión generado por los fluoróforos excitados. Los filtros que se usaron son: cubos 41004, 41028, 31044v2 y 31000v2 respectivamente (Chroma Technologies Corp. (Brattleboro, Vermont).

2.3. Procesamiento de imágenes con VCell-ID y análisis de imágenes con Rcell.

Luego de la adquisición de imágenes se procedió a usar el programa VCell-ID para procesarlas y extraer información cuantitativa de las mismas (Chernomoretz et al., 2008; Gordon et al., 2007).

A continuación se analizó la información de las células individuales, generada por VCell-ID, usando el paquete de análisis estadístico de R (http://www.r-project.org) diseñado específicamente para VCell-ID. Este paquete Rcell a su vez se basa en el paquete ggplot2 (http://had.co.nz/ggplot2/).



Figura M3. Procesamiento de imágenes en VCell-ID. Se toman las fotografías de fluorescencia y de transmisión. VCell-ID asigna límites a cada célula individual en base a las fotos de transmisión y cuantifica la fluorescencia de cada canal (y otras múltiples variables) dentro del área asignada (Chernomoretz et al., 2008).

Para las distintas variables analizadas, Rcell procesa los datos y calcula los valores de las distintas variables que uno desee (media, mediana, desvío estándar, etc.). El valor predeterminado que calcula y grafica Rcell es la media y el error estándar de la media (s.e.m.), definido como la media por la raíz cuadrada del número de células analizado.

2.4. Cálculo de fluorescencia total.

La "respuesta transcripcional" de una célula, para cada reportero se define como la señal de fluorescencia total dentro de la célula, en una dado canal de <u>corregida</u> por la fluorescencia del entorno ("background") que rodea a cada célula. Para cada célula la fluorescencia total está representada por la variable f.tot, definida como la suma de intensidades de fluorescencia (fluorescencia "cruda") de todos los pixels incluidos dentro del área que VCell-ID asignó a esa célula (a.tot), en un dado canal de fluorescencia (por ejemplo f.tot.y, para el canal amarillo) luego se sustrae la fluorescencia del entorno. La fluorescencia del entorno, se calcula multiplicando la intensidad de fluorescencia del entorno, f.bg, por el número de pixels que ocupa una dada célula. La cuenta final que resulta es por ejemplo: Fluorescencia total = f.tot.y-(f.bg.y*a.tot).

2.5. Gráficos de distribución de frecuencia.

Los gráficos de distribuciones de frecuencia relativa se calcularon usando un número balanceado de células, muestreando al azar un número de células de aproximadamente 200 dependiendo del experimento. Los gráficos de densidad de frecuencia son generados por el paquete ggplot2 (http://had.co.nz/ggplot2/). Suman un área de 1. Básicamente se aplica una distribución suavizada en base al gráfico de histogramas de frecuencias relativas (http://had.co.nz/ggplot2/).



Figura M4. Gráfico de distribución relativa ("density plot" - http://had.co.nz/ggplot2/).

2.6. Cuantificación de la localización nuclear de Hog1. Métodos de microscopía confocal.

2.6.1. Procesamiento de las muestras.

Se crecieron las células por, al menos, 15 horas. Para lograr esto, típicamente se hicieron dos o tres diluciones en los medios correspondientes a cada experimento, de modo tal que luego de aproximadamente 15 horas los cultivos tuvieran una OD entre 0.05 y 0.1.

Al día siguiente se pipetearon 100 μ L de células en placas de microscopía de 96 posillos pretratadas con concanavalina A, como se describió previamente. La temperatura se mantuvo a 30 ⁰C durante todo el experimento.

2.6.2. Adquisición de imágenes confocales.

Las imágenes se tomaron con un microscopio invertido Olympus IX81 acoplado a un módulo confocal espectral FV1000 (Olympus, Latin America) usando un objetivo de inmersión en aceite 60X PlanApo (N.A.=1.4, Olympus[®]). Los filtros de excitación y emisión fueron los siguientes: para Hta2-CFP, 458 nm de excitación, y 470-510 nm de emisión; y para Hog1-Quadruple-Venus, 515 nm de excitación y 530-630 nm de emisión. Las imágenes se adquirieron de modo secuencial con dos rondas de adquisición de líneas e integración de tipo "line Kalman" (sequential mode, line acquisition y "line Kalman" integration type). Se verificó la ausencia de fluorescencia inespecífica adquiriendo imágenes de células de cepas que poseen sólo un fluoróforo Cyan o bien Venus usando la misma configuración de adquisición simultánea de ambos canales de fluorescencia antes descripta. El diámetro del "pinhole" se configuró en 300 nm Se adquirieron 6 planos focales de 0.21 µm de espesor para asegurar la presencia d el plano de máxima intensidad de fluorescencia que corresponde al plano focal del núcleo.

2.6.3. Procesamiento de imágenes y cuantificación. Análisis de variables de VCell-ID para cuantificar fluorescencia nuclear y citoplasmática.

Luego de la adquirir las imágenes, las mismas se procesaron con VCell-ID especificando como marca nuclear ("nuclear tag") al canal de CFP -ver (Chernomoretz et al., 2008)-.

Para cuantificar la intensidad de fluorescencia nuclear se usó como observable nuclear la variable generada por VCell-ID, "f.nucl1.y" -que cuantifica la fluorescencia dentro de un disco de aproximadamente 2 pixeles de radio centrado en el punto más brillante del canal elegido como marca nuclear- dividida por el área nuclear, variable "a.nucl1.y". En el caso de la intensidad de fluorescencia citoplasmática se eligió usar la fluorescencia de tres discos de 1 pixel de ancho que rodean a la célula. Se usó la suma de las variables f.m0, f.m1 y f.m2 dividida por la suma de las áreas a.m0, a.m1 y a.m2. La variable f.m0 corresponde a la fluorescencia de todos los pixels que coinciden con el borde celular y las f.m1 y f.m2 corresponden a la fluorescencia de todos los pixels localizados uno o dos pixels hacia adentro de la célula con respecto al borde celular respectivamente. Similarmente las áreas en donde se calculó esta fluorescencia son las variables a.m0, a.m1 y a.m2 (ver Figura M5).



Figura M5. Método de cuantificación de fluorescencia nuclear y citoplasmática (ver texto). a) Fotomontajes de canales de fluorescencia. Arriba. Los núcleos pueden verse en el canal de fluorescencia de CFP gracias a que la histona Hta2 está fusionada a CFP, en tanto que Hog1-Venus se observa en el canal de fluorescencia de YFP. Abajo. Solo canal de Hog1-Venus. b) intensidades de fluorescencia de las distintas variables de VCell-ID. c) Variables usadas para cuantificar Hog1-Venus en núcleo y citoplasma.

2.6.4. Cuantificación de fluorescencia nuclear en distintos planos focales de células individuales.

Al analizar las fotos de estos experimentos notamos que, en un mismo campo, distintas células presentan su plano ecuatorial en posiciones en Z ligeramente distintas y por esta razón cada una de ellas tiene su plano de máxima intensidad de fluorescencia en diferentes capas en Z. Más aún la posición de sus núcleos no necesariamente ocurre en el plano ecuatorial de una dada célula. Para considerar este factor el becario doctoral Alan Bush, de nuestro laboratorio, escribió una función llamada in.focus, que genera una variable "booleana" para cada célula que es añadida a la información de cada plano ("slice") de una serie en Z (o "Z stack"). Esta variable es verdadera solo para el plano ("slice") que presenta un valor máximo para una dada variable de VCell-ID escogida. Se aplicó esta función a la variable f.nucl1.c para encontrar donde se encuentra el plano ecuatorial de los núcleos para cada célula individual.



Figura M6. Análisis de serie de fotografías en el eje Z, para encontrar el plano de máxima intensidad de fluorescencia nuclear. Cada célula puede tener su núcleo en un distinto plano focal. Usando esta metodología determinamos el plano focal que presenta máxima fluorescencia nuclear.

Función "in focus":

```
append.var.in.focus<-function(X,focus.var=X$data$f.obs.y,in.focus.var.name="in.focus"){
    if(is.element("z.scan",names(X$data))){
        X<-append.lfv(X,focus.var,X$data$ucid+10000*X$data$z.scan,"max.focus.var",fun=max)
        X<-append.var(X,X$data$max.focus.var=focus.var,in.focus.var.name)
        X<-remove.var(X,"max.focus.var")
    } else {
        stop("z.scan not found in the dataset\n")
    }
    return(X)
}
Ex. X<-append.var.in.focus(X,focus.var=f.nucl1.c)</pre>
```

2.7. Métodos para experimentos de agrupamiento jerárquico ("Hierarchical clustering") de células individuales.

En cada experimento para hacer análisis por agrupamiento jerárquico se analizaron 7 campos diferentes para lograr un tamaño muestral de células grande. Las películas en estos experimentos son muy extensas (410 min.) y por esta razón es importante partir de una densidad de células pequeña en cada campo, de modo tal de que las mismas estén bien separadas y no se superpongan al crecer o dividirse. Luego de procesar las imágenes con VCell-ID se usó Rcell para filtrar las células reconocidas incorrectamente y también las células que no fueron reconocidas en muchos tiempos de las películas. Para este análisis se decidió usar la variable densidad de fluorescencia de YFP, ya que esta es más robusta a posibles artefactos de reconocimiento de los límites rodeando a cada célula. Luego de los aplicar los filtros quedó un número aproximado de células.

El agrupamiento jerárquico ("hierarchichal clustering") se llevó a cabo usando el programa "Gene cluster 3.0" [http://bonsai.hgc.jp/~mdehoon/software/cluster/]. En estos experimentos se quiere agrupar a las células en base al patrón temporal de expresión del reportero transcripcional de HOG, P_{STL1}-YFP. Para agrupar las células individuales se usó como variable:

$\frac{\Delta(YFPdensity)}{\Delta(time)}$

Se probaron varias métricas ("similarity metrics") y métodos de agrupamiento ("clustering methods") y se encontró que la mejor forma de separar los grupos de células es usando la métrica: "centered correlation" y algoritmo "average linkage". Con este algoritmo fuimos capaces de identificar los grupos principales que muestran un mismo comportamiento. Por ejemplo: un grupo con un aumento transcripcional temprano seguido de dilución de la intensidad de fluorescencia o grupos con múltiples activaciones transcripcionales separadas por períodos de inactivación.

2.8. Experimentos de cinética de recuperación de volumen.

2.8.1. Preparación de las muestras.

Se crecieron las células por, al menos, 15 horas controlando la OD (densidad óptica) de modo tal que las células se encontraran en fase de crecimiento exponencial. Para lograr esto, típicamente se hicieron dos o tres diluciones en los medios correspondientes a cada experimento, de modo tal que luego de aproximadamente 15 horas los cultivos tuvieran una OD entre 0.05 y 0.1.

El día siguiente se pipetearon las células en placas de microscopía de 96 posillos pretratadas con ConA (como se explicó antes). Luego se centrifugo la placa a 3000 rpm por 30 segundos. Se lavó una vez con 400 μ L del mismo medio que se crecieron las células y se finalmente se agregaron 200 μ L de medio con o sin α factor. Se esperó durante 4 horas y se procedió a comenzar el experimento de cinética de recuperación de volumen post shock osmótico.

2.8.2. Adquisición de imágenes.

Se tomaron imágenes esencialmente como se explicó antes usando un microscopio de fluorescencia invertido Olympus IX81 (Chernomoretz et al., 2008; Colman-Lerner et al., 2005; Gordon et al., 2007). Brevemente, se creó una rutina en programa Metamorph que toma fotografías de dos posillos distintos automáticamente. El primer posillo habitualmente tiene células con tratamiento y el segundo las células control. Seguidamente se comenzó la adquisición de imágenes posicionando manualmente el plano focal de las células (desde este tiempo en adelante el foco va a variar). Para cada tiempo se adquirió una serie de fotos en Z separadas 0.4 µm entre sí cubriendo 1.6 µm a cada lado del plano focal. Primero se tomaron fotos cada 1 minuto durante 10 minutos de las células tratadas con α factor y control para cuantificar el volumen previo al shock hiperosmótico que se va a usar para analizar la cinética de recuperación de volumen. Luego se estimuló el primer posillo se esperaron 30 segundos y se prosiguió con la adquisición de fotos. Se calculó el tiempo que tarda la rutina de adquisición de la serie de 8 fotos en Z y se especificó una orden de "retraso" ("delay") en la rutina de adquisición para poder estimular el segundo posillo y adquirir las fotografías a un tiempo equivalente al del primer posillo. Luego del shock hiperosmótico se tomaron fotos cada 1 minuto durante 120 minutos.

2.8.3. Procesamiento de imágenes y análisis de datos.

Para cada serie en Z (o "Z stack") se seleccionó la foto que está en foco aprovechando las siguientes observaciones. Primero, notamos que la variable "coeficiente de kurtosis" de la distribución de intensidades de pixeles de las imágenes de transmisión (calculada por ImageJ [http://rsbweb.nih.gov/ij/] presenta un máximo en el plano ("Z slice") de la serie de fotos en Z ("Z stack") que está en foco; y segundo, la variable "desvio standard" de esta distribución presenta un mínimo en el plano focal. Teniendo en cuenta esto generamos una nueva variable en R, que se aplica a cada serie en Z ("Z stack"), llamada "kurtosis.focus". Esta vale cero para la imagen en foco (máximo "coeficiente de Kurtosis") y aumenta hacia una dirección en Z (Ej. 1, 2, 3, etc.) y disminuye en la ora dirección focal en Z (Ej. -1, -2, -3). Seleccionamos las imágenes desenfocadas 1.2 μm equivalente a "kurtosis.focus" igual a -3 para seguir adelante procesándolas con VCell-ID. Luego usamos la variable de VCell-ID "sphere.vol" para cuantificar el volumen celular.

2.9. Cuantificación de "shmoos".

Para el experimento de "dosis respuesta" donde se cuantificó el porcentaje de "shmoos" para las distintas concentraciones de feromona. Se usó el siguiente criterio para definir una célula con morfología "shmoo" (ver figura). Se definen como "shmoo" aquellas células que presentan proyecciones de apareamiento ahusadas con una curvatura cóncava en su base. Estas imágenes se cuantificaron usando la herramienta "cell counter" del programa de análisis "ImageJ" [http://rsbweb.nih.gov/ij/].

Criterio de cuantifición de "shmoos"CategoriasImage: Criterio de cuantifición de "shmoos"27±6%"Shmoos"Image: Criterio de cuantifición de "shmoos"Image: Categorias28±2%"Peanut" IIImage: Criterio de cuantifición de "shmoos"Image: Categorias28±2%"Peanut" IIImage: Criterio de cuantifición de "shmoos"Image: CategoriasImage: CategoriasImage: CategoriasImage: Criterio de cuantifición de "shmoos"Image: CategoriasImage: CategoriasImage: CategoriasImage: Criterio de cuantifición d

Crecidas 16 hs. en SC + 1 M sorbitol y tratadas con α factor 10 nM 180 min n=778.

Figura M7. Criterio de cuantificación de shmoos (ver texto). Estás son las mismas células que se muestran en el texto principal. La morfología "shmoo" se reconoce al observar que las células presentan proyecciones de apareamiento ahusadas. La base de la proyección de apareamiento es muy cóncava. A medida que esta concavidad se va suavizando pasamos a ver la morfología "peanut". Distinguimos dos categorías más dentro de "peanut", la primera son aquellas células que presentan un estrangulamiento cerca del medio de la célula y luego ambos lados tienen un diámetro similar, en tanto que en la segunda se observa que las células son asimétricas ya que difieren en su tamaño a cada lado

del estrangulamiento. La cuarta categoría que clasificamos son células de gran tamaño que podrían corresponder a la morfología "peanut" en crecimiento o bien a células arrestadas creciendo isotrópicamente.

3. Medición de glicerol extracelular.

3.1. Experimento y preparación de muestras.

Se crecieron cultivos celulares en medio SC más Sorbitol 1M a 30 ⁰C durante 15-20 hs. Se crecieron varias diluciones de modo tal que la OD al día siguiente fuera aproximadamente 0.2. El día siguiente se filtró el medio usando filtros de esteres de celulosa de 0.45 µm de poro (cellulose ester filtering discs of 0.45µm pore size, 25mm de diameter - Millipore, USA, cat. number HAWP02500) en un equipo de filtración múltiple, "1225 manifold" (Millipore, USA, cat. number XX2702550) y se resuspendieron las células en un medio fresco a 30 ⁰C. Este paso es necesario ya que de otro modo el medio extracelular tendría glicerol (y otros componentes) secretado por las células por su pasado previo (en este caso las 15-20 hs de crecimiento durante toda la noche). Luego se dividió el cultivo resuspendido en dos de 30 mL cada uno para comenzar el experimento. Uno de los cultivos se estimuló con 5 μ L de α factor mientras que el cultivo control no fue estimulado. Durante el experimento se fueron filtrando 6.5 mL de cada cultivo a los tiempos 0, 100, 200 y 300 minutos, y se colectó la solución filtrada en tubos Falcon de 15 mL dispuestos en una gradilla de tubos del "manifold 1225". Luego se evaporó el etanol presente en las muestras usando un equipo de vacío, "Speed-Vac" durante 30 minutes (se midió el volumen celular antes y después de tratar en el "Speed-Vac" ya que la evaporación llego a ser de hasta un 20%). Las soluciones obtenidas se dializaron filtrando con microtubos de diálisis (Amicom, Ultra <3 KDa (UFC500396-Millipore, USA)), para quitar compuestos de alto peso molecular. Luego de estos procesamientos las muestras se sometieron a una cuantificación por HPLC (ver más abajo).

Adicionalmente se usó un tercer cultivo que sirvió para tener un valor de referencia de los niveles de glicerol del experimento. Esto es se sometieron las células del cultivo de referencia a un shock hipo-osmótico que provoca una liberación masiva de glicerol intracelular en tan solo 3 minutos (Luyten et al., 1995; Tamas et al., 1999). Para hacerlo se filtraron 6.5 mL de un cultivo sin tratar y se resuspendieron las células en un medio SC sin sorbitol.

En estos mismos experimentos también se colectaron muestras a 0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 minutos, se les agregó cicloheximida (100 μ g/mL, concentración final) y se midió: (i) la OD₆₀₀, y (ii) se tomaron fotografías en el microscopio de fluorescencia y se procesaron las fotos con VCell-ID para cuantificar las respuestas de los reporteros transcripcionales, el volumen celular y el número de células por microscopia (también se contando en un hemocitómetro).

3.2. Cuantificación de glicerol.

La concentración de glicerol se midió por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, ICS chromatographic system, DIONEX), como fue descripto previamente (Tarocco et al., 2005). Usamos una columna de intercambio iónico (HPAEC) y la señal se detecto con un detector electroquímico. Se usó la columna CarboPac MA1 (4x250mm, DIONEX), con una columna de "guarda" CarboPac MA1 ("guard column"

4x50mm, DIONEX). Se usó una solución hidróxido de sodio 200 mM como eluyente. Se llevó a cabo una corrida isocrática (composición de eluyente constante) con un flujo de usó un flujo 1 mL/min. Se inyectaron 20 μL de muestra en el "loop" de inyección. Se lavó la columna 3 veces con agua luego de cada corrida. La curva estándar de glicerol se hizo entre 0 y 4000 ng. Las muestras se diluyeron, típicamente diluciones 1/5to - 1/10mo.

Luego de la cuantificación de glicerol se aplicó la siguiente transformación matemática para calcular la masa de glicerol producida por célula .

$$\frac{Glycerol(pmols)}{cell}\Big|_{tx} = \frac{\left[Glycerol\right]_{tx}(ng/\mu L)}{OD_{tx}} * \left(\frac{OD=1}{3*10^7 cels/mL}\right)\Big|_{Vrel=1} * Vrel_{tx} * \left(\frac{10^6 \mu L}{1mL}\right)$$

donde $Vrel_{tx}$ es el volumen es el volumen de las células a un dado tiempo (tx) relativo al tiempo cero. En la figura se muestran los cambios en volumen relativo, $OD_{600 \text{ nm}}$ y número de células para los experimentos de medición de glicerol extracelular.



Figura M8. Medición de glicerol extracelular. Los niveles de glicerol extracelular se presentan en la Figura R27a. a, arriba) Esquema del experimento. Abajo) Cuantificación de densidad óptica a 600 nm. b) Cuantificación efectuada por microscopía del número de células. c) Volumen relativo a volumen inicial. En todos los casos las barras de error representan el desvio estándar de tres experimentos independientes. En el cado de b y c se fotografiaron 2 campos por experimento (n~300, por campo).

4. Métodos de manipulación de proteínas.

4.1. Preparación de muestras proteicas.

Se prepararon las muestras a usando una modificación del protocolo descripto por Yu y col. (Yu et al., 2008). Para cada punto se mezclaron 5 mL de células en fase exponencial de crecimiento (OD 600nm \leq 0.2) con una mezcla de 412.5 μ L de NaOH 10M más 50 μ L de β -mercaptoetanol 100% (14M) (preparada inmediatamente antes de usar en el experimento). Se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos, luego se pipetearon 700 μ L de ácido tricloroacético 100% (TCA, (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), se mezclaron las muestras y se incubó 10 minutos en hielo. Luego se centrifugó a 4000 g, 10 minutos (en caso de usar volúmenes más pequeños hasta 1.2 mL de cultivo, es preferible hacer todo en tubos Eppendorf y centrifugar

en microcentrífuga a >16000g) y se aspiró el sobrenadante. A continuación se agregó 1 mL de una solución de acetona fría (70%v/v en buffer TrisHCl 100 mM pH 6.8 - a 4 $^{\circ}$ C) y se resuspendió el pelet por sonicado -20 segundos a una amplitud de 40% (Sonic Dismembrator, Fisher Scientific, USA). Seguidamente se transfirió esta suspensión a un tubo Eppendorf y centrifugó en microcentrífuga a >16000g por 1 minuto. Se aspiro el sobrenadante y se dejo secar el pelet.

Los pelets se resuspendieron en 40 μ L de "buffer de resuspensión" (10 mM Tris pH 6.8, 2% SDS), previamente pre-calentado a 100 °C. Se mezcló en un "disruptor genie" (Scientific Industries, USA) por 2 minutes y luego se incubo 5 minutos a 100 °C para resuspender las proteínas. Luego se dejo 2 minutos a temperatura ambiente y 5 minutos a -70 °C (esto ayuda a la precipitación del pelet), se descongelaron las muestras y se centrifugó 10 minutos a >16000g para precipitar los restos celulares ("cellular debris") antes de la cuantificación de proteínas. El sobrenadante con las proteínas se transfirió a un tubo de microcentrífuga nuevo (con mucho cuidado de no tomar ninguna porción de pelet, ya que esto arruinaría la cuantificación de proteínas). Se cuantificaron las proteínas usando el kit "BCA Protein Assay" (Pierce Cat# 23225), que se puede usar con muestras conteniendo incluso hasta un 10% de SDS. Cuantificacón: (i) se tomaron 3 μ L de muestra y se hizo una dilución 1/25 con 72 μ L de agua mQ, (ii) separadamente se mezclaron los reactivos A y B en una proporción 50:1 (el volumen final dependerá del número de muestras), (iii) se pipetean 200 μ L de esta mezcla en cada posillo de una placa de Elisa de 96 posillos, (iv) Se pipetearon por duplicado 25 μ L de cada muestra en los distintos posillos y también de una curva Standard de proteínas (0, 0.125, 0.25, 0.5, 0.75 y 1 mg/mL) (v) se leyó la absorbancia a 570 nm.

Luego de la cuantificación las muestras se diluyeron al medio con un buffer (10 mM Tris pH 6.8, 0.002% bromophenol blue, 100 mM dithiothreitol, 2% SDS, 50% glicerol), apropiado para realizar electroforesis en geles desnaturalizantes SDS-PAGE. Las muestras se calentaron a 90 ^oC por 5 minutos y se sembraron.

4.2. Electroforesis, transferencia y cuantificación.

Se realizaron electroforesis en geles de poliacrilamida 12% (Tris-HCl/glycine polyacrylamide gels), luego se transfirieron las proteínas a membranas PVDF (0.2 µm Immobilon-P(SQ) PVDF membrane (Millipore, Billerica, MA)) por 45-60 minutes a corriente fija 225 mA usando un sistema de transferencia húmeda (Mini Protean Western transfer system (Bio-Rad)) o bien semi seco (semi-dry - TE 77 PWR Semi-Dry Transfer Unit from GE Healthcare, formerly Amersham Biosciences). Luego se bloquearon las membranas por 1 hora a temperatura ambiente usando una solución de bloqueo [TBS, 10 mM Tris pH 7.4, 150 mM NaCl más 1/10mo de volumen de Western Blocking Reagent (WBR) (Roche, Alameda, CA) o bien caseina 1% (Sigma C-5890). Se cuantificaron las MAPKs fosforiladas: Fus3, Kss1 y Slt2/Mpk1 con el anticuerpo rabbit anti-phosphoP44/P42 (#9101L ,Cell Signaling Technology, Danvers, MA) y Hog1 con el anticuerpo rabbit anti-phosphoP38 (#9211L ,Cell Signaling Technology, Danvers, MA) en una dilución 1:1000. Este anticuerpo detecta las variantes fosforiladas de la MAPK de modo dual en Tyr y Thr o bien la fosforilación de cualquiera de estos aminoácidos por separado, por esta razón también usamos otro anticuerpo que solo detecta la fosforilación dual de Hog1 (#9216, Cell Signaling Technology, Danvers, MA). Estos anticuerpos se resuspendieron en una buffer TBS (con 1/10mo de volumen de WBR (o bien 1% caseina), y 0.05% Tween). También se detectó Hog1 total usando el anticuerpo Goat anti-Hog1 (yC-20 SC-6815, Santa Cruz-Biotechnology, Inc.) en una dilución 1:5000. Se lavaron las transferencias con TBS tween 0.05%(v/v) y se incubaron 1 hora a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios en 800 nm donkey anti-rabbit #611-731-127 (Rockland Inc., Gilbertsville, PA) y 680 nm donkey anti-goat A21084, fluorophore-conjugated secondary antibodies (Invitrogen, Carlsbad, CA), diluidos 1:10,000 en buffer TBS tween 0.05% más 1/20vo de WBR o bien caseina 0.5%. Se hicieron 2 lavados con in TBS + tween 0.05% y dos más con TBS sin tween de 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se escanearon con un escáner laser infrarojo Odyssey (Li-Cor Biosciences, Lincoln, NE). Se cuantificó la intensidad de las bandas usando una normalización considerando el "background" local de arriba y abajo de las bandas.

Para otros experimentos usamos anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa (1/10000, Biorad), resuspendidos en buffer TBS, 1/20vo volumen de WBR (o caseina 0.05% m/v), 0.05% tween. Incubamos a temperatura ambiente 1 hora. Se hicieron 2 lavados con in TBS + tween 0.05% y dos más con TBS sin tween de 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se visualizaron las bandas por el método lumínico usando el reactivo Pierce SuperSignal ECL Western Blotting Detection Reagents (#34075) detectando la luminiscencia con el equipo de análisis LAS-1000 (FujiFilm).

Para los experimentos sin bandas control se tiñeron los geles donde se habían corrido las proteínas con coomasie R-250 (Gibco cat# 15528-011).

5. Métodos de manipulación de DNA.

5.1. Primers.

Se diseñaron de modo tal que las temperaturas de fusión fueran de alrededor de 60 ^oC, con un porcentaje de CGs del 50%. Además se verificó que no hubiera autohibridación de los mismos, ni complementariedad ni formación de horquillas ("hairpins"). Estas propiedades se analizaron en la página web http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html.

5.2. PCRs.

5.2.1. PCR común.

En general usamos la *Taq* polimerasa "Mango" (Bioline®). Alternativamente también usamos otras marcas como *Taq* (Invitrogen[®]), Biolasa (Bioline[®]), *Taq* turbo (Fermentas[®]).

Para una reacción de volumen final de 50 µL:

1 µL de solución de DNA (~1ng),

2.5 μL de solución 20 μM de "primers",

- 2 µL de MgCl₂ 50 mM (2mM concentración final),
- 1 µL de dNTPs 25 mM (0.5 mM concentración final),
- 1 μ L de polimerasa (stock 1U/ μ L) 5 unidades finales.

 $5\,\mu\text{L}$ buffer 10x,

H₂O hasta completar volumen.

Ciclos.

- 1. 95 ⁰C 10 min.
- 2. 95 ⁰C 30-45 seg.
- 3. 58 ⁰C 30-45 seg.
- 4. 72 °C 30 seg.-1min. por kb,
- 5. Volver a paso 2, 30 veces.
- 6. 72 ⁰C 5 min.

En el caso de PCRs donde se debe evitar una alta tasa de mutación se usaron polimerasas con "lectura de prueba" o "proofreading". Por ejemplo. Herculasa (Stratagene[®]), *Pfx* (Invitrogen[®]), *Pfx50* (Invitrogen[®]), *HiFi* (Invitrogen[®]).

Para una reacción de volumen final de 50 µL:

- 1 μ L de solución de DNA (~1ng),
- 2.5 μL de solución 20 μM de "primers",
- $2 \,\mu\text{L}$ de MgSO₄ 50 mM (2mM concentración final),
- 1 μL de dNTPs 25 mM (0.5 mM concentración final),
- $5\,\mu\text{L}$ buffer 10x,
- 0.2-1 μ L de polimerasa (stock 5U/ μ L) 1-2.5 unidades finales.
- H₂O hasta completar volumen.

Ciclos.

- 1. 95 ⁰C 10 min.
- 2. 95 °C 30-45 seg.
- 3. 58 ⁰C 30-45 seg.
- 4. 68 ^oC 30 seg.-1min. por kb,
- 5. Volver a paso 2, 30 veces.
- 6. 68 ⁰C 5 min.

5.2.2. "Colony PCR".

Para las "colony" PCRs se usó en general un volumen final de 20 μ L.

Para bacterias simplemente se "pica" con un escarbadientes estéril una pequeña porción de una colonia y se agrega al tubo de reacción de PCR.

Para levaduras primero se saca una buena cantidad (pelet de 1-2mm de diámetro) de células de una colonia y se sumergen en un tubo eppendorf conteniendo 50 μL de NaOH 50 mM.

Se calienta a 95 0 C 5-10 minutos y se centrifugan las células. Luego se toma 1 μ L de células de este sobrenadante. El rendimiento de estas PCRs aumenta significativamente si se agregan 0.02 Unidades de *HiFi* (Invitrogen[®]).

5.2.3. Purificación de DNA de geles de agarosa.

Se hizo una electroforesis en gel de agarosa 0.8% (m/v) teñido con BrEt 1 µg/mL (concentración final). Se cortó la banda de interés y se usó el kit QIAEXII Gel Extraction (QIAGEN[®]) o bien QIAquick Gel Extraction (QIAGEN[®]).

5.2.4. Purificación de DNA plasmídico.

Se usaron los kits de mini- o midipreparación de varias marcas (QIAGEN[®], Invitrogen[®], Sigma[®], RBC[®], etc) y se siguieron los protocolos de los fabricantes.

5.2.5. Cuantificación de DNA.

Se cuantificó por espectrofotometría analizando la absorbancia a 260 nm utilizando el equipo NanoDrop (Thermo Fisher[®]).

5.2.6. Ensayos de Halo.

Hicimos los ensayos de halo como ha sido descrito antes (Ausubel et al., 1987-2006; Guthrie y Fink, 1991). Brevemente, se plaquearon 1.10^6 células en placas de agar conteniendo diferentes medios: SC o SC suplementado con sorbitol, manitol o glicerol a distintas osmolaridades. Luego de plaquear las células se dispuso un circule de papel Whatman de 5 mm de diámetro en el centro de la placa de Petri y se pipetearon 3 μ L de α factor 1 mM.

6. Determinación de osmolaridad de los medios.

La osmolaridad de los medios se midió en un Osmómetro Vapro 5520 (Wescor, inc.). El método de medición de este equipo se basa en medir la presión de vapor de las soluciones. La presión de vapor es una propiedad coligativa de las soluciones que está afectada por el número de partículas de soluto. Se pipetean 10 µL de solución a medir en un disco de filtro Whatman de 4 mm. La misma debe tener una osmolaridad en el rango de 100 a 1000 mOsm. Para calibrar el equipo se deben usar 3 soluciones de 100, 290 y 1000 mOsm.

Referencias

Referencias

Aguilar, P.S., Engel, A., y Walter, P. (2007). The plasma membrane proteins Prm1 y Fig1 ascertain fidelity of membrane fusion during yeast mating. Mol Biol Cell *18*, 547-556.

Alepuz, P.M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G., y Posas, F. (2003). Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. Embo J *22*, 2433-2442.

Alepuz, P.M., Jovanovic, A., Reiser, V., y Ammerer, G. (2001). Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. Mol Cell *7*, 767-777.

Altschuler, S.J., y Wu, L.F. (2010). Cellular heterogeneity: do differences make a difference? Cell 141, 559-563.

Arkowitz, R.A. (2009). Chemical gradients y chemotropism in yeast. Cold Spring Harb Perspect Biol 1, a001958.

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., y Struhl, K. (1987-2006). Current protocols in molecular biology. (New York, N.Y., John Wiley & Sons, Inc.).

Bardwell, L. (2005). A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. Peptides 26, 339-350.

Barnett, J.A., y Robinow, C.F. (2002). A history of research on yeasts 4: cytology part II, 1950-1990. Yeast 19, 745-772.

Bcc-Research (2010). Yeasts, Yeast Extracts, Autolysates y Related Products: The Global Market.

Beese, S.E., Negishi, T., y Levin, D.E. (2009). Identification of positive regulators of the yeast fps1 glycerol channel. PLoS Genet *5*, e1000738.

Bermejo, C., Rodriguez, E., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J.M., Rodriguez de la Concepcion, M.L., Rivas, C., Arias, P., Nombela, C., Posas, F., y Arroyo, J. (2008). The sequential activation of the yeast HOG y SLT2 pathways is required for cell survival to cell wall stress. Mol Biol Cell *19*, 1113-1124.

Bettinger, B.T., y Amberg, D.C. (2007). The MEK kinases MEKK4/Ssk2p facilitate complexity in the stress signaling responses of diverse systems. Journal of cellular biochemistry *101*, 34-43.

Bettinger, B.T., Clark, M.G., y Amberg, D.C. (2007). Requirement for the polarisome y formin function in Ssk2pmediated actin recovery from osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae. Genetics *175*, 1637-1648.

Bishop, A.C., Shah, K., Liu, Y., Witucki, L., Kung, C., y Shokat, K.M. (1998). Design of allele-specific inhibitors to probe protein kinase signaling. Curr Biol *8*, 257-266.

Bishop, A.C., y Shokat, K.M. (1999). Acquisition of inhibitor-sensitive protein kinases through protein design. Pharmacol Ther *82*, 337-346. Bradham, C., y McClay, D.R. (2006). p38 MAPK in development y cancer. Cell Cycle 5, 824-828.

Breitkreutz, A., Choi, H., Sharom, J.R., Boucher, L., Neduva, V., Larsen, B., Lin, Z.Y., Breitkreutz, B.J., Stark, C., Liu, G., *et al.* (2010). A global protein kinase y phosphatase interaction network in yeast. Science *328*, 1043-1046.

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

Cargnello, M., y Roux, P.P. (2011). Activation y function of the MAPKs y their substrates, the MAPK-activated protein kinases. Microbiol Mol Biol Rev 75, 50-83.

Changwei, Z., Mingyong, X., y Ranran, W. (2007). Afr1p has a role in regulating the localization of Mpk1p at the shmoo tip in Saccharomyces cerevisiae. FEBS Lett *581*, 2670-2674.

Chen, R.E., y Thorner, J. (2007). Function y regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim Biophys Acta *1773*, 1311-1340.

Chernomoretz, A., Bush, A., Yu, R., Gordon, A., y Colman-Lerner, A. (2008). Using Cell-ID 1.4 with R for microscope-based cytometry. Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M Ausubel [et al *Chapter 14*, Unit 14 18.

Clotet, J., Escote, X., Adrover, M.A., Yaakov, G., Gari, E., Aldea, M., de Nadal, E., y Posas, F. (2006). Phosphorylation of Hsl1 by Hog1 leads to a G2 arrest essential for cell survival at high osmolarity. Embo J 25, 2338-2346.

Clotet, J., y Posas, F. (2007). Control of cell cycle in response to osmostress: lessons from yeast. Methods Enzymol 428, 63-76.

Cohen, A.A., Geva-Zatorsky, N., Eden, E., Frenkel-Morgenstern, M., Issaeva, I., Sigal, A., Milo, R., Cohen-Saidon, C., Liron, Y., Kam, Z., *et al.* (2008). Dynamic proteomics of individual cancer cells in response to a drug. Science *322*, 1511-1516.

Collister, M., Didmon, M.P., MacIsaac, F., Stark, M.J., MacDonald, N.Q., y Keyse, S.M. (2002). YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with y inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in S. cerevisiae. FEBS Lett *527*, 186-192.

Colman-Lerner, A., Gordon, A., Serra, E., Chin, T., Resnekov, O., Endy, D., Pesce, C.G., y Brent, R. (2005). Regulated cell-to-cell variation in a cell-fate decision system. Nature *437*, 699-706. Davenport, K.R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D.E., y 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 Nadal, E., Ammerer, G., y Posas, F. (2011). Controlling gene expression in response to stress. Nat Rev Genet 12, 833-845.

de Nadal, E., y Posas, F. (2010). Multilayered control of gene expression by stress-activated protein kinases. Embo J 29, 4-13.

Dihazi, H., Kessler, R., y Eschrich, K. (2004). High osmolarity glycerol (HOG) pathway-induced phosphorylation y activation of 6-phosphofructo-2-kinase are essential for glycerol accumulation y yeast cell proliferation under hyperosmotic stress. J Biol Chem *279*, 23961-23968.

Dohlman, H.G., y Thorner, J.W. (2001). Regulation of G protein-initiated signal transduction in yeast: Paradigms y Principles. Annu Rev Biochem *70*, 703-754.

Elowitz, M.B., Levine, A.J., Siggia, E.D., y Swain, P.S. (2002). Stochastic gene expression in a single cell. Science *297*, 1183-1186.

Errede, B., Cade, R.M., Yashar, B.M., Kamada, Y., Levin, D.E., Irie, K., y Matsumoto, K. (1995). Dynamics y organization of MAP kinase signal pathways. Mol Reprod Dev *42*, 477-485.

Escote, X., Zapater, M., Clotet, J., y Posas, F. (2004). Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. Nat Cell Biol *6*, 997-1002.

Ferreira, C., y Lucas, C. (2007). Glucose repression over Saccharomyces cerevisiae glycerol/H+ symporter gene STL1 is overcome by high temperature. FEBS Lett *581*, 1923-1927.

Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C., Lucas, C., y Brandt, A. (2005). A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H+ symporter in Saccharomyces cerevisiae. Mol Biol Cell *16*, 2068-2076.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., Botstein, D., y Brown, P.O. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. Mol Biol Cell *11*, 4241-4257.

Gascoigne, K.E., y Taylor, S.S. (2008). Cancer cells display profound intra- y interline variation following prolonged exposure to antimitotic drugs. Cancer cell *14*, 111-122.

Giaever, G., Chu, A.M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., *et al.* (2002). Functional profiling of the Saccharomyces cerevisiae genome. Nature *418*, 387-391.

Giot, L., y Konopka, J.B. (1997). Functional analysis of the interaction between Afr1p y the Cdc12p septin, two proteins involved in pheromone-induced morphogenesis. Mol Biol Cell *8*, 987-998.

Gordon, A., Colman-Lerner, A., Chin, T.E., Benjamin, K.R., Yu, R.C., y Brent, R. (2007). Single-cell quantification of molecules y rates using open-source microscope-based cytometry. Nat Methods *4*, 175-181.

Guthrie, C., y Fink, G.R. (1991). Methods in Enzymology, Guide to Yeast Genetics y Molecular Biology (San Diego, California 92101, Academic Press).

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

Hao, N., Nayak, S., Behar, M., Shanks, R.H., Nagiec, M.J., Errede, B., Hasty, J., Elston, T.C., y Dohlman, H.G. (2008). Regulation of cell signaling dynamics by the protein kinase-scaffold Ste5. Mol Cell *30*, 649-656.

Hartwell, L. (2002). NOBEL LECTURE: Yeast y Cancer. Bioscience Reports V22, 373-394.

Hartwell, L.H. (1974). Saccharomyces cerevisiae cell cycle. Bacteriol Rev 38, 164-198.

Hayashi, M., y Maeda, T. (2006). Activation of the HOG pathway upon cold stress in Saccharomyces cerevisiae. J Biochem *139*, 797-803.

Heiman, M.G., y Walter, P. (2000). Prm1p, a pheromone-regulated multispanning membrane protein, facilitates plasma membrane fusion during yeast mating. J Cell Biol *151*, 719-730.

Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast Saccharomyces cerevisiae. Microbiol Rev 52, 536-553.

Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling y osmoadaptation in yeasts. Microbiol Mol Biol Rev 66, 300-372.

Hughes, T.R., Marton, M.J., Jones, A.R., Roberts, C.J., Stoughton, R., Armour, C.D., Bennett, H.A., Coffey, E., Dai, H., He, Y.D., *et al.* (2000). Functional discovery via a compendium of expression profiles. Cell *102*, 109-126.

Jin, H., Carlile, C., Nolan, S., y Grote, E. (2004). Prm1 prevents contact-dependent lysis of yeast mating pairs. Eukaryot Cell 3, 1664-1673.

Kamada, Y., Jung, U.S., Piotrowski, J., y 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.

Kruppa, M., y Calderone, R. (2006). Two-component signal transduction in human fungal pathogens. FEMS Yeast Res *6*, 149-159.

Kruppa, M., Goins, T., Cutler, J.E., Lowman, D., Williams, D., Chauhan, N., Menon, V., Singh, P., Li, D., y Calderone, R. (2003). The role of the Candida albicans histidine kinase [CHK1) gene in the regulation of cell wall mannan y glucan biosynthesis. FEMS Yeast Res *3*, 289-299.

Kruppa, M., Jabra-Rizk, M.A., Meiller, T.F., y Calderone, R. (2004a). The histidine kinases of Candida albicans: regulation of cell wall mannan biosynthesis. FEMS Yeast Res 4, 409-416.

Kruppa, M., Krom, B.P., Chauhan, N., Bambach, A.V., Cihlar, R.L., y Calderone, R.A. (2004b). The twocomponent signal transduction protein Chk1p regulates quorum sensing in Candida albicans. Eukaryot Cell *3*, 1062-1065.

Lam, H.Y., Kim, P.M., Mok, J., Tonikian, R., Sidhu, S.S., Turk, B.E., Snyder, M., y Gerstein, M.B. (2010). MOTIPS: automated motif analysis for predicting targets of modular protein domains. BMC Bioinformatics *11*, 243.

Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in Saccharomyces cerevisiae. Microbiol Mol Biol Rev *69*, 262-291.

Levin, D.E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in Saccharomyces cerevisiae: the cell wall integrity signaling pathway. Genetics *189*, 1145-1175.

Longtine, M.S., McKenzie, A., III, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., y Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile y economical PCR-based gene deletion y modification in Saccharomyces cerevisiae. Yeast *14*, 953-961.

Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., y Hohmann, S. (1994). The FPS1 gene product functions as a glycerol facilitator in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Folia Microbiol (Praha) *39*, 534-536.

Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M., y Hohmann, S. (1995). Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake y efflux y is inactive under osmotic stress. Embo J *14*, 1360-1371.

Ma, W., Trusina, A., El-Samad, H., Lim, W.A., y Tang, C. (2009). Defining network topologies that can achieve biochemical adaptation. Cell *138*, 760-773.

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

Martin, B.R., Giepmans, B.N., Adams, S.R., y Tsien, R.Y. (2005). Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence y affinity. Nat Biotechnol *23*, 1308-1314.

McClean, M.N., Mody, A., Broach, J.R., y Ramanathan, S. (2007). Cross-talk y decision making in MAP kinase pathways. Nat Genet *39*, 409-414.

Meitinger, F., Boehm, M.E., Hofmann, A., Hub, B., Zentgraf, H., Lehmann, W.D., y Pereira, G. (2011). Phosphorylation-dependent regulation of the F-BAR protein Hof1 during cytokinesis. Genes Dev *25*, 875-888.

Mettetal, J.T., Muzzey, D., Gomez-Uribe, C., y van Oudenaarden, A. (2008). The frequency dependence of osmo-adaptation in Saccharomyces cerevisiae. Science *319*, 482-484.

Mettetal, J.T., Muzzey, D., Pedraza, J.M., Ozbudak, E.M., y van Oudenaarden, A. (2006). Predicting stochastic gene expression dynamics in single cells. Proc Natl Acad Sci U S A *103*, 7304-7309.

Mok, J., Kim, P.M., Lam, H.Y., Piccirillo, S., Zhou, X., Jeschke, G.R., Sheridan, D.L., Parker, S.A., Desai, V., Jwa, M., et al. (2010). Deciphering protein kinase specificity through large-scale analysis of yeast phosphorylation site motifs. Sci Signal 3 (109), ra12.

Muller, B., y Grossniklaus, U. (2010). Model organisms--A historical perspective. J Proteomics 73, 2054-2063.

Muzzey, D., Gomez-Uribe, C.A., Mettetal, J.T., y van Oudenaarden, A. (2009). A systems-level analysis of perfect adaptation in yeast osmoregulation. Cell *138*, 160-171.

Muzzey, D., y van Oudenaarden, A. (2006). When it comes to decisions, myeloid progenitors crave positive feedback. Cell *126*, 650-652.

Nagiec, M.J., y Dohlman, H.G. (2012). Checkpoints in a yeast differentiation pathway coordinate signaling during hyperosmotic stress. PLoS Genet *8*, e1002437.

Nelson, B., Parsons, A.B., Evangelista, M., Schaefer, K., Kennedy, K., Ritchie, S., Petryshen, T.L., y Boone, C. (2004). Fus1p interacts with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase y Cdc42p morphogenesis signaling pathways to control cell fusion during yeast mating. Genetics *166*, 67-77.

O'Rourke, S.M., y Herskowitz, I. (1998). The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG y pheromone response MAPK pathways in Saccharomyces cerevisiae. Genes Dev *12*, 2874-2886.

O'Rourke, S.M., y Herskowitz, I. (2002). A third osmosensing branch in Saccharomyces cerevisiae requires the Msb2 protein y functions in parallel with the Sho1 branch. Mol Cell Biol *22*, 4739-4749.

Oehlen, L.J., y Cross, F.R. (1994). G1 cyclins CLN1 y CLN2 repress the mating factor response pathway at Start in the yeast cell cycle. Genes Dev *8*, 1058-1070.

Oehlen, L.J., y Cross, F.R. (1998). Potential regulation of Ste20 function by the Cln1-Cdc28 y Cln2-Cdc28 cyclindependent protein kinases. J Biol Chem *273*, 25089-25097.

Oliveira, R., y Lucas, C. (2004). Expression studies of GUP1 y GUP2, genes involved in glycerol active transport in Saccharomyces cerevisiae, using semi-quantitative RT-PCR. Curr Genet *46*, 140-146.

Olivera-Couto, A., Grana, M., Harispe, L., y Aguilar, P.S. (2011). The eisosome core is composed of BAR domain proteins. Mol Biol Cell *22*, 2360-2372.

Ozbudak, E.M., Thattai, M., Kurtser, I., Grossman, A.D., y van Oudenaarden, A. (2002). Regulation of noise in the expression of a single gene. Nat Genet *31*, 69-73.

Panadero, J., Pallotti, C., Rodriguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., y Prieto, J.A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem *281*, 4638-4645.

Patterson, J.C., Klimenko, E.S., y Thorner, J. (2010). Single-cell analysis reveals that insulation maintains signaling specificity between two yeast MAPK pathways with common components. Sci Signal *3*, ra75.

Pelet, S., Rudolf, F., Nadal-Ribelles, M., de Nadal, E., Posas, F., y Peter, M. (2011). Transient activation of the HOG MAPK pathway regulates bimodal gene expression. Science *332*, 732-735.

Petranovic, D., y Nielsen, J. (2008). Can yeast systems biology contribute to the understanding of human disease? Trends Biotechnol *26*, 584-590.

Philips, J., y Herskowitz, I. (1997). Osmotic balance regulates cell fusion during mating in Saccharomyces cerevisiae. J Cell Biol *138*, 961-974.

Raser, J.M., y O'Shea, E.K. (2004). Control of stochasticity in eukaryotic gene expression. Science *304*, 1811-1814.

Remenyi, A., Good, M.C., Bhattacharyya, R.P., y Lim, W.A. (2005). The role of docking interactions in mediating signaling input, output, y discrimination in the yeast MAPK network. Mol Cell *20*, 951-962.

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

Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., y Hohmann, S. (2000). The transcriptional response of Saccharomyces cerevisiae to osmotic shock. Hot1p y Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. J Biol Chem *275*, 8290-8300.

Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G., y Ruis, H. (1999b). Osmotic stressinduced gene expression in Saccharomyces cerevisiae requires Msn1p y the novel nuclear factor Hot1p. Mol Cell Biol *19*, 5474-5485.

Roberts, C.J., Nelson, B., Marton, M.J., Stoughton, R., Meyer, M.R., Bennett, H.A., He, Y.D., Dai, H., Walker, W.L., Hughes, T.R., *et al.* (2000). Signaling y circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. Science *287*, 873-880.

Rodriguez Limardo, R.G., Ferreiro, D.N., Roitberg, A.E., Marti, M.A., y Turjanski, A.G. (2011). p38gamma activation triggers dynamical changes in allosteric docking sites. Biochemistry *50*, 1384-1395.

Rodriguez-Pena, J.M., Garcia, R., Nombela, C., y Arroyo, J. (2010). The high-osmolarity glycerol (HOG) y cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. Yeast *27*, 495-502.

Rubio-Texeira, M., Van Zeebroeck, G., Voordeckers, K., y Thevelein, J.M. (2009). Saccharomyces cerevisiae plasma membrane nutrient sensors y their role in PKA signaling. FEMS Yeast Res *10*, 134-149.

Saengsawang, W., Mitok, K., Viesselmann, C., Pietila, L., Lumbard, D.C., Corey, S.J., y Dent, E.W. (2012). The F-BAR protein CIP4 inhibits neurite formation by producing lamellipodial protrusions. Curr Biol *22*, 494-501.

Saito, H., y Tatebayashi, K. (2004). Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. J Biochem 136, 267-272.

Santos, S.D., Verveer, P.J., y Bastiaens, P.I. (2007). Growth factor-induced MAPK network topology shapes Erk response determining PC-12 cell fate. Nat Cell Biol *9*, 324-330.

Sheu, Y.J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C., y Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins y signaling components involved in yeast cell morphogenesis. MolCell Biol *18*, 4053-4069.

Snyder, M., y Gallagher, J.E. (2009). Systems biology from a yeast omics perspective. FEBS Lett *583*, 3895-3899.

Tamas, M.J., Luyten, K., Sutherland, F.C., Hernandez, A., Albertyn, J., Valadi, H., Li, H., Prior, B.A., Kilian, S.G., Ramos, J., *et al.* (1999). Fps1p controls the accumulation y release of the compatible solute glycerol in yeast osmoregulation. Mol Microbiol *31*, 1087-1104.

Tarocco, F., Lecuona, R.E., Couto, A.S., y Arcas, J.A. (2005). Optimization of erythritol y glycerol accumulation in conidia of Beauveria bassiana by solid-state fermentation, using response surface methodology. Applied microbiology y biotechnology *68*, 481-488.

Thomason, P., y Kay, R. (2000). Eukaryotic signal transduction via histidine-aspartate phosphorelay. J Cell Sci *113 (Pt 18)*, 3141-3150.

Uchida, M., Sun, Y., McDermott, G., Knoechel, C., Le Gros, M.A., Parkinson, D., Drubin, D.G., y Larabell, C.A. (2011). Quantitative analysis of yeast internal architecture using soft X-ray tomography. Yeast *28*, 227-236.

Valadi, A., Granath, K., Gustafsson, L., y Adler, L. (2004a). Distinct intracellular localization of Gpd1p y Gpd2p, the two yeast isoforms of NAD+-dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase, explains their different contributions to redox-driven glycerol production. J Biol Chem *279*, 39677-39685.

Valadi, H., Valadi, A., Ansell, R., Gustafsson, L., Adler, L., Norbeck, J., y Blomberg, A. (2004b). NADH-reductive stress in Saccharomyces cerevisiae induces the expression of the minor isoform of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (TDH1). Curr Genet *45*, 90-95.

van Drogen, F., Stucke, V.M., Jorritsma, G., y Peter, M. (2001). MAP kinase dynamics in response to pheromones in budding yeast. Nat Cell Biol *3*, 1051-1059.

Wang, Y., Ge, Q., Houston, D., Thorner, J., Errede, B., y Dohlman, H.G. (2003). Regulation of Ste7 ubiquitination by Ste11 phosphorylation y the Skp1-Cullin-F-box complex. J Biol Chem *278*, 22284-22289.

Warde-Farley, D., Donaldson, S.L., Comes, O., Zuberi, K., Badrawi, R., Chao, P., Franz, M., Grouios, C., Kazi, F., Lopes, C.T., *et al.* (2010). The GeneMANIA prediction server: biological network integration for gene prioritization y predicting gene function. Nucleic Acids Res *38*, W214-220.

Warringer, J., Hult, M., Regot, S., Posas, F., y Sunnerhagen, P. (2010). The HOG pathway dictates the short-term translational response after hyperosmotic shock. Mol Biol Cell *21*, 3080-3092.

Wassmann, K., y Ammerer, G. (1997). Overexpression of the G1-cyclin gene CLN2 represses the mating pathway in Saccharomyces cerevisiae at the level of the MEKK Ste11. J Biol Chem *272*, 13180-13188.

Westfall, P.J., Patterson, J.C., Chen, R.E., y Thorner, J. (2008). Stress resistance y signal fidelity independent of nuclear MAPK function. Proc Natl Acad Sci U S A *105*, 12212-12217.

Westfall, P.J., y Thorner, J. (2006). Analysis of mitogen-activated protein kinase signaling specificity in response to hyperosmotic stress: use of an analog-sensitive HOG1 allele. Eukaryot Cell *5*, 1215-1228.

Winzeler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., *et al.* (1999). Functional characterization of the S. cerevisiae genome by gene deletion y parallel analysis. Science *285*, 901-906.

Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A., y Saito, H. (1997). Regulation of the Saccharomyces cerevisiae HOG1 mitogen-activated protein kinase by the PTP2 y PTP3 protein tyrosine phosphatases. Mol Cell Biol *17*, 1289-1297.

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

Young, C., Mapes, J., Hanneman, J., Al-Zarban, S., y Ota, I. (2002). Role of Ptc2 Type 2C Ser/Thr Phosphatase in Yeast High-Osmolarity Glycerol Pathway Inactivation. Eukaryot Cell *1*, 1032-1040.

Yu, R.C., Pesce, C.G., Colman-Lerner, A., Lok, L., Pincus, D., Serra, E., Holl, M., Benjamin, K., Gordon, A., y Brent, R. (2008). Negative feedback that improves information transmission in yeast signalling. Nature *456*, 755-761.

Yuzyuk, T., y Amberg, D.C. (2003). Actin recovery y bud emergence in osmotically stressed cells requires the conserved actin interacting mitogen-activated protein kinase kinase kinase Ssk2p/MTK1 y the scaffold protein Spa2p. Mol Biol Cell *14*, 3013-3026.

Yuzyuk, T., Foehr, M., y Amberg, D.C. (2002). The MEK kinase Ssk2p promotes actin cytoskeleton recovery after osmotic stress. Mol Biol Cell *13*, 2869-2880.

Zapater, M., Clotet, J., Escote, X., y Posas, F. (2005). Control of cell cycle progression by the stress-activated Hog1 MAPK. Cell Cycle 4, 6-7.

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

Zhan, X.L., y Guan, K.L. (1999). A specific protein-protein interaction accounts for the in vivo substrate selectivity of Ptp3 towards the Fus3 MAP kinase. Genes Dev *13*, 2811-2827.

Zhang, N.N., Dudgeon, D.D., Paliwal, S., Levchenko, A., Grote, E., y Cunningham, K.W. (2006). Multiple signaling pathways regulate yeast cell death during the response to mating pheromones. Mol Biol Cell *17*, 3409-3422.