

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Microbiología II



**IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA PAK
Skm1 Y DE LA GTPasa Cdc42 EN PROCESOS DE
CRECIMIENTO POLARIZADO EN
“Saccharomyces cerevisiae”**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

José María Rodríguez Pachón

Bajo la dirección de los doctores

María Molina Martín
César Nombela Cano

Madrid, 2001

ISBN: 84-669-2016-1

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II**



**IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA PAK Skm1 Y DE LA
GTPasa Cdc42 EN PROCESOS DE CRECIMIENTO POLARIZADO EN
Saccharomyces cerevisiae.**

TESIS DOCTORAL

José María Rodríguez Pachón

2001

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II



**IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA QUINASA PAK Skm1 Y DE LA
GTPasa Cdc42 EN PROCESOS DE CRECIMIENTO POLARIZADO EN
Saccharomyces cerevisiae.**

Memoria presentada para optar al grado de Doctor en Farmacia por:

José María Rodríguez Pachón

Directores:

**Dra. María Molina Martín
Dr. César Nombela Cano**

Madrid, Mayo de 2001

D. RAFAEL ROTGER ANGLADA, DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA II DE LA FACULTAD DE FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID,

CERTIFICA: Que D. José María Rodríguez Pachón ha realizado en el Departamento de Microbiología II de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de los Dres. César Nombela Cano y María Molina Martín, el trabajo que presenta para optar al grado de Doctor en Farmacia, con el título: “Implicación de la proteína quinasa PAK Skm1 y de la GTPasa Cdc42 en procesos de crecimiento polarizado en *Saccharomyces cerevisiae*.”

Y para que conste, firmo la presente certificación en Madrid, a 4 de Mayo de 2001

Fdo.: Dr. Rafael Rotger Anglada

El trabajo de esta Tesis Doctoral ha sido realizado gracias a:

- Una Beca de Formación de Personal Investigador asociada al proyecto de investigación “Caracterización y manipulación de funciones esenciales para la integridad celular de la levadura como forma de mejorar los procesos de expresión y liberación de proteínas y otros productos intracelulares” (BIO95-0303) concedida por el Ministerio de Educación y Ciencia desde el año 1996 al 1999.
- El proyecto de investigación “Desarrollo de sistemas de levadura, potencialmente utilizables para el diagnóstico de enfermedades y la búsqueda de nuevos fármacos, basados en la expresión de genes heterólogos y su acoplamiento a rutas de transducción de señales” (BIO98-0726), desde el año 2000.

*A mis padres.
Y, por supuesto, a mi hermano.*

Es muy posible que nadie que se disponga a comenzar una tesis doctoral sepa realmente en dónde se está metiendo. Por supuesto, todo el mundo “sabe” que inicia una nueva e importante etapa en su vida académica, en la que aprenderá el proceso metodológico de la investigación científica, y que en unos años le permitirá obtener el título de Doctor. Pero estas ilusionadas y más o menos vagas expectativas del recién licenciado quedan ridículamente empequeñecidas ante la magnífica, absorbente, estimulante, obsesiva, gratificadora, frustrante, maravillosa, desbordante, febril, apasionante aventura intelectual y emocional en la que se embarca y que le va a poner a prueba en casi todos los aspectos de su persona. Una aventura que no sólo afectará a su dimensión intelectual, sino que, inevitablemente, le conducirá a un proceso intensivo de maduración personal. Al menos yo así lo he vivido. Y quiero dedicar unas palabras de agradecimiento – mezclando sin ningún respeto, advierto, lo profesional con lo personal- a las personas que más han influido en mí en este período.

Queda ya lejos el día en que el Dr. César Nombela sufrió la “osadía” de que un alumno de tercer curso de carrera le confesara su pasión por la Biología Molecular y su interés por integrarse en el Departamento. Desde entonces, tengo que agradecerle su inacabable paciencia conmigo, sus consejos y advertencias acerca del excitante, pero también a menudo frustrante mundo en el que quería adentrarme, y la oportunidad que me brindó de incorporarme a este Departamento, primero asistiendo a sus seminarios, después siendo Becario-Colaborador y, por último, permitiéndome la realización de esta Tesis Doctoral.

La Dra. María Molina ... Casi nada. ¿Qué decir que resulte original de esta increíble mujer? María, eres “la mujer total”: docente estimulante, de los que consiguen que sus clases progresen en un in crescendo, hasta el punto de dejarte con ganas de más; científica seria, exigente y (¿acaso es un defecto?) perfeccionista, siempre capaz de mejorar esa idea, ese experimento, esa tesis que creías definitivas; conversadora incansable, llena de anécdotas divertidas, y que no le hace ascos a un buen sarao, si la ocasión lo merece; ¡y encima, madre de tres hijas!. Einstein tenía razón: el tiempo es relativo, al menos para ti. Bromas aparte, gracias, María, por tu interminable paciencia hacia mí y mis innumerables despistes; por dirigirme con una benevolencia que nunca me hizo sentirme presionado más que por mí mismo; por no rendirte cuando a mí me fallaban las fuerzas (SKM1, ¡ay!); y gracias también por tus innumerables consejos y correcciones de los que constantemente he podido aprender.

Le llega el turno al Dr. Humberto Martín. Tenía ganas de decirte esto hace tiempo, Humber: eres el mejor. Si en el mundo científico que he tenido la suerte de conocer existe un modelo a seguir para un investigador joven, ése, en mi humilde opinión, eres tú. No conozco a nadie con mayor grado de éxitos por experimento realizado (olvidemos, por favor, la coletilla de “la suerte de Humber”; cuando las cosas salen, es por algo); tampoco conozco a nadie con la mente mejor amueblada para el pensamiento científico: puede dejar transcurrir un seminario en silencio, escuchando, pero cuando habla sabes que ha encontrado la idea correcta o el experimento más ajustado al caso; y tampoco conozco a nadie con un carácter tan apacible y alejado de los extremos de exasperación a los que a menudo nos conducen los experimentos fallidos, cualidad que es impagable en cualquier científico. Pero a lo que iba, que aunque no he conseguido parecerme a ti, a ti es a quien debo lo mucho que he aprendido en la poyata en estos años. Y si la paciencia de todos conmigo ha sido enorme, la que tú has mostrado hacia mí, enseñándome y sufriendome, ha sido absolutamente infinita. La verdad es que decir simplemente gracias se queda muy corto. Pero, como dice Camilo José Cela, en “Viaje a la Alcarria”, “cuando las deudas no se pagan porque no se puede, lo mejor es no hablar de ellas y barajar”. Pues eso. Barajemos.

Vaya también mi agradecimiento para el resto de profesorado, siempre dispuesto a dar una idea o a resolver cualquier problema: Concha, eminente científica y estrella de la Proteómica, tan derrochadora de humanidad y cariño que nos hemos atrevido a apodarte “madre científica” de todos los becarios (¿nos perdonarás algún día?); Jesús, cerebro privilegiado y rebosante de ideas, conversador divertido y buen aficionado, como yo intento ser, al cine y a la mayor de todas las artes, la Música; Miguel Sánchez, Javier Arroyo y Rafael Rotger, siempre disponibles para cualquier consulta y que me hicieron cambiar la opinión negativa que ciertos profesores de esta carrera me habían provocado acerca de la docencia universitaria; Rosa Cenamor, amabilidad, simpatía y, como yo, aficionada al Auditorio Nacional (a ver si nos cruzamos más a menudo por allí); Angelines, Carmen de la Rosa, Conchita y Carmina, microbiólogas de verdad, de las que te dicen de memoria el resultado del IMVIC de cualquier bicho viviente, ¡cuántas veces me he asomado, curioso, a

vuestras preparaciones para ver si este o aquel bacilo realmente eran móviles!; Rosalía y Gloria, por las que algunos alumnos sienten cierto “respeto”, pero que a mí nunca consiguieron “engañarme” (ni siquiera como alumno de prácticas), porque no pueden evitar que se les note que todo es teatro y que son buena gente; y, por último, y por eso mismo los primeros, Víctor y Fede, el primero, hombre del Renacimiento en el siglo XXI, el mayor corazón escondido tras el mayor carácter el segundo, dos de mis ejemplos a seguir en ciencia - además de mis malos ejemplos, que esos sí los he seguido, en las copas, alguna despedida de soltero y otras tropelías-.

Abandonando el mundo lejano y soñado del personal funcionario y contratado, regresemos al más terrenal de la precariedad becaria, del que me honro en formar parte: Marta, la mejor promesa investigadora, la mejor persona, la mejor amiga, para mí siempre serás la primera, en este párrafo y en lo demás; Blanca, elegante, sofisticada, inteligente, divertida, ... mujer diez en todo, incluida la amistad, sin ti me habría reído mucho menos estos últimos años; Paloma, la que cierra este trío de la “muete”, la de la carcajada limpia y estrepitosa, corazón sin límites, compañera de penas y de copas, te echamos de menos; Inma Cosano, desde siempre he sentido tu compañía, te he visto leer la tesina, casarte, tener un hijo y defender tu tesis (¿cómo pasa el tiempo!), siempre estuviste ahí para todo y lo sé; Javi, sí, el del pelo zanahoria, que, sin la menor duda, será una futura estrella científica helmántica, gracias por ser compañero de viajes, de congresos delirantes, de mañanas de lunes misóginas y por enseñarme tantas cosas; Mercedes, mujer trabajadora, inteligente, generosa y valiente donde las haya, gracias por soportar alguno de mis lloros y suerte en tu prometedora carrera científica; Aida, la más trabajadora, la más noctámbula, la más marchosa, la más misteriosa también, gracias por tener siempre una frase de ánimo y una sonrisa para quien lo necesita; Cristina, cercana, radiante, insondable, salvaje, traviesa, idealista, natural, alegre, ... gracias por haberme dejado ver cómo eres, ¡cuánto se pierden los que sólo te conocen en parte! Rebeca, otro cerebro fugado, tú sí que sabías bailar, guapa; Elvira, gracias por pagar mis habituales “ausencias” con tu constante cercanía; algunas adquisiciones más recientes: María Insenser, Isabel, Santiago, todos hacéis el trabajo más fácil y divertido; y más: el (¿encontraré el adjetivo?) mítico Jose, sabio indiscutible de la Biología Molecular, verbo rápido e incansable; el fantástico Paco, ¿qué habría sido de mí sin tus infinitos conocimientos informáticos?; la esbelta Gema (lo pasamos bien en clase de doctorado, ¿eh?), los todoterreno Benito y José Alberto, las trabajadoras Maribel y Rosita, la incombustible Paquita (¡a La Mancha manchega ...!), y los amigos extranjeros: Sandrine, Lubi, Doriana, Hans y Gaelle.

Ya casi al final (pero vosotros sabéis que no sois los últimos) los amigos de fuera del laboratorio: del lado madrileño, Estrella, Pilar y Paloma, Cortes, Ana Guti y Juantxo, Araceli y José Luis, Inés (la mejor, la que más me soportó, gracias), Sonia, Paloma y Marta; del lado tomellosero, Ana, Gema, Mari Carmen, Montse, Rosa, Juanfran, los Antonios (Roperó y Palacios), Angelito, Fede, Casi, Julián, Mari Carmen Carretero y Chari; nuestras vecinitas Araceli, Isabel, Lourdes y Pilar; y, quizá los más cercanos a mí estos años, mis compañeros de piso Carlos, Boni, Mikel y Javi (siento que os tragárais mis agobios, pero oye, menudas fiestas montábamos, ¿eh?) A todos os pido perdón por el tiempo que no os he podido dedicar y por haberme soportado durante mi estado predoctoral.

Por último, los mejores: gracias a mi padre, mi madre, mi abuela y muy en especial a mi hermano Juan Manuel, pues sin su apoyo constante este trabajo nunca habría existido. No en vano la tesis va dedicada, con el mayor de mis agradecimientos, a todos ellos.

Lo conocido es finito, lo desconocido infinito; desde el punto de vista intelectual estamos en una pequeña isla en medio de un océano ilimitable de inexplicabilidad. Nuestra tarea en cada generación es recuperar algo más de tierra.

Thomas H. Huxley (biólogo, defensor del evolucionismo darwiniano en sus orígenes), 1887

Nosotros, que somos hijos del universo – polvo estelar animado- podemos reflejar, no obstante, la naturaleza del universo mismo, hasta el punto incluso de vislumbrar las reglas que lo rigen. Cómo hemos sido vinculados a esta dimensión cósmica es un profundo misterio. Pero el vínculo no se puede negar.

Paul Davies (profesor de física matemática y divulgador científico), 1992

Señoras, señores: hemos descubierto el secreto de la vida.

Francis Crick (co-descubridor, junto a James Watson, de la estructura de la molécula de DNA), en el Eagle Pub, Cambridge, 28 de Febrero de 1953

Con una encuadernación como la tuya, la gente va a querer saber lo que hay en el libro.

Gene Kelly a Leslie Caron en *Un americano en París*, Vincente Minelli, 1951

ÍNDICE

ÍNDICE	I
ABREVIATURAS	i
INTRODUCCIÓN	1
I. EL CRECIMIENTO POLARIZADO EN <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. SU CONTROL POR CICLO CELULAR Y LAS GTPasas TIPO Rho	1
1. El ciclo biológico de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
2. El crecimiento polarizado en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
3. Las proteínas GTPasas.....	4
4. Modelo de crecimiento polarizado: la gemación.....	5
4.1. Selección del sitio de gemación: la GTPasa Bud1.....	5
4.1.1. ¿Gemación axial o bipolar?.....	5
4.1.2. La GTPasa Bud1: modelo del ensamblaje del sitio de gemación.....	5
4.2. Establecimiento del crecimiento polarizado: la GTPasa Cdc42.....	7
4.2.1. La GTPasa Cdc42.....	7
4.2.2. Reguladores de la actividad de Cdc42: la proteína GEF Cdc24.....	8
4.2.2.1. Proteínas que interaccionan con Cdc24: la proteína aglutinadora Bem1.....	8
4.2.2.2. Proteínas que interaccionan con Cdc24: la subunidad Gβ de la proteína G.....	9
4.2.2.3. Proteínas que interaccionan con Cdc24: el regulador de ciclo Far1.....	9
4.2.3. Reguladores de la actividad de Cdc42: las proteínas GAP Rga1, Rga2 y Bem3.....	9
4.2.4. Reguladores de la actividad de Cdc42: la proteína GDI Rdi1.....	10
4.2.5. Efectores de Cdc42: las proteínas quinasas tipo PAK.....	10
4.2.5.1. Ste20.....	12
4.2.5.2. Cla4.....	13
4.2.6. Otras proteínas que interaccionan con Cdc42.....	14
4.2.6.1. Las forminas: Bni1 y Bnr1.....	14
4.2.6.2. Iqg1/Cyk1.....	14
4.2.6.3. Bem4/Rom7.....	14
4.2.6.4. Las17/Bee1.....	14
4.2.6.5. Gic1 y Gic2.....	14
4.2.6.6. Otros posibles efectores de Cdc42: Msb3 y Msb4.....	15
4.2.7. La GTPasa Cdc42: modelo del establecimiento del crecimiento polarizado en la gemación.....	15
4.2.7.1. Regulación de las proteínas PAK por ciclo celular.....	17
4.2.8. La GTPasa Cdc42 y otros procesos de crecimiento polarizado.....	17
5. Control de la secreción polarizada: las GTPasas Rho3 y Rho4.....	18
6. Mantenimiento de la integridad celular en la zona de crecimiento polarizado: las GTPasas Rho1 y Rho2.....	18
II. RUTAS DE MAP QUINASAS IMPLICADAS EN CRECIMIENTO POLARIZADO	20
1. Generalidades sobre MAP quinasas en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
2. Ruta de respuesta a feromonas o de apareamiento.....	21

2.1. Papel de la GTPasa Cdc42 en la ruta de respuesta a feromonas.....	23
3. Ruta de pseudofilamentación-invasividad.....	24
4. Ruta de respuesta a alta osmolaridad.....	26
5. Ruta de integridad celular.....	27
6. Ruta de integridad celular en crecimiento vegetativo o SVG (“STE-vegetative-growth”).....	30
ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	33
I. ANTECEDENTES: LA PROTEÍNA PAK Skm1.....	33
II. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS	35
1. Microorganismos, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	35
1.1. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> originales utilizadas en este trabajo.....	35
1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> generadas en este trabajo.....	36
1.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en este trabajo.....	37
1.4. Plásmidos originales utilizados en este trabajo.....	37
1.5. Plásmidos generados en el transcurso de este trabajo.....	39
1.6. Genotecas utilizadas en este trabajo.....	40
1.7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	40
2. Medios de cultivo.....	40
2.1. Medios de cultivo para <i>E. Coli</i>	41
2.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	41
2.2.1. Solución mezcla de aminoácidos.....	41
3. Técnicas empleadas en este trabajo.....	41
3.1. Manipulación de DNA. Técnicas de Biología Molecular.....	41
3.2. Mutagénesis de <i>S. cerevisiae</i>	42
3.3. Microscopía de fluorescencia y contraste de fases.....	42
3.4. Microscopía electrónica de barrido.....	42
3.5. Obtención y determinación cuantitativa de RNA.....	43
3.6. Electroforesis de RNA, transferencia a membrana y detección (“Northern blotting”).....	43
3.7. Estudio de interacciones entre proteínas mediante el sistema de “dos híbridos”.....	44
3.7.1. Sistema de “dos híbridos” basado en la proteína LexA.....	44
3.7.2. Sistema de “dos híbridos” basado en el factor de transcripción Gal4.....	44
3.7.3. Sistema de “dos híbridos” de apareamiento basado en el factor de transcripción Gal4.....	44
3.8. Obtención de extractos proteicos y determinación cuantitativa de proteínas.....	45
3.9. Electroforesis de proteínas, transferencia a membrana e inmunodetección (“Western blotting”).....	46
RESULTADOS	47
1. Ensayos fenotípicos.....	47
1.1. Curvas de crecimiento de mutantes defectivos en las proteínas PAK.....	47
1.2. Estudios de sensibilidad de mutantes <i>skm1</i> a distintas sustancias.....	47
1.2.1. Sensibilidad a toxina <i>killer</i>	47
1.2.2. Sensibilidad a zimoliasa.....	48
1.2.3. Sensibilidad a calcoflúor.....	48

1.2.4. Sensibilidad a rojo Congo.....	48
1.2.5. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno.....	49
1.2.6. Sensibilidad a calcio.....	49
2. Estudio de la expresión del gen <i>SKM1</i>	49
2.1. Estudio de la expresión del gen <i>SKM1</i> mediante “Northern blotting”.....	49
2.2. Estudio de la expresión del gen <i>SKM1</i> mediante “Western blotting”.....	50
3. Estudios de sobreexpresión de <i>SKM1</i>	51
3.1. Sobreexpresión de <i>Skm1</i> completa.....	51
3.2. Sobreexpresión de distintos fragmentos de <i>Skm1</i>	53
3.3. Sobreexpresión del alelo <i>Skm1K406A</i> , catalíticamente inactivo.....	54
3.4. Estudio de la viabilidad de las yemas producidas por la sobreexpresión de <i>Skm1</i>	55
3.4.1. Sonicación.....	55
3.4.2. Micromanipulación.....	56
4. Búsqueda de proteínas que interaccionen con <i>Skm1</i> mediante el sistema de “dos híbridos”... ..	57
4.1. Estudio de la interacción entre <i>Skm1</i> y <i>Cdc42</i>	57
4.1.1. Sistema basado en <i>LexA</i>	59
4.1.2. Sistema basado en <i>Gal4</i>	59
4.2. Búsqueda de otras proteínas que interaccionen con <i>Skm1</i> : rastreo de genotecas... ..	61
4.2.1. Sistema basado en <i>LexA</i>	61
4.2.2. Sistema basado en <i>Gal4</i>	61
4.2.3. Sistema de apareamiento basado en <i>Gal4</i>	62
5. Estudio comparado de los fenotipos de sobreexpresión de <i>SKM1</i> y <i>CDC42</i> en distintos mutantes.....	62
5.1. Sobreexpresión de <i>cdc42^{G12V}</i> y <i>Skm1</i> en células silvestres.....	63
5.2. Sobreexpresión de <i>cdc42^{G12V}</i> y <i>Skm1</i> en mutantes en los genes de las proteínas PAK.....	63
5.2.1. En mutantes <i>ste20</i>	63
5.2.2. En mutantes <i>skm1</i>	63
5.2.3. En mutantes <i>cla4</i>	63
5.2.4. En mutantes <i>ste20 cla4</i>	65
5.3. Sobreexpresión de <i>cdc42^{G12V}</i> y <i>Skm1</i> en mutantes <i>ste11</i>	65
5.4. Sobreexpresión de <i>cdc42^{G12V}</i> y <i>Skm1</i> en el mutante <i>cdc42-1</i>	66
5.5. Sobreexpresión de los dominios quinasas de las proteínas PAK.....	66
6. Estudio de los fenotipos resultantes de la activación de <i>Cdc42</i> por eliminación de sus proteínas <i>GAP Rga1</i> , <i>Rga2</i> y <i>Bem3</i>	67
6.1. Fenotipo de mutantes en los genes <i>RGAI</i> , <i>RGA2</i> y <i>BEM3</i>	69
6.2. Sobreexpresión de <i>Skm1</i> y <i>Skm1K406A</i> en mutantes <i>rga2 bem3</i>	69
7. Búsqueda de genes relacionados con <i>SKM1</i> y <i>CDC42</i> mediante estrategias genéticas.....	69
7.1. Rastreo de genes que eliminen la letalidad de la sobreexpresión del dominio quinasa de <i>Skm1</i> o del alelo hiperactivo <i>cdc42^{G12V}</i>	69
7.2. Búsqueda de mutantes supresores de la letalidad de la sobreexpresión del dominio quinasa de <i>Skm1</i> o del alelo hiperactivo <i>cdc42^{G12V}</i>	70
7.3. Posible relación de <i>Ess1</i> y <i>Pin1</i> con <i>Skm1</i>	70
7.4. Búsqueda de mutaciones letales en un fondo deleciónado en <i>SKM1</i> : método del ácido 5-Fluoroorótico (5-FOA).....	70
8. Mecanismos reguladores de la señalización en la ruta de la MAP quinasa <i>Slr2</i>	71
8.1. Utilidad de los anticuerpos frente a la MAP quinasa p44/p42 fosforilada para	

analizar la activación de Slt2.....	72
8.2. Influencia de las proteínas PAK en la activación de Slt2.....	73
8.2.1. Pérdida de las proteínas PAK: Ste20, Cla4 y Skm1.....	73
8.2.2. Sobreexpresión de los dominios quinasas de las proteínas PAK.....	73
8.2.3. Implicación de componentes de las rutas de feromonas, invasividad y SVG en la activación de Slt2 debida a las proteínas PAK.....	75
8.3. Influencia de las GTPasas tipo Rho en la activación de Slt2: el papel de Cdc42...	75
8.3.1. Pérdida de Cdc42.....	76
8.3.2. Sobreexpresión de Cdc42 y de su proteína GEF Cdc24.....	77
8.3.3. Pérdida de las proteínas GAP de Cdc42: Rga1, Rga2 y Bem3.....	77
8.3.4. Implicación de la ruta de feromonas/invasividad en la activación de Slt2 debida a Cdc42.....	79
8.3.4.1. Papel de la MAPKK Ste7 en la transmisión de la señal hacia Slt2.....	79
8.3.4.2. Papel de las proteínas PAK Ste20 y Skm1 en la transmisión de la señal hacia Slt2.....	79
8.3.4.3. Papel de las MAPK Fus3 y Kss1 en la transmisión de la señal hacia Slt2.....	81
8.4. Influencia de las GTPasas tipo Rho en la activación de Slt2: el papel de Rho1.....	81
8.4.1. Pérdida de Rho1.....	82
8.4.2. Sobreexpresión de Rho1.....	83
8.4.3. Pérdida de las proteínas GAPs de Rho1: Bem2, Sac7 y Bag7.....	83
8.5. Conexión entre Cdc42 y las quinasas PAK y la ruta de integridad celular.....	84
8.5.1. Papel de la GTPasa Rho1 en la activación de Slt2 debida a Cdc42.....	85
8.5.2. Papel de la GTPasa Rho1 en la activación de Slt2 debida a las PAK.....	85
9. Estudios de sensibilidad a rojo Congo de diversos mutantes.....	85
9.1. Mutantes defectivos en las proteínas GAP de Cdc42.....	86
9.2. Mutantes en las rutas de feromonas, invasividad y SVG.....	86

DISCUSIÓN

1. Posible función biológica de Skm1.....	91
1.1. Ausencia de fenotipo detectable en mutantes <i>skm1</i>	91
1.2. El fenotipo de sobreexpresión de Skm1 es similar al de sobreexpresión de Cdc42 activo.....	92
1.3. Función regulatoria del extremo N-terminal de Skm1.....	93
1.4. Skm1 interacciona con Cdc42 mediante el sistema de “dos híbridos”.....	93
1.5. Diversos efectos de la sobreexpresión de Cdc42 activo y Skm1.....	95
1.6. La activación de Cdc42 por eliminación de sus proteínas GAP conduce a efectos diferentes de la sobreexpresión de <i>cdc42</i> ^{G12V}	96
2. Influencia de las proteínas PAK y Cdc42 en la activación de las MAP quinasas Slt2, Kss1 y Fus3.....	97
2.1. La sobreexpresión de los dominios quinasas de las proteínas PAK conduce a la hiperactivación de Slt2, Kss1 y Fus3.....	97
2.2. Cdc42 modula la actividad de Slt2 a través de Ste20, Ste7, Fus3 y Kss1.....	98
2.3. Rho1 controla la actividad de Slt2.....	99
2.4. La activación de Slt2 debida a Cdc42 y a la sobreexpresión del dominio quinasas	

de Skm1 son independientes de Rho1.....	100
3. Sensibilidad a rojo Congo de diversos mutantes	100
3.1. La activación de Fus3 y Kss1 induce sensibilidad a rojo Congo en glucosa y resistencia en galactosa.....	100
3.2. Influencia de la fuente de carbono en la activación de Slr2. Sensibilidad a rojo Congo de mutantes SVG.....	101
4. Modelo de acción de las proteínas PAK y las GTPasas tipo Rho durante el ciclo celular	102
CONCLUSIONES	105
BIBLIOGRAFÍA	107

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

ATP	adenosín trifosfato
5-FOA	ácido 5-fluoroorótico
cm	centímetros
CRIB	<i>Cdc42-Rac-interactive-binding</i>
D.O.	densidad óptica
Δ	delección
DEPC	dietilpirocarbonato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etilén-diamino-tetracético
erg	ergios
g	gramos
GAP	<i>GTPase-activating-protein</i>
GDI	<i>Guanine-nucleotide-dissociation-inhibitor</i>
GDP	guanosín difosfato
GEF	<i>Guanine-nucleotide-exchange-factor</i>
GST	glutathion-S-transferasa
GTP	guanosín trifosfato
GTPasa	guanosín trifosfatasa
h	horas
Kb	kilobases
kDa	kilodaltons
l	litros
M	molar
MAP	<i>Mitogen-activated-protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated-protein-kinase</i>
mg	miligramos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	milimolar
μg	microgramos
μl	microlitros
μm	micrómetros
ONPG	orto-nitro-fenil-galactopiranósido
ORF	<i>Open-Reading-Frame</i> (marco abierto de lectura)
PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida
PAK	<i>p21-activated-kinase</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PEG	polietilenglicol
PH	<i>Pleckstryn-homology</i>
PMSF	fluoruro de fenil-metil-sulfonato
RNA	ácido ribonucleico
RNAsa	ribonucleasa
rpm	revoluciones por minuto

s	segundos
SDS	dodecil sulfato sódico
TE	tampón Tris-EDTA
TLCK	tosil-lisín-clorometil-cetona
TPCK	tosil-fenilalanín-clorometil-cetona
UV	ultravioleta
V	voltios
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido
°C	grados centígrados

CÓDIGO DE AMINOÁCIDOS

Ala	A	Alanina
Arg	R	Arginina
Asn	N	Asparagina
Asp	D	Ácido aspártico
Cys	C	Cisteína
Gln	Q	Glutamina
Glu	E	Ácido glutámico
Gly	G	Glicina
His	H	Histidina
Ile	I	Isoleucina
Leu	L	Leucina
Lys	K	Lisina
Met	M	Metionina
Phe	F	Fenilalanina
Pro	P	Prolina
Ser	S	Serina
Thr	T	Treonina
Trp	W	Triptófano
Tyr	Y	Tirosina
Val	V	Valina

INTRODUCCIÓN

I. EL CRECIMIENTO POLARIZADO EN *Saccharomyces cerevisiae*: SU CONTROL POR CICLO CELULAR Y LAS GTPasas TIPO Rho.

1. EL CICLO BIOLÓGICO DE *Saccharomyces cerevisiae*.

El ciclo biológico de la levadura *S. cerevisiae* consta de dos fases: haploide y diploide. Las células haploides presentan dos posibilidades en su ciclo biológico: un ciclo de reproducción vegetativo, por el que la célula se divide para dar dos células iguales; y un ciclo sexual, en el que dos células de tipo sexual opuesto se fusionan para dar lugar a una célula diploide, que entra de nuevo en un ciclo de división vegetativo. En condiciones determinadas, como la limitación en la fuente de carbono, la célula diploide sufre una meiosis que genera cuatro esporas haploides, las cuales, al germinar, iniciarán un nuevo ciclo vegetativo. Algunas cepas diploides, bajo condiciones de ayuno de nitrógeno en medio sólido pueden desarrollar una transición dimórfica y mostrar un patrón de crecimiento pseudohifal. En cepas haploides, el fenómeno paralelo se manifiesta como crecimiento invasivo con penetración en el agar.

Durante el ciclo vegetativo, *S. cerevisiae* se divide por gemación. A partir de una célula madre se desarrolla una célula hija o yema que crece hasta un tamaño similar al de la madre, teniendo lugar en este momento la citoquinesis, septación y separación de las células. Este ciclo (**Figura 1**) se puede dividir en dos grandes etapas: la primera de ellas es la mitosis, en la que tiene lugar la separación del material genético –en sus cuatro etapas: profase, metafase, anafase y telofase- y que concluye con la formación del tabique o septo entre las dos células; la otra gran etapa del ciclo es la interfase, que englobaría el resto de procesos entre dos mitosis sucesivas. En la interfase se distinguen dos fases de aparente transición, G1 y G2, separadas por la fase S o de síntesis de nuevo DNA. En las fases G1 y G2 suceden procesos esenciales para la célula (crecimiento en tamaño, generación de maquinaria subcelular,...). Entre ellos se encuentra, al final de G1, la llegada al punto conocido como START. Una

vez superado este punto de control del ciclo, la mitosis es un proceso irreversible. En ese momento se duplica el cuerpo polar del huso y se inicia la emergencia de la yema, que crecerá durante el resto de G1 y S hasta la mitosis. Cuando una célula de *S. cerevisiae* –tipo sexual α o a - detecta la presencia de la feromona secretada por el tipo sexual opuesto – factor a o factor α -, el ciclo vegetativo se detiene en G1 antes de llegar a START, y comienza el ciclo sexual: la célula sufre una serie de modificaciones morfológicas que la llevan a formar una proyección dirigida hacia la fuente de feromona (la morfología de estas células se denomina “shmoo”). La célula de tipo sexual opuesto sufre los mismos cambios, y todo ello conduce a la conjugación de ambas células.

El ciclo celular se encuentra regulado por la proteína quinasa Cdc28 (Johnston y col., 1977; Lőrincz y Reed, 1984), la cual, a su vez, es regulada por la interacción con unas proteínas de expresión cíclica llamadas ciclinas. El complejo Cdc28-ciclina es capaz de fosforilar determinados sustratos en cada momento del ciclo que consiguen que éste avance (Reed, 1992). Las ciclinas se dividen en dos grandes grupos, según el momento del ciclo en el que se expresan: ciclinas G1 (Cln1, Cln2, Cln3, Clb5, Clb6 y Hcs26) y ciclinas G2 (Clb1, Clb2, Clb3 y Clb4) (revisado recientemente por Mendenhall y Hodge, 1998). La activación de Cdc28 por las ciclinas G1 determina la polarización del citoesqueleto de actina hacia el lugar de emergencia de la yema en el momento previo a su surgimiento (Lew y Reed, 1993), la duplicación del cuerpo polar del huso, el inicio de la replicación del genoma y la activación de Pkc1 (Gray y col., 1997), necesaria para el crecimiento polarizado; Clb5 y Clb6, concretamente, se encargan de controlar la progresión a través de la fase S (Cross, 1995). Las ciclinas G2 conducen el ciclo hasta el final de la mitosis, y su destrucción determina, entre otros procesos, la polarización del

citoesqueleto de actina hacia la zona del que será futuro septo, que es necesaria para la formación del

tabique intercelular (Lew y Reed, 1993).

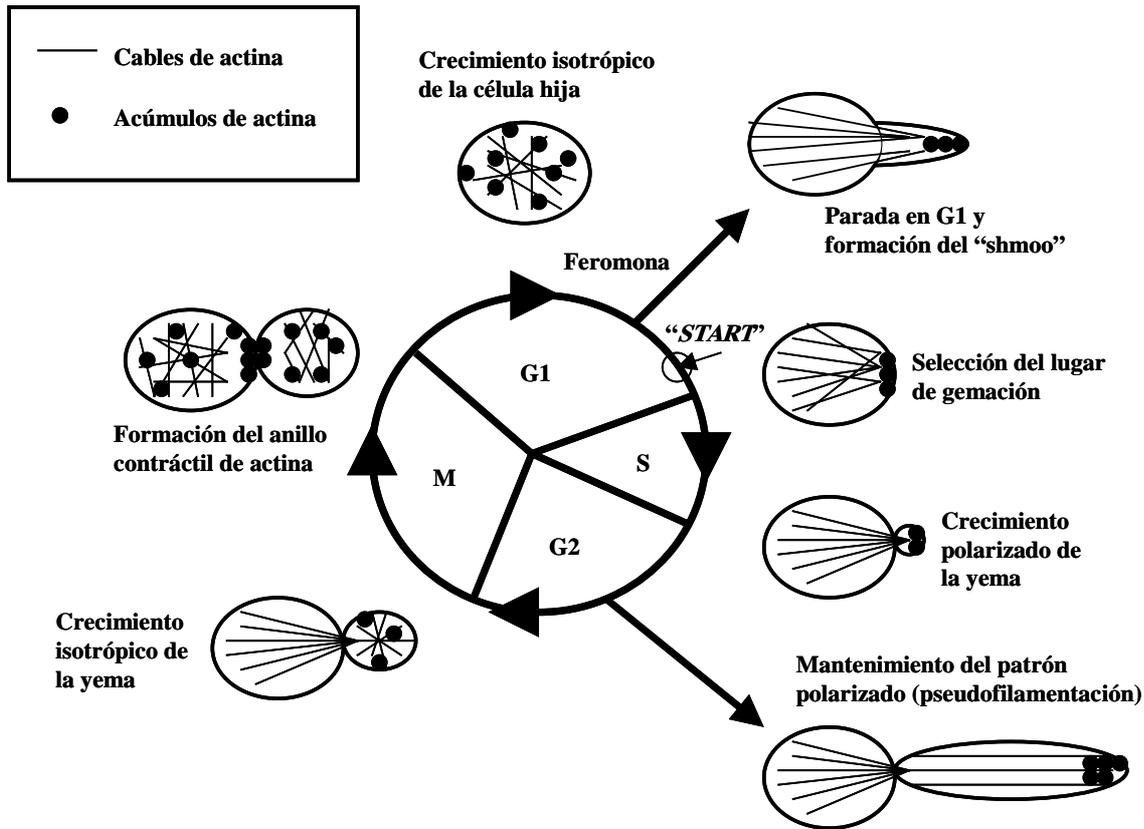


Figura 1. Reorganizaciones del citoesqueleto de actina durante el ciclo celular.

2. EL CRECIMIENTO POLARIZADO EN *Saccharomyces cerevisiae*.

La polarización de estructuras durante la morfogénesis celular consiste en el establecimiento de mecanismos y funciones celulares de una forma unidireccional y localizada (revisiones en Palmieri y Haarer, 1998; Johnson, 1999; Chant, 1999; Pruyne y Bretscher, 2000). Esencialmente, todas las células pueden polarizarse en respuesta a estímulos externos o internos. Algunos de ellos son, por ejemplo, los contactos intercelulares, la respuesta a gradientes químicos, la secreción localizada, la endocitosis, la distribución de orgánulos o la motilidad celular. Las células eucariotas interpretan ciertos estímulos o marcas ensamblando de determinada forma el citoesqueleto de actina. En *S. cerevisiae*, los procesos polarizados de gemación, crecimiento filamentosos y la formación de las prolongaciones típicas del apareamiento muestran muchos elementos en común en cuanto a la reestructuración

de la polaridad celular. Estos procesos de la levadura tienen diversos requerimientos: debilitamiento de la pared celular por enzimas degradativas que permita la expansión de la célula, formación de nueva membrana plasmática y síntesis de la nueva pared celular por enzimas biosintéticas. Para que se pueda dar este crecimiento polarizado, las rutas secretoras deben dirigir la maquinaria necesaria a sitios concretos de la superficie celular. En todos estos procesos el citoesqueleto de actina juega un papel fundamental (revisado por Finger y Novick, 1998) manteniendo las estructuras polarizadas en respuesta a marcas espaciales y temporales.

Los filamentos de actina en la levadura se organizan fundamentalmente en acúmulos (“patches” en inglés original) de actina cortical y cables de actina (**Figura 1**). Los acúmulos corticales

son cuerpos ricos en actina polimerizada o actina F, mientras que los cables son largas agrupaciones de esta actina F. Ambos tipos de estructuras sufren una polarización dependiente del ciclo (Adams y Pringle, 1984; Amberg, 1998). Al final de la fase G1, tras pasar el punto START, la célula selecciona un sitio para gemar. Los acúmulos de actina cortical forman un anillo en esa zona, y los cables convergen hacia allí. Cuando emerge la yema, los acúmulos inicialmente se agrupan en su extremo, los cables se extienden desde la madre hasta el interior de la hija y el crecimiento es apical. Más tarde, los acúmulos y cables en la yema adoptan un patrón al azar, mientras que en la célula madre los cables aún están polarizados hacia el cuello madre-hija. Esto cambia el patrón de crecimiento de la yema de apical a isotrópico, dándole la forma elipsoidal característica. Si la célula opta por crecer de forma pseudofilamentosa, el patrón apical se conservará más tiempo (Kron y Gow, 1995; Madhani y Fink, 1998). Al final del crecimiento vegetativo de la yema los acúmulos y los cables de actina se redistribuyen al azar en madre e hija, salvo un anillo de actina F que se ensambla en el cuello madre-hija y al contraerse provoca la separación de los citoplasmas, contribuyendo así a la citoquinesis (Field y col., 1999).

La actina también dirige el crecimiento polarizado durante el apareamiento. Las células haploides secretan feromonas que provocan la respuesta sexual en las células de tipo sexual opuesto. Las células que resultan estimuladas paran su ciclo en G1, expresan las proteínas necesarias para la fusión entre ambas células y se orientan siguiendo el gradiente de feromona hacia la otra célula mediante la polarización del citoesqueleto de actina (Kron y Gow, 1995).

Para el control y dirección hacia estos lugares de crecimiento de los filamentos y cables de actina la célula va a servirse de unas proteínas conocidas como GTPasas. En mamíferos (**Figura 2**) es clásica la cascada de GTPasas consistente en la activación secuencial de Cdc42, Rac1 y RhoA para coordinar el citoesqueleto de actina durante el movimiento celular. Siguiendo un patrón parecido, en *S. cerevisiae* se ha sugerido un modelo de activación secuencial para Bud1, Cdc42 y Rho1 en la que cada GTPasa podría controlar y activar a la siguiente consiguiendo en definitiva dirigir la polarización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado (Chant y Stowers, 1995).

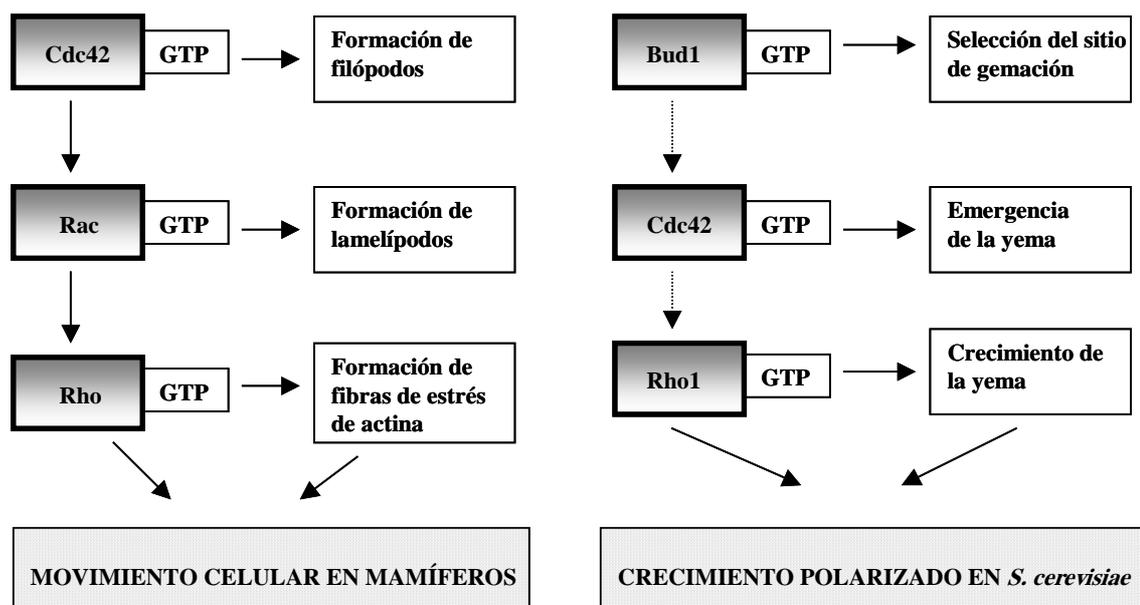


Figura 2. Modelo de activación secuencial de GTPasas en mamíferos y *S. cerevisiae*

3. LAS PROTEÍNAS GTPasas.

Se han descubierto proteínas de este tipo controlando procesos tan variados como el crecimiento, la apoptosis, la traducción, el transporte de vesículas, la organización del citoesqueleto o el transporte núcleo-citoplasma (Boguski y McCormick, 1993). Las proteínas GTPasas pueden encontrarse en dos conformaciones: unidas a GTP o a GDP. Generalmente, como ocurre en las GTPasas de la superfamilia Ras, el estado unido a GTP es el activo y el capaz de realizar una función determinada o de señalizar hacia una ruta concreta. La proteína tiene capacidad GTPásica, es decir, de hidrolizar el GTP a GDP, quedando en este caso en estado inactivo. La unión a cada tipo de guanín-nucleótido o la actividad GTPásica están generalmente modulados por otras proteínas reguladoras (**Figura 3**), que se pueden clasificar en GEFs (“guanine-nucleotide-exchange-factors”), que promueven el intercambio de GDP por GTP, estabilizan la forma unida a este último y activan, por tanto, a la GTPasa; GAPs (“GTPase-activating-

proteins”), que estimulan la actividad GTPásica intrínseca de la proteína, de forma que ésta hidroliza su GTP a GDP y queda inactiva; y GDIs (“guanine-nucleotide-dissociation-inhibitors”), que al impedir la separación de la proteína de la molécula de GDP, estabilizan su forma inactiva. Las GTPasas tipo Ras se anclan en la membrana mediante un grupo farnesilo o isoprenilo que les es añadido posttraduccionalmente por enzimas prenil- o farnesil-transferasas. Las proteínas GDIs, además de estabilizar la forma unida a GDP de la GTPasa, son capaces de extraerla de la membrana en la que se encuentra anclada mediante unión con el grupo isoprenoide C-terminal, con lo que la GTPasa, separada de su lugar de acción, queda inactivada (Boguski y McCormick, 1993; LaMarche y Hall, 1994; Feig, 1994; Chant y Stowers, 1995; Gooser y col., 1997). Para ilustrar el modo por el cual estas proteínas controlan la polarización del crecimiento se expondrá detalladamente el proceso de gemación en *S. cerevisiae*.

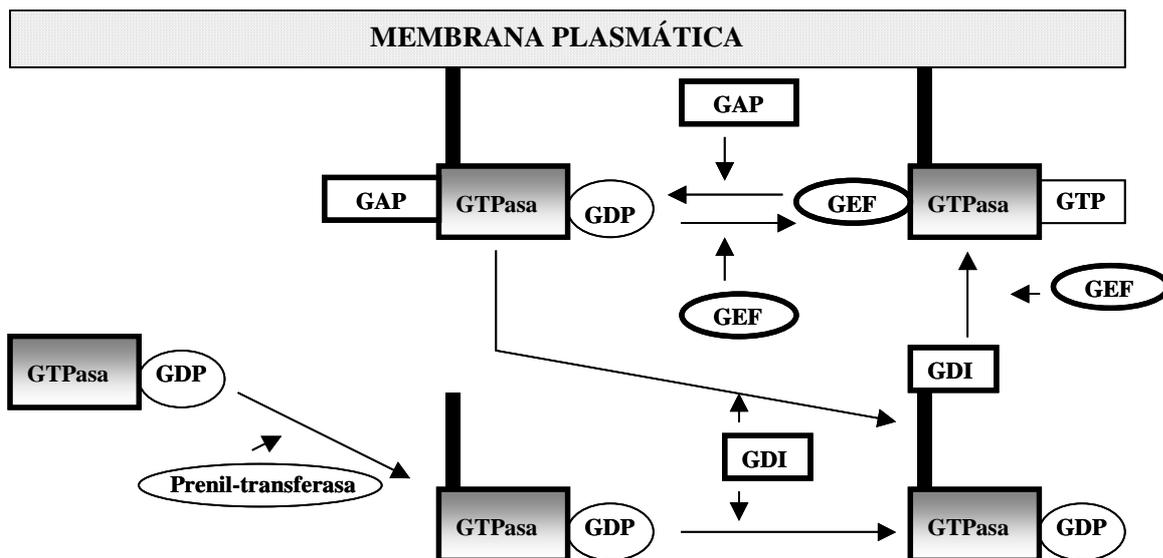


Figura 3. Esquema de la activación/inactivación de las GTPasas tipo Ras.

4. MODELO DE CRECIMIENTO POLARIZADO: LA GEMACIÓN.

4.1 Selección del sitio de gemación: la GTPasa Bud1.

4.1.1. ¿Gemación axial o bipolar?

Este proceso está controlado en primer lugar por el tipo de célula en división (**Figura 4**). Las células haploides tienen una gemación axial, es decir, adyacente al sitio de la anterior citoquinesis. Los diploides geman siguiendo un patrón bipolar, en el que la yema se produce cada vez en el polo opuesto a la gemación anterior (revisiones en Govindan y Novick, 1995; Drubin y Nelson, 1996; Cid y col., 1995). Los genes que seleccionan el sitio de gemación se pueden dividir en: genes para gemación axial, genes para gemación bipolar y genes generales para la selección del lugar de gemación. La especificación del lugar axial está regulada, en parte, por la presencia de una marca. Esta marca está constituida por el anillo de septinas. Las septinas (Longtine y col., 1996; Field y Kellogg, 1999), codificadas por los genes *CDC3*, *CDC10*, *CDC11*, *CDC12* y *SHS1* se ensamblan formando un anillo en el sitio de la siguiente gemación. Durante el crecimiento de la yema, este anillo se expande hasta formar un doble anillo, que permanece a ambos lados del cuello madre-hija durante la gemación. Tras la citoquinesis, los anillos permanecen. La hipótesis en boga es que esta permanencia del anillo sirve de marca para la formación de un nuevo anillo adyacente. El anillo de septinas es fundamental para el posicionamiento de la maquinaria biosintética (De Marini y col., 1997) y la correcta polarización del citoesqueleto de actina (Longtine y col., 1996). Esta marca axial que representa el antiguo anillo de septinas es reconocida directa o indirectamente por las proteínas Bud3, Bud4, Bud10 y Ax11, que colocan con el anillo (Adames y col., 1995; Chant y col., 1995; Halme y col., 1996; Sanders y Herskowitz, 1996). La especificación del lugar bipolar requiere un mecanismo más complejo que necesita de muchas marcas de posición. Aunque se ha descrito algún modelo (Chant y Pringle, 1995) aún no se considera a ninguno de ellos satisfactorio. Pero sí se conocen algunas proteínas implicadas: Bud8 y Bud9 serían

parte de la marca de señalización para la gemación distal y proximal, respectivamente. Ambas poseen estructura de proteínas de membrana (Zahner y col., 1996).

4.1.2. La GTPasa Bud1: modelo del ensamblaje del sitio de gemación.

Una vez especificado el patrón de gemación, la GTPasa Bud1 reconoce las marcas dejadas por las proteínas antes descritas y, translocándose a membrana, se asocia a ellas (Roemer y col., 1996), constituyendo la auténtica marca espacial que permite la localización de la maquinaria biosintética en ese punto.

Bud1 (inicialmente descrita como Rsr1) se identificó como una proteína GTPasa de la subfamilia Ras, dentro a su vez de la superfamilia Ras. Bud1 contiene, como es habitual en esta familia, una cisteína C-terminal (secuencia canónica CAAX al final de la proteína, donde A es un aminoácido alifático y X una metionina o serina) que sufre una farnesilación que le permite anclarse en la membrana plasmática. La delección de *BUD1* no resulta letal, pero produce una selección al azar del lugar de gemación (Chant y Herskowitz, 1991). Posteriormente, se clonaron y estudiaron otros genes implicados en esta función: *BUD2* y *BUD5*, que codifican, respectivamente, la proteína GAP y la GEF de Bud1 (Bender, 1993; Camus y col., 1994; Chant y col., 1991; Chant y Pringle, 1995; Park y col., 1993; Powers y col., 1991). Bud1 debe estar en estado activo – unido a GTP – para interactuar con Cdc24, la proteína GEF de una nueva GTPasa, Cdc42 (Ruggieri y col., 1992; Zheng y col., 1995). Cdc24 es capaz de inhibir la actividad GTPásica de Bud1 cuando se une a él, estabilizando su forma Bud1-GTP, y conectando así los procesos dependientes de Bud1 activa (selección de la yema) y los dependientes de la actividad de Cdc24 y Cdc42, que se describirán inmediatamente (Zheng y col., 1995). Bud1, por tanto, parece necesaria para

dirigir a Cdc24 al lugar de gemación, aunque, como veremos a continuación, Cdc24 y Cdc42 pueden no necesitar obligatoriamente la acción de Bud1 para

localizarse en la membrana plasmática (Michelicht y Chant, 1996; Elia y Marsch, 1998).

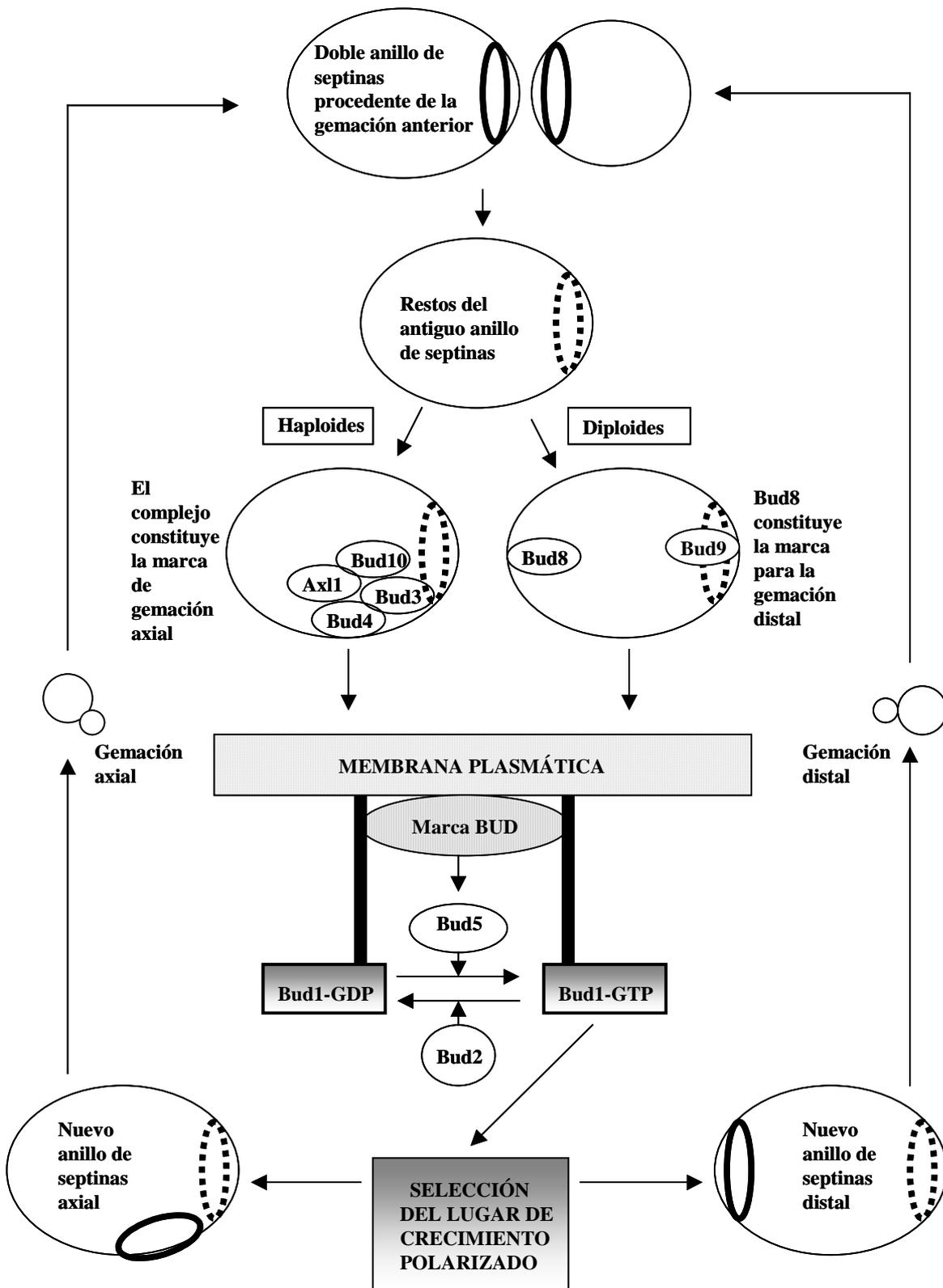


Figura 4. Especificación del patrón de polaridad axial o bipolar y ensamblaje del lugar de gemación.

4.2. Establecimiento del crecimiento polarizado: la GTPasa Cdc42.

4.2.1 La GTPasa Cdc42.

Cdc42 (revisado por Johnson, 1999) fue identificada por primera vez a partir de una cepa termosensible de *Saccharomyces cerevisiae*, que portaba una mutación que se denominó *cdc42-1*. A 37°C, en estos mutantes se imposibilita la formación de la yema, aunque la masa y volumen celulares continúan incrementándose, por lo que se produce finalmente un fenotipo de células grandes, redondeadas y sin yemas (Adams y col., 1990). Aunque la división celular se detiene a esta temperatura, no ocurre así con la replicación del DNA y la división nuclear, lo que desemboca en células multinucleadas. La polarización normal del citoesqueleto de actina – actina cortical distribuida preferentemente en las regiones de crecimiento de la célula hija y los cables de actina dirigidos hacia la yema emergente – desaparece en estos mutantes, sugiriendo la función de Cdc42 en la organización del citoesqueleto de actina durante periodos de crecimiento polarizado. Estos datos condujeron a la hipótesis de que Cdc42 dirige el crecimiento polarizado durante el ciclo celular. El fenotipo de mutantes nulos *cdc42* resultó letal, indicando la esencialidad de Cdc42 para la viabilidad celular (Johnson y col., 1990; Miller y Johnson, 1994). El análisis de secuencia indicó que Cdc42 pertenece a la subfamilia Rho de la superfamilia Ras de GTPasas.

Se han estudiado los dominios de Cdc42 implicados en la unión a guanín-nucleótidos y en la hidrólisis de GTP. Las mutaciones *cdc42*^{G12V} y *cdc42*^{Q61L} causan una disminución de la actividad GTPásica, estabilizando a la proteína en un estado permanentemente unido a GTP o “activado”. En *S. cerevisiae*, la sobreexpresión de estos alelos mutados es letal, provocando un fenotipo morfológico característico de células grandes y multigemadas con estructuras aberrantes de actina cortical localizadas en las múltiples yemas (Ziman y col., 1991). Este fenotipo sugiere una interacción constitutiva de la proteína mutada con efectores de la ruta que

conduce a una polarización incorrecta del citoesqueleto de actina.

Cdc42 sufre una prenilación con un grupo geranil-geranil-isopreno en la cisteína 188 que se encuentra en su extremo C-terminal, tras lo que se eliminan los tres aminoácidos restantes de la proteína (Finegold y col., 1991). Gracias a esta prenilación, Cdc42 se ancla en la membrana plasmática. La eliminación de esta cisteína o su sustitución por serina (C188S) impiden la prenilación y el consiguiente anclaje a membrana de Cdc42 (Ziman y col., 1991; Ziman y col., 1993). La proteína Cdc42 citoplásmica se encuentra, probablemente, bien no prenilada, o bien unida a Rdi1, proteína con capacidad GDI que es capaz de extraer de las membranas a estas GTPasas y mantenerlas en estado inactivo (Koch y col., 1997; Masuda y col., 1994). Cdc42 aparece localizada en la membrana plasmática en los lugares de crecimiento polarizado - en estos mismos lugares se localiza la actina cortical -, como son las invaginaciones de la membrana plasmática en el lugar de emergencia de la yema, el extremo apical de las yemas y el extremo apical de las proyecciones características durante el tratamiento con feromonas (Adams y col., 1984; Kilmartin y col., 1984; Ziman y col., 1991; Ziman y col., 1993). Recientemente, Cdc42 ha sido localizada en la región del cuello entre las células madre e hija en *S. cerevisiae* y en la zona del septo en *S. pombe*, indicando un posible papel en septación o citoquinesis (Johnson, 1999). La localización de Cdc42 parece estar controlada por el ciclo celular y, aunque coincide con la polarización del citoesqueleto de actina, no parece depender de la localización de ésta ni de la integridad del citoesqueleto (Ayscough y col., 1997).

Las principales dianas de Cdc42 contienen el dominio conocido como CRIB – de “Cdc42-Rac-Interactive-Binding”, pues también aparece en proteínas que interaccionan con la GTPasa de mamífero Rac -, que se encuentra en muchas proteínas que interaccionan con Cdc42, entre ellas y especialmente la familia de quinasas tipo PAK –de

“p21-activated-kinase”- (Burbelo y col., 1995) (**Figura 5**). El dominio CRIB óptimo para la interacción parece constar de 48 aminoácidos (se describe en Thompson y col., 1998), y presenta mucha mayor afinidad por Cdc42 cuando esta proteína está unida a GTP.

Cdc42 está implicada de manera fundamental en numerosos procesos en células eucarióticas y, en concreto, en *S. cerevisiae*. Los principales son la regulación de la reorganización del citoesqueleto de actina como respuesta a señales extra e intracelulares (presencia de feromona y gemación, respectivamente), como ya se ha mencionado, y la modulación de cascadas de proteínas quinasas (de respuesta a feromonas, de pseudofilamentación) que desembocan en la transcripción de genes necesarios para el control del crecimiento y otros procesos celulares que se describirán con detalle más adelante.

4.2.2. Reguladores de la actividad de Cdc42: la proteína GEF Cdc24.

Cdc24 (**Figura 5**) es la única proteína de *S. cerevisiae* con actividad GEF hacia Cdc42, es decir, capaz de activar a la GTPasa al eliminar su unión a GDP y estabilizar su asociación con GTP (Zheng y col., 1994; Ziman y Johnson, 1994). Tanto la mutación como la sobreexpresión de Cdc24 conducen a fenotipos similares a los equivalentes de Cdc42 (Ziman y Johnson, 1994). Además, los mutantes manifiestan un ligero defecto en selección del lugar de gemación (Sloat y col., 1981). Cdc24 contiene un dominio PH (de “pleckstrin homology”), un dominio DH (de “Dbl homology”) presente en la familia Dbl de GEFs, y dos potenciales dominios de unión a calcio. Cdc24 se localiza en la membrana plasmática, en el lugar de surgimiento de la yema y en el cuello madre-hija, quizá gracias a su dominio PH o a interacciones con otras proteínas, como Bud1 (Johnson, 1999). En general puede decirse que Cdc24 parece implicada en la selección del lugar de gemación, la polarización de la maquinaria biosintética hacia el lugar de emergencia de la yema y, en general, el crecimiento polarizado en la formación de la yema y del “shmoo”.

Cdc24, además de interactuar con Cdc42 y Bud1, es capaz de asociarse a otras tres proteínas que, por su interés, trataremos con más detalle: Bem1, la subunidad G β (Ste4) de la proteína G heterotrimérica acoplada a los receptores de feromonas y Far1.

4.2.2.1. Proteínas que interactúan con Cdc24: la proteína aglutinadora Bem1.

La ausencia de la proteína Bem1 provoca un fenotipo morfológico de células grandes, redondas y multinucleadas con la actina deslocalizada –similar al de mutantes *cdc24* y *cdc42*- (Chenevert y col., 1992), de crecimiento lento que llega a ser letal en algunos fondos genéticos (Leberer y col., 1996). Bem1 se localiza en el lugar de gemación y en el extremo de las yemas, como Cdc24 y Cdc42, y esto no depende de la localización de la actina (Ayscough y col., 1997; Pringle y col., 1995). Bem1 interactúa con muchas proteínas, por lo que sirve como proteína aglutinadora durante el ciclo mitótico y el apareamiento. Cdc24 interactúa por su extremo C-terminal con el extremo C-terminal de Bem1 (Matsui y col., 1996; Peterson y col., 1994; Zheng y col., 1995). Bem1 interactúa también con la GTPasa Bud1 (Zheng y col., 1995) y es capaz de asociarse a la proteína PAK Ste20 y a Ste5, proteína aglutinadora de las quinasas implicadas en la respuesta a feromonas (Leeuw y col., 1995). También interactúa con Far1, un inhibidor de la actividad del complejo Cdc28/ciclina (Lyons y col., 1996) del que se hablará más adelante. Otras proteínas con las que interactúa Bem1 son las homólogas Boi1 y Boi2 (Bender y col. 1996; Matsui y col., 1996); el doble mutante *boi1 boi2* tiene defectos en emergencia de la yema y la sobreexpresión de alguna de ellas conduce a una parada del crecimiento con células grandes, redondas, multinucleadas y sin yemas (Bender y col. 1996). Por último, y quizá éste sea el papel principal de Bem1, es una proteína capaz de unirse a la actina, con lo que la dirige hacia los lugares de crecimiento polarizado (Leeuw y col., 1995). En resumen, la función de Bem1 parece ser la de proteína

aglutinadora de componentes implicados en la emergencia de la yema y en el comienzo de la señalización provocada por feromonas.

4.2.2.2. *Proteínas que interactúan con Cdc24: la subunidad Gβ de la proteína G.*

La subunidad Gβ (Ste4) de la proteína G heterotrimérica transmite la señal iniciada por la unión de la feromona al receptor a la ruta de apareamiento que desemboca en la MAP (“Mitogen-activated-protein”) quinasa Fus3. Alelos mutados de Cdc24 incapaces de interactuar con Ste4 sufren un defecto en la orientación de la prolongación de apareamiento (Nern y Arkowitz, 1998) lo que parece indicar una implicación de Cdc24 en este proceso.

4.2.2.3. *Proteínas que interactúan con Cdc24: el regulador de ciclo celular Far1.*

Far1 es una proteína necesaria para la parada del ciclo celular en G1 en respuesta a feromonas (Chang y Herskowitz, 1990). Recientemente, se ha descrito que Far1 se encuentra asociada a Cdc24 en el núcleo y que la unión de la feromona al receptor provoca la salida del complejo del núcleo y su asociación a Bem1 y a la subunidad Gβγ en la membrana en el lugar marcado por Cdc42 para el ensamblaje del citoesqueleto (Toenjes y col., 1999; Nern y Arkowitz, 2000; Shimada y col., 2000).

4.2.3. *Reguladores de la actividad de Cdc42: las proteínas GAP Rga1, Rga2 y Bem3.*

Estas tres proteínas (**Figura 5**) son potenciales GAPs de Cdc42, aunque sólo se ha demostrado hasta el momento la actividad GAP *in vitro* de Bem3 sobre Cdc42 (Zheng y col., 1994). Bem3 contiene un dominio GAP en su extremo C-

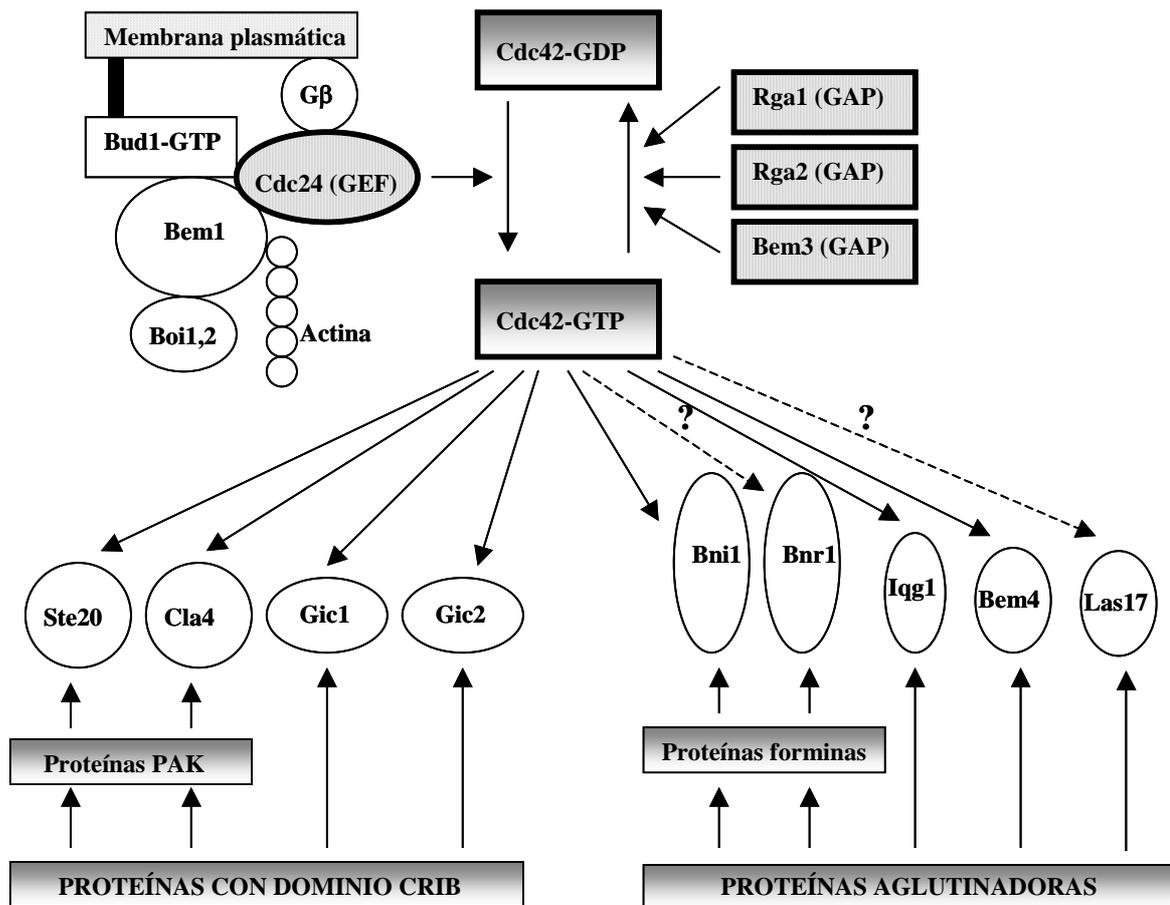


Figura 5. Proteínas que interactúan con Cdc24 y Cdc42.

terminal y un dominio PH. Interacciona con Cdc42, pero no con otras GTPasas tipo Rho (Stevenson y col., 1995). El mutante *bem3* es viable y no presenta defectos morfológicos importantes (Zheng y col., 1994; Stevenson y col., 1995).

La proteína Rga1/Dbm1 fue identificada a partir de un mutante capaz de activar la ruta de respuesta a feromonas en ausencia de Ste4 (Stevenson y col., 1995; Stevenson y col., 1992). Rga1 contiene un dominio GAP en su extremo C-terminal y dos dominios LIM en su extremo N-terminal que podrían funcionar como mediadores en interacciones entre proteínas. La pérdida de Rga1 no es letal, pero provoca un cambio en el patrón de gemación que en células haploides pasa de ser axial a bipolar, y un aumento en la expresión del gen indicador *FUS1::lacZ*, lo que sugiere una mayor activación de la ruta de respuesta a feromonas en este mutante. De acuerdo con esto, la sobreexpresión de Rga1 disminuye la expresión de este gen indicador - lo que indica un papel para Rga1 como regulador negativo de esta ruta - y reduce la temperatura restrictiva del mutante *cdc42-1* (Stevenson y col., 1995; Chen y col., 1996). Por otra parte, la mutación *rga1* aumenta la temperatura restrictiva de un mutante termosensible *cdc24*, lo que indica una acción opuesta a Cdc24. Rga1 interacciona con Cdc42 pero no con otras GTPasas tipo Rho, ni con ninguna de las proteínas quinasas constituyentes de la ruta de respuesta a feromonas (Stevenson y col., 1995).

Por último, Rga2 se ha identificado por su homología con Rga1 (G. Sprague, comunicación personal). Contiene también un dominio GAP y dos dominios LIM, su sobreexpresión disminuye la temperatura restrictiva de un mutante *cdc42-1*, y su delección aumenta la del mutante termosensible *cdc24*. Ésto la sitúa como posible candidata a GAP de Cdc42, pero aún no se ha comprobado por completo.

4.2.4. Reguladores de la actividad de Cdc42: la proteína GDI Rdi1.

La proteína Rdi1 fue identificada en *S. cerevisiae* en un estudio en el que se buscaban proteínas capaces de inhibir la disociación de GDP de la GTPasa RhoA bovina (Masuda y col., 1994). Rdi1 tiene actividad GDI sobre la GTPasa Rho1 prenilada, pero no sobre la no prenilada. Su eliminación no produce ningún fenotipo aparente, pero su sobreexpresión es letal. Coinmunoprecipita con Rho1 y Cdc42 (Koch y col., 1997). No está comprobada aún su posible actividad GDI sobre Cdc42.

4.2.5. Efectores de Cdc42: las proteínas quinasas tipo PAK.

Ste20 y Cla4 son dos miembros de la familia PAK en *S. cerevisiae* (revisado por Bagrodia y Cerione, 1999) (**Figura 5**). Skm1, proteína estudiada en el presente trabajo, es el tercer y último miembro de la familia identificado en esta levadura.

Las primeras proteínas que fueron incluidas en la familia PAK (de “p21-activated-kinase”) se descubrieron como proteínas que interaccionan con Cdc42 y Rac1, principalmente en su forma unida a GTP, en células de mamífero, y resultaron ser serín-treonín quinasas cuya actividad era estimulada por la unión con estas GTPasas (Manser y col., 1994). Ésta fue la primera evidencia de que las GTPasas tipo Rho -como son Cdc42 y Rac1 - eran capaces de actuar análogamente a como lo hace la proteína Ras, que activa a la serín-treonín-quinasa Raf al unirse a ella. Posteriormente, han sido descubiertas otras proteínas PAK en mamífero, en distintos tejidos y con distintas isoformas: Pak1/Pak α , Pak2/Pak γ , Pak3/Pak β y Pak4. Todas ellas se caracterizan por un dominio serín-treonín-quinasa en el extremo C-terminal y, a excepción de Pak4, un dominio CRIB de unión a Cdc42 y Rac en el extremo N-terminal (Lim y col., 1996; Abo y col., 1998; Bagrodia y Cerione, 1999) (**Fig. 6A**). Otras quinasas homólogas han sido descubiertas en diferentes organismos (revisado por Daniels y Bokoch, 1999; Bagrodia y Cerione, 1999).

¿Cómo estimulan Cdc42 y Rac la actividad de las proteínas PAK? Un modelo sugiere que la unión de la GTPasa al dominio CRIB induce un cambio de conformación en la PAK que estimula la actividad de ésta, mientras que otro sugiere que la interacción eliminaría algún factor que regularía negativamente a la PAK. Experimentos recientes

tanto en mamíferos como en levadura parecen indicar que el modelo correcto es una combinación de ambos (**Figura 6B**): la región que comprende al dominio CRIB esta solapada con otra región conocida como autoinhibitoria de la actividad quinasa de la PAK (Zhao y col., 1998). Se ha demostrado mediante el sistema “dos híbridos” la

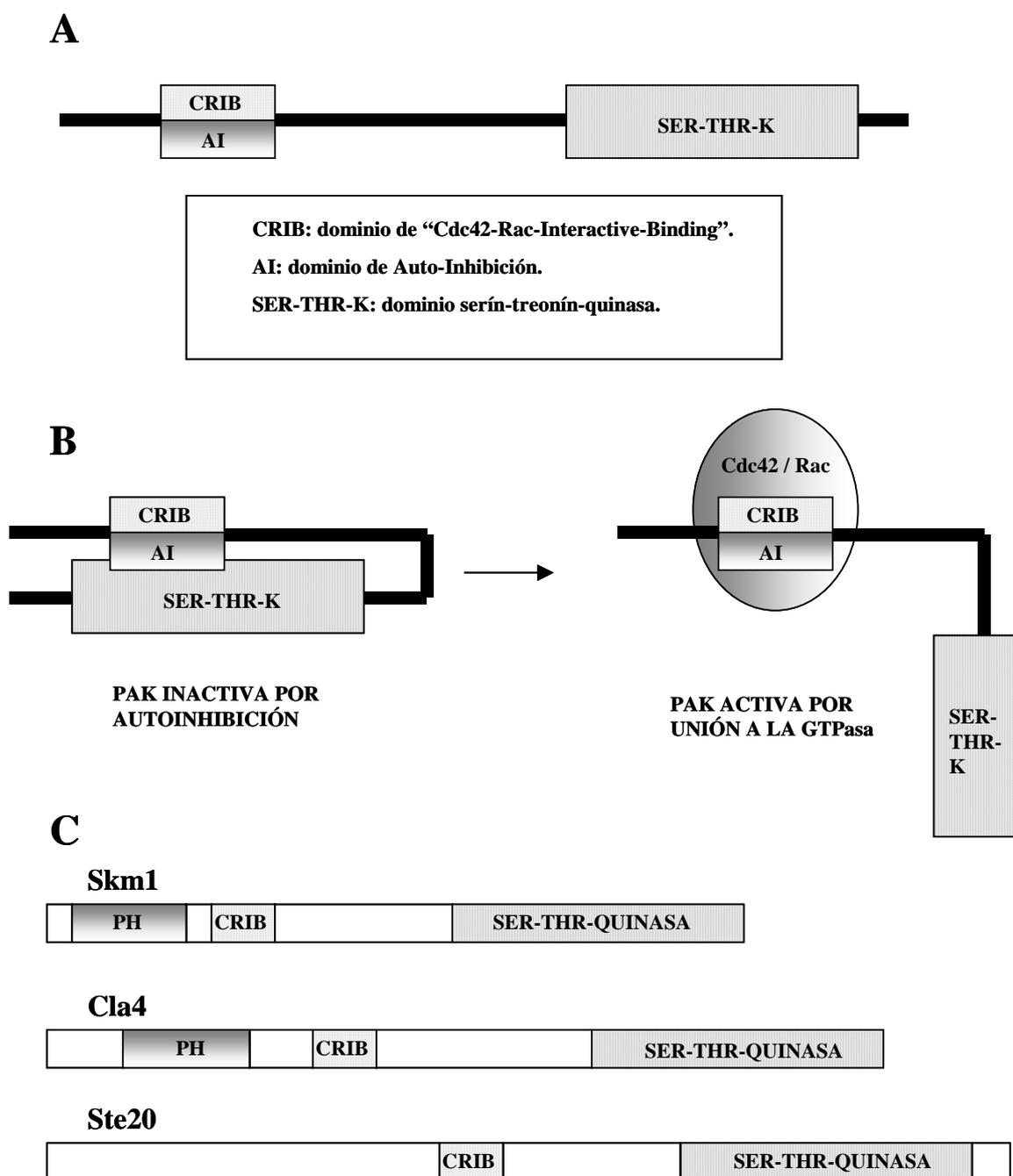


Figura 6. (A) Representación esquemática de las proteínas de la familia PAK. (B) Modelo de activación de las proteínas PAK por GTPasas.(C) Las tres proteínas PAK de *Saccharomyces cerevisiae*

interacción entre el dominio catalítico de la PAK y el extremo amino-terminal autoinhibitorio (Tu y Wigler, 1999). Esto sugiere que, en ausencia de la unión a la GTPasa, la proteína PAK mantiene inhibida su actividad quinasa mediante una interacción intramolecular entre el extremo regulatorio –solapante con el CRIB en la zona N-terminal- y el dominio quinasa. La interacción con Cdc42 o Rac obliga a la separación de estos dos dominios, a la “apertura” de la molécula y a su activación, quizá por autofosforilación (**Figura 6B**). Como detalle, resaltar que Pak4, al no contener la región autoinhibitoria ni la de unión a GTPasas, está constitutivamente activa (Abo y col., 1998).

La función principal de la familia PAK en mamíferos –y parece que en levaduras también- es servir de mediadores para las GTPasas tipo Rho en la regulación del citoesqueleto de actina. La acción de las PAK sobre el citoesqueleto parece que vendría dada por su capacidad de estimular la activación de miosinas, quizá por fosforilación de la quinasa de la cadena ligera de miosina o MLCK, importante regulador de miosinas por fosforilación (Chew y col., 1998; Sanders y col., 1999). Por otra parte, está la función de las proteínas PAK como integrantes de las cascadas de fosforilación que desembocan en el núcleo regulando la transcripción de genes determinados. En mamíferos, Cdc42 y Rac estimulan la cascada de fosforilaciones que conduce a las MAPKs JNK y p38, implicadas en respuesta a diferentes tipos de estrés (Coso y col., 1995; Minden y col., 1995; Bagrodia y col., 1995). Las proteínas PAK activan a estas MAPKs en algunos tipos celulares (Bagrodia y col., 1995; Zhang y col., 1995; Brown y col., 1996), y también en algunas circunstancias a las MAPK Erk1 y Erk2 (Lu y col., 1997), quizá en este último caso por fosforilación de Raf (King y col., 1998).

Ste20, Cla4 y Skm1, las tres proteínas tipo PAK de *S. cerevisiae* presentan un dominio serín-treonín-quinasa muy conservado en su extremo C-terminal y un dominio CRIB en el N-terminal. Cla4 y Skm1, además poseen un dominio PH en posición N-terminal respecto al CRIB (**Figura 6C**). Como ocurre con sus homólogos en mamífero, Ste20 y

Cla4 parecen relacionadas con la regulación del citoesqueleto y la transducción de señales.

4.2.5.1. Ste20.

Ste20 fue identificada por su capacidad de suprimir, en sobreexpresión, la esterilidad causada por un mutante dominante negativo *ste4*^{D62N} (Leberer y col., 1992) y por inducir la transcripción de *FUS1::lacZ* en ausencia de feromona (Ramer y Davis, 1993). La pérdida del dominio quinasa de Ste20 supone defectos en el apareamiento, la sensibilidad a feromonas y la formación de “shmoos” (Leberer y col., 1992; Ramer y Davis, 1993). Ste20 interacciona con la subunidad Gβ (Ste4) por una pequeña zona C-terminal, y esta interacción se intensifica tras la exposición a feromonas (Leeuw y col., 1998). Esta zona no aparece en las otras proteínas PAK, lo que parece convertir a Ste20 en una pieza especialmente importante para la señalización a través de la ruta de feromonas.

Ste20 podría mediar los efectos sobre el citoesqueleto de actina que controla Cdc42, puesto que la sobreexpresión de Ste20 parece suprimir el defecto en crecimiento y el fenotipo morfológico de mutantes *cdc42-1*, así como los defectos en polimerización de actina de este mutante (Eby y col., 1998). Mutantes *ste20 cla4* muestran también estos defectos en la polimerización de actina, que pueden remediarse sobreexpresando Ste20. Por otra parte, el complejo Cdc28/Cln1-2 fosforila a Ste20 cuando éste se localiza en zonas de crecimiento polarizado. Esta fosforilación se corresponde con una represión de la ruta de respuesta a feromonas, lo que parece indicar que, de esta forma, Ste20 “distingue” entre ciclo mitótico y apareamiento (Oehlen y col., 1998; Wu y col., 1998).

Ste20 puede fosforilar a Ste11 “in vitro”, iniciando así la ruta de respuesta a feromonas (Wu y col., 1995), pero también puede fosforilar –como Cla4- a Myo3, fosforilación necesaria para la acción de la miosina (Wu y col., 1997). Myo3 y Myo5 son miosinas pertenecientes a la clase I, se localizan con los acúmulos de actina cortical y son “motores

moleculares” necesarios para la organización del citoesqueleto (Goodson y col., 1996; Geli y Riezman, 1996). Un alelo mutante constitutivamente activo de Myo3, sin embargo, no complementa la letalidad ni los defectos morfológicos de un doble mutante *ste20 cla4*, ni el fenotipo del mutante sencillo *cla4*, lo que indica que esta miosina no es el único sustrato de estas quinasas.

Ste20 se une a Cdc42, preferentemente en su estado activo –unido a GTP- (Leberer y col., 1997; Peter y col., 1996; Simon y col., 1995). La interacción se produce a través del dominio CRIB de Ste20. Sin embargo, la unión entre Cdc42-GTP y Ste20 no parece necesaria para la actividad de la quinasa. Ste20 se localiza en los sitios de crecimiento polarizado –yemas emergentes y “shmoos”- mientras que el alelo delecionado en el CRIB muestra una distribución general por el citoplasma (Leberer y col., 1997; Peter y col., 1996), lo que indica que la función de Cdc42 en este caso sería localizar a Ste20 en los sitios de crecimiento polarizado.

4.2.5.2. *Cla4*.

CLA4 se identificó en un rastreo de genes esenciales en un fondo *cln1 cln2* (Benton y col., 1993; Cvrcková y Nasmyth, 1993). El mutante *cla4* muestra una morfología anormal de células con yemas alargadas, cuellos madre-hija engrosados y células multinucleadas (Cvrcková y col., 1995). *Cla4* interacciona con Cdc42-GTP y no con otras GTPasas tipo Rho (Cvrcková y col., 1995). Las mutaciones *ste20* y *cla4* no son letales, pero sí lo es la doble *ste20 cla4*, lo que indica la posibilidad de que estas quinasas tengan funciones solapantes. A la temperatura restrictiva, un mutante termosensible *ste20 cla4-75* muestra los defectos ya comentados del mutante sencillo *cla4* (yemas alargadas, cuello engrosado) y defectos en ensamblaje del anillo de septinas (Cvrcková y col., 1995).

Como Ste20, *Cla4* es capaz de fosforilar a la miosina Myo3 “in vitro”, aunque no se conozca el significado biológico de esta actividad (Wu y col., 1997). La actividad quinasa de *Cla4* está regulada

por el ciclo celular, con un pico de actividad en G2/M. Esta actividad cíclica depende de Cdc42, pues un alelo *cla4* delecionado en el CRIB no la muestra. Cdc42-GTP junto con el complejo Cdc28-Clb2 conducen a la hiperfosforilación de *Cla4*, y ésta, a su vez a la de la quinasa Gin4, todo ello necesario para el paso de crecimiento apical a isotrópico de la yema y posterior mitosis y citoquinesis (Altman y Kellog, 1997; Carroll y col., 1998; Longtine y col., 1998; Tjandra y col., 1998). Cdc42 podría estar unida a Ste20 durante el crecimiento apical y cambiar a *Cla4* durante el isotrópico, aunque también podrían tener funciones solapantes (Pruyne y Bretscher, 2000). La mutación *cdc42^{V44A}*, que confiere termosensibilidad, afecta a la unión de Cdc42 a *Cla4*, pero no a las otras PAK, siendo el fenotipo de estos mutantes similar al del mutante *cla4* y complementable por la expresión de esta PAK (Richman y col., 1999).

La pérdida de estas dos PAK conjuntamente provoca defectos graves en la polarización del citoesqueleto de actina en distintos puntos del ciclo celular (Holly y Blumer, 1999). La desaparición de las PAK en G1 conduce a defectos en el ensamblaje de las septinas y despolariza el citoesqueleto de actina cortical, lo que impide la emergencia de la yema, aunque permite el crecimiento isotrópico y las células aumentan de tamaño. Este fenotipo es diferente del descrito para mutantes *ste20 cla4-75* (Cvrckova y col. 1995), en el que las células aún pueden gemar, formando muchas de ellas largas prolongaciones con cuellos engrosados y que no llegan a dividirse. Quizá esta diferencia de fenotipos se deba a que el mutante *cla4-75* no ha perdido por completo su actividad (Holly y Blumer, 1999). Si la inactivación de ambas PAK se da en la transición S/G2 se produce una despolarización del crecimiento en la célula madre y en la hija que conduce a un crecimiento isotrópico de ambas, manteniéndose constante la relación de tamaño entre las dos. Por último, si la pérdida de las PAK se produce en mitosis se provoca un defecto en citoquinesis y en la polarización de la actina en el cuello madre-hija.

4.2.6. Otras proteínas que interaccionan con Cdc42.

4.2.6.1. Las forminas: Bni1 y Bnr1.

Bni1 (Evangelista y col., 1997; Imamura y col., 1997; Jansen y col., 1996; Kohno y col., 1996; Zahner y col., 1996) es una proteína que interacciona con las GTPasas tipo Rho (Rho1, Cdc42, Rho3 y Rho4) en *S. cerevisiae* (**Figura 5**). Además, también interacciona con Bud6 (proteína ésta que, a su vez interacciona con actina), con la profilina Pfy1 (que también se une a actina) (Evangelista y col., 1997; Imamura y col., 1997), con el factor de elongación 1α (EF1 α) (que interacciona también con la actina) (Umikawa y col., 1998), con el dominio SH3 de la miosina Myo3, y con la proteína Spa2, de función desconocida, pero necesaria junto con Cdc42 para localizar a Bni1 en las zonas de yemas en crecimiento (Fujiwara y col., 1998). Spa2, a su vez, puede interaccionar con Bud6, Pea2 – el complejo multiproteico 12S que comprende a Bni1, Sph1, Spa2, Pea2 y Bud6 se conoce como polarisoma (Sheu y col., 1998) - y con componentes de las rutas de MAP quinasas de respuesta a feromonas y de integridad celular, lo que sugiere la formación de grandes complejos multiproteicos que englobarían a todas estas proteínas en las zonas de crecimiento.

La proteína Bnr1 es homóloga de la anterior (Imamura y col., 1997) y, como ella, también interacciona con la profilina. De entre las GTPasas tipo Rho, hasta el momento tan sólo se ha descrito la interacción de Bnr1 con Rho4 en estado activo, pero su alta homología con Bni1 no permite descartar una posible interacción con Cdc42 (Imamura y col., 1997). Las forminas, por tanto, podrían actuar como proteínas aglutinadoras para Cdc42 y otras GTPasas tipo Rho, para unir las al citoesqueleto de actina.

4.2.6.2. Iqg1/Cyk1.

Iqg1 (Epp y Chant, 1997; Lippincott y Li, 1998; Osmann y Cerione, 1998) es un homólogo de las proteínas IQGAPs de mamífero. Interacciona con actina, calmodulina y, a través de un dominio GAP, con Cdc42, preferiblemente cuando ésta se

encuentra unida a GTP (**Figura 5**). El fenotipo del mutante consiste en defectos en citoquinesis, con yemas alargadas o bien múltiples yemas, y células multinucleadas. La proteína se localiza en el sitio de emergencia de la yema y formando un anillo en la zona del cuello madre-hija, colocalizando con los anillos de septinas, actina y Myo1. Quizá la función de Iqg1 sea coordinar a Cdc42 con el anillo de actina-miosina durante la citoquinesis.

4.2.6.3. Bem4/Rom7.

Bem4 interacciona con Cdc42, Rho1, Rho2 y Rho4, independientemente de la unión de estas GTPasas a GTP o GDP (**Figura 5**). La pérdida de Bem4 produce termosensibilidad y un fenotipo de células grandes, redondas, multinucleadas, sin yemas, con actina deslocalizada. La sobreexpresión simultánea de Cdc42 y Rho1 suprime este fenotipo (Mack y col., 1996; Hirano y col., 1996).

4.2.6.4. Las17/Bee1.

Otra familia de proteínas aglutinadoras que relacionan a Cdc42 con el citoesqueleto de actina son las homólogas a la WASP (“Wiskott-Aldrich-syndrome-protein”) humana (Featherstone, 1997; Kirchhausen y Rosen, 1996; Ochs, 1998). Las17/Bee1 es el homólogo de esta familia en *S. cerevisiae* (Li, 1997). Sin embargo, muestra algunas diferencias, como no poseer dominio CRIB, por lo que no se sabe con certeza si, como en humanos, interacciona con Cdc42. Los mutantes *las17* crecen lentamente y presentan defectos en gemación, citoquinesis y organización de la actina. Las17 se localiza en los acúmulos de actina cortical, interaccionando con ella y con otras proteínas fijadoras de actina (Li, 1997; Naqvi y col., 1998).

4.2.6.5. Gic1 y Gic2.

Gic1 fue identificada inicialmente como supresora de la mutación termosensible *bem2-101* (Chen y col., 1997), y después, junto con Gic2, se detectó en una búsqueda de proteínas que contuvieran el dominio CRIB (Brown y col., 1997). Ambas proteínas presentan una alta homología y,

mientras que la pérdida de una de ellas no provoca un fenotipo aparente, la eliminación de ambas provoca termosensibilidad y defectos morfológicos como células grandes, redondas, multinucleadas y sin yemas, con localización incorrecta de la actina, depósito deslocalizado de la quitina, huso mitótico anormal y defectos en la orientación de los “shmoos”. Gic1 y Gic2 interactúan con Cdc42 (**Figura 5**), preferentemente unido a GTP (Chen y col., 1997; Brown y col., 1997).

4.2.6.6. Otros posibles efectores de Cdc42: Msb3 y Msb4.

La pérdida de las proteínas homólogas Msb3 y Msb4 produce crecimiento lento y células grandes y redondeadas con desorganización parcial del citoesqueleto de actina. Su localización es la misma que la de Cdc42 y depende de esta GTPasa, y su sobreexpresión complementa a mutantes *cdc24* y *cdc42*. El cuádruple mutante *msb3 msb4 gic1 gic2* es letal. Se ha sugerido que Cdc42 controlaría el citoesqueleto por diversas vías paralelas, y que una de ellas incluiría a Msb3 y Msb4 (Bi y col., 2000).

4.2.7. La GTPasa Cdc42: modelo del establecimiento del crecimiento polarizado en la gemación.

Una vez que se ha llevado a cabo el ensamblaje del sitio de gemación y la GTPasa Bud1 señala el lugar de incipiente formación de la yema entra en juego Cdc42, el segundo componente de la hipotética cascada de GTPasas que controla el crecimiento polarizado en *S. cerevisiae*. Tras la anterior descripción de los reguladores y proteínas conocidas que interactúan con Cdc42, a continuación se expone un posible esquema de la actividad de esta GTPasa a lo largo del proceso de gemación (según Johnson, 1999) (**Figura 7**). La proteína Cdc42, una vez sintetizada, sufre la prenilación que hace posible su anclaje a membrana, pero inmediatamente es secuestrada por la GDI Rdi1 que la mantiene en el citoplasma en su forma unida a GDP. Por otra parte, la GTPasa Bud1 está anclada en la membrana plasmática señalando el punto de nueva gemación. En este momento se encuentra en

su estado activo o unido a GTP, y en esta conformación es capaz de unirse a Cdc24, la GEF de Cdc42. De esta forma, Cdc24 es llevada a la membrana, y es activada por la unión a Bud1-GTP en el lugar de futura gemación. Cdc24 está unida formando un complejo con la proteína aglutinadora Bem1, que, a su vez, une actina. De esta forma, la actina es polarizada también hacia el lugar de gemación. Cdc24, al ser translocada a membrana ve activada su capacidad GEF hacia Cdc42, lo que provoca su interacción con ésta que, al sustituir el GDP por GTP, se separa de Rdi1 y se ancla a la membrana por su residuo prenilado, también en el sitio de incipiente gemación. Una vez que Cdc42 ha intercambiado su GDP por GTP por la acción de Cdc24, ésta se disocia de Cdc42 y de Bud1, que ahora se encuentra en su forma unida a GDP por la acción de su GAP Bud2. Cdc24 queda libre hasta que sea necesario un nuevo intercambio de guanín-nucleótidos.

A partir de ahora es Cdc42 quien, desde su estado activado –unido a GTP- y anclado en la membrana en el sitio de emergencia de la yema, va a controlar el proceso. Cdc42 va a interactuar con sus efectores poseedores de dominio CRIB: Gic1 y Gic2 y alguna de las proteínas PAK (Ste20, Cla4 o Skm1). La más probable candidata a unirse a Cdc42 en este momento es Ste20, por su conocida localización en los extremos apicales de las yemas y su fosforilación dependiente de Cdc28/Cln1-2 en esta fase del ciclo. Cdc42, por otro lado, unirá todo este complejo a la proteína aglutinadora Bni1, que a su vez se asocia con las miosinas Myo3 y Myo5. De esta forma, Bni1 crea una proximidad entre Ste20 y las miosinas que desemboca en la fosforilación de éstas por la proteína PAK. Bni1 es capaz de interactuar con otras proteínas que, a su vez, se asocian al citoesqueleto de actina: la profilina Pfy1, el factor de elongación EF1 α , Bud6 y Spa2. Todo este complejo se convertirá en el núcleo del ensamblaje de los anillos de septinas, quitina y Myo1, y de la polimerización de la actina hacia el punto de emergencia de la yema.

Tras la replicación del DNA, la yema sufre la transición de crecimiento apical a isotrópico. Este paso requiere de la activación del complejo Cdc28/Clb1-2 y del efecto de Cdc42-GTP sobre la

proteína PAK Cla4 –su actividad máxima se da en la transición G2/M - y, quizá a través de ella, sobre la proteína quinasa Gin4. Ambas quinasas resultan hiperfosforiladas y permiten que el cambio del

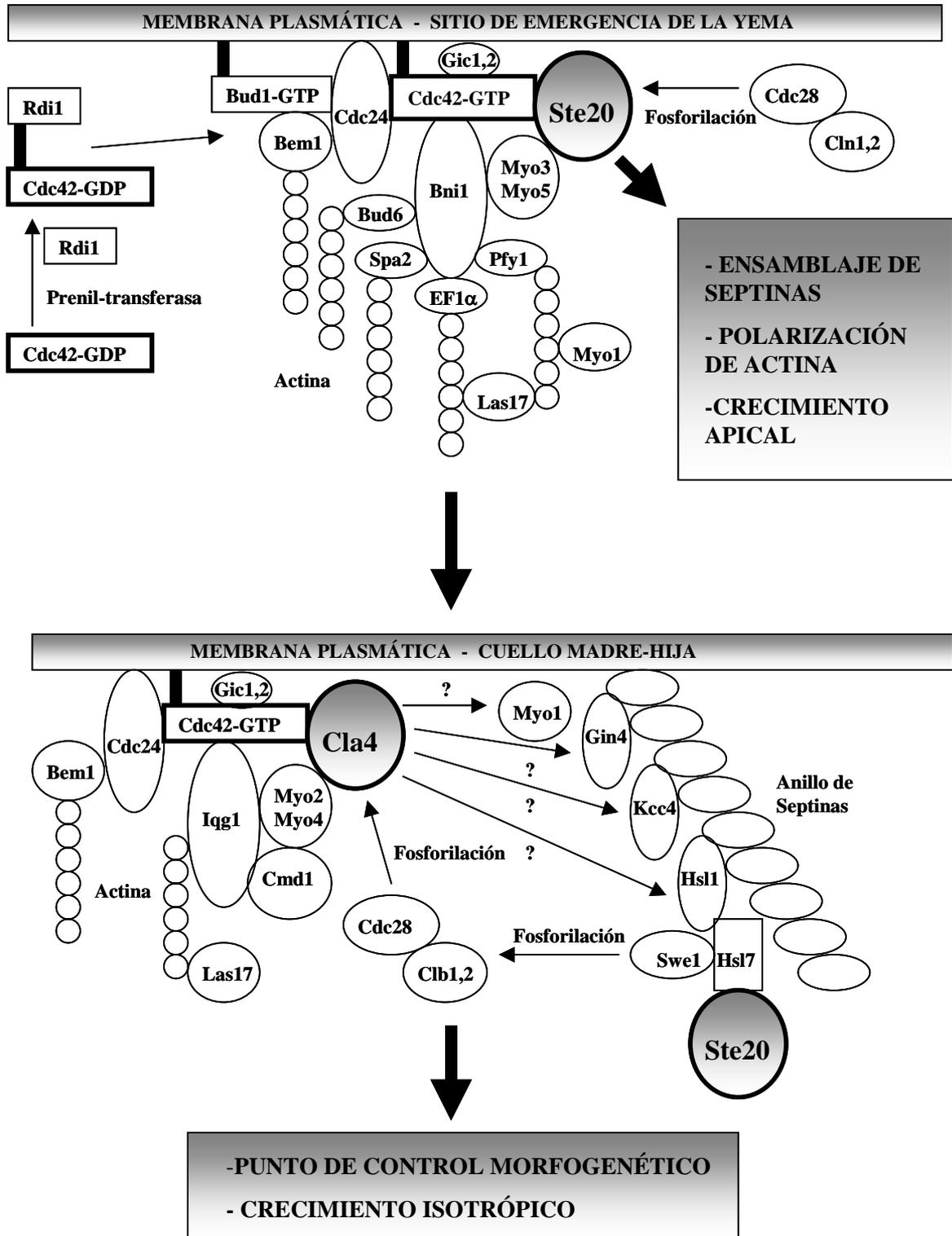


Figura 7. Modelo de actividad de Cdc42 y las proteínas PAK en crecimiento polarizado (gemación)

patrón de crecimiento se dé con éxito. En este momento, Cdc42 podría también interactuar con la proteína aglutinadora Iqg1, capaz de asociarse a la calmodulina Cmd1 a través de su dominio IQ y a la actina por su dominio de homología a calponina o CH. Cla4 podría entonces fosforilar a la miosina Myo1 -que forma un anillo alrededor del cuello-, a las miosinas Myo2 y Myo4 -que están unidas a la calmodulina-, a las septinas -que se encuentran formando también un anillo alrededor del cuello madre-hija- o a las quinasas asociadas al anillo Gin4 -como ya se ha comentado-, Kcc4 y Hsl1. En conjunto, todo conduciría a la formación de un anillo de actina-miosina dependiente de las septinas en la región del cuello. Este anillo, tras la anafase, sufriría una contracción que conduciría a la citoquinesis.

4.2.7.1. Regulación de las proteínas PAK por ciclo celular.

Las PAK Ste20 y Cla4 parecen actuar dirigiendo la polarización del crecimiento de distinta forma (**Figura 7**), y están controladas, en última instancia, por el complejo Cdc28/ciclinas. Cdc28-Cln1,2 parece regular la función del complejo Cdc42-Ste20, probablemente por fosforilación directa de Ste20 (Oda y col., 1999). Esta fosforilación en la transición G1-S permite a Ste20 dirigir el crecimiento apical de la yema y, cuando la actividad de Cdc28-Cln1,2 es más continuada, el crecimiento pseudohifal (Oehlen y Cross, 1998; Wu y col., 1998). Cla4, en cambio, es necesaria para el cambio de crecimiento apical a isotrópico, lo que viene apoyado en el hecho de que Cla4 sufre una hiperfosforilación dependiente de Cdc28/ciclinas B en la transición G2-M (Tjandra y col., 1998). Cla4 promueve el paso de crecimiento apical a isotrópico posiblemente a través de las quinasas Gin4, Hsl1 y Kcc4, parcialmente redundantes y cuya pérdida produce un fenotipo similar al de mutantes *cla4* (Altman y Kellog, 1997; Tjandra y col., 1998; Barral y col., 1999). Estas quinasas están asociadas a las

septinas, y necesitan de la presencia de éstas para ser activadas por Cdc28-Cln1,2 (Altman y Kellog, 1997; Tjandra y col., 1998). Hsl1 interactúa con Hsl7, y esta proteína a su vez con Swe1. Esta interacción provoca la fosforilación de Swe1, probablemente por Hsl1, lo que lo conduce a su degradación (Shulewitz y col., 1999; McMillan y col., 1999). Al ser Swe1 una proteína que fosforila al complejo Cdc28-Cln1,2, produciendo así su inactivación y deteniendo el paso G2-M, la degradación de Swe1 tiene el efecto inverso, provocando el paso de crecimiento apical a isotrópico. Además, Hsl7 puede competir con Cdc42 por unirse a Ste20, lo cual dejaría libre a Cdc42 para interactuar con Cla4 (Fujita y col., 1999). Así pues, la localización de las septinas es la que provoca, a través de Hsl1 y Hsl7, la fosforilación y posterior degradación de Swe1, con la consiguiente transición de crecimiento apical a isotrópico. Si las septinas no se han ensamblado correctamente, por tanto, Swe1 sigue inactivando a Cdc28-Cln1,2 y el ciclo se detiene. Este es el conocido como punto de control o “checkpoint” morfo genético.

4.2.8. La GTPasa Cdc42 y otros procesos de crecimiento polarizado.

Hasta ahora se ha descrito con detalle el proceso de gemación como modelo para comprender la implicación de las proteínas GTPasas en el control del crecimiento polarizado. Sin embargo, la gemación no es el único proceso de este tipo que se da en *S. cerevisiae*. Concretamente, la formación de la prolongación de apareamiento en respuesta a feromonas y el crecimiento pseudohifal son también procesos en los que el crecimiento se encuentra polarizado, y también en ellos se ve involucrada de manera fundamental la GTPasa Cdc42. Ambos procesos dependen de cascadas de fosforilación que desembocan en quinasas tipo MAP, y por ello se describirán más adelante en el apartado correspondiente a este tipo de rutas.

5. CONTROL DE LA SECRECIÓN POLARIZADA: LAS GTPasas Rho3 Y Rho4.

Las GTPasas parcialmente redundantes Rho3 y Rho4 cumplen un papel importante en el crecimiento polarizado (Matsui y Toh-e, 1992; Imai y col., 1996). La pérdida de ambas conduce a la despolarización de la actina. Rho3 parece implicada en dirigir a las vesículas secretoras hacia la membrana en el lugar de crecimiento (**Figura 8**). Sec4 es una GTPasa tipo Rab que se une a vesículas y que está implicada tanto en el transporte polarizado de éstas como en su fusión a la membrana (Finger y Novick, 1998). Tpm1 es la tropomiosina, uno de los principales componentes de los cables de actina (Liu y Bretscher, 1989). La mutación en *RHO3* es letal en combinación con la

mutación *sec4-2*, y la sobreexpresión de Sec4 o Tpm1 complementa los defectos de un mutante *rho3* (Imai y col., 1996; Kagami y col., 1997). Rho3 activa, unida a GTP, es capaz de unirse con otras proteínas implicadas en dirigir las vesículas: Myo2, la miosina que une las vesículas a los cables de actina, y Exo70, implicado en la fusión de estas vesículas (TerBush y col., 1996; Pruyne y col., 1998; Robinson y col., 1999; Schott y col., 1999). Rho3 se localiza en las regiones de crecimiento polarizado al igual que Myo2, Sec4 y Exo70 (Robinson y col., 1999). Todo ello sugiere un papel para Rho3 como reguladora del transporte vesicular a lo largo de los cables de actina.

6. MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD CELULAR EN LA ZONA DE CRECIMIENTO POLARIZADO: LAS GTPasas Rho1 Y Rho2.

Rho1 y Rho2 son dos GTPasas parcialmente redundantes. Rho1 es esencial (Madaule y col., 1987) y Rho2 no lo es, pero puede reemplazar a Rho1 si es sobreexpresada (Ozaki y col., 1996). Rho1 (**Figura 8**) se localiza en los sitios de crecimiento de forma dependiente de actina (McCaffrey y col., 1991; Yamochi y col., 1994; Ayscough y col., 1999), y allí es activada por sus proteínas GEFs Rom1 y Rom2, parcialmente redundantes (Ozaki y col., 1996; Manning y col., 1997). El fenotipo típico de mutantes *rho1* muestra células capaces de generar una pequeña yema pero que enseguida se lisa por su extremo apical, lo que indica un defecto en síntesis y expansión de la pared celular de la yema. Rho1 estimula la síntesis de la pared actuando como subunidad regulatoria del complejo glucan-sintasa (cuya subunidad catalítica puede ser una de las dos β -1,3-glucan-sintasas, Fks1 o Fks2) y a través de la ruta de integridad celular mediada por Pkc1 y la MAP quinasa Slt2 (Cabib y col. 1998; Schmidt y Hall, 1998). Algunos alelos

rho1 sufren despolarización de la actina (Heliwell y col., 1998), lo que indica su función en control de la organización de la actina. Rho1 parece señalar hacia la actina a través de la ruta de la MAP quinasa Slt2 (Schmidt y Hall, 1998). Slt2 está activado en períodos de crecimiento polarizado y su pérdida causa despolarización del citoesqueleto (Mazzoni y col., 1993). Sin embargo, la pérdida de Rom2 o Pkc1 hiperpolariza la actina y el crecimiento (Paravicini y col., 1992; Ozaki y col., 1996; Manning y col., 1997), y la sobreexpresión de Rho1 o la pérdida de Bem2 o Sac7, GAPs de Rho1, conducen a una despolarización. Esto sugiere un doble efecto de Rho1 sobre el citoesqueleto de actina. Recientemente se ha descrito que ambos efectos son controlados por Rho1 a través de su interacción con Pkc1, y que esta quinasa actúa a través de la ruta que desemboca en Slt2 para polarizar la actina y a través de una ruta aún desconocida para despolarizarla (Delley y Hall, 1999).

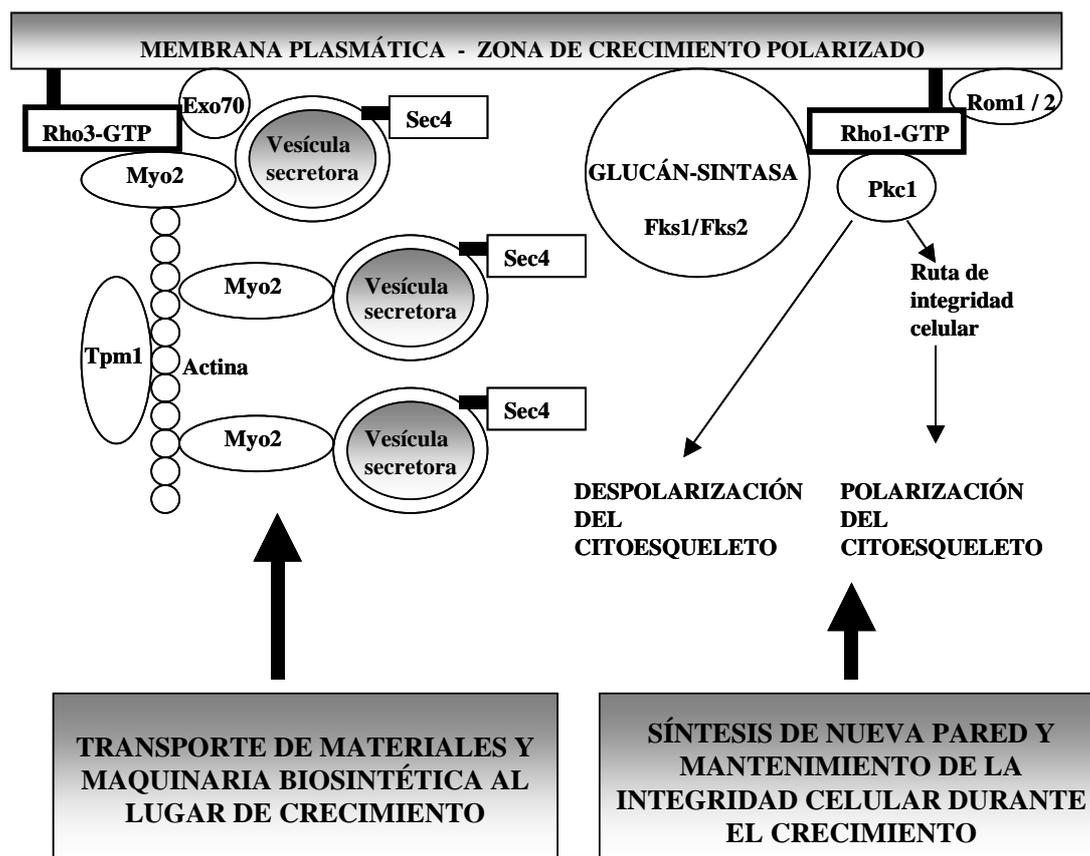


Figura 8. Modelo de actividad de Rho3 y Rho1 durante la secreción y la biosíntesis de la pared celular.

II. RUTAS DE MAP QUINASAS IMPLICADAS EN CRECIMIENTO POLARIZADO.

1. GENERALIDADES SOBRE MAP QUINASAS EN *Saccharomyces cerevisiae*.

Las células de *S. cerevisiae* poseen rutas de señalización complejas que permiten una rápida respuesta frente a estímulos externos. Entre las rutas de señalización en levaduras destacan las que incluyen cascadas de MAP (“mitogen-activated-protein”) quinasas (Herskowitz, 1995; Levin y Errede, 1995). Estas rutas generalmente contienen tres proteínas quinasas que actúan en serie, activando cada una a la siguiente (**Figura 9**): una MAP

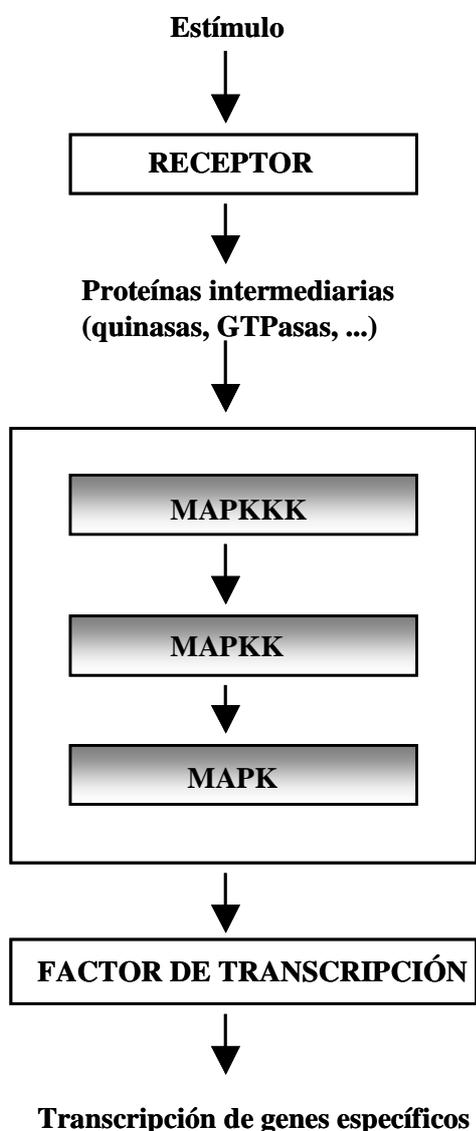


Figura 9. Módulo de activación en cascada en rutas de MAP quinasas.

quinasa quinasa quinasa (MAPKKK) que, cuando la ruta se activa, fosforila a la MAP quinasa quinasa (MAPKK), y esta a su vez lo hace con la MAP quinasa (MAPK) (Cobb y Goldsmith, 1995; Cooper, 1994; Marshall, 1994). La MAPK activada, entonces, entraría en el núcleo para regular factores de transcripción mediante fosforilación. De esta forma, muchas señales extra o intracelulares, a través de las cascadas de MAPK, provocan como respuesta de la célula la transcripción de determinados genes específicos (revisiones en Garrington y Johnson, 1999; Schaeffer y Weber, 1999).

En *S. cerevisiae* existen cinco MAP quinasas, formando parte de otras tantas cascadas de señalización (Hunter y Plowman, 1997; Gustin y col., 1998; Banuett, 1998; Posas y col., 1998; Heinisch y col., 1999) (**Figura 10**), que se conocen como: ruta de respuesta a feromonas (o de apareamiento), ruta de crecimiento pseudofilamentoso-invasivo, ruta de integridad celular, ruta de respuesta a alta osmolaridad y ruta de ensamblaje de la pared de la espora. Recientemente se ha descrito una posible nueva ruta –conocida por las siglas SVG (de “STE-vegetative-growth”) que comparte la MAPK y otros componentes con la ruta de invasividad, y que estaría implicada en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento vegetativo (Lee y Elion, 1999).

Las diferentes MAPK existentes en levadura, y sus homólogos en otros organismos (otras levaduras, plantas, mamíferos), pueden clasificarse según la ruta en que estén implicadas o por el aminoácido que separa los dos residuos del dominio regulatorio de la MAPK que son fosforilables por la MAPKK. En el caso de MAPKs como Hog1 en *S. cerevisiae* o p38 en mamíferos, el aminoácido es glicina; en otras MAPK, como Fus3, Kss1 y Slt2 en levadura o ERK1/2 en mamíferos, el

aminoácido es glutámico; es especial el caso de la MAPK Smk1, implicada en el ensamblaje de la pared de la espora en *S. cerevisiae*, ya que el aminoácido en cuestión es asparragina (Kyriakis y Avruch, 1996; Robinson y Cobb, 1997).

Nos referiremos en más profundidad a las

rutas que se ven implicadas en este trabajo: de apareamiento, de pseudofilamentación o invasividad, de integridad celular y la recientemente descrita ruta SVG. También, por el papel que desempeñan en ella la GTPasa Cdc42 y la proteína PAK Ste20, se describirá brevemente la ruta de respuesta a alta osmolaridad.

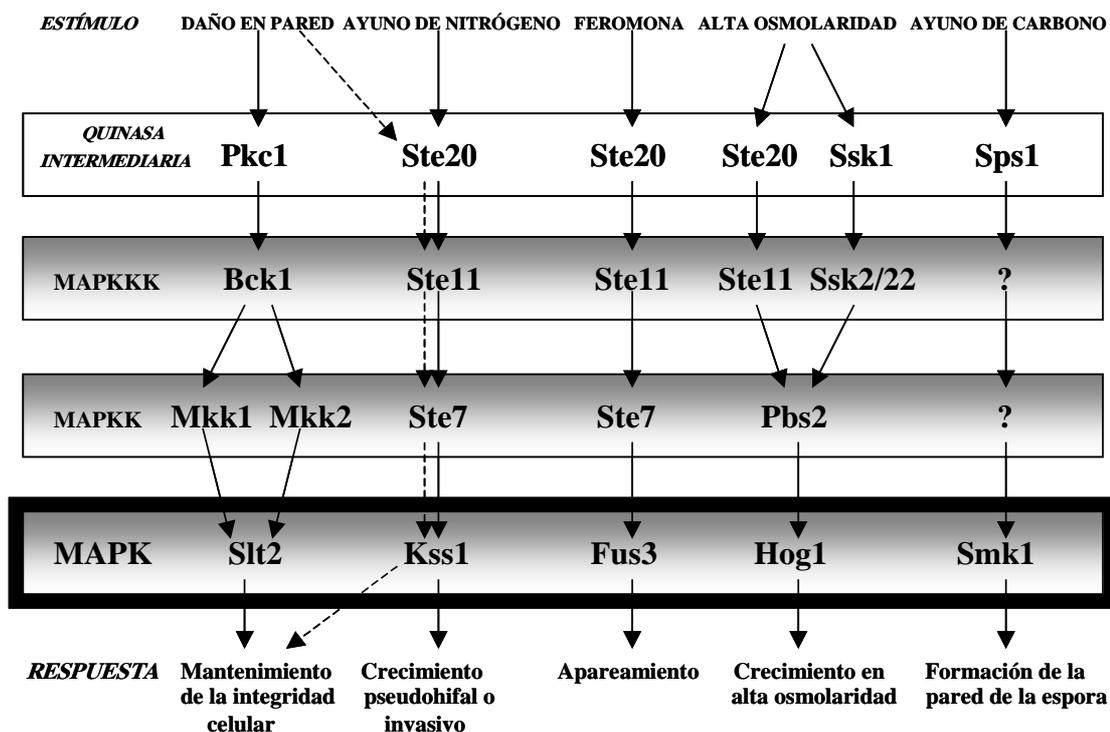


Figura 10. Cascadas de MAP quinasas descritas en *S. cerevisiae*. Las flechas discontinuas indican la ruta SVG.

2. RUTA DE RESPUESTA A FEROMONAS O DE APAREAMIENTO.

Las células de *S. cerevisiae* pueden tener dos tipos sexuales, α y a . Cada uno de ellos secreta al exterior un pequeño péptido, la feromona, -factor a o α , según el tipo sexual de la célula que lo produce-, que cuando es detectado por el tipo sexual opuesto, provoca su parada de ciclo en G1, la polarización del crecimiento hacia la fuente de emisión de feromona y la expresión de proteínas necesarias para la adhesión entre células, la fusión celular y la cariogamia, para dar así lugar a un cigoto diploide. Estas respuestas son mediadas por una cascada de MAPK que se activa en presencia de la

feromona. La feromona (**Figura 11**) se une a un receptor de siete dominios transmembranales, induciéndole un cambio de conformación que provoca la disociación de la proteína G heterotrimérica que se halla asociada a él, separándose de la subunidad $G\alpha$ (Gpa1) el complejo $G\beta\gamma$ (Ste4-Ste18) (Blinder y col., 1989; Dietzel y Kurjan, 1987; Jahng y col., 1988; Miyajima y col., 1987). $G\beta\gamma$ causa la activación de toda la cascada de feromona a través de Ste5 (Cairns y col., 1992; Leberer y col., 1993; Stevenson y col., 1992; Whiteway y col., 1995) y de la quinasas tipo PAK

Ste20 (Leberer y col., 1992; Leberer y col., 1992; Wu y col., 1995). Esta quinasa activa al módulo constituido por la MAPKKK Ste11, la MAPKK Ste7 y la MAPK Fus3. Otras proteínas, como Ste50 (Rad y col., 1992; Xu y col., 1996) y Bem1 (Kao y col., 1996; Leberer y col., 1996; Leeuw y col., 1995; Lyons y col., 1996) podrían tener un papel en la transmisión de la señal, pero no parece tan esencial como el de Ste5 y Ste20. Ste5 cumple el papel de proteína aglutinadora de todos los componentes de la ruta al interactuar con Ste11, Ste7 y Fus3 (Choi y col., 1994; Inouye y col., 1997; Marcus y col., 1994; Printen y Sprague, 1994; Kranz y col., 1994). Esta acción aglutinadora facilita las interacciones entre las proteínas del módulo e incrementa la especificidad de la cascada, lo que impide las interacciones con quinasas parecidas de otras rutas. Como ejemplo, el caso de la MAPKKK Ste11 que, como se describe más adelante, también interviene en la ruta de respuesta a alta osmolaridad que desemboca en la MAPK Hog1 (Posas y Saito, 1997). La unión de Ste11 a Ste5 permite que, en presencia de feromona, la fosforilación de Ste11 desemboque en activación de la MAPK Fus3, mientras que, en ausencia de Ste5, conduciría a la activación de Hog1 o de Kss1.

La quinasa PAK Ste20 es la serín-treonín-quinasa que activa a la MAPKKK Ste11 por fosforilación en su extremo N-terminal (Leberer y col., 1992; Ramer y Davis, 1993; Drogen y col., 2000). En este punto juega un papel importante Ste50, que interactúa con Ste11 (Xu y col., 1996) y de alguna forma coopera con Ste20 en la activación de la MAPKKK, quizá favoreciendo una conformación de Ste11 accesible a la fosforilación por Ste20 (Wu y col., 1999). Un mutante *ste20* pierde casi toda su capacidad de apareamiento, pero no es completamente estéril como lo es un mutante en la subunidad G β (Akada y col., 1996). Las otras dos proteínas PAK de *S. cerevisiae*, Cla4 (Cvrckova y col., 1995) y Skm1 (Martín y col., 1997), podrían explicar este efecto al presentar un posible solapamiento de funciones con Ste20.

Por otra parte, Bem1 es capaz de interactuar con Far1 (Lyons y col., 1996), proteína necesaria para la parada del ciclo celular en G1 (Chang y Herskowitz, 1990). La conjugación de las dos células de tipo sexual opuesto va acompañada de la sincronización de sus ciclos celulares. La parada del ciclo está provocada por fenómenos dependientes de Far1 e independientes de él. Far1 es un inhibidor del complejo Cdc28-ciclinas G1 (Jeoung y col., 1998; Peter y Herskowitz, 1994), efecto que provoca la parada en G1 necesaria para el apareamiento. La MAPK Fus3 es esencial en este proceso porque es ella la que activa a Far1 por fosforilación (Chang y Herskowitz, 1992; Errede y col., 1993; Gartner y col., 1998; Peter y col., 1993; Tyers y Futcher, 1993). Far1, antes de la detección de la feromona, se encuentra en el núcleo y recientemente se ha descrito que se halla unida a Cdc24. La presencia de la feromona sería la que provocaría la salida de Far1-Cdc24 del núcleo y permitiría su interacción con Bem1 en la zona donde se emitirá la prolongación de apareamiento (Toenjes y col., 1999; Nern y Arkowitz, 2000; Shimada y col., 2000). Los procesos implicados en la parada de ciclo que son independientes de Far1 son más complejos y aún no están bien estudiados.

La estimulación por feromona estimula la transcripción de diversos genes. Estos genes tienen en común la presencia en su zona promotora de unas secuencias conocidas como PRE (“pheromone-response-elements”) (Hagen y col., 1991; Kronstad y col., 1987). La MAPK Fus3 promueve la transcripción de estos genes mediante la fosforilación de Dig1/Rst1, Dig2/Rst2 y Ste12 (Cook y col., 1996; Tedford y col., 1997). Ste12 es un factor de transcripción que reconoce las secuencias PRE, y Dig1 y Dig2 son proteínas relacionadas que actúan como reguladores negativos de Ste12. Dig1, Dig2, Ste12 y Fus3 aparecen formando un complejo en células no estimuladas por feromona. La activación de la ruta provoca la fosforilación de Dig1, Dig2 y Ste12 por Fus3, lo que conduce a la separación de Dig1 y Dig2 de Ste12, con la consecuente activación transcripcional (Elion y col., 1993; Tedford y col., 1997).

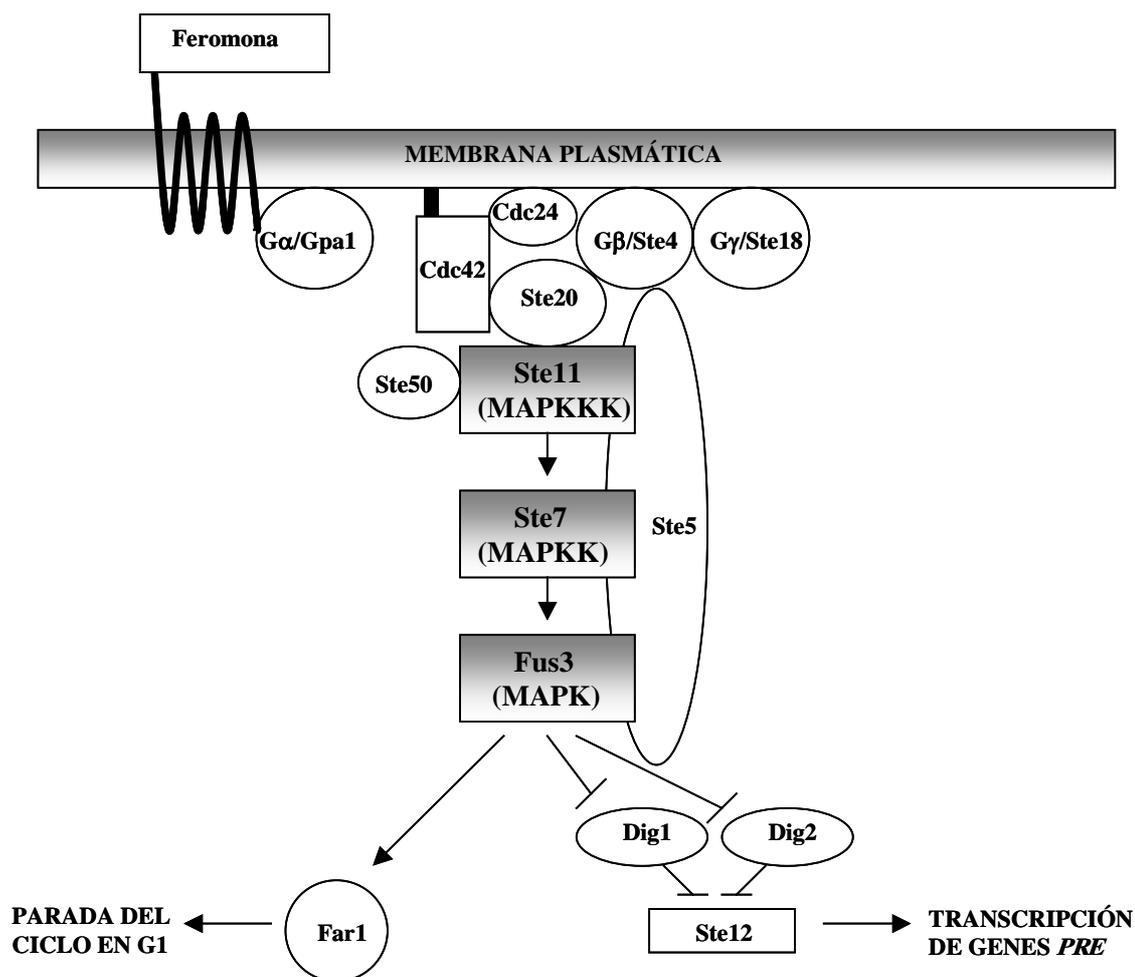


Figura 11. Ruta de respuesta a feromonas o de apareamiento.

2.1. Papel de la GTPasa Cdc42 en la ruta de respuesta a feromonas.

Se ha propuesto que el inicio de la activación de la ruta podría deberse a la activación de Ste20 por Cdc42. Se ha descrito que mutantes defectivos en *CDC42* no muestran aumento de la transcripción de *FUS1::lacZ* en respuesta a feromonas (Simon y col., 1995; Zhao y col., 1995). Por otra parte, células delecionadas en el gen que codifica la proteína GAP de Cdc42 Rga1 muestran, en ausencia de feromonas, un incremento de la transcripción de los genes controlados por la ruta (Stevenson y col., 1995). La subunidad Gβ interacciona con la GEF de Cdc42, Cdc24 (Nern y Arkowitz, 1998; Zhao y col., 1995), que a su vez activa a Cdc42. Todo esto apunta a que Cdc42, al unirse al dominio CRIB de Ste20, separaría el extremo N-terminal autoinhibitorio de la proteína

PAK de su dominio quinasa, provocando su autofosforilación y activación (Ramer y Davis, 1993; Wu y col., 1995). Sin embargo, células que contienen un alelo *ste20* que ha perdido el dominio CRIB de interacción con Cdc42 presentan niveles de señalización y de apareamiento similares a los que presenta la cepa silvestre (Leberer y col., 1997; Peter y col., 1996), siendo el único defecto en estas células un ligero fallo de localización de Ste20 en los lugares de formación de la proyección de apareamiento, donde se localiza Cdc42. Así pues, la única función de Cdc42 en esta ruta podría ser la de localizar a Ste20 en el lugar de formación de la proyección polarizada, y no la de activar a Ste20 (Peter y col., 1996; Simon y col., 1995; Zhao y col., 1995). ¿Cómo se produce, entonces, la activación de

Ste20? Se ha descrito que la estimulación por feromona induce la interacción entre G β y Ste20 (Leeuw y col., 1998) a través de un dominio muy pequeño situado en el extremo C-terminal de Ste20, fuera de su dominio quinasa. Por otra parte, un mutante *ste20* defectivo en su actividad quinasa y, por tanto, incapaz de autofosforilación, aún muestra, en presencia de feromonas, fosforilación de Ste20 (Wu y col., 1995). Si es la unión a la subunidad G β o a una proteína quinasa desconocida la que provoca la fosforilación y activación de Ste20 es una cuestión por estudiar. Por último, un trabajo reciente (Moskow y col., 2000) apuesta de nuevo por la importancia de Cdc42 en la señalización a través de esta ruta: un alelo mutante *cdc42* incapaz de interactuar con Ste20 no detiene su ciclo en G1 en

presencia de feromonas y presenta muy reducidos niveles de transcripción de *FUS1*. Además, un alelo *ste20* incapaz de interactuar con Cdc42 por haber perdido su dominio CRIB es capaz de restaurar la sensibilidad a feromonas de este mutante. Según estos autores, ésto no significaría que Ste20 no necesita a Cdc42 para realizar su función, ya que la pérdida del dominio CRIB conlleva la eliminación del dominio autoinhibitorio presente en todas las PAK y, por consiguiente, la creación de un alelo hiperactivo de Ste20. Hay que destacar, sin embargo, que este alelo *ste20* sin dominio CRIB sólo aumenta la transcripción de *FUS1* en presencia de feromona, por lo que no puede considerarse como un auténtico alelo hiperactivo.

3. RUTA DE PSEUDOFILAMENTACIÓN-INVASIVIDAD.

El ayuno de nitrógeno y quizá otros factores provocan en la célula diploide un cambio en el tipo de crecimiento, que pasa a ser pseudohifal (Gimeno y col., 1992). Esto también ocurre en las células haploides, que experimentan un crecimiento invasivo del medio sólido en el que se encuentran (Roberts y Fink, 1994). En el crecimiento pseudohifal de los diploides el patrón de gemación pasa de ser bipolar a ser unipolar y las células se alargan. Aunque probablemente varias rutas estén implicadas en este cambio de crecimiento, quizá la principal de ellas sea la que desemboca en la MAPK Kss1 (**Figura 12**) y que comparte muchos componentes con la ruta de apareamiento (Liu y col., 1993; Madhani y col., 1997; Roberts y Fink, 1994). Se ha propuesto un posible sensor de membrana para esta ruta, Sho1 - que también está implicado en la ruta de respuesta a alta osmolaridad -, ya que el crecimiento pseudofilamentoso parece depender de la presencia de esta proteína (O'Rourke y Herskowitz, 1998). A continuación, la señal es transmitida de alguna manera hasta la GTPasa Ras2 (Gimeno y col., 1992; Möscher y col., 1996). Para que Ras2 transmita de nuevo la señal son necesarias las proteínas Bmh1 y Bmh2, de la familia 14-3-3, que interactúan con Ste20 (Gelperin y col., 1995;

Roberts y col., 1997). En esta ruta, Cdc42 actúa por debajo de Ras2 (Möscher y col., 1996) y, a diferencia de lo que parece ocurrir en la ruta de feromonas, es claramente necesaria para activar a la PAK Ste20 (Leberer y col., 1997; Peter y col., 1996). A continuación, Ste20 transmite la señal al módulo de MAPK, constituido por Ste11, Ste7 y la MAPK Kss1, sin que se tenga constancia de ninguna proteína aglutinadora para estas quinasas (Cook y col., 1997; Madhani y col., 1997). Esta ruta también promueve la transcripción génica, en concreto la de genes que contienen en su promotor secuencias FRE ("filamentation-responsive-element"). Estas secuencias constan de una copia de la secuencia PRE junto al sitio de unión del factor de transcripción Tec1. El propio gen *TEC1* está regulado transcripcionalmente por la ruta (Madhani y Fink, 1997). Así pues, Ste12 y Tec1 conjuntamente son necesarias para esta transcripción. Dig1 y Dig2 actúan como represoras de Ste12 también en esta ruta, por lo que mutantes *dig1 dig2* muestran una activación constitutiva de la transcripción (Cook y col., 1996; Tedford y col., 1997).

Curiosamente, la pérdida no sólo de Kss1, sino de todas las MAPK en la levadura no impide la formación de pseudohifas (Liu y col., 1993). Sin embargo, células con una mutación en *KSS1* que produce una proteína no fosforilable y, por tanto, no activable, no pueden formar hifas (Madhani y col., 1997). Un alelo que codifica una forma de Kss1 fosforilable por Ste7 pero catalíticamente inactivo, sin embargo, no impide la formación de hifas (Bardwell y col., 1998). Parece ocurrir que la forma no fosforilada de Kss1 se uniría a Ste12, impidiendo el desarrollo de este tipo de crecimiento. Por tanto,

Kss1 no fosforilada se comporta como un represor de la ruta y Kss1 fosforilada como un activador. Se ha sugerido también un papel para Kss1 en la ruta de respuesta a feromonas, ya que la pérdida de Fus3 no vuelve estéril a la célula (Elion y col., 1991; Gartner y col., 1992) y, sin embargo, el doble mutante *fus3 kss1* es estéril. La pérdida de Fus3 induce efectos típicos de activación de Kss1, como aumento de crecimiento invasivo (Madhani y co., 1997), lo que sugiere un efecto represor de Fus3 sobre la acción de Kss1.

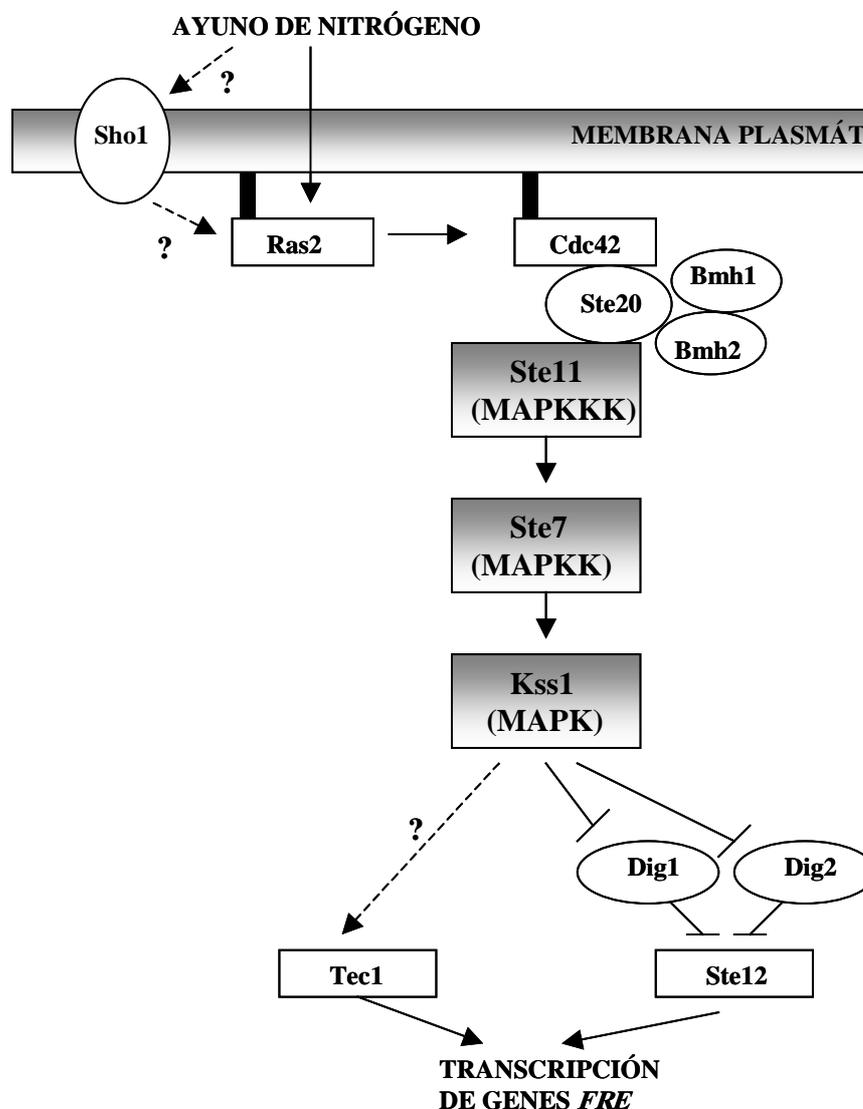


Figura 12. Ruta de pseudofilamentación / invasividad.

4. RUTA DE RESPUESTA A ALTA OSMOLARIDAD.

La osmolaridad interna de la célula se mantiene más elevada que la externa. El resultado es la entrada de agua en la célula y un estado de turgencia adecuado, mantenido gracias a la pared celular. El incremento de la osmolaridad externa significa un importante estrés para la célula, pero que puede resultar habitual para ella en su medio ambiente. En *S. cerevisiae*, la ruta de la MAPK Hog1 es la encargada de tomar las medidas adecuadas ante este incremento de la concentración externa de sustancias. El módulo en este caso consiste en tres MAPKKK –Ssk2, Ssk22 (Maeda y col., 1995) y Ste11 (Posas y Saito, 1997), que activan a una única MAPKK –Pbs2, que también actúa como proteína aglutinadora del complejo- (Bogulawski y Polazzi, 1987; Brewster y col., 1993; Maeda y col., 1994), que fosforila a la MAPK Hog1 (Brewster y col., 1993; Maeda y col., 1994).

La ruta consta de dos ramas (**Figura 13**) que confluyen en la MAPKK Pbs2 (Maeda y col., 1995). Por un lado, la proteína de membrana Sho1, que señala hacia Ste11 mediante un proceso que parece implicar a Ste20 y a Cdc42 (Raitt y col., 2000; Reiser y col., 2000). La otra rama consta de un complejo de señalización formado por tres componentes: la proteína de membrana Sln1 (con actividad histidín-quinasa), Ypd1 y Ssk1. Sln1 permanece activa en condiciones normales de osmolaridad externa, lo que conduce a la activación de Ypd1. La función de esta proteína es la de inactivar a Ssk1, que así es incapaz de activar a las MAPKKK Ssk2 y Ssk22, con lo que el resultado final es que la ruta permanece inactiva. En alta osmolaridad, Sln1 se bloquea, produciéndose el resultado contrario (Posas y col., 1996).

El receptor de membrana Sho1 se localiza fundamentalmente en sitios de crecimiento polarizado (yemas emergentes, extremo apical de los “shmoos”). Su función parece ser la de translocar a esas zonas a la MAPKK Pbs2, y con ella a todo el complejo necesario para su activación (Ste20, Ste50 y Ste11). Para llevar a la membrana a Pbs2 parece necesario tanto Sho1, con el que interacciona, como

una acción aún no clara de la GTPasa Cdc42, que quizá implica su interacción con la PAK Ste20 y la de ésta con Ste11, que después fosforilaría a Pbs2. En cualquier caso, es necesaria la acción de Cdc42 para la transmisión de la señal a través de esta rama de la ruta, y esta acción parece estar mediada fundamentalmente por Ste20 y, en menor medida, por Cla4, ya que la sobreexpresión de ésta evita la osmosensibilidad de mutantes *ste20* (Reiser y col., 2000; Raitt y col., 2000). La función de esta rama de la ruta de Hog1 parece ser la de controlar puntualmente el balance osmótico en los lugares de la pared celular que resultan más vulnerables por estar sufriendo cambios debidos al crecimiento polarizado.

Mutaciones en *PBS2* o en *HOG1* provocan, en presencia de alta osmolaridad la activación de las rutas de respuesta a feromonas y de pseudofilamentación (O'Rourke y Herskowitz, 1998; Davenport y col., 1999). Esto parece deberse al hecho de que las quinasas Ste20 y Ste11 estén compartidas por las tres rutas, y a que la presencia de Hog1 activado inactiva la rama de la ruta que se inicia con Sho1 o al menos evita de alguna forma el cruce entre rutas a nivel de Ste20 y Ste11.

El efecto final de la ruta es la transcripción de genes cuyos promotores contienen las secuencias *STRE* (de “stress-response-element”), lo que conduce finalmente al incremento del nivel intracelular de glicerol (Bolmberg y Adler, 1992; Nevoigt y Stahl, 1997). Ésto se consigue mediante la disminución de la permeabilidad de la membrana para el glicerol por la inhibición del transportador Fps1 (Luyten y col., 1995; Suhterland y col., 1997) y la expresión de enzimas necesarias para la síntesis de glicerol, como son la glicerol-3-fosfato-deshidrogenasa y glicerol-3-fosfatasa, codificadas por los genes *GPD1* y *HOR2*, respectivamente (Norbeck y Blomberg, 1996; Norbeck y Blomberg, 1997).

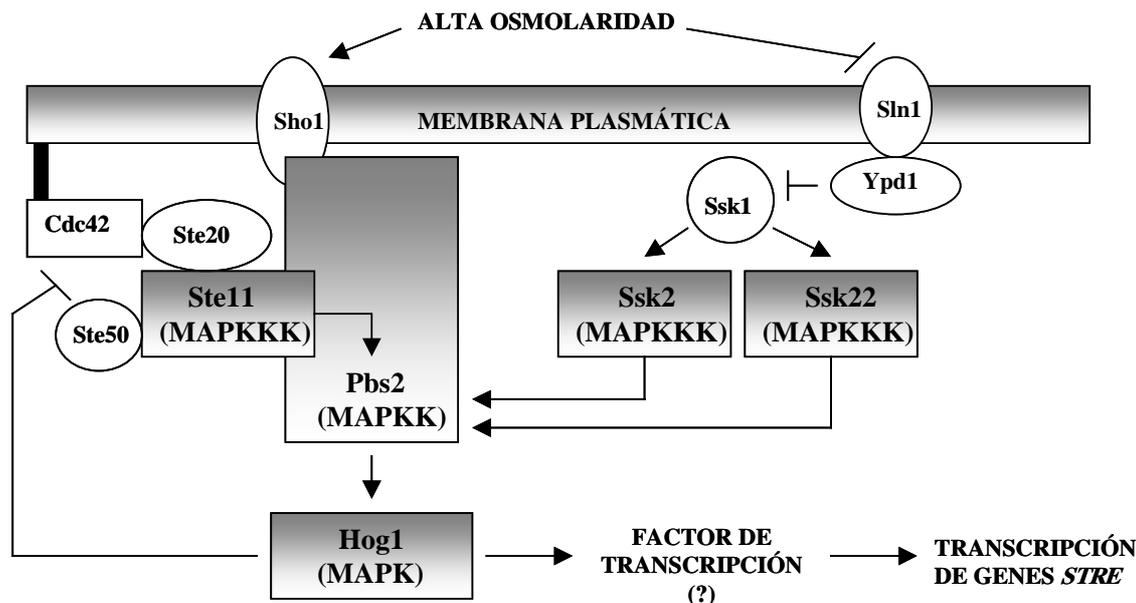


Figura 13. Ruta de respuesta a alta osmolaridad.

5. RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR.

Esta ruta controla la síntesis de pared regulada por ciclo celular y responde a diferentes estímulos externos, como daños en la pared celular, alta temperatura, baja osmolaridad externa y la presencia de feromonas. Miembros conocidos que intervienen en esta ruta (**Figura 14**) son la GTPasa Rho1 (Kamada y col., 1996; Nonaka y col., 1995), que activa a la quinasa Pkc1 (Levin y col., 1990), y ésta, a su vez activa al módulo conservado que en esta ruta está constituido por la MAPKKK Bck1 (Lee y Levin, 1992), dos MAPKK redundantes, Mkk1 y Mkk2 (Irie y col., 1993), y la MAPK Slt2 (Torres y col., 1991), también denominada Mpk1 (Lee y Levin, 1992). Ésta fosforila a los factores de transcripción Rlm1 (Dodou y Treisman, 1997; Watanabe y col., 1995; Watanabe y col., 1997) y SBF (Madden y col., 1997) –compuesto por Swi4 y Swi6 (Dirick y col., 1992; Koch y Nasmyth, 1994)–. Sin embargo, esta ruta parece presentar varias ramificaciones: Rho1, como se ha descrito anteriormente, no sólo interacciona y regula a Pkc1; a su vez, esta quinasa no sólo controla a la cascada de la MAPK Slt2 (Huang y Simington, 1994; Lee y Levin, 1992). Es interesante exponer las

interacciones identificadas mediante el sistema de “dos híbridos” entre algunos de los componentes de la ruta (Paravicini y Friedli, 1996; Soler y col., 1995): las MAPKK Mkk1 y Mkk2 interaccionan con Slt2; Bck1 interacciona con Mkk1 y Mkk2; sin embargo, Pkc1 interacciona con Mkk2, pero no con Bck1 o con otros componentes de la cascada. Esta especial disposición de Mkk2, interaccionando con Pkc1 y Slt2, ha llevado a sugerir un papel para ella como proteína aglutinadora de todos los componentes de la ruta (Heinisch y col., 1999). Sin embargo, es de interés destacar que el papel de Mkk1 es mucho más importante que el de Mkk2 en la transmisión de la señal (Martín y col., 2000).

La activación de la ruta, como ya se ha indicado, puede tener lugar en respuesta a diversos estímulos, indicando todos ellos la implicación de esta ruta en el control y mantenimiento de la integridad de la pared celular. El primero de los desencadenantes de la activación de la ruta tiene lugar durante el ciclo celular: cuando la célula pasa el punto START de la fase G1 y comienza la formación de una nueva yema. Se ha sugerido que la

quinasa Cdc28 podría regular la activación de la ruta, ya que incrementos y descensos en la actividad de Cdc28 van acompañados, respectivamente, de incrementos y descensos en la fosforilación y activación de Slf2 (Marini y col., 1996; Zarzov y col., 1996). Sin embargo, el mecanismo por el que Cdc28 regularía la actividad de la ruta no está claro. El momento de máxima fosforilación de Slf2 a lo largo del ciclo celular coincide con la polarización del crecimiento hacia el extremo de la yema (Lew y Reed, 1995).

Otro de los estímulos activadores de la ruta es el choque térmico: la ruta es necesaria para el crecimiento a elevadas temperaturas, como 37°C (Lee y Levin, 1992; Levin y col., 1990) y para inducir termotolerancia (Kamada y col., 1995). El incremento de la temperatura de crecimiento podría crear un estrés en la pared celular o en la membrana plasmática que activaría la ruta e incrementaría la expresión de genes implicados en la biosíntesis de la pared celular (Kamada y col., 1995; Igual y col., 1996). El aumento de la osmolaridad en el medio suprime la termosensibilidad y la lisis celular de los mutantes en esta ruta (Torres y col., 1991), al estabilizar la membrana plasmática en ausencia de una pared funcional estable.

Diversas sustancias que afectan a la pared celular, como el blanco de calcoflúor y la zimoliasa también estimulan la ruta (De Nobel y col., 2000), sugiriendo que ésta se dispara a manera de mecanismo compensatorio para reparar los daños sufridos por la pared. La cafeína y el vanadato también estimulan la ruta en ausencia de un estabilizador osmótico (Martin y col., 2000). Los mecanismos moleculares que activarían la ruta en respuesta a estos estímulos procedentes de membrana o pared aún no están del todo claros. Algunas proteínas de membrana que potencialmente podrían actuar como detectores de cambios en la membrana o la pared e intervenir en la señalización hacia esta ruta son las que constituyen la familia WSC: Wsc1/Hcs77/Slg1 (Verna y col., 1997; Gray y col., 1997; Jacoby y col., 1998), Wsc2, Wsc3 y Wsc4 (Verna y col., 1997); la pérdida de estas cuatro proteínas impide la activación de la ruta por

temperatura. Fuera de esta familia, la proteína de membrana Mid2 podría también actuar como sensor para esta ruta (Ketela y col., 1999), ya que su ausencia evita la activación de la ruta por vanadato y temperatura (Martín y col., 2000) y blanco de calcoflúor (De Nobel y col., 2000).

Por otra parte, Tor2 es una fosfatidil-inositol-quinasa (Schmidt y col., 1997) cuya pérdida es complementable por la presencia en el mismo fondo de las mutaciones *fks1* y *gas1* (Helliwell y col., 1998), mutaciones que hiperactivan la ruta de Slf2 (De Nobel y col., 2000). El fosfatidil-inositol de membrana obtenido por la acción de Tor2 podría ser la diana de anclaje en membrana del dominio PH de Rom1 y Rom2, GEFs –activadoras– de Rho1 (Ozaki y col., 1996; Schmidt y col., 1997). Apoyando la teoría que implica a estas GEFs en la ruta se ha descrito recientemente la interacción mediante el sistema de “dos híbridos” de Wsc1 y de Mid2 con Rom2 (Philip y Levin, 2001). Otros posibles reguladores de la ruta son las GAPs de Rho1 Bem2 (Kim y col., 1994; Wang y Bretscher, 1995) y Sac7 (Schmidt y col., 1997).

El tratamiento con feromonas activa a esta ruta, coincidiendo la máxima activación con el momento de formación de la proyección de apareamiento (Buehrer y Errede, 1997), mientras que en el momento de la fusión celular, la ruta debe encontrarse desactivada (Phillips y Herskowitz, 1997). Para la activación de Slf2 por feromonas se necesita Pkc1, Mkk1 y Mkk2 (Buehrer y Errede, 1997; Zarzov y col., 1996). Se ha descrito que Bck1 es necesario para esta activación (Zarzov y col., 1996), pero también se ha dicho que sólo lo es parcialmente (Buehrer y Errede, 1997), por lo que podría existir una segunda MAPKKK que cumpliera esta función. La parte de la ruta de respuesta a feromonas responsable de esta activación no está clara: se ha descrito que Ste20 es necesario, pero no Ste11 o Ste12 (Zarzov y col., 1996), sugiriendo un cruce de rutas a nivel de Ste20 y Bck1. Contrariamente, también se ha indicado que en un mutante *ste12* se elimina la activación de Slf2 debida a feromonas (Buehrer y Errede, 1997), lo que sugiere que es necesaria la transcripción de genes

inducida por esta ruta para activar la ruta de integridad celular. Curiosamente, también se ha descrito que la hiperactivación de la ruta de Slt2 conduce a un aumento en la transcripción de *FUS1*, y que para ello son necesarios Ste11, Ste7 y Ste12 (Cullen y col., 2000).

Un elemento clave en la transmisión de la señal hacia esta ruta es la GTPasa Rho1. Aunque *RHO1* es un gen esencial, ciertos alelos *rho1* termosensibles muestran el mismo fenotipo que el resto de los mutantes de la ruta y son complementables por estabilización osmótica del medio y sobreexpresión de proteínas que se encuentran por debajo en la ruta (Kamada y col., 1996). Rho1 unido a GTP interacciona con Pkc1 mejor que unido a GDP (Nonaka y col., 1995), pero

esta interacción no parece activar a Pkc1, sino que facilita su activación por fosfolípidos aniónicos, como la fosfatidilserina (Kamada y col., 1996). Quizá la función de Rho1 no es activar a Pkc1 sino localizarlo en sitios de crecimiento polarizado. Recientemente, se ha estudiado la localización subcelular de Pkc1, encontrándose en lugares de crecimiento polarizado y en el cuello entre las células madre-hija. Tras daño en la pared celular, Pkc1 sufre una rápida reorganización por la célula que quizá responde a las marcas que suponen los receptores WSC o Mid2 (Andrews y Stark, 2000).

Otra función importante de Rho1 es su papel en la síntesis de β -1,3-glucano, uno de los principales componentes de la pared celular. Este polisacárido es sintetizado en la superficie de la

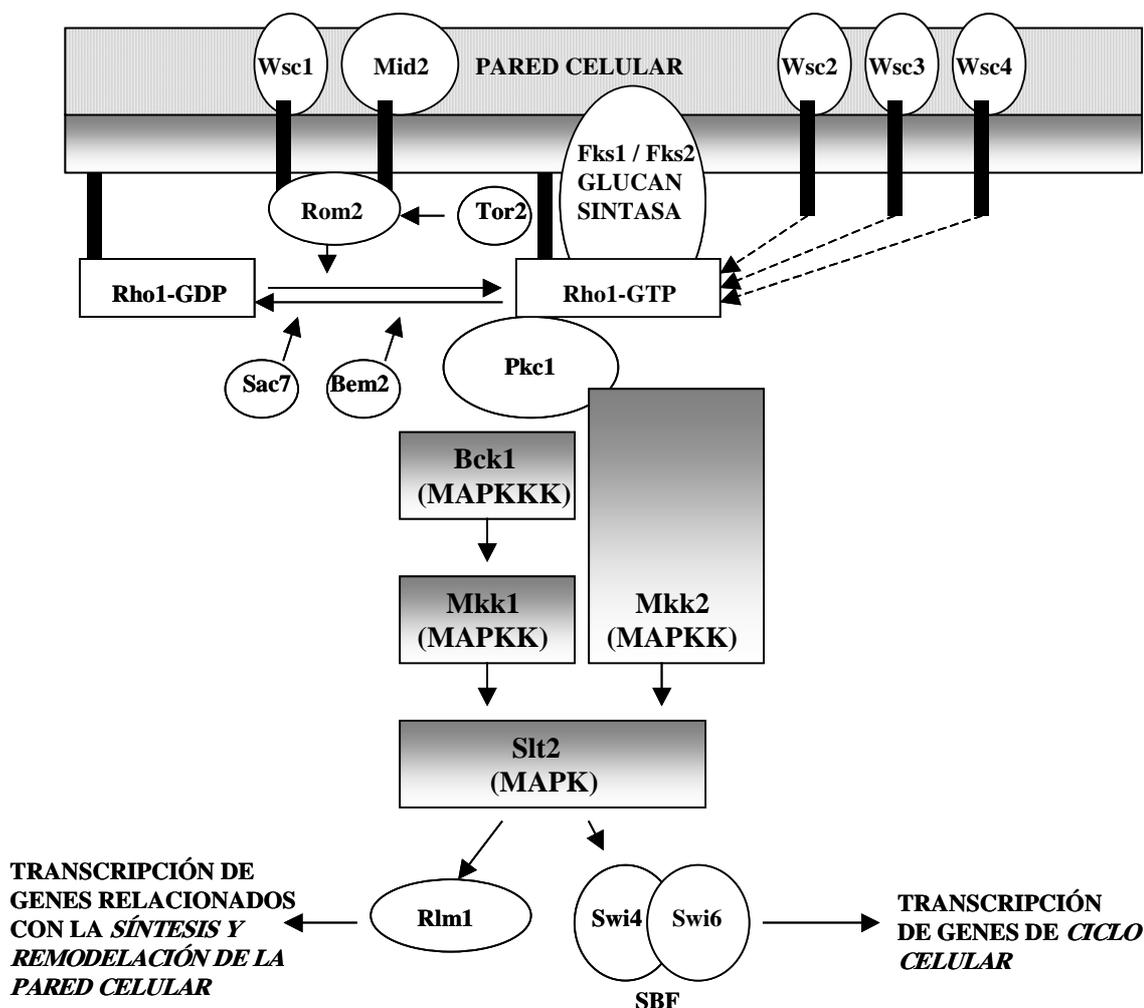


Figura 14. Ruta de integridad celular.

célula por el complejo glucán-sintasa, y Rho1 es necesario en su forma unida a GTP para la actividad de la subunidad catalítica Fks1, a la que se une, actuando la GTPasa como subunidad reguladora del complejo (Drgonová y col., 1996; Mazur y Baginsky, 1996; Qadota y col., 1996) (**Figura 14**). Además, la ruta de integridad celular promueve la expresión de los genes *FKS1* y *FKS2* (Igual y col., 1996; Kamada y col., 1996).

Como se ha descrito, Slt2 fosforila a los factores de transcripción SBF y Rlm1. SBF parece ser el factor de transcripción fosforilado por Slt2 en respuesta a ciclo celular y Rlm1 en respuesta a estímulos procedentes de la pared. SBF, como se ha comentado, es un complejo formado por las proteínas Swi4 y Swi6. Swi4 es el auténtico factor de transcripción y Swi6 es la subunidad reguladora. Este complejo activa la transcripción de los genes de las ciclinas G1 *CLN1*, *CLN2*, *PCL1* y *PCL2*, que actúan en la transición G1/S (Cross y col., 1994; Koch y col., 1996; Nasmyth y Dirick, 1991; Ogas y col., 1991; Partridge y col., 1997). Posibles dianas

para Rlm1 son los promotores de múltiples genes implicados en la construcción y mantenimiento de la pared celular. La hiperactivación de la ruta mediante la sobreexpresión de un alelo activado de *MKK1* ha permitido detectar alteraciones en la expresión de 25 genes, todas, a excepción de *FKS2*, dependientes de la presencia de Rlm1 (lo que sugiere la existencia de algún otro activador transcripcional para la ruta). Casi todos los genes detectados codifican proteínas relacionadas de alguna forma con la pared celular: proteínas relacionadas con la biogénesis de pared (como el componente de la β -1,3-glucán-sintasa Fks1, la quitín-sintasa Chs3 o el propio Slt2), glicosil-fosfatidil-inositol-proteínas (proteínas GPI) las manoproteínas de pared Cwp1, Pst1 y Crh1 (similar ésta última a endo-1,3-1,4- β -glucanasas), proteínas de la familia PIR (implicadas en la tolerancia al choque térmico) u otras proteínas relacionadas con el ensamblaje del glucano, como la glucanosil-transferasa Bgl2, o la implicada en formación de la pared de la espora Sps100 (regulada, en este caso, negativamente por la ruta) (Jung y Levin, 1999).

6. RUTA DE INTEGRIDAD CELULAR EN CRECIMIENTO VEGETIVO O SVG (“STE-VEGETATIVE-GROWTH”).

Recientemente se ha descrito una nueva posible ruta de MAPK que estaría implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular durante el crecimiento vegetativo, y que actuaría en paralelo con la de Slt2 (Lee y Elion, 1999). La ruta (**Figura 15**) estaría constituida por las quinasas Ste20, Ste11, Ste7, la MAPK Kss1 y el factor de transcripción Ste12, todas ellas proteínas comunes también a las rutas de respuesta a feromonas y de crecimiento invasivo. Fus3 sería el factor encargado de inhibir esta ruta en el paso a crecimiento polarizado, por lo que estos autores han propuesto que esta ruta actúa durante el crecimiento no polarizado, frente a la ruta de Slt2, que lo hace en el polarizado. Las mutaciones en cada uno de los miembros de esta ruta son letales en combinación con la pérdida de la manosil-transferasa Och1. La

activación de esta ruta provoca la expresión del gen *FKS2*, que es más elevada en un mutante *fus3*. También son letales las mutaciones *slt2* o *bck1* en combinación con *och1*, y un mutante *ste11 bck1* crece más despacio que un *bck1*, indicando una acción paralela y aditiva de ambas rutas (Lee y Elion, 1999).

Esta ruta se ve activada en diversos mutantes afectados en la pared celular, en concreto en glicosilación y manosilación de proteínas; dicha activación de la ruta en estos mutantes desaparece en mutantes *sho1*, lo que parece indicar que la proteína transmembranal implicada previamente en la ruta de alta osmolaridad y quizá en crecimiento pseudofilamentoso, Sho1, es también un posible sensor para esta ruta (Cullen y col., 2000).

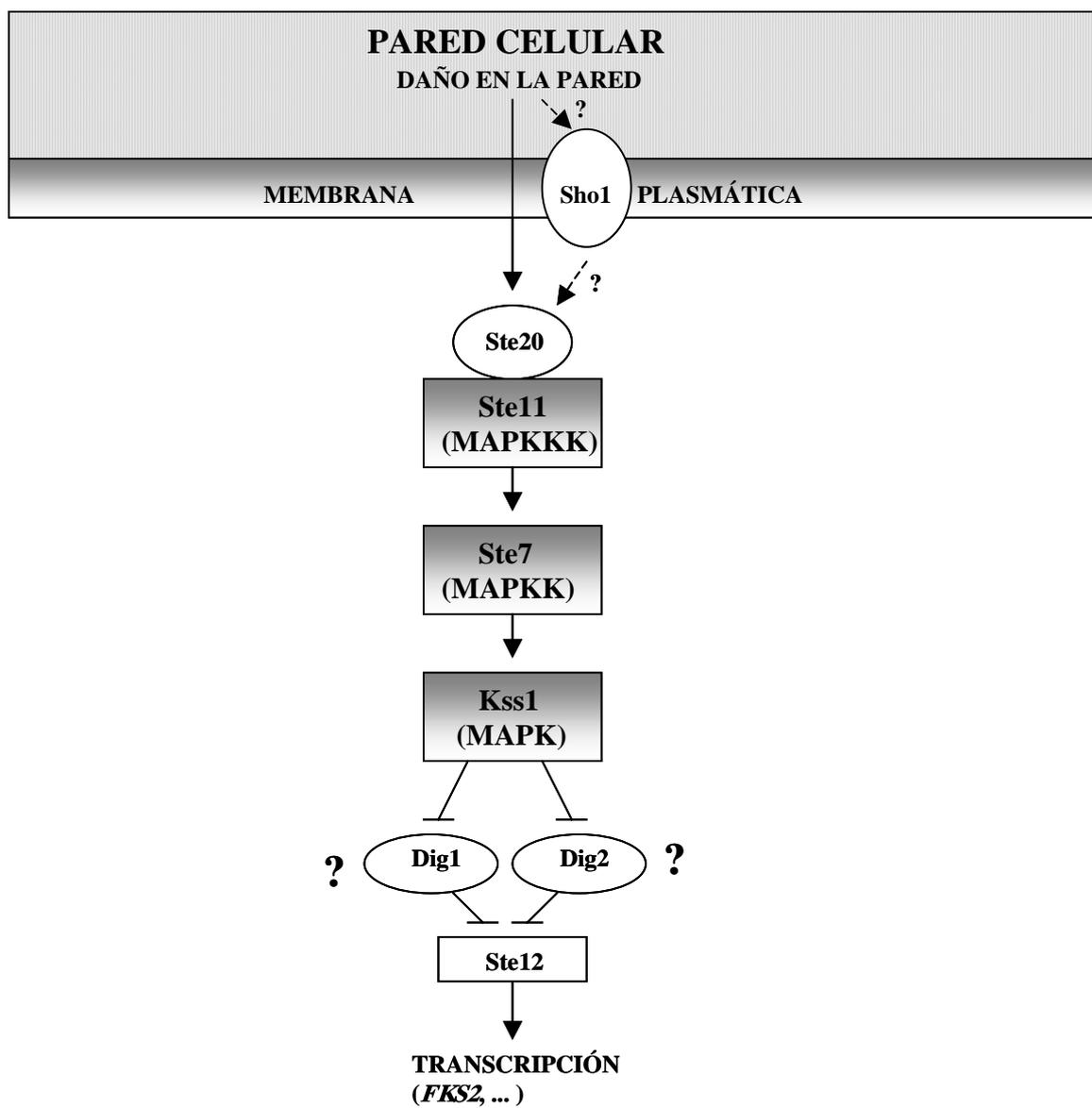


Figura 15. Hipotética ruta SVG (“STE-Vegetative-Growth”) de integridad celular en crecimiento vegetativo.

ANTECEDENTES Y
OBJETIVOS

I. ANTECEDENTES: LA PROTEÍNA PAK Skm1

Durante el rastreo de una genoteca genómica construida en λ gt11 con anticuerpos policlonales anti-endo- β -glucanasa se clonó en nuestro laboratorio un fragmento de DNA de 3.3 kb que incluía el extremo 3' de un ORF. Este extremo codificaba la parte C-terminal de una posible proteína quinasa. Para clonar el gen completo, se usó el fragmento 3' como sonda para rastrear una genoteca genómica de *S. cerevisiae* construida en el plásmido YEp13. El fragmento clonado finalmente consistía en un ORF de 1965 pares de bases, que codificaba para una proteína de 655 aminoácidos. Esta proteína contenía un dominio serín-treonín-quinasa en su extremo C-terminal, y un dominio PH (de "pleckstryn homology") y un dominio CRIB en el extremo N-terminal. Por todas estas características y por su alta homología con los miembros de la familia PAK de *S. cerevisiae*, Ste20 y Cla4, se decidió incluir a la nueva proteína en esta familia. Posteriormente se la nombró Skm1 -por "Ste20/PAK homologous Kinase related to Morphogenesis"- debido a los efectos provocados por su sobreexpresión y que se detallan más adelante en esta tesis.

Tras realizar la delección del gen *SKM1* en distintos fondos genéticos, se estudió el comportamiento de los mutantes en múltiples condiciones de cultivo: se analizó el crecimiento en medio rico y medio mínimo a distintas temperaturas, la viabilidad tras ayuno de nitrógeno, la resistencia a choque térmico, el porcentaje de células gemadas al entrar en fase estacionaria, el

crecimiento en condiciones de alta osmolaridad, la sensibilidad a SDS o cafeína, la frecuencia de apareamiento, la sensibilidad a factor α y la esporulación, sin que se descubriera ningún fenotipo discernible del de las cepas isogénicas silvestres. La morfología de las células y el patrón de distribución de quitina o la selección del sitio de gemación tampoco parecían alterados en los mutantes. Todo indicaba que el gen *SKM1*, en las condiciones ensayadas, no era necesario para ninguno de estos procesos. No obstante, la existencia de otros dos miembros de la familia de proteínas PAK en *S. cerevisiae* (Ste20 y Cla4), que presentan alta homología con Skm1 apuntaba a un posible efecto redundante entre sus funciones que podría explicar la ausencia de fenotipo detectable en mutantes *skm1*. Sin embargo, los dobles mutantes *skm1 cla4* o *skm1 ste20* tampoco presentaban un fenotipo diferente o adicional al de mutantes *cla4* o *ste20*, respectivamente, indicando que la PAK Skm1 no era redundante con los restantes miembros de la familia. Corroborando esto, la expresión en multicopia de *SKM1* no fue capaz de compensar el defecto en citoquinesis de mutantes *cla4*, ni el defecto en apareamiento de mutantes *ste20*. Por último, el fenotipo letal del triple mutante *cln1 cln2 cla4* (Cvrcková y col., 1995) y la alta homología entre Cla4 y Skm1 condujo a la obtención del mutante *cln1 cln2 skm1*, que, sin embargo, resultó ser viable. Todos estos experimentos vienen detallados en Martín y col. (1997).

II. OBJETIVOS DEL PRESENTE TRABAJO.

A pesar de la dificultad en encontrar un fenotipo para estos mutantes que diera información sobre la función de Skm1 en la célula, el elevado interés de esta proteína - perteneciente a la familia PAK, y por ello quizá relacionada con Cdc42 y con el control del citoesqueleto de actina o la transmisión de señales a través de rutas de MAP

quinasas - condujo a perseverar en su estudio. Por tanto, como objetivo fundamental de este trabajo se planteó el estudio de la función de esta proteína PAK mediante la caracterización fenotípica de mutantes *skm1*, estudios de sobreexpresión de la proteína, búsqueda de proteínas que interaccionasen físicamente con ella y diversas estrategias genéticas

que nos permitieran relacionar a *SKMI* con otros genes. Los datos obtenidos en el transcurso del trabajo permitieron establecer una posible relación con Cdc42, lo que, unido al elevado interés que presenta esta GTPasa, condujo a establecer como segundo objetivo del trabajo el estudio de la posible relación de Cdc42 y las proteínas PAK con rutas de

MAP quinasas implicadas en el crecimiento polarizado, especialmente la mediada por la GTPasa Rho1 y que desemboca en la MAP quinasa Slt2. Con esta finalidad se realizaron estudios genéticos – obtención de diversos mutantes - y bioquímicos -análisis de la activación de estas MAP quinasas -.

***MATERIALES Y
MÉTODOS***

1. MICROORGANISMOS, PLÁSMIDOS Y OLIGONUCLEÓTIDOS UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO.

1.1. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* originales utilizadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo	Procedencia o Referencia
DBY746	<i>MATα trp1-289 leu2-3112 ura3-52 his3-Δ1</i>	Martín y col., 1997
HM27	Isogénica con DBY746, <i>skm1::HIS3</i>	Martín y col., 1997
HM29	Isogénica con DBY746, <i>skm1Δ::URA3</i>	Martín y col., 1997
HM32	Isogénica con DBY746, <i>cla4::LEU2</i>	Martín y col., 1997
HM33	Isogénica con DBY746, <i>skm1::HIS3 cla4::LEU2</i>	Martín y col., 1997
SEY6211	<i>MATα trp1Δ901 leu2 3112 ade2-101 ura3-52 his3-Δ200 suc2Δ9</i>	Paravicini y col., 1992
HM28	Isogénica con SEY6211, <i>skm1::HIS3</i>	Martín y col., 1997
HM37	Isogénica con SEY6211, <i>ste20Δ::URA3</i>	Martín y col., 1997
HM38	Isogénica con SEY6211, <i>skm1::HIS3 ste20Δ::URA3</i>	Martín y col., 1997
HM51	Isogénica con SEY6211, <i>kss1Δ::URA3</i>	H. Martín
HM52	Isogénica con SEY6211, <i>slt2Δ::LEU2</i>	H. Martín
HM53	Isogénica con SEY6211, <i>kss1Δ::URA3 slt2Δ::LEU2</i>	H. Martín
1638	<i>MATα K⁺ his4 kar1-1</i>	R. Esteban
5 x 47	<i>MATα/α K</i>	R. Esteban
1783	<i>MATα trp1-1 leu2-3112 ura3-52 his4 canR</i>	Lee y col., 1993
1784	Isogénica con 1783, <i>MATα</i>	Lee y col., 1993
1783x1784	Diploide 1783 x 1784	H. Martín
DL454	Isogénica con 1783, <i>slt2Δ::TRP1</i>	Lee y col., 1993
EGY48	<i>MATα ura3 his3 trp1 6lexAops-LEU2</i>	R. Brent
HF7c	<i>MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 lys2-801 trp1-901 leu2-3,112 gal4-542 gal80-538 LYS2::GAL1-HIS3 URA3::GAL4-lacZ</i>	Feilotter y col., 1994
Y526	<i>MATα GAL4-542 GAL80-538 ura3-52 URA3::GAL1-lacZ leu2-3 his3-200 trp1-901 lys-801 canR</i>	Soler y col., 1995
CG1945	<i>MATα ura3-52 his3 trp1-901 leu2-3,112 ade2-101 lys2-801 met- gal4 gal80 URA3::GAL4-lacZ LYS2::GAL1-HIS3</i>	S.J. Elledge
Y187	<i>MATα ura3-52 his3 trp1-901 leu2-3,112 ade2-101 met- gal4 gal80 URA3::GAL1-lacZ</i>	S.J. Elledge
FY1617	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1-901</i>	EUROSCARF
FSRN003-11C(AL)	Isogénica con FY1617, <i>skm1Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
FSII017-01B(A)	Isogénica FY1617, <i>hsl7Δ::kanMX4</i>	EUROSCARF
FY67928C	<i>MATα ura3-52 his3Δ200 leu2-3,112 trp1-901</i>	H. Martín
FY67928C-DK	Isogénica FY67928C, <i>slt2Δ::LEU2</i>	H. Martín
FY39	<i>MATα ura3 his3 trp1-1 leu2-3,112 ade2-1 HIS4 ste20::URA3</i>	F. Cvrckova

FY41	Isogénica con FY39, <i>cla4::LEU2</i> YCp- <i>cla4-75</i>	F. Cvrckova
YPH499	<i>MATa ade2-101 trp1-63 leu2-1 ura3-52 his3-Δ200 lys2-801</i>	Martín y col., 1997
HM31	Isogénica con YPH499, <i>skm1Δ::URA3</i>	Martín y col., 1997
HM34	Isogénica con YPH499, <i>cla4::LEU2</i>	Martín y col., 1997
HM36	Isogénica con YPH499, <i>ste20Δ::URA3</i>	Martín y col., 1997
JTY2556	Isogénica con YPH499, <i>ste7::ADE2</i>	J. G. Cook
JTY2519	Isogénica con YPH499, <i>fus3::LEU2</i>	Bardwell y col., 1998
JTY2520	Isogénica con YPH499, <i>kss1::HIS3</i>	Ma y col., 1995
JTY2516	Isogénica con YPH499, <i>fus3::LEU2 kss1::HIS3</i>	Ma y col., 1995
HM42	<i>MATa ste11-1 ura3 his4 trp1</i>	Martín y col., 1997
BJ5464	<i>MATα ura3-52 leu2-Δ1 trp1 his3-Δ200 pep4::HIS2 pbr1Δ1.6R can1</i>	Yeast Genetic Stock Center
BJ5464-DK	Isogénica BJ5464, <i>slt2Δ::URA3</i>	Martín y col., 2000
OHNY	<i>MATa ura3 his3 trp1 leu2 ade2</i>	Nonaka y col., 1995
HNY21	Isogénica OHNY, <i>rho1-104</i>	Yamochi y col., 1994
HM54	<i>MATα ura3 his3 trp1 leu2 ade2 rho1-104</i>	H. Martín
HM55	<i>MATa ura3 his3 trp1 leu2 ade2 rho1-104 rga1::URA3 bem3::TRP1</i>	H. Martín
TB50α	<i>MATα ura3 his3 HIS4 trp1 leu2</i>	M. N. Hall
AS171-3a	Isogénica con TB50α, <i>sac7::kanMX</i>	M. N. Hall
AS169-2a	Isogénica con TB50α, <i>bag7::HIS3</i>	M. N. Hall
Y806	<i>MATa ura3 leu2 ade2 ade3 lys2 ρ0</i>	A. Bender
Y807	Isogénica con Y806, <i>bem2::URA3</i>	A. Bender
DJTD2-16D	<i>MATα cdc42-1 trp1 leu2 ura3 his4 gal2</i>	Johnson y Pringle, 1990
Y604	<i>MATa ura3-52 ade2-101 lys2-801 his3-Δ200 trp1-Δ1</i>	M. Snyder
PMYD9-1B	Isogénica con Y604, <i>ura3::cdc42^{W97R}::URA3</i>	Miller y Johnson, 1997
SY2002	<i>MATa his3::FUS1-HIS3 mfa2-Δ1::FUS1-lacZ ura3 leu2 trp1 his3 ade1</i>	G. Sprague
YGS2	Isogénica SY2002, <i>rga1::URA3</i>	G. Sprague
YGS7	Isogénica SY2002, <i>rga2::TRP1</i>	G. Sprague
YGS50	Isogénica SY2002, <i>bem3::TRP1</i>	G. Sprague
YGS72	Isogénica SY2002, <i>rga1::URA3 rga2::TRP1</i>	G. Sprague
YGS51	Isogénica SY2002, <i>rga1::URA3 bem3::TRP1</i>	G. Sprague
YGS56	Isogénica SY2002, <i>rga2::TRP1 bem3::TRP1</i>	G. Sprague
YGS57	Isogénica SY2002, <i>rga1::URA3 rga2::TRP1 bem3::TRP1</i>	G. Sprague

1.2. Cepas de *Saccharomyces cerevisiae* generadas en este trabajo.

Cepa	Genotipo
YTX10	Isogénica SY2002, <i>ste7::LEU2</i>
YTX21	Isogénica YGS72, <i>ste7::LEU2</i>
YTX22	Isogénica YGS51, <i>ste7::LEU2</i>
YTX23	Isogénica YGS56, <i>ste7::LEU2</i>

YTX24	Isogénica YGS57, <i>ste7::LEU2</i>
YTX25	Isogénica SY2002, <i>ste20Δ::URA3</i>
YTX26	Isogénica YGS56, <i>ste20Δ::URA3</i>
YTX27	Isogénica SY2002, <i>ksl1Δ::URA3</i>
YTX28	Isogénica YGS56, <i>ksl1Δ::URA3</i>
YTX29	Isogénica SY2002, <i>skm1Δ::URA3</i>
YTX30	Isogénica YGS56, <i>skm1Δ::URA3</i>
YTX31	Isogénica SY2002, <i>fus3Δ::LEU2</i>
YTX32	Isogénica YGS56, <i>fus3Δ::LEU2</i>
YTX33	Isogénica SY2002, <i>ksl1Δ::URA3 fus3Δ::LEU2</i>
YTX34	Isogénica YGS56, <i>ksl1Δ::URA3 fus3Δ::LEU2</i>
YTX40	Isogénica SEY6211, <i>ste7::URA3</i>
YTX41	Isogénica SY2002, <i>SKM1-myc::LEU2</i>
YTX42	Isogénica YGS57, <i>SKM1-myc::LEU2</i>
YTX50	Isogénica SEY6211, <i>ste7::LEU2</i>

Las cepas de *S. cerevisiae* se almacenaron en una solución de glicerol al 50% (v/v) a -70°C . Su cultivo se realizó en medio sólido (en placas Petri) o

líquido a las temperaturas elegidas para cada ensayo (entre 24 y 39°C).

1.3. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en este trabajo.

DH5 α	<i>SupE44 ΔlacU169(φ80lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>
GM2163	F- <i>ara14 dam13::Tn9 (CmR) dcm6 galK2 galT22 glnV-44 hisG4 hsdR2 lacY1 leuB6 mcr201 mcrB1 mcrA mrr+ mtl1 rpsl136 thi1 thr+ tonA31 tsx78 xy15</i>

Las cepas de *E. coli* portadoras de los diferentes plásmidos se almacenaron en una solución de glicerol al 20% (v/v) a -20°C . Su cultivo se

realizó en medio líquido con agitación vigorosa o bien sólido (en placas Petri) a 37°C .

1.4. Plásmidos originales utilizados en este trabajo.

Plásmido	Características o modificaciones	Procedencia o Referencia
pKIN2	YEpl3 conteniendo el gen <i>SKM1</i> completo	Martín y col., 1997
p292K	pEMBL18 conteniendo el fragmento <i>PstI-KpnI</i> de <i>SKM1</i> , que expresa los aminoácidos 177-655	A. Mendoza
YEpl352	<i>ori 2μ bla lacZ (MCS) URA3</i>	Hill y col., 1986
YEpl352SKM1	Subclonación en <i>HindIII-KpnI</i> de YEpl352 del gen <i>SKM1</i> completo, a partir de pKIN2	Martín y col., 1997

pEG(KG)	<i>ori 2μ bla URA3 GAL1p-GST</i>	Mitchell y col., 1993
pEG(KGH)	Subclonación en <i>SstI</i> del gen <i>URA3</i> de pEG(KG) del gen <i>HIS3</i>	Martín y col., 1997
pSCLA	Subclonación en <i>HindIII</i> de pEG(KG) del dominio quinasa de <i>CLA4</i> (aminoácidos 420-842), amplificado por PCR	Martín y col., 1997
pSTE20	Subclonación en <i>BamHI</i> de pEG(KG) del dominio quinasa de <i>STE20</i> (aminoácidos 492-939), amplificado por PCR	Martín y col., 1997
Bluescript SK	<i>ori bla lacZ(MCS) f1 PT3 PT7</i>	Stratagene
pEG202	<i>ori 2μ bla HIS3 ADHp-LexA</i>	R. Brent
pJG4-5	<i>ori 2μ bla TRP1 ADHp-GAL1b</i>	R. Brent
pSH1834	<i>ori 2μ bla URA3 6LexAop-lacZ</i>	R. Brent
pGBT9	<i>ori 2μ bla TRP1 ADHp-GAL4b</i>	S. Fields
pGAD424	<i>ori 2μ bla LEU2 ADHp-GAL4a</i>	S. Fields
pGBMCK1	Subclonación en <i>EcoRI-SalI</i> de pGBT9 del ORF de <i>MKK1</i> amplificado por PCR	Soler y col., 1995
pGASLT2	Subclonación en <i>EcoRI-SalI</i> de pGAD424 del ORF de <i>SLT2</i> amplificado por PCR	Soler y col., 1995
pAS1-CYH2-PKC1-Nt	Subclonación en pAS1-CYH2 del fragmento <i>NdeI-SmaI</i> aminoterminal de <i>PKC1</i>	A. Mendoza
pASΔΔ	<i>ori 2μ bla TRP1 ADHp-GAL4b</i>	J. B. Millar
pACTII	<i>ori 2μ bla LEU2 ADHp-GAL4a</i>	J. B. Millar
pRS305	<i>ori bla LEU2 lacZ</i> (para realizar fusiones a <i>myc</i>)	Sikorski y Hieter, 1989
pPHO4	Subclonación de <i>PHO4</i> en pYES2	H. Martín
pGAL-ESS1	Subclonación en <i>EcoRI</i> de pBC103 del ORF de <i>ESS1</i>	S. Hanes
pGAL-PIN1	Subclonación en <i>XhoI-AvrII</i> de pBC103 del ORF de <i>PIN1</i>	S. Hanes
YE351CDC24	Subclonación en <i>HindIII</i> del gen <i>CDC24</i>	D. Johnson
pRS315CDC42G12V	Subclonación en <i>BamHI-HindIII</i> de pRS315 del alelo <i>cdc42^{G12V}</i>	A. Bender
pRS315CDC42	Subclonación en <i>BamHI-HindIII</i> del gen <i>CDC42</i>	D. Johnson
pNC149	pUC118-1 que contiene la cassette de interrupción <i>ste7::URA3</i>	Company y col., 1988
pNC113	pUC118-1 que contiene la cassette de interrupción <i>ste7::LEU2</i>	Company y Errede 1988
pT18U	p34E que contiene la cassette de delección <i>skm1Δ::URA3</i>	Martín y col., 1997
p34S2U	p34H que contiene la cassette de delección <i>ste20Δ::URA3</i>	Martín y col., 1997
pYEE98	YIp5 que contiene la cassette de delección <i>fus3Δ::LEU2</i>	Elion y col., 1990
pBC65	pBR322 que contiene la cassette de delección <i>kss1Δ::URA3</i>	J. Thorner
pHPS100	<i>ori CEN4/ARS1 TRP1 ADHp-LexA-RLM1 5LexAop-lacZ</i>	Kirchrath y col., 2000
pRS316BCK1-20	Subclonación del alelo <i>bck1-20</i> en pRS316	A. Mendoza

YEp352KSS1	Subclonación en YEp352 del gen <i>KSS1</i>	J. Thorner
------------	--------------------------------------------	------------

1.5. Plásmidos generados en el transcurso de este trabajo.

Plásmido	Plásmido de origen	Modificación
pGSTO32	pEG(KG)	Subclonación en <i>SalI</i> (relleno con Klenow) de pEG(KG) del fragmento <i>MamI-StuI</i> (relleno con Klenow) de <i>SKM1</i> (que expresa los aminoácidos 10-655), a partir de pKIN2
pGSTNN42	pEG(KG)	Subclonación en <i>SalI</i> (relleno con Klenow) de pEG(KG) del fragmento <i>MamI-AvaI</i> de <i>SKM1</i> (que expresa los aminoácidos 10-387), a partir de pKIN2
pGSTN49	pEG(KG)	Subclonación en <i>SalI</i> (relleno con Klenow) de pEG(KG) del fragmento <i>MamI-StuI</i> de <i>SKM1</i> (que expresa los aminoácidos 10-248), a partir de pKIN2
pGSTO32R	pEG(KG)	Eliminación del fragmento <i>HindIII</i> de pGSTO32, lo que permite expresar los aminoácidos 10-196 de <i>Skm1</i> .
pGSTK7	pEG(KG)	Subclonación en <i>SalI</i> (relleno con Klenow) de pEG(KG) del fragmento <i>StuI-SnaBI</i> de <i>SKM1</i> (que expresa los aminoácidos 249-655), a partir de p292K
pGSTK7S	pEG(KG)	Subclonación en <i>SalI</i> de pEG(KG) del fragmento <i>SalI</i> de pGSTK7 (que expresa los aminoácidos 249-562 de <i>Skm1</i>).
pGSTK7H18	pEG(KG)	Subclonación en <i>StuI</i> del gen <i>URA3</i> de pGSTK7 del gen <i>HIS3</i>
pS19	pYES2	Subclonación en <i>KpnI-XhoI</i> (relleno con Klenow) de pYES2 del fragmento <i>XbaI-XhoI</i> de pGSTK7.
pKGSKM1	pEG(KG)	Subclonación en <i>XbaI</i> del ORF de <i>SKM1</i> amplificado por PCR con los oligos U-SKM1 y L-SKM1
pKGCDC42	pEG(KG)	Subclonación en <i>XbaI</i> del ORF de <i>CDC42</i> amplificado por PCR con los oligos U-CDC42 y L-CDC42
pKGC42G12V	pEG(KG)	Subclonación en <i>XbaI</i> del ORF de <i>cdc42</i> ^{G12V} amplificado por PCR con los oligos U-CDC42 y L-CDC42
pKGHSKM1	pEG(KGH)	Subclonación en <i>XbaI</i> del ORF de <i>SKM1</i> amplificado por PCR con los oligos U-SKM1 y L-SKM1
pKGHC42G12V	pEG(KGH)	Subclonación en <i>XbaI</i> del ORF de <i>cdc42</i> ^{G12V} amplificado por PCR con los oligos U-CDC42 y L-CDC42
pKGSKM1-KD	pEG(KG)	Subclonación en <i>XbaI</i> del alelo <i>skm1</i> ^{K406A} Obtenido por PCR con los oligos U-SK-KD, L-SK-KD, U-KG-SK y L-KG-SK
pRS305SKM1	pRS305	Subclonación en <i>SmaI</i> del ORF de <i>SKM1</i> amplificado por PCR con los oligos U-SK-MYC y L-SK-MYC
YEp352-C42G12V	YEp352	Subclonación en <i>BamHI-HindIII</i> del gen <i>CDC42</i> completo, a partir de pRS315CDC42
YEp352CDC24	YEp352	Subclonación en <i>HindIII</i> del gen <i>CDC24</i> completo, a partir de YEp351CDC24
Plásmidos generados para los estudios de “dos híbridos”		Ver Figuras 8 y 9 de “Resultados”

1.6. Genotecas utilizadas en este trabajo.

Genoteca	Vector	Procedencia o Referencia
pYES2.X	pYES2	E. Herrero
pJG4-5.X	pJG4-5	R. Brent
pGAD.1R	pGAD.1	Clontech
pGAD.2R	pGAD.2	Clontech
pGAD.3R	pGAD.3	Clontech
Y2HL-C1	pGAD-C1	James y col., 1996
Y2HL-C2	pGAD-C2	James y col., 1996
Y2HL-C3	pGAD-C3	James y col., 1996

1.7. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Detalles
U-CDC42	CCTCTAGAAGAATTCATGCAAACGCTAAAGTGTG	<i>XbaI-EcoRI</i>
L-CDC42	CCTCTAGAATTCGATTAAGAAAAGATGGGC	<i>XbaI-EcoRI</i>
L-CDC42Δ	CCTCTAGAATTCCTATTTTTACTTTTCTTGATAAC	<i>XbaI-EcoRI</i>
U-RHO1	CCTCTAGAATTCATGTCACAACAAGTTGG	<i>XbaI-EcoRI</i>
L-RHO1Δ	CCTCTAGAATTCCTACTTCTTCTTCTTTTCAG	<i>XbaI-EcoRI</i>
U-BUD1	CCTCTAGAATTCATGAGAGACTATAAATTAG	<i>XbaI-EcoRI</i>
U-BUD1Δ	CCTCTAGAATTCCTAAGTGGGAAGCGTTTTTCTTC	<i>XbaI-EcoRI</i>
U-SKM1	CCTCTAGAAACTGCAGAAATGAAGGGCGTAAAAAAGG	<i>XbaI-PstI</i>
L-SKM1	CCTCTAGAACTGCAGTTCAATGCCACTTTAAGG	<i>XbaI-PstI</i>
U-CRIB	CCGAATTCTGGCTTGATGCCATTTTTGCC	<i>EcoRI</i>
L-CRIB	CCGAATTCCTATCCATTGTAATCTTC	<i>EcoRI</i>
U-SK-MYC	GGCCCGGGATGAAGGGCGTAAAAAAGG	<i>SmaI</i>
L-SK-MYC	GGCCCGGGATGCCACTTTAAGGATAC	<i>SmaI</i>
U-KG-SK	CCTCTAGACATGAAGGGCGTAAAAAAGG	<i>XbaI</i>
L-KG-SK	CCTCTAGATCAATGCCACTTTAAGG	<i>XbaI</i>
U-SK-KD	GAGTGGCCATTGCGCAGATACGTTTATC	Sustitución K406A
L-SK-KD	GATAAACGTATCTGCGCAATGGCCACTC	Sustitución K406A
SKM1-MUT	CCCGAGATTCTTGAAATCAC	Comprobación <i>skmI</i> ^{K406A}

2. MEDIOS DE CULTIVO

Para lograr la solidificación del medio se añadía bacto-agar a una concentración final de 20 g/l. La esterilización de los medios se lograba utilizando un

autoclave bajo las siguientes condiciones: 121°C de temperatura y 2.1 atmósferas de presión durante 20 minutos.

2.1. Medios de cultivo para *E. coli*.

Medio	Composición
LB (Luria-Bertani)	Bacto-triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l, NaCl 5 g/l
TB (<i>Terrific Broth</i>)	Bacto-triptona 12 g/l, extracto de levadura 24 g/l, glicerina 4 ml/l, y tras su esterilización KH_2PO_4 2.3 g/l y K_2HPO_4 12.5 g/l

2.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*.

Medio	Composición
YEPD	Glucosa 20 g/l, peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l
YPEG	Galactosa 20 g/l, peptona 20 g/l, extracto de levadura 10 g/l
SD	Base nitrogenada para levaduras 1.7 g/l, sulfato amónico 5 g/l, glucosa 20 g/l y 70 ml/l de mezcla de aminoácidos
SG	Como SD pero con galactosa en lugar de glucosa
SR	Como SD pero con rafinosa a 15 g/l,

2.2.1. Solución mezcla de aminoácidos.

Aminoácido o base	mg/l						
L-fenilalanina	736	L-treonina	1472	L-tirosina	442	L-triptófano	294
L-glutámico	1472	L-serina	1472	L-leucina	442	L-histidina	294
L-aspártico	1472	L-isoleucina	442	Adenina	294	L-arginina	294
L-valina	1472	L-lisina	442	Uracilo	294	L-metionina	294

A los medios de cultivo de *E. coli* se les añadía ampicilina a 100 mg/l para seleccionar células resistentes a dicho antibiótico. Cuando fue necesario, los medios empleados para el crecimiento de *S. cerevisiae* se suplementaron con diversas sustancias: el sorbitol, utilizado como estabilizador osmótico, se añadió a la concentración de 1M

previamente a la esterilización del medio de cultivo; otras sustancias, como el rojo Congo, el ácido 5-fluoroorótico (5-FOA), el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-Gal), el blanco de calcoflúor y el cloruro cálcico se añadieron al medio esterilizado hasta conseguir la concentración final apropiada.

3. TÉCNICAS EMPLEADAS EN ESTE TRABAJO.

3.1. Manipulación de DNA. Técnicas de Biología Molecular.

Las técnicas básicas de biología molecular – aislamiento de DNA plásmidico de *E. coli* mediante lisis alcalina, extracción de DNA genómico de levadura, etc.- se realizaron según los protocolos

clásicos (Sambrook, 1989; Ausubel y col., 1993). Las enzimas de restricción, DNA-ligasa y DNA-fosfatasa procedían de Boehringer-Mannheim. La elución de fragmentos de DNA de geles de agarosa

se realizó mediante el “kit” comercial Geneclean. La transformación de *E. coli* se realizó según el método de Hanahan (1983) y la de *S. cerevisiae* según el método de Ito y col. (1983). La amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un aparato DNA Thermal Cyclor (Perkin-Elmer) y en un MiniCyclor PTC-150 (MJ Research) según las técnicas descritas

en Sambrook y col (1989). La secuenciación de DNA fue llevada a cabo en la Unidad de Secuenciación Automatizada de DNA de la Universidad Complutense de Madrid, utilizando DNA obtenido mediante el “kit” comercial Quiagen Plasmid Mini-Kit, y un secuenciador automático modelo ABI PRISM 377 DNA Sequencer.

3.2. Mutagénesis de *S. cerevisiae*.

La mutagénesis sobre células de *S. cerevisiae* se realizó utilizando luz ultravioleta de 240 nm de longitud de onda. Las cepas se cultivaban hasta fase exponencial (DO=1) y a continuación se sembraba un número adecuado de células por placa con el medio correspondiente (según el experimento de que se tratase). A continuación eran irradiadas a una

intensidad de 4 erg/mm/s durante 30 o 60 segundos (dependiendo del experimento) para provocar una supervivencia del 40% o el 17%, respectivamente, que había sido comprobada en ensayos previos. Las placas se incubaban a continuación a 28 °C hasta aparición de colonias.

3.3. Microscopía de fluorescencia y de contraste de fases.

Las muestras de levadura se observaban en un montaje húmedo. Los microscopios utilizados fueron un microscopio directo Nikon Optiphot acoplado a una lámpara halógena de luz ultravioleta

y un microscopio invertido Nikon Diaphot acoplado a una lámpara ultravioleta de mercurio. Se empleó un objetivo de contraste de fases 40 X y un ocular 10 X.

3.4. Microscopía electrónica de barrido.

Sobre un filtro Millipore de 13 mm de diámetro y 0.2 µm de tamaño de poro, previamente lavado con, en primer lugar, 2 ml de metanol y, en segundo lugar, con 1 ml de cacodilato sódico 0.2 M, se recogía una muestra de 1 ml de cultivo en el medio líquido correspondiente. Las células se fijaban sumergiéndolas en una solución de glutaraldehído al 5% en cacodilato sódico 0.2 M pH 7.2 durante 60 minutos. A continuación se procedía a la deshidratación de la muestra mediante la

inmersión sucesiva y durante diez minutos en soluciones de etanol al 25, 50, 70, 90 y 100%. Inmediatamente se sumergía la muestra en acetona durante una noche y a continuación se desecaba en un desecador de punto crítico. Las muestras se observaban en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6400 perteneciente al Centro de Microscopía Electrónica “Luis Bru” de la Universidad Complutense de Madrid.

3.5. Obtención y determinación cuantitativa de RNA. (Collart y Oliviero, 1993)

Las células se cultivaban hasta densidad óptica de 1.0 a 600 nm. Todos los materiales utilizados en el manejo de RNA habían de ser previamente lavados con H₂O₂ al 33% y tratados después con dietilpircarbonato (DEPC) para inactivar RNAsas. Para recoger las células, los cultivos se transferían a tubos de centrifuga Falcon y se centrifugaban a 4 °C a 1500 g durante 3 minutos. Las células se recogían con 1 ml de agua previamente enfriada en hielo y se volvían a centrifugar a 4°C, descartándose el sobrenadante (estas células podían conservarse congeladas a -70 °C). Las células se resuspendían en 400 µl de tampón TES (ácido N-tris(hidroximetil)-metil-2-aminoetanosulfónico (TES) 10 mM pH 7.4, EDTA 10 mM, SDS 0.2%) y se añadían 400 µl de fenol ácido, agitando a continuación con vórtex durante 10 segundos y centrifugando 5 minutos a 4 °C. La fase acuosa se transfería a un tubo Eppendorf y se le añadían 400 µl de fenol ácido, agitando de nuevo con vórtex y volviendo a centrifugar. La fase acuosa se pasaba a un nuevo tubo Eppendorf y se añadían 400 µl de cloroformo, agitando con vórtex y

centrifugando de nuevo. La fase acuosa se transfería a un nuevo tubo y se añadían 40 µl de acetato sódico 3M pH 5.3 y 1 ml de etanol 100% frío. A continuación se centrifugaba para recoger el RNA, que se resuspendía en 50 µl de agua tratada con DEPC.

La determinación de la cantidad de RNA se realizaba con un espectrofotómetro Beckman DV 640 mediante la medida de la absorbancia a 260 nm y 280 nm (la absorbancia a 280 nm debe ser la mitad que a 260 nm, y 1 unidad de DO a 260 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 40 µg/ml de RNA), igualándose las concentraciones con agua. Cada extracto se preparaba para la electroforesis mediante la adición al extracto de RNA (50 µg), ajustado a 16.5 µl con agua, de formaldehído 12.3 M (13.5 µl), formamida (37.5 µl) y tampón de carga MOPS 10X (ácido 3-N-morfolino-propanosulfónico (MOPS) 0.4 M pH 7, acetato sódico 0.5 M, EDTA 0.01 M) (7.5 µl).

3.6. Electroforesis de RNA, transferencia a membrana y detección (“Northern blotting”). (Brown y Mackey, 1997)

Las muestras se cargaban en un gel de agarosa / MOPS / formaldehído (216 ml de agua, 30 ml MOPS 10X, 54 ml formaldehído 12.3 M, agarosa 1%) (de nuevo todos los materiales y soluciones se trataban con DEPC para inactivar RNAsas) y se sometían a electroforesis durante una noche a un voltaje constante de 30 voltios, utilizando tampón de electroforesis MOPS (MOPS 0.2 M pH 7, acetato sódico 0.5 M, EDTA 0.01 M). A continuación se transfería el gel a una membrana de nitrocelulosa tratada previamente con SSC 20X (NaCl 3M, citrato sódico 0.3 M, pH 7), depositando el gel sobre la membrana y manteniendo un peso constante sobre el gel durante una noche.

Se utilizaron como sondas un fragmento *HindIII-BamHI* de 1,2 kb de *SKM1*, y un fragmento

HindIII-BamHI de 1,7 kb de *ACT1*. Ambas se marcaron utilizando el fragmento Klenow de la DNA-polimerasa I y dUTP marcado con digoxigenina. La membrana se prehibridaba en primer lugar durante 3 horas a 42 °C y a continuación se hibridaba con la sonda marcada de DNA –previamente desnaturizada a 100 °C durante 10 minutos - durante una noche a 42 °C. Después se lavaba la membrana con SSC 2X / SDS 0.1% dos veces y con SSC 0.2X / SDS 0.1% otras dos veces, para eliminar los restos de la solución de hibridación. La detección se realizaba mediante un anticuerpo reconecedor de la digoxigenina marcado con fosfatasa alcalina, y a continuación se revelaba con CSPD (kit de detección de Boehringer-Manheim).

3.7. Estudio de interacciones entre proteínas mediante el sistema de “dos híbridos”.

En este trabajo se han utilizado los siguientes sistemas de “dos híbridos”:

3.7.1. Sistema de “dos híbridos” basado en la proteína LexA (Ausubel y col., 1993).

En este sistema, el gen X se subclona en el plásmido pEG202 en fase con el gen *LexA*, y bajo el control del promotor constitutivo del gen *ADHI*. En el plásmido pJG4-5 se subclona el gen Y, en fase con el dominio de activación transcripcional B42, y bajo el control del promotor del gen *GALI*, inducible por galactosa. El sistema emplea los genes “reporter” *LEU2* y *lacZ*, ambos bajo el control de un promotor al que se une la proteína LexA. *lexA-lacZ* se encuentra subclonado en el plásmido pSH18-34, mientras que *lexA-LEU2* se encuentra integrado en el genoma de la cepa EGY48, hospedadora del sistema. Se utilizó la genoteca pJG4-5.X, subclonada en el vector pJG4-5.

3.7.2. Sistema de “dos híbridos” basado en el factor de transcripción Gal4 (Fields y Song, 1989).

En este sistema, el gen X se subclona en el vector pGBT9 en fase con el dominio de unión a DNA del gen *GAL4* y bajo el control del promotor del gen *ADHI*. El gen Y se subclona en el vector pGAD424 en fase con el dominio activador de transcripción de *GAL4* bajo el control del mismo promotor. Los genes “reporter” *lacZ* y *HIS3* se encuentran controlados por el promotor del gen *GALI*, al que se une el factor de transcripción Gal4. Las cepas hospedadoras de este sistema son la HF7c (Feilolter y col., 1994), que contiene integradas en su genoma las construcciones *GALI-lacZ* y *GALI-HIS3* y la cepa Y526 (Soler y col., 1997), que sólo contiene la construcción *GALI-lacZ*. Se empleó el 3-aminotriazol para inhibir el crecimiento de colonias que expresaran niveles bajos del gen *HIS3*. Se utilizaron las genotecas subclonadas en los vectores pGAD.1R, pGAD.2R y pGAD.3R, que permiten la subclonación de los insertos en los tres posibles marcos de lectura (Chien y col., 1991).

3.7.3. Sistema de “dos híbridos” de apareamiento basado en el factor de transcripción Gal4 (cedido por S.J. Elledge).

En este sistema, similar al anterior, el gen X se subclona en el plásmido pASΔΔ -análogo al pGBT9-, y en el plásmido pACTII -análogo al pGAD424- se subclona el gen Y. La construcción pASΔΔ-X se transforma en la cepa CG1945 (*MATa*), que porta integrada en su genoma la construcción *GALI-HIS3*, y la pACTII-Y se introduce en la cepa Y187 (*MATα*), que contiene en su genoma la construcción *GALI-lacZ*. La fusión sexual de ambas cepas permite la transcripción de ambos genes “reporter”. Las genotecas que se han utilizado en este sistema son la Y2HL-C1, Y2HL-C2 e Y2HL-C3, que permiten, como en el caso anterior, obtener los tres posibles marcos de lectura de los insertos génicos (James y col., 1996).

En los sistemas descritos previamente, la selección de los clones positivos se realizaba en primer lugar por crecimiento en un medio deficiente en un determinado aminoácido; y en segundo lugar por la detección de la producción de β-galactosidasa. Esta valoración puede realizarse de diversos modos:

-*Valoración cualitativa de actividad β-galactosidasa:*

1. Análisis en placa con X-Gal. Las células se incubaban en placas con X-Gal (80 μg/ml) durante 3 días, volviéndose azules las productoras de β-galactosidasa.

2. Réplica en filtro. Las colonias se replicaban en un papel Whatman 3M y se permeabilizaban mediante inmersión en nitrógeno líquido durante 5 segundos. Después de que el filtro se descongelara se colocaba con las colonias hacia arriba sobre una placa Petri que contenía un papel de filtro inmerso en 3.2 ml de tampón Z (Na₂HPO₄*7 H₂O 16.1 g/l, NaH₂PO₄*H₂O 5.5 g/l, KCl 0.75 g/l, MgSO₄*7 H₂O 0.246 g/l) con β-mercapto-etanol (2.7 ml/l) y 100 μl de solución de

X-Gal (solución madre a 20 mg/ml en dimetilformamida). Los filtros se incuban de 30 minutos a 12 horas a 28 °C. Las colonias que se vuelven azules son las productoras de β -galactosidasa.

3. Ensayo de sobrecapa. Sobre la placa con las colonias seleccionadas por el marcador de auxotrofia se añadía una capa semisólida de tampón fosfato y X-Gal en dimetilformamida con agar al 1.2%. Las placas se incuban de 30 minutos a 12 horas a 28 °C, volviéndose azules las productoras de β -galactosidasa. Las colonias positivas se recogen con un palillo estéril, atravesando la sobrecapa semisólida.

3.8. Obtención de extractos proteicos y determinación cuantitativa de proteínas.

Las células de *S. cerevisiae* se cultivaban toda la noche en el medio correspondiente hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial. Entonces se diluían hasta una densidad óptica a 600 nm de 0.2 y se dejaban crecer una generación. A continuación, las células se recogían en hielo añadiendo 20 ml del cultivo a un volumen similar de hielo en un tubo de centrifuga Falcon, depositándose en el fondo mediante centrifugación refrigerada. Las células, a continuación, se transferían resuspendidas en 1ml de agua previamente mantenida en hielo a un tubo Eppendorf, se recogían mediante centrifugación y bien se congelaban inmediatamente en hielo seco o bien se rompían.

Para la ruptura, las células se resuspendían en tampón de lisis frío (Tris-HCl -pH 7.5- a 50mM, glicerol al 10%, Tritón X-100 al 1%, SDS al 0.1%, NaCl a 150mM, EDTA a 5mM, los inhibidores de proteasas fenil-metil-sulfonil-fluoruro (PMSF) a 1mM, tosil-fenil-alanín-clorometil-cetona (TPCK), tosil-lisín-clorometil-cetona (TLCK), leupeptina, pepstatina A, antipaína y aprotinina, todos ellos a 25

-Valoración cuantitativa de actividad beta-galactosidasa:

1. Ensayo con orto-nitro-fenil-galacto-piranosido (ONPG). Se parte de células crecidas en medio selectivo para los plásmidos y que se encuentran en fase exponencial. Las células se permeabilizan con cloroformo y SDS 0.1%. La β -galactosidasa hidroliza el ONPG produciendo orto-nitrofenol, de color amarillo (Ausubel y col., 1997). La determinación de orto-nitrofenol se realiza midiendo la absorbancia a 420 nm en un espectrofotómetro, y el resultado se expresa en unidades de Miller (Miller, 1972).

μ g/ml y los inhibidores de fosfatasa NaF a 50 mM, β -glicerol-fosfato a 50mM, pirofosfato sódico a 5mM y ortovanadato sódico a 1mM), se añadían perlas de vidrio Ballotini de 0.45 o 1 mm (BHD Lab. Supplies) y a continuación se agitaba vigorosamente la mezcla en un aparato homogeneizador de células Fast-Prep (Bio-101, intensidad 5.5 durante 30 segundos).

Los extractos celulares se separaban de las perlas de vidrio y los restos de células mediante centrifugación refrigerada a 4 °C y 13000xg durante 15 minutos. La concentración de proteína de los sobrenadantes se determinaba midiendo la absorbancia de los extractos en un espectrofotómetro Beckman DV 640 a 280 nm (1 unidad de DO a 280 nm corresponde aproximadamente a una concentración de 1 mg/ml de proteína) y se igualaba mediante adición de tampón de lisis. A continuación se añadía tampón de carga SDS-PAGE 2X a los extractos y éstos se hervían durante 5 minutos, conservándose a continuación congelados a -20 °C o bien se realizaba directamente la electroforesis.

3.9. Electroforesis de proteínas, transferencia a membranas e inmunodetección (“Western-blotting”).

La separación de proteínas de los extractos se realizó mediante SDS-PAGE, utilizando geles de poliacrilamida al 8%, en cubetas Mini-Protean II Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 150 voltios y cargando aproximadamente 10 µg de proteína por pocillo. Estos geles se transferían a continuación a membranas de nitrocelulosa (Hybond, Amersham) en unas cubetas de transferencia Mini Trans-Blot Transfer Cell (Bio-Rad) a un voltaje constante de 100 voltios durante 1 hora.

Las membranas eran hibridadas con el anticuerpo correspondiente en presencia de leche desnatada al 1%: policlonales frente a GST (Santa Cruz Biotechnology), a dilución 1:1000; monoclonales 9E10 frente a *c-myc* (BAbCO) a dilución 1:2000; policlonales frente a la MAP

quinasa p44/p42 difosforilada (Thr202/Tyr204) (New England Biolabs) a dilución 1:2000; o policlonales frente a GST-Slt2 (Martín y col., 1993) a dilución 1:1000. El anticuerpo primario se detectaba utilizando un anticuerpo conjugado con peroxidasa y después el sistema de detección ECL (Bio-Rad).

En ocasiones, las membranas tratadas con el anticuerpo frente a la forma fosforilada de la MAP quinasa p44/p42 eran deshibridadas y rehibridadas con el anticuerpo frente a GST-Slt2, para monitorizar la cantidad de esta proteína. En otros casos, con los mismos extractos se realizaban “western-blot” paralelos utilizando cada uno de los anticuerpos.

RESULTADOS

1. ENSAYOS FENOTÍPICOS.

Con el objetivo de encontrar un papel para Skm1 en la fisiología celular, y ya que, como se detalla en “Antecedentes y Objetivos” los primeros intentos de caracterizar fenotípicamente los mutantes *skm1* no rindieron resultados positivos, este trabajo se centró inicialmente en la búsqueda de un fenotipo para estos mutantes.

1.1. Curvas de crecimiento de mutantes defectivos en las proteínas PAK.

Se procedió a la comparación de los patrones de crecimiento en medio rico de mutantes *ste20*, *cla4*, *skm1*, *ste20 skm1* y *cla4 skm1*. Previamente, como se indica en “Antecedentes y Objetivos”, pudo observarse que Skm1 no parecía redundante, en las condiciones ensayadas, con sus dos proteínas PAK homólogas Ste20 y Cla4, puesto que el fenotipo de esterilidad de mutantes *ste20* o el morfológico de yemas alargadas de *cla4* no sufrían intensificación o modificación alguna por la adición de la mutación *skm1*. Sin embargo, parecía interesante comprobar si la posible redundancia funcional se podría manifestar en un efecto sobre el crecimiento.

Para ello, se escogió por un lado la cepa silvestre DBY746 y los mutantes isogénicos sencillos *skm1*, *cla4* y el doble *skm1 cla4*, y por otro, la cepa silvestre SEY6211 y los mutantes isogénicos *skm1*, *ste20* y *skm1 ste20* para proceder a la comparación de las curvas de crecimiento. Como se muestra en la **Figura 1A**, los mutantes *ste20*, *skm1* y *skm1 ste20* no mostraron diferencias significativas entre sí, ni con la cepa silvestre, llegando las curvas de crecimiento a ser casi solapantes. En el caso de los mutantes *cla4* (**Figura 1B**), se observó una ligera ralentización en el crecimiento. El mutante *skm1*, sin embargo, se comportó como la cepa silvestre, y el doble *skm1 cla4* como el *cla4*.

1.2. Estudios de sensibilidad de mutantes *skm1* a diversas sustancias.

En “Antecedentes y Objetivos” se han descrito los estudios previos de sensibilidad a diferentes

sustancias efectuados en mutantes *skm1*, los cuales no mostraron especial susceptibilidad hacia las sustancias ensayadas. En este trabajo se estudió la sensibilidad de *skm1* a nuevas sustancias:

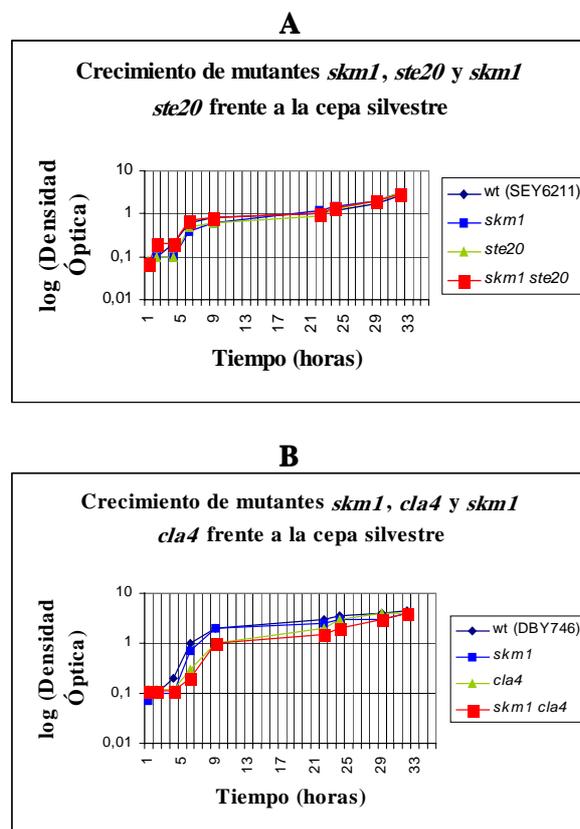


Figura 1. Curvas de crecimiento de mutantes defectivos en las proteínas PAK.

Representación semilogarítmica de las densidades ópticas a 600 nm frente al tiempo de cultivos de (A) cepas *skm1*, *ste20* y *skm1 ste20* y la isogénica silvestre SEY6211, y (B) cepas *skm1*, *cla4* y *skm1 cla4* y la isogénica silvestre DBY746. El cultivo se realizó en medio rico (YPD) a 28°C. Los preinóculos se cultivaron durante una noche y a la mañana siguiente se realizó un inóculo a una densidad óptica de partida de 0,1 a 600 nm.

1.2.1. Sensibilidad a toxina killer.

La toxina *killer* K1, producida por algunas cepas de levadura es una toxina formadora de poros en la membrana que requiere un paso inicial de

unión a un receptor en la pared celular para ejercer su acción (Bussey, 1991). Este receptor es probablemente el β -1,6-glucano, ya que se ha demostrado su unión a la toxina (Hutchins y Bussey, 1983). Los mutantes resistentes a la toxina *killer* K1 presentan niveles disminuidos de β -1,6-glucano álcali-insoluble y en ocasiones defectos en la glicosilación (Orlean, 1991). Por ello, la alteración de la sensibilidad a esta toxina es una buena herramienta para detectar defectos en la pared celular.

Se comparó la sensibilidad de las cepas DBY746 y su isogénica *skm1*, y la SEY6211 y su isogénica *skm1*. Para ello se sembraron céspedes de un millón de células de cada cepa en placas de YED tamponadas con citrato sódico 2N a pH 4.7 y con azul de metileno al 0.6% (que permite una mejor observación de los halos de inhibición de crecimiento). En el centro de la placa se situó una gota de 0.9 mm de diámetro conteniendo 8×10^6 células de la cepa 1638 (K+) productora de la toxina. Como control se utilizó un césped de células 5x47 (K-), sensibles a la toxina. Se incubaron las placas durante 1 semana a 24°C – el crecimiento en azul de metileno es lento- y a continuación se midieron los halos de inhibición: la cepa K- mostraba un halo de 19 mm de diámetro, mientras que en las cepas en el fondo genético DBY746 era de 9 mm y en el fondo genético SEY6211 era de 10 mm. Los mutantes *skm1* no mostraron diferencia respecto a sus isogénicas silvestres.

1.2.2. Sensibilidad a zimoliasa.

La zimoliasa es una mezcla de enzimas hidrolíticas, constituida principalmente por β -1,3-glucanasas y proteasas, que digiere la pared celular de las levaduras, provocando en última instancia la lisis celular. La diferente sensibilidad de las levaduras a esta preparación ha sido utilizada para detectar cambios en la composición y organización de la pared celular (de Nobel y col., 1990; Lussier y col., 1997; Ovalle y col., 1998; Ram y col., 1994).

Se utilizaron las mismas cepas que en el ensayo anterior. Se resuspendieron estas cepas en una solución de zimoliasa 20T a una concentración de 12.5 μ g/ml durante 5 horas y a continuación se sembró en placas de YPD un volumen equivalente al que contendría 100 células vivas del cultivo antes del tratamiento. Se contó el número de colonias crecidas al cabo de tres días de cultivo a 24°C, comprobándose que en el fondo genético DBY746 la supervivencia era del 84% y en el SEY6211 del 81% -se considera que una cepa es especialmente sensible a zimoliasa cuando al cabo de 2 horas de exposición a esta misma concentración la supervivencia es del 40% (Ram y col., 1994)-. No se observaron diferencias significativas en la supervivencia de los respectivos mutantes *skm1*.

1.2.3. Sensibilidad a calcoflúor.

El blanco de calcoflúor es un fluorocromo que se une a las cadenas en formación de quitina y en menor medida de β -1,3-glucano, impidiendo la cristalización y ensamblaje de las microfibrillas (Roncero y Durán, 1985). Interfiere así en la organización de la pared celular, de forma que si ésta se encuentra debilitada no resiste concentraciones de estos agentes que no afectan a células silvestres.

De nuevo se utilizaron las mismas cepas. Se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de suspensiones celulares (2×10^6 células/ml) obtenidas de los cultivos de estas cepas mutantes y silvestres, y se sembraron gotas (5 μ l, conteniendo, según la dilución, 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 células) en placas de YPD con blanco de calcoflúor a distintas concentraciones (hasta 100 μ g/ml). No se observó diferencia en el crecimiento entre unas cepas y otras.

1.2.4. Sensibilidad a rojo Congo.

El rojo Congo es un compuesto de características y propiedades similares al blanco de calcoflúor y afecta fundamentalmente al ensamblaje de las cadenas de β -1,3-glucano (Kopecka y Gabriel, 1992). La sensibilidad a este compuesto se puede

utilizar para detectar mutantes afectados en la biosíntesis y arquitectura de la pared celular.

Se utilizaron las mismas cepas del experimento anterior, sembrándose gotas a partir de diluciones decimales seriadas de los cultivos en placas de YPD con rojo Congo a una concentración de 100 µg/ml, que se incubaron a 24°C durante 4 días. Tampoco se observaron diferencias entre mutantes y silvestres.

1.2.5. Sensibilidad a peróxido de hidrógeno.

Se realizó este experimento con el fin de estudiar una posible implicación de *Skm1* en respuesta a estrés oxidativo. Se utilizaron una vez más las mismas cepas, que fueron cultivadas paralelamente hasta fase exponencial (densidad óptica 1 a 600 nm) y fase estacionaria (densidad óptica 12 a 600 nm). En ese momento se añadía peróxido de hidrógeno de manera que su concentración final en el cultivo fuera de 100 mM y se continuaba la incubación, recogiendo muestras, que se sembraban en placas de YPD, cada 5 minutos, hasta los 40 minutos. Al cabo de tres días de incubación a 24°C se contaban las colonias. De nuevo, se observó que no había diferencias entre mutantes y silvestres.

1.2.6. Sensibilidad a calcio.

El calcio actúa como segundo mensajero en numerosas rutas fisiológicas en *S. cerevisiae*, siendo, por tanto, muy importante para la célula la concentración intracelular de este catión. Se piensa que el calcio influye de diversas formas en la morfogénesis celular y la biosíntesis de la pared celular: regula los procesos morfogenéticos dependientes de actina a través de Cdc24 (Miyamoto y col., 1991), influye en la secreción polarizada a través de la calmodulina (Peters y Mayer, 1998) y regula la síntesis de glucano mediante la calcineurina (Zhao y col., 1998).

Se comparó la sensibilidad de mutantes defectivos en las distintas proteínas PAK: en el fondo genético DBY746, los mutantes *skm1*, *cla4*, *skm1 cla4* y la cepa silvestre; en el fondo genético SEY6211, los mutantes *skm1*, *ste20*, *skm1 ste20* y la cepa silvestre. Se sembraron gotas a partir de diluciones decimales seriadas de los cultivos en placas de YPD con cloruro cálcico a concentración 0.2 M, que se incubaron a 24°C durante 5 días. No se observaron diferencias en los mutantes con respecto a las cepas silvestres.

2 ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *SKM1*

La dificultad, mostrada en los experimentos anteriores, de encontrar un fenotipo para la mutación *skm1* nos hizo preguntarnos si realmente el gen *SKM1* era capaz de transcribirse o nos encontrábamos ante un pseudogén. Para resolver esta duda procedimos a estudiar la expresión de *SKM1* mediante dos técnicas (**Figura 2**).

2.1 Estudio de la expresión del gen *SKM1* mediante “Northern blotting”.

Para este ensayo se utilizaron las cepas haploide 1783 y diploide 1783x1784, para comprobar si la haploidía o diploidía podían influir en la expresión del gen. Estas cepas se transformaron también con el

plásmido episómico YEp352SKM1, que expresa el gen *SKM1* bajo el control de su propio promotor, pero permite amplificar esta expresión por el mayor número de copias del plásmido que porta la célula. Además, todas las cepas y transformantes descritos se expusieron a la presencia de factor α .

Se realizó el análisis utilizando como sonda marcada el fragmento *HindIII-BamHI* del ORF del gen *SKM1* y para controlar la cantidad de RNA una sonda del gen *ACT1*, de expresión constitutiva en todos los estados fisiológicos de la célula (ver “Materiales y Métodos”). El resultado obtenido (**Figura 2A**) indicó que la expresión del gen *SKM1* tanto en condiciones de ciclo vegetativo como en

presencia de factor α era muy débil y prácticamente indetectable por esta técnica, aunque el gen se transcribía, como quedaba de manifiesto por la banda intensa que aparece en las células transformadas con el vector multicopia. En el diploide 1783x1784 los resultados obtenidos fueron similares (datos no mostrados).

2.2. Estudio de la producción de la proteína Skm1 mediante “Western-blotting”.

Como método alternativo para el estudio de la expresión de este gen, procedimos a la detección del producto proteico que codifica utilizando la técnica del “Western-blotting”. Para conseguir este objetivo fue necesario expresar la proteína Skm1 en fusión al péptido *myc*, para así hacer posible la detección de la fusión mediante anticuerpos anti-*myc*. Para conseguir la producción de la proteína de fusión Skm1-*myc* bajo el control del promotor del gen *SKM1*, se procedió a la construcción del plásmido integrativo pRS315SKM1-*myc*, que fue linearizado con la enzima de restricción *SphI* para dirigir su

integración al *locus* de *SKM1*, antes de ser transformado en las cepas YGS57 (*rga1 rga2 bem3*) y su isogénica silvestre SY2002. Se eligieron estas cepas debido a que las células YGS57 muestran (como más adelante se estudiará en detalle) una elevada activación de la GTPasa Cdc42, y la posible relación entre esta y Skm1 (las proteínas PAK, en general, son sustratos de Cdc42) podría determinar una posible influencia de la GTPasa en la expresión de Skm1.

Tras realizar el “western-blot” con anticuerpos anti-*myc* sobre extractos de estas cepas, se pudo apreciar (**Figura 2B**) que la expresión de la fusión Skm1-*myc* desde el propio promotor del gen *SKM1* es claramente detectable mediante esta técnica, lo que indica que este gen se expresa durante el crecimiento vegetativo. Por último, no se aprecian diferencias en la cantidad de proteína producida por la cepa YGS57 y la silvestre, lo que parece indicar que la activación de Cdc42 no influye en la expresión de *SKM1*.

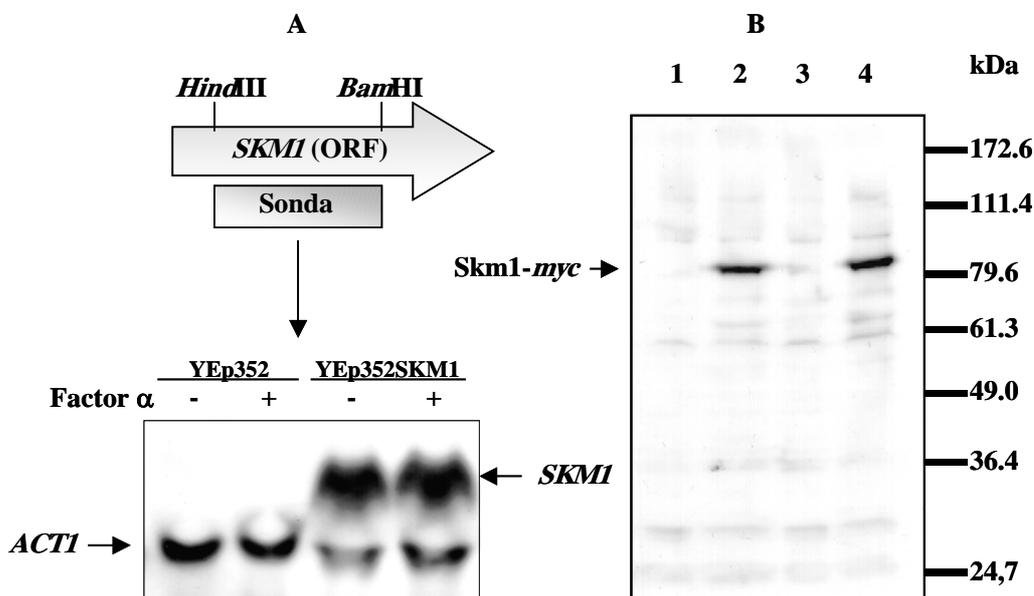


Figura 2. Análisis de la expresión del gen *SKM1*. (A) “Northern blot” realizado sobre extractos de células cultivadas a 28 °C hasta fase exponencial en ausencia (-) o en presencia (+) de factor α . Se utilizaron las cepas 1783 transformada con el vector multicopia *YEp352* como control y con *YEp352SKM1*. Como sonda marcada, se utilizó un fragmento *HindIII-BamHI* del gen *SKM1*. Para monitorizar la cantidad de RNA se usó una sonda del gen *ACT1*. (B) “Western blot” realizado con anticuerpos anti-*myc* a partir de extractos de las cepas (1) silvestre SY2002, (2) YTX41 (con la construcción *SKM1-myc* integrada en el genoma de la cepa SY2002), y las mutantes isogénicas (3) YGS57 (*rga1 rga2 bem3*) y (4) YTX42 (*rga1 rga2 bem3 SKM1-myc*), todas ellas cultivadas a 28°C hasta fase exponencial.

3 ESTUDIOS DE SOBREEXPRESIÓN DE *SKM1*.

Dado que la pérdida de *SKM1* no provocaba en la célula ningún fenotipo detectable en las condiciones ensayadas, planteamos otros abordajes experimentales que nos permitieran identificar sus posibles funciones en la célula, entre ellos, la sobreexpresión de la proteína o de fragmentos de ella.

3.1. Sobreexpresión de *Skm1* completa.

En un primer momento, se utilizó el vector pEG(KG) para realizar la construcción del plásmido pGSTO32 que, en presencia de galactosa, sobreexpresa en fusión a GST el fragmento *MamI-*

SspI de *SKM1*. Este fragmento codifica la proteína completa a excepción de sus primeros nueve aminoácidos. Este plásmido se transformó en las cepas 1783 (haploide) y 1783x1784 (diploide). Cuando los transformantes se cultivaron en medio mínimo con galactosa como fuente de carbono para inducir la sobreexpresión de la proteína de fusión, las células mostraron un fenotipo morfológico anormal de grandes células redondas y multigemadas y un menor número de células grandes, redondeadas y sin yemas. Tras 14 horas de inducción de la sobreexpresión en galactosa, el 26% de las células manifestaban el fenotipo de multigemación, y este porcentaje se incrementó

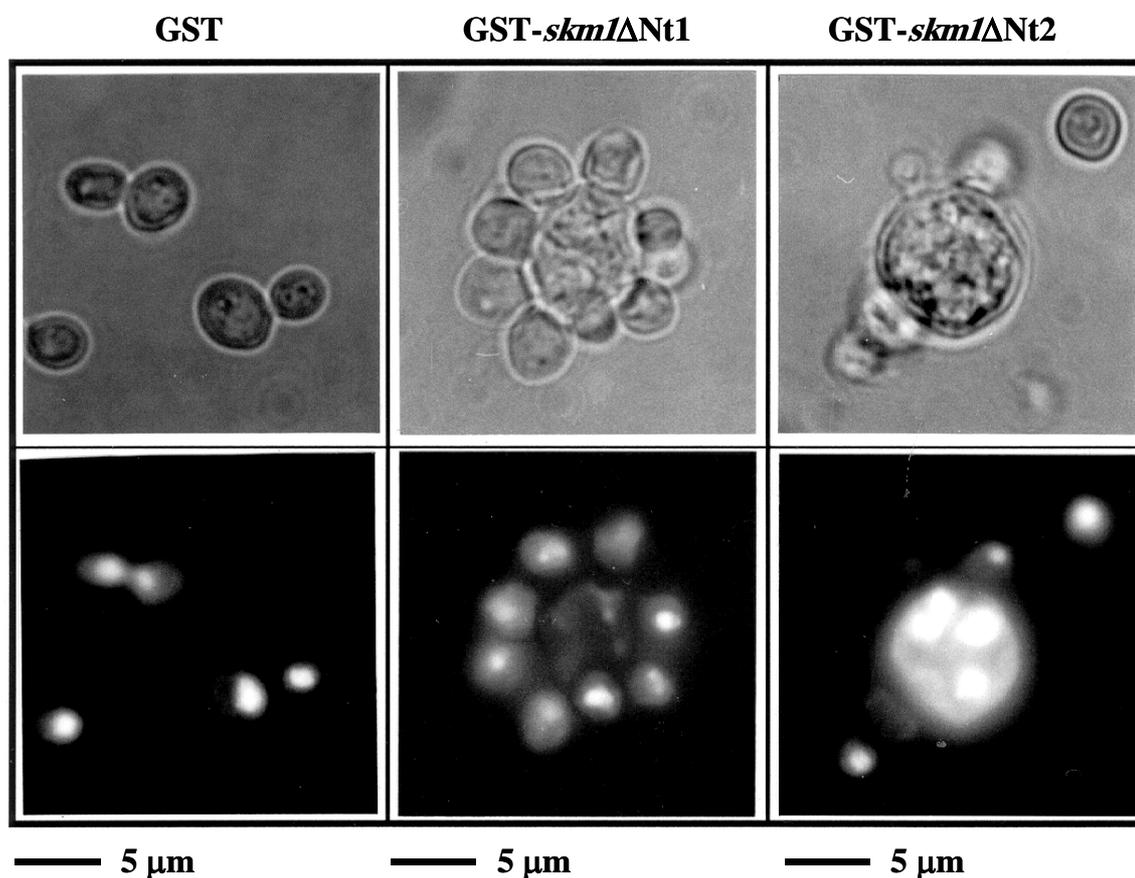


Figura 3. Fenotipo morfológico causado por la sobreexpresión de distintos fragmentos de *SKM1*. Arriba, cepa 1783 transformada con los plásmidos pEG(KG), pGSTO32 y pGSTK7, y cultivada a 28°C en medio mínimo con galactosa como fuente de carbono durante 40 horas para inducir la expresión de, respectivamente, GST, GST-*skm1*ΔNt1 (que codifica toda la proteína a excepción de los nueve primeros aminoácidos), y GST-*skm1*ΔNt2 (que expresa el dominio quinasa de *Skm1*). Abajo, las mismas células teñidas con yoduro de propidio para visualizar los núcleos.

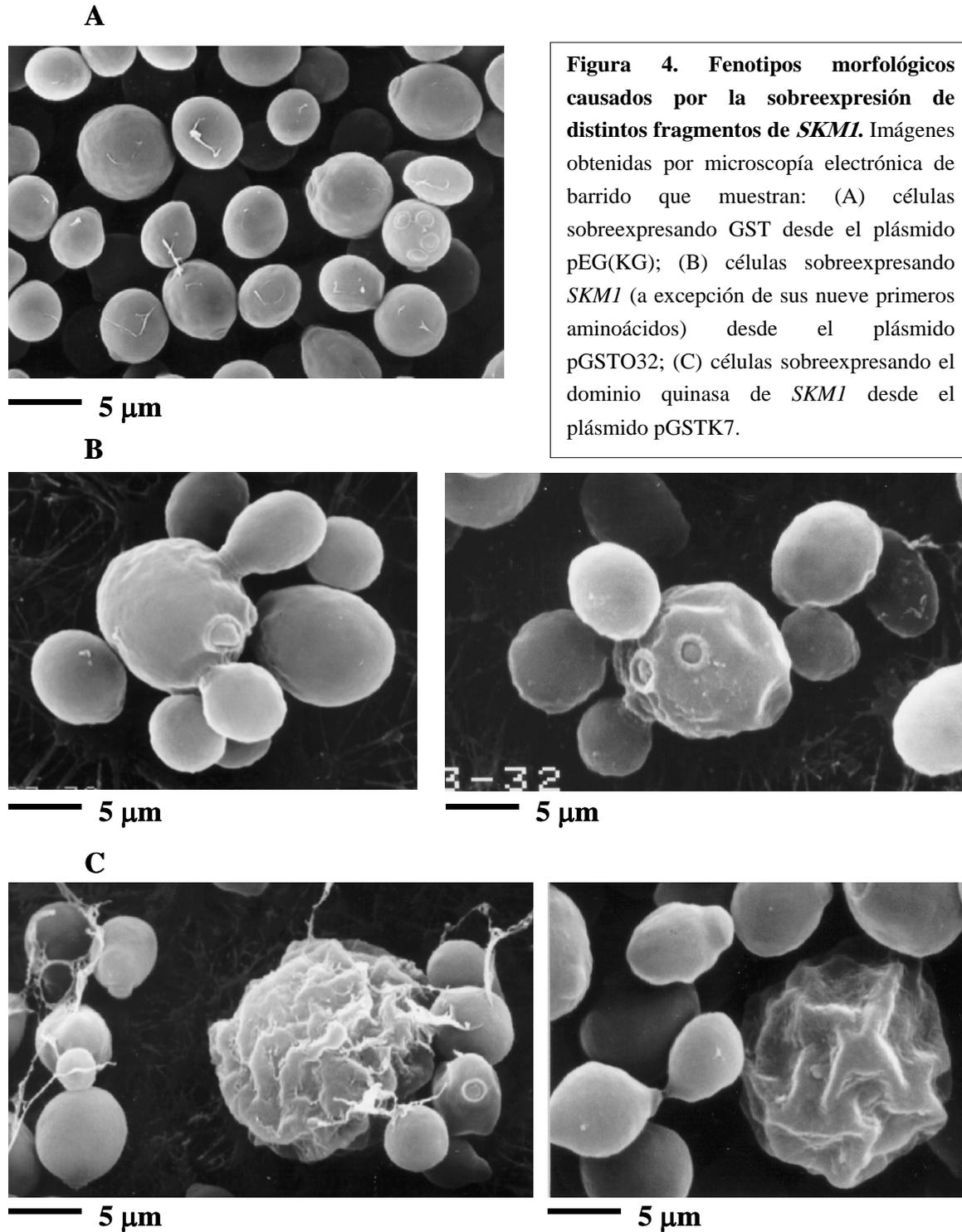


Figura 4. Fenotipos morfológicos causados por la sobreexpresión de distintos fragmentos de *SKMI*. Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido que muestran: (A) células sobreexpresando GST desde el plásmido pEG(KG); (B) células sobreexpresando *SKMI* (a excepción de sus nueve primeros aminoácidos) desde el plásmido pGSTO32; (C) células sobreexpresando el dominio quinasa de *SKMI* desde el plásmido pGSTK7.

hasta el 52% a las 38 horas y el 72% a las 62 horas. La estabilización osmótica del medio mediante la adición de sorbitol a concentración 1M no evitó este fenotipo. La tinción con yoduro de propidio permitió observar el hecho de que las células madre multigemadas contenían varios núcleos, y que cada una de sus yemas poseía también su propio núcleo (**Figuras 3 y 4**). Este fenotipo morfológico era muy

similar al producido por la sobreexpresión de *CDC42* y alelos activados de éste (Ziman y col., 1991).

Se estudió si este fenotipo morfológico aberrante dependía de las rutas de integridad celular o de respuesta a alta osmolaridad, sobreexpresando *Skml* desde el plásmido pGSTO32 en las cepas

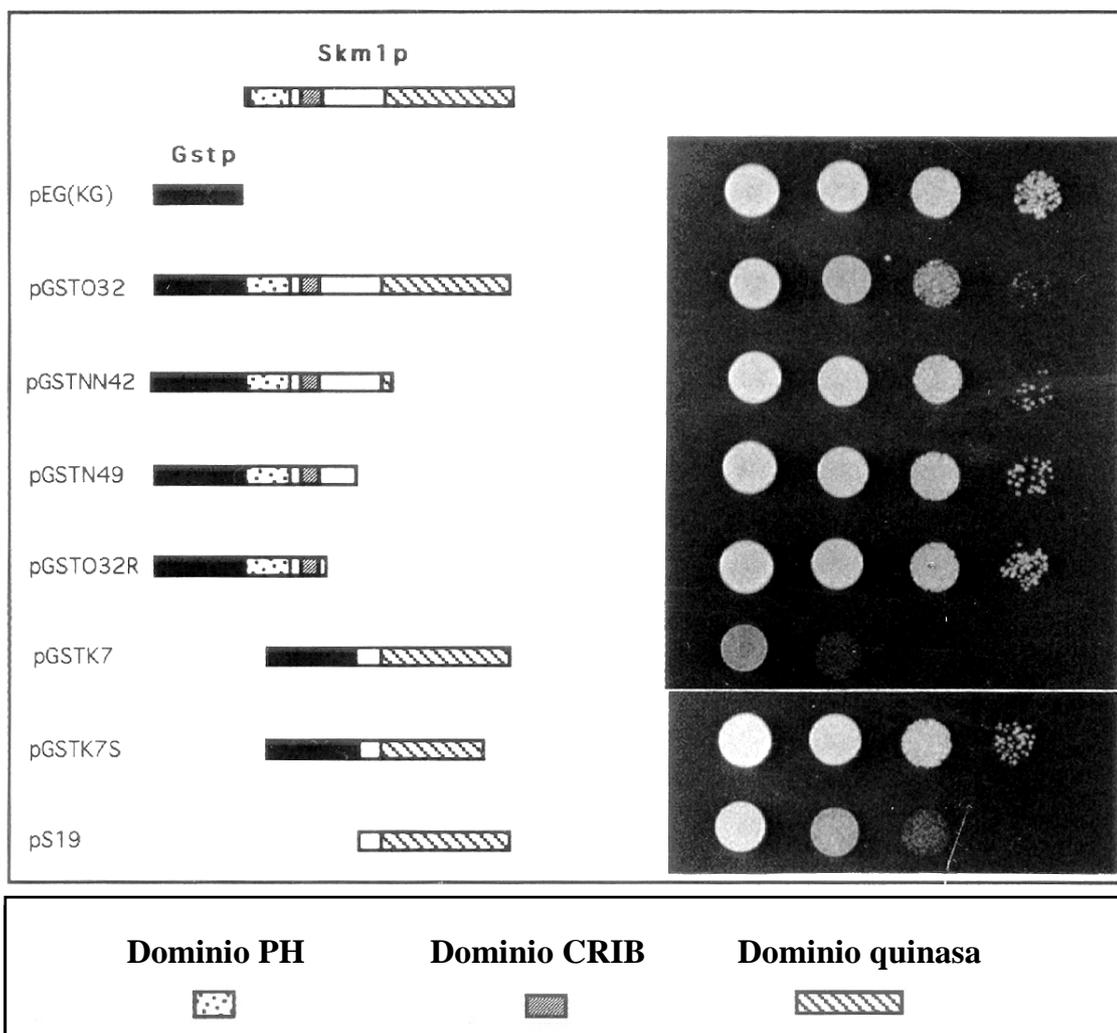


Figura 5. Efecto en el crecimiento de la sobreexpresión de distintos fragmentos de *SKM1*. La cepa 1783 fue transformada con los plásmidos indicados en la figura, y los transformantes se cultivaron en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono. A continuación se realizaron diluciones decimales seriadas a partir de suspensiones celulares (2×10^6 células/ml) obtenidas de los cultivos, y se sembraron gotas ($5 \mu\text{l}$, conteniendo, según la dilución, 10^4 , 10^3 , 10^2 y 10^1 células) en galactosa para sobreexpresar en fusión a GST los fragmentos de *SKM1* descritos gráficamente. Las placas se incubaron 62 horas a 28°C .

DL454 (*slt2*) y JBY10 (*hog1*). La persistencia del fenotipo indicaba que no era resultado de la hiperactivación de alguna de estas rutas individualmente.

A continuación, se subclonó en el mismo vector de expresión inducible por galactosa pEG(KG) y en fusión a GST el ORF completo de *SKM1* obtenido por PCR –obteniéndose el plásmido pKGSKM1- y se repitieron los anteriores ensayos de sobreexpresión. No hubo diferencia apreciable en el

fenotipo morfológico observado en las células, lo que llevó a concluir que la pérdida de los primeros nueve aminoácidos de la proteína –pertenecientes al dominio PH- no era la causante de las alteraciones morfológicas causadas por la sobreexpresión.

3.2. Sobreexpresión de distintos fragmentos de *Skm1*.

Para determinar el dominio de *Skm1* responsable de las alteraciones morfológicas

producidas por la sobreexpresión de la proteína, se realizaron delecciones parciales del ORF de *SKM1* que se subclonaron en el vector pEG(KG) para ser expresadas en fusión a GST (Figura 5). Mientras que la sobreexpresión de *Skm1* completa en la cepa 1783 conducía al fenotipo ya comentado y a una ligera disminución del crecimiento, la sobreproducción de diferentes fragmentos del extremo N-terminal no causaba efecto alguno en la morfología o en el crecimiento; sin embargo, la sobreexpresión del dominio catalítico quinasa desde el plásmido pGSTK7 resultaba letal, y en la morfología de las células predominaban, con mucho, las formas grandes, redondeadas y sin yemas. La tinción con yoduro de propidio reveló los múltiples núcleos que contenían estas grandes células (Figuras 3 y 4). Para comprobar si el efecto se debía a la actividad catalítica quinasa de este fragmento de *Skm1*, se realizó una delección que le privaba de los subdominios IX, X y XI de proteína quinasa, y pudo observarse que la sobreexpresión de este nuevo fragmento no producía alteración alguna (Figura 5). Todos estos resultados parecen confirmar el propuesto efecto inhibitorio de la actividad quinasa que ejerce el extremo N-terminal en las proteínas PAK. Por último, para eliminar la posible influencia de GST en el efecto, se sobreexpresó el dominio quinasa de *Skm1* desde el plásmido pYES2, inducible por galactosa, y se comprobó que el fenotipo morfológico producido seguía siendo el mismo y la parada de crecimiento similar (Figura 5).

3.3. Sobreexpresión del alelo *Skm1K406A*, catalíticamente inactivo.

Existía la posibilidad de que la sobreexpresión de un alelo inactivo en la capacidad quinasa de *Skm1* fuera capaz de secuestrar a sus sustratos en la célula, pero no los fosforilara, provocando así defectos fisiológicos que pondrían más claramente de manifiesto el papel de esta proteína PAK en la biología de la célula. Se procedió, por tanto, a la sobreexpresión, desde el plásmido inducible por galactosa pEG(KG), de la fusión a GST del alelo *skm1^{K406A}* que, al sufrir el cambio de lisina por alanina en la posición 406 (en

el subdominio II de proteína quinasa) debe comportarse como un alelo inactivo catalíticamente, como se ha demostrado en otras quinasa, como *Slk2* (Martín y col., 1993). Este alelo *skm1^{K406A}* se obtuvo por PCR solapante a partir de los oligonucleótidos U-KG-SK, L-KG-SK y los oligonucleótidos que incorporan la mutación U-SK-KD y L-SK-KD. La presencia de esta única mutación en el producto de PCR se comprobó mediante secuenciación utilizando el oligonucleótido SKM1-MUT. Se comprobó mediante “Western blotting” que dicha mutación no afectaba a la estabilidad de la proteína (Figura 6).

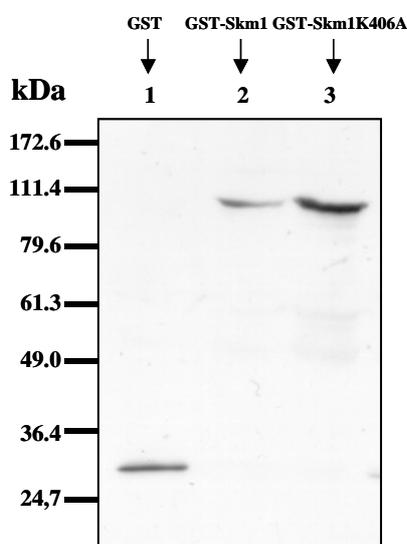


Figura 6. Expresión de las proteínas de fusión GST-*Skm1* y GST-*Skm1K406A* comprobada por “Western-blotting”. “Western blot” realizado con anticuerpos anti-GST sobre extractos de células crecidas a 28°C hasta fase exponencial en medio mínimo con rafinosa como fuente de carbono, añadiendo a continuación al medio de cultivo galactosa hasta alcanzar la concentración de 2% para inducir la expresión del promotor de *GALI*, bajo cuyo control se expresan las fusiones a GST en el plásmido pEG(KG). La cepa 1783 fue transformada con los vectores pEG(KG) (1), pKGSKM1 (2) y pKGSKM1-KD (3).

Sin embargo, la sobreexpresión de este alelo en presencia de galactosa no produjo fenotipo

morfológico aberrante alguno ni alteración en el crecimiento. Estos datos sirvieron para corroborar que el efecto morfológico producido por la sobreexpresión de Skm1 completo se debía a su actividad quinasa

3.4. Estudio de la viabilidad de las yemas producidas por la sobreexpresión de Skm1.

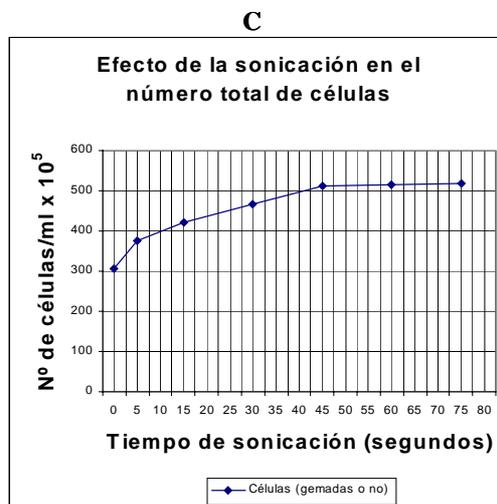
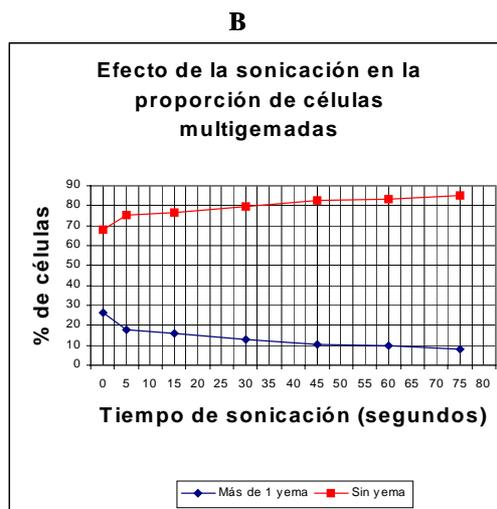
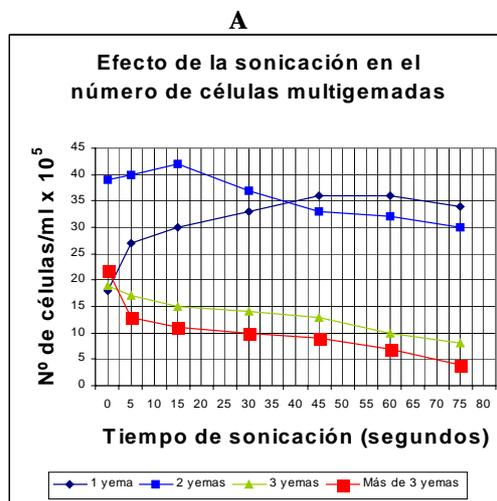
Con el fin de comprender mejor este fenotipo morfológico de sobreexpresión, se realizaron estudios estadísticos del porcentaje de células multigemadas y de su número de yemas. Para saber más acerca de la naturaleza de las yemas, se procedió a estudiar la intensidad de la unión de éstas a la célula madre –lo que nos informaría acerca del grado de septación al que han llegado- y al estudio de su viabilidad cuando son separadas de la madre mediante dos métodos: sonicación leve y micromanipulación.

3.4.1. Sonicación.

Se consideró que un método adecuado para

Figura 7. Efecto de la sonicación sobre las células multigemadas producidas por la sobreexpresión de SKM1. Se transformó la cepa 1783 con el plásmido pKGSKM1. Los transformantes se cultivaron a 28°C durante dos días en medio líquido con galactosa para inducir la formación de células multigemadas. Se tomaron muestras que se sometieron a sonicación leve (3 micrones) en un sonicador MSE Soniprep 150 durante períodos de tiempo crecientes. A continuación se contaba al microscopio el número de células independientes y su número de yemas tras cada sonicación. Con estos datos se realizaron las gráficas que representan (A) el número de células gemadas de cada tipo (una, dos, tres o más yemas), (B) el tanto por ciento de células multigemadas o sin yema y (C) el número total de células (considerando como unidad celular una célula con sus yemas), todo ello frente al tiempo de sonicación.

valorar el grado de formación del septo entre madre e hija sería someter a las células multigemadas a una sonicación leve. La sonicación constituye una agresión mecánica a la pared, de manera que las células con una pared celular debilitada o frágil presentan mayor sensibilidad al tratamiento. La



sensibilidad a sonicación se puede emplear para detectar mutantes de levadura afectados en la pared celular, como se ha demostrado en nuestro Departamento (Ruiz y col., 1999). Nuestro interés en esta técnica se basaba en que si las yemas eran capaces de separarse de la madre bajo una sonicación mínima, esto indicaría que el tabique intercelular estaría lo suficientemente formado.

Para determinar ésto, se transformó la cepa 1783 con el plásmido pKGSKM1, que sobreexpresa en presencia de galactosa la proteína Skm1 en fusión a GST y como control se utilizó la cepa transformada con pEG(KG). El procedimiento fue el siguiente: los transformantes se cultivaron a 28°C durante dos días en medio líquido con galactosa para inducir la formación de células multigemadas. A partir de este momento se tomaron muestras y se procedió a su sonicación a intensidad muy leve (3 micrones) y a distintos tiempos (desde 0 a 75 segundos). A continuación se contaba el número de células independientes que se podían observar al microscopio tras cada sonicación, y se sembraban por extensión diferentes volúmenes del cultivo sonificado en placas de YPD con el fin de comprobar si el número de células contadas se correspondía con el número de colonias crecidas en cada placa.

La **Figura 7A** nos muestra en primer lugar el número de células con una, dos, tres o más de tres yemas que encontramos en el cultivo crecido en galactosa durante dos días antes de sonificarlo, es decir, a tiempo cero. Se aprecia la predominancia de las células con dos yemas, aproximadamente el doble que las células con tan sólo una yema. Las células con tres o con más de tres yemas (grupo que engloba a células con cuatro, cinco, seis, siete e incluso hasta ocho yemas) aparecen aproximadamente en la misma proporción que la de células con una yema. Al comenzar la sonicación, tan sólo a los cinco segundos a intensidad mínima ya se aprecia una brusca bajada de las células con más de tres yemas y una disminución más ligera de las células con tres yemas, acompañadas de un aumento de las células con una sola yema y una ligera subida de las células con dos yemas – como consecuencia de la separación de yemas de células multigemadas-

El proceso se mantiene en esta línea hasta los 15 segundos de sonicación, momento a partir del cual las células que se han ido acumulando con dos yemas, también comienzan a disminuir mientras a cambio continúan su progresivo aumento las células con una sola yema. La pérdida de yemas sigue acumulando células con una sola yema hasta los 60 segundos, ya que a partir de entonces la sonicación comienza a separar también esta única yema de su célula madre.

En conjunto se puede apreciar que a tiempos muy bajos de sonicación (5, 10 segundos), el proceso ya afecta a las células gemadas, provocando fácilmente la separación de las yemas y aumentando con rapidez el número de células sin yema y el número total de células (**Figuras 7B y 7C**). Esto parece indicar que en las células multigemadas el proceso de septación entre madre e hija está completamente finalizado.

Por otra parte, se sembraron por extensión en placas de medio rico diferentes volúmenes de los cultivos sonificados. El número de colonias que crecieron en estas placas al cabo de tres días de incubación a 28°C fue muy inferior al número de células individuales sembradas, lo que hizo pensar que posiblemente las yemas, al ser separadas de la madre, no eran capaces de sobrevivir. Para comprobar que la falta de viabilidad no se debía al proceso de sonicación se realizó el siguiente ensayo de separación por micromanipulación.

3.4.2. Micromanipulación.

Paralelamente al experimento anterior se procedió a la separación de las yemas de células multigemadas mediante micromanipulación. Se pudo comprobar que esta separación no presentaba ninguna dificultad, lo que confirmó que la formación del septo estaba completada, pero sin embargo, las yemas separadas de la madre eran incapaces de formar una colonia en medio rico, es decir, no eran viables.

4. BÚSQUEDA DE PROTEÍNAS QUE INTERACCIONEN CON Skm1 MEDIANTE EL SISTEMA DE “DOS HÍBRIDOS”.

Como orientación para el estudio del papel de Skm1 recurrimos a la búsqueda de proteínas que interaccionaran físicamente con ella en la célula. Para ello se utilizó el sistema conocido como de “dos híbridos” o “doble híbrido”.

Skm1 ha sido incluida dentro de la familia de proteínas PAK (ver “Introducción” y “Antecedentes y Objetivos”) por cumplir dos requisitos: poseer un dominio catalítico serín-treonín-quinasa que presenta alta homología con los de los miembros de esta familia, y contener en su extremo N-terminal una zona de alta homología con el dominio CRIB del resto de proteínas PAK. Este dominio CRIB (de “Cdc42-Rac-Interactive-Binding”) es el responsable de que las proteínas de la familia PAK interaccionen físicamente con la GTPasa Cdc42 (y además con Rac en mamíferos), convirtiéndose mediante esta interacción en posibles efectores de ésta. Además, la sobreexpresión de Skm1 provoca un fenotipo morfológico muy similar al provocado por la sobreexpresión de Cdc42 o de algunos alelos activados de ésta, lo que parecía implicar a ambas proteínas en alguna función o ruta común. Por tanto, el primer objetivo en la búsqueda fue determinar si la proteína PAK Skm1 interaccionaba efectivamente con Cdc42 y se podía considerar, por tanto como un posible efector de la GTPasa y quizá mediador de alguna de las múltiples funciones de esta proteína en crecimiento polarizado, transmisión de señales u organización del citoesqueleto. En segundo lugar, también se buscaron otras proteínas que interaccionaran tanto con el extremo N-terminal de Skm1 como con el C-terminal, mediante el rastreo de genotecas específicas del sistema “dos híbridos”.

Se ensayaron en paralelo tres sistemas de “dos híbridos” diferentes: un sistema que se basa en la proteína LexA, y dos sistemas que utilizan el factor de transcripción Gal4, el último de ellos basado en el apareamiento de dos cepas hospedadoras (ver “Materiales y Métodos”).

4.1. Estudio de la interacción entre Skm1 y Cdc42.

Cdc42 es una proteína que sufre una prenilación en la cisteína del motivo CAAX de su extremo C-terminal, y esta prenilación ancla a la GTPasa en la membrana plasmática. Esto supone un problema para la detección por “dos híbridos” de interacciones con Cdc42, ya que el sistema exige que el complejo de las dos proteínas que interaccionan se transloque al núcleo para allí activar la transcripción del gen “reporter”. A pesar de que las fusiones proteicas contienen señales de localización nuclear para facilitar esta translocación, el hecho de que una de ellas esté anclada a la membrana puede causar problemas en la detección. Por otra parte, se ha descrito que las interacciones de las proteínas PAK con Cdc42 son mucho más fuertes cuando la GTPasa se encuentra en su estado activo, unido a GTP. Para evitar el primer problema, se obtuvo por PCR un alelo *cdc42*^{ΔCt} que ha perdido sus cuatro últimos aminoácidos, entre ellos la cisteína que se prenila, con lo que se evita su unión a membrana. Para solucionar el segundo problema, se obtuvieron fusiones con el alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V}, que estabiliza permanentemente la forma de la GTPasa unida a GTP. Para estudiar la especificidad de la posible interacción entre la proteína PAK y la GTPasa tipo Rho Cdc42 se utilizaron alelos no prenilables de la GTPasa Rho1 y de la GTPasa tipo Ras Bud1.

Se obtuvieron, por tanto, las fusiones de diferentes fragmentos de la proteína Skm1 al dominio de unión a DNA del factor de transcripción de cada uno de los sistemas de “dos híbridos”, LexA o Gal4 (**Figura 8**): la mitad N-terminal de Skm1 (aminoácidos 10-248), la mitad C-terminal de Skm1 (aminoácidos 249-585) y un fragmento del extremo N-terminal más restringido al dominio CRIB (aminoácidos 109-184; el dominio CRIB lo constituyen los aminoácidos 123-179). Por otra parte, se consiguieron las fusiones de los distintos

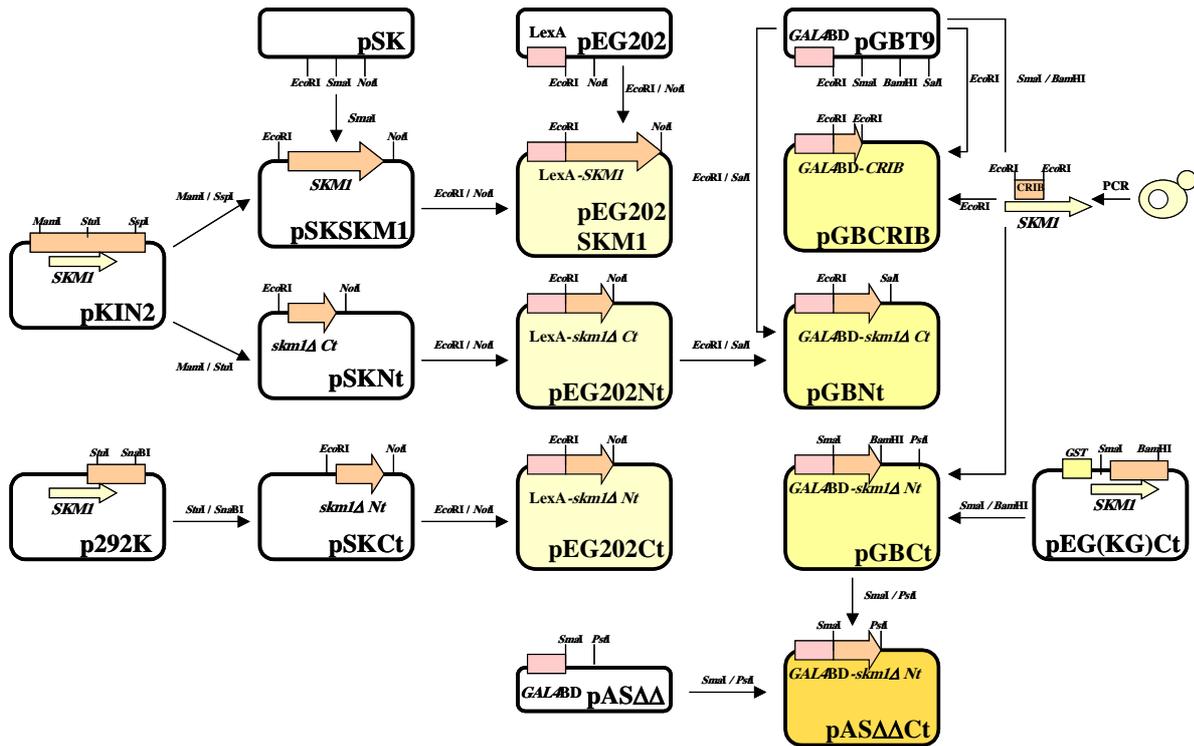


Figura 8. Obtención de las fusiones de distintos fragmentos de *SKM1* a los dominios de unión a DNA de los distintos sistemas de interacción por “dos híbridos” ensayados.

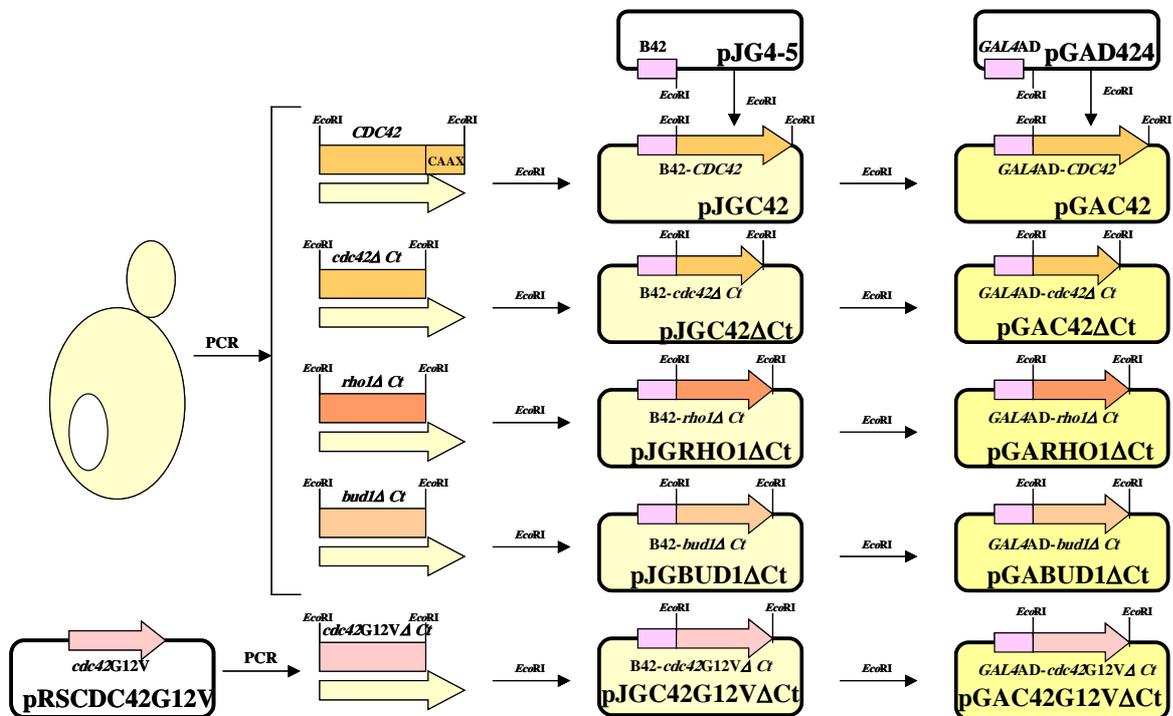


Figura 9. Obtención de las fusiones de distintos genes y alelos mutados de GTPasas a los dominios de activación transcripcional de los distintos sistemas de interacción por “dos híbridos” ensayados.

alelos de Cdc42 al dominio de activación transcripcional del factor de transcripción utilizado en cada uno de los sistemas, B42 o Gal4 (**Figura 9**): Cdc42 silvestre, el alelo *cdc42*^{ΔCt} (no prenilable), el alelo *cdc42*^{G12VΔCt} (hiperactivo y no prenilable) y los alelos *rho1*^{ΔCt} y *bud1*^{ΔCt} (no prenilables)

4.1.1. Sistema basado en LexA.

Utilizando este sistema se observó que, en todos los casos, incluso en los controles negativos, se producía un apreciable crecimiento en medio sin leucina y coloración azul en presencia de X-Gal, que variaban en intensidad al repetir el ensayo en los mismos transformantes. Estos problemas se achacaron a una elevada transcripción basal del gen *LEU2* y a que el gen *lacZ* fuera portado por un plásmido episómico, en lugar de encontrarse integrado en el genoma. La falta de reproducibilidad en los resultados obligó a cambiar de sistema.

4.1.2. Sistema basado en Gal4.

Este sistema se caracteriza por no ser tan sensible como el anterior y por sólo detectar interacciones relativamente intensas. El hecho de que, en este caso, la β-galactosidasa no se expresara desde un plásmido multicopia hacía confiar más en la reproducibilidad de los resultados (**Figura 10**). La cepa HF7c fue cotransformada con los plásmidos que expresan el extremo N-terminal o el dominio CRIB de Skm1, por un lado, y con los plásmidos que expresan cada uno de los alelos de las proteínas GTPasas. Se utilizaron los plásmidos sin inserto y los plásmidos con insertos subclonados en la orientación inversa como controles negativos. Como control positivo, se cotransformó la cepa con plásmidos que expresan las fusiones de Mkk1 y Slt2 al dominio de unión a DNA y al dominio activador transcripcional de Gal4, respectivamente, ya que la interacción por “dos híbridos” entre estas dos proteínas está bien descrita y es relativamente intensa (Soler y col., 1995).

El resultado obtenido fue el siguiente (**Figura 11**): tan sólo hubo crecimiento sin

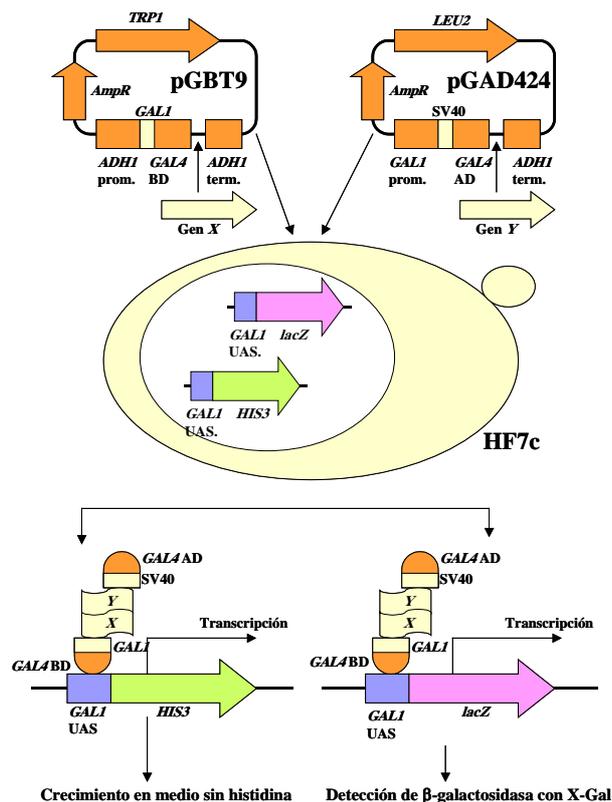
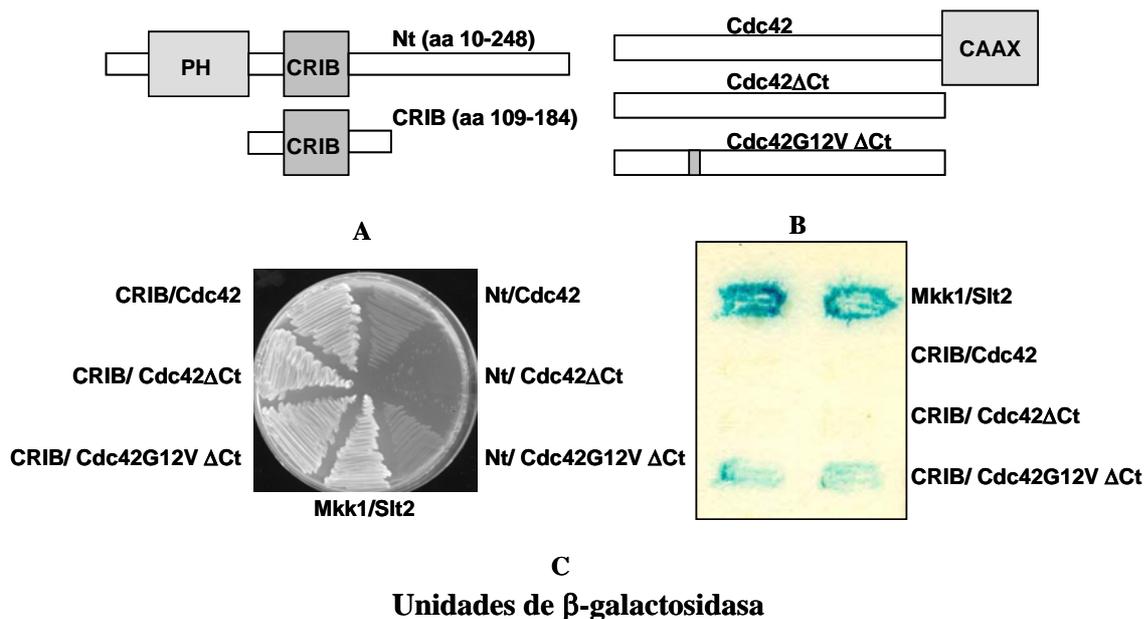


Figura 10. Esquema del sistema de “dos híbridos” basado en el factor de transcripción Gal4. “BD” y “AD” significan, respectivamente, “binding domain” y “activation domain”. Gal1 y SV40 representan las señales de localización nuclear de Gal1 y del virus SV40, respectivamente.

histidina de las cepas que expresaban el fragmento de Skm1 que contenía el dominio CRIB y cada uno de los alelos de *CDC42*, además del control positivo Mkk1-Slt2. De todos estos transformantes se realizó un ensayo de réplica en filtro con X-Gal, observándose coloración azulada tan sólo en el control positivo y en la cepa que expresaba el dominio CRIB y el alelo hiperactivo y no prenilable *cdc42*^{G12VΔCt}. En el ensayo de valoración cuantitativa de β-galactosidasa utilizando ONPG como sustrato cromogénico, se pudo comprobar que el control positivo presentaba 11.1 unidades de Miller y la interacción dominio CRIB- *cdc42*^{G12VΔCt}, 3.7 unidades de Miller, es decir, una intensidad tres veces menor. Los ensayos de detección de β-galactosidasa se realizaron también en la cepa Y526,



BD \ AD	Slt2	Cdc42	Cdc42 Δ Ct	Cdc42G12V Δ Ct
Mkk1	11.1	-	-	-
CRIB	-	0.13	0.16	3.7
Nt	-	0.02	0.046	0.046

Figura 11. Interacción detectada mediante el sistema “dos híbridos” del dominio CRIB de Skm1 con el alelo Cdc42G12V Δ Ct. (A) Crecimiento en medio sin histidina de la cepa HF7c transformada con los plásmidos (en el sentido de las agujas del reloj): pGBNt y pGAC42; pGBNt y pGAC42 Δ Ct; pGBNt y pGAC42G12V Δ Ct; pGBMKK1 y pGASLT2; pGBCRIB y pGAC42G12V Δ Ct; pGBCRIB y pGAC42 Δ Ct; pGBCRIB y pGAC42. (B) Ensayo de actividad β -galactosidasa por réplica en filtro con X-Gal de la cepa HF7c transformada con los plásmidos (de arriba a abajo): pGBMKK1 y pGASLT2; pGBCRIB y pGAC42; pGBCRIB y pGAC42 Δ Ct; pGBCRIB y pGAC42G12V Δ Ct. (C) Valoración cuantitativa de la actividad β -galactosidasa sobre el sustrato ONPG de todos los transformantes indicados. Se utilizó el transformante pGBMKK1 pGASLT2 como control positivo de interacción.

que presenta como gen “reporter” sólo a *lacZ*, llegándose a resultados similares. En ningún caso se detectó interacción con el resto de GTPasas (Rho1 o Bud1), lo que parece indicar una especificidad de interacción hacia la GTPasa Cdc42.

Por otra parte, se ha descrito la interacción de ciertos dominios PH con el dominio pseudosustrato de algunas isoformas de PKC en células de mamífero (Yao y col., 1997), por lo que presentaba interés comprobar la posibilidad de interacción entre el dominio PH aminoterminal de Skm1 y Pkc1. También se ha mostrado que parte del extremo

aminoterminal de las proteínas PAK, conteniendo el dominio CRIB, es capaz de interactuar por el sistema “dos híbridos” con el dominio quinasa de éstas, ejerciéndose así una acción autoinhibitoria.

Por tanto, se obtuvieron plásmidos que permitieran comprobar la posible interacción de los extremos N-terminal o C-terminal de Skm1 con un fragmento de Pkc1 en el que se encuentra el dominio pseudosustrato, sin obtenerse resultados positivos. También se estudió la posible interacción de los extremos aminoterminal y el dominio CRIB con el extremo carboxiterminal de Skm1, obteniéndose tan

sólo crecimiento en medio sin histidina, pero no coloración azul en presencia de X-Gal.

4.2. Búsqueda de otras proteínas que interaccionen con Skm1: rastreo de genotecas.

4.2.1. Sistema basado en LexA.

El rastreo de la genoteca pJG4-5.X sufrió de los problemas ya comentados para este sistema en cuanto a variabilidad en la expresión de los genes “reporter” y escasa reproducibilidad de los resultados, lo que motivó de nuevo el cambio de sistema.

4.2.2. Sistema basado en Gal4.

Se utilizó como cebo el plásmido que expresa el extremo N-terminal de Skm1 (aminoácidos 10-248) y se rastrearon tres genotecas, subclonadas en los vectores pGAD.1R, pGAD.2R y pGAD.3R, que permiten obtener todas las proteínas de fusión en los tres marcos de lectura posibles (ver “Materiales y Métodos”). La cepa elegida fue la HF7c (frente a la Y526) por la posibilidad de la doble selección de los clones positivos, primero por crecimiento en medio sin histidina y después, tras un ensayo en filtro con

X-Gal, por coloración azul (**Figura 12**). Rastreando unos 230.000 transformantes de cada genoteca se obtiene una representación superior al 95% de cada una de ellas (Chien y col., 1991).

Se rastrearon 250.000 transformantes de la primera genoteca, 350.000 de la segunda y 350.000 de la tercera. Se obtuvieron 72 transformantes que crecían en medio sin histidina y producían color azul con X-Gal. Para estar seguros de que la coloración azulada se debía a una interacción y no a un efecto activador de la fusión proteica procedente de la genoteca, se sembraron estos transformantes en medio rico durante varias generaciones para hacerles perder el plásmido cebo que expresaba el fragmento de Skm1. Una vez comprobada la pérdida de plásmido, se repitió el ensayo en filtro con X-Gal, conservando 66 de los transformantes la capacidad de producir coloración azulada, por lo que fueron descartados. De los 6 positivos restantes, se extrajo el plásmido y se comprobó por restricción si contenían algún inserto: dos de ellos no lo contenían, y al retransformarlos no consiguieron repetir la coloración azulada, por lo que también se descartaron. Los 4 restantes contenían insertos, y al ser retransformados confirmaban de nuevo la coloración azulada, por lo que sus insertos fueron

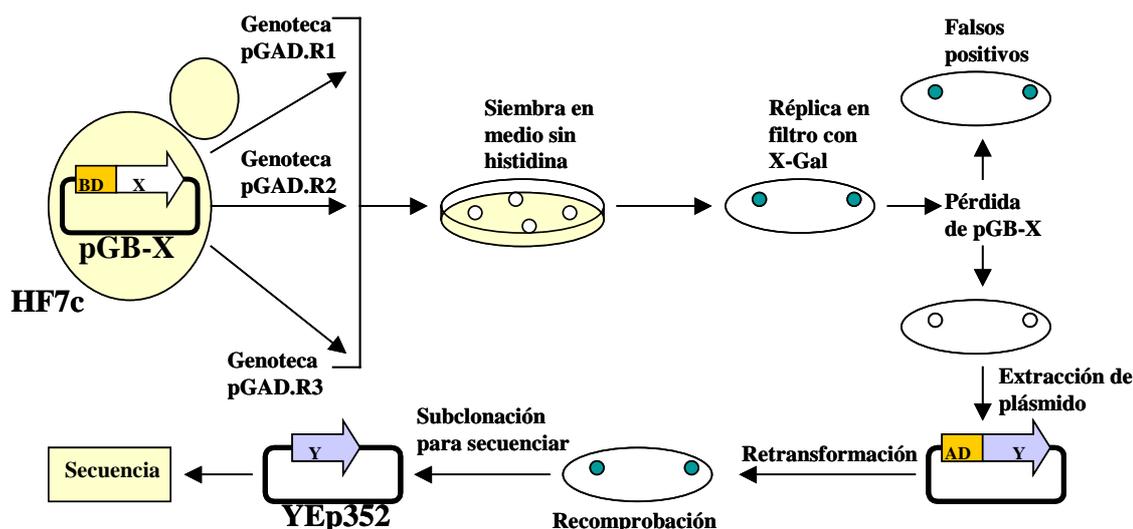


Figura 12. Esquema del rastreo de genotecas de “dos híbridos” en el sistema basado en el factor de transcripción Gal4.

subclonados en el vector YEp352 para su secuenciación. Ésta reveló que en los cuatro casos lo que se hallaba en fase con el dominio de activación transcripcional de Gal4 del plásmido no eran más que diferentes fragmentos de Gal4, todos ellos conteniendo su dominio de unión a DNA. Por ello, se consideraron como falsos positivos.

4.2.3. Sistema de apareamiento basado en Gal4.

El hecho de que la cepa HF7c presentara problemas de lento crecimiento y floculación que provocaban bajos rendimientos de transformación y de que las genotecas utilizadas se habían realizado a partir de una cepa de *S. cerevisiae* no delecionada en el gen *GAL4*, lo que multiplica los falsos positivos en el rastreo, condujo a escoger un nuevo sistema de dos híbridos, basado en el apareamiento entre dos

cepas (ver “Materiales y Métodos”). Mediante este último método se realizó la búsqueda de proteínas que interaccionaran con el extremo C-terminal de Skm1 (aminoácidos 249-585). Se rastrearon tres genotecas: Y2HL-C1, Y2HL-C2 e Y2HL-C3, de nuevo cada una con un marco de lectura diferente, necesiándose 1.000.000 de transformantes de cada una para obtener una representación superior al 95% (James y col., 1996). Se obtuvieron unos 8 millones de diploides a partir de la genoteca Y2HC1, 4 millones a partir de la Y2HC2 y 5 millones a partir de la Y2HC3. Las colonias que crecieron en el medio sin histidina y 3-amino-triazol (3-AT) 20 mM fueron muy numerosas, pero al realizarse el ensayo de sobrecapa con X-Gal, ninguna de ellas presentó coloración azulada, por lo que no se obtuvieron positivos.

5. ESTUDIO COMPARADO DE LOS FENOTIPOS DE SOBREENPRESIÓN DE *SKM1* Y *CDC42* EN DISTINTOS MUTANTES.

Una vez determinada la interacción por “dos híbridos” de Cdc42 con el fragmento N-terminal que contiene el dominio CRIB de Skm1 y, dado que el fenotipo morfológico de sobreexpresión de ésta última es similar al descrito para la sobreexpresión de Cdc42, nos pareció de interés realizar una comparación de los fenotipos de sobreexpresión de ambas proteínas, además de observar el fenotipo resultante de la sobreexpresión simultánea de ambas. Por otra parte, al ser consideradas las proteínas PAK como efectores de Cdc42, resultaba interesante comprobar si los efectos fenotípicos causados por la sobreexpresión de Cdc42 podían aliviarse en mutantes defectivos en cada una de estas proteínas. Por último, la alta homología existente entre las proteínas PAK nos condujo a investigar el fenotipo que se observaría al sobreexpresar Skm1 en estos mismos mutantes. Nuestros experimentos previos habían mostrado que la sobreexpresión de Cdc42 subclonado en el plásmido pEG(KG), bajo el control de un promotor inducible por galactosa, no mostraba ningún fenotipo diferenciable del silvestre. Achacamos ésto al hecho de que sobreexpresar Cdc42 silvestre no significaba amplificar su función,

por el hecho de que para ser activa, la GTPasa necesita de la unión a GTP. Por ello, para los experimentos de sobreexpresión siguientes, se sobreexpresó el alelo activado constitutivamente *cdc42^{G12V}*.

Por otra parte, nos pareció interesante observar el efecto de la sobreexpresión de Skm1 y de los dominios quinasas de las otras proteínas PAK en mutantes termosensibles *cdc42-1*. La mutación *cdc42-1* a temperatura restrictiva es letal, y la sobreexpresión de los dominios quinasas de las PAK también lo es, pero existía la posibilidad de que, en ausencia de su supuesto activador, Cdc42, la sobreexpresión de estos fragmentos de Skm1, Cla4 y Ste20 no resultara absolutamente letal; al contrario, quizá la sobreexpresión de éstos efectores de Cdc42 sería capaz de complementar, aunque ligeramente, la letalidad del mutante *cdc42-1* a 37°C.

Para realizar estos ensayos se dispuso de mutantes *skm1*, *ste20*, *cla4* y *ste20 cla4*, defectivos en las proteínas PAK; un mutante *ste11*, que sufre la pérdida de la señalización a través de las rutas de

feromonas, invasividad, SVG y en una de las ramas de la ruta de respuesta a alta osmolaridad; y de un mutante *cdc42-1*, letal a 37°C. Se sobreexpresaron el gen *SKM1*, el alelo hiperactivo de Cdc42 *cdc42^{G12V}* y los dominios quinasa de las proteínas PAK desde los plásmidos pEG(KG) –con marcador de auxotrofia *URA3*- y pEG(KGH) –con marcador de auxotrofia *HIS3*- dependiendo del marcador que resultara útil en cada cepa. Como controles se utilizaron los plásmidos sin inserto, que expresan GST. Los transformantes se cultivaron en placas conteniendo galactosa al 2% y rafinosa al 1% durante 72 horas (la rafinosa no produce el efecto represor de la glucosa sobre los genes que se expresan en presencia de galactosa y permite un crecimiento más rápido que el que proporciona la galactosa como única fuente de carbono), observándose los siguientes resultados:

5.1. Sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* y *Skm1* en células silvestres.

En las cepas silvestres YPH499, EG123 y SEY6211, isogénicas de los mutantes utilizados, y salvo pequeñas diferencias individuales, la sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* condujo a una inhibición muy acusada del crecimiento acompañada de un fenotipo morfológico en el que predominaban las células grandes, redondas y multigemadas (tipo morfológico 1), acompañadas por otras grandes, redondas y sin yemas aparentemente muy afectadas (tipo morfológico 2) (**Figura 13**) -ambos fenotipos morfológicos son similares a los previamente descritos para la sobreexpresión de *Skm1* completo y de su dominio quinasa, respectivamente-. La sobreexpresión de *Skm1* en estas cepas condujo a un fenotipo similar al comentado anteriormente para el fondo genético 1783 (predominancia del tipo morfológico 1). La cosobreexpresión de *cdc42^{G12V}* y *SKM1* produjo una completa inhibición del crecimiento, con un fenotipo morfológico único de células redondas sin yemas y muy afectadas (tipo morfológico 2), lo que parece indicar un efecto sumatorio o intensificador del fenotipo causado por la sobreexpresión de cada proteína por separado (**Figura 14**).

5.2. Sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* y *Skm1* en mutantes en los genes de las proteínas PAK.

5.2.1. En mutantes *ste20*.

Como se muestra en la **Figura 14**, en los mutantes *ste20*, el fenotipo de sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* parece similar al de su cepa isogénica silvestre, presentando parecidos fenotipos de crecimiento y morfológico (mezcla de los tipos morfológicos 1 y 2). Sin embargo, los defectos morfológicos parecen ligeramente menos drásticos que en la cepa silvestre: también células grandes, redondas y multigemadas acompañadas de grandes células sin yemas, pero el número de ambas parece ligeramente menor, en especial en el caso de las células sin yemas. Esto quizá indica que una pequeña parte del efecto producido por esta sobreexpresión es mediado por *Ste20*. La sobreexpresión de *Skm1* presentó similar fenotipo al de la célula silvestre (predominancia del tipo morfológico 1). No pudo realizarse la cosobreexpresión por un problema de marcadores de auxotrofia.

5.2.2. En mutantes *skm1*.

En los mutantes *skm1* la sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* y la de *Skm1* condujo a igual fenotipo que en la cepa silvestre (**Figura 14**). Tampoco aquí, por el mismo motivo, pudo realizarse la cosobreexpresión.

5.2.3. En mutantes *cla4*.

En mutantes *cla4*, que presentan un fenotipo morfológico de células con yema alargada (**Figuras 13 y 14**), la sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* condujo a la casi total parada de crecimiento y a una mezcla de fenotipos: el típico de *cdc42^{G12V}* (mezcla de tipos morfológicos 1 y 2) y el de *cla4*. La sobreexpresión de *Skm1* en mutantes *cla4*, sin embargo, condujo a la casi total desaparición del fenotipo *cla4* de yemas alargadas y a su sustitución por el típico de *Skm1* de células grandes y redondas multigemadas (predominancia del tipo morfológico 1). La cosobreexpresión de *Skm1* y *cdc42^{G12V}* en estos

mutantes inhibió el crecimiento por completo, siendo la morfología celular más observada la de las células redondas, sin yemas y muy afectadas (tipo morfológico 2), con el fenotipo *cla4* prácticamente desaparecido (Figuras 13 y 14).

Los mutantes *hsl7* presentan un fenotipo de yemas alargadas similar al de *cla4* (Figura 13). La proteína Hsl7 cumple un papel fundamental en el punto de control o “checkpoint” morfogénico, que,

una vez superado, permite el paso de crecimiento polarizado a isotrópico en la yema. La proteína PAK Cla4 también se ha relacionado con este proceso (ver “Introducción”). Es interesante destacar que la sobreexpresión de Skm1 provoca en mutantes *hsl7* el mismo efecto que sobre mutantes *cla4*, es decir, la desaparición del fenotipo de yemas alargadas y su sustitución por el que hemos dado en llamar tipo morfológico 1 de células grandes y multigemadas.

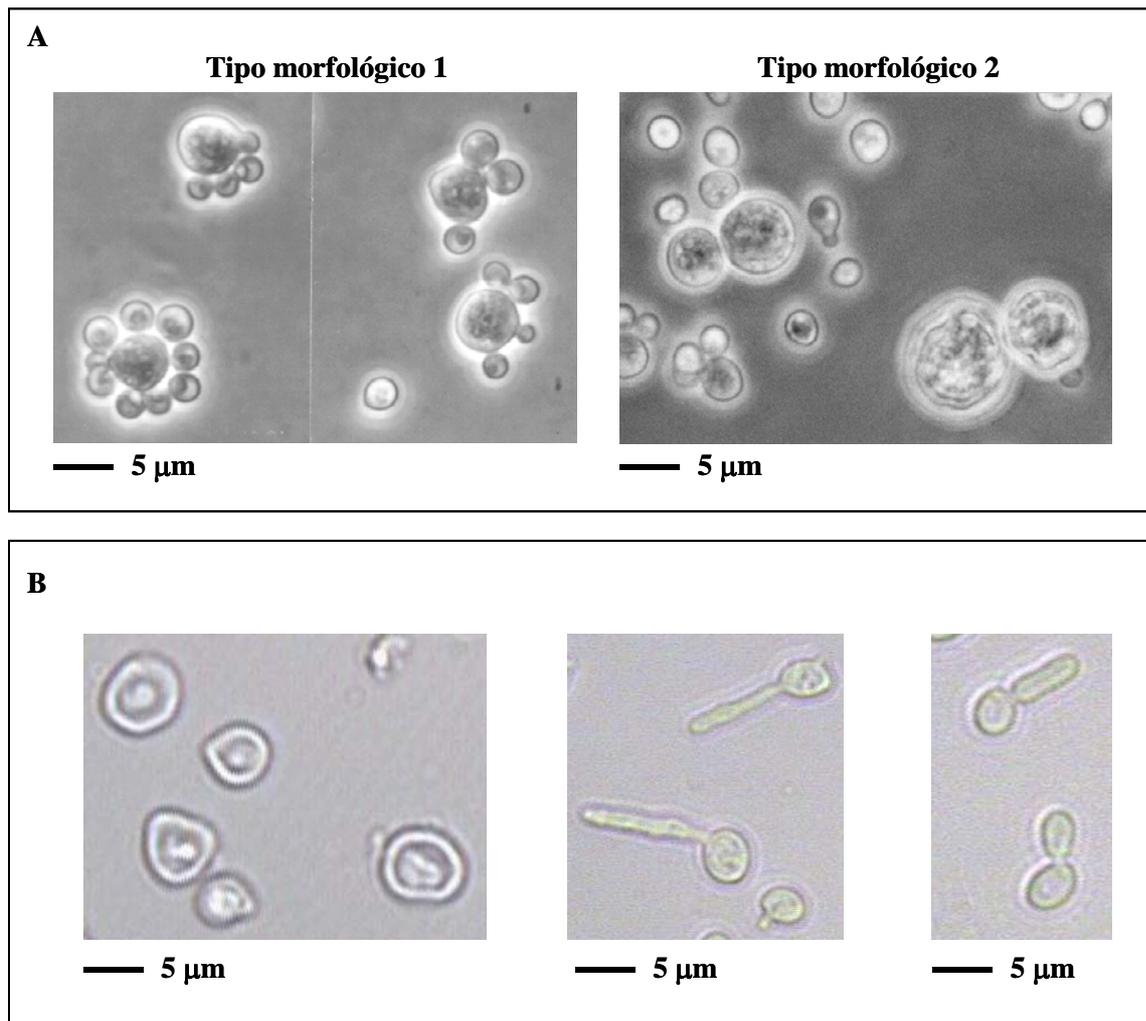


Figura 13. Fenotipos observados en la sobreexpresión de *SKM1* y *cdc42^{G12V}* y en los mutantes *cdc42-1*, *cla4* y *hsl7*. (A) Cepa 1783 transformada con el plásmido pKGSKM1 e incubada a 28°C durante 72 horas en medio con galactosa para inducir la sobreexpresión de *SKM1* (tipo morfológico 1) o transformada con el plásmido pKGC42G12V e incubada en las mismas condiciones para sobreexpresar el alelo *cdc42^{G12V}* (tipo morfológico 2). Como se indica en el texto, los fenotipos de sobreexpresión 1 y 2 se observan tanto en la sobreexpresión de *SKM1* como en la de *cdc42^{G12V}*, si bien en la de *SKM1* es muy predominante el 1 y en la del alelo *cdc42^{G12V}* se aprecia una mezcla más igualada de ambos. (B) Morfología de cepas DJTD2-16D (*cdc42-1*) a 37°C, HM43 (*cla4*) y FSII017-01B(A) (*hsl7*).

5.2.4. En mutantes *ste20 cla4*.

La cepa mutante *ste20 cla4* utilizada portaba en un plásmido el alelo termosensible *cla4-75*, ya que el doble mutante es letal. A 37°C la sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* condujo a un fenotipo similar al obtenido con el mutante *cla4* (mezcla del fenotipo *cla4* y los tipos morfológicos 1 y 2). La sobreproducción de Skm1, una vez más, hizo desaparecer casi completamente el fenotipo de

mutantes *cla4* (siendo el tipo morfológico 1 el predominante), aunque no consiguió evitar la inhibición del crecimiento del doble mutante *ste20 cla4* a 37°C (Figura 14).

5.3. Sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* y Skm1 en mutantes *ste11*.

En la cepa mutante *ste11* se produjo un fenómeno parecido al observado con mutantes *ste20*:

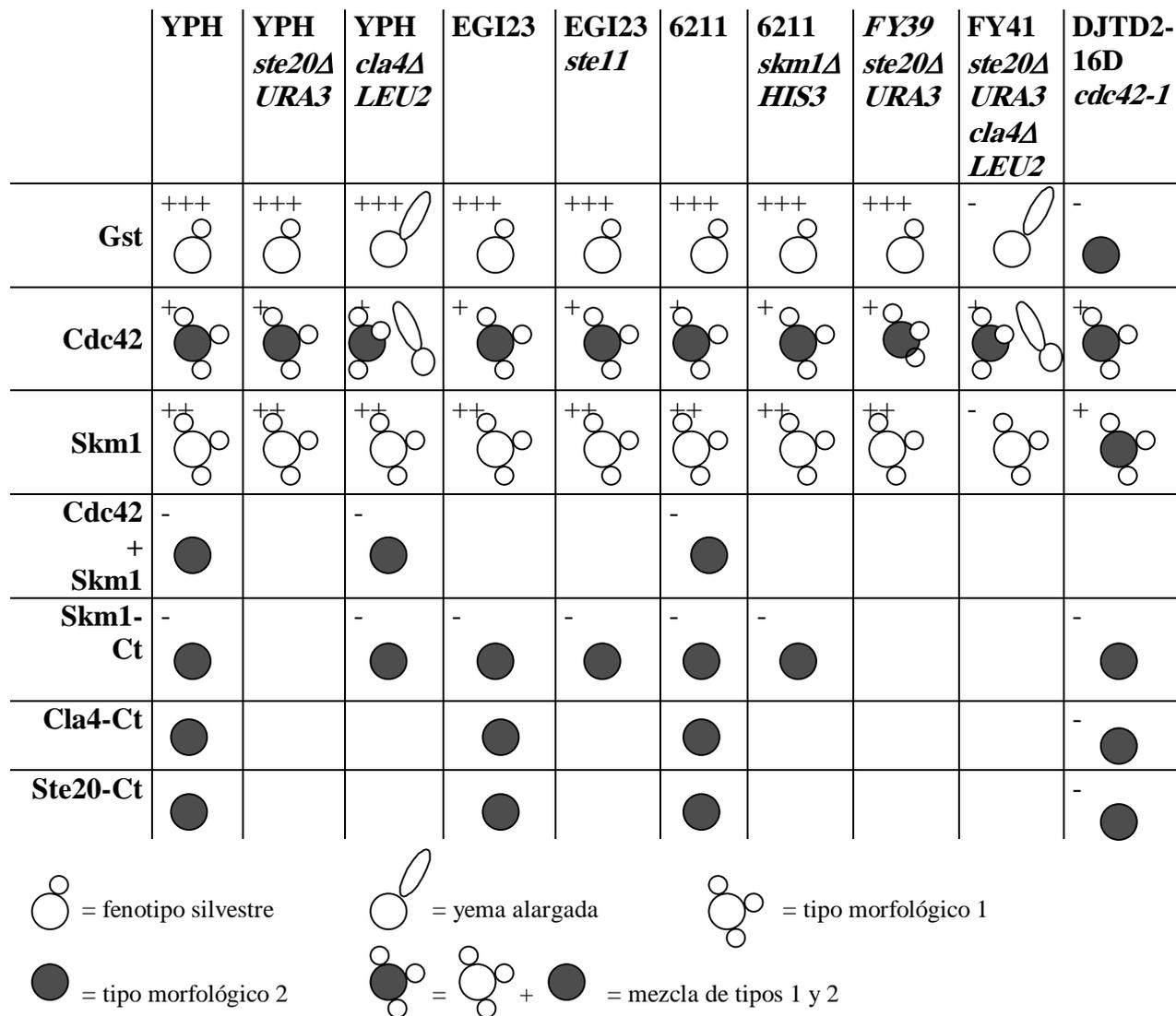


Figura 14. Grado de crecimiento y morfología predominante en diversos mutantes que sobreexpresan el alelo *cdc42^{G12V}*, *SKM1* o los dominios quinasas de las tres proteínas PAK. Todos los transformantes se cultivaron en placas que contenían galactosa a una concentración de 2% y rafinosa al 1% durante 72 horas a 28°C o, en el caso de las cepas termosensibles FY41 y DJTD2-16D, a 37°C.

un ligero alivio del fenotipo de sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* (mezcla de tipos morfológicos 1 y 2), con ligera disminución del número de células grandes y sin yemas. De nuevo, este resultado parece apuntar a que la transmisión de la señal a través de las rutas de respuesta a feromonas, invasividad o SVG y, quizá también de la ruta de respuesta a alta osmolaridad (Ste11, al igual que Ste20, está implicado en una de sus ramas) cumple algún papel, aunque pequeño, en la producción de este fenotipo. La sobreexpresión de Skm1 condujo al fenotipo acostumbrado (predominancia del tipo morfológico 1) (Figura 14).

5.4. Sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* y Skm1 en el mutante *cdc42-1*.

En el mutante termosensible *cdc42-1*, a 37°C la sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* condujo al fenotipo típico (mezcla de tipos morfológicos 1 y 2) y a una ligera mejoría en la capacidad de crecimiento de este mutante. La sobreexpresión de Skm1, curiosamente, condujo a un fenotipo muy similar (mezcla de tipos morfológicos 1 y 2), incluyendo también una ligera complementación que permitió crecer débilmente al mutante a 37°C (Figura 15), y que nos permite especular sobre un posible papel de Skm1 como efector de Cdc42.

5.5. Sobreexpresión de los dominios quinasas de las proteínas PAK.

Por último, la sobreexpresión de los dominios quinasas de las tres proteínas PAK condujo en todos los mutantes descritos a una inhibición total del crecimiento y una morfología de células grandes, redondas, sin yemas y muy afectadas (tipo morfológico 2) (Figura 14).

La similitud en la morfología de las células que sobreexpresan los dominios quinasas de cada una de las tres proteínas PAK sugería que estas quinasas, desreguladas al haber perdido sus extremos N-terminales inhibitorios, podrían sufrir una alteración en su especificidad de sustrato y estar activando los mismos efectores. Para comprobar ésto se estudió si la sobreexpresión inducida por galactosa de la proteína Skm1 completa o de su dominio quinasa eran capaces de complementar el defecto de apareamiento de una cepa *ste20Δ*. Como se observa en la Figura 16A, el alelo truncado de *SKM1* restauró la capacidad de apareamiento del mutante, mientras que *SKM1* completo permitió una complementación mucho menor. Como se aprecia, los diploides sólo se forman en galactosa, lo que indica que el apareamiento depende de la

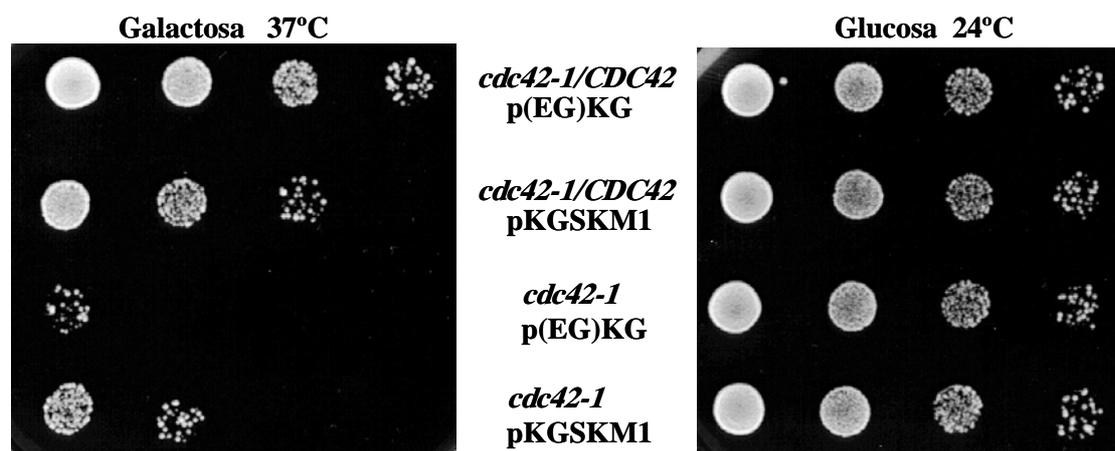


Figura 15. Efecto de la sobreexpresión de *SKM1* en el crecimiento de un mutante *cdc42-1*. Crecimiento de diluciones decimales seriadas a partir de suspensiones celulares (2×10^6 células/ml) obtenidas de cultivos de la cepa DJTD2-16D (*cdc42-1*) sobreexpresando GST o GST-*SKM1* en galactosa a 37°C (izquierda) y sin sobreexpresar en glucosa a 24°C (derecha). Se utilizó como “silvestre” la misma cepa transformada con el plásmido centromérico pRS315CDC42.

sobreexpresión de los alelos de *SKM1*. Para evitar el efecto letal de la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1, se limitó el período de tiempo de apareamiento en galactosa. También se realizó un ensayo cuantitativo para comparar la capacidad de apareamiento de estos transformantes (**Figura 16B**):

mientras que el mutante *ste20* transformado con el plásmido control no produce diploides y el mutante transformado con el alelo completo *SKM1* presenta una muy baja eficiencia de apareamiento, el alelo truncado incrementa la frecuencia de apareamiento más de 300 veces.

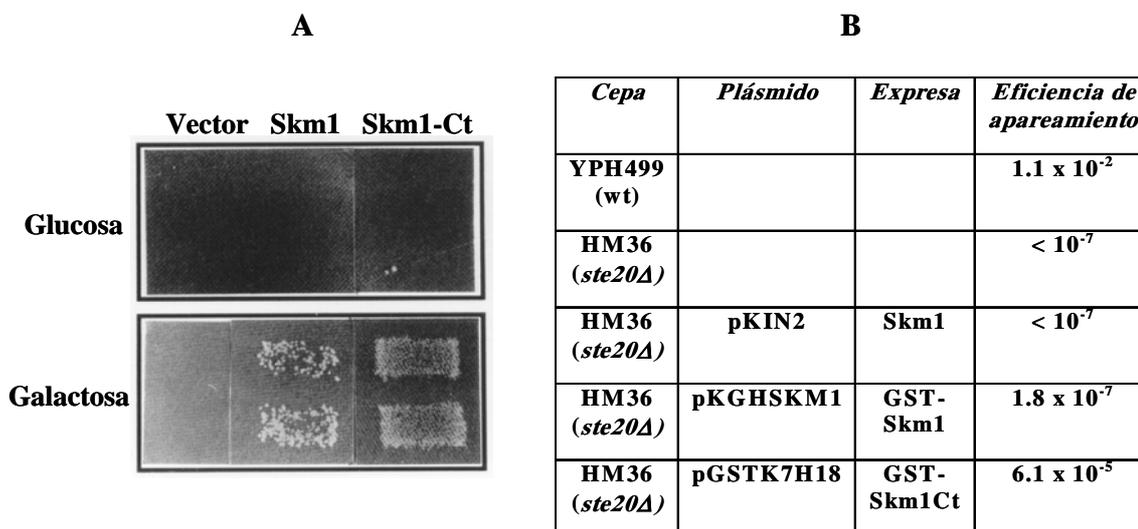


Figura 16. La sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1 complementa el defecto en apareamiento de un mutante *ste20Δ*. (A) Ensayo de apareamiento de una cepa *ste20Δ* transformada con los plásmidos pEG(KGH) (vector), pKGHSKM1 (Skm1) y pGSTK7H18 (Skm1-Ct), que en presencia de galactosa sobreexpresan, respectivamente, GST, Skm1 en fusión a GST y el dominio carboxilo catalítico de Skm1 en fusión a GST. Se sembraban “patches” de los transformantes que, tras dos días de incubación a 28°C, eran replicados en placas de medio con glucosa o galactosa, previamente sembradas con un césped de células silvestres de tipo sexual opuesto (cepa 1784). Las placas se incubaban a 28°C durante 20 horas (no más, para evitar la letalidad de la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1) y a continuación se replicaban a placas con medio selectivo para diploides (medio mínimo sin uracilo ni histidina) que se incubaban 48 horas a 28°C. (B) Ensayo cuantitativo de apareamiento según Sprague (1991), con las siguientes variaciones: cuando se necesitaba inducción por galactosa los transformantes fueron previamente incubados en medio con este azúcar durante 3 horas; el apareamiento se realizó en medio con galactosa como fuente de carbono y el tiempo de apareamiento fue de 7 horas. La eficiencia de apareamiento se calcula dividiendo el número de diploides obtenidos entre el número de células haploides **a**.

6. ESTUDIO DE LOS FENOTIPOS RESULTANTES DE LA ACTIVACIÓN DE Cdc42 POR ELIMINACIÓN DE SUS PROTEÍNAS GAP Rga1, Rga2 Y Bem3

La GTPasa Cdc42 ve modulada su actividad por proteínas GEFs, GAPs y GDIs (ver “Introducción”). Se ha descrito que Rga1, Rga2 y

Bem3 son proteínas con posible actividad GAP sobre Cdc42. La pérdida de alguna de ellas (en los casos de Rga1 y Bem3 está comprobado) provoca

una mayor actividad de la GTPasa que, en principio, debería manifestarse en un fenotipo morfológico relativamente similar al de la sobreexpresión del

alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V}. Sin embargo, la morfología que presentan los mutantes en los genes de las distintas GAP de Cdc42 es bastante diferente.

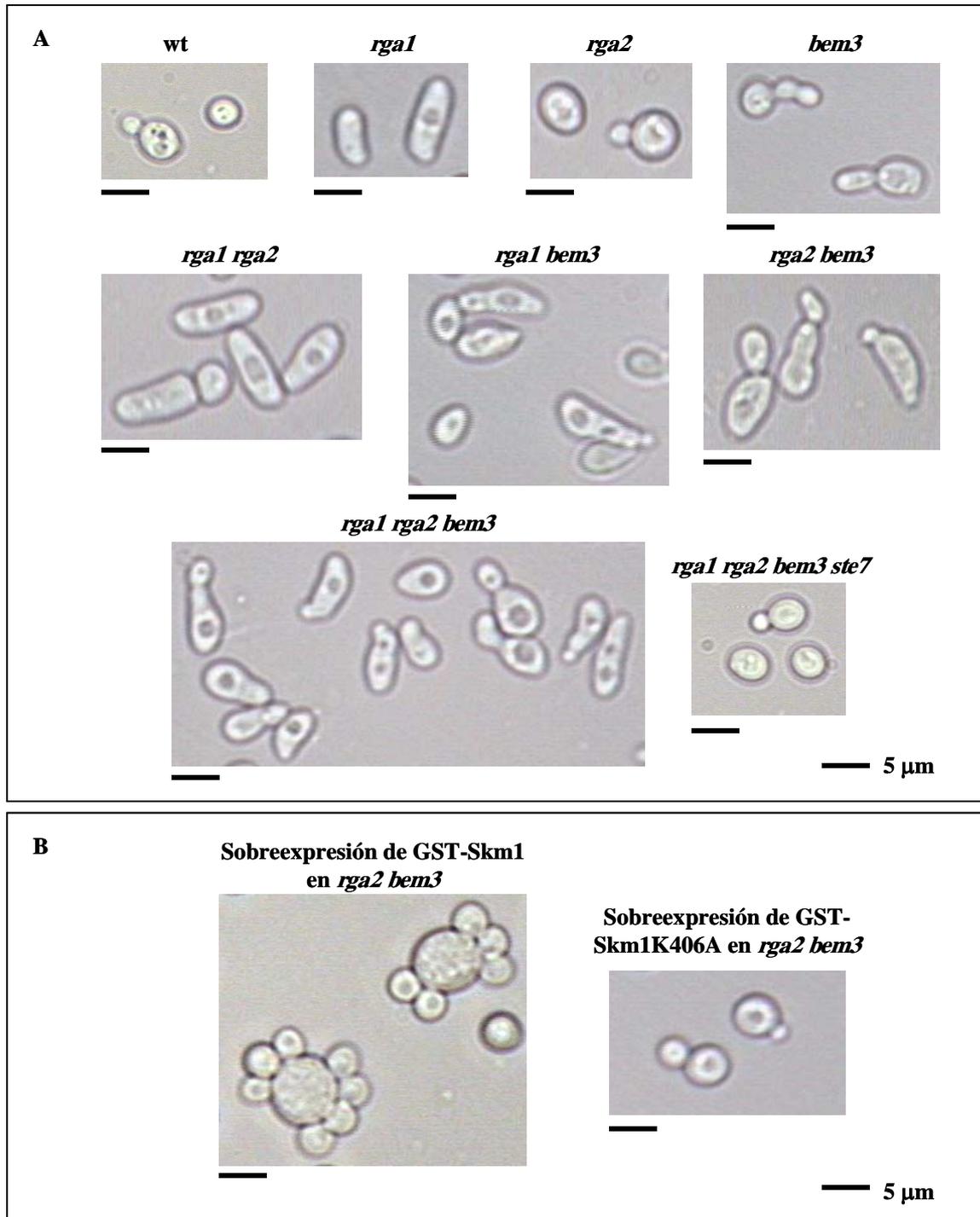


Figura 17. Fenotipo morfológico de los mutantes en los genes de las proteínas GAP de Cdc42. Efecto de la sobreexpresión de Skm1 o Skm1K406A en estos mutantes. (A) Morfología de mutantes en los genes *RGA1*, *RGA2* y *BEM3* y del cuádruple mutante *rga1 rga2 bem3 ste7*, crecidos en YPD a 28°C. (B) Morfología de células *rga2 bem3* transformadas con los vectores pKGSKM1 o pKGSKM1-KD y crecidas en galactosa durante 72 horas a 28°C para inducir la sobreexpresión de los alelos correspondientes de *SKM1*.

6.1. Fenotipo de mutantes en los genes *RGAI*, *RGA2* y *BEM3*.

Los mutantes *rgal* muestran una morfología alargada, que recuerda vagamente a la forma de células que comienzan a pseudofilamentar; los mutantes *rga2* no parecen mostrar morfología aberrante; sin embargo, en los mutantes *bem3* aparece un pequeño porcentaje de células con yemas alargadas. En los dobles y triples mutantes, resultado de la combinación de las mutaciones anteriores, los fenotipos se intensifican y se vuelven aberrantes: los mutantes *rgal rga2* siguen mostrando la morfología típica de los mutantes *rgal*, quizá más agudizada; las células *rgal bem3* aparecen aún más afectadas, exhibiendo morfologías alargadas y piriformes; las *rga2 bem3* de nuevo parecen emitir yemas alargadas, si bien parecen más afectadas que las *bem3*; y los mutantes *rgal rga2 bem3* exhiben la morfología más afectada, mostrando una mezcla de todos los fenotipos indicados (**Figura 17**).

Parece claro que la activación de Cdc42 que provocan estas mutaciones desemboca en un tipo de crecimiento que parece implicar a las rutas de pseudofilamentación/invasividad y a la ruta de respuesta a feromonas. Para confirmar esto, todas las cepas descritas fueron interrumpidas en el gen *STE7* –utilizando para ello el plásmido integrativo pNC113, linearizado con la enzima de restricción *SacI* antes de ser transformado en las cepas correspondientes-, con el fin de eliminar la transmisión a través de las rutas de feromonas/invasividad. Tras observar la morfología

de estos nuevos mutantes, se comprobó que, en todos, la mutación *ste7* conducía a una morfología idéntica a la de las células silvestres. Sobre estos mutantes y sus efectos sobre las rutas de transducción de señales se hablará extensamente más adelante, pero es de destacar la gran diferencia en la morfología de estos mutantes y de células sobreexpresando el alelo *cdc42^{G12V}*.

6.2. Sobreexpresión de *Skm1* y *Skm1K406A* en mutantes *rga2 bem3*.

Previamente se ha mostrado el efecto aditivo de la sobreexpresión de *cdc42^{G12V}* y la de *Skm1*. La diferencia de fenotipo mostrado por los mutantes en los genes de las proteínas GAP condujo a indagar acerca del efecto de la sobreexpresión de *Skm1* en estos mutantes. Se eligió el mutante *rga2 bem3* por presentar un fenotipo más intenso y a la vez permitir ser transformado, por razón de marcadores de auxotrofia, con la construcción pKGSKM1.

La sobreexpresión de *SKM1* sustituyó el fenotipo de mutantes *rga2 bem3* por el típico de sobreexpresión de esta PAK (células grandes, redondas y multigemadas). Cuando el sobreexpresado fue el alelo inactivo *skm1^{K406A}* no apareció ninguna morfología aberrante y las células fueron similares a las silvestres (**Figura 17**). Estos resultados parecen indicar que la sobreexpresión de *Skm1* o *Skm1K406A* conduce a un secuestro de Cdc42 que quizá lo desvía de sus sustratos fisiológicos en los mutantes *rga2 bem3*.

7. BÚSQUEDA DE GENES RELACIONADOS CON *SKM1* Y *CDC42* MEDIANTE ESTRATEGIAS GENÉTICAS.

Con el fin de encontrar genes implicados en la regulación de Cdc42 y *Skm1* o relacionados con su función se procedió a los siguientes ensayos:

7.1. Rastreo de genes que eliminen la letalidad de la sobreexpresión del dominio quinasa de *Skm1* o del alelo hiperactivo *cdc42^{G12V}*.

Se transformó la cepa SEY6211 con el vector pGSTK7H18 –marcador *HIS3*-, que en presencia de galactosa sobreexpresa en fusión a GST los aminoácidos 249-655 de *Skm1*, que contienen su dominio quinasa. (como se ha descrito previamente, el fenotipo causado por esta sobreexpresión es letal) y a continuación se procedió a una nueva transformación con una genoteca de sobreexpresión

(cedida por E. Herrero) subclonada en pYES2 (marcador *URA3*; los fragmentos se encuentran bajo el control del promotor del gen *GALI*). Esta genoteca queda representada por unos 40.000 transformantes. Se obtuvieron 600.000, de los cuales ninguno fue capaz de crecer en galactosa.

Procediendo de forma similar, se transformó la misma cepa SEY6211 con el vector pKGC42G12V, que contiene en fusión a GST el alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V}. Tras comprobar que en galactosa la sobreexpresión resultaba letal se procedió al rastreo de la misma genoteca. Se obtuvieron 700.000 transformantes, sin que ninguno fuera capaz de crecer en galactosa.

Estos ensayos parecen poner de manifiesto que los efectos causados por los alelos indicados son demasiado pleiotrópicos como para eliminarse por la acción de un solo gen.

7.2. Búsqueda de mutantes supresores de la letalidad de la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1 y del alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V}.

Paralelamente, y con el mismo objetivo indicado previamente, la cepa 1783 transformada, por un lado, con pKGC42G12V y, por otro, con pGSTK7 se sometió a un proceso de mutagénesis por irradiación de luz ultravioleta de 240 nm durante 30 segundos a una intensidad de 4 erg/mm/s, - que permitía obtener un 40% de supervivencia- y fue sembrada por extensión en medio con galactosa. Se obtuvieron en cada caso siete colonias que eran capaces de crecer en este medio. Estos mutantes perdieron el plásmido y fueron transformados con el plásmido pPHO4 (gen *PHO4* subclonado en pYES2) que expresa la enzima fosfatasa ácida, para comprobar que la mutación no se había producido en el sistema de inducción por galactosa. Tras descartar esta posibilidad, los mutantes se retransformaron con los plásmidos de sobreexpresión, pero esta vez fueron incapaces de crecer como colonias aisladas, por lo que se descartaron.

De nuevo parece ocurrir que los efectos de la sobreexpresión de estos alelos son demasiado numerosos (afectan a diversas rutas) para poder suprimirlos por mutagénesis.

7.3. Posible relación entre *Ess1* y *Pin1* con *Skm1*.

La proteína *Ess1* es una peptidil-prolil-isomerasa recientemente implicada en el procesamiento de RNA mensajero y la regulación de la mitosis (Hani y col., 1999; Wu y col., 2000). El fenotipo morfológico de multigemación del mutante *ess1* inicialmente descrito por Hanes y col. (1989) es muy similar al de sobreexpresión de *Skm1*. Esto condujo a la idea de que quizá la sobreexpresión de *Ess1* en células sobreexpresando *Skm1* podría eliminar este fenotipo. Por ello se cotransformó la cepa 1783 con plásmidos de sobreexpresión de *Skm1* y *Ess1*, por un lado, y de *Skm1* y *Pin1* (homólogo humano de *Ess1*) por otro. La cosobreexpresión de ambos genes, en todos los casos, condujo a un fenotipo similar al de sobreexpresión de *Skm1*.

7.4. Búsqueda de mutaciones letales en un fondo deleciónado en *SKM1*: método del ácido 5-Fluoroorótico (5-FOA).

En un nuevo intento de encontrar genes relacionados funcionalmente con *SKM1* se procedió a un rastreo de letalidad sintética. Para ello se utilizó el método conocido usualmente como del ácido 5-fluoroorótico (5-FOA). Un mutante deleciónado en *SKM1* en el fondo DBY746 se transformó con el plásmido con marcador *URA3* YEp352SKM1. Este transformante se creció hasta fase exponencial y se sembró en placas de YPD (aproximadamente 2500 células por placa) sobre las que se realizó una mutagénesis con luz ultravioleta de 240 nm durante 60 segundos a una intensidad de 4 erg/mm/s y que después se incubaron a 24 °C hasta aparición de colonias. Este tratamiento permitió una supervivencia del 17% de las células (aproximadamente 400 por placa). Las colonias que crecieron se replicaron a placas con 5-FOA (0.75 mg/ml) que se incubaron a 24°C durante 5 días con

el fin de que pudieran crecer únicamente las colonias *ura* (-), es decir, las que hubiesen perdido el plásmido YEp352SKM1, con marcador *URA3*.

El objetivo final de la técnica es seleccionar aquellas colonias incapaces de crecer en 5-FOA, es decir, aquellas para las que resulta letal la pérdida del plásmido que contiene el gen *SKM1*. Estas colonias portarán, por tanto, una mutación no letal

pero que resulta mortal en combinación con la mutación *skm1*.

Se estudió el comportamiento en 5-FOA de 10.000 posibles mutantes que sobrevivieron a la irradiación ultravioleta, observándose que todos ellos, en mayor o menor grado, eran capaces de crecer en este medio, por lo que no presentaban mutaciones letales en combinación con la del gen *SKM1*.

8. MECANISMOS REGULADORES DE LA SEÑALIZACIÓN EN LA RUTA DE LA MAP QUINASA Slt2.

En nuestro laboratorio estamos también interesados en el estudio de los mecanismos que modulan la actividad de la MAP quinasa Slt2. La ruta mediada por Pkc1 es una de las rutas de transducción de señales que actúan en *Saccharomyces cerevisiae* controlando su biología celular. Esta ruta es esencial para el mantenimiento de la integridad celular frente a diferentes condiciones ambientales y durante sucesos morfogénicos, mediante el control de la dinámica de la pared celular y del citoesqueleto de actina (Heinisch y col., 1999; Schmidt y Hall, 1998). La llamada ruta de integridad celular se induce en periodos de crecimiento polarizado, durante la gemación y el apareamiento (Zarzov y col., 1996), y en respuesta a determinadas condiciones ambientales que alteran la estabilidad de la pared celular, como la alta temperatura (Kamada y col., 1995), el choque hipotónico (Davenport y col., 1995) o las interferencias con la síntesis de la pared celular (Ketela y col., 1999; De Nobel y col., 2000). De acuerdo con esto, la pérdida de la funcionalidad de esta ruta conduce a la lisis celular cuando las células son expuestas a los estímulos activadores, lisis que puede evitarse por estabilización osmótica del medio (Torres y col., 1991; Levin y Bartlett-Heubusch, 1992). Este hecho indica el papel de esta ruta en el mantenimiento de una estructura funcional en la pared celular.

Para estudiar estímulos y mutaciones capaces de influir en la activación de Slt2, decidimos utilizar la

técnica del “Western blotting”. El anticuerpo primario que ha sido utilizado reconoce el péptido TEY doblemente fosforilado, en la treonina 202 y la tirosina 204, de la MAP quinasa p44/p42 de mamífero, lo que nos ha permitido usarlo para detectar la fosforilación del motivo TEY de Slt2 en la treonina 190 y la tirosina 192 (**Figura 18**). La actividad catalítica de esta familia de MAP quinasas depende de la fosforilación en estos residuos conservados (Cobb y Goldsmith, 1995), y por ello este anticuerpo puede utilizarse para detectar el estado activo de Slt2. En estos ensayos, para mostrar que los niveles de Slt2 se mantenían aproximadamente constantes durante el experimento, las membranas tratadas con este anticuerpo eran deshibridadas y de nuevo rehibridadas con un nuevo anticuerpo primario obtenido frente a la proteína de fusión GST-Slt2 (Martín y col., 1993). Con el mismo fin, en ocasiones se transferían geles en paralelo con los mismos extractos, utilizando en un caso el anticuerpo frente al motivo TEY fosforilado y en el otro el anticuerpo anti-Slt2.

Este anticuerpo primario frente al péptido TEY doblemente fosforilado permite también la detección en *S. cerevisiae*, como más adelante se comprobará, de la activación de otras dos MAP quinasas que son fosforiladas, de igual forma y en un dominio idéntico, en respuesta a sus respectivos estímulos: Fus3, en presencia de feromonas, y Kss1 durante el crecimiento pseudofilamentoso o invasivo.

8.1. Utilidad de los anticuerpos frente a la MAP quinasa p44/p42 fosforilada para analizar la activación de Slt2.

En primer lugar, comprobamos si determinados estímulos conocidos como activadores de Slt2 eran capaces, efectivamente, de provocar un incremento en la fosforilación en el motivo TEY. Una vez demostrado esto, se podría afirmar que la fosforilación detectada por estos anticuerpos se correspondía con una activación proporcional de la actividad catalítica de la MAP quinasa. El choque térmico es un conocido estímulo activador de la ruta de Pkc1, y de acuerdo con esto el paso de las células a una temperatura de crecimiento de 39°C durante 1

hora provoca un fuerte incremento en la intensidad de la señal de Slt2 fosforilado (**Figura 18**). La estabilización osmótica del medio con sorbitol a concentración 1M evita la hiperfosforilación de Slt2 a 39°C e incluso conduce a una disminución de la fosforilación basal a 24°C. Este nivel basal es debido a la activación periódica que sufre la MAP quinasa en cada una de las células que en ese momento se encuentran iniciando la gemación (Zarrov y col., 1996).

Para confirmar que el uso de este anticuerpo detecta la señalización a través de la ruta de Pkc1, procedimos a comprobar si la hiperactivación de Bck1, componente que se encuentra por debajo de

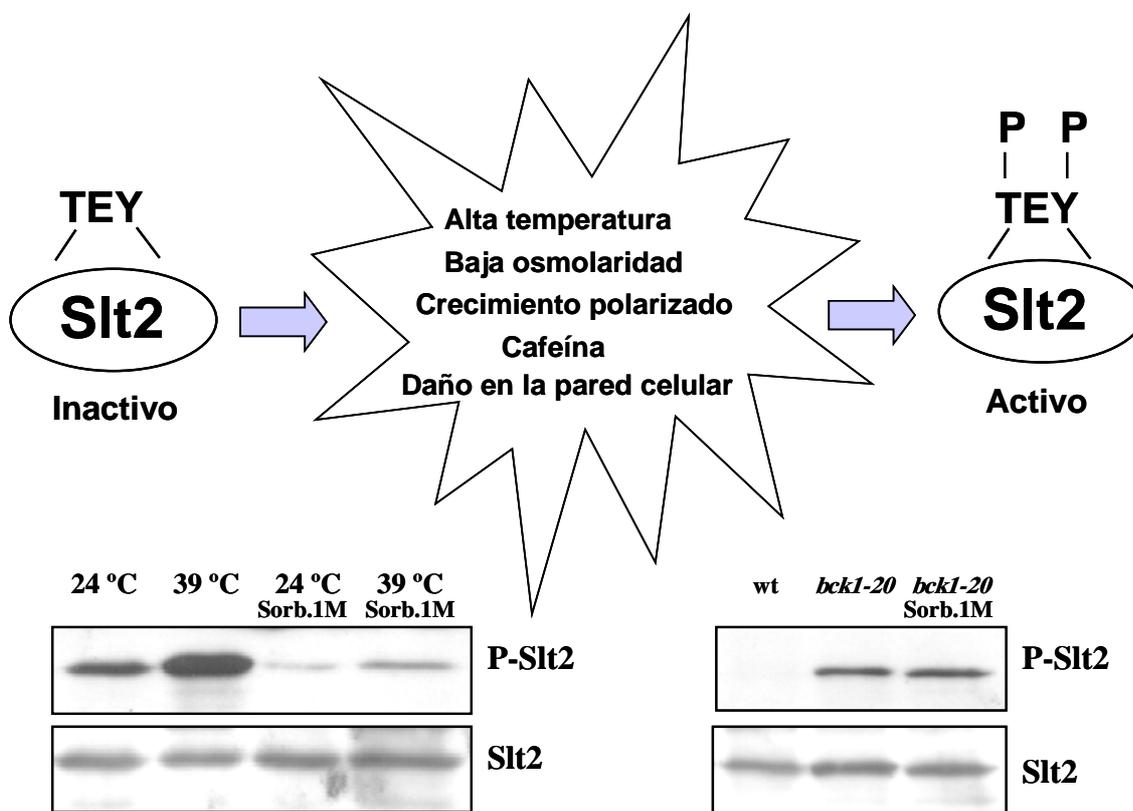


Figura 18. Detección de Slt2 fosforilado en treonina y tirosina bajo algunos estímulos activadores conocidos de la ruta de integridad celular. Arriba, “Western blots” realizados con un anticuerpo reconocedor del péptido TEY fosforilado en treonina y tirosina - “anti-phospho-p42/44-MAP kinase” (New England Biolabs) - a partir de extractos de la cepa SEY6211 crecida hasta fase exponencial a 24°C y después incubada 1 hora a 39°C (panel izquierdo), o bien de la misma cepa transformada con el plásmido pRS316BCK1-20, portador del alelo hiperactivo *bck1-20* (panel derecho), todo ello en ausencia o presencia de sorbitol 1M como estabilizador osmótico. Abajo, “Western blots” realizados a partir de las membranas anteriores, que fueron deshibridadas y rehibridadas de nuevo con anticuerpos frente a GST-Slt2 para confirmar que las cantidades de proteína eran similares (ver “Materiales y Métodos”).

Pkc1 en la ruta, desembocaba en un incremento de la fosforilación de Slt2. Células expresando el alelo hiperactivo *bck1-20* desde el plásmido pRS316BCK1-20 sufren un importante incremento de la fosforilación de esta MAP quinasa que, en este caso, no es remediable por la adición al medio del estabilizador osmótico sorbitol 1M (**Figura 18**).

Estos resultados están de acuerdo con el modelo aceptado en el que la estabilización osmótica evita la activación de Slt2 en presencia del estímulo porque previene el estiramiento de la membrana plasmática en ausencia de una pared estable (Kamada y col., 1995). Por tanto, es incapaz de prevenir una activación de Slt2 provocada no por defectos en la pared sino por una hiperactivación de un componente previo a la MAP quinasa en la cascada de fosforilación.

8.2. Influencia de las proteínas PAK en la activación de Slt2.

Entre las funciones bien estudiadas que cumplen las proteínas PAK en células de mamífero se encuentran dos: la primera, servir de mediadores entre Cdc42 y el citoesqueleto de actina para controlar los procesos de crecimiento polarizado; y la segunda, el activar, mediante su capacidad serín-treonín-quinasa, cascadas de fosforilación que desembocan en la activación de distintas MAP quinasa. En *S. cerevisiae*, la primera función parece implicar a las proteínas PAK Cla4 y Ste20, si bien esta última también desarrolla un papel en señalización, actuando a través de las rutas de respuesta a feromonas y de crecimiento pseudofilamentoso/invasivo. El interés de nuestro laboratorio en la ruta de transducción de señales que desemboca en la MAP quinasa de integridad celular Slt2, nos llevó a estudiar con más detenimiento el posible papel de estas proteínas PAK, en especial de la que es objeto de este estudio, Skm1, en la activación de esta ruta.

8.2.1. Pérdida de las proteínas PAK: Ste20, Cla4 y Skm1.

La primera pregunta surgida fue qué efecto tendría sobre la fosforilación basal de Slt2 la pérdida de cada una de estas proteínas PAK (**Figura 19A**). Para ello comparamos el grado de activación a 24°C de mutantes *ste20*, *cla4* y *skm1*. No se encontraron diferencias notables entre los mutantes *skm1* y *cla4* y la cepa isogénica silvestre. En el caso del mutante *ste20*, se pudo apreciar una muy ligera disminución del grado de fosforilación de Slt2 en el fondo genético SEY6211, aunque este resultado no se consideró suficientemente significativo, ya que no se repitió en otros fondos genéticos ensayados, como el SY2002 (**Figura 19B**).

8.2.2. Sobreexpresión de los dominios quinasa de las proteínas PAK.

El siguiente paso fue mostrar el efecto de la sobreexpresión de estas proteínas en la actividad de Slt2. Nuestra intención era observar el efecto causado por un incremento en la actividad de estas proteínas y, como se ha descrito y en este trabajo se ha mostrado que el extremo N-terminal de las proteínas PAK ejerce una función inhibitoria sobre el dominio quinasa C-terminal, procedimos a la sobreexpresión de alelos truncados en el extremo aminoterminal. La adición de galactosa a un cultivo crecido en un medio con rafinosa como única fuente de carbono y la posterior incubación a 24°C durante 7 horas condujo a una hiperfosforilación de Slt2 y a la aparición de dos nuevas bandas que fueron identificadas como correspondientes a las MAP quinasa fosforiladas Kss1 y Fus3 (**Figura 19C**). Mientras que la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1 y Ste20 conducía a la hiperfosforilación de las tres bandas, en el caso de Cla4, Kss1 y Fus3 también sufrían una gran fosforilación, pero el aumento en la activación de Slt2 no era tan elevado. Para descartar la posibilidad de que la activación de Slt2 fuera sólo respuesta a un daño en la pared causado por la sobreexpresión de estos dominios quinasa, los experimentos de sobreexpresión se repitieron en presencia del estabilizador osmótico sorbitol 1M, obteniéndose los mismos resultados que en ausencia de estabilización (datos no mostrados).

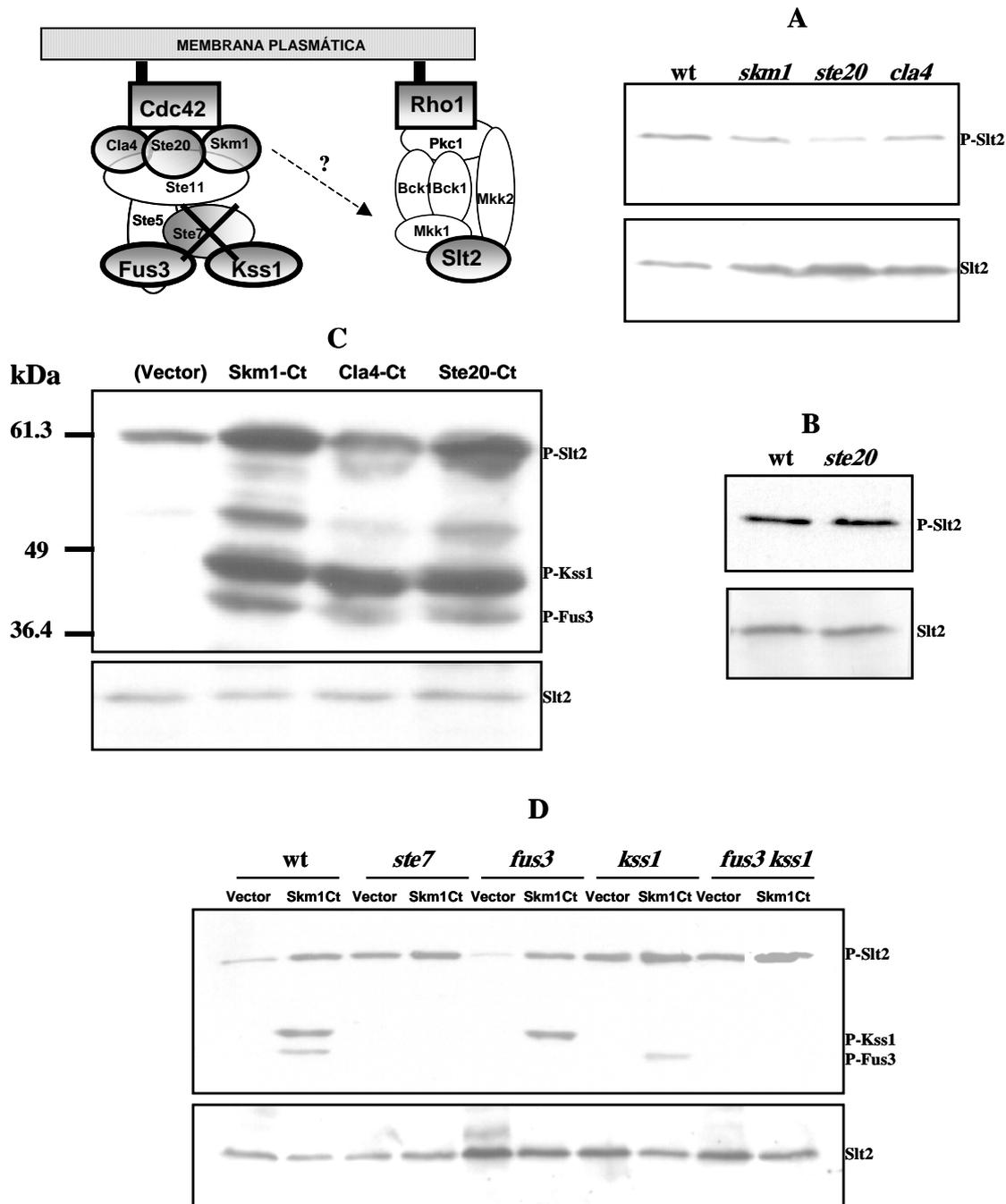


Figura 19. Influencia de las proteínas PAK en la activación de las MAP quinasas Slt2, Fus3 y Kss1. (A) Fosforilación basal de Slt2 en la cepa SEY6211 (silvestre) y las mutantes isogénicas HM28 (*skm1* Δ), HM37 (*ste20* Δ) y HM50 (*cla4* Δ) crecidas a 24°C. (B) *Idem* en las cepas SY2002 (silvestre) y la mutante isogénica YTX25 (*ste20* Δ). (C) Efecto en la fosforilación de Slt2, Fus3 y Kss1 de la sobreexpresión de los dominios carboxilos quinasas de las proteínas PAK: Skm1-Ct (plásmido pGSTK7), Cla4-Ct (plásmido pSCLA) y Ste20-Ct (plásmido pSTE20) en la cepa 1783. Las células se crecieron a 24°C en rafinosa hasta fase exponencial y a continuación se añadió galactosa al medio de cultivo hasta concentración final de 2% para inducir la sobreexpresión durante 7 horas. (D) Fosforilación de las tres MAP quinasas provocada por la sobreexpresión del dominio carboxilo quinasa de Skm1 (Skm1Ct, plásmido pGSTK7) en las condiciones indicadas en C en la cepa YPH499 (silvestre) y las mutantes isogénicas JTY2556 (*ste7*), JTY2519 (*fus3*), JTY2520 (*kss1*) y JTY2516 (*fus3 kss1*). Los anticuerpos utilizados son los descritos en la **Figura 18**.

Estos datos parecen apoyar la importancia de Ste20 y Skm1 para la señalización hacia Slt2 y el menor papel de Cla4 en este proceso y podrían estar en concordancia con el hecho descrito (Jacoby y col., 1998) de que la expresión en multicopia de *STE20* es capaz de complementar el fenotipo de sensibilidad a cafeína de mutantes *hcs77*, afectados en la señalización a través de la ruta de Slt2. A la vista de los resultados obtenidos nos preguntamos si la expresión en multicopia –desde el plásmido YEp352SKM1 - o la sobreexpresión –desde el plásmido pKGSKM1- de *SKM1* serían capaces de aliviar la incapacidad de crecimiento en cafeína 12mM del mutante *hcs77*. Sin embargo, el resultado fue negativo.

8.2.3. Implicación de componentes de las rutas de feromonas, invasividad y SVG en la activación de Slt2 debida a las proteínas PAK.

Para responder a la cuestión de si componentes de alguna de estas rutas serían necesarios para transmitir la señal hacia Slt2, procedimos a sobreexpresar el dominio quinasa de Skm1 en mutantes *ste7*, *fus3*, *kss1* y *fus3 kss1* en condiciones de incubación de 24°C y de 7 horas de inducción en galactosa. El resultado obtenido fue que en mutantes *ste7* desaparecía, como era de esperar, la activación de Fus3 y Kss1, pero no ocurría así con la de Slt2 (**Figura 19D**). En mutantes *fus3* y *kss1* seguían apareciendo las bandas de Kss1 y Fus3, respectivamente, y de nuevo la de Slt2. Y en el doble mutante *fus3 kss1* sólo se mantenía la activación de Slt2. Así pues, esta ruta no parecía necesaria para la activación de Slt2 debida a la sobreexpresión de las PAK.

Curiosamente, los mutantes *ste7* y *kss1*, pero no *fus3*, presentaban una elevación de la activación basal de Slt2 en las condiciones ensayadas: es decir, creciendo a 24 °C en rafinosa a concentración 1% hasta fase exponencial, añadiendo galactosa al cultivo para alcanzar una concentración final del 2% e incubando las células siete horas (**Figura 19D**). Para estudiar más detenidamente este hecho se procedió a analizar la activación de Slt2 de estos mutantes en medio mínimo con distintas fuentes de

carbono: galactosa, glucosa o rafinosa/galactosa. Los resultados mostraron que en la cepa silvestre YPH499 la activación de la ruta de Slt2 es mayor cuando se utiliza galactosa como fuente de carbono, algo menor cuando es glucosa y menor aún en el caso de rafinosa/galactosa (**Figura 20**). Cuando las células se han cultivado en galactosa no se aprecian diferencias en la activación de Slt2 en los distintos mutantes del fondo YPH499, aunque los mutantes *ste7* y *kss1* en el fondo SEY6211 muestran una ligera disminución de esta activación; en el caso de utilizar glucosa, los mutantes *ste7* parecen mostrar una activación ligeramente superior que la cepa silvestre y en cultivos con rafinosa/galactosa la diferencia entre mutantes *ste7* y cepa silvestre comienza a ser realmente apreciable, aún más en el fondo SEY6211.

La significación de estos resultados no está clara, pero el hecho de que mutantes afectados en *Ste7* y *Kss1* presenten una mayor fosforilación de Slt2 y que *Ste7* y *Kss1* formen parte de la recientemente descrita ruta SVG (de mantenimiento de la integridad celular en crecimiento vegetativo) parece apuntar a que Slt2 está activándose para compensar algún tipo de defecto en la pared causado por estos mutantes. Se volverá a ello más adelante.

8.3. Influencia de las GTPasas tipo Rho en la activación de Slt2: el papel de Cdc42.

En mamíferos existe un esquema clásico en el que las GTPasas tipo Rho se coordinan en una activación secuencial de Cdc42, Rac1 y RhoA para controlar las reorganizaciones del citoesqueleto de actina durante el movimiento celular (Chant y Stowers, 1995). En *S. cerevisiae* no existen GTPasas tipo Rac, pero las funciones descritas para las GTPasas Bud1 (selección del sitio de gemación), Cdc42 (polarización de la maquinaria biosintética hacia ese punto - emergencia de la yema o de la proyección de apareamiento) y Rho1 (mantenimiento de la integridad de la pared en la yema o en la proyección de apareamiento crecientes) durante los procesos de crecimiento polarizado parecen indicar un esquema similar de activación secuencial.

Por otro lado, se ha descrito que la MAP quinasa Slt2 se activa en períodos de crecimiento polarizado (Zarzov y col., 1996). Cdc42, la GTPasa necesaria para el inicio del crecimiento polarizado en el lugar marcado para la emergencia de la yema o para la emisión del “shmoo”, podría ejercer algún tipo de regulación sobre esta MAP quinasa. El hecho de que las proteínas PAK parezcan cumplir un papel en la señalización hacia esta MAP quinasa, y el de que éstas sean sustratos de Cdc42 nos condujo a

investigar el posible papel de la GTPasa en la activación de la MAP quinasa de integridad celular.

8.3.1. Pérdida de Cdc42.

Al ser *CDC42* un gen esencial, el ensayo se realizó con el mutante termosensible *cdc42-1* (Adams y col., 1990), utilizándose como cepa isogénica “silvestre” al mismo mutante transformado con el plásmido centromérico pRS315CDC42. Para

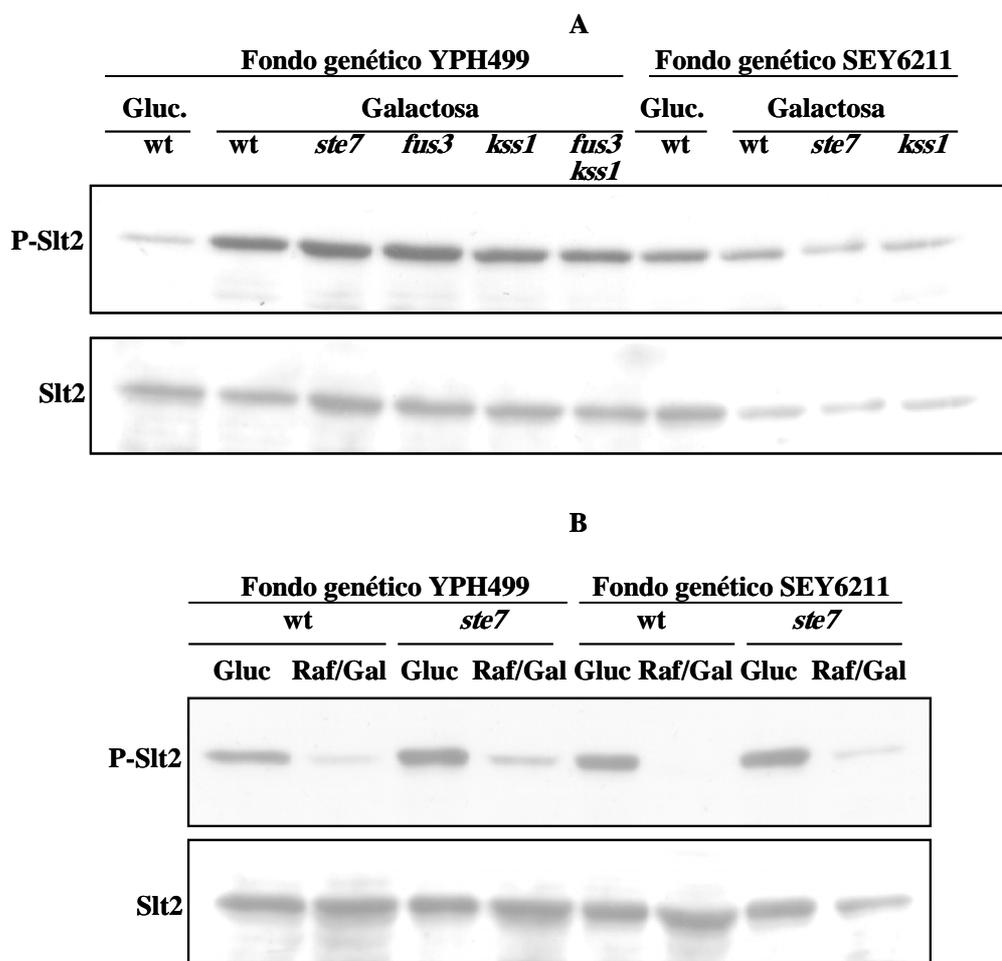


Figura 20. Influencia de la fuente de carbono en la activación de Slt2 en mutantes en la ruta SVG. (A) Fosforilación de Slt2 y Kss1 en células cultivadas en medio mínimo con glucosa o galactosa como fuente de carbono a 24 °C: en la cepa silvestre YPH499 y las mutantes isogénicas JTY2556 (*ste7*), JTY2519 (*fus3*), JTY2520 (*kss1*) y JTY2516 (*fus3 kss1*); en la cepa silvestre SEY6211 y las mutantes isogénicas YTX40 (*ste7*) y HM51 (*kss1*). (B) Fosforilación de Slt2 en células cultivadas a 24 °C en medio mínimo con glucosa como fuente de carbono o bien en rafinosa hasta fase exponencial, añadiendo a continuación galactosa al medio de cultivo a una concentración final de 2%: en la cepa silvestre YPH499 y la mutante isogénica JTY2556 (*ste7*); en la cepa silvestre SEY6211 y la mutante isogénica YTX40 (*ste7*). Los anticuerpos utilizados son los descritos en la **Figura 18**.

que la mutación se manifieste es necesario incubar las células a la temperatura restrictiva de 37°C. Esto supuso un problema, ya que la MAP quinasa Slt2 sufre una intensa fosforilación a esa temperatura. Este efecto colateral del choque térmico podría enmascarar el efecto que la pérdida de Cdc42 pudiera tener sobre la fosforilación de Slt2. Para evitar en la medida de lo posible este efecto no deseado las células fueron incubadas a temperaturas crecientes, desde la que provoca una activación basal de Slt2 hasta la temperatura restrictiva de 37°C. En concreto, las temperaturas ensayadas fueron 24°C, 28°C, 32°C y 37°C, y el tiempo de incubación a cada temperatura siempre 1 hora. El resultado obtenido fue que ya a partir de 32°C se producía un incremento en la fosforilación de Slt2 mayor en los mutantes *cdc42* que en los respectivos transformados con pRS315CDC42 (**Figura 21A**). Para comprobar si este efecto se debía a una activación de Slt2 provocada por una posible desestabilización de la pared causada por la mutación *cdc42*, se incubaron las células a 37°C en presencia de sorbitol 1M. La estabilización osmótica provocó una ligera disminución de la fosforilación de Slt2 debida a la mutación *cdc42-1*, pero no consiguió rebajarla al nivel de la cepa silvestre. Las MAP quinasa Fus3 y Kss1 no mostraron alteración en su grado basal de fosforilación en este mutante.

El clásico mutante *cdc42-1* ha sido utilizado ya en multitud de estudios anteriores que han aportado mucha información acerca de la función de Cdc42 en la célula. Sin embargo, en un estudio en profundidad de las mutaciones del alelo *cdc42-1* (Miller y Johnson, 1997) se ha descrito que éste no sólo porta mutaciones que convierten a la proteína en no funcional a temperaturas restrictivas, sino además mutaciones en su zona promotora que provocan una relativa disminución de su expresión basal. Con el fin de solucionar este problema, y de obtener un mutante termosensible “puro”, estos autores desarrollaron la mutación *cdc42*^{W97R}, en la que tan sólo está afectado un aminoácido, la zona promotora del gen está libre de alteraciones y el comportamiento de la cepa es también termosensible. Se repitió el experimento anterior con

este nuevo mutante llegándose a idénticos resultados.

8.3.2. Sobreexpresión de Cdc42 y de su proteína GEF, Cdc24.

A continuación, nos propusimos averiguar si la sobreexpresión del alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V} o bien la activación de Cdc42 por acción de su proteína GEF Cdc24 influían de alguna forma en la fosforilación de Slt2. Para ello se subclonó el gen *CDC24* en el plásmido multicopia YEp352, y se subclonó el alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V} en el mismo plásmido YEp352 bajo el control de su propio promotor y en pEG(KG), bajo el control del promotor de *GAL1*, para poder sobreexpresarlo en presencia de galactosa. Todas las construcciones se transformaron en la cepa 1783. La expresión en multicopia de la GEF Cdc24, que supuestamente conduce a la activación de Cdc42, no provocó ninguna variación en los niveles de fosforilación de Slt2 (**Figura 21B**), y el mismo efecto se obtuvo al expresar en multicopia y al sobreexpresar el alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V}. Tampoco se vieron afectados los niveles basales de las MAP quinasa Fus3 y Kss1. Por último, utilizando como herramienta el vector pHPS100 (Kirchrath y col., 2000) - que expresa la fusión LexA-Rlm1, y que porta la construcción génica *lexA-lacZ*, lo que provoca expresión de β-galactosidasa cuando Rlm1 es fosforilado y, consecuentemente, activado -, comprobamos definitivamente que la sobreexpresión de Cdc24 y la del alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V} no inducía un aumento de señalización en la ruta de Slt2. Así pues, en un primer momento, parecía que el aumento de actividad de Cdc42 en la célula no afectaba a los niveles de fosforilación de la MAP quinasa de integridad celular (ni a los de Fus3 y Kss1).

8.3.3. Pérdida de las proteínas GAP de Cdc42: Rga1, Rga2 y Bem3.

Como se expuso previamente, el fenotipo morfológico de sobreexpresión del alelo *cdc42*^{G12V} es muy distinto del que muestran los mutantes en los

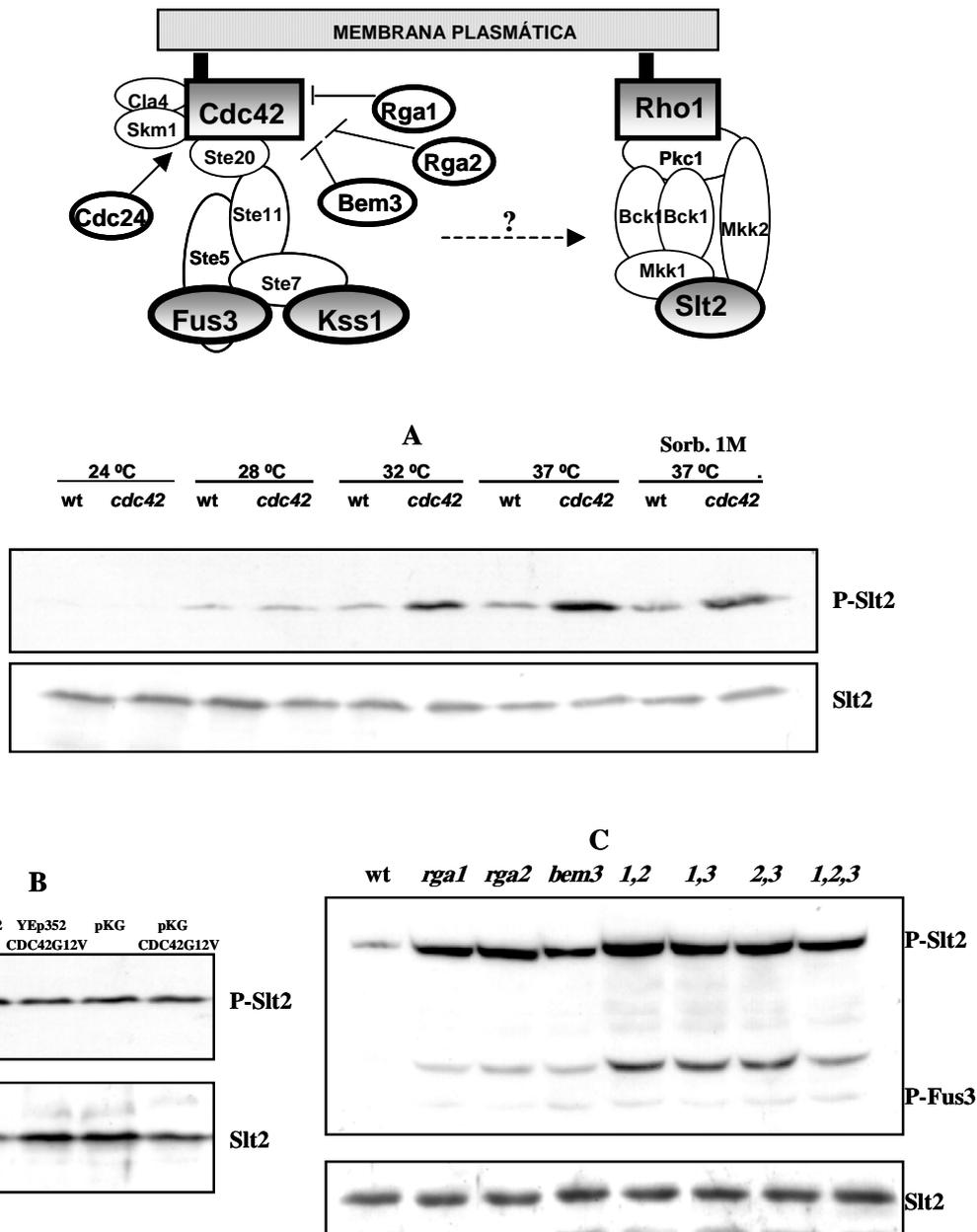


Figura 21. Influencia de la GTPasa Cdc42 y sus reguladores GEFs y GAPs sobre la activación de Slt2.

(A) Fosforilación de Slt2 a temperaturas crecientes y en ausencia o presencia de sorbitol 1M como estabilizador osmótico en la cepa DJTD2-16D (*cdc42-1*, alelo termosensible de *CDC42*), utilizando como silvestre la misma cepa transformada con el vector centromérico pRS315CDC42. (B) Efecto en la fosforilación de Slt2 de la expresión en multicopia de *CDC24* y el alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V} (plásmidos YEp352CDC24 y YEp352C42G12V, respectivamente) y de la sobreexpresión inducida por galactosa de este alelo hiperactivo (plásmido pKGC42G12V; la sobreexpresión se indujo por la adición al cultivo crecido en rafinosa de galactosa hasta concentración final del 2% y crecimiento en este medio a 24°C durante 7 horas) en la cepa 1783. (C) Efecto en la fosforilación de Slt2 de la progresiva eliminación de las proteínas GAP de Cdc42: cepas SY2002 (silvestre), YGS2 (*rga1*), YGS7 (*rga2*), YGS50 (*bem3*), YGS72 (*rga1 rga2*), YGS51 (*rga1 bem3*), YGS56 (*rga2 bem3*) y YGS57 (*rga1 rga2 bem3*) crecidas a 24°C. Los anticuerpos utilizados son los descritos en la Figura 18.

genes que codifican sus proteínas GAP. Esto nos condujo, por último, a estudiar el efecto de la pérdida de los reguladores negativos de Cdc42 o GAPs Rga1, Rga2 y Bem3 en la activación de Slt2. Curiosamente, la progresiva pérdida de una, dos o las tres proteínas GAP (**Figura 21C**) desembocó en un paralelo aumento de la fosforilación de Slt2 y, en menor medida, de Kss1 y Fus3. La intensidad de este efecto resultó mayor en los dobles y el triple mutante. Estas activaciones se observaron también en presencia de sorbitol 1M como estabilizador osmótico (datos no mostrados), lo que parece eliminar como causa a un posible defecto en la pared celular de estos mutantes. Llama la atención que ninguna de estas bandas adicionales (Kss1 y Fus3) apareciera cuando se expresaba el activador *CDC24* o se sobreexpresaba el alelo hiperactivo *cdc42^{G12V}*. Esto, efectivamente, entronca con el hecho de que el fenotipo de sobreexpresión del alelo *cdc42^{G12V}* sea muy diferente del de los mutantes en los genes de estas proteínas GAP. Nos preguntamos qué efecto tendría sobre la fosforilación de estas tres MAP quinasas la sobreexpresión del alelo hiperactivo *cdc42^{G12V}* en el triple mutante *rga1 rga2 bem3* desde el plásmido multicopia YEp352C42G12V, pero este efecto no resultó ser mayor del causado ya por la triple mutación (datos no mostrados).

8.3.4. Implicación de la ruta de feromonas/invasividad en la activación de Slt2 debida a Cdc42.

La activación de Cdc42 producida por la pérdida de sus reguladores negativos conduce, por tanto, a la activación de Kss1, Fus3 (en menor medida) y de Slt2. Parece clara la cascada de activaciones que une a Cdc42 con Fus3 o Kss1, pero no tanto la conexión de Cdc42 con Slt2. Se ha propuesto que Slt2 se activa en respuesta a feromonas, pero sigue sin estar clara la conexión entre ambas rutas: se ha descrito que Ste20 es necesario, pero no Ste11 o Ste12 (Zarrov y col., 1996), sugiriendo un cruce de rutas a nivel de Ste20 y Bck1; pero también se ha indicado en otro trabajo que Ste12 es necesario para esta activación (Buehrer y Errede, 1997). La primera pregunta que surgió, por tanto, fue si esta activación es dependiente de la ruta

Ste20-Ste11-Ste7-Fus3 o Kss1, o bien sigue un mecanismo diferente.

8.3.4.1. *Papel de la MAPKK Ste7 en la transmisión de la señal hacia Slt2.*

Para aclarar esta cuestión se interrumpió el gen *STE7* en cada uno de los mutantes defectivos en las proteínas GAP. Para ello se utilizó el plásmido pNC113 (Company y Errede, 1988), linearizado mediante la enzima de restricción *SacI*, previamente a su transformación en las cepas correspondientes. Se eligió en primer lugar *Ste7* para interrumpir la señalización de la ruta porque es una proteína específica de las rutas de feromonas, invasividad y SVG, mientras que *Ste20* y *Ste11* también están implicadas en la ruta de respuesta a alta osmolaridad de la MAP quinasa Hog1. El resultado fue que en todos los mutantes sencillos, dobles o triples en las proteínas GAP, si se añadía la mutación *ste7* la activación de Fus3 y Kss1 desaparecía (como era de esperar) y la de Slt2 se reducía a niveles similares a los de la cepa isogénica silvestre. Se muestra (**Figura 22A**) el efecto de la mutación *ste7* en los mutantes dobles y en el triple, que manifiestan una mayor y más repetitiva activación de Slt2.

8.3.4.2. *Papel de las proteínas PAK Ste20 y Skm1 en la transmisión de la señal hacia Slt2.*

A continuación nos preguntamos por el papel que podrían jugar los efectores PAK de Cdc42, *Ste20* y *Skm1*, en la transmisión de esta señal. Para resolver esto, procedimos a la delección de *STE20* y *SKM1* en la cepa mutante *rga2 bem3*, mediante los plásmidos p34S2U y pT18U (Martín y col., 1997), linearizados mediante restricción con las enzimas *EcoRI-KpnI* y *HindIII-SphI*, respectivamente, como paso previo a su transformación en el mutante. El efecto obtenido fue que, aparentemente, la práctica totalidad de la señal es transmitida por *Ste20*, como demuestra el hecho de que en mutantes *rga2 bem3 ste20* desaparecieran por completo las bandas correspondientes a Fus3 y Kss1 y disminuya la intensidad de la banda de Slt2 hasta niveles similares a los obtenidos en la cepa silvestre (**Figura 22B**). Los mutantes *rga2 bem3 skm1* no mostraron

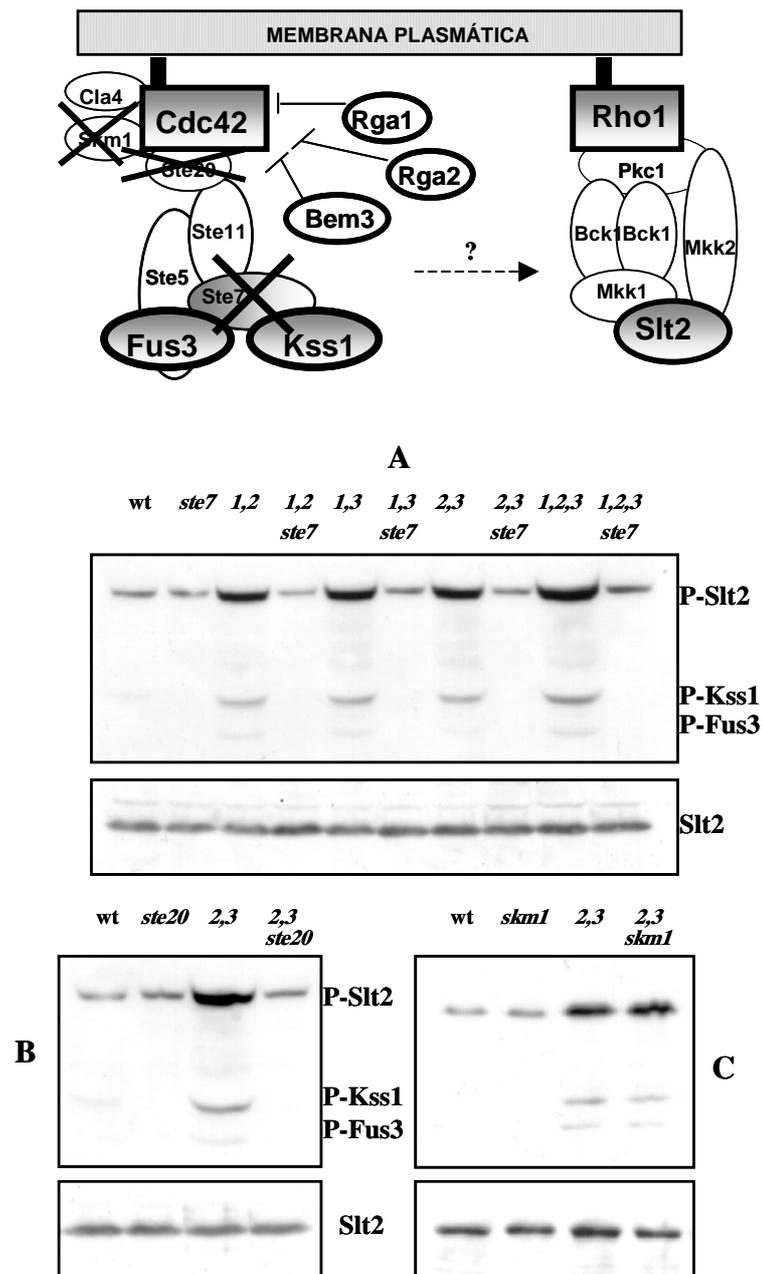


Figura 22. La activación de Slt2 debida a Cdc42 depende de la ruta de feromonas/invasividad, y en concreto de Ste20, pero no de Skm1. (A) Fosforilación de Slt2 en las cepas YTX10 (*ste7*), YTX21 (*rga1 rga2 ste7*), YTX22 (*rga1 bem3 ste7*), YTX23 (*rga2 bem3 ste7*) y YTX24 (*rga1 rga2 bem3 ste7*) en comparación con sus respectivas cepas isogénicas silvestres para *STE7* SY2002, YGS72, YGS51, YGS56 y YGS57. (B) Fosforilación de Slt2 en las cepas YTX25 (*ste20*) y YTX26 (*rga2 bem3 ste20*) en comparación con sus respectivas cepas isogénicas silvestres para *STE20* SY2002 y YGS56. (C) Fosforilación de Slt2 en las cepas YTX29 (*skm1*) y YTX30 (*rga2 bem3 skm1*) en comparación con sus respectivas cepas isogénicas silvestres para *SKM1* SY2002 y YGS56. Los anticuerpos utilizados son los descritos en la **Figura 18**.

diferencia alguna frente a los *rga2 bem3* en la activación de las tres MAP quinasas, lo que parece eliminar la posibilidad de un papel para Skm1 en la transmisión de la señal (**Figura 22C**).

Estas cepas mutantes en los genes que codifican las proteínas GAP de Cdc42 portan integrada en su genoma la construcción génica *FUS1::HIS3*, que permite detectar la transducción de señal a través de las rutas de feromonas y SVG por el mayor o menor grado de crecimiento en medio sin histidina.

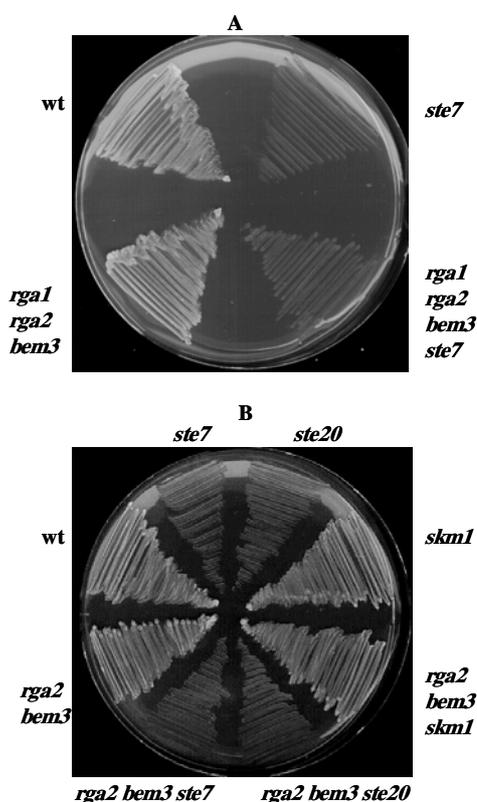


Figura 23 . Transcripción de *FUS1-HIS3* en distintos mutantes. (A) Crecimiento en medio sin histidina de las cepas YTX10 (*ste7*) y YTX24 (*rga1 rga2 bem3 ste7*) en comparación con sus respectivas isogénicas silvestres para *STE7* SY2002 y YGS57. (B) Crecimiento en medio sin histidina de las cepas YTX10 (*ste7*), YTX25 (*ste20*) y YTX29 (*skm1*) en comparación con su isogénica silvestre SY2002, y de YTX23 (*rga2 bem3 ste7*), YTX26 (*rga2 bem3 ste20*) y YTX30 (*rga2 bem3 skm1*) en comparación con la YGS56 (*rga2 bem3*).

Utilizando este gen “reporter” se comprobó que el efecto activador de Cdc42 causado por la pérdida de las tres proteínas GAP se canaliza totalmente a través de Ste7 – mutantes *rga1 rga2 bem3 ste7* no crecen en medio sin histidina (**Figura 23**)-. El análisis de la transcripción de *FUS1* en los mutantes *rga2 bem3 ste20* y *rga2 bem3 skm1* en medio sin histidina confirmó que tan sólo Ste20 está implicado en esta señalización (**Figura 23**).

8.3.4.3. Papel de las MAPK Fus3 y Kss1 en la transmisión de la señal hacia Slt2.

Por último, quedaba por aclarar si la señal activadora de Slt2 procedente de Cdc42 y dependiente de Ste7 era transmitida por Fus3 o Kss1. Para responder a esta cuestión, se obtuvieron los mutantes *rga2 bem3 kss1*, *rga2 bem3 fus3* y *rga2 bem3 fus3 kss1* por delección de *KSS1* y *FUS3* en las cepas correspondientes mediante los plásmidos pBC65 y pYEE98, linearizados mediante restricción por las enzimas *EcoRI-SphI* y *NheI-HindIII*, respectivamente, como paso previo a su transformación. Los resultados de la inmunodetección revelaron que la eliminación de cada una de las MAP quinasas suponía una disminución de la fosforilación de Slt2, pero tan sólo la eliminación de ambas conducía a unos niveles similares a los de la cepa silvestre, indicando que ambas MAP quinasas son capaces de transmitir la señal desde Cdc42 hacia Slt2 (**Figura 24**).

8.4. Influencia de las GTPasas tipo Rho en la activación de Slt2: el papel de Rho1.

Una vez demostrada la capacidad de Cdc42 para modular la fosforilación de Slt2 a través de componentes de las rutas de feromonas, invasividad y SVG, nos propusimos estudiar la acción sobre esta MAP quinasa del último componente en la hipotética cascada de activación secuencial de GTPasas que conduce al crecimiento polarizado: la GTPasa Rho1. Hasta ese momento tan solo se había descrito que Rho1 era capaz de unirse a Pkc1 y activarlo (Nonaka y col., 1995; Kamada y col., 1996).

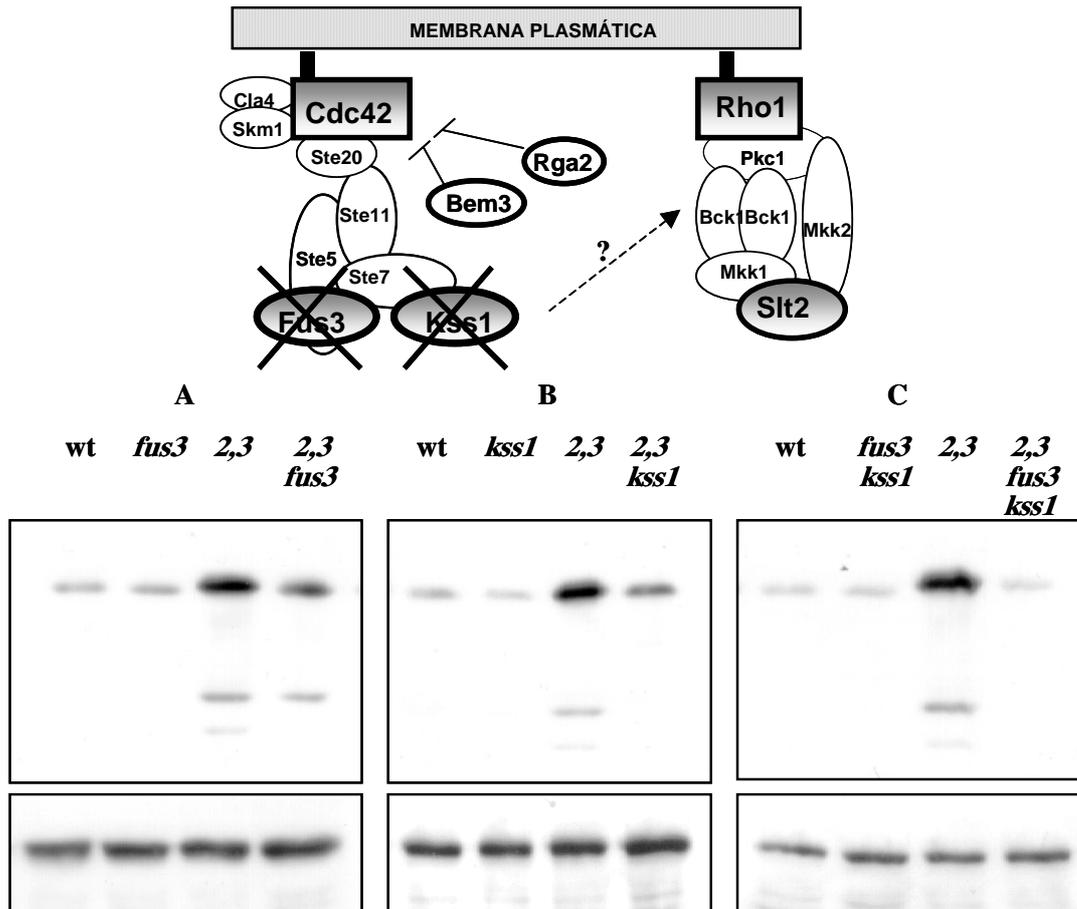


Figura 24. La activación de Slt2 debido a Cdc42 depende de Fus3 y Kss1. (A) Fosforilación de Slt2 en las cepas YTX31 (*fus3*) y YTX32 (*rga2 bem3 fus3*) en comparación con sus respectivas cepas isogénicas silvestres para *FUS3* SY2002 y YGS56. (B) Fosforilación de Slt2 en las cepas YTX27 (*kss1*) y YTX28 (*rga2 bem3 kss1*) en comparación con sus respectivas cepas isogénicas silvestres para *KSS1* SY2002 y YGS56. (C) Fosforilación de Slt2 en las cepas YTX33 (*fus3 kss1*) y YTX34 (*rga2 bem3 fus3 kss1*) en comparación con sus respectivas cepas isogénicas silvestres para *FUS3* y *KSS1* SY2002 y YGS56. Los anticuerpos utilizados son los descritos en la **Figura 18**.

8.4.1. Pérdida de Rho1.

Utilizamos, en primer lugar, la cepa silvestre OHNY y su isogénica HNY21 portadora de un alelo mutante termosensible *rho1-104*. Al ser *RHO1* un gen esencial, la temperatura de 39°C es restrictiva para el crecimiento de los mutantes *rho1-104*. Pudimos comprobar que, mientras el choque térmico a 39°C, como era de esperar, incrementaba la fosforilación en la cepa silvestre, en el mutante *rho1-104* la activación de la ruta por choque térmico está completamente bloqueada: el nivel de fosforilación de Slt2 a 39°C en el mutante es incluso menor que el nivel basal de la cepa silvestre a 24°C

(**Figura 25A**). Aunque los ensayos que se muestran se realizaron exponiendo las células a 39°C durante 45 minutos, 10 minutos son suficientes para bloquear la fosforilación de Slt2 en estos mutantes (datos no mostrados). Tras una hora de incubación a 39°C, el 75% de las células mutantes *rho1-104* seguían siendo viables (como se comprobó por tinción con yoduro de propidio y observación al microscopio de fluorescencia), lo que indica que la pérdida de fosforilación de Slt2 no se debe a la muerte celular, sino al bloqueo de la señalización a través de la ruta.

8.4.2. Sobreexpresión de Rho1.

Para confirmar mejor el papel fundamental que cumple Rho1 en la señalización hacia Slit2 nos preguntamos por el efecto que causaría en la fosforilación de la MAP quinasa la sobreexpresión del gen *RHO1* subclonado en el plásmido multicopia YEplac181. El resultado obtenido complementa al anterior: si la pérdida de Rho1 inhibe la señalización en la ruta, su expresión en multicopia conduce a un aumento de la fosforilación basal de Slit2 en condiciones de incubación de 24 °C (Figura 25B).

8.4.3. Pérdida de las proteínas GAPs de Rho1: Bem2, Sac7 y Bag7.

Por otra parte, aunque se conocía la importancia de Rom2, proteína GEF de Rho1, para el control de la actividad de la GTPasa en respuesta a alteraciones de la pared (Bickle y col., 1998), no se conocía demasiado sobre la posible modulación de la actividad de la ruta de Slit2 por los reguladores negativos de Rho1, sus proteínas GAP. En principio, cabría esperar que la pérdida de estas proteínas estabilizadoras de la forma inactiva de la GTPasa condujera a un incremento de su actividad, y que éste se viera reflejado en un aumento de la señalización a través de la ruta de integridad celular.

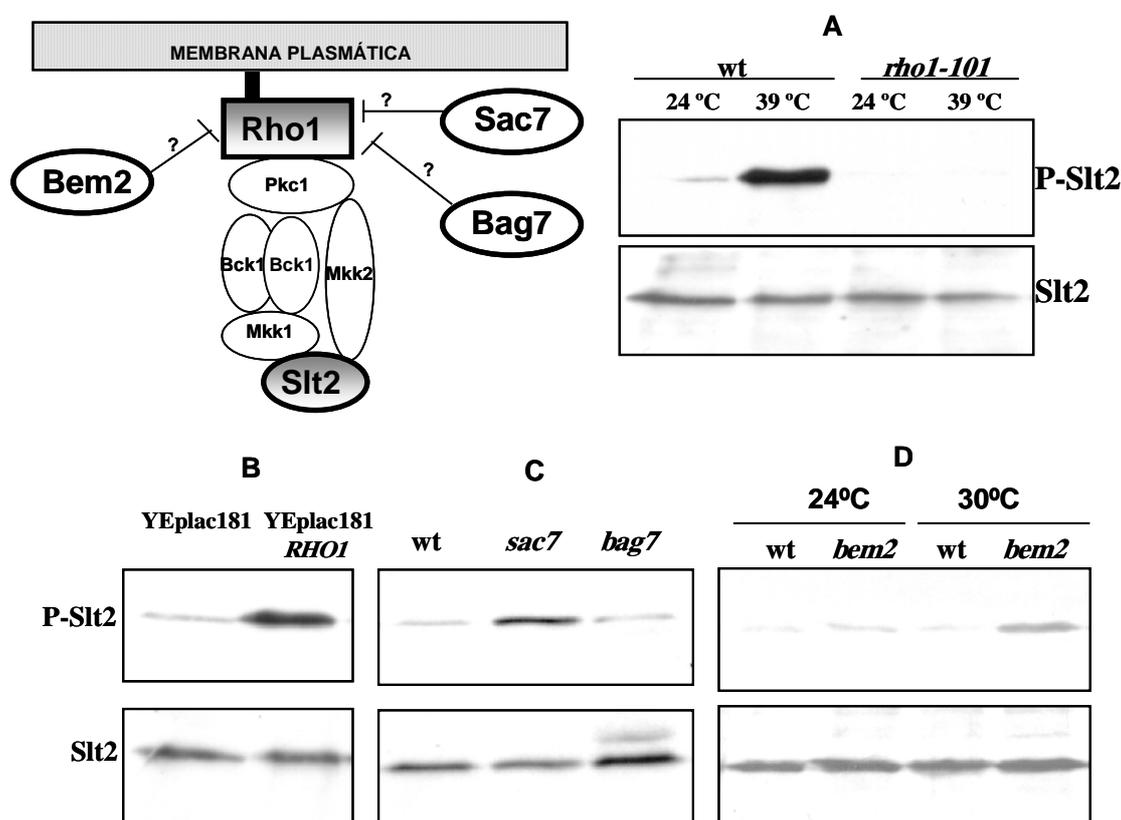


Figura 25. Influencia de la GTPasa Rho1 y sus reguladores negativos (GAPs) sobre la activación de Slit2. (A) Fosforilación de Slit2 en las cepas OHNY (silvestre) y HNY21 (*rho1-101*, alelo termosensible de *RHO1*) cultivadas a 24 °C y tras ser incubadas a la temperatura de 39°C durante 45 minutos. (B) Efecto sobre la fosforilación de Slit2 de la expresión en multicopia de *RHO1* desde el plásmido YEplac181RHO1 en la cepa BJ5464 cultivada a 24°C. (C) Fosforilación de Slit2 en las cepas TB50α (silvestre), AS171-3a (*sac7Δ*) y AS169-2a (*bag7Δ*) cultivadas a 24°C. (D) Fosforilación de Slit2 en cepas Y806 (silvestre) y Y807 (*bem2Δ*) crecidas a 24 y 30°C. Los anticuerpos utilizados son los descritos en la Figura 18.

Bem2 y Sac7 se han identificado como GAPs de Rho1 (Peterson y col., 1994; Schmidt y col., 1997). Además, Bag7 muestra una alta homología con Sac7 y contiene también un dominio GAP para proteínas tipo Rho (Schmidt y col., 1997). Por tanto, se procedió al estudio de la fosforilación de Slt2 en mutantes que no poseían estas proteínas.

En condiciones de incubación a 24°C se pudo observar que únicamente la pérdida de Sac7 conducía al esperado incremento del nivel de Slt2 fosforilado (Figura 25C). Sin embargo, cuando la

incubación se realizaba a 30°C la pérdida de Bem2 también conducía a un aumento en la activación de la MAP quinasa (Figura 25D). En ningún caso se pudo demostrar efecto alguno de la pérdida de la supuesta GAP de Rho1 Bag7 en la activación de la ruta.

8.5. Conexión entre Cdc42 y las quinasas PAK y la ruta de integridad celular.

Una vez mostrado el papel activador de Cdc42 y Rho1 sobre Slt2, nos propusimos comprobar la

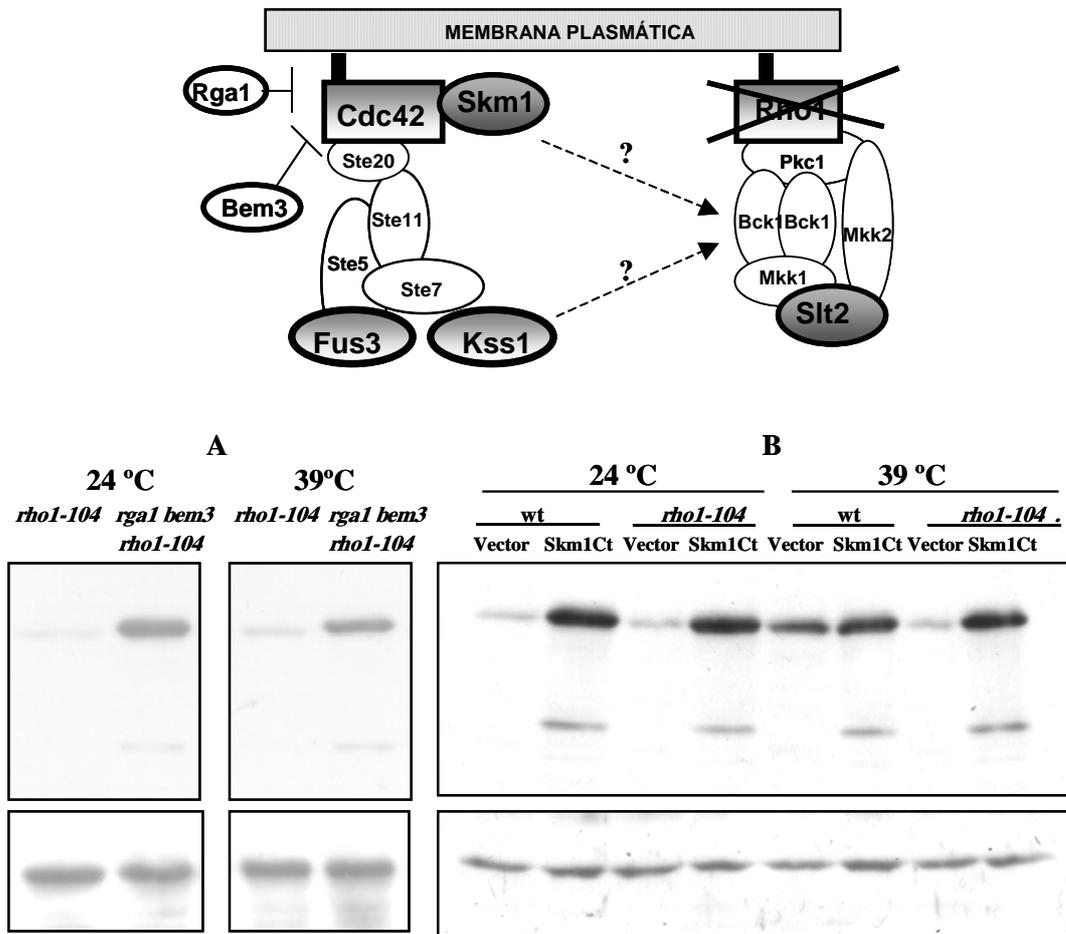


Figura 26. La activación de Slt2 debido a Cdc42 o a la sobreexpresión de las proteínas PAK no depende de Rho1. (A) Fosforilación de Slt2 en cepas HM54 (*rho1-104*) y HM55 (*rga1 bem3 rho1-104*), cultivadas a 24 °C y tras ser incubadas a la temperatura restrictiva de 39°C durante 1 hora. (B) Efecto de la sobreexpresión del dominio carboxilo quinasa de Skm1 desde el plásmido pGSTK7 en la fosforilación de Slt2 en la cepa HNY21 (*rho1-104*) y su isogénica silvestre OHNY a 24°C y a la temperatura restrictiva de 39°C. Las células se crecieron a 24°C en rafinosa hasta fase exponencial y a continuación se añadió galactosa al medio de cultivo hasta concentración final de 2% para inducir la sobreexpresión durante 7 horas. Los anticuerpos utilizados son los descritos en la Figura 18.

hipótesis de la cascada secuencial de GTPasas que conduce al crecimiento polarizado. En otras palabras, ¿la activación de Slt2 debida a Cdc42 –que necesita de las rutas de feromonas-invasividad-SVG– es mediada por Rho1 o los mecanismos que modulan a Slt2 son distintos para cada GTPasa? También nos preguntamos si la acción activadora de las proteínas PAK sobre Slt2 que, a diferencia del caso anterior, no depende de las rutas de feromonas, invasividad o SVG, dependía de la GTPasa Rho1.

8.5.1. Papel de la GTPasa Rho1 en la activación de Slt2 debida a Cdc42.

Para resolver esta cuestión se recurrió al mutante *rgal bem3 rho1-104*, obtenido mediante genética clásica por el Dr. Martín en nuestro laboratorio a partir del mutante *rgal bem3 (MAT α)* y la cepa HM54, *rho1-104 (MAT α)*. La elevada activación de Slt2 en el triple mutante es similar a 24°C (temperatura permisiva para la mutación *rho1-104*) y a 39°C (temperatura restrictiva) (**Figura 26A**), lo que permite afirmar que, incluso en mutantes *rho1*, Cdc42 activo es capaz de provocar la activación de Slt2.

Como comprobación adicional de que la elevada fosforilación de Slt2 en el mutante *rgal bem3 rho1-104* se debía efectivamente a la activación de Cdc42, se procedió a la obtención del cuádruple mutante *rgal bem3 rho1-104 ste7*, mediante la interrupción del gen *STE7* con el plásmido integrativo pNC113 (procedimiento

descrito previamente). La eliminación de la transmisión de la señal a través de las rutas de feromonas, invasividad y SVG debería reducir los niveles de fosforilación del mutante a su nivel basal. Sin embargo, tras analizar 60 transformantes con el plásmido integrativo pNC113, ninguno de ellos resultó estar interrumpido en el gen *STE7*, lo que hace pensar que el cuádruple mutante sea inviable.

8.5.2. Papel de la GTPasa Rho1 en la activación de Slt2 debida a las proteínas PAK.

A diferencia de lo que ocurría en los mutantes en las proteínas GAP, en los que la activación de Slt2 desaparecía al eliminar la transmisión a través de Ste7, la activación debida a la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1 no desaparece al eliminar este componente. Esto hace pensar que quizá se esté produciendo un cruce de rutas: la sobreexpresión del extremo C-terminal de Skm1 y de las otras PAK produciría un efecto múltiple sobre varias rutas. Quizá ese dominio quinasa se comportaría como una MAPKKKK inespecífica que activaría a cualquier otra MAPKKK, aunque no correspondiera a su ruta. Para confirmar si realmente se estaba produciendo un cruce entre rutas y que la señal no venía transmitida a través de la GTPasa Rho1, se procedió a sobreexpresar el extremo quinasa de Skm1 en un mutante termosensible *rho1-104*. La hiperfosforilación de Slt2 se mantenía incluso a la temperatura restrictiva (**Figura 26B**), lo que indica que, efectivamente, no depende de Rho1.

9. ESTUDIOS DE SENSIBILIDAD A ROJO CONGO DE DIVERSOS MUTANTES.

A lo largo de los estudios de activación de la MAP quinasa Slt2 en distintos mutantes y bajo diversas condiciones, parece claro que la sucesiva eliminación de las proteínas GAP –inactivadoras– de Cdc42 se corresponde con un progresivo aumento en la fosforilación de la MAP quinasa. También se ha observado que la fosforilación basal de Slt2 en mutantes *ste7* y *kss1* varía dependiendo de la fuente de carbono. La activación de Slt2 se produce en

momentos de crecimiento polarizado, pero también como respuesta a daños en la pared celular. En este último caso tiene lugar el denominado “mecanismo compensatorio”, por el que la ruta se activa para inducir la transcripción de genes que colaboran al reforzamiento de la pared celular en respuesta al daño producido. Por esto, nos pareció de interés observar la sensibilidad de estos mutantes a una sustancia que causa daños en la pared celular, como

es el rojo Congo, y en presencia de distintas fuentes de carbono, como son la glucosa y la galactosa.

9.1. Mutantes defectivos en las proteínas GAP de Cdc42.

Se sembraron en placas de medio mínimo con rojo Congo a concentración de 150 µg/ml diluciones decimales seriadas de cultivos de las cepas mutantes *rga1*, *rga2*, *bem3*, *rga1 rga2*, *rga1 bem3*, *rga2 bem3* y *rga1 rga2 bem3*, junto con su cepa isogénica silvestre. Tras cuatro días de incubación a 24°C, el resultado fue que todos los mutantes presentaban la misma sensibilidad a rojo Congo que la cepa silvestre, excepto el triple mutante, que presentaba una ligera sensibilidad.

Esto parecía indicar que este mutante podría presentar alteraciones en la pared celular, por lo que fue estudiado más detenidamente: se realizó este mismo experimento pero esta vez tan sólo con el triple mutante en las proteínas GAP y el cuádruple mutante *rga1 rga2 bem3 ste7*, con el fin de comprobar si la hiperactivación de las rutas de feromonas, invasividad y SVG era la causante de esta sensibilidad. A la vista de la importancia que

presenta la fuente de carbono para la activación de Slt2, el experimento se realizó también en galactosa. El resultado obtenido (Figura 27) fue que la sensibilidad a rojo Congo del triple mutante en las GAP era eliminada por la mutación *ste7*. Sin embargo, en galactosa se producía un efecto curioso: el triple mutante *rga1 rga2 bem3* mostraba mayor resistencia que la cepa silvestre, y si se le añadía la mutación *ste7*, la sensibilidad era más acusada que en el caso de la cepa silvestre.

9.2. Mutantes en las rutas de feromonas, invasividad y SVG.

Se repitió el ensayo anterior de sensibilidad a rojo Congo en los mutantes *ste7*, *kss1* y *fus3 kss1*, todos ellos procedentes del fondo genético YPH499, en el que se habían observado en un primer momento las diferencias en la activación basal de Slt2. El resultado (Figura 28) muestra un crecimiento ligeramente mayor de los mutantes *fus3* y *fus3 kss1* en glucosa. Sin embargo, estos mismos mutantes manifiestan mayor sensibilidad a rojo Congo en galactosa y son los mutantes *ste7* y *kss1* los que muestran mayor resistencia en esta fuente de carbono. Es de destacar que, una vez más, que el cambio de la fuente de carbono invierte la

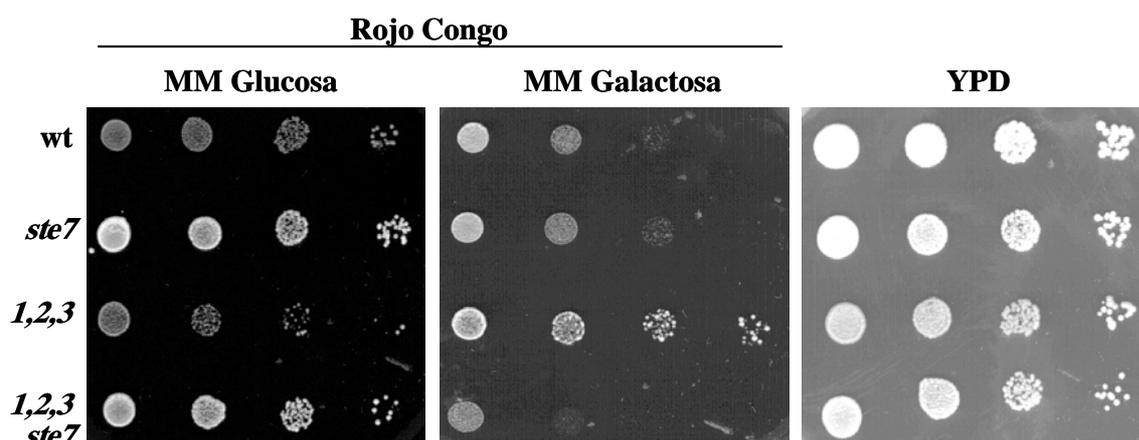


Figura 27. Sensibilidad del mutante *rga1 rga2 bem3* a rojo Congo en distintas fuentes de carbono. Crecimiento en medio mínimo con glucosa o galactosa y rojo Congo a concentración 150 µg/ml y en YPD de diluciones decimales seriadas de cultivos de las cepas YTX10 (*ste7*), YGS57 (*rga1 rga2 bem3*) y YTX24 (*rga1 rga2 bem3 ste7*) frente a su isogénica silvestre SY2002 (wt). El resto de mutantes defectivos en las proteínas GAP mostraron el mismo comportamiento en rojo Congo que la cepa silvestre.

sensibilidad de los mutantes a rojo Congo.

Se realizó el mismo ensayo pero utilizando un nuevo fondo genético, el SEY6211: se estudió la sensibilidad a rojo Congo de mutantes implicados en la ruta SVG y en la de integridad celular: *ste7*, *kss1*, *slt2*, *kss1 slt2*, *ste20*, *ste20 skm1*, la cepa isogénica silvestre para todos ellos y esta misma cepa transformada con un plásmido portador del alelo hiperactivo *bck1-20*.

El crecimiento a 24 °C durante cuatro días permitió las siguientes observaciones (**Figura 29**): los mutantes *ste20*, *ste20 skm1* y *kss1* mostraron una sensibilidad idéntica a la de la cepa silvestre. Sin embargo, el mutante *ste7*, a pesar de manifestar un crecimiento mas lento en YPD, mostró en glucosa un importante aumento en la resistencia a rojo Congo, mientras que el mutante *slt2* mostró un aumento moderado, idéntico al del doble *kss1 slt2* y la hiperactivación de la ruta de SlT2 causada por el transformante con el alelo hiperactivo *bck1-20* no se correspondió con un aumento en la resistencia a rojo congo. Hay que reseñar que los mutantes *slt2* son habitualmente muy sensibles a rojo Congo (**Figura 30**), y que la resistencia que presentan en este fondo genético parece un caso excepcional. Una vez más,

el patrón de sensibilidad a rojo Congo se vio invertido en galactosa: mutantes *ste7* y *slt2* son más sensibles, aunque es de destacar que el doble *kss1 slt2* no lo es.

Por azar, a partir de una amplificación mediante PCR del ORF del gen *KSS1* realizada sobre DNA genómico de la cepa SEY6211 por un integrante de nuestro Departamento, pudimos comprobar que esta cepa muestra una mutación en dicho ORF que causa un cambio en el marco de lectura y la producción de una proteína Kss1 no funcional. Para comprobar si esta ausencia de Kss1 influía en la elevada resistencia que mostraban los mutantes *ste7* en este fondo genético, se transformó dicho mutante con el plásmido multicopia YEp352KSS1, que expresa el gen de esta MAP quinasa desde su propio promotor. Efectivamente, el mutante *ste7* en el fondo SEY6211 con la mutación *kss1* complementada por este plásmido mostró similar sensibilidad a rojo Congo que la cepa silvestre (**Figura 29C**). Esto ponía de manifiesto que las mutaciones *ste7* y *kss1* por separado no conferían resistencia a rojo Congo a esta cepa, pero sí la combinación de ambas. De nuevo, en galactosa el patrón de sensibilidad a rojo Congo se invirtió.

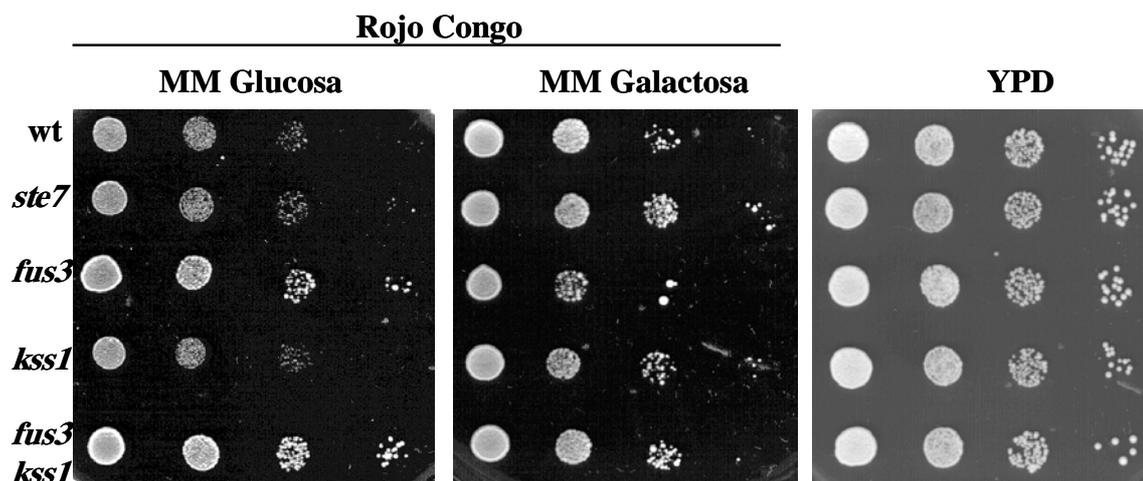


Figura 28. Sensibilidad a rojo Congo de mutantes en la ruta de feromonas y de pseudofilamentación en distintas fuentes de carbono. Crecimiento en medio mínimo con glucosa o galactosa y rojo Congo a concentración 150 µg/ml y en YPD de diluciones decimales seriadas de cultivos de las cepas JTY2556 (*ste7*), JTY2519 (*fus3*), JTY2520 (*kss1*) y JTY2516 (*fus3 kss1*) frente a su isogénica silvestre YPH499 (wt).

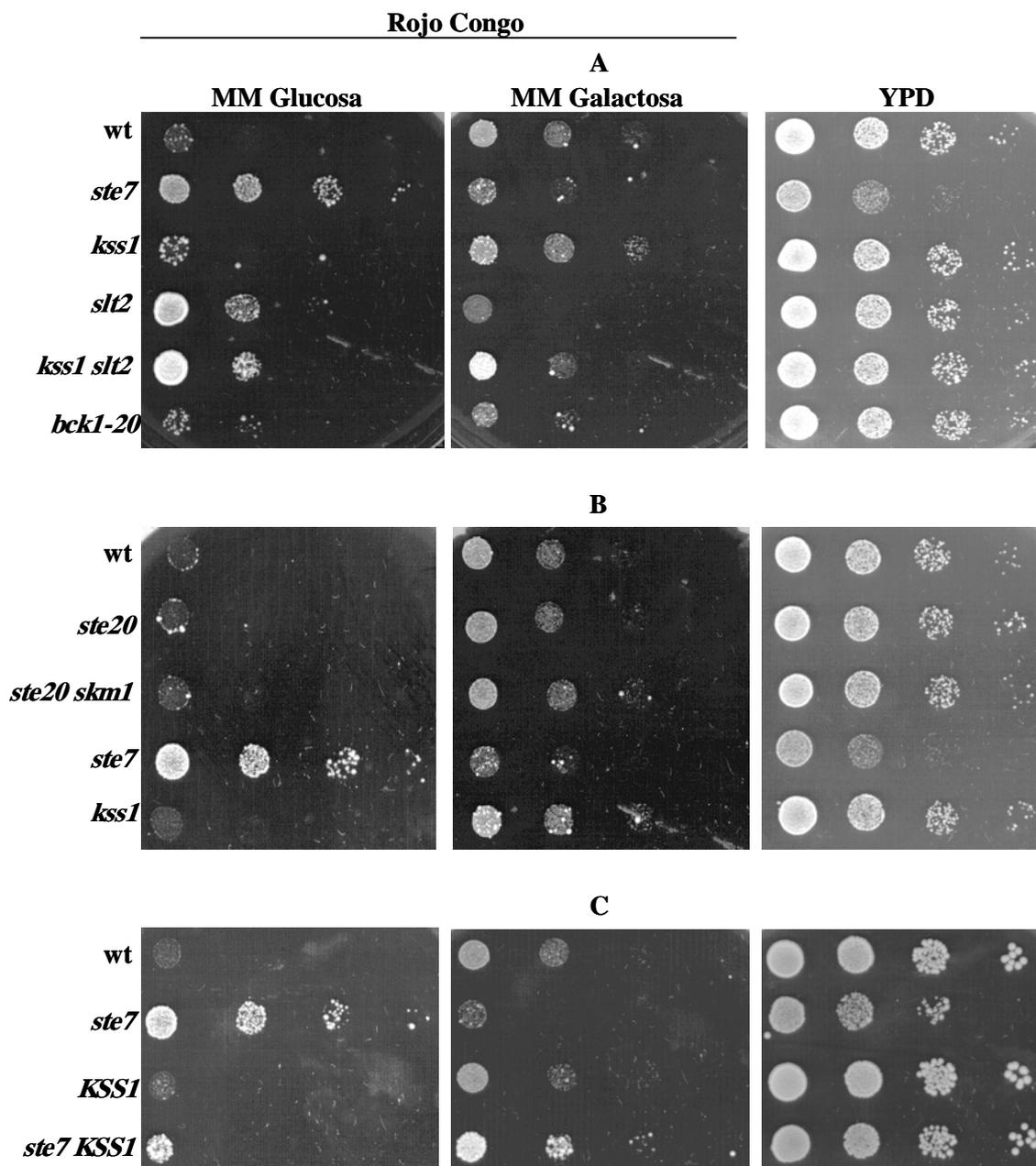


Figura 29. Sensibilidad a rojo Congo de diversos mutantes en las rutas SVG y de integridad celular en el fondo genético SEY6211 en distintas fuentes de carbono. (A) Crecimiento en medio mínimo con glucosa o galactosa y rojo Congo a concentración 150 µg/ml y en YPD de diluciones decimales seriadas de cultivos de las cepas YTX40 (*ste7*), HM51 (*kss1*), HM52 (*slt2*), HM53 (*kss1 slt2*) y silvestre transformada con el plásmido pRS316BCK1-20, todas frente a su isogénica silvestre SEY6211 (wt). (B) *Idem* con las cepas HM37 (*ste20*), HM38 (*ste20 skm1*), YTX40 (*ste7*) y HM51 (*kss1*) frente a la cepa isogénica silvestre SEY6211 (wt). (C) *Idem* con las cepas YTX50 (*ste7*), y las cepas silvestre y YTX50 transformadas con el plásmido YEp352KSS1 (*KSS1* y *ste7 KSS1*, respectivamente) frente a la cepa isogénica silvestre SEY6211 (wt).

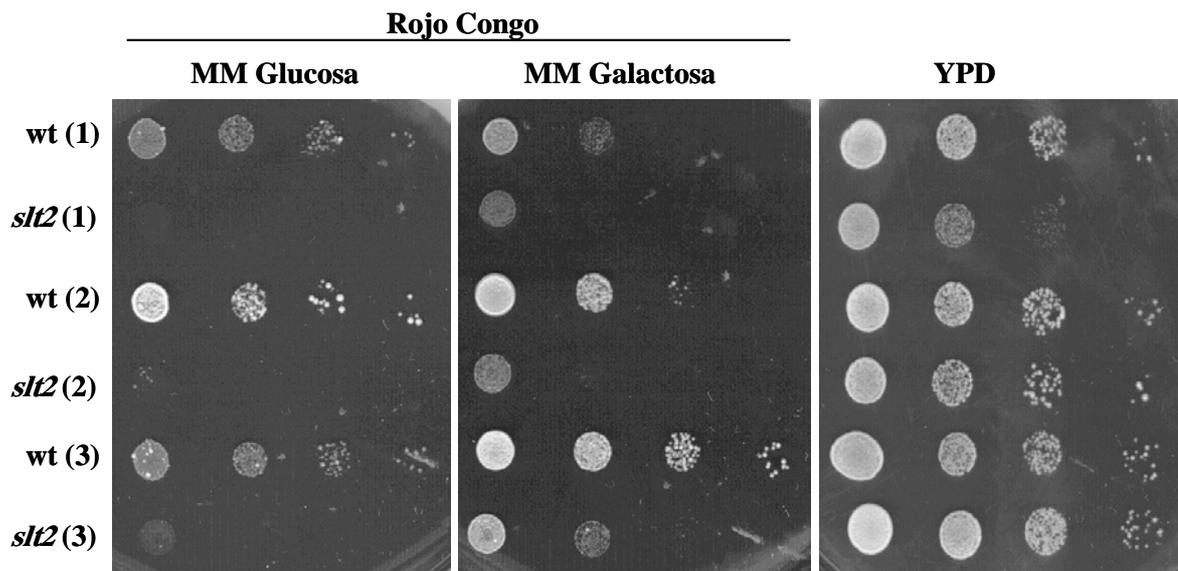


Figura 30. Sensibilidad a rojo Congo y en distintas fuentes de carbono de mutantes *slt2* en diferentes fondos genéticos. Crecimiento en medio mínimo con glucosa o galactosa y rojo Congo a concentración 150 $\mu\text{g/ml}$ y en YPD de diluciones decimales seriadas de cultivos de las cepas (1) BJ5464-DK (*slt2*) y su isogénica silvestre BJ5464, (2) DL454 (*slt2*) y su isogénica silvestre 1783, y (3) FY67928C-DK (*slt2*) y su isogénica silvestre FY67928C.

DISCUSIÓN

1. POSIBLE FUNCIÓN BIOLÓGICA DE Skm1.

1.1. Ausencia de fenotipo detectable en mutantes *skm1*.

En “Antecedentes y Objetivos” se comentaban diversos ensayos a los que fueron sometidos los mutantes *skm1* con el fin de aportar alguna luz sobre su posible papel en la fisiología celular. Ninguno de esos estudios permitió observar diferencias en el comportamiento de las cepas mutantes y sus correspondientes isogénicas silvestres. En esta memoria se han reseñado algunos ensayos fenotípicos adicionales realizados sobre mutantes *skm1* y, en algunos casos, también sobre mutantes *ste20* y *cla4*. Estos estudios han conducido a similar resultado: concretamente, Skm1 no parece estar implicado en la estructura y composición de la pared celular, la respuesta a estrés oxidativo, la fisiología del calcio o en funciones relacionadas con el crecimiento (tan sólo el mutante *cla4*, y no *skm1* o *ste20*, mostró una cierta ralentización en el crecimiento).

El estudio de la expresión de *SKM1* mediante las técnicas de “Northern blotting” y “Western blotting” eliminó la duda de que en realidad estuviéramos estudiando un gen que no se transcribía y ello fuera la causa de la ausencia de un fenotipo detectable. Estos ensayos permitieron, además, comprobar que la expresión de este gen es relativamente baja, aunque variable según las cepas, y que ni la presencia de feromona ni la activación de la GTPasa Cdc42, con la que se ha mostrado su interacción mediante el sistema “dos híbridos”, influían en su transcripción.

Por tanto, ni los ensayos fenotípicos ni los de expresión aportaron ninguna pista importante acerca de la función de Skm1. Para apuntar una posible hipótesis acerca de la ausencia de fenotipo de estos mutantes es necesario contemplar el alto grado de homología que presentan las proteínas PAK entre sí, y que posiblemente permite el solapamiento de funciones y, si llega el caso, la casi completa sustitución de una proteína por otra. El mutante *ste20*, aparte de presentar un fenotipo de esterilidad, presenta un crecimiento y morfología

normales; el mutante *cla4*, como hemos descrito, presenta un ligero enlentecimiento del crecimiento y además, algunos defectos morfológicos (yemas alargadas, cuellos engrosados), pero también es perfectamente viable; sin embargo, la doble mutación *ste20 cla4* resulta letal (Cvrcková y col., 1995) y provoca graves defectos en la polarización del citoesqueleto de actina (Holly y Blumer, 1999). Resulta llamativo que ambas mutaciones por separado presenten ligeros defectos en aspectos morfológicos o de crecimiento (*cla4*) o en ninguno de ellos (*ste20*), y que la combinación de ambas produzca células completamente inviables. Parece claro, por tanto, que ambas proteínas PAK están a cargo de funciones esenciales para la célula, como son el control del citoesqueleto de actina durante el crecimiento polarizado y el paso de crecimiento apical de la yema a isotrópico durante la gemación (Holly y Blumer, 1999; Johnson, 1999), pero que cada una de ellas es capaz de reemplazar a la otra cuando está ausente. También es cierto que este reemplazo no es total: Cla4 podría estar compensando totalmente cualquier defecto morfogénico que ocasionara la pérdida de Ste20, aunque es incapaz de restaurar el defecto en apareamiento que esta pérdida supone. Por ello éste último sería el único fenotipo distinguible en mutantes *ste20*. Por otra parte, Ste20 es capaz de mantener el crecimiento de un cultivo de células *cla4*, si bien este crecimiento es ligeramente más lento y algunas de las células muestran el fenotipo típico del defecto en el paso de crecimiento apical a isotrópico (yemas alargadas).

¿Y Skm1? Esta tercera proteína PAK presenta alta homología con el resto de la familia, en especial con Cla4 (ambas poseen un dominio PH que no presenta Ste20). La pérdida de Skm1 no parece causar fenotipo morfológico alguno, ni tampoco en crecimiento, al igual que ocurre con Ste20. Sin embargo, no parece, como ésta última, estar implicada en la ruta de apareamiento (ver “Antecedentes y Objetivos”), y los mutantes *skm1 ste20* y *skm1 cla4* no muestran diferencias respecto a los mutantes sencillos *ste20* y *cla4*. Es posible que la

función de Skm1 esté relacionada también con la polarización del citoesqueleto de actina y el desarrollo de la yema, como ocurre con sus homólogas en levadura (y también en mamíferos), pero su pérdida pueda ser compensada por la presencia de una sola de las otras dos proteínas PAK. La única manera de comprobar esta hipótesis sería obtener el triple mutante *skm1 ste20 cla4*, pero el doble *ste20 cla4* ya es inviable. Todo esto parece indicar que, o bien la función de Skm1 es similar a la de sus homólogas, pero en mucho menor grado de importancia en comparación con Ste20 y Cla4 por separado, o bien su función es distinta a pesar de su alta homología con ellas, siendo necesaria en condiciones no ensayadas. El hecho de no encontrar mutaciones letales en un fondo deletado en *SKM1* mediante un rastreo utilizando 5-FOA sigue apuntando a un posible solapamiento de funciones con las otras dos proteínas PAK.

1.2. El fenotipo de sobreexpresión de Skm1 es similar al de sobreexpresión de Cdc42 activo.

Otro abordaje experimental para la búsqueda de la función de Skm1 fue su sobreexpresión bajo el control de un promotor inducible por galactosa. Las células grandes, redondas, multigemadas y multinucleadas que se obtuvieron parecían poner de manifiesto que la polaridad se había alterado en estas células (aparecían grandes y redondas), que la célula madre era capaz de acometer sucesivos ciclos celulares sin haberse desprendido aún de las yemas generadas anteriormente (múltiples yemas, múltiples núcleos en la célula madre), y que estas yemas, además, parecían detenidas en G1, lo que apuntaba hacia un posible defecto asimétrico entre la madre y las hijas. Este fenotipo parecía relacionar a Skm1 con la generación de la polaridad en el crecimiento, con la selección del sitio de gemación (las yemas a menudo aparecen al azar), con la formación de la yema y, si bien no con la mitosis (las yemas poseen todas núcleo y la septación se ha completado), sí con el proceso de separación de las yemas de la célula madre. El fenotipo morfológico de multigemación se ha descrito en mutantes defectivos en genes relacionados con la membrana o la pared celular:

mutantes en el gen de la ATPasa de membrana Pma1 (McCusker y col., 1987), la quitín-sintasa I Chs1 (Bulawa y col., 1986) o la GTPasa implicada en secreción Ypt1 (Schmitt y col., 1986). Pero quizá lo más interesante es que la sobreexpresión de Cdc42 activado produce un fenotipo similar de células multigemadas con gemación al azar (Ziman y col., 1991; Zhao y col., 1995), si bien en este trabajo hemos comprobado que este fenotipo aparece mezclado con el de células grandes, redondas, multinucleadas y sin yemas. Esto, unido a la interacción física mostrada entre Cdc42 y Skm1, podría situar a ambas proteínas en una misma ruta en la que Skm1 sería un efector de esta GTPasa.

La hiperactivación de algunas rutas de MAP quinasas en *S. cerevisiae* provoca fenotipos que se asemejan al de sobreexpresión de Skm1: la sobreexpresión de un alelo hiperactivo de Mkk1 induce la formación de células multigemadas (Watanabe y col., 1995); la sobreexpresión de Ste12 o de un alelo hiperactivo de Ste11 provoca la formación de células grandes y redondeadas (Dolan y Fields, 1990; Stevenson y col., 1992). Por otra parte, la sobreexpresión de diferentes fragmentos de Skm1 y de un alelo catalíticamente inactivo de éste condujo a la conclusión de que era la actividad quinasa de la proteína la causante de su fenotipo. Era una hipótesis interesante suponer que entre los posibles sustratos fosforilables por Skm1 podrían encontrarse algunos componentes de las rutas de MAP quinasas cuya hiperactivación conduce a fenotipos similares al de multigemación. Sin embargo, pudimos comprobar que la sobreexpresión de Skm1 en cepas mutantes en las que se había eliminado la transmisión de la señal a través de las rutas de integridad celular, de respuesta a feromonas o de respuesta a alta osmolaridad, conducía al mismo fenotipo, indicando que la multigemación no se debía a la hiperactivación de alguna de estas rutas, al menos individualmente.

¿Qué puede estar ocurriendo cuando se sobreexpresa Skm1? El hecho de que el fenotipo de sobreexpresión de Skm1 sea similar, al menos en parte, al de Cdc42 activado nos da una pista. Si Skm1 es realmente un efector de Cdc42 activo,

como parece apuntar su homología con miembros de la familia PAK y, especialmente, la interacción de su dominio CRIB con la GTPasa mediante el sistema de “dos híbridos”, su sobreexpresión puede estar provocando efectos similares a la de Cdc42 en estado activado. El papel esencial de Cdc42 en el establecimiento del crecimiento polarizado provoca que su sobreexpresión cause una polarización del crecimiento en todas direcciones que conduce a las células grandes y redondeadas, a una selección múltiple y al azar de los sitios de gemación que conduce a la formación de múltiples yemas y, por alguna causa desconocida, a un defecto en la separación de estas yemas – quizá la continua formación de yemas sobrepone la emergencia de la nueva a la separación de la anterior, cuyo ciclo quedaría paralizado en G1 -. Estos efectos se corresponden perfectamente con los observados en la sobreexpresión de Skm1. Por otra parte, el hecho de que las yemas, a pesar de poseer núcleo y haber finalizado el proceso de septación (son separadas fácilmente de la madre por sonicación o micromanipulación), no sean viables, indica que algún mecanismo importante ha fallado en su generación. Quizá la sobreexpresión de Skm1 induce una gemación brusca y desacoplada de otros eventos no morfogénicos pero igualmente importantes para la futura viabilidad de las células hijas aisladas de la madre.

Los efectos morfogénicos de esta sobreexpresión, y el hecho de que dependan de la actividad quinasa de Skm1, sugieren que quizá esta proteína está fosforilando a algún efector relacionado con el citoesqueleto de actina. Cla4 y Ste20 son capaces de fosforilar “in vitro” a las miosinas Myo3 y Myo5 (Wu y col., 1997), por lo que estas miosinas aparecen como posibles efectores para Skm1 y mediadoras para la producción de su fenotipo de sobreexpresión.

1.3. Función regulatoria del extremo N-terminal de Skm1.

El extremo N-terminal de Skm1 parece estar cumpliendo una función inhibitoria sobre la PAK, tal y como se ha descrito previamente en

mamíferos (Zhao y col., 1998). Esto pudo comprobarse mediante la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1, que produjo un efecto mucho más drástico que el de la proteína completa: células grandes, redondeadas, sin yemas, y ausencia de crecimiento. Apoyando la hipótesis de una misma ruta para Cdc42 y Skm1, este fenotipo también se observa, mezclado con el de multigemación, en la sobreexpresión del alelo activado de la GTPasa. La eliminación del extremo N-terminal regulatorio de Skm1 quizá tiene un efecto hiperactivador de las funciones de la proteína, y su sobreexpresión, en este caso, provoca una polarización del crecimiento en todas direcciones que agudiza el fenotipo de células grandes y redondeadas, y que oculta, por tanto, el posible efecto polarizador –unidireccional– de la proteína en condiciones fisiológicas normales. Es posible que la célula quede paralizada en este paso morfogénico y, por ello, además quede impedida la subsiguiente gemación.

El hecho de que la sobreexpresión de este alelo truncado de *SKM1*, y no el gen completo, sea capaz de complementar el defecto en apareamiento de un mutante *ste20*, parece dar a este extremo N-terminal de las proteínas PAK un papel no sólo en la regulación de su actividad quinasa, sino también en la determinación de la especificidad de sus sustratos.

1.4. Skm1 interacciona con Cdc42 mediante el sistema “dos híbridos”.

La inclusión de Skm1 dentro de la familia de proteínas PAK suponía la posibilidad de una interacción física entre ésta y la GTPasa Cdc42. Todas las proteínas PAK (a excepción de Pak4, en mamíferos) poseen un dominio CRIB en su extremo N-terminal que posibilita, en teoría, esta interacción.

Para comprobar esta posible interacción y para buscar otras proteínas que interaccionasen físicamente con Skm1 *in vivo* se recurrió al sistema de “dos híbridos”. En los sistemas utilizados se emplean dos genes “reporter” para detectar la interacción: un gen que permite el crecimiento de la cepa en un medio para el que es auxótrofa (*LEU2*, *HIS3*) y el gen *lacZ*. Habitualmente, se considera

que existe interacción entre dos proteínas cuando se produce transcripción de ambos genes “reporter”. En el estudio de la posible interacción entre Skm1 y Cdc42 se pudo comprobar que sólo el fragmento que comprendía los aminoácidos 109-184 de Skm1 (que incluye el dominio CRIB y secuencias flanqueantes, pero no incluye parte del dominio PH o el dominio quinasa) era capaz de permitir el crecimiento en medio sin histidina en presencia de todos los alelos ensayados de Cdc42, y tan sólo en el caso del alelo activo constitutivamente y no prenilable de la GTPasa se produjo además expresión de β -galactosidasa. Hay que destacar que no se detectó interacción alguna, ni siquiera crecimiento en medio sin histidina, con los alelos ensayados de las GTPasas Rho1 y Bud1, lo que muestra la especificidad de esta interacción.

Así pues, se había detectado una interacción por dos híbridos entre Skm1 y Cdc42, si bien esta interacción parecía únicamente observable en condiciones muy restringidas: tan sólo un pequeño fragmento de Skm1 y un alelo hiperactivo e imposibilitado para su unión a membrana de Cdc42. ¿Es este resultado significativo?

En primer lugar hay que resaltar la dificultad intrínseca del sistema “dos híbridos” para detectar interacciones con proteínas asociadas a membranas. Para que el sistema funcione es necesario que el complejo formado por ambas proteínas ensayadas se transloque al núcleo para allí activar la transcripción de los correspondientes genes “reporter”. Habitualmente, las proteínas que se estudian son fusionadas a señales de localización nuclear que permiten este paso, pero en el caso de proteínas ancladas en membranas, como las GTPasas, esta señal de localización nuclear se revela insuficiente para conseguir la translocación, con la consiguiente imposibilidad de transcripción y de detección del resultado positivo. Por otra parte, si repasamos los estudios de interacción mediante el sistema de “dos híbridos” entre la GTPasa Cdc42 y las otras proteínas PAK, Ste20 y Cla4, encontramos lo siguiente: en Simon y col. (1995) se describe la interacción entre un fragmento que comprende los

aminoácidos 319-496 de Ste20 (que incluyen el dominio CRIB y secuencias flanqueantes, pero ningún otro dominio de función conocida) y distintos alelos de Cdc42: silvestre, no prenilable, y dos alelos activados y no prenilables (entre ellos el alelo *cdc42*^{G12V Δ Ct}, utilizado en este trabajo). Los autores detectan expresión de β -galactosidasa en todos los casos, si bien en el caso del alelo no prenilable la interacción es tres veces más intensa que con el alelo silvestre, y con los alelos hiperactivos y no prenilables es entre 6 y 7 veces más intensa. Cvrcková y col. (1995), muestran la interacción entre Cdc42 y Cla4: la proteína PAK completa tan sólo produce expresión de β -galactosidasa junto al alelo hiperactivo y no prenilable de Cdc42; sin embargo, el fragmento que comprende los aminoácidos 174-294 de Cla4 (que incluye, una vez más, el dominio CRIB y secuencias flanqueantes, pero no otros dominios funcionales) muestra ligera interacción con el alelo silvestre de Cdc42 e interacciones 30 veces y 80 veces más intensas frente a los alelos no prenilable y el hiperactivo y no prenilable, respectivamente. Es necesario destacar que estos resultados fueron obtenidos utilizando un sistema de “dos híbridos” basado en la proteína LexA, más sensible que los basados en el factor de transcripción Gal4 y, de hecho, nuestra primera elección para realizar los ensayos, pero que en nuestras manos no dio buen resultado. Así pues, parece deducirse que la interacción más potente se produce en todos los casos entre un fragmento N-terminal de las proteínas PAK que incluye el dominio CRIB y el alelo no prenilable e hiperactivo de Cdc42, resultado comparable al obtenido para Skm1, si bien la interacción de esta PAK con Cdc42 parece más débil que las de Cla4 o Ste20.

Posteriormente a nuestro estudio, Richman y col. (1999), utilizando de nuevo un sistema basado en LexA, han comparado las interacciones de las tres PAK con la GTPasa, obteniendo una interacción débil (4.3 unidades de Miller) para Skm1 con Cdc42 no prenilado, que aumenta diez veces (43.3 unidades de Miller) para el caso del alelo hiperactivo y no prenilable de Cdc42. Es interesante que estos autores

detectan una interacción 60 veces mayor que la de Skm1 con Cla4 y el alelo no prenilable de Cdc42, y que en el caso de Ste20, la interacción es 100 veces mayor. Así pues, parece claro que la interacción entre Skm1 y Cdc42 es débil, más débil que la de las demás proteínas PAK, que implica a la zona que contiene el dominio CRIB de Skm1 y que prácticamente sólo se manifiesta cuando Cdc42 se encuentra en su estado activo. Skm1, por tanto, podría comportarse como efector de Cdc42 activado.

Para confirmar la teoría de que las proteínas PAK poseen un dominio de autoinhibición de su actividad quinasa solapado con su dominio CRIB, se procedió al estudio de la posible interacción entre el dominio CRIB de Skm1 y su dominio catalítico mediante el sistema de “dos híbridos”. Se obtuvo crecimiento en medio sin histidina, pero no producción de β -galactosidasa, por lo que se concluyó que la interacción, de haberla, era muy débil o implicaba a una región muy concreta del dominio quinasa.

También se rastrearon genotecas a la búsqueda de posibles proteínas que interaccionaran con los extremos N-terminal o C-terminal (catalítico) de Skm1, pero no se obtuvieron resultados positivos. Esto parece indicar que las interacciones de Skm1 con otras proteínas son débiles y se necesita estudiar regiones más pequeñas y concretas de la proteína. Tratándose de una proteína que se asocia a Cdc42, tampoco se puede descartar la posibilidad de interacción de Skm1 con otras proteínas asociadas a membrana, y que estas interacciones no se hayan observado por los problemas que plantean estas proteínas para su detección mediante el sistema “dos híbridos” y que han sido previamente comentados.

1.5. Diversos efectos de la sobreexpresión de Cdc42 activo y Skm1.

El efecto de la sobreexpresión del alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V}, como se ha descrito, condujo a un fenotipo mezcla de dos tipos morfológicos: células grandes, redondas y multigemadas (típico de la sobreexpresión de Skm1), y células grandes y

redondas sin yemas, con ausencia de crecimiento (típico de la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1). Es interesante resaltar que este segundo tipo morfológico es muy similar al que exhiben los mutantes *cdc42-1* a 37°C, en los que se produce una completa pérdida de la polarización en el crecimiento. Parece, por tanto, que la sobreexpresión de *cdc42*^{G12V} es capaz de activar, entre sus varios efectores, a Skm1, provocando la mezcla de fenotipos típicos de Skm1 completo o de su dominio catalítico. La intensidad del fenotipo letal de cosobreexpresión de *cdc42*^{G12V} y Skm1 parece apuntar a un efecto aditivo de ambas sobreexpresiones en la misma dirección y, de nuevo, a que Skm1 actúa como efector de la GTPasa. Esta última hipótesis viene apoyada, además, por el hecho de que la sobreexpresión de Skm1 permite un ligero crecimiento de los mutantes termosensibles *cdc42-1* a 37°C.

Las mutaciones en los genes de las proteínas PAK no lograron eliminar el fenotipo de sobreexpresión de *cdc42*^{G12V}, lo que conduce a la conclusión de que este fenotipo es producido a través de múltiples efectores de Cdc42, o que a Cdc42 le basta con una sola de las proteínas PAK para provocarlo. Mutantes *ste20* y *ste11*, sin embargo, mostraron un leve alivio del fenotipo de sobreexpresión de *cdc42*^{G12V}, lo que parece indicar que, al menos en una pequeña parte, el efecto es conducido a través de la ruta de feromonas o de invasividad. Recordemos que la sobreexpresión de Ste12 o de un alelo hiperactivo de Ste11 conduce a la formación de células grandes y redondeadas (Dolan y Fields, 1990; Stevenson y col., 1992). Que el efecto letal de la sobreexpresión de *cdc42*^{G12V} o del dominio quinasa de Skm1 sea imposible de eliminar mediante la sobreexpresión de otros genes o recurriendo a procesos de mutagénesis pone claramente de manifiesto los efectos pleiotrópicos de estas sobreexpresiones. El mismo resultado negativo se obtiene, por ejemplo, al intentar eliminar la letalidad de la sobreexpresión de un alelo activado de Pkc1 (Soler, 1997), proteína implicada en diversas rutas.

Es de destacar que la sobreexpresión de Skm1 sea capaz de suprimir el fenotipo de mutantes *cla4* y “sustituirlo” por su fenotipo de sobreexpresión, lo que parece indicar un posible efecto epistático en la función, si bien parcial, ya que la sobreexpresión de Skm1 no alivia la letalidad de un doble mutante *ste20 cla4*. En esta línea se incluye el hecho de que la sobreexpresión de Skm1 también “sustituya” el fenotipo de un mutante *hsl7* por el suyo propio de sobreexpresión. La implicación de Cla4 y Hsl7 en el punto de control morfogénico que permite el paso de crecimiento apical a isotrópico de la yema (Altman y Kellog, 1997, Tjandra y col., 1998; Barral y col., 1999; Shulewitz y col., 1999) y el hecho de que la sobreexpresión de Skm1 pueda “sustituir” los defectos morfológicos causados por la pérdida de estas proteínas parecen relacionar levemente a ésta PAK con este proceso.

1.6. La activación de Cdc42 por eliminación de sus proteínas GAP conduce a efectos diferentes de la sobreexpresión de *cdc42*^{G12V}.

La progresiva pérdida de las proteínas GAP de Cdc42 conduce a morfologías alargadas, piriformes y que recuerdan a células comenzando a pseudofilamentar o a formar “shmoos”. Estos fenotipos parecían reflejar la activación de las rutas de feromonas e invasividad, lo que quedó de manifiesto cuando las mutaciones en los genes que codifican estas proteínas GAP se combinaron con una mutación *ste7*, y el fenotipo morfológico de las células volvió a ser similar al silvestre. Resulta llamativa la diferencia entre estos fenotipos de células exhibiendo un crecimiento claramente polarizado hacia un punto y las células que sobreexpresan el alelo *cdc42*^{G12V}, con morfologías grandes y redondeadas. Como se ha descrito antes, es posible que, en este último caso, la sobreexpresión esté produciendo una polarización del crecimiento en todas direcciones debida al exceso de GTPasa producida y repartida por toda la

membrana plasmática. En este caso, los fenotipos morfológicos aparentemente diferentes de los mutantes en los genes de las proteínas GAP y de sobreexpresión de *cdc42*^{G12V} no serían más que dos grados diferentes de intensidad del mismo efecto. Esto viene apoyado por el hecho de que los mutantes *rga1 rga2 bem3* son viables, mientras que la sobreexpresión de *cdc42*^{G12V} es letal. Sin embargo, existe la posibilidad de que los efectos causados por la sobreexpresión de este alelo sigan un mecanismo diferente al provocado por la eliminación de las GAP, y por ello, mientras que un mutante *rga1 rga2 bem3 ste7* presenta una morfología silvestre, la sobreexpresión de *cdc42*^{G12V} sólo se ve ligeramente aliviada por la mutación *ste11*. A favor de esta última hipótesis está el hecho de que la sobreexpresión de este alelo no provoque un incremento de la fosforilación en Fus3, Kss1 y Slt2, que sí es provocado por la eliminación de las proteínas GAP. Quizá la presencia o ausencia de estas proteínas, Rga1, Rga2 y Bem3, sea determinante para, además de la activación de Cdc42, su elección de sustratos. Esta última hipótesis explicaría que, tanto en el caso de los mutantes GAP como el de *cdc42*^{G12V}, Cdc42 se encuentre igualmente activo, pero sus efectos sean diferentes.

La sobreexpresión en mutantes *rga2 bem3* del alelo inactivo Skm1K406A elimina los defectos morfológicos de estos mutantes, ejerciendo, por tanto, un efecto similar al de la adición de la mutación *ste7*. Esto hace pensar en un secuestro de Cdc42 activo por parte de Skm1K406A, que lo separaría de Ste20 y evitaría así una hiperactivación de las rutas de feromonas e invasividad, y de paso, es una prueba más de que Skm1 puede ser un efector de Cdc42 en estado activo.

2. INFLUENCIA DE LA PROTEÍNAS PAK Y Cdc42 EN LA ACTIVACIÓN DE LAS MAP QUINASAS Slt2, Kss1 y Fus3.

Las proteínas PAK de levadura participan, como las PAK de células de mamífero, en dos tipos de funciones: morfogénesis y señalización a través de rutas de MAP quinasas. Ste20 y Cla4 colaboran en el control de la morfogénesis durante el crecimiento polarizado a través del citoesqueleto de actina, y además, Ste20 está implicado en la señalización de diversas rutas. La sobreexpresión de Skm1 y su relación con Cdc42 parece implicarlo en morfogénesis, pero su participación en señalización no parece tan clara.

2.1. La sobreexpresión de los dominios quinasas de las proteínas PAK conduce a la hiperactivación de Slt2, Kss1 y Fus3.

Es interesante el hecho de que, en algunas cepas, la pérdida de Ste20, pero no de Cla4 o Skm1 provoque una ligera disminución de la fosforilación de Slt2 a 24°C, pero que este efecto no sea reproducible en otras cepas. Se ha descrito que la presencia de feromonas activa a la ruta de Slt2, y que para ello se necesita Ste20, si bien los autores no se ponen de acuerdo en si es necesario para ello el resto de la ruta de feromonas (Buehrer y Errede, 1997) o no lo es, dándose un posible cruce entre ambas rutas a la altura de Ste20 y Bck1 (Zarrov y col., 1996). En cualquier caso, Ste20 parece relacionado en éste proceso de activación de la ruta de integridad celular, lo cual explicaría que en algunas cepas su pérdida desemboque en una cierta disminución de la activación de Slt2. Pero quizá esta implicación sólo tenga importancia en presencia de feromonas, por lo que en otras cepas, la pérdida de Ste20 en crecimiento vegetativo no produce efecto alguno en la fosforilación de Slt2.

Por otra parte, la sobreexpresión de los dominios quinasas de estas proteínas (la eliminación de los extremos N-terminales inhibitorios tenía como objetivo obtener fragmentos activos catalíticamente de estas proteínas, y así incrementar su posible efecto) condujo, como se ha descrito, a una intensa fosforilación de Fus3 y Kss1. En el caso

de Skm1 y Ste20 se produjo, además, una gran activación de Slt2, siendo el efecto de Cla4 sobre Slt2 menos intenso. El gran efecto provocado sobre Fus3 y Kss1 podría indicar un papel para Skm1 y Cla4, además de Ste20, en la señalización a través de las rutas de apareamiento, invasividad y SVG. Sin embargo, la sobreexpresión de Skm1 completo no provoca aumento de fosforilación en ninguna de las tres MAP quinasas (datos no mostrados). Esto sugiere que el efecto provocado por la sobreexpresión de los dominios quinasas de las tres PAK no es más que un reflejo de la posible capacidad de discriminación entre sustratos del extremo N-terminal de estas quinasas y del alto grado de homología de sus dominios catalíticos, que son capaces de sustituir la función señalizadora de Ste20 cuando son desregulados por eliminación de su extremo autoinhibitorio. La elevada fosforilación de Fus3 observada al sobreexpresar el alelo truncado de Skm1 parece ser la explicación de que esta sobreexpresión complemente los defectos en apareamiento de un mutante *ste20*, previamente comentados. Sin embargo, quizá no todos los efectos observados en estas sobreexpresiones puedan achacarse a la desregulación de estas quinasas y a la pérdida en su especificidad de sustratos: si el grado de homología es tan elevado entre ellas, ¿por qué tan sólo Ste20 y Skm1 son capaces de activar fuertemente a Slt2, mientras que Cla4 sólo lo hace levemente? En el caso de Ste20, quizá aquí estemos observando un efecto complementario al del experimento anterior, en el que en algunas cepas el mutante *ste20* presenta menor fosforilación basal de Slt2. Pero en el caso de Skm1 no es así: la mutación *skm1* no disminuye la activación basal de Slt2.

El hecho de que las tres proteínas PAK influyeran de forma similar en la activación de Fus3 y Kss1, pero diferente en la de Slt2 ya hacía pensar que la activación sobre esta última se podría deber a un cruce entre rutas. La activación de Slt2 que provocó la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1 en mutantes *ste7*, *fus3* y *kss1*, indicaba que, probablemente, esta quinasa desregulada debía

actuar directamente sobre algún componente de la ruta de Slt2. Es decir, la eliminación del extremo N-terminal regulatorio parecía provocar pérdida en la especificidad de sustrato para la quinasa, que era capaz, quizá, de fosforilar a otra MAPKKK de una ruta diferente. El hecho de que los resultados fueran idénticos en presencia del estabilizador osmótico sorbitol 1M eliminaba la posibilidad de que la activación de Slt2 se debiera a una estimulación provocada por un defecto en la pared celular causado por la sobreexpresión de estos dominios quinasas.

2.2. Cdc42 modula la actividad de Slt2 a través de Ste20, Ste7, Fus3 y Kss1.

¿Cómo influyen las GTPasas Cdc42 y Rho1, directoras del crecimiento polarizado, en la actividad de la MAP quinasa Slt2, que se activa en los períodos en que dicho crecimiento tiene lugar? ¿Es secuencial y en cascada la activación de estas GTPasas, siguiendo un esquema paralelo al propuesto en mamíferos para Cdc42, Rac1 y RhoA durante el movimiento celular (Chant y Stowers, 1995)? El hecho de que las proteínas PAK, sustratos de Cdc42, manifestaran cierta influencia en la fosforilación de Slt2 parecía apoyar una posible modulación de la activación de Slt2 por esta GTPasa.

La activación de Slt2 que se produce por la pérdida de Cdc42 tiene dos posibles explicaciones: la primera, apoyada por el hecho de que el sorbitol 1M no evite completamente esta activación, es que la ausencia de Cdc42 esté provocando un efecto interno a la célula que desemboca en la activación de Slt2. Las características de este efecto sólo se pueden suponer: por ejemplo, la despolarización del citoesqueleto de actina en estos mutantes podría intentar ser compensada por la GTPasa Rho1 a través de su efecto polarizador mediado por la ruta de Pkc1 y Slt2. Delley y Hall (1999) han descrito cómo Rho1 puede polarizar y despolarizar la actina a través de Pkc1, pero el primer efecto sólo a través de la ruta de integridad celular. Otra explicación a la activación de Slt2 en estos mutantes es que los defectos en pared que sufren sean tan intensos que el

sorbitol 1M no pueda compensar totalmente la activación de Slt2 que provocan.

Por otra parte, ni la sobreexpresión de Cdc24 ni la de *cdc42*^{G12V} condujo a alteración alguna en la fosforilación basal de Slt2, ni tampoco de las MAP quinasas Fus3 o Kss1. Este resultado parecía extraño, ya que, aunque la relación de Cdc42 con la ruta de respuesta a feromonas aún no estaba completamente discernida, sí estaba bien establecida la relación de Cdc42 con la ruta de invasividad, y, por ello, al menos Kss1 debería sufrir fosforilación en células con Cdc42 activado. Además, parecía claro que, efectivamente, el alelo *cdc42*^{G12V} se estaba sobreexpresando, ya que el fenotipo morfológico de las células era similar al descrito previamente (Ziman y col., 1991; Zhao y col., 1995) y al comprobado anteriormente en este mismo trabajo. Contrariamente, la progresiva eliminación de una, dos o tres proteínas GAP de Cdc42 provocó una paralela activación de las tres MAP quinasas, Slt2, Kss1 y Fus3. Que la activación de Cdc42 desembocara en fosforilación de Kss1 era un dato esperable, pero no así la activación de Slt2 y, en menor medida, de Fus3, que sufrían estos mutantes. Así pues, el debate acerca de la implicación de Cdc42 en la ruta de feromonas parece inclinarse hacia el resultado de que Cdc42 activo sí es capaz de influir en la ruta de feromonas y activar a su MAP quinasa Fus3. Por último, recientemente, y apoyando la hipótesis de la influencia de Cdc42 sobre Slt2 se ha mostrado, mediante el uso de “micro-arrays” de DNA, que la sobreexpresión de *CDC42* bajo el control del promotor de tetO induce la transcripción de determinados genes, algunos de ellos regulados por la ruta de integridad celular, y entre ellos el propio *SLT2* (Hughes y col., 2000). A qué se deben las diferencias que produce la sobreexpresión de *cdc42*^{G12V} y la eliminación de sus GAP es un problema difícil de responder. Es posible que, como se comentó previamente, las proteínas GAP, además de ejercer su función inactivadora de la actividad GTPásica de Cdc42 sean capaces, al unirse a él, de secuestrarlo y de dirigirlo hacia o separarlo de determinados efectores.

¿Este control de Cdc42 sobre Slt2 se ejerce de forma directa por la GTPasa sobre la ruta de integridad celular o es indirecto, a través de alguna de las rutas de feromonas, invasividad o SVG? Responder a esta pregunta podría arrojar luz también sobre otra de las controversias actuales: si la activación de Slt2 causada por feromonas necesita de toda la ruta de apareamiento o es capaz de provocar un cruce de rutas al nivel de Ste20. La eliminación de Ste7 en los mutantes en los genes de las proteínas GAP permitió comprobar que Cdc42 activo inducía la fosforilación de Slt2 a través de Ste7 y, por tanto, de alguna de las rutas en las que esta MAPKK está integrada.

Por otra parte, la utilización del gen “reporter” para la ruta de apareamiento *FUS1::HIS3* portado por estas cepas mutantes, mostró que Skm1 no parece desarrollar ningún papel en esta señalización, mientras que la pérdida de Ste20 conduce a un efecto similar al de la pérdida de Ste7. Así pues, a pesar de los resultados obtenidos en la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1, que desembocaba en la hiperfosforilación de las tres MAP quinasas, estos últimos resultados ponen de manifiesto que, en condiciones fisiológicas, Skm1 no parece cumplir ningún papel en señalización a través de estas rutas. No obstante, muy recientemente se ha mostrado que la proteína mutante Cdc42I46M, que suprime el crecimiento invasivo y pseudohifal, manifiesta una interacción cinco veces menor con Skm1 mediante el sistema “dos híbridos”. También exhibe, sin embargo, menor intensidad en la interacción con otros efectores, como Gic1, Gic2 y Cla4, pero no con Ste20 (Mösch y col., 2001). Ésto podría indicar un cierto papel de Skm1 en la transmisión de la señal hacia Kss1.

Por último, la influencia activadora de Cdc42 sobre Slt2 depende las dos MAP quinasas de las rutas de feromonas y de invasividad/SVG, Fus3 y Kss1, respectivamente. La pérdida de cada una de ellas disminuye parcialmente la fosforilación de Slt2, pero sólo la eliminación de ambas la reduce totalmente al nivel basal, indicando el papel parcialmente redundante en esta función que desarrollan ambas MAP quinasas. Así pues, la

GTPasa Cdc42, principal orquestadora del crecimiento polarizado, ejerce un control claro sobre la MAP quinasa Slt2, que se activa durante este tipo de crecimiento, y esta influencia es mediada a través de la ruta Ste20-Ste11-Ste7 y de las MAP quinasas Fus3 y Kss1, sin que Skm1 sea necesario para el proceso. Esta afirmación podría, quizá, aplicarse a todos los procesos de crecimiento polarizado: en presencia de feromonas, en la gemación e incluso en la invasividad y pseudofilamentación, aunque aún han de realizarse experimentos adicionales para comprobar esta hipótesis.

2.3. Rho1 controla la actividad de Slt2.

Rho1 es el último componente en la hipotética cascada de GTPasas que controla el crecimiento polarizado. El hecho de que la pérdida de Rho1 desembocara en una fuerte disminución de la activación de Slt2, hasta niveles incluso inferiores a los basales y que la sobreexpresión de Rho1 desde un plásmido multicopia produjera el efecto contrario, una elevación de los niveles de fosforilación de Slt2, apunta hacia una clara modulación de Slt2 por Rho1. Es de destacar que, en el caso de esta GTPasa, su sobreexpresión en multicopia fuera capaz de provocar este efecto, mientras que en el caso de Cdc42, ni la sobreexpresión de su regulador positivo Cdc24, ni siquiera la del alelo hiperactivo *cdc42*^{G12V} provocaran este efecto. Sin embargo, la eliminación de las proteínas GAP de Rho1, Sac7 y Bem2, condujo a una activación de Rho1 que se manifestó en un incremento de la fosforilación de Slt2, de forma similar a la provocada por la eliminación de las proteínas GAP de Cdc42. Es de destacar que, en el caso de Sac7, este efecto se mostrara a temperaturas inferiores que en el caso de Bem2, cuyo efecto no se manifestó hasta los 30°C. Esto enlaza con el hecho de que los mutantes *sac7* (Dunn y Shortle, 1990) presenten un fenotipo de sensibilidad al frío y, sin embargo, el de los mutantes *bem2* (Bender y Pringle, 1991; Cid y col., 1998) sea de intensificación del fenotipo morfológico a altas temperaturas. Por tanto, esto sugeriría la actuación de Sac7 en un rango de temperaturas más amplio, mientras que la función de

Bem2 sería necesaria a temperaturas superiores. Bag7 no muestra ningún efecto sobre la ruta de integridad celular, lo que hace dudar de que realmente sea una GAP de Rho1 o bien, si lo es, dirige a la GTPasa hacia otras funciones diferentes de la activación de la ruta de integridad celular.

2.4. La activación de Slt2 debida a Cdc42 y la sobreexpresión del dominio quinasa de Skm1 es independiente de Rho1.

¿El efecto de Cdc42 y las proteínas PAK sobre la activación de Slt2 es mediado por Rho1? De ser así se apoyaría la hipótesis de la activación secuencial en cascada de las GTPasas durante el crecimiento polarizado, por un lado, mientras que se podría descartar el posible cruce de rutas que realizarían las proteínas PAK en ausencia de su extremo N-terminal regulatorio. Sin embargo, los resultados muestran que ambos efectos son independientes de Rho1. El efecto causado por el dominio catalítico de Skm1 parece, efectivamente, ser debido a un cruce de rutas. Aún quedaría por estudiar a qué nivel de la ruta de integridad celular se produce la conexión con el alelo truncado de Skm1: a través de Pkc1, de la MAPKKK Bck1, de las MAPKK Mkk1 y Mkk2 o incluso de Slt2. El caso de la activación de Slt2 por Cdc42 activo es diferente. En primer lugar, no se puede descartar la posibilidad de que la ausencia de Rho1 sea complementada por otra GTPasa tipo Rho especialmente homóloga, como podría ser Rho2. Sin embargo, se ha descrito que esta GTPasa puede

complementar a mutantes *rho1* únicamente en sobreexpresión (Ozaki y col., 1996). Otras GTPasas homólogas, como Rho3 y Rho4, parecen implicadas en otros procesos, como la secreción (Matsui y Tohe, 1992; Imai y col., 1996), por lo que tampoco parecen candidatas para sustituir a Rho1. En segundo lugar, y como comprobación adicional de que la elevada fosforilación de Slt2 en el mutante *rgal1 bem3 rho1-104* se debía a la activación de Cdc42, se intentó interrumpir *STE7* en este mutante, pero no fue posible, probablemente debido a que la combinación de las mutaciones resulte letal. Queda por estudiar, por supuesto, el nivel de la ruta de Slt2 al que se introduce el impulso activador de Cdc42, pero también, y ésto es más complejo, qué proteína o proteínas se hacen cargo de transmitir esta señal desde Fus3 y Kss1 hasta la ruta de integridad celular. Quizá se trate de las propias MAP quinastas Fus3 y Kss1. Pero si seguimos el modelo de Buehrer y Errede (1997), en el que Ste12 es necesario para la activación de Slt2 por feromonas, habría que pensar, por tanto, que la activación de Cdc42 desembocaría en una inducción de la transcripción de genes provocada por Fus3 y Kss1 y que alguno de los productos génicos sería el encargado de activar a algún componente de la ruta de integridad celular por debajo de Rho1. En este punto, por el momento, sólo se puede especular, pero, en cualquier caso, parece ser que no existe una activación secuencial en cascada entre Cdc42 y Rho1, es decir, la primera no condiciona a la activación de la segunda, sino que ambas modulan a Slt2 de manera independiente.

3. SENSIBILIDAD A ROJO CONGO DE DIVERSOS MUTANTES

3.1. La activación de Fus3 y Kss1 induce sensibilidad a rojo Congo en glucosa y resistencia en galactosa.

Se ha descrito que la proteína antifúngica producida por la planta de tabaco y conocida como osmotina induce la muerte en células de *S. cerevisiae* dañando la pared y la membrana plasmática. Para ello se sirve de modificaciones de la pared celular inducidas por la activación de las

rutas de feromonas e invasividad; la eliminación de la transmisión de la señal a través de estas rutas induce resistencia a osmotina (Yun y col., 1998). Estos datos concuerdan con la sensibilidad a rojo Congo que provoca la eliminación de las tres proteínas GAP de Cdc42 y con la eliminación de esta sensibilidad en el cuádruple mutante *rgal1 rga2 bem3 ste7*, apuntando además hacia un papel importante de estas rutas en el mantenimiento de la integridad celular. Es probable que estos resultados

reflejen la implicación de la ruta SVG en la estabilidad de la pared celular. Esta ruta se mantiene activada en mutantes defectivos en manosilación y glicosilación de proteínas (Lee y Elion, 1999; Cullen y col., 2000), funcionando, quizá, en paralelo con la ruta de la MAP quinasa Slt2 para mantener la integridad celular.

Es interesante el hecho de que si el experimento se repite utilizando, en lugar de la usual glucosa como fuente de carbono, el azúcar galactosa, la sensibilidad y resistencia de los mutantes se invierte: el triple mutante en los genes de las proteínas GAP es ahora más resistente que la cepa isogénica silvestre, y el cuádruple mutante *rga1 rga2 bem3 ste7* es ahora incluso algo más sensible que la cepa silvestre. ¿Qué está ocurriendo? Al parecer, el cambio en la fuente de carbono probablemente esté provocando un cambio importante en la composición de la pared celular, y esto se refleje en diferente sensibilidad hacia el rojo Congo. Pero lo interesante es que las células que poseen esta nueva pared son más resistentes a rojo Congo si presentan rutas de feromonas, invasividad y SVG activadas constitutivamente. Quizá en estas condiciones se pone especialmente de manifiesto la actividad de la ruta SVG de mantenimiento de la integridad celular en paralelo con la de Slt2. La MAP quinasa descrita para la ruta SVG es Kss1, y en estos mutantes Kss1 está activada de forma constitutiva, lo que quizá supone una desventaja cuando las células crecen en glucosa, pero es beneficioso si la fuente de carbono disponible es galactosa. El hecho de que en galactosa mutantes *rga1 rga2 bem3 ste7* sean más sensibles aún que la cepa isogénica silvestre a rojo Congo parece indicar que, efectivamente, en estas condiciones, la ruta SVG es necesaria.

3.2. Influencia de la fuente de carbono en la activación de Slt2. Sensibilidad a rojo Congo de mutantes SVG.

Se ha podido comprobar que la fuente de carbono presente en el medio influye de manera importante en la fosforilación de Slt2, reflejando, probablemente y como ya se ha comentado, la

diferente composición de la pared celular en un medio u otro. En determinadas condiciones de crecimiento utilizadas en este trabajo para inducir la sobreexpresión de genes desde plásmidos regulables por galactosa (concretamente, crecimiento en medio mínimo con rafinosa 1.5% hasta fase exponencial, con posterior adición de galactosa hasta concentración final de 2% e incubación a 24°C durante 7 horas), los mutantes *ste7* y *kss1* mostraban una elevación basal de la fosforilación de Slt2. *Ste7* y *Kss1* son la MAPKK y la MAPK, respectivamente, de la ruta SVG, implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular. Por ello, el hecho de que mutantes *ste7* y *kss1* mantuvieran elevados niveles de fosforilación de Slt2 podía estar demostrando que esos mutantes sufrían daños en la pared celular que tenían que ser compensados con una activación adicional de Slt2.

El rojo Congo nos sirvió como herramienta para detectar estos posibles daños en la pared celular. Los resultados más interesantes se obtuvieron en el fondo genético SEY6211. La gran resistencia a rojo Congo en presencia de glucosa como fuente de carbono mostrada por los mutantes *ste7* recordaba de nuevo a los efectos descritos en presencia de osmotina. Esta resistencia, una vez más, se tornó sensibilidad cuando el medio contenía galactosa. La mayor resistencia en glucosa no pudo deberse a una activación de Slt2 provocada por el mecanismo compensatorio en mutantes *ste7* con un hipotético daño en la pared, puesto que la cepa SEY6211 portadora de un plásmido que expresa el alelo hiperactivado *bck1-20* no muestra mayor resistencia a rojo Congo que la cepa silvestre. El efecto resultaba difícil de explicar, pues tampoco podía achacarse a la pérdida de la transducción de la señal a través de la ruta SVG, ya que el mutante *kss1* mostraba el mismo patrón de sensibilidad que la cepa silvestre. El azar nos proporcionó una posible respuesta al descubrirse en nuestro laboratorio que esta cepa portaba un alelo mutado no funcional de Kss1, y se pudo comprobar que el mutante *ste7* transformado con un plásmido portador del gen *KSS1* mostraba una sensibilidad similar a la de la cepa silvestre. Por tanto, en este fondo genético, mutantes *kss1*, que presentan una eliminación de la

señalización a través de la ruta SVG, no son más resistentes a rojo Congo; tampoco lo son los mutantes *ste7* que, en teoría sufren del mismo problema de señalización. Sin embargo, la pérdida de ambas proteínas, provoca resistencia a rojo Congo. Estos resultados parecen indicar que, además de en la transmisión de la señal, los

componentes de esta ruta SVG podrían estar implicados en otros mecanismos (formación de complejos que permitieran la interacción física de Ste7, Kss1 o de ambas con otras proteínas) que contribuirían, junto a la señalización, al mantenimiento de la integridad de la pared celular.

4. MODELO DE ACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS PAK Y LAS GTPasas TIPO Rho DURANTE EL CICLO CELULAR.

A partir de los resultados experimentales expuestos y los datos publicados por otros autores, puede sugerirse un modelo de acción para las proteínas PAK y las GTPasas Cdc42 y Rho1 (Figura 1).

Durante el crecimiento en tamaño de la célula, Cdc42 permanecería, en su mayor parte, inactivado por la unión a sus proteínas GAP Rga1, Rga2 y Bem3. Una pequeña cantidad de esta GTPasa permanecería activa por su unión a Cdc24 para controlar al citoesqueleto de actina a través de las proteínas PAK, mediante la fosforilación de Myo3 y Myo5 por Ste20, Cla4 y, quizá, Skm1. Rho1 permanecería inactiva por unión a sus proteínas GAP Sac7 y Bem2, en ausencia de estímulos externos que pusieran en peligro la integridad de la pared celular. De la misma forma, la ruta SVG se mantendría inactiva o con una activación basal en ausencia de daños en la pared de la célula. Para que se inicie el crecimiento polarizado (gemación o formación de “shmoo”) es necesario que Cdc42 se separe de sus proteínas inactivadoras y que Cdc42 salga del núcleo para unirse a ella y estabilizarla en su forma activa. Las proteínas PAK aumentarían sus funciones: mientras Cla4 y Skm1 permanecerían encargadas fundamentalmente del mantenimiento

del citoesqueleto de actina mediante fosforilación de las miosinas 3 y 5, Ste20 transmitiría la señal activadora de Cdc42 a través de la ruta que desemboca en las MAP quinasas Fus3 y Kss1. Éstas, siguiendo el modelo de Buehrer y Errede (1997), provocarían a través de Ste12 la transcripción de determinados genes, y entre sus productos se encontraría X, capaz de activar a la ruta de Slt2 por debajo de Rho1, permaneciendo esta GTPasa aún inactiva. La activación de Slt2 controlada por Cdc42 permitiría el mantenimiento de la integridad de la pared en el momento del surgimiento de la yema. A continuación, para realizar el cambio de crecimiento apical a isotrópico es necesario que Cdc42 active a Cla4, mientras que serían Ste20 y Skm1 las que controlarían al citoesqueleto de actina vía fosforilación de las miosinas. El estrés causado en la pared celular por el debilitamiento de ciertas zonas y la inserción en ellas de nuevo material, procesos que posibilitarían el crecimiento de la célula hija, provocaría que Rho1 se activara por separación de sus proteínas GAP y unión a sus GEF Rom1 y Rom2, con la consiguiente activación de la ruta de Slt2 para mantener la integridad de la pared durante el crecimiento de la yema.

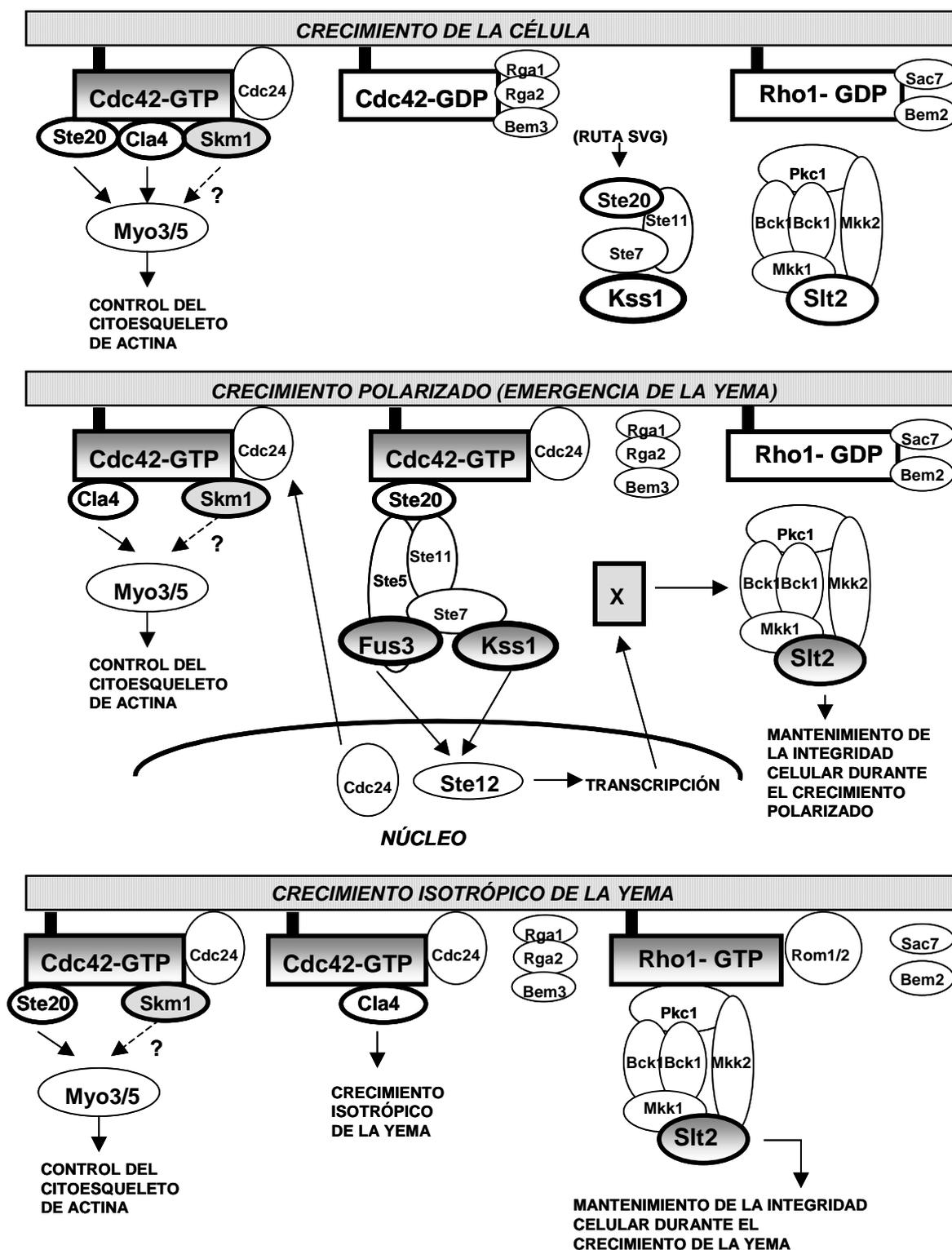


Figura 1. Modelo de acción de las proteínas PAK y las GTPasas tipo Rho durante el ciclo celular.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El fenotipo morfológico de sobreexpresión de *SKM1*, similar al del alelo *cdc42^{G12V}*, relaciona a la proteína PAK con los procesos morfogénicos dependientes de esta GTPasa.
2. El fragmento constituido por los aminoácidos 109-184 de *Skm1*, que contiene su dominio CRIB y secuencias flanqueantes, interacciona mediante el sistema de “dos híbridos” con un alelo hiperactivo e imposibilitado en su unión a membrana plasmática de *Cdc42*, hecho que apoya la conclusión anterior.
3. La sobreexpresión de un alelo de *SKM1* truncado en su extremo N-terminal conduce a un fenotipo morfológico más agudizado y a la hiperactivación de las MAP quinasas *SlT2*, *Kss1* y *Fus3*, siendo este último fenómeno independiente de la GTPasa *Rho1*. Estos efectos apoyan el papel regulatorio autoinhibitorio del dominio N-terminal de *Skm1* sobre su actividad catalítica, y apuntan hacia una posible influencia de este dominio en la especificidad de sustrato de la quinasa.
4. La activación de *Cdc42* provocada por la eliminación de las proteínas GAP *Rga1*, *Rga2* y *Bem3* conduce a la activación de *Kss1*, *Fus3* y *SlT2*, lo que indica la influencia de la GTPasa activada sobre las tres MAP quinasas.
5. La influencia de *Cdc42* sobre la activación de *SlT2* es ejercida a través de la proteína PAK *Ste20*, la MAPKK *Ste7* y las MAP quinasas *Fus3* y *Kss1*.
6. La sobreexpresión de *Rho1* y la eliminación de las proteínas GAP *Sac7* y *Bem2* conduce a la activación de *SlT2*, lo que confirma la influencia de esta GTPasa en la señalización hacia la ruta de integridad celular, así como el papel de *Sac7* y *Bem2* como GAPs de *Rho1*.
7. La activación de *Cdc42* por eliminación de sus proteínas GAP conduce a una activación de *SlT2* independiente de *Rho1*.
8. La señalización a través de las rutas de respuesta a feromonas, invasividad o SVG influye en la función protectora de la pared celular en condiciones en la que ésta se ve afectada.

BIBLIOGRAFÍA

- Abo, A., J. Qu, M. S. Cammarano, C. Dan, A. Fritsch, V. Baud, B. Belisle, and A. Minden.** 1998. PAK4, a novel effector for Cdc42Hs, is implicated in the reorganization of the actin cytoskeleton and in the formation of filopodia. *EMBO J.* **17**:6527-6540.
- Adames, N., K. Blundell, M. N. Ashby, and C. Boone.** 1995. Role of yeast insulin-degrading enzyme homologs in propheromone processing and bud site selection. *Science* **270**:464-467.
- Adams, A. E. and J. R. Pringle.** 1984. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in wild-type and morphogenetic-mutant *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **98**:934-945.
- Adams, A. E., D. I. Johnson, R. M. Longnecker, B. F. Sloat, and J. R. Pringle.** 1990. CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **111**:131-142.
- Akada, R., L. Kallal, D. I. Johnson, and J. Kurjan.** 1996. Genetic relationships between the G protein beta gamma complex, Ste5p, Ste20p and Cdc42p: investigation of effector roles in the yeast pheromone response pathway. *Genetics* **143**:103-117.
- Altman, R. and D. Kellogg.** 1997. Control of mitotic events by Nap1 and the Gin4 kinase. *J.Cell Biol.* **138**:119-130.
- Amberg, D. C.** 1998. Three-dimensional imaging of the yeast actin cytoskeleton through the budding cell cycle. *Mol.Biol.Cell* **9**:3259-3262.
- Andrews, P. D. and M. J. Stark.** 2000. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J.Cell Sci.* **113 (Pt 15)**:2685-2693.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** 1993. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York; Greene Publishing Associates and Wiley Interscience).
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K.** 1997. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York; Greene Publishing Associates and Wiley Interscience).
- Ayscough, K. R., J. Stryker, N. Pokala, M. Sanders, P. Crews, and D. G. Drubin.** 1997. High rates of actin filament turnover in budding yeast and roles for actin in establishment and maintenance of cell polarity revealed using the actin inhibitor latrunculin-A [published erratum appears in *J Cell Biol* 1999 Sep 6;146(5):following 1201]. *J.Cell Biol.* **137**:399-416.
- Ayscough, K. R., J. J. Eby, T. Lila, H. Dewar, K. G. Kozminski, and D. G. Drubin.** 1999. Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol.Biol.Cell* **10**:1061-1075.
- Bagrodia, S., B. Derijard, R. J. Davis, and R. A. Cerione.** 1995. Cdc42 and PAK-mediated signaling leads to Jun kinase and p38 mitogen-activated protein kinase activation. *J.Biol.Chem.* **270**:27995-27998.
- Bagrodia, S. and R. A. Cerione.** 1999. Pak to the future. *Trends Cell Biol.* **9**:350-355.
- Banuett, F.** 1998. Signalling in the yeasts: an informational cascade with links to the filamentous fungi. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:249-274.
- Bardwell, L., J. G. Cook, E. C. Chang, B. R. Cairns, and J. Thorner.** 1996. Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. *Mol.Cell Biol.* **16**:3637-3650.
- Bardwell, L., J. G. Cook, D. Voora, D. M. Baggott, A. R. Martinez, and J. Thorner.** 1998. Repression of yeast Ste12 transcription factor by direct binding of unphosphorylated Kss1 MAPK and its regulation by the Ste7 MEK. *Genes Dev.* **12**:2887-2898.

- Barral, Y., M. Parra, S. Bidlingmaier, and M. Snyder.** 1999. Nim1-related kinases coordinate cell cycle progression with the organization of the peripheral cytoskeleton in yeast. *Genes Dev.* **13**:176-187.
- Bender, A. and J. R. Pringle.** 1989. Multicopy suppression of the *cdc24* budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**:9976-9980.
- Bender, A. and J. R. Pringle.** 1991. Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **11**:1295-1305.
- Bender, A.** 1993. Genetic evidence for the roles of the bud-site-selection genes BUD5 and BUD2 in control of the Rsr1p (Bud1p) GTPase in yeast. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **90**:9926-9929.
- Bender, L., H. S. Lo, H. Lee, V. Kokojan, V. Peterson, and A. Bender.** 1996. Associations among PH and SH3 domain-containing proteins and Rho-type GTPases in Yeast. *J.Cell Biol.* **133**:879-894.
- Benton, B. K., A. H. Tinkelenberg, D. Jean, S. D. Plump, and F. R. Cross.** 1993. Genetic analysis of Cln/Cdc28 regulation of cell morphogenesis in budding yeast. *EMBO J.* **12**:5267-5275.
- Benton, B. K., A. Tinkelenberg, I. Gonzalez, and F. R. Cross.** 1997. Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol.Cell Biol.* **17**:5067-5076.
- Bi, E. and J. R. Pringle.** 1996. ZDS1 and ZDS2, genes whose products may regulate Cdc42p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:5264-5275.
- Bi, E., J. B. Chiavetta, H. Chen, G. C. Chen, C. S. Chan, and J. R. Pringle.** 2000. Identification of novel, evolutionarily conserved Cdc42p-interacting proteins and of redundant pathways linking Cdc24p and Cdc42p to actin polarization in yeast. *Mol.Biol.Cell* **11**:773-793.
- Bickle, M., P. A. Delley, A. Schmidt, and M. N. Hall.** 1998. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J.* **17**:2235-2245.
- Blacketer, M. J., C. M. Koehler, S. G. Coats, A. M. Myers, and P. Madaule.** 1993. Regulation of dimorphism in *Saccharomyces cerevisiae*: involvement of the novel protein kinase homolog Elm1p and protein phosphatase 2A. *Mol.Cell Biol.* **13**:5567-5581.
- Blinder, D., S. Bouvier, and D. D. Jenness.** 1989. Constitutive mutants in the yeast pheromone response: ordered function of the gene products. *Cell* **56**:479-486.
- Blomberg, A. and L. Adler.** 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv.Microb.Physiol* **33**:145-212.
- Boguski, M. S. and F. McCormick.** 1993. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature* **366**:643-654.
- Boguslawski, G. and J. O. Polazzi.** 1987. Complete nucleotide sequence of a gene conferring polymyxin B resistance on yeast: similarity of the predicted polypeptide to protein kinases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**:5848-5852.
- Brewster, J. L., T. de Valoir, N. D. Dwyer, E. Winter, and M. C. Gustin.** 1993. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science* **259**:1760-1763.
- Brown, J. L., L. Stowers, M. Baer, J. Trejo, S. Coughlin, and J. Chant.** 1996. Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr.Biol.* **6**:598-605.

- Brown, J. L., M. Jaquenoud, M. P. Gulli, J. Chant, and M. Peter.** 1997. Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev.* **11**:2972-2982.
- Brown, T. and Mackey, K.** 1997. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York; Greene Publishing Associates and Wiley Interscience).
- Brunet, A. and J. Pouyssegur.** 1996. Identification of MAP kinase domains by redirecting stress signals into growth factor responses. *Science* **272**:1652-1655.
- Buehrer, B. M. and B. Errede.** 1997. Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.* **17**:6517-6525.
- Bulawa, C. E., M. Slater, E. Cabib, J. Au-Young, A. Sburlati, W. L. Adair, and P. W. Robbins.** 1986. The *S. cerevisiae* structural gene for chitin synthase is not required for chitin synthesis in vivo. *Cell* **46**:213-225.
- Burbelo, P. D., D. Drechsel, and A. Hall.** 1995. A conserved binding motif defines numerous candidate target proteins for both Cdc42 and Rac GTPases. *J. Biol. Chem.* **270**:29071-29074.
- Bussey, H.** 1991. K1 killer toxin, a pore-forming protein from yeast. *Mol. Microbiol.* **5**:2339-2343.
- Cabib, E., J. Drgonova, and T. Drgon.** 1998. Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **67**:307-333.
- Cairns, B. R., S. W. Ramer, and R. D. Kornberg.** 1992. Order of action of components in the yeast pheromone response pathway revealed with a dominant allele of the STE11 kinase and the multiple phosphorylation of the STE7 kinase. *Genes Dev.* **6**:1305-1318.
- Cali, B. M., T. C. Doyle, D. Botstein, and G. R. Fink.** 1998. Multiple functions for actin during filamentous growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **9**:1873-1889.
- Camus, C., E. Boy-Marcotte, and M. Jacquet.** 1994. Two subclasses of guanine exchange factor (GEF) domains revealed by comparison of activities of chimeric genes constructed from CDC25, SDC25 and BUD5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **245**:167-176.
- Carroll, C. W., R. Altman, D. Schieltz, J. R. Yates, and D. Kellogg.** 1998. The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. *J. Cell Biol.* **143**:709-717.
- Castro, C., J. C. Ribas, M. H. Valdivieso, R. Varona, F. del Rey, and A. Duran.** 1995. Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **177**:5732-5739.
- Chang, F. and I. Herskowitz.** 1990. Identification of a gene necessary for cell cycle arrest by a negative growth factor of yeast: FAR1 is an inhibitor of a G1 cyclin, CLN2. *Cell* **63**:999-1011.
- Chang, F. and I. Herskowitz.** 1992. Phosphorylation of FAR1 in response to alpha-factor: a possible requirement for cell-cycle arrest. *Mol. Biol. Cell* **3**:445-450.
- Chant, J., K. Corrado, J. R. Pringle, and I. Herskowitz.** 1991. Yeast BUD5, encoding a putative GDP-GTP exchange factor, is necessary for bud site selection and interacts with bud formation gene BEM1. *Cell* **65**:1213-1224.
- Chant, J. and I. Herskowitz.** 1991. Genetic control of bud site selection in yeast by a set of gene products that constitute a morphogenetic pathway. *Cell* **65**:1203-1212.

- Chant, J. and L. Stowers.** 1995. GTPase cascades choreographing cellular behavior: movement, morphogenesis, and more. *Cell* **81**:1-4.
- Chant, J., M. Mischke, E. Mitchell, I. Herskowitz, and J. R. Pringle.** 1995. Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *J.Cell Biol.* **129**:767-778.
- Chant, J. and J. R. Pringle.** 1995. Patterns of bud-site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **129**:751-765.
- Chant, J.** 1996. Generation of cell polarity in yeast. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**:557-565.
- Chant, J.** 1999. Cell polarity in yeast. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **15**:365-391.
- Chen, G. C., L. Zheng, and C. S. Chan.** 1996. The LIM domain-containing Dbm1 GTPase-activating protein is required for normal cellular morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:1376-1390.
- Chen, G. C., Y. J. Kim, and C. S. Chan.** 1997. The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**:2958-2971.
- Chen, W., H. H. Lim, and L. Lim.** 1993. The CDC42 homologue from *Caenorhabditis elegans*. Complementation of yeast mutation. *J.Biol.Chem.* **268**:13280-13285.
- Chenevert, J., K. Corrado, A. Bender, J. Pringle, and I. Herskowitz.** 1992. A yeast gene (BEM1) necessary for cell polarization whose product contains two SH3 domains. *Nature* **356**:77-79.
- Chenevert, J., N. Valtz, and I. Herskowitz.** 1994. Identification of genes required for normal pheromone-induced cell polarization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **136**:1287-1296.
- Chew, T. L., R. A. Masaracchia, Z. M. Goeckeler, and R. B. Wysolmerski.** 1998. Phosphorylation of non-muscle myosin II regulatory light chain by p21-activated kinase (gamma-PAK). *J.Muscle Res.Cell Motil.* **19**:839-854.
- Chien, C. T., P. L. Bartel, R. Sternglanz, and S. Fields .** 1991. The two-hybrid system: a method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:9578-9582.
- Choi, K. Y., B. Satterberg, D. M. Lyons, and E. A. Elion .** 1994. Ste5 tethers multiple protein kinases in the MAP kinase cascade required for mating in *S. cerevisiae*. *Cell* **78**:499-512.
- Cid, V. J., A. Duran, F. del Rey, M. P. Snyder, C. Nombela, and M. Sanchez.** 1995. Molecular basis of cell integrity and morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Rev.* **59**:345-386.
- Cid, V. J., R. Cenamor, M. Sanchez, and C. Nombela.** 1998. A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* **144 (Pt 1)**:25-36.
- Cobb, M. H. and E. J. Goldsmith.** 1995. How MAP kinases are regulated. *J.Biol.Chem.* **270**:14843-14846.
- Collart, M.A. and Oliviero, S.** 1993. *Current Protocols in Molecular Biology* (New York; Greene Publishing Associates and Wiley Interscience).
- Company, M. and B. Errede.** 1988. A Ty1 cell-type-specific regulatory sequence is a recognition element for a constitutive binding factor. *Mol.Cell Biol.* **8**:5299-5309.
- Company, M., C. Adler, and B. Errede.** 1988. Identification of a Ty1 regulatory sequence responsive to STE7 and STE12. *Mol.Cell Biol.* **8**:2545-2554.

- Cook, J. G., L. Bardwell, S. J. Kron, and J. Thorner.** 1996. Two novel targets of the MAP kinase Kss1 are negative regulators of invasive growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **10**:2831-2848.
- Cook, J. G., L. Bardwell, and J. Thorner.** 1997. Inhibitory and activating functions for MAPK Kss1 in the *S. cerevisiae* filamentous-growth signalling pathway. *Nature* **390**:85-88.
- Cooper, J. A.** 1994. MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr.Biol.* **4**:1118-1121.
- Coso, O. A., M. Chiariello, J. C. Yu, H. Teramoto, P. Crespo, N. Xu, T. Miki, and J. S. Gutkind.** 1995. The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* **81**:1137-1146.
- Costigan, C., S. Gehrung, and M. Snyder.** 1992. A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol.Cell Biol.* **12**:1162-1178.
- Cross, F. R., M. Hoek, J. D. McKinney, and A. H. Tinkelenberg.** 1994. Role of Swi4 in cell cycle regulation of CLN2 expression. *Mol.Cell Biol.* **14**:4779-4787.
- Cross, F. R.** 1995. Starting the cell cycle: what's the point? *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**:790-797.
- Cullen, P. J., J. Schultz, J. Horecka, B. J. Stevenson, Y. Jigami, and G. F. Sprague.** 2000. Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**:1005-1018.
- Cvrckova, F. and K. Nasmyth.** 1993. Yeast G1 cyclins CLN1 and CLN2 and a GAP-like protein have a role in bud formation. *EMBO J.* **12**:5277-5286.
- Cvrckova, F., C. De Virgilio, E. Manser, J. R. Pringle, and K. Nasmyth.** 1995. Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev.* **9**:1817-1830.
- Daniels, R. H. and G. M. Bokoch.** 1999. p21-activated protein kinase: a crucial component of morphological signaling? *Trends Biochem.Sci.* **24**:350-355.
- Davenport, K. D., K. E. Williams, B. D. Ullmann, and M. C. Gustin.** 1999. Activation of the *Saccharomyces cerevisiae* filamentation/invasion pathway by osmotic stress in high-osmolarity glycogen pathway mutants. *Genetics* **153**:1091-1103.
- Davenport, K. R., M. Sohaskey, Y. Kamada, D. E. Levin, and M. C. Gustin.** 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.
- Davis, C. R., T. J. Richman, S. B. Deliduka, J. O. Blaisdell, C. C. Collins, and D. I. Johnson.** 1998. Analysis of the mechanisms of action of the *Saccharomyces cerevisiae* dominant lethal *cdc42G12V* and dominant negative *cdc42D118A* mutations. *J.Biol.Chem.* **273**:849-858.
- de Nobel, H., C. Ruiz, H. Martin, W. Morris, S. Brul, M. Molina, and F. M. Klis.** 2000. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slit2/Mpk1 MAP kinase and in an Slit2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology* **146 (Pt 9)**:2121-2132.
- de Nobel, J. G., F. M. Klis, J. Priem, T. Munnik, and E. H. van den.** 1990. The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **6**:491-499.

- Delley, P. A. and M. N. Hall.** 1999. Cell wall stress depolarizes cell growth via hyperactivation of RHO1. *J.Cell Biol.* **147**:163-174.
- DeMarini, D. J., A. E. Adams, H. Fares, C. De Virgilio, G. Valle, J. S. Chuang, and J. R. Pringle.** 1997. A septin-based hierarchy of proteins required for localized deposition of chitin in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *J.Cell Biol.* **139**:75-93.
- Dietzel, C. and J. Kurjan.** 1987. The yeast SCG1 gene: a G alpha-like protein implicated in t. *Cell* **50**:1001-1010.
- Dirick, L., T. Moll, H. Auer, and K. Nasmyth.** 1992. A central role for SWI6 in modulating cell cycle Start-specific transcription in yeast. *Nature* **357**:508-513.
- Dirick, L., T. Bohm, and K. Nasmyth.** 1995. Roles and regulation of Cln-Cdc28 kinases at the start of the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**:4803-4813.
- Dodou, E. and R. Treisman.** 1997. The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.* **17**:1848-1859.
- Doi, K., A. Gartner, G. Ammerer, B. Errede, H. Shinkawa, K. Sugimoto, and K. Matsumoto.** 1994. MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **13**:61-70.
- Dolan, J. W. and S. Fields.** 1990. Overproduction of the yeast STE12 protein leads to constitutive transcriptional induction. *Genes Dev.* **4**:492-502.
- Drgonova, J., T. Drgon, K. Tanaka, R. Kollar, G. C. Chen, R. A. Ford, C. S. Chan, Y. Takai, and E. Cabib.** 1996. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis [see comments]. *Science* **272**:277-279.
- Drogen, F., S. M. O'Rourke, V. M. Stucke, M. Jaquenoud, A. M. Neiman, and M. Peter.** 2000. Phosphorylation of the MEKK Ste11p by the PAK-like kinase Ste20p is required for MAP kinase signaling in vivo. *Curr.Biol.* **10**:630-639.
- Drubin, D. G. and W. J. Nelson.** 1996. Origins of cell polarity. *Cell* **84**:335-344.
- Dunn, T. M. and D. Shortle.** 1990. Null alleles of SAC7 suppress temperature-sensitive actin mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **10**:2308-2314.
- Eby, J. J., S. P. Holly, F. van Drogen, A. V. Grishin, M. Peter, D. G. Drubin, and K. J. Blumer.** 1998. Actin cytoskeleton organization regulated by the PAK family of protein kinases. *Curr.Biol.* **8**:967-970.
- Elia, L. and L. Marsh.** 1998. A role for a protease in morphogenic responses during yeast cell fusion. *J.Cell Biol.* **142**:1473-1485.
- Elion, E. A., P. L. Grisafi, and G. R. Fink.** 1990. FUS3 encodes a cdc2+/CDC28-related kinase required for the transition from mitosis into conjugation. *Cell* **60**:649-664.
- Elion, E. A., J. A. Brill, and G. R. Fink.** 1991. FUS3 represses CLN1 and CLN2 and in concert with KSS1 promotes signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:9392-9396.
- Elion, E. A., B. Satterberg, and J. E. Kranz.** 1993. FUS3 phosphorylates multiple components of the mating signal transduction cascade: evidence for STE12 and FAR1. *Mol.Biol.Cell* **4**:495-510.
- Epp, J. A. and J. Chant.** 1997. An IQGAP-related protein controls actin-ring formation and cytokinesis in yeast. *Curr.Biol.* **7**:921-929.
- Erickson, J. W., C. Zhang, R. A. Kahn, T. Evans, and R. A. Cerione.** 1996. Mammalian Cdc42 is a

- brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J.Biol.Chem.* **271**:26850-26854.
- Errede, B., A. Gartner, Z. Zhou, K. Nasmyth, and G. Ammerer.** 1993. MAP kinase-related FUS3 from *S. cerevisiae* is activated by STE7 in vitro. *Nature* **362**:261-264.
- Espinoza, F. H., J. Ogas, I. Herskowitz, and D. O. Morgan.** 1994. Cell cycle control by a complex of the cyclin HCS26 (PCL1) and the kinase PHO85. *Science* **266**:1388-1391.
- Evangelista, M., K. Blundell, M. S. Longtine, C. J. Chow, N. Adames, J. R. Pringle, M. Peter, and C. Boone.** 1997. Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* **276**:118-122.
- Featherstone, C.** 1997. The many faces of WAS protein [news]. *Science* **275**:27-28.
- Feig, L. A.** 1994. Guanine-nucleotide exchange factors: a family of positive regulators of Ras and related GTPases. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**:204-211.
- Feilotter, H. E., G. J. Hannon, C. J. Ruddell, and D. Beach.** 1994. Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* **22**:1502-1503.
- Feng, Y., L. Y. Song, E. Kincaid, S. K. Mahanty, and E. A. Elion.** 1998. Functional binding between Gbeta and the LIM domain of Ste5 is required to activate the MEKK Ste11. *Curr.Biol.* **8**:267-278.
- Field, C., R. Li, and K. Oegema.** 1999. Cytokinesis in eukaryotes: a mechanistic comparison. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**:68-80.
- Field, C. M. and D. Kellogg.** 1999. Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol.* **9**:387-394.
- Fields, S. and O. Song.** 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* **340**:245-246.
- Finegold, A. A., D. I. Johnson, C. C. Farnsworth, M. H. Gelb, S. R. Judd, J. A. Glomset, and F. Tamanai.** 1991. Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the CDC43 gene product but not the DPR1 gene product. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**:4448-4452.
- Finger, F. P. and P. Novick.** 1998. Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *J.Cell Biol.* **142**:609-612.
- Fujita, A., A. Tonouchi, T. Hiroko, F. Inose, T. Nagashima, R. Satoh, and S. Tanaka.** 1999. Hsl7p, a negative regulator of Ste20p protein kinase in the *Saccharomyces cerevisiae* filamentous growth-signaling pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:8522-8527.
- Fujiwara, T., K. Tanaka, A. Mino, M. Kikyo, K. Takahashi, K. Shimizu, and Y. Takai.** 1998. Rho1p-Bni1p-Spa2p interactions: implication in localization of Bni1p at the bud site and regulation of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell* **9**:1221-1233.
- Gammie, A. E., V. Brizzio, and M. D. Rose.** 1998. Distinct morphological phenotypes of cell fusion mutants. *Mol.Biol.Cell* **9**:1395-1410.
- Garrington, T. P. and G. L. Johnson.** 1999. Organization and regulation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* **11**:211-218.
- Gartner, A., K. Nasmyth, and G. Ammerer.** 1992. Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes Dev.* **6**:1280-1292.

- Gartner, A., A. Jovanovic, D. I. Jeoung, S. Bourlat, F. R. Cross, and G. Ammerer.** 1998. Pheromone-dependent G1 cell cycle arrest requires Far1 phosphorylation, but may not involve inhibition of Cdc28-Cln2 kinase, in vivo. *Mol.Cell Biol.* **18**:3681-3691.
- Geli, M. I. and H. Riezman.** 1996. Role of type I myosins in receptor-mediated endocytosis in yeast. *Science* **272**:533-535.
- Gelperin, D., J. Weigle, K. Nelson, P. Roseboom, K. Irie, K. Matsumoto, and S. Lemmon.** 1995. 14-3-3 proteins: potential roles in vesicular transport and Ras signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**:11539-11543.
- Gimeno, C. J. and G. R. Fink.** 1992. The logic of cell division in the life cycle of yeast. *Science* **257**:626.
- Gimeno, C. J., P. O. Ljungdahl, C. A. Styles, and G. R. Fink.** 1992. Unipolar cell divisions in the yeast *S. cerevisiae* lead to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* **68**:1077-1090.
- Gong, T. W., J. J. Shin, M. Burmeister, and M. I. Lomax.** 1997. Complete cDNAs for CDC42 from chicken cochlea and mouse liver. *Biochim.Biophys.Acta* **1352**:282-292.
- Goodson, H. V., B. L. Anderson, H. M. Warrick, L. A. Pon, and J. A. Spudich.** 1996. Synthetic lethality screen identifies a novel yeast myosin I gene (MYO5): myosin I proteins are required for polarization of the actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.* **133**:1277-1291.
- Gorner, W., E. Durchschlag, M. T. Martinez-Pastor, F. Estruch, G. Ammerer, B. Hamilton, H. Ruis, and C. Schuller.** 1998. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev.* **12**:586-597.
- Gosser, Y. Q., T. K. Nomanbhoy, B. Aghazadeh, D. Manor, C. Combs, R. A. Cerione, and M. K. Rosen.** 1997. C-terminal binding domain of Rho GDP-dissociation inhibitor directs N-terminal inhibitory peptide to GTPases. *Nature* **387**:814-819.
- Govindan, B., R. Bowser, and P. Novick.** 1995. The role of Myo2, a yeast class V myosin, in vesicular transport. *J.Cell Biol.* **128**:1055-1068.
- Gray, J. V., J. P. Ogas, Y. Kamada, M. Stone, D. E. Levin, and I. Herskowitz.** 1997. A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* **16**:4924-4937.
- Gulli, M., M. Jaquenoud, Y. Shimada, G. Niederhauser, P. Wiget, and M. Peter.** 2000. Phosphorylation of the cdc42 exchange factor cdc24 by the PAK-like kinase cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol.Cell* **6**:1155-1167.
- Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander, and K. Davenport.** 1998. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:1264-1300.
- Gyuris, J., E. Golemis, H. Chertkov, and R. Brent.** 1993. Cdi1, a human G1 and S phase protein phosphatase that associates with Cdk2. *Cell* **75**:791-803.
- Hagen, D. C., G. McCaffrey, and G. F. Sprague, Jr.** 1991. Pheromone response elements are necessary and sufficient for basal and pheromone-induced transcription of the FUS1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **11**:2952-2961.
- Halme, A., M. Michelitch, E. L. Mitchell, and J. Chant.** 1996. Bud10p directs axial cell polarization in budding yeast and resembles a transmembrane receptor. *Curr.Biol.* **6**:570-579.
- Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J.Mol.Biol.* **166**:557-580.

- Hancock, J. F., H. Paterson, and C. J. Marshall.** 1990. A polybasic domain or palmitoylation is required in addition to the CAAX motif to localize p21ras to the plasma membrane. *Cell* **63**:133-139.
- Hancock, J. F., K. Cadwallader, H. Paterson, and C. J. Marshall.** 1991. A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J.* **10**:4033-4039.
- Hanes, S. D., P. R. Shank, and K. A. Bostian.** 1989. Sequence and mutational analysis of ESS1, a gene essential for growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **5**:55-72.
- Hani, J., B. Schelbert, A. Bernhardt, H. Domdey, G. Fischer, K. Wiebauer, and J. U. Rahfeld.** 1999. Mutations in a peptidylprolyl-cis/trans-isomerase gene lead to a defect in 3'-end formation of a pre-mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **274**:108-116.
- Hartwell, L. H., J. Culotti, and B. Reid.** 1970. Genetic control of the cell-division cycle in yeast. I. Detection of mutants. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **66**:352-359.
- Heinisch, J. J., A. Lorberg, H. P. Schmitz, and J. J. Jacoby.** 1999. The protein kinase C-mediated MAP kinase pathway involved in the maintenance of cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **32**:671-680.
- Helliwell, S. B., I. Howald, N. Barbet, and M. N. Hall.** 1998. TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **148**:99-112.
- Helliwell, S. B., A. Schmidt, Y. Ohya, and M. N. Hall.** 1998. The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Curr.Biol.* **8**:1211-1214.
- Herskowitz, I.** 1995. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell* **80**:187-197.
- Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, and A. Tzagoloff.** 1986. Yeast/*E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites. *Yeast* **2**:163-167.
- Hirano, H., K. Tanaka, K. Ozaki, H. Imamura, H. Kohno, T. Hihara, T. Kameyama, K. Hotta, M. Arisawa, T. Watanabe, H. Qadota, Y. Ohya, and Y. Takai.** 1996. ROM7/BEM4 encodes a novel protein that interacts with the Rho1p small GTP-binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:4396-4403.
- Holly, S. P. and K. J. Blumer.** 1999. PAK-family kinases regulate cell and actin polarization throughout the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **147**:845-856.
- Huang, K. N. and L. S. Symington.** 1994. Mutation of the gene encoding protein kinase C 1 stimulates mitotic recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **14**:6039-6045.
- Hughes, T. R., M. J. Marton, A. R. Jones, C. J. Roberts, R. Stoughton, C. D. Armour, H. A. Bennett, E. Coffey, H. Dai, Y. D. He, M. J. Kidd, A. M. King, M. R. Meyer, D. Slade, P. Y. Lum, S. B. Stepaniants, D. D. Shoemaker, D. Gachotte, K. Chakraborty, J. Simon, M. Bard, and S. H. Friend.** 2000. Functional discovery via a compendium of expression profiles. *Cell* **102**:109-126.
- Hunter, T. and G. D. Plowman.** 1997. The protein kinases of budding yeast: six score and more. *Trends Biochem.Sci.* **22**:18-22.
- Hutchins, K. and H. Bussey.** 1983. Cell wall receptor for yeast killer toxin: involvement of (1 leads to 6)-beta-D-glucan. *J.Bacteriol.* **154**:161-169.
- Igual, J. C., A. L. Johnson, and L. H. Johnston.** 1996. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* **15**:5001-5013.

- Imai, J., Toh-e A, and Y. Matsui.** 1996. Genetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* RHO3 gene, encoding a rho-type small GTPase, provides evidence for a role in bud formation. *Genetics* **142**:359-369.
- Imamura, H., K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, T. Kamei, K. Takahashi, T. Sasaki, and Y. Takai.** 1997. Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **16**:2745-2755.
- Inouye, C., N. Dhillon, T. Durfee, P. C. Zambryski, and J. Thorner.** 1997. Mutational analysis of STE5 in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: application of a differential interaction trap assay for examining protein-protein interactions. *Genetics* **147**:479-492.
- Inouye, C., N. Dhillon, and J. Thorner.** 1997. Ste5 RING-H2 domain: role in Ste4-promoted oligomerization for yeast pheromone signaling. *Science* **278**:103-106.
- Irie, K., M. Takase, K. S. Lee, D. E. Levin, H. Araki, K. Matsumoto, and Y. Oshima.** 1993. MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol.Cell Biol.* **13**:3076-3083.
- Ito, H., Y. Fukuda, K. Murata, and A. Kimura.** 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J.Bacteriol.* **153**:163-168.
- Jacoby, J. J., S. M. Nilius, and J. J. Heinisch.** 1998. A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol.Gen.Genet.* **258**:148-155.
- Jahng, K. Y., J. Ferguson, and S. I. Reed.** 1988. Mutations in a gene encoding the alpha subunit of a *Saccharomyces cerevisiae* G protein indicate a role in mating pheromone signaling. *Mol.Cell Biol.* **8**:2484-2493.
- James, P., J. Halladay, and E. A. Craig.** 1996. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* **144**:1425-1436.
- Jansen, R. P., C. Dowzer, C. Michaelis, M. Galova, and K. Nasmyth.** 1996. Mother cell-specific HO expression in budding yeast depends on the unconventional myosin myo4p and other cytoplasmic proteins [see comments]. *Cell* **84**:687-697.
- Jeung, D. I., L. J. Oehlen, and F. R. Cross.** 1998. Cln3-associated kinase activity in *Saccharomyces cerevisiae* is regulated by the mating factor pathway. *Mol.Cell Biol.* **18**:433-441.
- Johnson, D. I. and J. R. Pringle.** 1990. Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J.Cell Biol.* **111**:143-152.
- Johnson, D. I.** 1999. Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **63**:54-105.
- Johnston, G. C., J. R. Pringle, and L. H. Hartwell.** 1977. Coordination of growth with cell division in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Exp.Cell Res.* **105**:79-98.
- Jung, U. S. and D. E. Levin.** 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol.Microbiol.* **34**:1049-1057.
- Kagami, M., Toh-e A, and Y. Matsui.** 1997. SRO9, a multicopy suppressor of the bud growth defect in the *Saccharomyces cerevisiae* rho3-deficient cells, shows strong genetic interactions with tropomyosin genes, suggesting its role in organization of the actin cytoskeleton. *Genetics* **147**:1003-1016.
- Kamada, Y., U. S. Jung, J. Piotrowski, and D. E. Levin.** 1995. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates

- a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* **9**:1559-1571.
- Kamada, Y., H. Qadota, C. P. Python, Y. Anraku, Y. Ohya, and D. E. Levin.** 1996. Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J.Biol.Chem.* **271**:9193-9196.
- Kamei, T., K. Tanaka, T. Hihara, M. Umikawa, H. Imamura, M. Kikyo, K. Ozaki, and Y. Takai.** 1998. Interaction of Bnr1p with a novel Src homology 3 domain-containing Hof1p. Implication in cytokinesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**:28341-28345.
- Kao, L. R., J. Peterson, R. Ji, L. Bender, and A. Bender .** 1996. Interactions between the ankyrin repeat-containing protein Akr1p and the pheromone response pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:168-178.
- Ketela, T., R. Green, and H. Bussey.** 1999. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J.Bacteriol.* **181**:3330-3340.
- Kilmartin, J. V. and A. E. Adams.** 1984. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J.Cell Biol.* **98**:922-933.
- Kim, Y. J., L. Francisco, G. C. Chen, E. Marcotte, and C. S. Chan.** 1994. Control of cellular morphogenesis by the Ip12/Bem2 GTPase-activating protein: possible role of protein phosphorylation. *J.Cell Biol.* **127**:1381-1394.
- King, A. J., H. Sun, B. Diaz, D. Barnard, W. Miao, S. Bagrodia, and M. S. Marshall.** 1998. The protein kinase Pak3 positively regulates Raf-1 activity through phosphorylation of serine 338. *Nature* **396**:180-183.
- Kirchhausen, T. and F. S. Rosen.** 1996. Disease mechanism: unravelling Wiskott-Aldrich syndrome. *Curr.Biol.* **6**:676-678.
- Kirchrath, L., A. Lorberg, H. P. Schmitz, U. Gengenbacher, and J. J. Heinisch.** 2000. Comparative genetic and physiological studies of the MAP kinase Mpk1p from *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Mol.Biol.* **300**:743-758.
- Koch, C. and K. Nasmyth.** 1994. Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr.Opin.Cell Biol.* **6**:451-459.
- Koch, C., A. Schleiffer, G. Ammerer, and K. Nasmyth.** 1996. Switching transcription on and off during the yeast cell cycle: Cln/Cdc28 kinases activate bound transcription factor SBF (Swi4/Swi6) at start, whereas Clb/Cdc28 kinases displace it from the promoter in G2. *Genes Dev.* **10**:129-141.
- Koch, G., K. Tanaka, T. Masuda, W. Yamochi, H. Nonaka, and Y. Takai.** 1997. Association of the Rho family small GTP-binding proteins with Rho GDP dissociation inhibitor (Rho GDI) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* **15**:417-422.
- Kohno, H., K. Tanaka, A. Mino, M. Umikawa, H. Imamura, T. Fujiwara, Y. Fujita, K. Hotta, H. Qadota, T. Watanabe, Y. Ohya, and Y. Takai.** 1996. Bni1p implicated in cytoskeletal control is a putative target of Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**:6060-6068.
- Kopecka, M. and M. Gabriel.** 1992. The influence of congo red on the cell wall and (1----3)-beta-D-glucan microfibril biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch.Microbiol.* **158**:115-126.
- Kranz, J. E., B. Satterberg, and E. A. Elion.** 1994. The MAP kinase Fus3 associates with and phosphorylates the upstream signaling component Ste5. *Genes Dev.* **8**:313-327.
- Kron, S. J., C. A. Styles, and G. R. Fink.** 1994. Symmetric cell division in pseudohyphae of the yeast

Saccharomyces cerevisiae. *Mol.Biol.Cell* **5**:1003-1022.

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

Kronstad, J. W., J. A. Holly, and V. L. MacKay. 1987. A yeast operator overlaps an upstream activation site. *Cell* **50**:369-377.

Kyriakis, J. M. and J. Avruch. 1996. Protein kinase cascades activated by stress and inflammatory cytokines. *Bioessays* **18**:567-577.

Lamarche, N. and A. Hall. 1994. GAPs for rho-related GTPases. *Trends Genet.* **10**:436-440.

Leberer, E., D. Dignard, D. H Marcus, D. Y. Thomas, and M. Whiteway. 1992. The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J.* **11**:4815-4824.

Leberer, E., D. Dignard, L. Hougan, D. Y. Thomas, and M. Whiteway. 1992. Dominant-negative mutants of a yeast G-protein beta subunit identify two functional regions involved in pheromone signalling. *EMBO J.* **11**:4805-4813.

Leberer, E., D. Dignard, D. H Marcus, D. Y. Thomas, and M. Whiteway. 1992. The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J.* **11**:4815-4824.

Leberer, E., D. Dignard, D. H Marcus, L. Hougan, M. Whiteway, and D. Y. Thomas. 1993. Cloning of *Saccharomyces cerevisiae* STE5 as a suppressor of a Ste20 protein kinase mutant: structural and functional similarity of Ste5 to Far1. *Mol.Gen.Genet.* **241**:241-254.

Leberer, E., J. Chenevert, T. Leeuw, D. H Marcus, I. Herskowitz, and D. Y. Thomas. 1996. Genetic interactions indicate a role for Mdg1p and the SH3 domain protein Bem1p in linking the G-protein mediated yeast pheromone signalling pathway to regulators of cell polarity. *Mol.Gen.Genet.* **252**:608-621.

Leberer, E., D. Y. Thomas, and M. Whiteway. 1997. Pheromone signalling and polarized morphogenesis in yeast. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **7**:59-66.

Leberer, E., C. Wu, T. Leeuw, A. Fourest-Lieuvain, J. E. Segall, and D. Y. Thomas. 1997. Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J.* **16**:83-97.

Lee, B. N. and E. A. Elion. 1999. The MAPKKK Ste11 regulates vegetative growth through a kinase cascade of shared signaling components. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:12679-12684.

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

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

Leeuw, T., A. Fourest-Lieuvain, C. Wu, J. Chenevert, K. Clark, M. Whiteway, D. Y. Thomas, and E. Leberer. 1995. Pheromone response in yeast: association of Bem1p with proteins of the MAP kinase cascade and actin. *Science* **270**:1210-1213.

Leeuw, T., C. Wu, J. D. Schrag, M. Whiteway, D. Y. Thomas, and E. Leberer. 1998. Interaction of a G-protein beta-subunit with a conserved sequence in

- Ste20/PAK family protein kinases. *Nature* **391**:191-195.
- Levin, D. E., F. O. Fields, R. Kunisawa, J. M. Bishop, and J. Thorner.** 1990. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**:213-224.
- Levin, D. E. and E. Bartlett-Heubusch.** 1992. Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J.Cell Biol.* **116**:1221-1229.
- Levin, D. E. and B. Errede.** 1995. The proliferation of MAP kinase signaling pathways in yeast. *Curr.Opin.Cell Biol.* **7**:197-202.
- Lew, D. J. and S. I. Reed.** 1993. Morphogenesis in the yeast cell cycle: regulation by Cdc28 and cyclins. *J.Cell Biol.* **120**:1305-1320.
- Lew, D. J. and S. I. Reed.** 1995. Cell cycle control of morphogenesis in budding yeast. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **5**:17-23.
- Li, R.** 1997. Bee1, a yeast protein with homology to Wiscott-Aldrich syndrome protein, is critical for the assembly of cortical actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.* **136**:649-658.
- Lim, L., E. Manser, T. Leung, and C. Hall.** 1996. Regulation of phosphorylation pathways by p21 GTPases. The p21 Ras-related Rho subfamily and its role in phosphorylation signalling pathways. *Eur.J.Biochem.* **242**:171-185.
- Lippincott, J. and R. Li.** 1998. Sequential assembly of myosin II, an IQGAP-like protein, and filamentous actin to a ring structure involved in budding yeast cytokinesis. *J.Cell Biol.* **140**:355-366.
- Liu, H. and A. Bretscher.** 1992. Characterization of TPM1 disrupted yeast cells indicates an involvement of tropomyosin in directed vesicular transport. *J.Cell Biol.* **118**:285-299.
- Liu, H., C. A. Styles, and G. R. Fink.** 1993. Elements of the yeast pheromone response pathway required for filamentous growth of diploids. *Science* **262**:1741-1744.
- Liu, H. P. and A. Bretscher.** 1989. Disruption of the single tropomyosin gene in yeast results in the disappearance of actin cables from the cytoskeleton. *Cell* **57**:233-242.
- Longtine, M. S., D. J. DeMarini, M. L. Valencik, O. S. Al Awar, H. Fares, C. De Virgilio, and J. R. Pringle.** 1996. The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Curr.Opin.Cell Biol.* **8**:106-119.
- Longtine, M. S., H. Fares, and J. R. Pringle.** 1998. Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J.Cell Biol.* **143**:719-736.
- Lorincz, A. T. and S. I. Reed.** 1984. Primary structure homology between the product of yeast cell division control gene CDC28 and vertebrate oncogenes. *Nature* **307**:183-185.
- Lu, W., S. Katz, R. Gupta, and B. J. Mayer.** 1997. Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr.Biol.* **7**:85-94.
- Luo, L., Y. J. Liao, L. Y. Jan, and Y. N. Jan.** 1994. Distinct morphogenetic functions of similar small GTPases: *Drosophila* Drac1 is involved in axonal outgrowth and myoblast fusion. *Genes Dev.* **8**:1787-1802.
- Lussier, M., A. M. White, J. Sheraton, T. di Paolo, J. Treadwell, S. B. Southard, C. I. Horenstein, J. Chen-Weiner, A. F. Ram, J. C. Kapteyn, T. W. Roemer, D. H. Vo, D. C. Bondoc, J. Hall, W. W. Zhong, A. M. Sdicu, J. Davies, F. M. Klis, P. W. Robbins, and H. Bussey.** 1997. Large scale identification of genes involved in cell surface biosynthesis and architecture in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **147**:435-450.

- Luyten, K., J. Albertyn, W. F. Skibbe, B. A. Prior, J. Ramos, J. M. Thevelein, and S. Hohmann.** 1995. Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J.* **14**:1360-1371.
- Lyons, D. M., S. K. Mahanty, K. Y. Choi, M. Manandhar, and E. A. Elion.** 1996. The SH3-domain protein Bem1 coordinates mitogen-activated protein kinase cascade activation with cell cycle control in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:4095-4106.
- Ma, D., J. G. Cook, and J. Thorner.** 1995. Phosphorylation and localization of Kss1, a MAP kinase of the *Saccharomyces cerevisiae* pheromone response pathway. *Mol.Biol.Cell* **6**:889-909.
- Maas, R. L., L. I. Jepeal, S. L. Elfering, R. F. Holcombe, C. C. Morton, R. L. Eddy, M. G. Byers, T. B. Shows, and P. Leder.** 1991. A human gene homologous to the formin gene residing at the murine limb deformity locus: chromosomal location and RFLPs. *Am.J.Hum.Genet.* **48**:687-695.
- Mack, D., K. Nishimura, B. K. Dennehey, T. Arbogast, J. Parkinson, Toh-e A, J. R. Pringle, A. Bender, and Y. Matsui.** 1996. Identification of the bud emergence gene BEM4 and its interactions with rho-type GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:4387-4395.
- Madaule, P., R. Axel, and A. M. Myers.** 1987. Characterization of two members of the rho gene family from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**:779-783.
- Madden, K., Y. J. Sheu, K. Baetz, B. Andrews, and M. Snyder.** 1997. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**:1781-1784.
- Madhani, H. D. and G. R. Fink.** 1997. Combinatorial control required for the specificity of yeast MAPK signaling. *Science* **275**:1314-1317.
- Madhani, H. D., C. A. Styles, and G. R. Fink.** 1997. MAP kinases with distinct inhibitory functions impart signaling specificity during yeast differentiation. *Cell* **91**:673-684.
- Madhani, H. D. and G. R. Fink.** 1998. The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol.* **8**:348-353.
- Madhani, H. D. and G. R. Fink.** 1998. The riddle of MAP kinase signaling specificity. *Trends Genet.* **14**:151-155.
- Maeda, T., S. M. Wurgler-Murphy, and H. Saito.** 1994. A two-component system that regulates an osmosensing MAP kinase cascade in yeast [see comments]. *Nature* **369**:242-245.
- Maeda, T., M. Takekawa, and H. Saito.** 1995. Activation of yeast PBS2 MAPKK by MAPKKs or by binding of an SH3-containing osmosensor. *Science* **269**:554-558.
- Manning, B. D., R. Padmanabha, and M. Snyder.** 1997. The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell* **8**:1829-1844.
- Manser, E., T. Leung, H. Salihuddin, Z. S. Zhao, and L. Lim.** 1994. A brain serine/threonine protein kinase activated by Cdc42 and Rac1. *Nature* **367**:40-46.
- Marcus, S., A. Polverino, M. Barr, and M. Wigler.** 1994. Complexes between STE5 and components of the pheromone-responsive mitogen-activated protein kinase module. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91** :7762-7766.

- Marini, N. J., E. Meldrum, B. Buehrer, A. V. Hubberstey, D. E. Stone, A. Traynor-Kaplan, and S. I. Reed.** 1996. A pathway in the yeast cell division cycle linking protein kinase C (Pkc1) to activation of Cdc28 at START. *EMBO J.* **15**:3040-3052.
- Marks, P. W. and D. J. Kwiatkowski.** 1996. Genomic organization and chromosomal location of murine Cdc42. *Genomics* **38**:13-18.
- Marshall, C. J.** 1994. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr.Opin.Genet.Dev.* **4**:82-89.
- Marshall, M. S.** 1993. The effector interactions of p21ras. *Trends Biochem.Sci.* **18**:250-254.
- Martin, H., J. Arroyo, M. Sanchez, M. Molina, and C. Nombela.** 1993. Activity of the yeast MAP kinase homologue Sl2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol.Gen.Genet.* **241**:177-184.
- Martin, H., A. Mendoza, J. M. Rodriguez-Pachon, M. Molina, and C. Nombela.** 1997. Characterization of SKM1, a *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a novel Ste20/PAK-like protein kinase. *Mol.Microbiol.* **23**:431-444.
- Martin, H., J. M. Rodriguez-Pachon, C. Ruiz, C. Nombela, and M. Molina.** 2000. Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sl2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **275**:1511-1519.
- Martinez-Pastor, M. T., G. Marchler, C. Schuller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, and F. Estruch.** 1996. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J.* **15**:2227-2235.
- Masuda, T., K. Tanaka, H. Nonaka, W. Yamochi, A. Maeda, and Y. Takai.** 1994. Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J.Biol.Chem.* **269**:19713-19718.
- Matsui, Y. and E. Toh.** 1992. Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. *Mol.Cell Biol.* **12**:5690-5699.
- Matsui, Y., R. Matsui, R. Akada, and Toh-e A.** 1996. Yeast src homology region 3 domain-binding proteins involved in bud formation. *J.Cell Biol.* **133**:865-878.
- Mazur, P. and W. Baginsky.** 1996. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J.Biol.Chem.* **271**:14604-14609.
- Mazzoni, C., P. Zarov, A. Rambourg, and C. Mann.** 1993. The SLT2 (MPK1) MAP kinase homolog is involved in polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **123**:1821-1833.
- McCaffrey, M., J. S. Johnson, B. Goud, A. M. Myers, J. Rossier, M. R. Popoff, P. Madaule, and P. Boquet.** 1991. The small GTP-binding protein Rho1p is localized on the Golgi apparatus and post-Golgi vesicles in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **115**:309-319.
- McCusker, J. H., D. S. Perlin, and J. E. Haber.** 1987. Pleiotropic plasma membrane ATPase mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **7**:4082-4088.
- McMillan, J. N., M. S. Longtine, R. A. Sia, C. L. Theesfeld, E. S. Bardes, J. R. Pringle, and D. J. Lew.** 1999. The morphogenesis checkpoint in *Saccharomyces cerevisiae*: cell cycle control of Swe1p degradation by Hsl1p and Hsl7p. *Mol.Cell Biol.* **19**:6929-6939.
- Measday, V., L. Moore, J. Ogas, M. Tyers, and B. Andrews.** 1994. The PCL2 (ORFD)-PHO85 cyclin-dependent kinase complex: a cell cycle regulator in yeast. *Science* **266**:1391-1395.

- Meikle, A. J., R. H. Reed, and G. M. Gadd.** 1988. Osmotic adjustment and the accumulation of organic solutes in whole cells and protoplasts of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Gen.Microbiol.* **134** (Pt 11):3049-3060.
- Mendenhall, M. D. and A. E. Hodge.** 1998. Regulation of Cdc28 cyclin-dependent protein kinase activity during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**:1191-1243.
- Michelitch, M. and J. Chant.** 1996. A mechanism of Bud1p GTPase action suggested by mutational analysis and immunolocalization. *Curr.Biol.* **6**:446-454.
- Miller, J.** 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Miller, P. J. and D. I. Johnson.** 1994. Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol.Cell Biol.* **14**:1075-1083.
- Miller, P. J. and D. I. Johnson.** 1997. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* cdc42-1ts allele and new temperature-conditional-lethal cdc42 alleles. *Yeast* **13**:561-572.
- Minden, A., A. Lin, F. X. Claret, A. Abo, and M. Karin.** 1995. Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**:1147-1157.
- Mirbod, F., S. Nakashima, Y. Kitajima, R. D. Cannon, and Y. Nozawa.** 1997. Molecular cloning of a Rho family, CDC42Ca gene from *Candida albicans* and its mRNA expression changes during morphogenesis. *J.Med.Vet.Mycol.* **35**:173-179.
- Mitchell, D. A., T. K. Marshall, and R. J. Deschenes.** 1993. Vectors for the inducible overexpression of glutathione S-transferase fusion proteins in yeast. *Yeast* **9**:715-722.
- Miyajima, I., M. Nakafuku, N. Nakayama, C. Brenner, A. Miyajima, K. Kaibuchi, K. Arai, Y. Kaziro, and K. Matsumoto.** 1987. GPA1, a haploid-specific essential gene, encodes a yeast homolog of mammalian G protein which may be involved in mating factor signal transduction. *Cell* **50**:1011-1019.
- Miyamoto, S., Y. Ohya, Y. Sano, S. Sakaguchi, H. Iida, and Y. Anraku.** 1991. A DBL-homologous region of the yeast CLS4/CDC24 gene product is important for Ca(2+)-modulated bud assembly. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **181**:604-610.
- Mosch, H. U., R. L. Roberts, and G. R. Fink.** 1996. Ras2 signals via the Cdc42/Ste20/mitogen-activated protein kinase module to induce filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:5352-5356.
- Mosch, H. U. and G. R. Fink.** 1997. Dissection of filamentous growth by transposon mutagenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **145**:671-684.
- Mosch, H. U., T. Kohler, and G. H. Braus.** 2001. Different domains of the essential GTPase Cdc42p required for growth and development of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **21**:235-248.
- Moskow, J. J., A. S. Gladfelter, R. E. Lamson, P. M. Pryciak, and D. J. Lew.** 2000. Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **20**:7559-7571.
- Munemitsu, S., M. A. Innis, R. Clark, F. McCormick, A. Ullrich, and P. Polakis.** 1990. Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol.Cell Biol.* **10**:5977-5982.
- Naqvi, S. N., R. Zahn, D. A. Mitchell, B. J. Stevenson, and A. L. Munn.** 1998. The WASp

- homologue Las17p functions with the WIP homologue End5p/verprolin and is essential for endocytosis in yeast. *Curr.Biol.* **8**:959-962.
- Nasmyth, K. and L. Dirick.** 1991. The role of SWI4 and SWI6 in the activity of G1 cyclins in yeast. *Cell* **66**:995-1013.
- Nern, A. and R. A. Arkowitz.** 1998. A GTP-exchange factor required for cell orientation. *Nature* **391**:195-198.
- Nern, A. and R. A. Arkowitz.** 2000. Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J.Cell Biol.* **148**:1115-1122.
- Nevoigt, E. and U. Stahl.** 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Rev.* **21**:231-241.
- Niedenthal, R. K., L. Riles, M. Johnston, and J. H. Hegemann.** 1996. Green fluorescent protein as a marker for gene expression and subcellular localization in budding yeast. *Yeast* **12**:773-786.
- Nonaka, H., K. Tanaka, H. Hirano, T. Fujiwara, H. Kohno, M. Umikawa, A. Mino, and Y. Takai.** 1995. A downstream target of RHO1 small GTP-binding protein is PKC1, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **14**:5931-5938.
- Norbeck, J. and A. Blomberg.** 1996. Protein expression during exponential growth in 0.7 M NaCl medium of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Lett.* **137**:1-8.
- Norbeck, J. and A. Blomberg.** 1997. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 M NaCl. Evidence for osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. *J.Biol.Chem.* **272**:5544-5554.
- O'Rourke, S. M. and I. Herskowitz.** 1998. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **12**:2874-2886.
- Ochs, H. D.** 1998. The Wiskott-Aldrich syndrome. *Semin.Hematol.* **35**:332-345.
- Oda, Y., K. Huang, F. R. Cross, D. Cowburn, and B. T. Chait.** 1999. Accurate quantitation of protein expression and site-specific phosphorylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **96**:6591-6596.
- Oehlen, L. J. and F. R. Cross.** 1994. G1 cyclins CLN1 and CLN2 repress the mating factor response pathway at Start in the yeast cell cycle. *Genes Dev.* **8**:1058-1070.
- Oehlen, L. J. and F. R. Cross.** 1998. Potential regulation of Ste20 function by the Cln1-Cdc28 and Cln2-Cdc28 cyclin-dependent protein kinases. *J.Biol.Chem.* **273**:25089-25097.
- Oehlen, L. J. and F. R. Cross.** 1998. The role of Cdc42 in signal transduction and mating of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**:8556-8559.
- Ogas, J., B. J. Andrews, and I. Herskowitz.** 1991. Transcriptional activation of CLN1, CLN2, and a putative new G1 cyclin (HCS26) by SWI4, a positive regulator of G1-specific transcription. *Cell* **66**:1015-1026.
- Orlean, P., M. J. Kuranda, and C. F. Albright.** 1991. Analysis of glycoproteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **194**:682-697.
- Osman, M. A. and R. A. Cerione.** 1998. Iqg1p, a yeast homologue of the mammalian IQGAPs, mediates cdc42p effects on the actin cytoskeleton. *J.Cell Biol.* **142**:443-455.
- Ovalle, R., S. T. Lim, B. Holder, C. K. Jue, C. W. Moore, and P. N. Lipke.** 1998. A spheroplast rate

assay for determination of cell wall integrity in yeast. *Yeast* **14**:1159-1166.

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

Palmieri, S. J. and B. K. Haarer. 1998. Polarity and division site specification in yeast. *Curr.Opin.Microbiol.* **1**:678-686.

Paravicini, G., M. Cooper, L. Friedli, D. J. Smith, J. L. Carpentier, L. S. Klig, and M. A. Payton. 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol.Cell Biol.* **12**:4896-4905.

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

Park, H. O., J. Chant, and I. Herskowitz. 1993. BUD2 encodes a GTPase-activating protein for Bud1/Rsr1 necessary for proper bud-site selection in yeast. *Nature* **365**:269-274.

Partridge, J. F., G. E. Mikesell, and L. L. Breeden. 1997. Cell cycle-dependent transcription of CLN1 involves swi4 binding to MCB-like elements. *J.Biol.Chem.* **272**:9071-9077.

Peter, M., A. Gartner, J. Horecka, G. Ammerer, and I. Herskowitz. 1993. FAR1 links the signal transduction pathway to the cell cycle machinery in yeast. *Cell* **73**:747-760.

Peter, M. and I. Herskowitz. 1994. Direct inhibition of the yeast cyclin-dependent kinase Cdc28-Cln by Far1. *Science* **265**:1228-1231.

Peter, M., A. M. Neiman, H. O. Park, M. van Lohuizen, and I. Herskowitz. 1996. Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J.* **15**:7046-7059.

Peters, C. and A. Mayer. 1998. Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* **396**:575-580.

Peterson, J., Y. Zheng, L. Bender, A. Myers, R. Cerione, and A. Bender. 1994. Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J.Cell Biol.* **127**:1395-1406.

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

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

Polakis, P. and F. McCormick. 1993. Structural requirements for the interaction of p21ras with GAP, exchange factors, and its biological effector target. *J.Biol.Chem.* **268**:9157-9160.

Posas, F., S. M. Wurgler-Murphy, T. Maeda, E. A. Witten, T. C. Thai, and H. Saito. 1996. Yeast HOG1 MAP kinase cascade is regulated by a multistep phosphorelay mechanism in the SLN1-YPD1-SSK1 "two-component" osmosensor. *Cell* **86**:865-875.

Posas, F. and H. Saito. 1997. Osmotic activation of the HOG MAPK pathway via Ste11p MAPKKK: scaffold role of Pbs2p MAPKK. *Science* **276**:1702-1705.

Posas, F., M. Takekawa, and H. Saito. 1998. Signal transduction by MAP kinase cascades in budding yeast. *Curr.Opin.Microbiol.* **1**:175-182.

- Powers, S., E. Gonzales, T. Christensen, J. Cubert, and D. Broek.** 1991. Functional cloning of BUD5, a CDC25-related gene from *S. cerevisiae* that can suppress a dominant-negative RAS2 mutant. *Cell* **65**:1225-1231.
- Pringle, J. R., R. A. Preston, A. E. Adams, T. Stearns, D. G. Drubin, B. K. Haarer, and E. W. Jones.** 1989. Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol.* **31**:357-435.
- Pringle, J. R., E. Bi, H. A. Harkins, J. E. Zahner, C. De Virgilio, J. Chant, K. Corrado, and H. Fares.** 1995. Establishment of cell polarity in yeast. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **60**:729-744.
- Printen, J. A. and G. F. Sprague, Jr.** 1994. Protein-protein interactions in the yeast pheromone response pathway: Ste5p interacts with all members of the MAP kinase cascade. *Genetics* **138**:609-619.
- Pruyne, D. and A. Bretscher.** 2000. Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *J. Cell Sci.* **113** (Pt 3):365-375.
- Pruyne, D. W., D. H. Schott, and A. Bretscher.** 1998. Tropomyosin-containing actin cables direct the Myo2p-dependent polarized delivery of secretory vesicles in budding yeast. *J. Cell Biol.* **143**:1931-1945.
- Qadota, H., C. P. Python, S. B. Inoue, M. Arisawa, Y. Anraku, Y. Zheng, T. Watanabe, D. E. Levin, and Y. Ohya.** 1996. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase [see comments]. *Science* **272**:279-281.
- Rad, M. R., G. Xu, and C. P. Hollenberg.** 1992. STE50, a novel gene required for activation of conjugation at an early step in mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **236**:145-154.
- Raitt, D. C., F. Posas, and H. Saito.** 2000. Yeast cdc42 GTPase and ste20 PAK-like kinase regulate Sho1-dependent activation of the hog1 MAPK pathway [In Process Citation]. *EMBO J.* **19**:4623-4631.
- Ram, A. F., A. Wolters, R. Ten Hoopen, and F. M. Klis.** 1994. A new approach for isolating cell wall mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by screening for hypersensitivity to calcofluor white. *Yeast* **10**:1019-1030.
- Ram, A. F., S. S. Brekelmans, L. J. Oehlen, and F. M. Klis.** 1995. Identification of two cell cycle regulated genes affecting the beta 1,3-glucan content of cell walls in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **358**:165-170.
- Ramer, S. W. and R. W. Davis.** 1993. A dominant truncation allele identifies a gene, STE20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:452-456.
- Reed, R. H., J. A. Chudek, R. Foster, and G. M. Gadd.** 1987. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:2119-2123.
- Reed, S. I.** 1992. The role of p34 kinases in the G1 to S-phase transition. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**:529-561.
- Reid, B. J. and L. H. Hartwell.** 1977. Regulation of mating in the cell cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **75**:355-365.
- Reiser, V., S. M. Salah, and G. Ammerer.** 2000. Polarized localization of yeast Pbs2 depends on osmotic stress, the membrane protein Sho1 and Cdc42. *Nat. Cell Biol.* **2**:620-627.
- Richman, T. J., M. M. Sawyer, and D. I. Johnson.** 1999. The Cdc42p GTPase is involved in a G2/M morphogenetic checkpoint regulating the apical-isotropic switch and nuclear division in yeast. *J. Biol. Chem.* **274**:16861-16870.

- Roberts, R. L. and G. R. Fink.** 1994. Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev.* **8**:2974-2985.
- Roberts, R. L., H. U. Mosch, and G. R. Fink.** 1997. 14-3-3 proteins are essential for RAS/MAPK cascade signaling during pseudohyphal development in *S. cerevisiae*. *Cell* **89**:1055-1065.
- Robinson, M. J. and M. H. Cobb.** 1997. Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr.Opin.Cell Biol.* **9**:180-186.
- Robinson, N. G., L. Guo, J. Imai, E. Toh, Y. Matsui, and F. Tamanoi.** 1999. Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol.Cell Biol.* **19**:3580-3587.
- Roemer, T., G. Paravicini, M. A. Payton, and H. Bussey.** 1994. Characterization of the yeast (1-->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J.Cell Biol.* **127**:567-579.
- Roemer, T., K. Madden, J. Chang, and M. Snyder.** 1996. Selection of axial growth sites in yeast requires Axl2p, a novel plasma membrane glycoprotein. *Genes Dev.* **10**:777-793.
- Roncero, C. and A. Duran.** 1985. Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J.Bacteriol.* **163**:1180-1185.
- Ruggieri, R., A. Bender, Y. Matsui, S. Powers, Y. Takai, J. R. Pringle, and K. Matsumoto.** 1992. RSR1, a ras-like gene homologous to Krev-1 (*smg21A/rap1A*): role in the development of cell polarity and interactions with the Ras pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **12**:758-766.
- Ruiz, C., V. J. Cid, M. Lussier, M. Molina, and C. Nombela.** 1999. A large-scale sonication assay for cell wall mutant analysis in yeast. *Yeast* **15**:1001-1008.
- Run, J. Q., R. Steven, M. S. Hung, R. van Weeghel, J. G. Culotti, and J. C. Way.** 1996. Suppressors of the *unc-73* gene of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **143**:225-236.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.** 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual* (New York; Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sanders, L. C., F. Matsumura, G. M. Bokoch, and P. de Lanerolle.** 1999. Inhibition of myosin light chain kinase by p21-activated kinase. *Science* **283**:2083-2085.
- Sanders, S. L. and I. Herskowitz.** 1996. The BUD4 protein of yeast, required for axial budding, is localized to the mother/BUD neck in a cell cycle-dependent manner. *J.Cell Biol.* **134**:413-427.
- Schaeffer, H. J. and M. J. Weber.** 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol.Cell Biol.* **19**:2435-2444.
- Schmidt, A., M. Bickle, T. Beck, and M. N. Hall.** 1997. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* **88**:531-542.
- Schmidt, A. and M. N. Hall.** 1998. Signaling to the actin cytoskeleton. *Annu.Rev.Cell Dev.Biol.* **14**:305-338.
- Schmitt, H. D., P. Wagner, E. Pfaff, and D. Gallwitz.** 1986. The ras-related YPT1 gene product in yeast: a GTP-binding protein that might be involved in microtubule organization. *Cell* **47**:401-412.
- Schott, D., J. Ho, D. Pruyne, and A. Bretscher.** 1999. The COOH-terminal domain of Myo2p, a yeast myosin V, has a direct role in secretory vesicle targeting. *J.Cell Biol.* **147**:791-808.

- Sheu, Y. J., B. Santos, N. Fortin, C. Costigan, and M. Snyder.** 1998. Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol.Cell Biol.* **18**:4053-4069.
- Shimada, Y., M. P. Gulli, and M. Peter.** 2000. Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat.Cell Biol.* **2**:117-124.
- Shinjo, K., J. G. Koland, M. J. Hart, V. Narasimhan, D. I. Johnson, T. Evans, and R. A. Cerione.** 1990. Molecular cloning of the gene for the human placental GTP-binding protein Gp (G25K): identification of this GTP-binding protein as the human homolog of the yeast cell-division-cycle protein CDC42. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **87**:9853-9857.
- Shulewitz, M. J., C. J. Inouye, and J. Thorner.** 1999. Hsl7 localizes to a septin ring and serves as an adapter in a regulatory pathway that relieves tyrosine phosphorylation of Cdc28 protein kinase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **19**:7123-7137.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter.** 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**:19-27.
- Simon, M. N., C. De Virgilio, B. Souza, J. R. Pringle, A. Abo, and S. I. Reed.** 1995. Role for the Rho-family GTPase Cdc42 in yeast mating-pheromone signal pathway. *Nature* **376**:702-705.
- Sloat, B. F., A. Adams, and J. R. Pringle.** 1981. Roles of the CDC24 gene product in cellular morphogenesis during the *Saccharomyces cerevisiae* cell cycle. *J.Cell Biol.* **89**:395-405.
- Soler, M.** 1997. *Caracterización molecular y funcional de las interacciones de la MAP quinasa Slt2 con otros elementos de la ruta de señalización que controla la integridad celular de Saccharomyces cerevisiae* (Tesis Doctoral).
- Soler, M., A. Plovins, H. Martin, M. Molina, and C. Nombela.** 1995. Characterization of domains in the yeast MAP kinase Slt2 (Mpk1) required for functional activity and in vivo interaction with protein kinases Mkk1 and Mkk2. *Mol.Microbiol.* **17**:833-842.
- Sprague, Jr., J: F.** 1991. Assay of yeast mating reaction. *Methods in Enzimology* **194**: 77-93.
- Stevenson, B. J., N. Rhodes, B. Errede, and G. F. Sprague, Jr.** 1992. Constitutive mutants of the protein kinase STE11 activate the yeast pheromone response pathway in the absence of the G protein. *Genes Dev.* **6**:1293-1304.
- Stevenson, B. J., B. Ferguson, C. De Virgilio, E. Bi, J. R. Pringle, G. Ammerer, and G. F. Sprague, Jr.** 1995. Mutation of RGA1, which encodes a putative GTPase-activating protein for the polarity-establishment protein Cdc42p, activates the pheromone-response pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **9**:2949-2963.
- Sutherland, F. C., F. Lages, C. Lucas, K. Luyten, J. Albertyn, S. Hohmann, B. A. Prior, and S. G. Kilian.** 1997. Characteristics of Fps1-dependent and -independent glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **179**:7790-7795.
- Tedford, K., S. Kim, D. Sa, K. Stevens, and M. Tyers.** 1997. Regulation of the mating pheromone and invasive growth responses in yeast by two MAP kinase substrates. *Curr.Biol.* **7**:228-238.
- TerBush, D. R., T. Maurice, D. Roth, and P. Novick.** 1996. The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**:6483-6494.
- Thompson, G., D. Owen, P. A. Chalk, and P. N. Lowe.** 1998. Delineation of the Cdc42/Rac-binding

domain of p21-activated kinase. *Biochemistry* **37**:7885-7891.

Tjandra, H., J. Compton, and D. Kellogg. 1998. Control of mitotic events by the Cdc42 GTPase, the Clb2 cyclin and a member of the PAK kinase family. *Curr.Biol.* **8**:991-1000.

Toenjes, K. A., M. M. Sawyer, and D. I. Johnson. 1999. The guanine-nucleotide-exchange factor Cdc24p is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Curr.Biol.* **9**:1183-1186.

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

Trumpp, A., P. A. Blundell, J. L. de la Pompa, and R. Zeller. 1992. The chicken limb deformity gene encodes nuclear proteins expressed in specific cell types during morphogenesis. *Genes Dev.* **6**:14-28.

Tu, H. and M. Wigler. 1999. Genetic evidence for Pak1 autoinhibition and its release by Cdc42. *Mol.Cell Biol.* **19**:602-611.

Tyers, M. and B. Futcher. 1993. Far1 and Fus3 link the mating pheromone signal transduction pathway to three G1-phase Cdc28 kinase complexes [published erratum appears in *Mol Cell Biol* 1994 Mar;14(3):2222]. *Mol.Cell Biol.* **13**:5659-5669.

Umikawa, M., K. Tanaka, T. Kamei, K. Shimizu, H. Imamura, T. Sasaki, and Y. Takai. 1998. Interaction of Rho1p target Bni1p with F-actin-binding elongation factor 1alpha: implication in Rho1p-regulated reorganization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene* **16**:2011-2016.

van Heusden, G. P., D. J. Griffiths, J. C. Ford, A. W. T. Chin, P. A. Schrader, A. M. Carr, and H. Y. Steensma. 1995. The 14-3-3 proteins encoded by the BMH1 and BMH2 genes are essential in the yeast

Saccharomyces cerevisiae and can be replaced by a plant homologue. *Eur.J.Biochem.* **229**:45-53.

Verna, J., A. Lodder, K. Lee, A. Vagts, and R. Ballester . 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **94**:13804-13809.

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

Wassmann, K. and G. Ammerer. 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.

Watanabe, N., P. Madaule, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, A. Kakizuka, Y. Saito, K. Nakao, B. M. Jockusch, and S. Narumiya. 1997. p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **16** :3044-3056.

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

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

Whiteway, M. S., C. Wu, T. Leeuw, K. Clark, A. Fourest-Lieuvin, D. Y. Thomas, and E. Leberer. 1995. Association of the yeast pheromone response G protein beta gamma subunits with the MAP kinase scaffold Ste5p. *Science* **269**:1572-1575.

- Woychik, R. P., R. L. Maas, R. Zeller, T. F. Vogt, and P. Leder.** 1990. 'Formins': proteins deduced from the alternative transcripts of the limb deformity gene. *Nature* **346**:850-853.
- Wu, C., M. Whiteway, D. Y. Thomas, and E. Leberer.** 1995. Molecular characterization of Ste20p, a potential mitogen-activated protein or extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK) kinase kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **270**:15984-15992.
- Wu, C., S. F. Lee, E. Furmaniak-Kazmierczak, G. P. Cote, D. Y. Thomas, and E. Leberer.** 1996. Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J.Biol.Chem.* **271**:31787-31790.
- Wu, C., V. Lytvyn, D. Y. Thomas, and E. Leberer.** 1997. The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J.Biol.Chem.* **272**:30623-30626.
- Wu, C., E. Leberer, D. Y. Thomas, and M. Whiteway.** 1999. Functional characterization of the interaction of Ste50p with Ste11p MAPKKK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Biol.Cell* **10**:2425-2440.
- Wu, X., C. B. Wilcox, G. Devasahayam, R. L. Hackett, M. Arevalo-Rodriguez, M. E. Cardenas, J. Heitman, and S. D. Hanes.** 2000. The Ess1 prolyl isomerase is linked to chromatin remodeling complexes and the general transcription machinery. *EMBO J.* **19**:3727-3738.
- Xu, G., G. Jansen, D. Y. Thomas, C. P. Hollenberg, and R. M. Ramezani.** 1996. Ste50p sustains mating pheromone-induced signal transduction in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **20**:773-783.
- Yablonski, D., I. Marbach, and A. Levitzki.** 1996. Dimerization of Ste5, a mitogen-activated protein kinase cascade scaffold protein, is required for signal transduction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **93**:13864-13869.
- Yamochi, W., K. Tanaka, H. Nonaka, A. Maeda, T. Musha, and Y. Takai.** 1994. Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **125**:1077-1093.
- Yao, L., H. Suzuki, K. Ozawa, J. Deng, C. Lehel, H. Fukamachi, W. B. Anderson, Y. Kawakami, and T. Kawakami.** 1997. Interactions between protein kinase C and pleckstrin homology domains. Inhibition by phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and phorbol 12-myristate 13-acetate. *J.Biol.Chem.* **272**:13033-13039.
- Yun, D. J., J. I. Ibeas, H. Lee, M. A. Coca, M. L. Narasimhan, Y. Uesono, P. M. Hasegawa, J. M. Pardo, and R. A. Bressan.** 1998. Osmotin, a plant antifungal protein, subverts signal transduction to enhance fungal cell susceptibility. *Mol.Cell* **1**:807-817.
- Zahner, J. E., H. A. Harkins, and J. R. Pringle.** 1996. Genetic analysis of the bipolar pattern of bud site selection in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**:1857-1870.
- Zarzov, P., C. Mazzoni, and C. Mann.** 1996. The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* **15**:83-91.
- Zhan, X. L., R. J. Deschenes, and K. L. Guan.** 1997. Differential regulation of FUS3 MAP kinase by tyrosine-specific phosphatases PTP2/PTP3 and dual-specificity phosphatase MSG5 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**:1690-1702.
- Zhang, S., J. Han, M. A. Sells, J. Chernoff, U. G. Knaus, R. J. Ulevitch, and G. M. Bokoch.** 1995. Rho family GTPases regulate p38 mitogen-activated protein kinase through the downstream mediator Pak1. *J.Biol.Chem.* **270**:23934-23936.
- Zhao, C., U. S. Jung, P. Garrett-Engele, T. Roe, M. S. Cyert, and D. E. Levin.** 1998. Temperature-

induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol.Cell Biol.* **18**:1013-1022.

Zhao, Z. S., T. Leung, E. Manser, and L. Lim. 1995. Pheromone signalling in *Saccharomyces cerevisiae* requires the small GTP-binding protein Cdc42p and its activator CDC24. *Mol.Cell Biol.* **15**:5246-5257.

Zhao, Z. S., E. Manser, X. Q. Chen, C. Chong, T. Leung, and L. Lim. 1998. A conserved negative regulatory region in alphaPAK: inhibition of PAK kinases reveals their morphological roles downstream of Cdc42 and Rac1. *Mol.Cell Biol.* **18**:2153-2163.

Zheng, Y., R. Cerione, and A. Bender. 1994. Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J.Biol.Chem.* **269**:2369-2372.

Zheng, Y., A. Bender, and R. A. Cerione. 1995. Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **270**:626-630.

Zhou, Z., A. Gartner, R. Cade, G. Ammerer, and B. Errede . 1993. Pheromone-induced signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires the sequential function of three protein kinases. *Mol.Cell Biol.* **13**:2069-2080.

Ziman, M., J. M. O'Brien, L. A. Ouellette, W. R. Church, and D. I. Johnson. 1991. Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol.Cell Biol.* **11**:3537-3544.

Ziman, M., D. Preuss, J. Mulholland, J. M. O'Brien, D. Botstein, and D. I. Johnson. 1993. Subcellular localization of Cdc42p, a *Saccharomyces cerevisiae* GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol.Biol.Cell* **4**:1307-1316.

Ziman, M. and D. I. Johnson. 1994. Genetic evidence for a functional interaction between *Saccharomyces cerevisiae* CDC24 and CDC42. *Yeast* **10**:463-474.