

TESIS DOCTORAL

MECANISMOS DE ADAPTACIÓN DE
Saccharomyces cerevisiae
A LA ALCALINIZACIÓN AMBIENTAL

Raquel Serrano Cánovas

Dept. Bioquímica i Biologia Molecular
Universitat Autònoma de Barcelona

Julio 2006

Memoria presentada por la licenciada en Bioquímica RAQUEL SERRANO CÁNOVAS para optar al grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular. Esta tesis ha sido realizada bajo la dirección del Dr. JOAQUÍN ARIÑO CARMONA en la Unitat de Veterinària del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Fdo. Raquel Serrano Cánovas

Fdo. Dr. Joaquín Ariño Carmona

Bellaterra, Junio de 2006

'La curiosidad mató al gato'

Dicho popular

Bueno esto ya está. Ahora toca agradecer a toooooodos por la ayuda que me habéis dado para que esta tesis se haya podido realizar. Y toooooodos no sois pocos así que paciencia...

En primer lugar, claro está, agradezco al Dr. Joaquín Ariño por haberme dado esta oportunidad y permitirme realizar una 'pequeña intrusión' en el mundo de la ciencia y las levaduras. Quiero agradecerle tanto los momentos buenos como las 'pequeñas diferencias de opinión' que han puesto un poco de 'salsa' en el día a día. Gracias por ponerme en mi sitio cuando lo he necesitado, ya sabes: 'a la tropa si no...'.

A los colaboradores externos por su gentileza y ayuda. En especial a Humberto Martín por su especial paciencia con esos mails interminables sobre Slt2 y por haber colaborado con nosotros en este último tramo de la tesis. A Jose Luis Revuelta por permitirnos el acceso a la biblioteca de mutantes y a todo el equipo que me ayudó en Salamanca en especial a Rocío Benito. A Joaquim Ros y a Elisa Cabiscol por echarnos un cable con el tema del estrés oxidativo y a Maria Ángeles de la Torre por sus consejos en la tinción de citosqueleto de actina. También quiero agradecer a los eternos no agradecidos: los colegas que nos regalan FK506.

A nuestros predecesores, Laia de Nadal, Francesc Posas y Pep Clotet porque, aunque no hayamos tenido demasiada relación, nos han legado esas ideas y protocolos ancestrales tan valiosos incluso hoy en día.

En especial quiero agradecer la paciencia que han tenido conmigo todos los compañeros de laboratorio con los que he compartido tantos y tantos ratos y anécdotas y a los que considero amigos o casi familia.

A los de mi generación. A Ernesto porque siempre facilitaba las cosas, por ser siempre tan honesto y darme el apoyo de un hermano (nunca he estado a la altura para nada más). A Ivancito porque a peleas verbales sobre temas intrascendentes nadie nos ganaba, por sus chistes repetitivos y por subirme siempre la moral con piropos y demás (espero que las escocesas tengan un vestuario como el mío). Y a Amparo por 'enchufarme', por las discusiones de ciencia y los cotilleos que desestresan, por enseñarme (aunque tú dices que yo ya venía con el pan bajo el brazo), por apoyarme en todo, defenderme ante el Jefe y, lo más importante, por ser mi mejor amiga de siempre

fuera y dentro del trabajo (ya me pongo un pelín ñoña). A Loli por ser la mejor compañera a tiempo parcial de laboratorio y de pH (ya soy mayor, ¿puedo ser como tú?) y a Laia por colaborar conmigo laboralmente y por los 'Hot Phenoles' compartidos y los 'yuyus'. A Anna Barceló por hacerme amenas las visitas al servicio y por ayudarme con la high technology de allí.

Y a los nuevos fichajes, los niños. A la Marieta por ser el terremoto del laboratorio, por sus muestras de afecto algo 'políticamente incorrectas' y por las actividades extralaboratorio (eres la sucesora del pH pero, ¡¡¿sabes que hay que tapar el pHmetro?!!). A Maribel por ser una superviviente estando tan lejos de su casa, por darle 'luz' al 175 y por esas peleas con Néstor (que yo se que os gustan a los dos...). A Asiercito simplemente porque es el mejor en cualquier aspecto (eres un 'artista' y vas a conseguir lo que te propongas), por la mítica and co-letillas varias, por animarme y mimarme siempre y por enseñarme que sin equipo no hay laboratorio (sé que 'quieres darme un besito...'). A Martí por compartir algunos momentos sobretodo durante la escritura de tesis (nadie dijo que fuera fácil), farras monumentales y congresos varios (mai m'oblidaré de Lleida, el llit, els teus mitjons i el moment 'no m'heu avisat...'). A Xavi por ser la persona más auténtica que he conocido, por sorprendernos con sus múltiples disfraces y 'performances', por su gran talento culinario y por ser mi mejor amigo invisible (la Raqué 2ª edició per quan?). También quiero dar las gracias a Antonio, el niño eterno, porque en el sprint final de la tesis me ha ayudado mucho: ahora ya sé que hay algo después de la tesis y que va a ser difícil pero no imposible. Gracias por las paellas y las laaaargas conversaciones sobre ciencia y vida (¡ya se acerca NY...!). Y por último, al recién llegado Carlos, que tiene las ganas de los 'novatos' y eso es refrescante (¿ya sabes donde te has metido?).

A los técnicos Yolanda y Manel pero sobretodo a María Jesús (hay técnicos y técnicos) por cuidarnos tan bien a todos, por ayudarme si rechistar incluso cuando he necesitado algo para 'ya', por sus mail que me han 'animado' tantas veces y, como no, por sus fabulosos pasteles (eres nuestra mamá en toda regla, y no te llamo vieja ¿eh?). Especialmente quiero darle las gracias a Anna Vilalta que ha estado siempre ahí, incluso cuando no había nadie más y la situación se desbordaba, por ser siempre el alma de las fiestas y por defenderme tantas veces (Visca el Barça!).

También quisiera agradecer a los temporales los momentos compartidos: a Virginia, Ferran y sobre todo Estercilla por clonar el pMRK515, que no fue fácil, y por entender mis explicaciones aunque ni yo las entendiera. Le deseo mucha suerte aunque no la necesita porque es (está) buena.

El apoyo de los vecinos también me ha ayudado mucho. A Anna Bassols y sus Bassolas por las comidas, meriendas y cenas compartidas. A Montse por ser la 'manguis' más elegante. A Clelia por compartir toda la tesis conmigo, aunque de forma mucho más intensa últimamente, por miles de risas juntas, por los abrazos que me debe (no vamos a ser 'tú' y yo menos, ¿no?) y por su receta de guacamole que siempre estará conmigo. A Laia, depèn (ho sento, ho havia de dir), por ser la 'millor catalana' y por reirse de mis chistes tontos e incluso, en ocasiones, superarlos (quina dona!). A Mery Jou por ser la prueba de que más vale dos palabras a tiempo que rondar un año y por esa paliza que le dio a Dani (él sí que 'lo notó'). A Dani-él por ser la única esperanza de macho ibérico del 157 (a poco) y por su arte musical (como dicen por ahí de 'perdidos' al río). Y por último a 'Su Santidad' por las incontables pruebas de ingenio a las que nos ha sometido a los del 181 y agregados.

A los miembros y ex miembros del 175. A Néstor por sus constantes 'insinuaciones', por compartir siempre su buen humor y por las acaloradas peleas con Vilalta (t'he baixat punts per Catalunya Radio). A Lourdes por sus risas y su alegría del principio (me quedo con lo bueno, 'ed madimonio'), y a Fátima por mostrarme sus puntos de vista, muy diferentes a los míos. A Josep por darle 'vidilla' al laboratorio desde que llegó. Y a los múltiples portugueses: a Miguel 'Papansa', que espero que me perdone por lo de la silla, a Ruben, a Carla y a Luis ('sardinyas', no te enfades).

Tampoco me puedo olvidar de los ratos compartidos con los ex vecinos del 185. En especial a Sergio al que considero un gran amigo (a pesar de la caña), a Judith porque siempre se puede charlar con ella y sobretodo por su risa contagiosa y sus payasadas (eres la mejor 'Repu'), a Álex por su forma de bailar y hacerme bailar, a Mireia por sus dobles sentidos y optimismo, a Alba por haberme ayudado con las prácticas cuando yo era sólo una principiante, a Vicki por tener siempre anécdotas que contar de esa forma tan emocionante, a Edu por las 'Historias del Piso' y a la parejita made in Veterinaria-CBATEG Ariana y Antonio por los ratos que hemos pasado juntos. A todos los

demás porque en algún momento habeis estado ahí: Fátima, Carles Ros, Marta, Sylvie, Tura, las dos Anas, Albert, Carles Roca, Ivet, Xavi, Joel, Ester, Pedro, Maria, Raúl...

A Rosa, Silvia y Ester, las 'secres', por su paciencia conmigo y por todo el trabajo que les he dado con becas, congresos, fluorescentes y demás. En especial a Rosa y a Silvia por facilitarme tanto que esta tesis se pueda presentar 'a tiempo'.

A mi churi porque siempre me ha apoyado incluso después de sufrir en sus propias carnes mi estrés y por pagar mi mal genio no sólo debido a los malos momentos en el laboratorio. Por animarme a seguir haciendo lo que me gusta y sobretodo por comprenderme y estar ahí.

Sobretodo quiero dar las gracias a mi familia porque sin ellos nada de esto habría pasado. En especial a mis padres por quererme siempre y por ayudarme a superar los altibajos durante todo el proceso. A mi madre por convivir conmigo y soportarme en algunos momentos en los que he sido algo insoportable y a mi padre por haberme enseñado a ver que la vida no es sólo trabajo (¡que ya salgo del huevo!). A mi hermano Héctor por haber crecido juntos y por respetar mis decisiones y a mi hermanito Alejandro por contagiarme la ilusión por todo de los niños. A mis abuelos por su cariño incondicional y en especial a mi yaya Cari porque si hay algo bueno en mí se lo debo a ella.

Y a Scotty y Nina simplemente por recibirme cada día.

1. RESUMEN	1-2
<hr/>	
2. INTRODUCCIÓN	3-35
<hr/>	
2.1. La respuesta a estrés alcalino en hongos	3-12
2.1.1. La regulación por pH en <i>Aspergillus nidulans</i> .	4-7
2.1.2. Regulación por pH en <i>Candida albicans</i> .	7-8
2.1.3. La respuesta de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a estrés por pH alcalino.	8-12
2.2. La vía de señalización de calcio/calcineurina	13-18
2.2.1. La homeostasis del calcio.	13-14
2.2.2. La vía de la calcineurina.	14-16
2.2.3. Otras dianas de calcineurina.	16-18
2.3. El metabolismo del fosfato y de los metales hierro y cobre en <i>S. cerevisiae</i>.	19-28
2.3.1. El metabolismo del fosfato.	19-23
2.3.1.1. Obtención de fosfato: sistemas de transporte y almacenamiento.	19-22
2.3.1.2. El regulón PHO.	22-23
2.3.2. La homeostasis de hierro y cobre en <i>S. cerevisiae</i> .	24-26
2.3.3. El estrés oxidativo en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	27-28
2.4. La pared celular de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>.	29-35
2.4.1. Funciones y composición de la pared celular.	29-30
2.4.2. La vía de la integridad de la pared celular.	31-35

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36-82
<hr/>	
3.1. Análisis de la respuesta transcripcional de <i>S.cerevisiae</i> a pH alcalino.	36-39
3.2. La alcalinización extracelular provoca la activación de la vía de la calcineurina.	40-55
3.2.1. Caracterización de la respuesta de los genes <i>ENA1</i> , <i>PHO84</i> , <i>PHO89</i> y <i>PHO12</i> a estrés alcalino: implicación de la vía de Rim101 y la vía de la calcineurina.	40-43
3.2.2. El mapeo funcional del promotor de <i>ENA1</i> revela la existencia de dos regiones de respuesta a pH alcalino, una calcio dependiente y otra calcio independiente.	44-48
3.2.3. El elemento CDRE es suficiente para generar una respuesta a pH alcalino.	48-49
3.2.4. La exposición a estrés alcalino provoca un incremento transitorio de los niveles de calcio citoplasmático de origen extracelular.	49-53
3.2.5. Papel de la calcineurina en la respuesta a estrés alcalino.	53-55
3.3. Identificación de genes cuya delección confiere sensibilidad a estrés alcalino.	56-67
3.3.1. La función vacuolar es imprescindible para el crecimiento en condiciones alcalinas.	58-59
3.3.2. La alcalinidad medioambiental mimetiza una situación de escasez de fosfato.	59-61
3.3.3. La disponibilidad de hierro y cobre es un factor limitante para el crecimiento de <i>S. cerevisiae</i> en medio alcalino.	61-63
3.3.4. La exposición a elevado pH da lugar a estrés oxidativo.	63-65
3.3.5. Identificación de mutaciones que resultan en sensibilidad del inhibidor de calcineurina FK506.	65-66

3.4. El papel de la vía Pkc1/Slt2 de integridad de la pared celular en respuesta a estrés alcalino.	67-81
3.4.1. El pH alcalino da lugar a la activación transitoria de la MAPK Slt2.	67-71
3.4.2. Identificación de Wsc1 como señalizador en la respuesta a estrés alcalino.	71-73
3.4.3. Análisis estructural del papel de Wsc1 en la señalización a pH alcalino.	73-76
3.4.4. Perfil transcripcional en respuesta a estrés alcalino en el mutante <i>slt2</i> .	76-80
3.4.5. La vía CWI como nexo común en la detección de cambios repentinos de pH.	80-81
3.5. ¿Cómo se enfrenta <i>Saccharomyces cerevisiae</i> al estrés alcalino?	82-84
4. CONCLUSIONES	85-86
<hr/>	
5. REFERENCIAS	87-100
<hr/>	
6. ARTÍCULOS	
<hr/>	

6.1. Artículo 1: Serrano R, Ruiz A, Bernal D, Chambers JR, Ariño J. (2002) The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling. *Mol Microbiol.* **46**:1319-33.

6.2. Artículo 2: Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domènech G, Giraldo J, Barceló A, Ariño J (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **279**, 43614-43624.

6.3. Artículo 3: Serrano R, Martín H, Casamayor A, Ariño J (2006) Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAP kinase pathway. (pendiente de publicación).

1. RESUMEN

En este trabajo hemos abordado el estudio de la respuesta a estrés alcalino de *S. cerevisiae* utilizando como herramientas principales dos técnicas de análisis a gran escala. Por un lado, hemos realizado un análisis mediante microarrays de DNA de la respuesta transcripcional a estrés alcalino y, por otro, hemos utilizado una biblioteca de más de 4800 mutantes para identificar genes esenciales para la supervivencia a pH alcalino. Todo ello nos ha permitido identificar nuevos aspectos en la respuesta y en la adaptación de dicha levadura a estrés alcalino.

En primer lugar, partiendo de la identificación de *ENA1* y *PHO89* como genes regulados por pH alcalino cuya expresión es dependiente de calcineurina hemos establecido una relación entre la respuesta a pH alcalino y la vía de señalización de calcio/calcineurina. Demostramos que la alcalinización extracelular estimula el transporte de calcio desde el exterior dando lugar a un incremento en los niveles citoplasmáticos de este catión. Esta señal es la que desencadena la activación de la fosfatasa calcineurina, cuya acción principal, aunque no la única, es activar la expresión de una serie de genes implicados en la resistencia a pH alcalino.

Por otro lado, los resultados de microarrays indican que el estrés alcalino induce la transcripción de varios de los genes implicados en la obtención de fosfato y en el metabolismo de hierro y cobre. A su vez, el análisis de mutantes revela que tanto la integridad de elementos del regulón PHO como la del transporte de metales es esencial para la supervivencia en medio alcalino. Todo ello sugiere que la alcalinización medioambiental genera una situación de escasez de estos iones.

Asimismo hemos demostrado que la alcalinización extracelular provoca un incremento intracelular de ROS (o especies reactivas de oxígeno), lo que genera una situación de estrés oxidativo capaz de activar un conjunto de genes a través de los mecanismos específicos de respuesta a estrés oxidativo.

Por último, hemos descubierto una implicación de la vía de la integridad de la pared celular (CWI) en la respuesta a estrés alcalino. Hemos descrito que la ausencia de varios elementos implicados en dicha vía, como el sensor Wsc1 o las quinasas Bck1 y Slt2, da lugar a un fenotipo de sensibilidad a pH alcalino. Además, confirmamos que este estrés provoca la activación de Slt2, la MAPK de la vía CWI, y que el sensor de la vía más relevante en dicha activación es Wsc1. Por otro lado, el estudio de la respuesta

RESUMEN

transcripcional a pH alcalino de un mutante *slt2* sugiere que esta quinasa es responsable de una parte de la respuesta transcripcional y que, probablemente, la alcalinización extracelular tiene efectos sobre la estructura de glucanos de la pared celular.

La conclusión final que se extrae de todos nuestros resultados es que la alcalinización medioambiental da lugar a una respuesta adaptativa que no es el resultado de la activación de una única vía de señalización específica para pH alcalino, sino que es el producto de activar diversas vías encaminadas a paliar las variadas alteraciones producidas por el estrés alcalino.

2. INTRODUCCIÓN

Los seres vivos no están aislados del entorno y su desarrollo está estrechamente ligado a su relación con el medio extracelular. Fluctuaciones en el ambiente desencadenan una respuesta encaminada a la adaptación a la nueva situación, que puede ser determinante para su supervivencia. Para ello poseen sensores que detectan los cambios y mecanismos moleculares de transducción de la señal que activarán una respuesta específica, parte de la cual puede implicar remodelación de la expresión génica.

Saccharomyces cerevisiae es una levadura muy conocida por sus diferentes aplicaciones en el ámbito alimentario. En un contexto científico, tiene una gran utilidad como modelo relativamente simple para estudiar a nivel molecular los procesos que tienen lugar en las células eucariotas. Esta levadura crece de forma óptima a pH ácido. La alcalinización extracelular interfiere con el correcto transporte de nutrientes y cationes necesarios para su supervivencia y, por ello, la exposición a pH alcalino le supone una situación de estrés. Cuando se iniciaron los estudios que se presentarán en esta tesis, la respuesta de *S. cerevisiae* a estrés alcalino había sido muy poco estudiada, a diferencia de lo que sucedía en el caso de otros tipo de estrés como el hiperosmótico, salino, por elevada temperatura o por daños a la pared celular.

En nuestro laboratorio, se decidió abordar el estudio de la respuesta a la alcalinización mediambiental en esta levadura con el objetivo de identificar genes regulables por pH alcalino que, posteriormente, pudieran ser usados como herramienta para diseñar sistemas de expresión heteróloga a gran escala de modulación fácil y económica. Para ello era necesario averiguar el mecanismo de regulación por pH alcalino de dichos genes y caracterizar sus promotores.

2.1. La respuesta a estrés alcalino en hongos

El pH extracelular es un aspecto clave que influencia el crecimiento, la fisiología y la diferenciación de todos los organismos. Este hecho ha llevado al estudio de los mecanismos que permiten la adaptación a cambios en el pH. Hasta hace muy pocos años, los únicos análisis se habían llevado a cabo en *Aspergillus nidulans*, debido a la

importancia del pH en la producción de antibióticos por este hongo. Esto ha propiciado que en *A. nidulans* se haya podido establecer desde hace algún tiempo un modelo de regulación de la expresión génica por pH alcalino. También existen evidencias comparativamente más recientes acerca de los mecanismos que controlan la homeostasis del pH en *Candida albicans* y en *Saccharomyces cerevisiae*.

2.1.1. La regulación por pH en *Aspergillus nidulans*.

Aspergillus nidulans es un hongo ascomiceto capaz de crecer dentro de un amplio rango de valores de pH extracelular que oscila entre pH 2.5 y pH 9.0 (Caddick *et al.* 1986). Esta gran adaptabilidad a cambios en pH extracelular se debe a que, además de poseer un eficiente sistema para mantener la homeostasis de pH intracelular, posee un sistema de regulación génica capaz de controlar la síntesis de enzimas extracelulares, permeasas y metabolitos que son secretados al medio. Dicho sistema se activa de forma específica en respuesta a variaciones en el pH medioambiental y asegura que sólo se produzcan las proteínas que sean funcionales en las condiciones de pH ambiental existentes. Por ejemplo la fosfatasa ácida sólo se sintetiza a pH ácido o neutro y la alcalina sólo en condiciones alcalinas.

La correcta funcionalidad del sistema de regulación del pH de *A. nidulans* requiere siete genes denominados *pacC*, *palA*, *palB*, *palC*, *palF* y *pall*. De forma colectiva, los datos genéticos y fenotípicos obtenidos indican que *pacC* actúa *downstream* respecto a los otros seis genes. De hecho, el modelo aceptado propone que *pacC* codifica un factor de transcripción y que los productos de los otros seis genes forman parte del sistema de transducción de la señal que activaría PacC. PacC actúa positivamente sobre genes que se sobreexpresan a pH alcalino, también llamados 'genes alcalinos', y negativamente sobre genes que se expresan mayoritariamente a bajo pH o 'genes ácidos'. Entre los primeros se encuentran genes como *ipnA*, que codifica la isopenicilina N sintasa, *prtA*, una proteasa alcalina, o *palD*, una fosfatasa alcalina, mientras que son genes ácidos *pacA*, que codifica una fosfatasa ácida, o *gabA*, que codifica una permeasa de GABA.

El análisis estructural de PacC ha revelado que se trata de un factor de transcripción que contiene tres estructuras del tipo 'dedos de zinc' mediante las cuales es capaz de reconocer la secuencia de DNA 5'-GCCARG-3' (Tilburn *et al.* 1995; Espeso *et*

al. 1997). Además, se han encontrado tres formas de la proteína PacC con diferentes pesos moleculares: 72 kDa, 53 kDa y 27 kDa (Orejas *et al.* 1995; Diez *et al.* 2002). La forma de 72 kDa de PacC (PacC⁷²) se localiza en el citoplasma y es la predominante en condiciones de pH ácido (Mingot *et al.* 2001). Es la forma inactiva de la proteína y dicha inactivación es debida a interacciones moleculares que tienen lugar entre una zona cercana a la región de unión al DNA y una región próxima al extremo carboxi-terminal (Espeso *et al.* 2000). La activación de PacC tiene lugar en respuesta a la alcalinización del medio extracelular e implica dos etapas consecutivas de proteólisis. En primer lugar PacC⁷² se convierte en PacC⁵³ como consecuencia de un corte proteolítico que tiene lugar en una zona de 24 residuos denominada *signaling protease box* (Diez *et al.* 2002). Este corte está catalizado por una proteasa, que probablemente sea PalB, cuya activación depende de la señalización por pH alcalino. El segundo proceso proteolítico ocurre de forma independiente al pH generándose la forma de 27 kDa, que es la responsable de activar o reprimir la expresión de genes implicados en la adaptación a pH alcalino (Orejas *et al.* 1995; Mingot *et al.* 1999; Diez *et al.* 2002).

Por otro lado, trabajos recientes han arrojado nuevas hipótesis acerca del mecanismo de acción por el cual cinco de los genes *pal* (todos excepto PalC, del que no se conoce la función) vehiculan la señal de pH a PacC. Los elementos situados *upstream* de la vía son las proteínas Pall y PalH los cuales se han descrito como posibles sensores de pH de la membrana plasmática. La predicción de estructura de Pall revela que posee cuatro probables regiones transmembrana seguidas de un extremo carboxi-terminal de localización citosólica. Además entre los fragmentos transmembrana 1 y 2 se sitúa un *loop* de localización periplasmática que podría tener un papel como sensor de pH (Denison *et al.* 1998). Por su parte PalH tiene siete posibles segmentos transmembrana seguidos por una cola carboxi-terminal citosólica (Negrete-Urtasun *et al.* 1999), estructura clásica de los receptores asociados a proteínas G.

Recientemente se ha definido a PalF como un miembro de la familia de las arrestinas capaz de interactuar con la cola carboxi-terminal citoplasmática de PalH en respuesta a pH. PalF es fosforilada y ubiquitinada (por una quinasa y una ubiquitín ligasa, respectivamente, ambos de naturaleza desconocida) y el complejo PalH-PalF es internalizado para su degradación por el endosoma (Herranz *et al.* 2005).

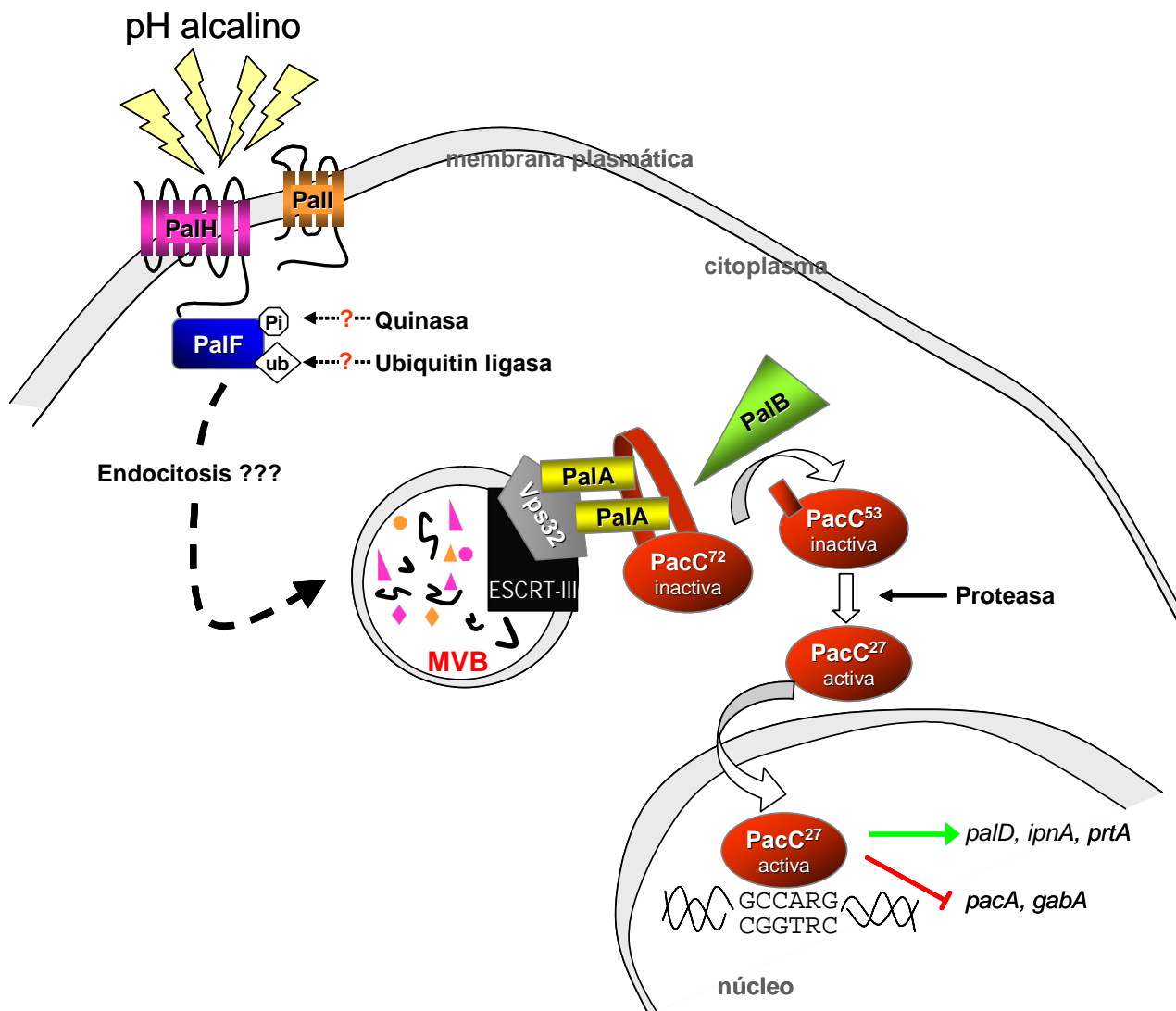


Figura 1. Respuesta a pH alcalino en *Aspergillus nidulans*. La exposición a pH alcalino da lugar a la activación del sensor PalH (y presumiblemente Pall). PalH interacciona con la arrestina PalF, la cual es fosforilada y ubiquitinada, mediante un mecanismo no conocido, lo que provoca la endocitosis y degradación del complejo PalH-PalF. Esta endocitosis, aunque se desconoce cómo, promueve la interacción de PalA con la proteína Vps32 del complejo ESCRT-III. De esta manera PalA puede reconocer al factor de transcripción PacC, evento necesario para que la proteasa PalB catalice el primer corte de PacC. PacC es proteolizado de nuevo, por una proteasa de identidad desconocida, dando lugar a la forma activa del factor de transcripción. Por último, PacC es transportado al núcleo donde regula la expresión de un conjunto de genes. Para más detalles ver 2.1.1.

Esta cadena de eventos activa a PalA, que está unida a Vps32, una subunidad del ESCRT-III (por *Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) que es uno de los tres complejos proteicos asociados a la membrana del endosoma tardío para mediar el transporte de proteínas ubiquitinadas en la vía MVB (de *multivesicular body*). Entonces, PalA se une a dos motivos Y-P-X-L situados en la región que se ha denominado *signaling*

protease box de PacC⁷², unión que es totalmente necesaria para que se produzca el primer corte proteolítico de PacC (Vincent *et al.* 2003).

Por último, PalB, miembro de la familia de las calpaínas (cisteína proteasas dependientes de calcio) es, casi con seguridad absoluta, la proteasa que, en respuesta a la alcalinización extracelular, reconoce la *signaling protease box* provocando el primer corte de PacC (Denison *et al.* 1995; Diez *et al.* 2002).

2.1.2. Regulación por pH en *Candida albicans*.

En el hongo patógeno oportunista *Candida albicans* el pH medioambiental constituye una potente señal para la diferenciación morfológica. Se ha demostrado que *in vitro* puede crecer en condiciones en que el pH adquiere valores entre 2 y 10. Condiciones de pH extracelular ácido favorecen el crecimiento en forma de células aisladas, es decir como levaduras, mientras que en condiciones alcalinas presenta un crecimiento filamentoso. Dado que la virulencia de *C. albicans* viene determinada por su crecimiento como hongo filamentoso, existe un gran interés en desvelar los mecanismos de respuesta a pH que existen en este organismo (Davis 2003).

La capacidad de *C. albicans* de responder a cambios en el pH extracelular está también controlada en parte por cambios en la expresión génica. Desde hace algún tiempo se conoce que *PHR1* (que codifica una proteína de la pared celular implicada en la unión de 1,3-β y 1,6-β-glucanos) y *PRA1* (que codifica una proteína de función desconocida pero también situada en la pared) son genes cuya expresión se induce a pH alcalino. *PHR2* presenta un 71% de identidad con *PHR1* y la misma función, pero se expresa en condiciones ácidas (Saporitoirwin *et al.* 1995; Muhlschlegel and Fonzi 1997). Más recientemente se ha realizado un estudio de la respuesta transcripcional de *C. albicans* a cambios en el pH extracelular demostrándose que, además de los mencionados, unos quinientos genes son regulados por pH, bien sea por alcalinización o por acidificación del medio. De todos ellos, 267 se activan en respuesta a pH alcalino y entre estos se incluyen un número significativo de genes relacionados con el metabolismo del hierro (Bensen *et al.* 2004).

En *C. albicans* existen homólogos de los componentes de la vía PacC de *Aspergillus nidulans*, lo que sugiere una conservación de dicha vía. Rim101 (el homólogo de PacC), Rim8 (PalF), Rim13 (PalB), Rim20 (PalA) y Rim21 y Dfg16 (PalH) son necesarios para generar la respuesta a pH alcalino (Ramon *et al.* 1999; Su and Mitchell 1993b; Arst *et al.* 1994; Denison *et al.* 1995; Maccheroni, Jr. *et al.* 1997; Negrete-Urtasun *et al.* 1997; Negrete-Urtasun *et al.* 1999; Xu and Mitchell 2001; Barwell *et al.* 2005).

Además, se ha demostrado que la vía RIM101 regula parcialmente la respuesta transcripcional a alcalinización medioambiental y, entre otros, activa la expresión de los genes *PHR1*, *PRA1* y reprime la de *PHR2* (Ramon *et al.* 1999; Porta *et al.* 1999; Davis *et al.* 2000; Bensen *et al.* 2004). De forma análoga a *A. nidulans*, Rim101 necesita ser procesada para llevar a cabo su actividad, aunque en este caso el procesamiento de esta proteína no se ha definido a nivel bioquímico.

Sin embargo, *C. albicans* es capaz de responder a pH en ausencia de *RIM101* y además se ha demostrado que parte de la respuesta transcripcional a pH alcalino es independiente de este factor de transcripción. Todo ello sugiere que han de existir vías alternativas de señalización (Davis *et al.* 2000; Bensen *et al.* 2004).

2.1.3. La respuesta de *Saccharomyces cerevisiae* a estrés por pH alcalino.

Saccharomyces cerevisiae es un organismo eucariota capaz de sobrevivir en un rango relativamente amplio de valores de pH medioambiental aunque su crecimiento óptimo tiene lugar a pHs ácidos (pH 5.0-6.0). De hecho, la actividad exportadora de protones de la ATPasa de membrana Pma1 asegura un entorno ácido y así se establece un gradiente de protones a través de la membrana que permite el transporte de aminoácidos, nucleótidos, fosfato y otras moléculas, así como la entrada de cationes, todo ello imprescindible para la supervivencia de este organismo (van der Rest *et al.* 1995; Serrano 1996). *PMA1* es por ello un gen esencial.

Cuando el pH del medio alcanza valores alcalinos o incluso cercanos a la neutralidad, el gradiente de protones generado por Pma1 se anula y la célula se halla en una situación que compromete su supervivencia. Se trata pues de una situación de estrés. Bajo estas condiciones juegan un papel esencial dos bombas de iones: Ena1 y la

ATPasa vacuolar (Garcia-deblas *et al.* 1993; Stevens and Forgac 1997). *ENA1* codifica una ATPasa de membrana plasmática que exporta iones Na^+ generando así un gradiente de sodio que permite el transporte a través de la membrana de otros cationes. Por su parte la ATPasa vacuolar es una bomba formada por múltiples subunidades y necesaria para la acidificación vacuolar, proceso que en condiciones de alcalinidad medioambiental no puede tener lugar mediante mecanismos de endocitosis (Nelson and Nelson 1990; Munn and Riezman 1994). Mutantes defectivos en alguna de estas bombas son perfectamente viables en condiciones ácidas pero son hipersensibles a la alcalinización extracelular.

Cambios en el pH extracelular provocan una respuesta transcripcional en *S. cerevisiae* que le permite adaptarse a la nueva condición. Hasta el año 2001 se habían descrito únicamente tres genes capaces de inducir su expresión a pH alcalino: el propio *ENA1*, *SHC1* (un activador de Chs3, una de las quitina sintasa de levadura, durante la esporulación) y *SCY1* (una posible quinasa) (Garcia-deblas *et al.* 1993; Mendoza *et al.* 1994; Hong *et al.* 1999), pero mediante la técnica de microarrays se ha podido caracterizar más detalladamente dicha respuesta (Causton *et al.* 2001; Lamb *et al.* 2001). Mediante este tipo de análisis se ha demostrado que la respuesta a pH alcalino implica un cambio en la expresión de genes relacionados con diferentes aspectos de la biología de la levadura. Esto indica que la alcalinización medioambiental afecta a numerosos procesos celulares y sugiere que en la respuesta a estrés alcalino pueden estar implicadas múltiples vías de señalización.

S. cerevisiae posee un homólogo de PacC denominado Rim101. La similitud entre ambas proteínas se concentra únicamente en la región de los tres 'dedos de zinc' de unión al DNA. Por otro lado, también se han identificado homólogos en *S. cerevisiae* de algunos de los otros componentes de la vía de señalización de pH de *A. nidulans*. Así Rim20 interacciona con Rim101 de forma dependiente al sistema ESCRT al igual que su homólogo PalA, Rim13 es una cisteína proteasa del tipo calpaína homóloga a PalB, Rim8, aunque se desconoce su función, tiene cierta similitud con PalF y Rim21 y Dfg16 por un lado y Rim9 por otro son, respectivamente, los homólogos de los posibles sensores de pH de membrana de *A. nidulans* PalH y Pall (Penalva and Arst, Jr. 2002; Penalva and Arst 2004; Barwell *et al.* 2005).

Rim101 se identificó inicialmente como un regulador de la meiosis en *S. cerevisiae* (Su and Mitchell 1993b; Su and Mitchell 1993a). Tal y como sucede con PacC, Rim101 necesita ser proteolizado para poder activarse aunque, en este caso, tiene lugar un único corte que elimina unos 100 aminoácidos del extremo carboxi-terminal de la proteína (Li and Mitchell 1997). Así, se trataría de un corte similar al primer corte de PacC y en principio Rim13 (el homólogo en *S. cerevisiae* de PalB) sería el candidato más probable a catalizarlo. La pregunta clave que se plantea es si la vía de Rim101 en *S. cerevisiae* responde a pH alcalino como en el caso de *A. nidulans* o si ha divergido evolutivamente para responder a una señal diferente. De hecho, se ha relacionado Rim101 con los procesos de esporulación de diploides o invasividad en haploides debido a que su mutación provoca deficiencias en estos procesos (Li and Mitchell 1997).

Actualmente existen evidencias de que la vía Rim101 responde a pH alcalino. En primer lugar se ha demostrado que la proporción de forma activa o inactiva de Rim101 varía dependiendo de la composición del medio: en un medio rico en glucosa, el cual conlleva acidificación extracelular, predomina la forma no procesada, mientras que a pH alcalino, así como en condiciones de crecimiento en acetato, que lleva a pH neutro, predomina la forma procesada (Li and Mitchell 1997). En segundo lugar, la falta de Rim101, Rim20 o Rim13 impiden el crecimiento a pH alcalino lo que sugiere que la integridad de la vía Rim101 es necesaria para la adaptación a pH alcalino (Lamb *et al.* 2001; Xu and Mitchell 2001; Futai *et al.* 1999).

El trabajo de Lamb y colaboradores ha sido crucial para establecer la relación entre la vía RIM101 y el pH en *S. cerevisiae* (Lamb *et al.* 2001). En él se compara el transcriptoma de *S. cerevisiae* en condiciones de crecimiento a pH ácido (pH 4.0) con el de la misma levadura sometida a pH alcalino (pH 8.0) durante dos horas. Los datos obtenidos revelan 71 genes sobreexpresados en condiciones alcalinas con funciones diversas e involucrados en procesos celulares varios. Además de *ENA1*, cuya aparición era predecible, cabe destacar la presencia de genes relacionados con el metabolismo del fosfato y con la homeostasis del hierro y el cobre. El análisis de la expresión en las cepas salvaje y defectiva en *RIM101* de algunos de los genes identificados en el estudio, mediante northern blots o utilizando ensayos con *reporters*, les permite clasificarlos en tres grupos en base a su dependencia de este factor de transcripción: totalmente dependientes de *RIM101* (*ARN4*, *YAR068W/YHR214W* y *ZPS1*), parcialmente dependientes (*ENA1* y *NRG2*) o independientes (*PHO11/12*, *PHO84*, *FRE1*, *CTR3*).

Aunque cabe destacar que el hecho de que existan genes parcialmente y totalmente independientes de *RIM101* implica que en *S. cerevisiae* la respuesta a pH alcalino no está mediada totalmente por el homólogo de PacC, estos estudios demuestran que efectivamente existe una relación entre la vía RIM101 y la regulación del pH.

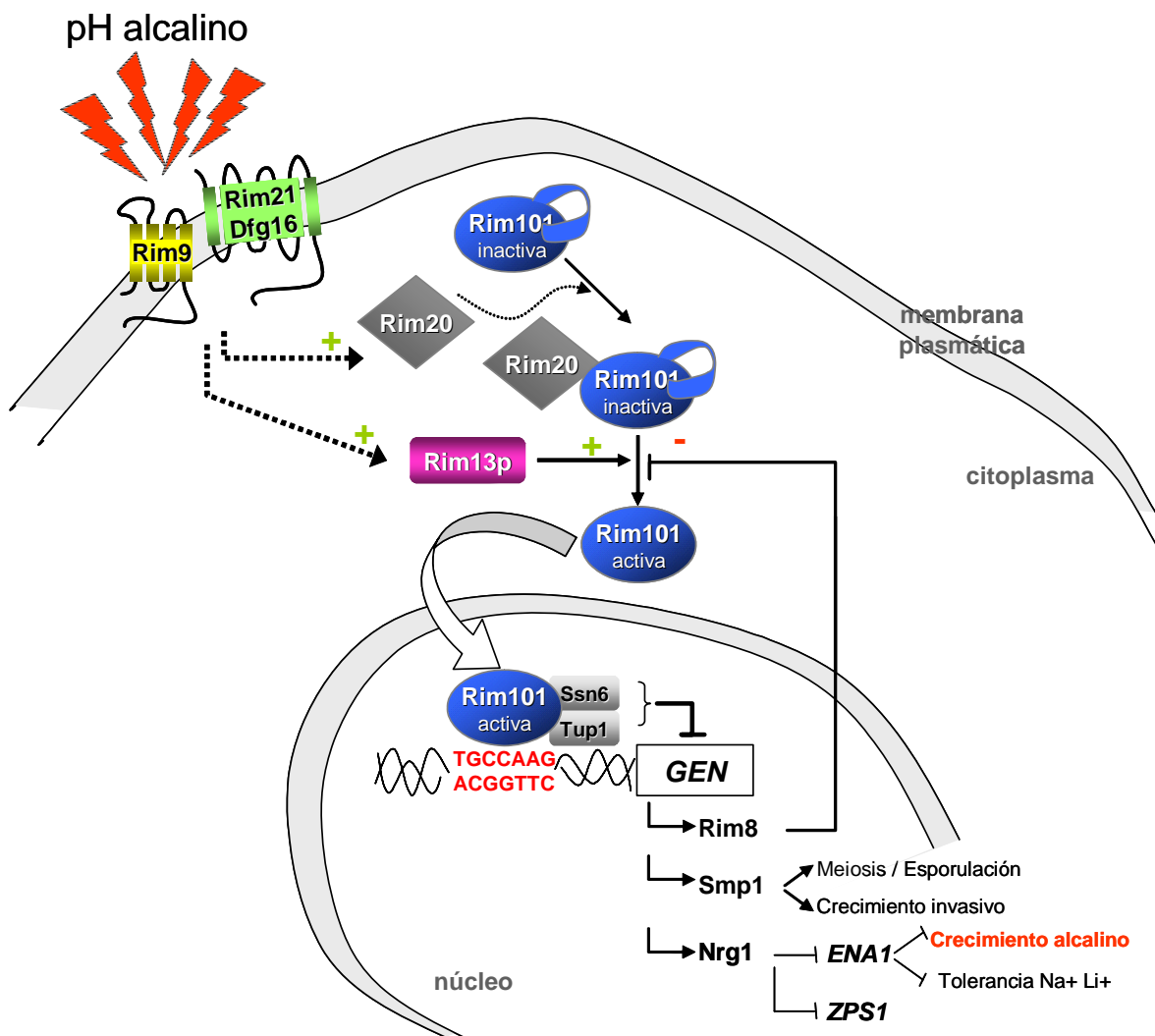


Figura 2. La vía RIM101 en *Saccharomyces cerevisiae*. En *S. cerevisiae* los presuntos sensores de la vía RIM101 son Rim9, Rim21 y Dfg16 (homólogos de Pall y PalH respectivamente). En respuesta a pH alcalino Rim20 (homólogo de PalA) interacciona con Rim101 (homólogo de PacC), de forma dependiente del sistema ESCRT, y esto favorece el corte proteolítico de Rim101 que es catalizado seguramente por Rim13 (homólogo de PalB). Rim101 se trasloca al núcleo y reprime la expresión de *RIM8* (que codifica un inhibidor de la proteólisis de Rim101), de *SMP1* y de *NRG1*. Nrg1 es represor algunos genes implicados en el crecimiento en medio alcalino como *ENA1*.

Con el objetivo de identificar posibles dianas de Rim101, los mismos autores realizan el análisis transcripcional de un mutante defectivo en *RIM101* (Lamb and Mitchell 2003). De esta forma encuentran 17 genes cuya expresión se halla incrementada en el mutante *rim101* y 18 genes cuya expresión está reprimida en el mismo mutante. Un análisis mediante ensayos de inmunoprecipitación de cromatina demuestra que Rim101 se une *in vivo* a la secuencia consenso de unión de PacC (5'-TGCCAAG-3') que se encuentra en la mayoría de genes cuya expresión se incrementa en el mutante *rim101*. Esto indica que Rim101 actúa principalmente como represor de la expresión. Estos mismos autores presentan evidencias de que Rim101 es capaz de reprimir la transcripción por medio de su unión al complejo corepresor Tup1/Ssn6, mecanismo muy común de represión génica en *S. cerevisiae*.

Por otro lado las deleciones de *NRG1* y *SMP1*, que codifican dos factores de transcripción que son reprimidos por Rim101, suprimen los diversos fenotipos del mutante *rim101*. La mutación *smp1* suprime el defecto de crecimiento invasivo que presenta el mutante *rim101* mientras que la deleción de *NRG1* elimina la sensibilidad del mutante *rim101* a pH alcalino y a altas concentraciones de iones litio y sodio. Nrg1 regula la expresión de al menos dos genes inducidos a pH alcalino: *ZPS1* y *ENA1*. El papel de Nrg1 sobre *ENA1* es crucial para permitir el crecimiento a pH alcalino. Nrg1 regula negativamente la expresión de *ENA1*, posiblemente a través de la unión a dos sitios en su promotor. Así, la activación de Rim101 mediada por pH alcalino inhibiría la transcripción de Nrg1 y, dado que Nrg1 actúa como represor de *ENA1*, el efecto final de Rim101 sería la activación de la transcripción de *ENA1* lo que favorecería la supervivencia en estas condiciones.

Resumiendo, el modelo de Lamb y colaboradores propone que la vía de regulación del pH PacC/Rim101 está conservada entre *S. cerevisiae* y *A. nidulans* aunque algunos de los aspectos de la vía de señalización no son idénticos ya que, mientras PacC actúa como activador de genes directamente involucrados en la regulación del pH extracelular, Rim101 es un represor de genes que, anulando la transcripción de determinados genes, permite el crecimiento de la levadura en estas mismas condiciones.

2.2. La vía de señalización de calcio/calcineurina

La calcineurina es una proteína fosfatasa activable por calcio muy conservada evolutivamente. En mamíferos juega un papel crucial en procesos como el desarrollo del músculo esquelético y cardíaco, la angiogénesis o en la activación de las células T en la respuesta inmunitaria. Sin embargo, en el caso de *S. cerevisiae*, la activación de dicha fosfatasa es esencial para la adaptación a diversas condiciones de estrés tales como la presencia de altas concentraciones de iones Na^+ , Li^+ , Mn^{2+} o OH^- , la exposición prolongada a feromonas o cuando se producen daños en pared celular. La activación de la calcineurina es un proceso regulado de forma muy precisa y una de sus consecuencias es modular la transcripción de ciertos genes cuyos productos participan en la supervivencia celular (Cyert 2003).

2.2.1. La homeostasis del calcio.

El incremento de los niveles citoplasmáticos de calcio es la señal para que tenga lugar la activación de la calcineurina. Este incremento tiene lugar como consecuencia de diferentes tipos de estrés aunque los mecanismos que lo provocan son todavía poco conocidos. Existen sistemas de transporte de calcio desde los compartimentos intracelulares o desde el medio extracelular al citosol y viceversa. En ambos casos, se hallan bajo un complejo sistema de regulación que permite un control preciso de los niveles intracelulares de este catión (Bonilla and Cunningham 2002).

Ante diversas circunstancias, como el choque hipotónico (Batiza *et al.* 1996), la exposición a feromonas (Iida *et al.* 1994), la adición al medio de glucosa (Tokes-Fuzesi *et al.* 2002), o el estrés de retículo endoplasmático provocado por el compuesto tunicamicina, que inhibe la N-glicosilación de proteínas en retículo (Bonilla *et al.* 2002), se produce un incremento en el importe de calcio extracelular al citoplasma mediante el canal de calcio dependiente de voltaje de la membrana plasmática compuesto por Cch1 y su subunidad reguladora Mid1 (Iida *et al.* 1994; Paidhungat and Garrett 1997). En otros casos, tal y como sucede en respuesta a choque hipertónico, parte del calcio es transportado desde la vacuola a través del canal iónico Yvc1 (Denis and Cyert 2002; Palmer *et al.* 2001).

La liberación de calcio al citoplasma implica la posterior redistribución de este catión en varios orgánulos celulares, en concreto la vacuola (en la cual se puede almacenar hasta un 95 % de la totalidad del calcio intracelular), el retículo endoplasmático y Golgi. Se conocen varios sistemas de transporte implicados en dicho proceso. Pmr1 es la bomba de calcio responsable del transporte hacia retículo y Golgi mientras que Pmc1, una ATPasa de alta afinidad por calcio necesaria para mantener bajos los niveles de calcio citoplasmático, y Vcx1, un intercambiador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$, son los responsables de translocar este catión a vacuola (Cunningham and Fink 1994; Cunningham and Fink 1996; Pozos *et al.* 1996; Rudolph *et al.* 1989).

2.2.2. La vía de la calcineurina.

En respuesta al incremento de calcio citoplasmático la Ser/Thr fosfatasa calcineurina es activada mediante la unión directa de calcio y calmodulina (Cyert *et al.* 1991). La calcineurina es un heterodímero formado por dos subunidades, una subunidad reguladora codificada por el gen *CNB1* y una subunidad catalítica que está codificada por los genes *CNA1* y *CNA2* (Cyert *et al.* 1991; Cyert and Thorner 1992; Kuno *et al.* 1991). Su actividad puede ser bloqueada mediante la delección de *CNB1*, la doble delección de los genes redundantes *CNA1* y *CNA2*, o mediante la adición en el medio de los inhibidores FK506 o ciclosporina A (Kuno *et al.* 1991; Liu *et al.* 1991; Foor *et al.* 1992).

En su forma activada, calcineurina es capaz de desfosforilar el factor de transcripción tipo 'dedos de zinc' denominado Crz1/Tcn1/Hal8 (Stathopoulos and Cyert 1997; Matheos *et al.* 1997). Esta desfosforilación provoca, presumiblemente, un cambio en la estructura tridimensional de Crz1 que expone los motivos NLS (de *Nuclear Localization Sequence*) reconocidos por la importina Nmd5 a través de la cual tiene lugar la translocalización de Crz1 al núcleo (Polizotto and Cyert 2001). Una vez en el núcleo, Crz1 se une de forma específica a los promotores de determinados genes en zonas que se han denominado CDRE (de *Calcineurin Dependent Response Element*) y cuya secuencia consenso se ha determinado como: 5'-GNGGC(G/T)-3' (Stathopoulos and Cyert 1997; Yoshimoto *et al.* 2002).

La salida de Crz1 del núcleo está mediada por la exportina Msn5 pero únicamente tiene lugar una vez Crz1 está fosforilado (Boustany and Cyert 2002). Hasta el momento

se ha determinado que Crz1 es sustrato de tres quinasas, la caseín quinasa de tipo I Hrr25, la proteína quinasa A dependiente de AMP cíclico PKA, y la quinasa dependiente de ciclinas Pho85 (bajo regulación por la ciclina Pho80) aunque podrían existir otras quinasas relacionadas con la misma función (Kafadar and Cyert 2004; Kafadar *et al.* 2003; Sopko *et al.* 2006).

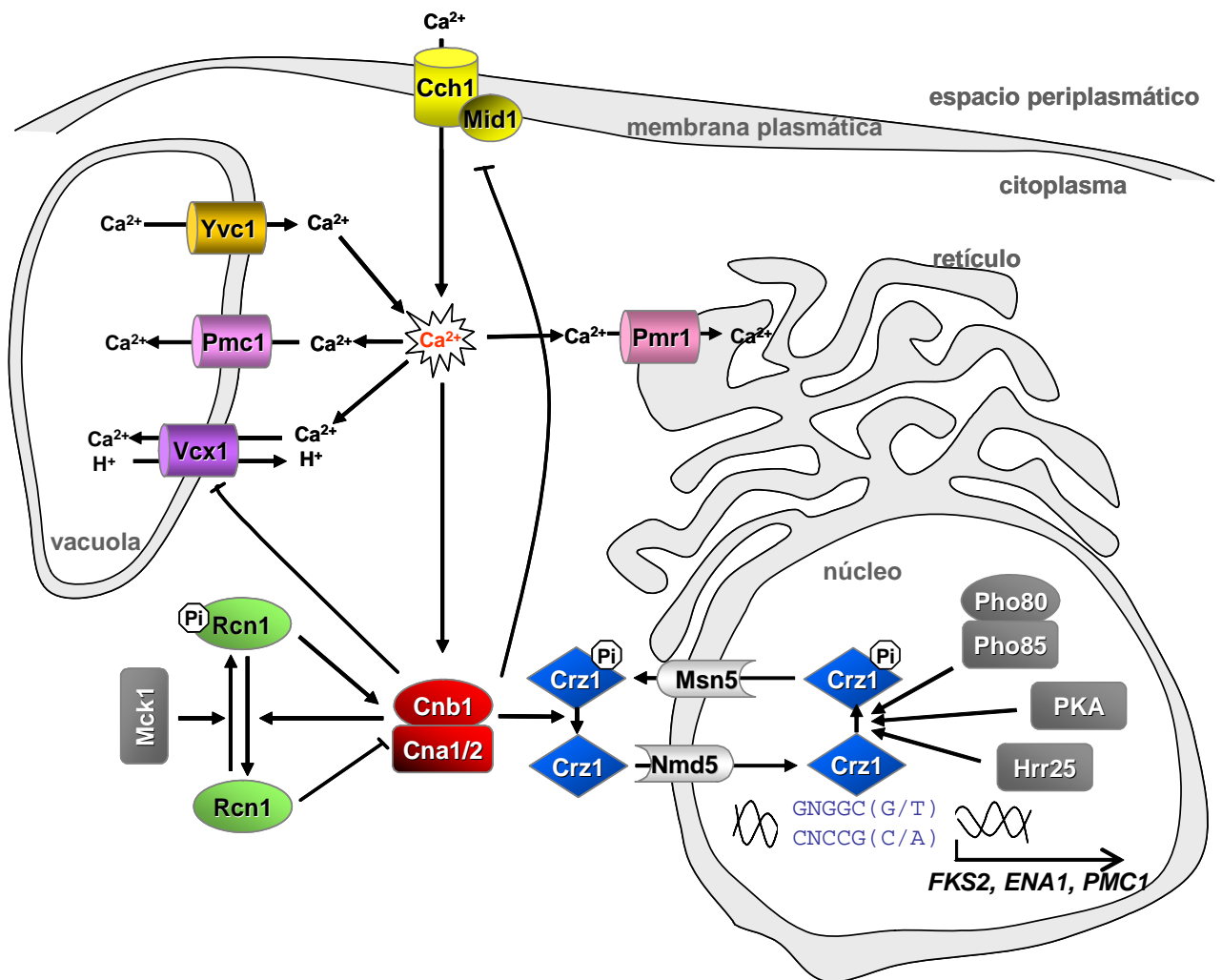


Figura 3. Homeostasis de calcio y la vía de la calcineurina. En la figura se esquematizan los principales elementos implicados en el transporte de calcio: Cch1-Mid1 y Yvc1 (implicados en incrementar el calcio citoplasmático) y Pmc1, Vcx1 y Pmr1 (responsables de eliminar calcio de citoplasma) (ver 2.2.1. para una descripción más amplia). Un aumento en la concentración de calcio citoplasmático activa la fosfatasa calcineurina (formada por Cnb1 y Cna1 o Cna2). La calcineurina desfosforila el factor de transcripción Crz1, que es transportado al núcleo por la importina Nmd5 y activa una respuesta transcripcional específica. También se esquematiza el papel de la calcipresina Rcn1 y la quinasa Mck1 como reguladores de calcineurina, el papel de las quinasas implicadas en la desfosforilación de Crz1 (Pho80, PKA y Hrr25), así como la función de Msn5 en el transporte de Crz1 desde núcleo (detallado en 2.2.2.).

Probablemente, la activación de calcineurina tiene como objetivo principal desencadenar una respuesta transcripcional mediada en gran parte por Crz1. Estudios mediante microarrays de DNA han permitido la identificación de más de 160 genes inducidos de manera dependiente de la calcineurina por una elevada concentración de calcio o sodio. La respuesta de todos y cada uno de ellos es dependiente, al menos de forma parcial, de Crz1 y la mayoría presentan en sus promotores motivos CDRE. Dichos genes han sido clasificados en diferentes categorías funcionales (Yoshimoto *et al.* 2002).

Muchos de los genes dependientes de calcineurina son componentes de la membrana plasmática, están involucrados en la síntesis y mantenimiento de la pared celular o participan en el tráfico vesicular, la síntesis de lípidos y la degradación de proteínas. Así, en respuesta a estrés, la calcineurina media una respuesta transcripcional, dirigida a preservar la pared celular y la función de la membrana, que implica una remodelación de la superficie celular en la que participan mecanismos de degradación de proteínas existentes y de transporte de nuevos componentes a la superficie celular. Por otro lado, algunos de los genes dependientes de calcineurina codifican productos involucrados en el transporte de iones y pequeñas moléculas, por lo que posiblemente la vía de la calcineurina también estaría modulando algún aspecto en la homeostasis iónica de la célula. Entre estos genes cabe destacar *ENA1* y *PMC1*. Finalmente, la activación de calcineurina también estaría afectando la expresión de elementos centrales en varias vías de señalización celular así como de elementos implicados en la propia vía de calcineurina. Todo ello señala hacia la existencia de mecanismos de retroalimentación y de conexión con otras vías de señalización. Dentro de este último apartado se incluyen los genes *RCN1*, que codifica un regulador de calcineurina, *CMK2*, una quinasa dependiente de calcio/calmodulina, *YPK1*, un regulador de PKC, y varios factores de transcripción.

2.2.3. Otras dianas de calcineurina.

Sin embargo, Crz1 no es la única diana conocida de la calcineurina. Existen dianas relacionadas con la vía de la calcineurina como *Vcx1*, *Cch1-Mid1* y *Rcn1*, y otras involucradas en funciones diversas como *Hsl1*, *Yap1*, *Hph1* y los transportadores de iones *Pma1* y *Trk1/2*.

La calcineurina inhibe, aunque no está claro si de forma directa o indirecta, al intercambiador de protón/calcio vacuolar Vcx1. En un mutante defectivo en calcineurina, Vcx1 está constitutivamente activo y esto permite eliminar el exceso de calcio citoplasmático explicando la resistencia de dicho mutante a altas concentraciones de calcio extracelular (Cunningham and Fink 1996). También existen evidencias que apuntan hacia una inhibición directa del canal de calcio formado por Cch1-Mid1 por parte de la fosfatasa, lo que constituiría un mecanismo de retroalimentación negativa de la vía (Bonilla and Cunningham 2003).

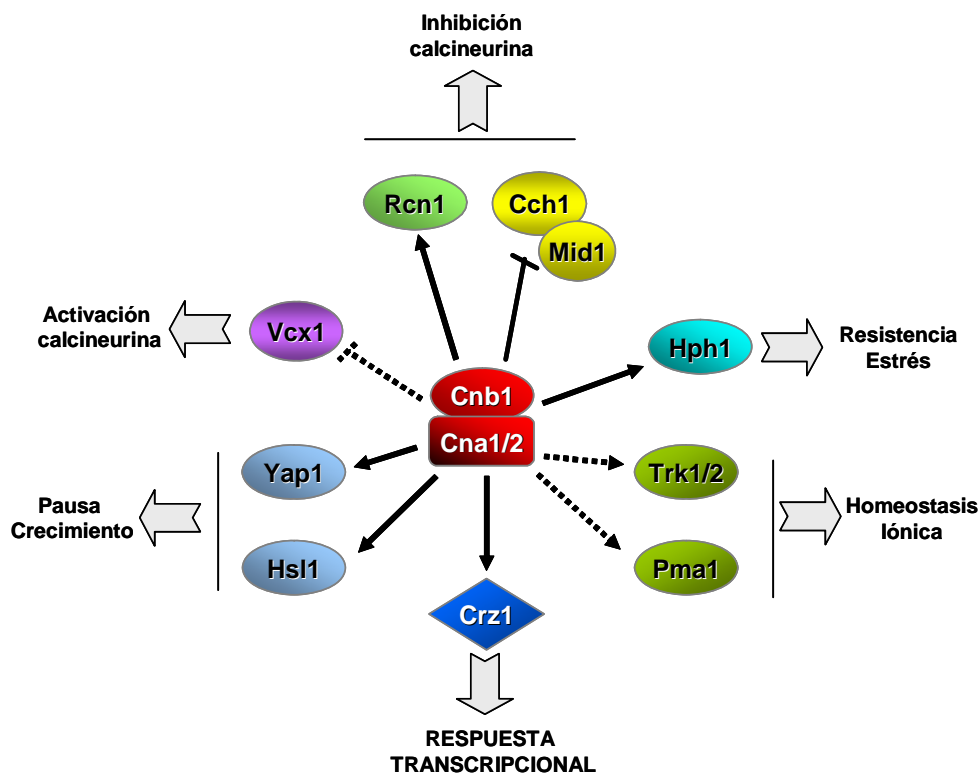


Figura 4. Efectores conocidos de calcineurina. Se muestran las dianas conocidas para la fosfatasa calcineurina. Las flechas continuas indican que la relación es directa, es decir que la proteína es sustrato de la calcineurina, mientras que las discontinuas indican que se desconoce si la relación es o no directa. También se especifican las funciones que controla la calcineurina a través de dichas proteínas (ver explicación en 2.2.3.).

Por su parte Rcn1 también es desfosforilado por calcineurina. Esta calcipresina, conservada en mamíferos, es un activador de calcineurina cuando es fosforilada por la quinasa Mck1 pero se comporta como inhibidor de dicha fosfatasa en su estado no fosforilado. Así, cuando se da la activación de la vía de la calcineurina tiene lugar por un

lado la sobreexpresión de Rcn1, tal y como se ha mencionado anteriormente, y por otro lado su desfosforilación. Esto resulta en una acumulación de la forma desfosforilada de Rcn1, que actúa como inhibidor de calcineurina, constituyendo un mecanismo adicional de retroalimentación negativa (Hilioti and Cunningham 2003).

Otros sustratos directos de calcineurina son Hsl1 y Yap1 (Mizunuma *et al.* 2001; Mizunuma *et al.* 1998; Yokoyama *et al.* 2006). Mediante su acción sobre ellos es capaz de evitar, respectivamente, la inhibición y la degradación de Swe1 una quinasa que inhibe la progresión de fase G2 a M en el ciclo celular. Además se conoce que la calcineurina actúa de forma positiva en la transcripción de Swe1 (Mizunuma *et al.* 1998). De esta manera la activación de la calcineurina da lugar, mediante una triple estrategia, a la activación de Swe1 provocando el bloqueo del ciclo celular.

La proteína Hph1 ha sido identificada como sustrato directo de la fosfatasa y, aunque se desconoce su función, participa junto a Hph2 (la cual no interacciona ni es fosforilada por calcineurina) en la resistencia a estrés mediada por calcineurina de un modo independiente a Crz1 (Heath *et al.* 2004).

La calcineurina también parece implicada en la función de los transportadores de alta afinidad de potasio Trk1 y Trk2 y posiblemente en la de Pma1, la bomba de protones de membrana. Sin embargo no se conoce si los efectos sobre ellos son directos o involucran elementos intermediarios (Mendoza *et al.* 1994; Withee *et al.* 1998).

2.3. El metabolismo de fosfato y de los metales hierro y cobre en *S. cerevisiae*.

Una de las conclusiones que se extraen de los resultados que se van a presentar es la profunda alteración que sufren los metabolismos del fosfato y de los metales hierro y cobre a consecuencia de la alcalinización del medio. Por ello ofrecemos aquí una breve descripción de los mismos.

2.3.1. El metabolismo del fosfato.

El fosfato inorgánico es un nutriente esencial para todos los organismos ya que es necesario en procesos tan diversos como la síntesis de ácidos nucleicos, fosfolípidos y múltiples metabolitos celulares (implicados en procesos de fosforilación u obtención de energía). Es precisamente éste el motivo de que los procesos de obtención, almacenamiento e integración metabólica de este compuesto, catalizados por diferentes tipos de enzimas (fosfatasas, fosfodiesterasas, transportadores de fosfato, quinasas, fosfatasas alcalinas y endofosfatasas), estén bajo un estricto sistema de regulación denominado regulón PHO.

2.3.1.1. Obtención de fosfato: sistemas de transporte y almacenamiento de fosfato.

Existen dos sistemas de captación de fosfato del medio extracelular: uno de baja afinidad y otro de alta afinidad. El sistema de baja afinidad se encuentra constitutivamente activo, presenta una K_m por fosfato inorgánico de 1 mM y, aunque se desconoce la proteína o proteínas implicadas, es el mayor responsable del importe de este metabolito en condiciones basales, es decir, cuando el medio extracelular es rico en fosfato (Tamai *et al.* 1985; Borst-Pauwels and Peters 1977). Cuando existe un déficit extracelular de fosfato se activa el transporte de alta afinidad y se induce la transcripción de fosfatasas extracelulares que se encargan de liberar fosfato inorgánico. El transporte de alta afinidad es llevado a cabo gracias a la actividad de varias proteínas denominadas Pho84, Pho87, Pho88, Pho89, Pho90 y Pho91 (Wykoff and O'Shea 2001). Pho84 es el transportador que lleva a cabo la mayor parte del importe de fosfato en condiciones limitantes mientras que el resto parece tener un papel más superfluo. Del conjunto de todos estos transportadores los estudiados con más detalle son Pho84 y Pho89.

INTRODUCCIÓN

Pho84, que fue caracterizado genéticamente a principios de los noventa (Bun-ya *et al.* 1991), constituye un sistema *simporter* en el cual el transporte de fosfato inorgánico se realiza de forma paralela al de protones con una estequiometría de 1 molécula de fosfato en forma de anión monovalente (H_2PO_4^-) por cada 2 o 3 protones (Cockburn *et al.* 1975; Borst-Pauwels and Peters 1977). Cabe destacar que presenta una K_m para fosfato de 1-15 μM a pH 4.5.

El otro transportador importante en condiciones de bajo fosfato es Pho89. Se trata de nuevo de un sistema *simporter* pero en este caso el fosfato es cotransportado con cationes, preferiblemente iones sodio (Na^+) (por cada molécula de fosfato se importan también dos de sodio). La K_m para fosfato de este transporte es de 0.5 μM aunque en este caso el pH óptimo en que el transportador presenta su máxima actividad es pH 9.5 (Martinez and Persson 1998; Pattison-Granberg and Persson 2000).

La actividad de estos dos transportadores es muy dependiente del pH extracelular. Pho84 es más activo a pHs ácidos y es prácticamente inactivo a pHs alcalinos, en los cuales Pho89 funciona de forma óptima. Gracias a las propiedades cinéticas de estos dos transportadores de alta afinidad, la célula asegura la adquisición de fosfato en condiciones limitantes de forma independiente del grado de acidez o alcalinidad del medio extracelular.

La célula también es capaz de obtener fosfato a partir de reservas intracelulares. La mayor reserva de fosfato que posee la célula está constituida por los polifosfatos. El polifosfato es una molécula ubicua y común para todos los organismos. Está formada por la unión mediante enlaces fosfo-anhídrido de alta energía de varias moléculas de ortofosfato, desde 4 (polifosfatos solubles en condiciones ácidas) hasta miles (insolubles) (Rao *et al.* 1998). En *S. cerevisiae* esta molécula se localiza principalmente en la vacuola aunque también en el núcleo, otros organelos y espacios periplasmáticos (Persson *et al.* 2003).

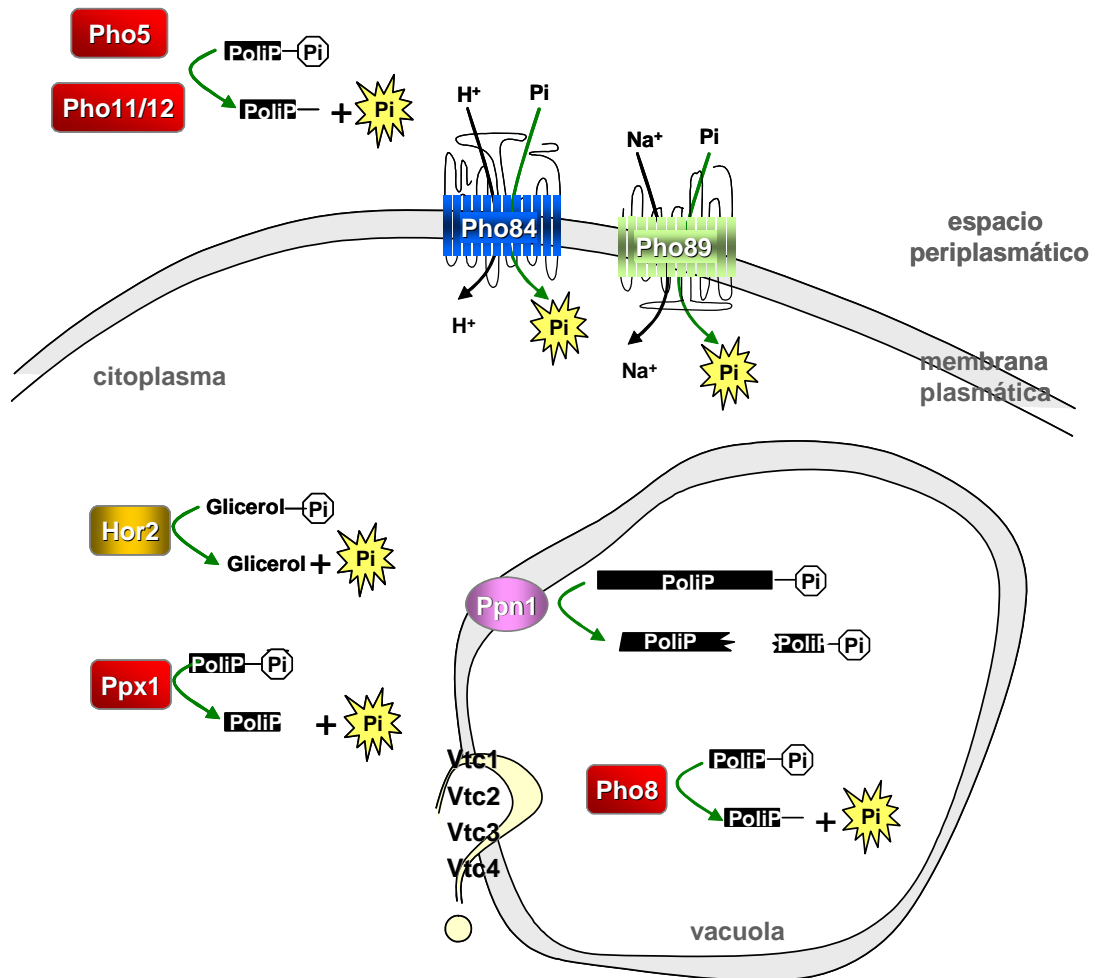


Figura 5. Elementos implicados en la obtención de fosfato inorgánico en *S. cerevisiae*. El transporte de fosfato desde el medio extracelular está mediado básicamente por el sistema de transporte de baja afinidad y por los transportadores de alta afinidad Pho84 y Pho89 (se obvian en el esquema los otros transportadores de alta afinidad menos importantes). Otra fuente de fosfato es la liberación a partir de los polifosfatos por la acción de exofosfatasas (Pho5, Pho11/12, Ppx1 y Pho8) y de la endofosfatasa Ppn1. Vtc1-4 están implicados en la regulación de los polifosfatos aunque no se sabe cuál es su función específica. Alternativamente, el fosfato puede ser liberado a partir de otras moléculas. Por ejemplo, Hor2 permite obtener fosfato a partir de glicerol-fosfato.

En condiciones de deficiencia de fosfato tiene lugar una rápida degradación y movilización del polifosfato celular (Persson *et al.* 2003). Las moléculas de polifosfato sufren un corte en su extremo terminal que da lugar a la liberación de fosfato inorgánico. Este corte es catalizado por exofosfatasas entre las que se encuentran las fosfatasas ácidas Pho5, Pho11/12 (localizadas en el espacio periplasmático), Ppx1 (citoplasmática) y la fosfatasa alcalina Pho8 (vacuolar) (Toh-e A and Kakimoto 1975; Bostian *et al.* 1980; de Steensma *et al.* 1989; Wurst *et al.* 1995; Kaneko *et al.* 1987). También es importante la endofosfatasa Ppn1 (situada en la membrana de la vacuola) que convierte las moléculas

de polifosfato de cadena larga en polifosfatos de cadena más corta (de 3 o 60 fosfatos) que a su vez pueden ser utilizadas por exofosfatasas con el objetivo de acelerar la liberación de fosfato inorgánico (Kumble and Kornberg 1996; Ogawa *et al.* 2000). Es preciso apuntar que tanto las fosfatasas ácidas como la alcalina son capaces de hidrolizar una amplia variedad de sustratos incluyendo ácidos nucleicos, fosfoazúcares, fosfolípidos y fosfoproteínas.

Aunque se desconoce el papel exacto que tienen, existen otras proteínas vacuolares denominadas Vtc1-4 que también están involucradas en la síntesis, el transporte al interior de la vacuola y/o el metabolismo del polifosfato (Ogawa *et al.* 2000).

2.3.1.3. El regulón PHO.

Como respuesta a déficit de fosfato la célula ha desarrollado un sofisticado sistema de obtención de este metabolito. Una de las estrategias que adopta consiste en la expresión de ciertos genes que codifican proteínas implicadas en varios pasos del metabolismo del fosfato como la captación de fosfato del medio extracelular, la degradación de polifosfatos, la obtención de fosfato inorgánico a partir de moléculas capaces de producirlo, así como de muchas de las proteínas implicadas en la regulación de estos procesos. Al menos 22 genes relacionados con el metabolismo del fosfato sufren desrepresión génica en condiciones de falta de fosfato (Ogawa *et al.* 2000 y revisado en Oshima 1997; Persson *et al.* 1999; Persson *et al.* 2003).

El mecanismo responsable de esta respuesta transcripcional se denomina regulón PHO y tiene como protagonistas a Pho85, una de las CDK (*Cyclin Dependent Kinase*) de levaduras, a Pho80, la ciclina asociada a ella en la función relacionada con el metabolismo de fosfato, a Pho81 el inhibidor del complejo Pho80/85 y a los factores de transcripción Pho4 y Pho2.

En condiciones óptimas de crecimiento en lo que respecta a fosfato, el complejo Pho80-85 se encuentra activado lo que provoca la fosforilación de Pho4 (Kaffman *et al.* 1994). En este estado Pho4 es capaz de unirse al complejo formado por la exportina Msn5 y el homólogo de Ran llamado Gsp1, y cuando esto ocurre el complejo es transportado al citosol. Al llegar al citosol el complejo es disociado posiblemente por

acción de la GTPasa Rna1 pero Pho4, que se encuentra fosforilado, no puede ser transportado nuevamente al núcleo (Kaffman *et al.* 1998a).

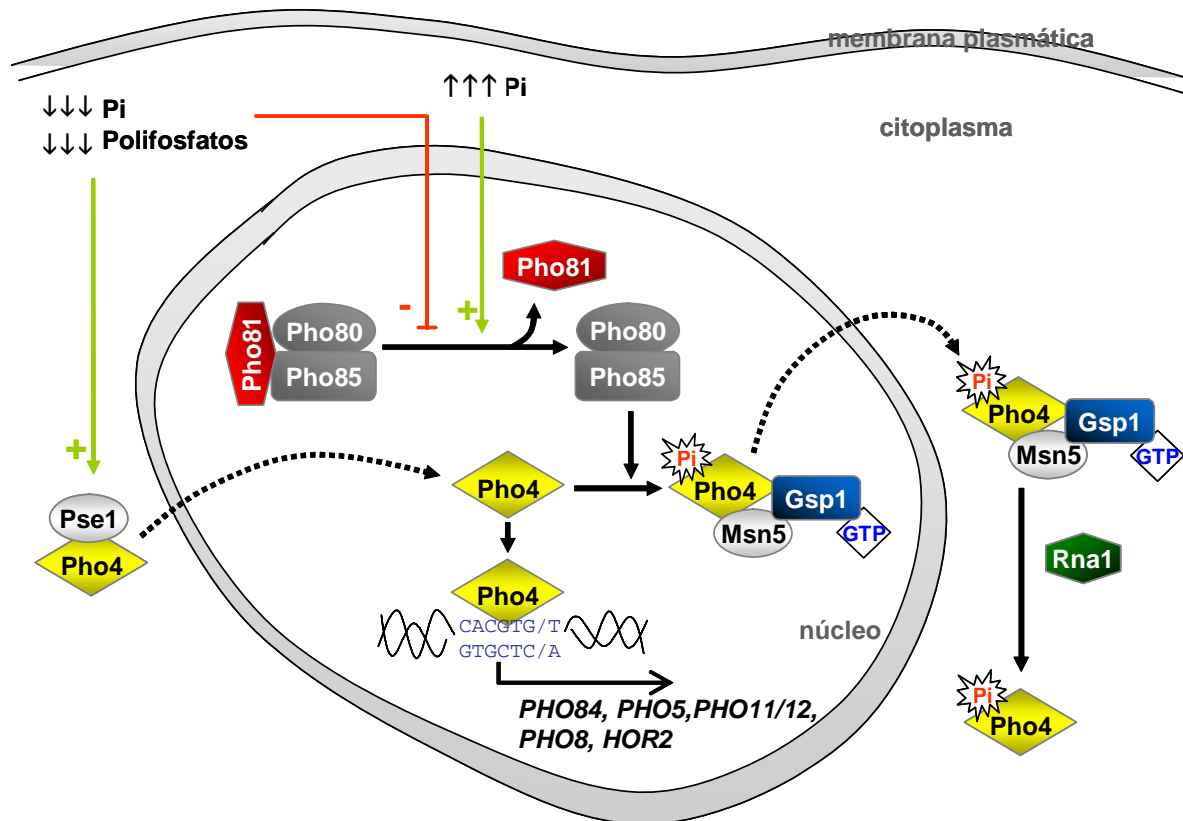


Figura 6. El Regulón PHO. El sistema de regulación en respuesta a déficit de fosfato es el regulón PHO. Cuando hay déficit de fosfato Pho81 inhibe el complejo ciclina-quinasa Pho80/Pho85 y esto evita que el factor de transcripción Pho4 se fosforile. Pho4 no fosforilado activa la transcripción de los genes implicados en la captación de fosfato como *PHO84*, *PHO5* o *HOR2*. Cuando hay suficiente fosfato, Pho4 es fosforilado y esto provoca su translocación a citoplasma. Se muestran también los mecanismos de importe y exporte del núcleo de Pho4 (explicado en 2.3.1.3.)

Cuando la célula sufre limitación de fosfato inorgánico, Pho81 inhibe la función de Pho80-85 (Schneider *et al.* 1994). De esta forma, Pho4 no está fosforilado y puede translocarse al núcleo mediante la acción de la β -importina Pse1/Kap121 (Kaffman *et al.* 1998b). Sólo entonces Pho4 activa la expresión de ciertos genes mediante unión a determinadas regiones de sus promotores llamadas UAS (*Upstream Activator Sequences*) y cuya secuencia consenso es 5'-CACGTG/T-3' (Oshima 1997; Ogawa *et al.* 2000). Algunos de los genes cuya expresión se induce de esta forma son los que codifican las fosfatasas ácidas (*PHO5*, *PHO11/12*), la fosfatasa alcalina (*PHO8*), los transportadores de alta afinidad (*PHO84*, *PHO89*), las proteínas Vtc1-4 implicadas en la

síntesis de polifosfatos, la glicerol fosfatasa (*HOR2*) o el propio *PHO81* (mecanismo de retroalimentación positiva) (Ogawa *et al.* 2000).

Cómo la señal de bajo fosfato es transmitida a Pho81 es todavía una incógnita y aunque la primera respuesta a esta señal sea la movilización de polifosfato no existe evidencia alguna de que exista una relación entre los niveles de polifosfatos y la regulación de la vía del fosfato.

2.3.2. La homeostasis de hierro y cobre en *S. cerevisiae*.

El hierro y el cobre son nutrientes esenciales para *S. cerevisiae* ya que participan en procesos muy relevantes pero el exceso o la incorrecta distribución de estos metales puede resultar tóxico. Dadas sus propiedades redox, la acumulación de hierro y cobre libres da lugar a la generación de especies reactivas de oxígeno capaces de provocar daños a diferentes componentes celulares como lípidos, proteínas y DNA.

El hierro es extremadamente insoluble en presencia de oxígeno. Por ello, los organismos que crecen en ambientes oxigenados (como suele suceder en el caso de *S. cerevisiae*) han desarrollado un eficiente sistema de captación y compartimentalización de este metal. Ante escasez de hierro, los factores de transcripción Aft1 y 2 se activan y se translocan al núcleo donde dan lugar a la expresión de un conjunto de genes implicados en la captación y almacenamiento de este metal (Yamaguchi-Iwai *et al.* 2002). La secuencia reconocida por estos activadores transcripcionales se denomina 'elemento de respuesta a hierro' y se ha determinado experimentalmente como 5'-CACCC-3' (Rutherford *et al.* 2001; Yamaguchi-Iwai *et al.* 1996). El mecanismo por el cual Aft1 y 2 detectan la falta de este metal es poco conocido. Existe la posibilidad de que Aft1 una directamente hierro y la falta del metal active la translocación al núcleo tal y como se ha descrito para organismos procariotas (Andrews *et al.* 2003).

Los genes inducidos por falta de hierro más relevantes se describen a continuación y están implicados en la captación y metabolismo de este metal. El hierro libre es captado a nivel de la superficie celular a través de sistemas de transporte de baja y alta afinidad. Se trata del transportador Fet4 y del complejo formado por el transportador Ftr1 y la ferroxidasa Fet3, respectivamente (Stearman *et al.* 1996; Dix *et al.*

1994). Fet3 requiere cobre como cofactor, metal que es secuestrado por Atx1 y transferido a Fet3 mediante Ccc2 (Lin *et al.* 1997; Yamaguchi-Iwai *et al.* 1996; Yuan *et al.* 1995). Por ello, la captación de hierro está comprometida cuando el cobre es escaso (he aquí la estrecha relación que existe entre los metabolismos de ambos metales). Dado que la mayor parte del hierro extracelular se halla en forma oxidada (hierro férrico, Fe^{3+}) y por lo tanto insoluble, es necesario el papel de varias reductasas. La reducción a hierro ferroso (Fe^{2+}) es llevada a cabo por dos flavocitocromos denominados Fre1 y Fre2 y ello permite que sea transportado mediante el sistema de alta afinidad (Georgatsou and Alexandraki 1994). El hierro también puede ser captado en forma de sideróforos, que son pequeñas moléculas que quelan hierro. Aunque *S. cerevisiae* no sintetiza sus propios sideróforos, sí puede utilizar los de otros organismos. La familia de transportadores Arn1-4 son los responsables de mediar la captación de sideróforos (Yun *et al.* 2000). Alternativamente, el hierro de los sideróforos puede ser reducido por Fre1-4 y transportado por el sistema de transporte de alta afinidad previamente descrito (Yun *et al.* 2000). También intervienen en la captación de hierro un grupo de manoproteínas de la pared celular denominadas Fit1-3 que secuestran sideróforos reteniéndolos en la pared (Protchenko *et al.* 2001).

Otros elementos relacionados con el metabolismo de hierro también se regulan transcripcionalmente mediante el mismo mecanismo. Se incluyen aquí genes que codifican sistemas de transporte a vacuola como Fet5, Fth1 y Smf3, un transportador mitocondrial llamado Mrs4 y las proteínas Isu1 e Isu2 implicadas en la síntesis de centros hierro-azufre (Foury and Roganti 2002; Portnoy *et al.* 2002; Portnoy *et al.* 2000; Garland *et al.* 1999; Schilke *et al.* 1999; Urbanowski and Piper 1999).

En el caso del cobre los mecanismos de regulación de los niveles del metal actúan a nivel transcripcional, como en el caso del hierro, pero también a nivel post-transcripcional (Ooi *et al.* 1996). En *S. cerevisiae* se han descrito dos factores de transcripción implicados en la homeostasis de cobre: Mac1, que se activa en respuesta a limitación de cobre y Ace1 que lo hace en el caso opuesto. En ambos casos el cobre es quien directamente regula la actividad de dichos factores de transcripción. La unión de cobre a Mac1 impide la interacción con el DNA mientras que Ace1 se activa y puede reconocer sus dianas génicas exclusivamente cuando tiene unido este metal.

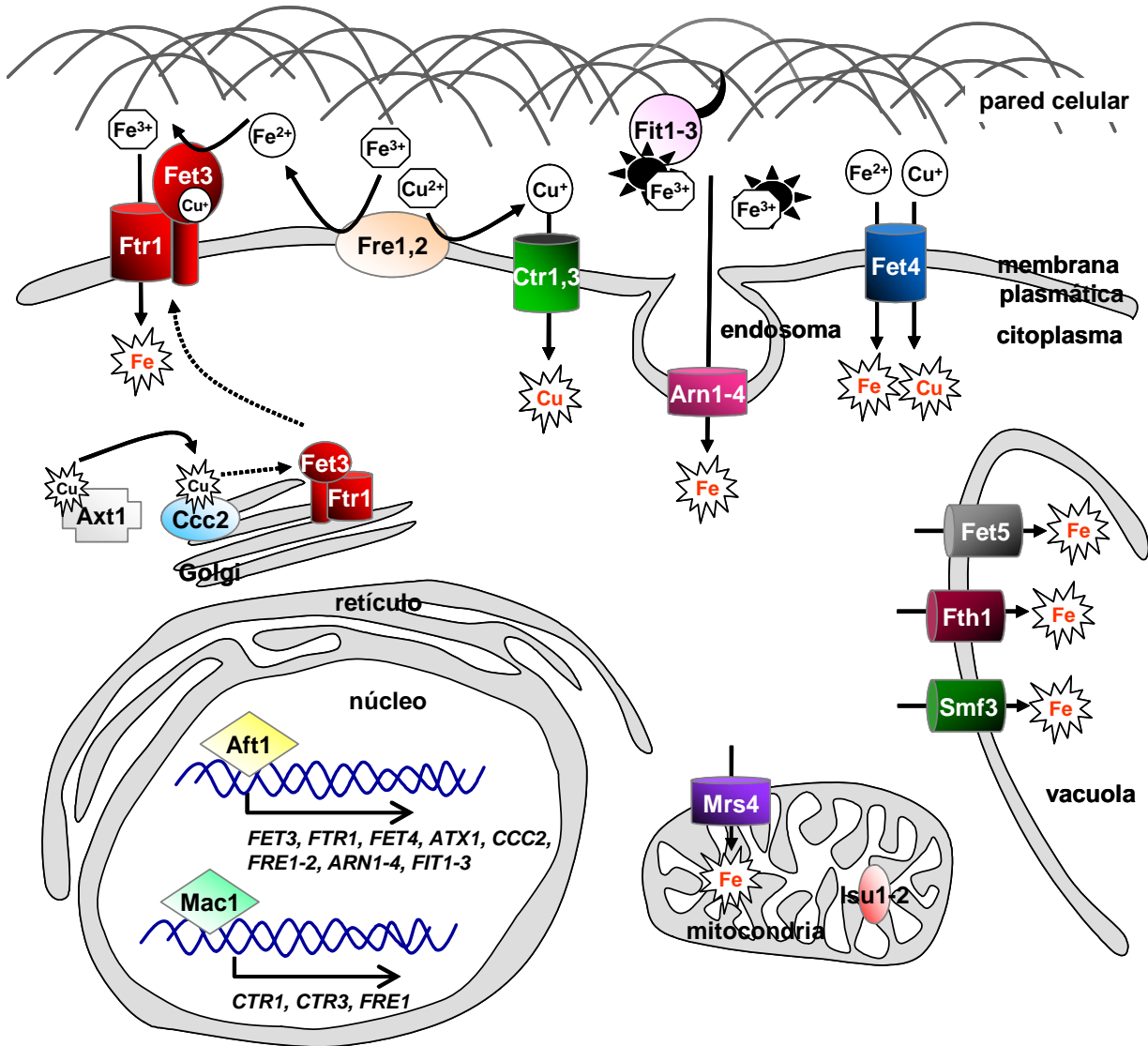


Figura 7. **Metabolismo del hierro y el cobre.** Se muestran los principales transportadores de hierro y cobre implicados en el importe y compartimentalización de dichos metales, así como los factores de transcripción activados en respuesta a déficit de hierro (Aft1) o cobre (Mac1). En el texto se explica con detalle la regulación de la homeostasis de dichos metales.

Cuando existe déficit de cobre Mac1 activa la expresión de *CTR1* y *CTR3* que codifican transportadores de alta afinidad para este metal (Labbe *et al.* 1997; Yamaguchi-Iwai *et al.* 1997). Hay que señalar que Ctr3 es menos importante en el transporte de cobre que Ctr1. El factor de transcripción Mac1 también regula la expresión de la reductasa de hierro y cobre de la membrana plasmática Fre1 y de la reductasa Fre7 (cuya localización celular es desconocida) (Georgatsou *et al.* 1997; Martins *et al.* 1998).

Por otro lado, cuando la célula se encuentra con elevados niveles de cobre la expresión inducida por Ace1 de *CUP1*, principalmente, *CRS5* y *SOD1* favorece la resistencia a cobre (Thiele 1988; Liu and Culotta 1994; Gralla *et al.* 1991). *CUP1* y *CRS5* codifican metalotioneínas que secuestran cobre mientras que *SOD1* codifica la superóxido dismutasa dependiente de cobre implicada en procesos de resistencia a estrés oxidativo.

2.3.3. El estrés oxidativo en *Saccharomyces cerevisiae*.

El oxígeno es una molécula potencialmente peligrosa ya que puede ser parcialmente reducida generando ROS (*Reactive Oxygen Species*) capaces de dañar DNA, lípidos y proteínas (Costa and Moradas-Ferreira 2001). Entre las ROS, el radical hidroxilo ($\text{HO}\cdot$) es la más peligrosa. Aunque no son ROS propiamente dichos, también se incluyen en este grupo el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el anión superóxido (O_2^-) (Jamieson 1998). Las ROS son generadas endógenamente a consecuencia de procesos metabólicos como la respiración mitocondrial. También se generan ROS por exposición a radiación ionizante, a agentes químicos que ciclan entre diferentes estados redox o a metales como hierro y cobre (Costa and Moradas-Ferreira 2001). Dada la naturaleza de las ROS, todos los organismos han desarrollado sistemas de defensa contra la oxidación. *S. cerevisiae* posee sistemas de defensa enzimáticos y no enzimáticos (revisado en Jamieson 1998).

Entre los sistemas no enzimáticos el más destacable es el glutatión (GSH), un tripéptido γ -L-glutamil-L-cistinilglicina que posee un grupo sulfidrilico que reacciona con oxidantes y se convierte en glutatión reducido (GSSG). Las proteínas implicadas en la síntesis de glutatión son Gsh1 y Gsh2. La tioredoxina (codificada por *TRX1-2*) y la glutaredoxina (*GRX1-2*) son pequeñas proteínas que pueden ser utilizadas como reductores en reacciones catalizadas por peroxidasas. Otra forma de protección, o más bien prevención, frente a estrés oxidativo es la presencia de metalotioneínas (que secuestran metales) o la correcta homeostasis de metales (evita el exceso de metales).

Varios son los enzimas que intervienen en la defensa contra oxidación: las superóxido dismutasas (*SOD1* y *SOD2*) que transforman O_2^- en H_2O_2 y O_2 , la catalasa (codificada por *CTA1* y *CTT1*) capaz de convertir H_2O_2 en H_2O y O_2 , las glutatión

reductasa (*GLR1*) y glutatión peroxidasa, las tioredoxina reductasa (*Trr1*) y tioredoxina peroxidasa y enzimas como *Zwf1*, *Tkl1* y *Rpe1* implicadas en la síntesis de NADPH, necesario en las reacciones de reducción mediadas por reductasas.

La respuesta a estrés oxidativo se regula a nivel transcripcional (Moye-Rowley 2003; Ikner and Shiozaki 2005). En el caso de *S. cerevisiae* el factor de transcripción del tipo 'dedos de zinc' Yap1 es el responsable de activar la expresión de genes relacionados con la respuesta a este estrés, como *TRX2*, *TRR1*, *GLR1* o *GSH1*. El mecanismo de activación de Yap1 se basa en una translocación al núcleo debida a un cambio de conformación producido por reducción de dos cisteínas, que forman un puente disulfuro, dando lugar a la exposición de motivos NLS (*Nuclear Localization Sequence*). Al parecer Yap1 coopera con otro factor de transcripción denominado Skn7 en la regulación de la expresión génica tras estrés oxidativo. Se ha determinado que genes como *TRR1* y *TRX2* se hallan bajo el control dual de ambos factores de transcripción, mientras que otros como *GLR1* y *GSH1* sólo son dependientes de Yap1. El estrés oxidativo también provoca la activación de los factores de transcripción Msn2 y Msn4 implicados en mecanismos generales de estrés.

2.4. La pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*

Las levaduras son hongos unicelulares que viven en entornos muy diversos. En este escenario la pared extracelular actúa como primera barrera de protección frente a daños causados por agentes externos. Su correcta función determina la supervivencia de este organismo, y es por ello que tanto su construcción como su remodelación están finamente reguladas por la vía de integridad de la pared celular, también denominada vía CWI, por *Cell Wall Integrity*.

2.4.1. Funciones y composición de la pared celular.

La pared celular de la levadura tiene cuatro funciones principales: permite la estabilización de las condiciones osmóticas internas (evita que un exceso de agua entre o salga de la célula a favor de gradiente, impidiendo así la perturbación de las condiciones internas y la ruptura de la membrana plasmática), confiere protección frente a estrés físico (debido a su considerable resistencia mecánica y su gran elasticidad), regula el tamaño y la forma celular y, por último, sirve como sitio de anclaje de proteínas (Klis *et al.* 2006).

Esta estructura celular puede llegar a constituir entre el 10 y el 25 % del peso seco celular y, dada su importante función, *S. cerevisiae* invierte gran parte de su energía metabólica en su construcción y remodelación. La pared está compuesta por dos capas, una interior formada por una red de polisacáridos, que sirve como esqueleto de la capa exterior constituida básicamente por proteínas manosiladas que están en contacto con el exterior celular (Lipke and Ovalle 1998; Klis *et al.* 2002).

La zona o capa interior está formada por polímeros de glucanos y quitina. De hecho existe una estructura principal compuesta por 1,3- β -glucanos (moléculas compuestas por unos 1500 monómeros de glucosa) unidos por enlaces del tipo puente de hidrógeno que construyen una red tridimensional dotada de gran elasticidad (Manners *et al.* 1973a; Klis *et al.* 2002). En la cara exterior de la red de 1,3- β -glucanos se encuentran unidas cadenas muy ramificadas, y por lo tanto muy hidrosolubles, de 1,6- β -glucanos (compuestas por aproximadamente 130 monómeros de glucosa) (Manners *et al.*

1973b). En la cara interna de esta misma red, aunque sólo en situaciones de estrés, o en la zona de formación de la gema después de la citoquinesis, la estructura de la pared se halla reforzada mediante la unión de moléculas de quitina (formadas por unos 190 residuos de N-acetilglucosamida) (Manners *et al.* 1973b; Roberts *et al.* 1983).

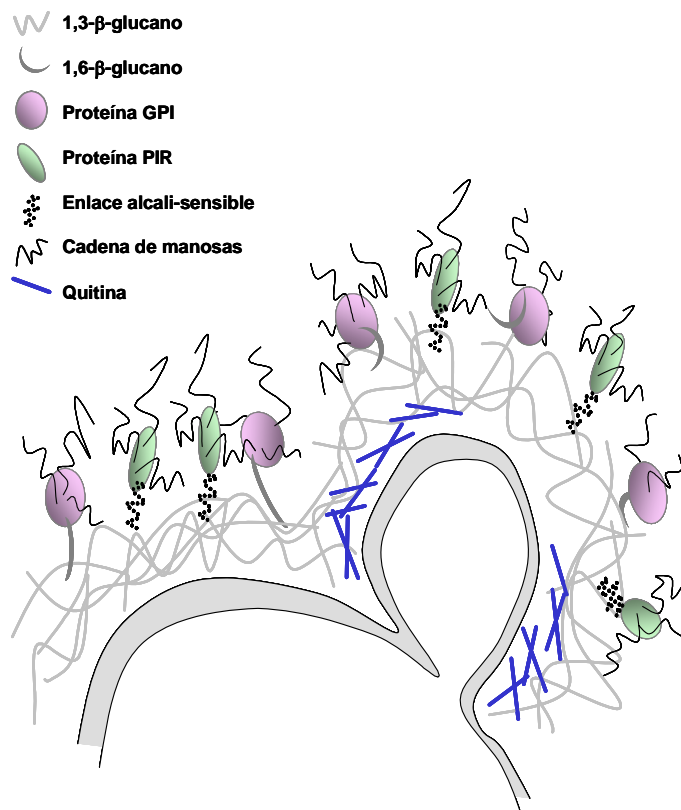


Figura 8. Estructura de la pared celular. Esquema de la composición de la pared celular en *S. cerevisiae*.

La capa externa de la pared está formada por proteínas altamente glicosiladas. Existen dos categorías de proteínas de la pared: las denominadas proteínas glicosilfosfatoinositol (GPI), que son las mayoritarias, y se unen a la estructura de polisacáridos a través de las moléculas de 1,6-β-glucanos y las denominadas proteínas Pir que se hallan unidas directamente a 1,3-β-glucanos mediante un enlace de naturaleza desconocida altamente sensible a agentes alcalinos. Todas estas proteínas están implicadas en diversas funciones entre las que se encuentran la adhesión celular (Flo1, 5, 9-11, Sag1, Aga1-2, Fig2), el crecimiento (Spo1, Sed1, Spi1, Dan1, 4, Tip1, Tir1-4, Pir1-4), el procesamiento de la propia pared (Crh1, Crr1, Bgl2, Cwp1, Pir1-4, Egt2, Pry3, Cts1, Dse2 y 4, Scw11) o el metabolismo (Tip1, Fit1-3) (Klis *et al.* 2002).

2.4.2. Vía de la integridad de la pared celular.

La pared celular debe ser una estructura muy dinámica pues la levadura suele padecer de forma continua cambios morfológicos tanto en respuesta a variaciones en las condiciones externas como debido a la dinámica de su ciclo vital. La vía de la integridad de la pared celular (CWI) permite y modula dichos cambios. Dicha vía está formada por una familia de sensores, transductores y efectores de la señal que regulan la expresión de genes y/o la función de proteínas de forma especializada dependiendo del estímulo que la active y la acción requerida.

Típicamente los estreses que activan la vía CWI son la exposición a elevadas temperaturas (que provoca un incremento en la presión interna sobre la pared debido a acumulación de trehalosa) y los agentes que dañan directamente la pared como el antagonista de quitina blanco de calcoflúor, el colorante rojo congo (que se une a varios polisacáridos, especialmente quitina y celulosa, y tiene un efecto parecido al del blanco de calcoflúor), la acción enzimática de la zimoliasa (que directamente causa la lisis de la pared) o la cafeína (aunque en este último caso no se conoce demasiado bien el mecanismo de acción) (Kamada *et al.* 1995; Manners *et al.* 1973b; Zarzov *et al.* 1996; Neves and Francois 1992; De Nobel *et al.* 2000; Ketela *et al.* 1999; Jung *et al.* 2002; Kopecka and Gabriel 1992; Roncero and Duran 1985; Martin *et al.* 2000). El tratamiento con rapamicina, que despolariza el citosqueleto de actina, o con el antagonista de actina latrunculina B también dan lugar a la activación de la vía, aunque es incierta la implicación de los sensores en esta respuesta (Torres *et al.* 2002; Krause and Gray 2002; Harrison *et al.* 2001). Otros tipos de circunstancias como la presencia de feromonas, el estrés hipotónico, el estrés oxidativo y el estrés físico sobre la membrana plasmática también desencadenan una respuesta relacionada con la vía CWI, aunque los mecanismos implicados permanecen oscuros (Davenport *et al.* 1995; Kamada *et al.* 1995; Buehrer and Errede 1997; Errede *et al.* 1995; Zarzov *et al.* 1996; Alic *et al.* 2004).

La activación de la vía de integridad de la pared celular suele estar a cargo de los sensores localizados en la membrana plasmática. Se ha identificado una familia de cinco sensores que incluye las proteínas Wsc1, Wsc2, Wsc3, Mid2 y Mtl1 (Gray *et al.* 1997; Jacoby *et al.* 1998; Verna *et al.* 1997; Ketela *et al.* 1999; Rajavel *et al.* 1999). Todos ellos son similares en el sentido de que poseen un dominio carboxi-terminal citoplasmático, un único dominio transmembrana y un ectodominio periplasmático muy rico en residuos

Ser/Thr que se encuentra altamente O-manosilado. Se ha propuesto que funcionan como mecanosensores aunque no existen evidencias directas que lo demuestren. Como hecho distintivo, Wsc1, 2 y 3 poseen una región característica en el dominio extracelular rica en Cys denominada región WSC que no se encuentra ni en Mid2 ni en Mtl1. Las tres proteínas Wsc tienen gran similitud de secuencia entre ellas mientras que Mid2 posee una identidad del 50 % con Mtl1 (Vay *et al.* 2004; Verna *et al.* 1997; Ketela *et al.* 1999; Rajavel *et al.* 1999). Los datos experimentales apuntan a Wsc1 y Mid2 como los sensores más importantes.

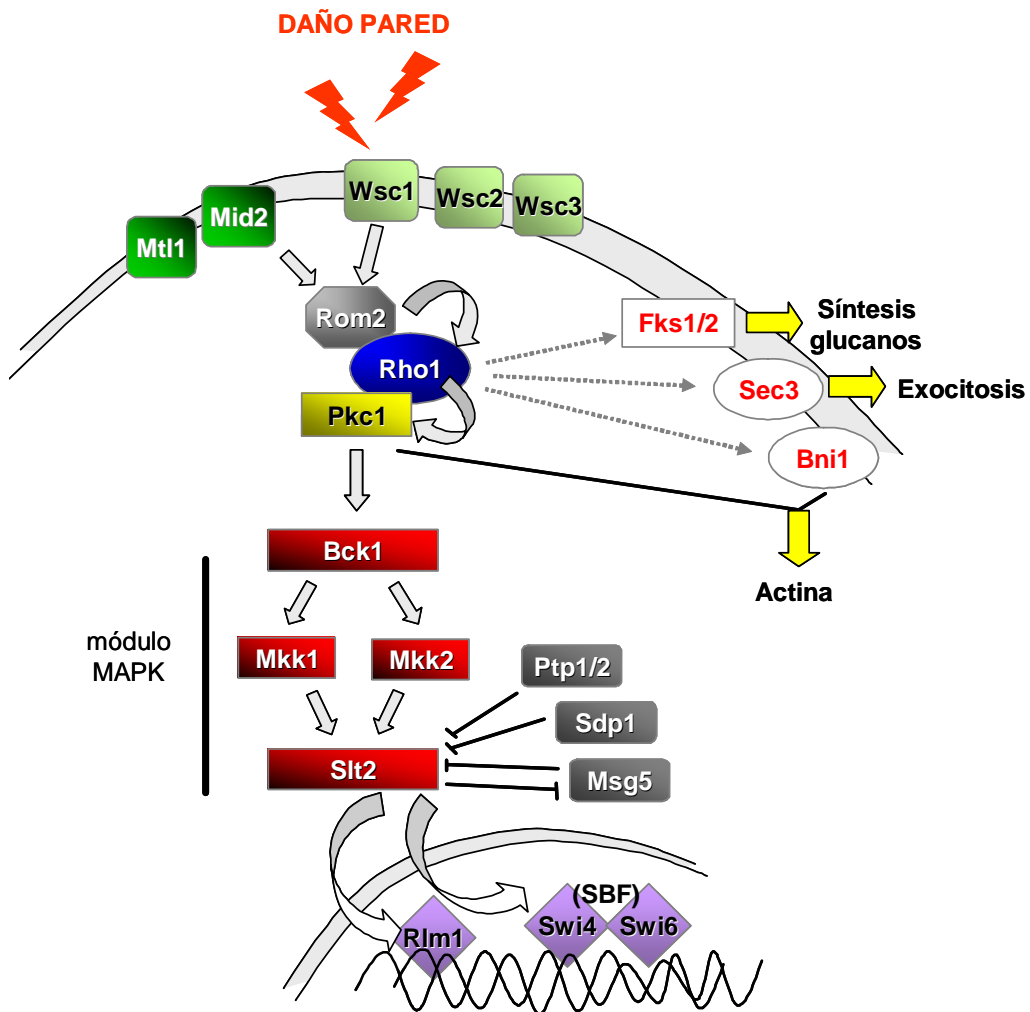


Figura 9. La vía de la integridad de la pared celular (CWI). Los sensores de membrana Wsc1-3, Mid2 y Mtl1 detectan daños en la pared celular y lo señalizan a través de Rom2 (GEF de Rho1) y la proteína G Rho1. Rho1 activa a la proteína quinasa C (Pkc1) que a su vez activa el módulo MAPK formado por Bck1, Mkk1/2 y Slf2. Slf2 fosforila y activa los factores de transcripción Rlm1 y Swi4/Swi6 provocando una respuesta transcripcional. En el esquema se muestran otras funciones de Rho1 y Pkc1.

El elemento de regulación central en la vía es la proteína denominada Rho1. Se trata de una proteína G pequeña y como tal cicla entre estado activo (cuando une GTP) y el estado inactivo (une GDP). Para pasar de uno a otro requiere la acción de GEFs (*Guanoside nucleotide Exchange Factors*) que la convierten a su forma activa y de GAPs (*GTPase Activating Proteins*) que la inactivan. Entre las GEFs de Rho1 se han identificado Rom2, Rom1 y Tus1 mientras que Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1 son sus GAPs (Cid *et al.* 1998; Martin *et al.* 2000; Peterson *et al.* 1994; Schmidt *et al.* 2002; Schmelzle *et al.* 2002; Ozaki *et al.* 1996). Rom2, y presumiblemente Rom1, se une a zonas específicas del dominio citoplasmático de los sensores permitiendo la activación de Rho1 (Philip and Levin 2001). Una vez activa, esta proteína G actúa sobre diferentes dianas: activando la proteína quinasa C de *S. cerevisiae* (Pkc1), promoviendo la actividad 1,3- β -glucano sintasa (llevada a cabo por las subunidades catalíticas Fks1 y Fks2), participando en la regulación del citoesqueleto (activando las forminas Bni1 y Bnr1) y jugando un papel en la secreción polarizada (mediante su función sobre el elemento del complejo exocítico Sec3) (Cabib *et al.* 1998; Levin 2005).

En relación a los efectores de Rho1, la vía más estudiada ha sido la vía de Pkc1/Slt2. Se trata de una de las cinco vías de MAPKs (*Mitogen Activated Protein Kinase*) de *S. cerevisiae*. Actúa a modo de cascada de señalización, un mecanismo extremadamente eficiente de amplificación de señal, de respuesta rápida y capaz de discriminar estímulos poco intensos (ruido) o demasiado duraderos. Se trata de una vía lineal constituida por la quinasa Pkc1 y el módulo MAPK formado por la MAP quinasa quinasa quinasa (MEKK) Bck1, las MAP quinasa quinasa (MEK) redundantes Mkk1 y 2, y la MAP quinasa (MAPK) Slt2 (Levin *et al.* 1990; Costigan *et al.* 1992; Lee and Levin 1992; Irie *et al.* 1993; Lee *et al.* 1993; Martin *et al.* 1993).

Al inicio de la activación de la vía Pkc1/Slt2, Pkc1 se asocia a Rho1-GTP (activa) y esto permite que pueda ser estimulada por fosfatidilserina (pero no por otros cofactores como diacilglicerol o calcio, que convencionalmente activan PKCs en otros organismos) (Kamada *et al.* 1996; Nonaka *et al.* 1995). Aunque la activación del módulo MAPK (Bck1-Mkk1,2-Slt2) es el papel más estudiado de Pkc1, esta quinasa también actúa sobre otros sustratos. Esta conclusión se extrae del hecho que la delección de Pkc1 es letal, a diferencia de la delección de cualquiera de las otras quinasa de la vía o de la doble delección *mkk1 mkk2*, que únicamente provoca deficiencias de crecimiento a elevadas temperaturas o bajo estrés de pared. Tanto la letalidad de *pkc1* como la sensibilidad de

los mutantes en los elementos del módulo MAPK son remediables por estabilización osmótica del medio, por ejemplo en presencia de 1 M sorbitol (Lee and Levin 1992).

Pkc1 fosforila Bck1 en varios residuos (Ser⁹³⁹, Thr¹¹¹⁹, y Ser¹¹³⁴) en una zona situada entre su centro catalítico y el dominio regulador (Levin *et al.* 1994). A su vez, Bck1 activa a Mkk1 y 2 mediante fosforilación y éstas reconocen el motivo típico de MAPK T-X-Y en Slr2 y la fosforilan de forma dual en los residuos Thr¹⁹⁰ y Tyr¹⁹² (Irie *et al.* 1993; Kamada *et al.* 1995; Paravicini and Friedli 1996). Estas tres quinasas difieren en su localización en ausencia de estrés ya que Bck1 y las Mkk1 y 2 se encuentran en citoplasma mientras que Slr2 tiene localización nuclear. Sin embargo, en caso de estrés de pared tanto Slr2 como Mkk1 y 2 se distribuyen en las zonas de crecimiento polarizado, cosa que no se ha podido demostrar en el caso de Bck1 (Kamada *et al.* 1995; van Drogen and Peter 2002).

La desfosforilación y por tanto inactivación de Slr2 es catalizada por al menos cuatro fosfatasa. Msg5 es una fosfatasa de especificidad dual que también tiene la capacidad de inactivar a Fus3, la MAPK de la vía de respuesta a feromonas (Doi *et al.* 1994; Flandez *et al.* 2004). Otras fosfatasas que también actúan sobre Slr2 son Ptp2 y Ptp3, tirosina fosfatasas que desfosforilan Fus3 y Hog1, la MAPK de respuesta a alta osmolaridad (Mattison *et al.* 1999). Por último encontramos Sdp1, una serina treonina fosfatasa como Msg5 pero que parece actuar de forma específica sobre Slr2 (Collister *et al.* 2002).

Los principales sustratos conocidos de Slr2 se encuentran en el núcleo. Se trata de Rlm1 y el complejo SBF formado por Swi4 y Swi6. Rlm1 es el factor de transcripción responsable de la mayor parte de la respuesta transcripcional generada por la vía CWI (Watanabe *et al.* 1997; Jung and Levin 1999; Garcia *et al.* 2004). Este factor de transcripción puede funcionar como activador o como inhibidor de la expresión dependiendo de los genes sobre los que actúe. Actúa mediante unión a motivos 5'-CTA(A/T)₄TAG-3' presentes en los promotores de ciertos genes, la mayoría de los cuales están implicados en la biogénesis de la pared celular (Dodou and Treisman 1997; Jung *et al.* 2002). Por otro lado, se ha descrito que el complejo transcripcional SBF (Swi4/Swi6 *dependent cycle box*), capaz de unirse a secuencias CACGAAA durante la fase G1 del ciclo celular y regular la transición de G1 a S y la morfogénesis celular, también posee

una función dependiente de su fosforilación por Slt2 en respuesta a estrés de pared (Baetz *et al.* 2001; Madden *et al.* 1997).

El defecto de crecimiento de un mutante *swi4 rlm1* no es tan severo como el que tiene el mutante simple *slt2*, cosa que, junto al hecho de que Slt2 se transloque a citoplasma en situaciones de estrés de pared, concuerda con la existencia de dianas de esta MAPK extranucleares (Levin 2005). Algunas de ellas han sido identificadas: el canal de calcio formado por Cch1 y Mid1, la fosfatasa Msg5 y la tirosina fosfatasa Mih1. La relación entre Cch1-Mid1 y Slt2 no está todavía demasiado clara. Se ha demostrado que el correcto funcionamiento de este canal depende de Slt2 en respuesta a estrés de retículo lo que sugiere una interacción entre la vía CWI y la de la calcineurina (Bonilla and Cunningham 2003). El papel de Slt2 sobre la fosfatasa Msg5 constituye un excelente mecanismo de potenciación de la señal (retroalimentación positiva) de forma que Slt2 fosforila Msg5 y esto provoca una disminución en la afinidad de unión de ambas proteínas (Flandez *et al.* 2004). Por otro lado, aunque no se sabe si directa o indirectamente, Slt2 regula de forma negativa la fosfatasa Mih1 y esto provoca que Mih1 no active Cdc28 produciéndose una parada de ciclo celular entre G2 y M (Harrison *et al.* 2001).

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Análisis de la respuesta transcripcional de *S. cerevisiae* a pH alcalino.

Al iniciar nuestros estudios sobre la respuesta de *S. cerevisiae* a estrés alcalino sólo se habían descrito algunas mutaciones (sobre todo de genes relacionados con la ATPasa vacuolar) que daban lugar a sensibilidad a pH alcalino y la existencia de algunos genes, como *ENA1*, *SHC1* y *SCY1*, cuya expresión variaba en condiciones alcalinas. Estas últimas observaciones indicaban que el estrés alcalino era capaz de modificar la expresión génica, por lo que nos propusimos a realizar un análisis a gran escala para caracterizar exhaustivamente la respuesta transcripcional a este tipo de estrés.

Para ello realizamos un análisis mediante microarrays de DNA del perfil transcripcional de células sometidas a un estrés alcalino suave, que ni siquiera producía un retraso significativo de ciclo celular (no mostrado). Así, células de la cepa salvaje DBY746 fueron expuestas a pH 7.6 durante 5, 25 y 45 min y comparadas con células de la misma cepa mantenidas a pH 6.4. Los resultados indicaron que 150 genes incrementaban su expresión al menos dos veces en alguno de los tiempos analizados mientras que la expresión de 232 era reprimida un tercio o más.

Los genes inducidos se clasificaron en familias funcionales y nos referimos a ellos como tempranos (E; *Early*) si su máxima inducción tenía lugar a los 5 min, intermedios (I; *Intermediate*) si tenía lugar a los 25 min y tardíos (L; *Late*) si la tenía a 45 min (tabla 1). Nuestros resultados indicaban que la respuesta a pH alcalino de algunos genes era rápida, pudiendo ser duradera o transitoria, y la de otros tardía. Un tercio de los genes tenían su pico máximo de inducción a los 5 min, sugiriendo una respuesta muy rápida.

Nuestros datos indicaban que la exposición a pH alcalino implica parcialmente una respuesta que recuerda a la producida en respuesta a estrés general ya que, entre los genes inducidos, aparecían 28 que se pueden clasificar como miembros de la respuesta a estrés general (CER, *Common Stress Response*) o de la respuesta a estrés medioambiental (ESR, *Environmental Stress Response*) (Gasch *et al.* 2000; Causton *et al.* 2001). Además, también eran inducidos por estrés alcalino un número considerable de genes implicados en la transcripción y el procesamiento de RNA. Sin embargo, la respuesta a pH alcalino también implicaba respuestas más específicas. Este es el caso de la respuesta de genes relacionados con el metabolismo del fosfato como

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Carbohydrate Metabolism / Energy				
YOR374W	<i>ALD4</i>	6.8	E	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase
YPL061W	<i>ALD6</i>	5.0 (*)	I	Acetaldehyde dehydrogenase
YOR095C	<i>RK11</i>	3.3	I	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase
YEL071W	<i>DLD3</i>	3.9 (*)	I	D-lactate dehydrogenase
YIL162W	<i>SUC2</i>	4.6	E	Sucrose utilization
YDR178W	<i>SDH4</i>	2.4	E	Subunit succinate dehydrogenase complex
YCR005C	<i>CIT2</i>	4.1	I	Peroxisomal citrate synthase

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Phosphate transport / metabolism				
YBR296C	<i>PHO89</i>	3.2	E	High-affinity Na ⁺ -phosphate symporter
YHR215W	<i>PHO12</i>	2.2	L	Inducible, secreted acid phosphatase
YML123C	<i>PHO84</i>	12.7	L	H ⁺ /phosphate permease
YJL012C	<i>VTC4</i>	2.9	I	Putative polyphosphate synthetase
YPL019C	<i>VTC3</i>	2.2	L	Putative polyphosphate synthetase

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Other metabolism				
YLR303W	<i>MET17</i>	2.2	I	Methionine biosynthesis
YKL001C	<i>MET14</i>	4.2	I	Sulfate assimilation
YGL037C	<i>PNC1</i>	2.3	E	Pyridine nucleotide cycle
YML106W	<i>URA5</i>	5.0	I	Pyrimidine biosynthesis
YPL057C	<i>SUR1</i>	2.2	I	Sphingolipid metabolism
YLR056W	<i>ERG3</i>	2.1	L	Sterol metabolism
YOL165C	<i>AAD15</i>	2.8	I	Hypothetical aryl-alcohol dehydrogenase
YCR107W	<i>AAD3</i>	2.5	I	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YFL056C	<i>AAD6</i>	2.5	I	Probable aryl alcohol dehydrogenase

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Ion transport & homeostasis / Other transports				
YBR158W	<i>CST13</i>	4.2	I	Cu ²⁺ ion homeostasis (putative)
YLR214W	<i>FRE1</i>	7.4	I	Iron and copper homeostasis
YOR382W	<i>FIT2</i>	6.6	L	Possibly involved in iron uptake
YPL135W	<i>ISU1</i>	2.3	I	Iron homeostasis
YEL065W	<i>ARN3</i>	5.4	I	Ferrioxamine B permease
YHL040C	<i>ARN1</i>	2.4	L	Transport of ferrichromes.
YHL047C	<i>ARN2</i>	3.9	L	Triacetylfusarinine C transporter
YMR058W	<i>FET3</i>	2.6	L	Cell surface ferroxidase
YPR124W	<i>CTR1</i>	2.5	I	Required for high-affinity uptake of copper
YDR038C	<i>ENA5</i>	2.5	E	Na ⁺ ATPase
YDR040C	<i>ENA1</i>	2.0	E	Na ⁺ ATPase
YCR011C	<i>ADP1</i>	2.1	I	Putative ATP-dependent permease
YDR011W	<i>SNQ2</i>	3.1	I	Putative ATP-dependent permease
YGL077C	<i>HNM1</i>	2.2	E	Choline permease
YGR121C	<i>MEP1</i>	2.0	E	Ammonia permease
YHR092C	<i>HXT4</i>	2.3	E	Moderate- to low-affinity hexose transporter
YIL170W	<i>HXT12</i>	2.7	E	Hexose transporter

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Transcription & RNA processing				
YBR112C	<i>CYC8</i>	2.9	I	General repressor
YBR154C	<i>RPB5</i>	7.2	I	Shared subunit of RNA pol. I. II. III
YCL066W	<i>HML 1</i>	2.3	I	Activates alpha-specific genes
YJR063W	<i>RPA12</i>	2.1	I	RNA polymerase I subunit
YKR025W	<i>RPC37</i>	2.0	I	RNA polymerase III 37 kDa subunit
YPR110C	<i>RPC40</i>	2.3	I	Shared subunit of RNA pol. I and III
YLR136C	<i>TIS11</i>	4.6	I	Pol II transcription
YDR395W	<i>SXM1</i>	2.3	I	mRNA export. nuclear protein targeting
YHR170W	<i>NMD3</i>	2.2	I	mRNA decay
YKL009W	<i>MRT4</i>	2.6	I	mRNA decay
YOL123W	<i>HRP1</i>	2.0	E	Nuclear polyA RNA-binding protein
YDR083W	<i>RRP8</i>	2.9	I	Ribosomal RNA processing
YHR169W	<i>DBP8</i>	2.1	I	RNA helicase
YJL116C	<i>NCA3</i>	9.7	I	RNA processing/modification
YDR087C	<i>RRP1</i>	3.8	I	rRNA processing
YJL033W	<i>HCA4</i>	3.5	I	rRNA processing
YOL142W	<i>RRP40</i>	2.2	I	rRNA processing
YDL051W	<i>LHP1</i>	2.3	I	tRNA processing

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Stress response				
YMR174C	<i>PAI3</i>	4.5	I	Osmotic stress response
YJR104C	<i>SOD1</i>	2.1	I	Copper-zinc superoxide dismutase
YKR066C	<i>CCP1</i>	2.6	I	Cytochrome-c peroxidase
YCR021C	<i>HSP30</i>	2.0	L	Heat shock protein
YDR513W	<i>GRX2</i>	2.3	I	Glutaredoxin
YDR353W	<i>TRR1</i>	4.6 (*)	I	Thioredoxin reductase
YBR111C	<i>YSA1</i>	2.1	I	Nucleoside diphosphate-sugar hydrolase
YMR175W	<i>SIP18</i>	2.1	I	Induced by osmotic stress

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Protein degradation / synthesis / modification				
YER012W	<i>PRE1</i>	2.1	I	20S proteasome subunit C11(beta4)
YGR135W	<i>PRE9</i>	2.2	I	20S proteasome subunit Y13 (alpha3)
YLR120C	<i>YPS1</i>	2.7	E	GPI-anchored aspartyl protease
YPL154C	<i>PEP4</i>	2.1	E	Vacuolar aspartyl protease
YDR037W	<i>KRS1</i>	2.2	I	tRNA synthetase. lysyl
YDR041W	<i>RSM10</i>	2.0	E	Mitochondrial ribosomal small subunit
YDR418W	<i>RPL12B</i>	2.2 (*)	I	Ribosomal protein L12B
YNL002C	<i>RPL7</i>	2.0	I	Similarity to ribosomal proteins
YOL127W	<i>RPL25</i>	3.7	L	Ribosomal protein L25
YMR060C	<i>TOM37</i>	3.1	L	Outer membrane translocase
YBR110W	<i>ALG1</i>	5.3	I	Beta-1.4-mannosyltransferase
YBR205W	<i>KTR3</i>	3.0	I	Putative alpha-1.2-mannosyltransferase
YMR101C	<i>SRT1</i>	2.0	L	Cis-prenyltransferase (putative)

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Other				
YAL059W	<i>ECM1</i>	2.0	I	Cell wall biogenesis
YGR008C	<i>STF2</i>	2.3	E	Cell wall maintenance
YKL096W	<i>CWP1</i>	2.2	E	Mannoprotein of the cell wall
YBR160W	<i>CDC28</i>	2.4	I	Cyclin-dependent protein kinase
YNL307C	<i>MCK1</i>	2.2	E	Member of the GSK-3 family of protein kinases
YOR242C	<i>SSP2</i>	3.7	L	Sporulation
YCR052W	<i>RSC6</i>	2.9	I	Chromatin remodeling complex subunit
YCR009C	<i>RVS161</i>	2.1	I	Actin-binding protein
YBR179C	<i>FZO1</i>	3.4	E	Mitochondrial membrane GTPase
YIR012W	<i>SQT1</i>	2.5	I	Ribosome biogenesis. putative
YNL036W	<i>NCE103</i>	7.6	E	Secretion
YBR109C	<i>CMD1</i>	2.8	I	Calmodulin. Ca ⁺ binding
YGR023W	<i>MTL1</i>	2.3	L	Morphogenesis
YER072W	<i>VTC1</i>	2.5	L	Distribution of V-ATPase and others at membranes
YKL043W	<i>PHD1</i>	3.1	E	Transcription factor involved in filamentous growth

ORF				ORF					
Gene	-Fold	Time	Gene	-Fold	Time	Gene	-Fold	Time	
YAL049C	2.6	I	YKL175W	<i>ZRT3</i>	2.3	L			
YAL053W	2.0	L	YLR108C		2.3	I			
YBL108W	3.2	L	YLR186W		2.3	I			
YBR004C	2.2	E	YLR205C		2.2	I			
YBR207W	2.6	I	YLR327C		5.2	E			
YBR287W	3.7	E	YLR405W		2.1	L			
YCL059C	2.3	I	YLR414C		2.5	E			
YCR054C	3.0	I	YML058C-A		2.1	L			
YDL046W	4.6	E	YML059C		2.1	L			
YDL167C	2.6	I	YML128C	<i>MSC1</i>	3.0	E			
YDL213C	3.7	I	YML131W		2.9	I			
YDR161W	2.0	I	YMR031C		2.9	E			
YDR370C	5.0	I	YMR173W	<i>DDR48</i>	5.4	I			
YDR372C	2.7	I	YMR173W-A		5.9	I			
YDR516C	2.3	E	YMR251W-A	<i>HOR7</i>	9.2	E			
YDR534C	2.5	L	YMR304C-A		2.3	E			
YER150W	2.7	E	YMR316W	<i>DIA1</i>	2.8	E			
YGL039W	2.0	I	YMR318C		2.8	I			
YGL183C	5.0	I	YNL013C		2.6	L			
YGR187C	2.0	I	YNL134C		2.7	I			
YGR211W	2.0	I	YNL149C		2.3	I			
YGR213C	3.4	E	YNL208W		2.2	I			
YGR243W	2.5	E	YNL300W	<i>TOS6</i>	2.2	L			
YHL021C	2.1	E	YOL150C		3.0	I			
YHR052W	2.2	I	YOL151W	<i>GRE2</i>	4.1	I			
YHR087W	2.4	E	YOR049C		3.7	E			
YHR138C	2.6	E	YOR161C		2.4	E			
YJL171C	2.4	E	YPL183C		2.3	L			
YKL071W	13.8	I							

Tabla 1. Clasificación en familias funcionales de los ORFs cuya expresión se halla incrementada tras exposición a estrés alcalino moderado. Se listan todos los ORFs sobreexpresados al menos dos veces en condiciones alcalinas. Los números indican el máximo nivel de expresión obtenido. También se indica el tiempo donde se observa una mayor respuesta: E (early o temprano) si su máxima respuesta es a los 5 min, I (intermediate o intermedio) si es a los 25 min y L (late o tardío) si es a los 45 min. Los asteriscos (*) indican que la señal de hibridación estaba fuera del rango de detección. Los genes en negrita corresponden con genes que responden a una gran variedad de estreses.

PHO84, *PHO12*, *PHO89* o *PHM2* o de genes implicados en la homeostasis de iones, especialmente hierro y cobre, como *FRE1*, *FIT2*, *FET3* o *ARN1-3*. Algunos de los resultados obtenidos mediante arrays fueron recomprobados por northern blot (figura 1 del artículo 1).

Respecto a los genes reprimidos, cabe destacar que una gran parte de éstos está relacionada con la biosíntesis de aminoácidos. También se reprimían la mayoría de los genes relacionados con la síntesis de purinas, responsable de la generación *de novo* de AMP (tabla 2 y figura 1 del artículo 1).

Simultáneamente o con posterioridad a los experimentos descritos, se han publicado varios análisis de la respuesta transcripcional a pH alcalino. En el primero de ellos se analizaba el cambio en la transcripción génica de células sometidas a pH 8.0 durante 2 h (Lamb *et al.* 2001). De los 71 genes inducidos (al menos 2.1 veces) en estas condiciones sólo 14 estaban también presentes en nuestro estudio. Esta baja correlación puede ser debida a la naturaleza transitoria del incremento de los niveles de mRNA ya que Lamb y colaboradores analizaron la respuesta transcripcional a las 2 h después del estímulo, y por lo tanto podemos suponer que no se detectaron los genes de respuesta rápida y transitoria. De hecho, y exceptuando *PHO89* y *ENA1*, los genes en común fueron clasificados como intermedios o tardíos en nuestro estudio.

En otro trabajo del grupo de Young, en el que se evaluaban los cambios transcripcionales ante diferentes condiciones ambientales, también se incluía un estudio del estrés alcalino. En éste el cambio de pH era de 6.0 a 7.9 y se analizaba la respuesta a los 10, 20, 40, 60, 80 y 100 min (Causton *et al.* 2001). En este caso se consideraron inducidos un total de 676 genes (tres veces o más), un número muy superior al que nosotros obtuvimos. La comparación entre nuestros datos y los de Causton y colaboradores nos permitió encontrar únicamente 40 genes en común. Las diferencias entre ambos resultados pueden ser debidas a la diferente intensidad del estrés, pero cabe destacar que en este trabajo se documentan valores de inducción anormalmente elevados (de 270 veces en el caso de *HSP12*, por ejemplo) sugiriendo que se han podido sobreestimar las pequeñas diferencias de expresión debidas a error experimental.

Posteriormente, nuestro propio laboratorio llevó a cabo un nuevo estudio de la respuesta transcripcional a pH alcalino, esta vez a partir de células expuestas a un pH

mayor (8.0) durante 10, 20 y 45 min (Viladevall *et al.* 2004). En estas condiciones se inducían un total de 266 genes, 46 de los cuales aparecían en el análisis en condiciones de estrés alcalino suave. De todos los análisis de la respuesta transcripcional a pH alcalino, este último es el más similar al presentado aquí en cuanto a metodología, tanto respecto a la forma de provocar el estrés como a la cepa utilizada. Llama poderosamente la atención que las categorías de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y la obtención de energía por un lado, y la de genes relacionados con estrés por otro, estén significativamente más representadas en este último trabajo en el que las condiciones de estrés eran más severas.

A pesar del escaso solapamiento entre los datos publicados, aparecen perfiles constantes que indican cuáles son las funciones alteradas de manera consistente por estrés alcalino, independientemente de las variables experimentales. Precisamente son éstas las familias funcionales que van a ser motivo de estudio de esta tesis. Por ejemplo, todos los ensayos coinciden en una serie de genes relacionados con el metabolismo del fosfato como *PHO84*, *PHO89* o *PHO11/12*. Esto significa que posiblemente la alcalinización del medio altera la homeostasis de fosfato. Otro grupo muy representado es el grupo de genes implicados en la captación de los metales hierro y cobre, lo que sugeriría que la alcalinización extracelular podría suponer una situación de limitación de dichos metales. Dentro de esta categoría se incluyen, entre otros, genes como *FRE1*, *FET3*, *CTR1* o *FIT2*. Como es lógico, también son inducidos por estrés alcalino muchos genes relacionados con el estrés general, sobre todo cuando el estrés alcalino es más intenso. Curiosamente, dentro de este grupo aparecen numerosos genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo como *HSP12*, *TRX2*, *PRX1*, *TRR1* o *SOD1*, lo que sugiere una conexión entre estos dos tipos de estrés.

3.2. La alcalinización extracelular provoca la activación de la vía de la calcineurina.

3.2.1. Caracterización de la respuesta de los genes *ENA1*, *PHO84*, *PHO89* y *PHO12* a estrés alcalino: implicación de la vía de Rim101 y de la vía de la calcineurina.

Una vez establecido el perfil transcripcional generado en respuesta a estrés alcalino, nos preguntamos cuáles eran los mecanismos implicados en la activación de los genes inducidos. Para ello se seleccionaron cuatro genes con una elevada intensidad de respuesta a pH alcalino en base a dos criterios: la diferencia en el tiempo de respuesta y la capacidad para responder a otros estímulos. Por un lado, *PHO89* y *ENA1* son dos genes de respuesta rápida, mientras que *PHO84* y *PHO12* presentan respuesta tardía. Por otra parte, *ENA1* responde a estrés salino y el resto de genes a la privación de fosfato.

Con el objetivo de estudiar más detalladamente el comportamiento a pH alcalino de dichos genes, se realizaron fusiones de sus promotores con el gen *LacZ* en un plásmido multicopia, de manera que la medida de actividad β -galactosidasa reflejara la respuesta de estos genes. Así, esta respuesta podía ser fácilmente estudiada en una gran variedad de situaciones.

Gracias a estas construcciones analizamos, en primer lugar, las cinéticas de respuesta de dichos genes (resultados no mostrados). *ENA1* y *PHO89* presentaban una respuesta rápida ya que la actividad β -galactosidasa empezaba a detectarse a partir de los 15 min del choque alcalino, siendo máxima a los 60 min para *ENA1* y a los 90 min para *PHO89*. En cambio, *PHO84* y *PHO12* se inducían de forma más tardía ya que la actividad β -galactosidasa empezaba a detectarse a partir de los 30-60 min con un máximo de actividad a las 2 h. Todo ello indicaba que existen diferencias en la cinética de respuesta de estos genes tal y como habíamos observado tanto mediante microarrays (tabla 1) como por northern blot (figura 1 del artículo 1). Experimentos de dosis respuesta también evidenciaban el comportamiento diferencial entre dichos genes ya que la máxima inducción de *PHO84* tenía ya lugar a pHs relativamente bajos (7.0) y se mantenía hasta pH 7.9, mientras que *ENA1* y *PHO89* necesitaban un pH más alto para ser inducidos (figura 2 del artículo 1).

Con el objetivo de identificar elementos capaces de activar la transcripción del gen *ENA1*, analizamos su respuesta a pH alcalino en diversos mutantes de *S. cerevisiae* que eran defectivos en proteínas implicadas en varias vías de señalización de estrés (figura 10).

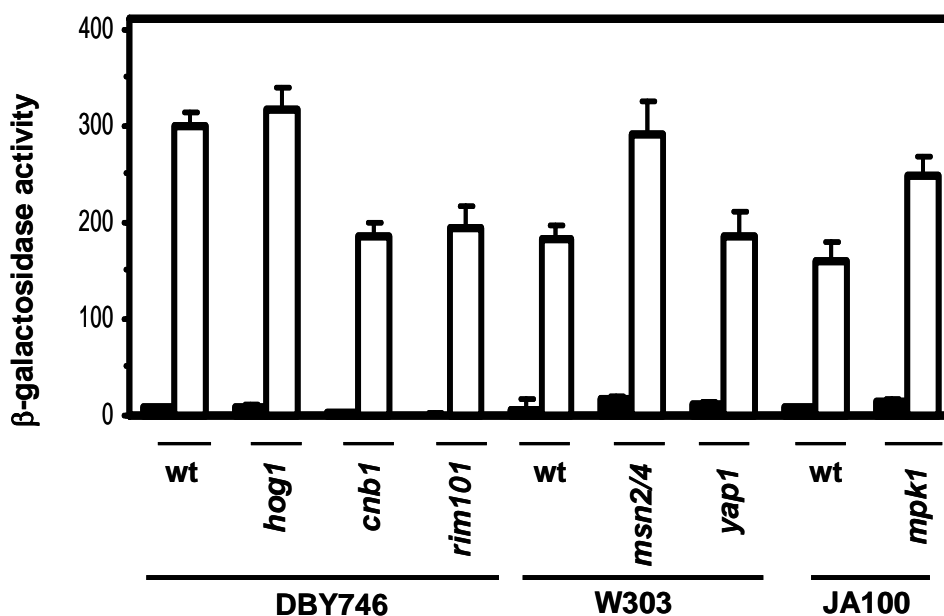


Figura 10. Respuesta del gen *ENA1* a estrés alcalino en varios mutantes defectivos en elementos de diferentes vías de señalización de *S. cerevisiae*. Transformamos los mutates indicados con el plásmido pKC201, que contiene el promotor de *ENA1* fusionado a *LacZ*, y los sometimos a estrés alcalino. Se representa la actividad β -galactosidasa (media y ESM de entre 3 y 6 valores) de células no estresadas (columnas en negro) o células inducidas por pH alcalino (columnas en blanco).

Estos experimentos nos permitieron descartar las vías de respuesta a estrés osmótico y la vía de la integridad de la pared celular ya que la falta de las MAPKs centrales de estas vías no alteraba la expresión de *ENA1*. Tampoco los factores de transcripción implicados en la respuesta a estrés general (Msn2 y Msn4) ni Yap1, el factor de transcripción implicado en la respuesta a estrés oxidativo, parecían participar en la respuesta de *ENA1* a pH alcalino. En cambio, observamos una cierta reducción de la activación de *ENA1* en un mutante *rim101*. Este último resultado concordaba con los datos obtenidos por Lamb y colaboradores que demostraban que Rim101, el homólogo de PacC de *A. nidulans*, contribuye parcialmente en la respuesta a pH alcalino del gen *ENA1* (Lamb *et al.* 2001). En el mismo experimento identificamos que, además de Rim101, al menos otro elemento estaba implicado en la respuesta de *ENA1* a pH

alcalino, ya que la delección de la subunidad reguladora de la calcineurina (mutación que provoca la pérdida total de la capacidad funcional de dicha fosfatasa) reducía en más de un tercio la respuesta de *ENA1* en estas condiciones. Este hecho constituyó el primer indicio de que la vía de la calcineurina podría jugar un papel en la respuesta alcalina.

Un análisis similar fue llevado a cabo para los genes *PHO84*, *PHO89* y *PHO12*, todos ellos implicados en la respuesta celular a déficit de fosfato (figura 11), por lo que en este caso se analizó el nivel de expresión en varios mutantes relacionados con la vía implicada en dicha respuesta. Tanto en el caso de *PHO84* como en el de *PHO12*, la falta de los factores de transcripción Pho2 y Pho4 o la falta de Pho81, el inhibidor de Pho80-85, que actúan de forma positiva en la expresión de los genes controlados por el regulón PHO, elimina por completo su respuesta a pH alcalino. Este resultado indicaba que la vía del fosfato es un componente de la respuesta transcripcional global a estrés alcalino. En el caso de *PHO89*, su expresión estaba parcialmente disminuída en los mutantes simples *pho81*, *pho2* o *pho4* mientras que la disminución era aditiva en el doble mutante *pho2 pho4*, en el que se producía una casi completa ausencia de respuesta. Además, al contrario de lo que sucedía para los otros genes relacionados con el metabolismo de fosfato como *PHO84* y *PHO12*, la inducción de *PHO89* por pH alcalino se perdía casi totalmente en el mutante *cnb1*, defectivo en actividad calcineurina.

Los datos mostrados hasta el momento evidenciaban que la expresión de *PHO89* estaba regulada por la fosfatasa calcineurina en respuesta a pH alcalino y que la de *ENA1* también era parcialmente dependiente de la actividad de dicha fosfatasa, sugiriendo un papel de la vía de calcio/calcineurina en la respuesta a estrés alcalino. Para confirmar esta hipótesis, examinamos si los promotores de los cuatro genes en estudio respondían a pH o a altas concentraciones de calcio (0.2 M de CaCl_2) en presencia o ausencia del inhibidor de la calcineurina FK506 o en células defectivas en Crz1, el factor de transcripción responsable de la mayoría de la respuesta transcripcional mediada por calcineurina (figura 5 del artículo 1). Tal y como esperábamos, *PHO84* y *PHO12* no respondían a calcio y su respuesta a pH alcalino no estaba afectada ni por FK506 ni por la falta de Crz1. En el caso de *ENA1*, como ya se había descrito, la respuesta a calcio era completamente dependiente de calcineurina y, por tanto, resultó eliminada por FK506 y en ausencia de Crz1 (Matheos *et al.* 1997; Stathopoulos and Cyert 1997). En cambio, la respuesta a pH alcalino de *ENA1* se veía disminuida en ambos casos, aunque no eliminada totalmente. Por otro lado, comprobamos que *PHO89* resultaba inducido por

elevadas concentraciones de calcio, dato que fue confirmado independientemente en aquellas fechas (Yoshimoto *et al.* 2002). Además, observamos que las respuestas a calcio y a pH alcalino de *PHO89* son muy similares en cuanto a intensidad y que, en ambos casos, se produce una pérdida total de inducción en presencia del inhibidor FK506 o en el mutante *crz1*.

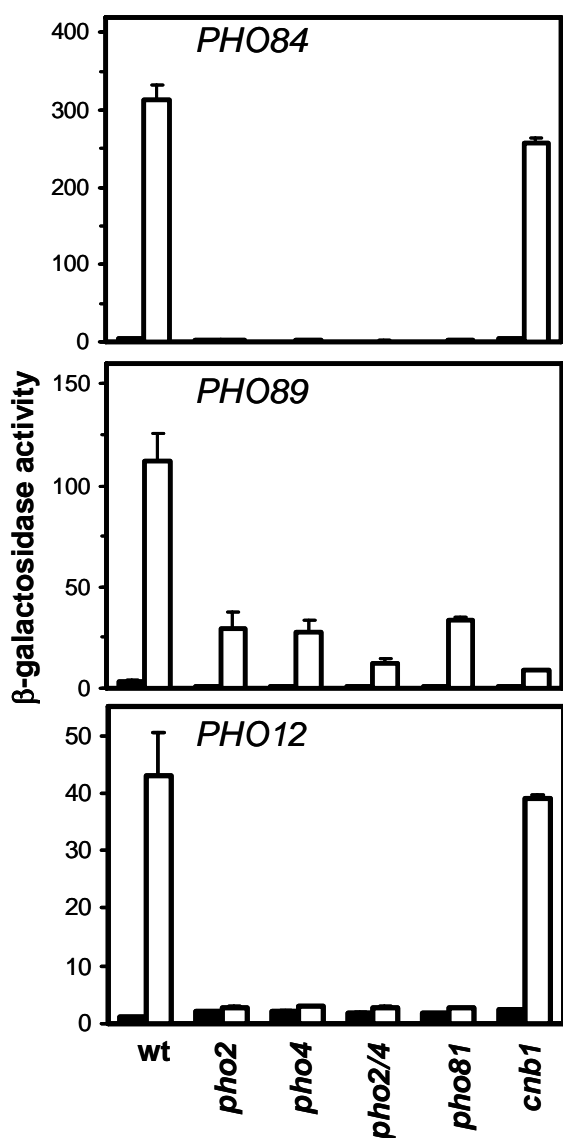


Figura 11. Caracterización de la respuesta a estrés alcalino de los genes *PHO84*, *PHO89* y *PHO12* en diferentes mutantes. Las cepas indicadas transformadas con los plásmidos pPHO84, pPHO89 y pPHO12 se sometieron a estrés alcalino durante 90 min (en el caso de pPHO84 y pPHO89) o 120 min (pPHO12) y se analizó su actividad β-galactosidasa. Las barras negras representan la actividad de células no estresadas y las blancas la de células estresadas. Los datos son la media +/- ESM de seis experimentos independientes.

En resumen, en este apartado, y gracias al estudio detallado de la respuesta de cuatro genes inducidos a pH alcalino, llegamos a la conclusión de que existen genes cuya respuesta a estrés alcalino es totalmente dependiente (*PHO89*), parcialmente dependiente (*ENA1*) o independiente (*PHO84* y *PHO12*) de la vía de la calcineurina.

3.2.2. El mapeo funcional del promotor de *ENA1* revela la existencia de dos regiones de respuesta a pH alcalino, una calcio dependiente y otra calcio independiente.

El gen *ENA1* codifica una ATPasa de sodio (aunque también transporta litio) y constituye el principal sistema de detoxificación de estos iones en *S. cerevisiae*. Su expresión está regulada a nivel transcripcional por varias vías de señalización y es capaz de ser inducida por múltiples estímulos como estrés osmótico, estrés salino, alta concentración de calcio o baja concentración de glucosa, que son integrados en su complejo promotor que se extiende aproximadamente 1.3 Kb.

Para averiguar qué regiones del promotor de *ENA1* eran importantes en la respuesta a pH alcalino se utilizaron varias construcciones *reporters* basadas en fusiones de diferentes regiones del promotor de *ENA1* a *CYC1-LacZ* (Alepez *et al.* 1997). Ello nos llevó a identificar los elementos importantes para la respuesta a pH alcalino en la zona comprendida entre los nucleótidos -853 a -358 (respecto al ATG). Un mapeo más detallado (figura 12) nos permitió restringir la zona entre las posiciones -742 y -490 (incluida en el plásmido pMP211), región que contiene la mayoría de elementos reguladores conocidos de *ENA1*. Dentro de esta zona se encuentran la secuencia activadora CDRE (de respuesta a calcio/calcineurina) y los elementos de unión a represores génicos MIG (reconocidas por Mig1 cuando los niveles de glucosa son altos) y CRE (donde se une Sko1 en ausencia de estrés osmótico) (Alepez *et al.* 1997; Proft and Serrano 1999; Mendizabal *et al.* 2001). También se incluye una secuencia STRE (de respuesta general a estrés) aunque se ha demostrado que no es funcional en el promotor de *ENA1*, al menos en respuesta a estrés osmótico (Proft and Serrano 1999).

Dentro de dicha región, el fragmento entre las posiciones -751 y -667 (pMR706) daba una respuesta significativa mientras que la región contigua entre -681 a -565 (pMR605), que contiene la secuencia STRE, era totalmente inactiva. Plásmidos que contenían partes del promotor de *ENA1* situadas a ambos lados de la región inactiva daban lugar a diferentes grados de expresión en respuesta estrés alcalino. Este es el caso de los plásmidos pMP212 (-743 a -577), pMP209 (-495 a -317) y pMP213 (que contiene la pequeña región entre -573 a -490). Todo ello indicaba que *ENA1* contiene al menos dos regiones individualizadas en su promotor que son dianas para la/s señal/es desencadenadas por estrés alcalino. Denominamos a estas regiones ARR1 y ARR2 (por

Alkaline Responsive Region). ARR1 está situada entre las posiciones -751 y -667 mientras que ARR2 se encuentra entre -573 y -490.

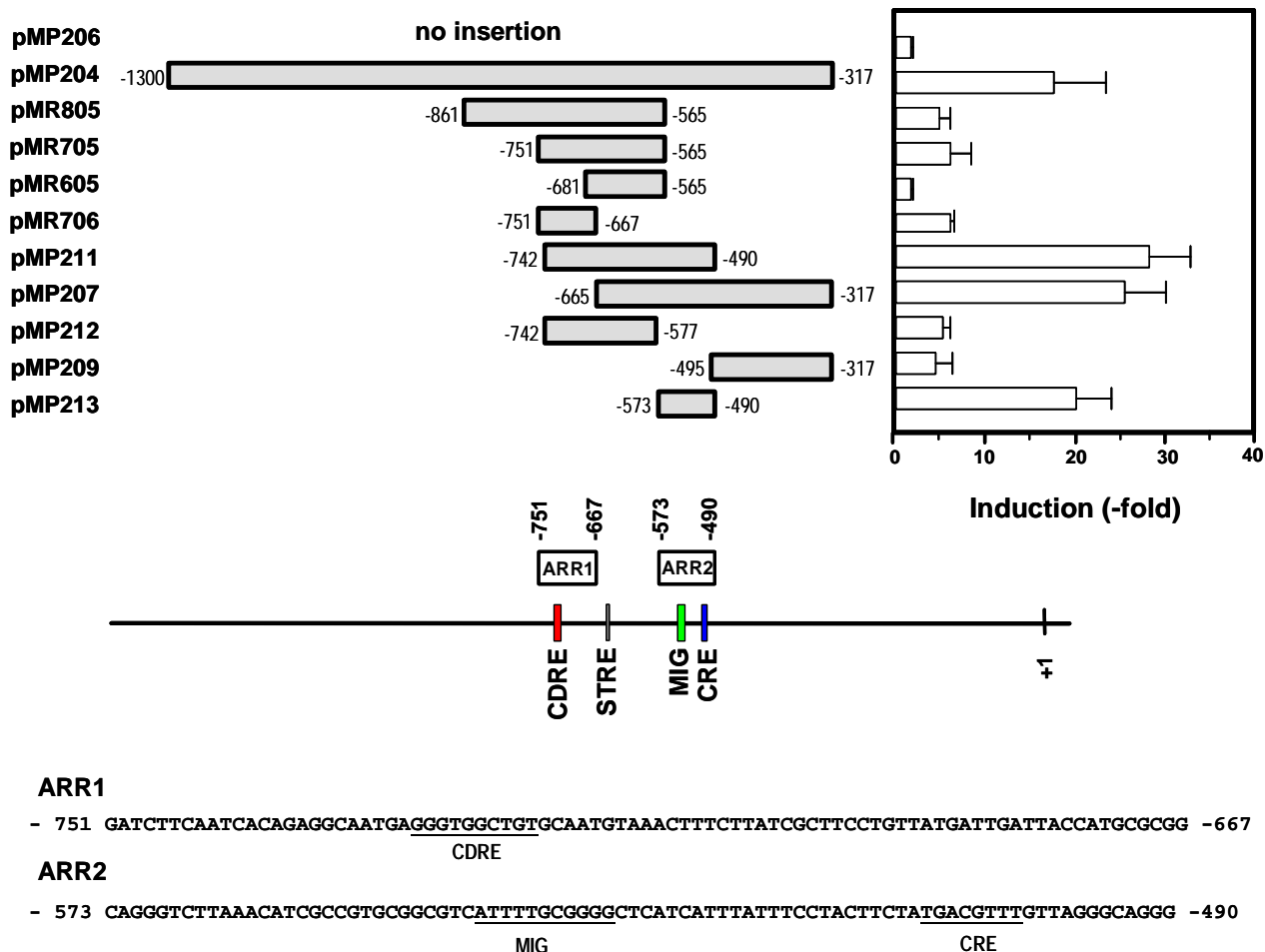


Figura 12. Mapeo funcional del promotor de *ENA1* en respuesta a estrés alcalino. Transformamos células salvajes con diferentes construcciones *reporters* que contenían regiones específicas del promotor de *ENA1* (se detalla el nombre del plásmido y la región comprendida en cada uno). En la gráfica se muestra la relación entre la actividad β -galactosidasa de células expuestas a estrés alcalino y la actividad en condiciones basales. También se incluye un esquema de los elementos reguladores conocidos del promotor de *ENA1* y las secuencias de las regiones que hemos definido como ARR1 y ARR2, de respuesta a estrés alcalino.

Puesto que sabíamos que la respuesta de *ENA1* era parcialmente dependiente de calcineurina, procedimos a identificar el elemento o elementos del promotor de este gen responsable/es de ello. Para ello se construyeron dos nuevos plásmidos que hemos denominado pMRK212 y pMRK213, que contienen el elemento CDRE de la región ARR1 y toda la región ARR2, respectivamente. Hay que señalar que estos nuevos plásmidos

contienen las mismas zonas del promotor de *ENA1* que sus homólogos de la serie pMR (pMR212 y pMR213 respectivamente) pero clonadas en un plásmido con una expresión basal mínima, lo que facilitaba la evaluación de las diferencias de expresión producidas por pH alcalino. Como se muestra en la figura 13, pMRK212 presentaba una respuesta a estrés alcalino y a calcio que, en ambos casos, dependía totalmente de calcineurina (era eliminada en presencia de FK506 o en ausencia de Cnb1 o Crz1). Este comportamiento no era de extrañar ya que, como se ha mencionado, su inserto contiene el CDRE de ARR1. En cambio, pMRK213 daba lugar a una respuesta a pH alcalino, incluso mayor que la de pMRK212, básicamente independiente de calcineurina. En concordancia con ello, dicha región no respondía a calcio. Por lo tanto, en la respuesta de la región ARR2 de *ENA1* a pH alcalino han de estar implicados otros mecanismos independientes de calcineurina.

Debido a que se había relacionado a Rim101 con la respuesta a pH alcalino de *ENA1* (apartado 3.2.1 y 3.2.2; Lamb *et al.* 2001) procedimos a localizar la zona del promotor de *ENA1* implicada en la respuesta a estrés alcalino mediada por Rim101. Para ello analizamos la actividad β -galactosidasa de pMRK212 y pMRK213 tras choque alcalino en mutantes *rim101*. Al parecer, Rim101 actúa en ambas regiones del promotor de *ENA1*, ya que en el mutante *rim101* la respuesta de ambos plásmidos se encuentra parcialmente disminuída (figura 14). Tal y como se ha descrito con posterioridad a estos experimentos, Rim101 no actúa directamente sobre el promotor de *ENA1* sino que lo hace a través de Nrg1, un factor de transcripción que reprime directamente la expresión de *ENA1* (Lamb and Mitchell 2003). Dentro del promotor de *ENA1* se han definido dos secuencias consenso de unión de Nrg1, una de las cuales está incluída en ARR1, solapada en parte con el CDRE, lo cual encaja perfectamente con nuestro modelo, mientras que la otra se encuentra en la región que hemos definido como inactiva en respuesta a estrés alcalino. Actualmente se está trabajando en la implicación de Rim101 en la respuesta de la región ARR2 y tenemos evidencias de que existe un dominio de unión de Nrg1 en esta región, aunque posiblemente su secuencia varíe respecto de la consenso (Platara *et al.*, en preparación).

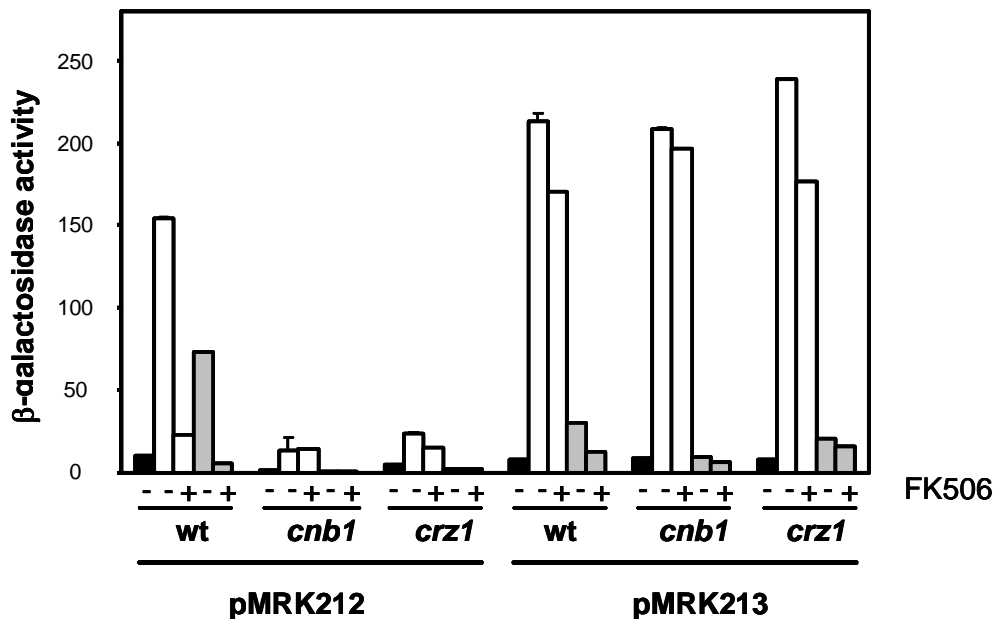


Figura 13. Estudio de la dependencia de la vía de la calcineurina en la respuesta a pH alcalino de las regiones ARR1 y ARR2 del promotor de *ENA1*. Se ha determinado la actividad β-galactosidasa de cepas defectivas en *Cnb1* o *Crz1* transformadas con los plásmidos pMRK212 (que contiene ARR1) o pMRK213 (que contiene ARR2) en condiciones basales (barras negras), sometidas a estrés alcalino (barras blancas) o inducidas por calcio (barras grises). Se indica con '+' o '-' la presencia o ausencia, respectivamente, del inhibidor de calcineurina FK506.

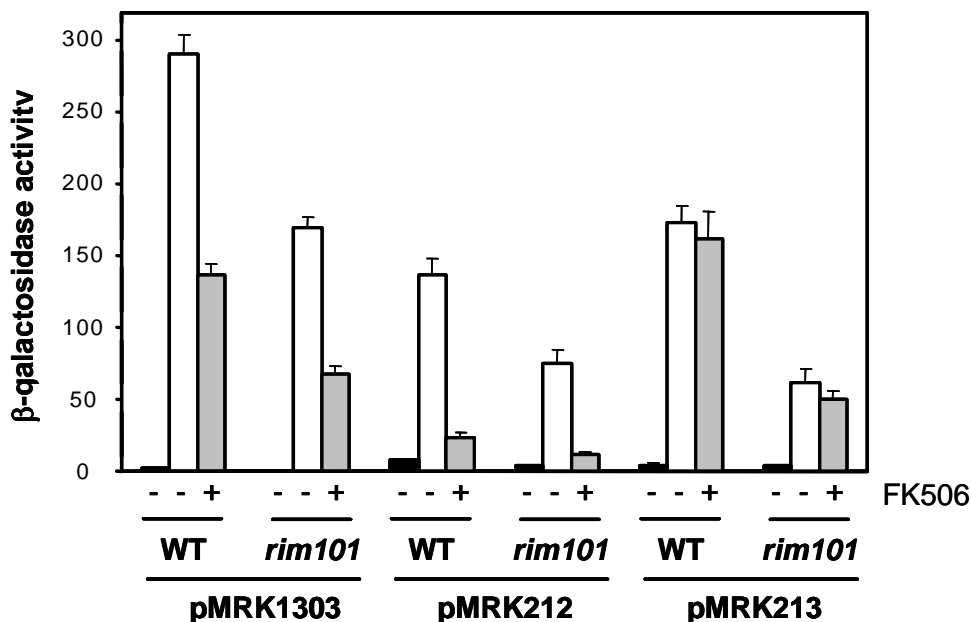


Figura 14. Análisis del papel de *Rim101* en la activación por pH alcalino de diversas regiones del promotor de *ENA1*. Se muestra la respuesta a estrés alcalino (por medio de la medida de la actividad β-galactosidasa) de varias regiones del promotor de *ENA1* en una cepa salvaje y en el mutante *rim101* isogénico. Se representa la actividad basal (columnas negras) y la respuesta a pH alcalino en ausencia (columnas blancas) o presencia (columnas grises) de FK506. La actividad es la media y la ESM de seis experimentos independientes.

En la figura 14 se muestra también la respuesta de pMRK212 y pMRK213 en un mutante *rim101* en presencia de FK506, es decir en condiciones en que ni la vía de la calcineurina ni la vía RIM101 pueden actuar sobre *ENA1*. La respuesta de pMRK212 se anulaba en estas condiciones pero esto no sucedía para pMRK213. Esto indicaba que Rim101 y calcineurina están actuando de forma conjunta y exclusiva en la respuesta de la región ARR1 de *ENA1* a pH alcalino. En cambio, además de Rim101, deben existir otros elementos implicados en la respuesta pH alcalino de la región ARR2 de *ENA1*. Se han realizado experimentos que demuestran que la vía de la MAPK Hog1 de respuesta a estrés osmótico, y por lo tanto el elemento CRE de ARR2, no están implicados en la respuesta a estrés alcalino (3.2.1). Sin embargo, el elemento MIG del promotor, responsable de la respuesta de *ENA1* a escasez de glucosa, sí parece estar implicado en la respuesta a estrés alcalino, tal y como demuestran una serie de experimentos que se han realizado recientemente en el laboratorio (Platara *et al.*, en preparación).

Además, el estrés alcalino induce la expresión de una serie de genes implicados directamente en el transporte y el metabolismo de la glucosa como *HXT2*, *HXT4*, *HXT6*, *HXT10* o *HXT11* que también se sobreexpresan en situación de falta de glucosa (Viladevall *et al.* 2004). Todo ello sugiere que el estrés alcalino estaría mimetizando una situación de falta de glucosa y, de hecho, esta hipótesis ha sido corroborada recientemente mediante experimentos realizados en nuestro propio laboratorio (Ruiz *et al.*, no publicado). La activación de la vía de la glucosa parece ser uno de los primeros eventos en la respuesta a estrés alcalino a juzgar por la rápida inducción de los genes relacionados con el transporte y el metabolismo de este azúcar. La rapidez en la respuesta permite descartar que la causa de que dicha vía se active sea una falta de glucosa en el medio y sugiere que podría deberse o a una disminución en su transporte o a una incapacidad para metabolizar el azúcar.

3.2.3. El elemento CDRE es suficiente para generar una respuesta a pH alcalino.

La evidencia de que los promotores que contienen secuencias CDRE como *ENA1* y *PHO89* respondan a estrés alcalino de forma dependiente a calcineurina, nos llevó a plantearnos si este elemento sería suficiente para generar dicha respuesta. Tal y como se muestra en la figura 9 del artículo 1, analizamos primero la respuesta a pH alcalino del plásmido pLA que contiene sólo la región entre -732 y -711 de *ENA1* que comprende el

CDRE de ARR1 (Mendizabal *et al.* 2001). También evaluamos la respuesta de pAMS366 y pAMS364, el primero de los cuales contiene un tándem de 4 secuencias CDRE del promotor de *FKS2* (uno de los genes que codifican la subunidad catalítica de la glucano sintasa) mientras que el segundo es esencialmente idéntico excepto que los elementos CDRE están mutados y Crz1 es incapaz de reconocerlos y unirse a ellos (Stathopoulos and Cyert 1997). Nuestros resultados indican que tanto el CDRE de pLA como los de pAMS366 responden a pH alcalino de forma dependiente de la vía de señalización de la calcineurina, ya que la respuesta se pierde en presencia de FK506 y por ausencia de Crz1 en ambos casos. Además la respuesta a pH alcalino no tiene lugar en pAMS364, es decir cuando el elemento CDRE no es funcional. Así llegamos a la conclusión de que, efectivamente, el elemento CDRE aislado es suficiente para desencadenar la respuesta a pH alcalino.

3.2.4. La exposición a estrés alcalino provoca un incremento transitorio de los niveles de calcio citoplasmático en *S. cerevisiae*.

Nuestros datos previos indicaban que la vía de la calcineurina está implicada en la tolerancia a estrés alcalino. En general, la activación de la calcineurina siempre se considera ligada al incremento en los niveles citosólicos de calcio. Sin embargo, los niveles de este catión no son los únicos elementos que gobiernan la actividad de calcineurina ya que se han definido otros sistemas de regulación. Por un lado, existen proteínas implicadas en su activación e inhibición, como Rcn1 y, por otro, la localización de Crz1 también se regula por fosforilación (Hilioti *et al.* 2004; Kafadar *et al.* 2003; Kafadar and Cyert 2004). Todo ello nos llevó a la necesidad de verificar si la activación de calcineurina era un reflejo de un incremento en la concentración de calcio citoplasmático producido por alcalinización del ambiente.

Para evaluar *in vivo* los cambios en los niveles citoplasmáticos de calcio utilizamos un método basado en la expresión en levadura de la proteína aequorina que, en presencia del sustrato coelenterazina y calcio, da lugar a una reacción en la que se emiten fotones. Así, la medida de luminiscencia es proporcional a la cantidad de calcio presente en citoplasma, y el seguimiento de dicha luminiscencia a través del tiempo es el reflejo de los cambios que tienen lugar en los niveles citoplasmáticos de este catión divalente. En nuestro caso la cepa salvaje JA100 transformada con el plásmido pEV11-

AEQ (Batiza *et al.* 1996) e incubada con coelenterazina, fue sometida a estrés alcalino mediante la adición directa de KOH hasta pH 8.1. Como control positivo añadimos CaCl_2 a una concentración final de 0.2 M y como control negativo añadimos KCl a la misma concentración que el KOH.

Mediante este tipo de ensayos se demostró que efectivamente el tratamiento con pH alcalino daba lugar a un incremento transitorio en los niveles de calcio citoplasmáticos con una señal máxima entre 10-15 segundos y una recuperación de los niveles basales en el primer minuto (figura 15). El tratamiento con KCl no era capaz de desencadenar dicha respuesta mientras que el tratamiento con cloruro cálcico provocaba un pico de calcio citoplasmático a los pocos segundos, de cinética similar al obtenido tras choque alcalino aunque bastante más pronunciado. En ensayos con otra cepa salvaje, denominada DBY746, el pico de calcio generado en respuesta a pH alcalino era particularmente intenso, llegando incluso a superar el obtenido por cloruro cálcico. Por ello seleccionamos dicha cepa para subsiguientes ensayos. El efecto del pH alcalino sobre el calcio citoplasmático tiene un comportamiento dependiente de la dosis, tal y como se aprecia en la figura 1B del artículo 2. Dicho incremento empieza a ser notable a pH 7.5 y tiene su máximo a pH 8.2.

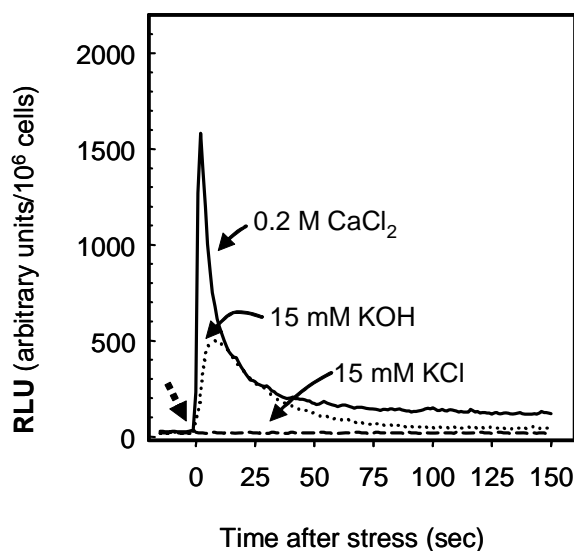


Figura 15. Determinación de los niveles de calcio citoplasmático en respuesta a estrés alcalino. Se representa la medida relativa de calcio citoplasmático (expresada como unidades relativas de luminiscencia por segundo y millón de células) de células transformadas con el plásmido pEV11-AEQ, incubadas con coelenterazina y sometidas a diferentes tratamientos. Los tratamientos realizados son: 0.2 M de CaCl_2 (línea continua), 15 mM de KOH (línea de puntos) o 15 mM de KCl (línea discontinua). La flecha discontinua indica el momento en el que se inició el tratamiento.

Estos resultados demostraban que el estrés alcalino desencadena un incremento rápido, intenso y transitorio del nivel de calcio citoplasmático. Un incremento en este parámetro tiene también lugar en diferentes situaciones como en presencia de feromonas, de esfingosina, tras un incremento en la concentración de glucosa, choque hipotónico o por varios estreses como el salino (altas concentraciones de sodio) o el de retículo endoplásmico. La cinética de la respuesta varía en función del tipo de estímulo. En el caso de choque hipotónico y estrés salino el incremento de calcio citoplasmático es rápido y transitorio, y es similar al observado para estrés alcalino. En cambio, en la respuesta a incrementos en los niveles de glucosa o por exposición a esfingosina, por ejemplo, la respuesta es más lenta y más prolongada (Batiza *et al.* 1996; Denis and Cyert 2002; Matsumoto *et al.* 2002; Tokes-Fuzesi *et al.* 2002; Hilioti *et al.* 2004).

Contrariamente a lo que se podría pensar, no existe relación entre la procedencia del calcio y su cinética de aparición en citoplasma. Por ejemplo, aunque en ambos casos el calcio tiene origen extracelular, existen diferencias en la cinética de acumulación de calcio citoplasmático por estrés hiposmótico y por adición al medio de glucosa. Por otro lado las respuestas a estrés salino y a estrés hipotónico son ambas rápidas y transitorias y, sin embargo, en el primer caso el calcio procede, al menos en parte, de compartimentos intracelulares mientras que en el segundo procede del exterior (Batiza *et al.* 1996; Denis and Cyert 2002; Matsumoto *et al.* 2002). Es por ello que se hacía necesario determinar el origen del calcio que es transportado al compartimento citoplasmático en el caso del estrés alcalino. Para ello analizamos los cambios en los niveles de calcio citoplasmático tras choque alcalino en mutantes defectivos en diferentes sistemas de transporte de calcio conocidos en levadura o en presencia del quelante de cationes divalentes EGTA. Tal y como se demuestra en la figura 16, el incremento de calcio provocado por choque alcalino se anulaba en mutantes defectivos en Cch1 o Mid1, componentes del canal de calcio de la membrana plasmática responsable de importar calcio desde el medio extracelular. Por el contrario, la falta de Yvc1, implicado en el transporte de calcio desde la vacuola, no producía efecto alguno. Asimismo, la presencia de EGTA en el medio también eliminaba completamente dicha respuesta, lo cual confirmaba el origen extracelular del calcio que se acumula en citoplasma tras choque alcalino. Así pues, la alcalinización del medio desencadena un proceso de entrada de calcio desde el compartimento extracelular.

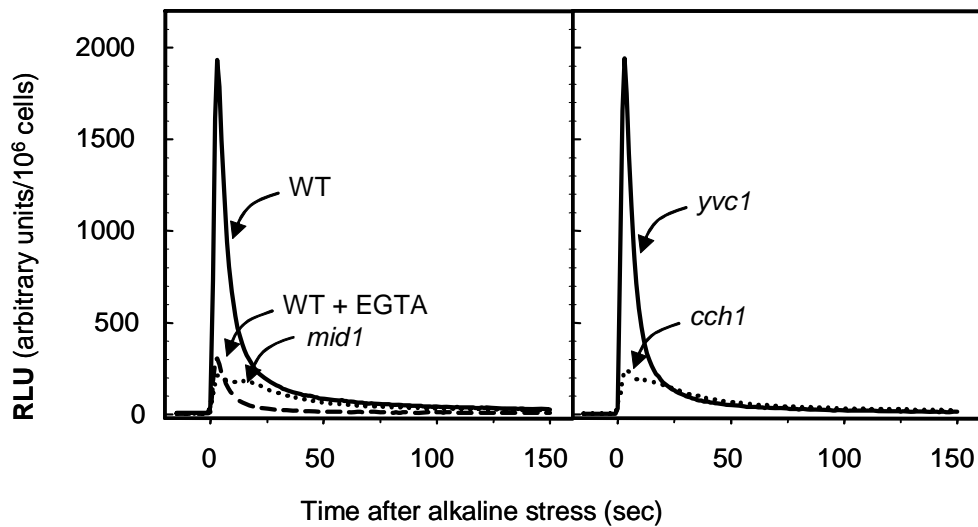


Figura 16. Medida de los cambios en la concentración de calcio citoplasmático en mutantes relacionados con la homeostasis de calcio. Se muestran las variaciones en los niveles intracelulares de calcio tras choque alcalino (15 mM de KOH) de células salvajes y de mutantes *mid1*, *cch1* y *yvc1*. Donde se indica se ha añadido EGTA a una concentración final de 10 mM.

Dado que el pH alcalino produce un incremento en el nivel de calcio citoplasmático se esperaría que esto fuera precisamente lo que desencadenase la activación de la calcineurina y la respuesta transcripcional mediada por dicha fosfatasa. Teníamos ciertas evidencias indirectas de que esto era lo que sucedía ya que, en cuanto a la cinética y a la dependencia de dosis, el incremento de los niveles de calcio citoplasmático producido por pH alcalino correlaciona perfectamente con la respuesta transcripcional de los genes *PHO89* y *ENA1* a este tipo de estrés (tabla 1; figuras 1 y 2 del artículo 1). Para validar la hipótesis utilizamos mutantes *cch1*, *mid1* y *yvc1* en presencia o ausencia de EGTA y evaluamos la respuesta a pH alcalino de los diferentes sistemas *reporters* basados en la expresión de *LacZ* anteriormente descritos: pAMS366 (con cuatro copias del elemento CDRE de *FKS2*), pPHO89 (con el promotor entero de *PHO89*) y pMRK212 (con la región ARR1 que contiene el CDRE de *ENA1*) (ver figura 3 del artículo 2). En el caso del mutante *yvc1* la respuesta a pH alcalino se mantenía en todos los casos mientras que dicha respuesta se perdía totalmente (para pAMS366) o casi totalmente (en pPHO89 y pMRK212) en presencia de EGTA o en los mutantes defectivos en cualquiera de los dos componentes del canal de calcio de membrana (mutantes *cch1* o *mid1*). Este resultado indicaba que la calcineurina se activa a causa del incremento de calcio citoplasmático que provoca el choque alcalino y confirmaba que el

origen de dicho calcio es extracelular. Cabe señalar que la expresión residual en pPHO89 y pMRK212 puede deberse a la existencia de otras vías de regulación implicadas en su respuesta a pH alcalino, como la vía de respuesta a déficit de fosfato en el caso de pPHO89 o la vía de Rim101 en el caso de pMRK212 (tal y como se discutía en 3.2.1).

Esencialmente, todos estos últimos resultados indicaban que el estrés alcalino provoca una entrada de calcio de origen extracelular dando lugar a un incremento en los niveles de este catión y que esto desencadena una respuesta transcripcional mediada por la vía de la calcineurina.

3.2.5. Papel de la calcineurina en la respuesta a estrés alcalino.

Los resultados que se han expuesto en el apartado 3.2. nos permitían afirmar que la vía de la calcineurina se activa en respuesta a estrés alcalino. Es más, la calcineurina es imprescindible para el crecimiento en condiciones alcalinas ya que mutantes defectivos en *Cnb1* no son capaces de crecer en un medio alcalino (Mendoza *et al.* 1994; Alepuz *et al.* 1996). Sin embargo, no sabíamos cuál era el papel de la fosfatasa ante este tipo de estrés.

Hasta el momento teníamos evidencias de que la calcineurina actuaba regulando la respuesta a pH alcalino de *PHO89* y *ENA1*. Para evaluar hasta qué punto la calcineurina estaba implicada en la respuesta transcripcional global a este tipo de estrés, se realizó en el laboratorio un análisis comparativo del perfil transcripcional a pH alcalino de una cepa salvaje y de una cepa defectiva en calcineurina o en el factor de transcripción *Crz1* (Viladevall *et al.* 2004). En dicho análisis se demostró que, entre los genes inducidos por este tipo de estrés, aproximadamente un 10 % presentaban una respuesta dependiente de calcineurina, y que, de éstos últimos, el 78 % también dependían del factor de transcripción *Crz1*. Estos datos sugerían que la calcineurina es un componente significativo en la respuesta transcripcional a pH alcalino, y que este papel lo desempeña principalmente a través de *Crz1*. Sin embargo, el papel transcripcional de calcineurina a través de *Crz1* no justifica el fenotipo de sensibilidad a pH alcalino del mutante *cnb1* ya que la delección del factor de transcripción *Crz1* no afecta al crecimiento en condiciones alcalinas (Stathopoulos and Cyert 1997), o lo hace de forma muy leve (experimentos no mostrados). De esta observación se puede deducir que

la calcineurina ha de tener otras funciones en la resistencia a estrés alcalino al margen de su acción sobre el factor de transcripción Crz1.

Una posibilidad sería que calcineurina regulara la transcripción génica de forma independiente a Crz1. No obstante, sólo otro factor de transcripción, denominado Yap1, ha sido relacionado con calcineurina (Yokoyama *et al.* 2006). Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción Yap1 es inhibido por desfosforilación por dicha fosfatasa pero los únicos efectos conocidos de calcineurina a través de Yap1 están relacionados con el ciclo celular. Otra proteína relacionada con ciclo y regulada directamente por calcineurina es Hsl1 (Mizunuma *et al.* 2001). De hecho, el papel de calcineurina sobre ambas es producir una parada de ciclo entre las fases G2 y M y quizá esta acción sobre ciclo, que es exclusiva de calcineurina y no de Crz1, sea imprescindible en la resistencia a estrés alcalino.

Es importante considerar que la calcineurina también está implicada en la regulación del transporte de potasio a través de los transportadores de alta afinidad Trk1 y 2. El papel que se le ha atribuido sobre estos transportadores es que, en respuesta a estrés salino por altas concentraciones de sodio, la fosfatasa propicia que aumente la afinidad de los Trks por potasio impidiendo que importen sodio (Mendoza *et al.* 1994). Además se ha observado que un mutante *cnb1* necesita más potasio para vivir que una cepa salvaje (experimentos en colaboración con el Dr. J. Ramos de la Universidad de Córdoba) y esto sugiere que la falta de calcineurina provoca una disminución en la concentración de potasio intracelular probablemente debida a un decremento de su transporte vía Trks. Así como la hiperactivación de Trks provoca una alcalinización intracelular (Yenush *et al.* 2002), la actividad reducida de estos transportadores en el mutante *cnb1* podría dar lugar a una acidificación intracelular. Esta hipotética acidificación debería conceder a una cepa *cnb1* tolerancia a estrés alcalino y, como esto es justo lo contrario de lo que sucede, podemos descartar que su sensibilidad a estrés alcalino sea debida a la función de calcineurina sobre los transportadores de potasio.

Por último, hemos observado que la sensibilidad pH alcalino del mutante *cnb1* desaparece en presencia del estabilizador osmótico sorbitol, utilizado comúnmente para evitar la lisis celular debida a daños en la pared celular (resultados no mostrados). Esto nos hace suponer que la calcineurina, en respuesta a estrés alcalino, tiene una función de protección de pared celular y, de hecho, existen precedentes que sugieren la

implicación a nivel transcripcional de calcineurina en respuesta a estrés de pared. Por ejemplo, estudios recientes de microarrays han determinado que bastantes de los genes inducidos por diversos daños a pared presentan secuencias de unión al factor de transcripción Crz1 (García *et al.* 2004). Además, en el caso particular del gen *FKS2*, que codifica la glucano sintasa, se había descrito que su transcripción se regula de forma dual por calcineurina y Pkc1, una quinasa importante en de la vía de la integridad celular (Zhao *et al.* 1998). Sin embargo, los datos existentes únicamente relacionan a calcineurina con la función de la pared a través de su papel sobre Crz1 y esto deja sin explicar por qué el mutante *cnb1* no puede sobrevivir a pH alcalino y el mutante *crz1* sí.

3.3. Identificación de genes cuya delección confiere sensibilidad a estrés alcalino.

Los experimentos descritos hasta el momento indicaban que existen múltiples vías de señalización implicadas en la respuesta a pH alcalino. Con el objetivo de caracterizar estos mecanismos recurrimos a una segunda aproximación experimental que complementaba los resultados obtenidos mediante el análisis por microarrays. Se trata del análisis de la sensibilidad a estrés alcalino de una colección de 4825 mutantes haploides en la cual cada mutante se corresponde con la delección de un único gen de *S. cerevisiae* (evidentemente genes no esenciales).

Para ello analizamos el crecimiento de los mutantes durante 48 h en diferentes condiciones de pH: 6.2 (control), 7.2 y 7.5 en placas de medio sólido. Este primer análisis permitió obtener más de 300 clones cuyo crecimiento se veía afectado en condiciones alcalinas. Un estudio más detallado, en un rango de pHs más fino (6.2, 6.8, 7.2, 7.3 y 7.5) redujo esta lista a 118 genes. En la tabla 2 se muestra el listado de estos genes clasificados por categorías funcionales y en el que se especifica su grado de sensibilidad (ver detalles en el pie de tabla).

Los genes identificados están relacionados con múltiples procesos celulares y cabe destacar los relacionados con la organización y biogénesis de la vacuola, así como el metabolismo del fosfato y la homeostasis del hierro y el cobre, que se analizarán con más detalle en los subsiguientes apartados. El subgrupo de transporte entre orgánulos también está ampliamente representado, sugiriendo que esta función es imprescindible en la resistencia a este tipo de estrés. También aparecían varios genes relacionados con la construcción y remodelación de la pared celular como *GAS1*, *BEM1*, *BEM4*, *SLT2*, *BCK1* o *RHO4*, lo que supuso el primer indicio de la relación entre el estrés alcalino y la pared celular (que se describirá en 3.4).

La comparación de nuestros datos con los de un análisis similar en el que se identificaron 128 genes hipersensibles a estrés alcalino (Giaever *et al.* 2002) revelaba que únicamente había 20 genes en común. En vista de la escasa correlación entre ellos decidimos seleccionar los mutantes con mayor sensibilidad identificados por Giaever y colaboradores y recomprobar su fenotipo. Sólo 8 de los 41 mutantes analizados presentaban sensibilidad a pH alcalino en nuestras condiciones, cinco de los cuales ya

habían sido identificados en nuestro ensayo y los otros tres (*ymr073c*, *ymr099c* y *kre1*) tenían un fenotipo tan leve que en su momento nos llevó a descartarlos. Otro hecho destacable es que en el listado de Giaever y colaboradores no aparecieran muchos de los mutantes defectivos en alguna subunidad de la ATPasa vacuolar, a pesar de que se habían descrito previamente como sensibles a pH alcalino y que presentaban un fenotipo muy intenso en nuestro estudio.

Function	Alkaline pH sensitive mutants
Vacuole organization and biogenesis	<i>CUP5</i> (1), <i>TFP1</i> (1), <i>VMA2</i> (1), <i>VMA22</i> (1), <i>VMA4</i> (1), <i>VMA5</i> (1), <i>VMA6</i> (1), <i>VMA7</i> (1), <i>CWH36</i> (1), <i>VMA21</i> (2), <i>PEP3</i> (3), <i>PEP5</i> (2), <i>PPA1</i> (2), <i>TFP3</i> (2), <i>VMA13</i> (2), <i>VPS16</i> (2), <i>VPS33</i> (2), <i>VPS34</i> (2), <i>ARP5</i> (3), <i>VPS15</i> (3), <i>FAB1</i> (4), <i>PEP7</i> (4), <i>VMA8</i> (4), <i>VPS65</i> (5)
Transport in other organelles	<i>GCS1</i> (3), <i>SEC22</i> (3), <i>DRS2</i> (3), <i>VPS20</i> (4), <i>GLO3</i> (4), <i>COG8</i> (4), <i>SYS1</i> (4)
Metal ion homeostasis	<i>CTR1</i> (1), <i>RCS1</i> (1), <i>SOD1</i> (1), <i>LYS7</i> (2), <i>SOD2</i> (2), <i>CCC2</i> (4), <i>FET3</i> (4), <i>PMR1</i> (4)
Metabolism	
Aminoacid metabolism	<i>GLY1</i> (1), <i>PHO2</i> (1), <i>PRO1</i> (1), <i>CYS3</i> (3), <i>ARO2</i> (4), <i>ILV1</i> (4), <i>TYR1</i> (5)
Lipid metabolism	<i>ERG2</i> (2), <i>ERG6</i> (2), <i>ARV1</i> (3), <i>BTS1</i> (3), <i>AGP2</i> (4), <i>DAP1</i> (4), <i>FEN1</i> (4), <i>MGA2</i> (4)
Phosphate metabolism	<i>PHO4</i> (2), <i>PHO81</i> (2), <i>PHO85</i> (3)
Protein biosynthesis	<i>TEF4</i> (3), <i>FES1</i> (4), <i>HCR1</i> (4), <i>RPL13B</i> (4), <i>RPL27A</i> (4)
Cell polarity, cell wall organization and biogenesis	<i>RHO4</i> (1), <i>BUD25</i> (1), <i>BEM1</i> (2), <i>GAS1</i> (2), <i>SLT2</i> (2), <i>BCK1</i> (3), <i>BEM4</i> (4), <i>CNB1</i> (5)
Chromatin modification, architecture and transcription	<i>SWI3</i> (1), <i>BUR2</i> (3), <i>DAL81</i> (3), <i>GCN5</i> (3), <i>HTZ1</i> (3), <i>REF2</i> (3), <i>REG1</i> (3), <i>RPB9</i> (3), <i>SPT20</i> (3), <i>SSN8</i> (3), <i>UME6</i> (3), <i>ADA2</i> (4), <i>KEM1</i> (4), <i>MED2</i> (4), <i>SPC72</i> (4), <i>SRB5</i> (4), <i>SWI4</i> (4), <i>TOP1</i> (4), <i>MRS1</i> (5)
Others	<i>PHO86</i> (1), <i>KEX2</i> (1), <i>RIB4</i> (1), <i>DIA2</i> (2), <i>SPS1</i> (2), <i>FYV6</i> (3), <i>MAP1</i> (3), <i>TPD3</i> (3), <i>ADE12</i> (4), <i>ATP1</i> (4), <i>ATP11</i> (4), <i>NEM1</i> (4), <i>PTC1</i> (4), <i>URE2</i> (4), <i>ZWF1</i> (4), <i>COX16</i> (5), <i>RIB1</i> (5), <i>SCP160</i> (5)
Unknown	<i>YELO45C</i> (1), <i>YKL118W</i> (1), <i>YOR331C</i> (1), <i>YJL175W</i> (3), <i>HUR1</i> (4), <i>ILM1</i> (4), <i>PKR1</i> (4), <i>YJR358C</i> (4), <i>YJR018W</i> (5), <i>YOR251C</i> (5), <i>YOR305W</i> (5)

Tabla 2. Clasificación funcional de los genes cuya delección provoca un defecto de crecimiento en condiciones alcalinas. Los números en paréntesis indican el nivel de sensibilidad a estrés alcalino (1 indica la mayor sensibilidad y 5 la menor sensibilidad). En negrita aparecen los genes que también han sido identificados por Giaever y colaboradores (Giaever *et al.* 2002).

Las aparentes discrepancias entre los resultados pueden deberse a las diferencias experimentales entre ambos ensayos. Por ejemplo, las condiciones de cultivo son sustancialmente diferentes ya que nosotros utilizamos como máximo pH 7.5 en medio sólido tamponado con 50 mM TAPS mientras que Giaever y colaboradores

realizaron el ensayo en medio líquido a pH 8.0 tamponado con 10 mM Tris. El tiempo de incubación de los cultivos también era diferente ya que en nuestras condiciones analizamos el crecimiento después de 48 h y en las suyas se incubó el cultivo durante 5 o 15 generaciones (lo que aproximadamente equivaldría a 10 o 30 h respectivamente). Otra diferencia fue el método para medir la sensibilidad de cada mutante. Nosotros realizamos una evaluación visual del crecimiento de cada uno de los clones en las diferentes condiciones mientras que Giaever y colaboradores utilizaron una estrategia más compleja. En su caso partían de un cultivo compuesto por cantidades iguales de cada una de las cepas de la biblioteca, lo sometían a estrés alcalino y determinaban, a partir de DNA extraído del cultivo, la tasa de crecimiento de cada mutante mediante la cuantificación relativa por microarrays de la abundancia del número de copias de una secuencia génica exclusiva de cada mutación (para una descripción más detallada del método consultar Giaever *et al.* 2002). En consecuencia, los métodos son claramente diferentes y las limitaciones de cada uno se reflejan en los resultados. Por ejemplo, nuestro ensayo es menos sensible porque pequeños cambios en el crecimiento no son percibidos visualmente en un estudio a gran escala mientras que, en el análisis realizado por Giaever y colaboradores, pueden pasar desapercibidos aquellos mutantes con crecimiento más lento ya que están menos representados en el cultivo original. Por lo tanto, los datos obtenidos mediante ambos ensayos son seguramente complementarios. De hecho búsquedas específicas posteriores utilizando métodos más precisos nos han permitido complementar nuestro listado con mutantes que ya habían sido descritos como sensibles por Giaever y colaboradores.

3.3.1. La función vacuolar es imprescindible para el crecimiento en condiciones alcalinas.

Entre los genes identificados en nuestro análisis de mutantes sensibles a pH alcalino, el grupo más numeroso es el formado por los genes implicados en la organización y la biosíntesis de la vacuola. La sensibilidad a pH alcalino de muchos de estos mutantes ya se había descrito anteriormente, lo que apoya la validez del ensayo (Nelson and Nelson 1990). Este fenotipo es debido a que mutantes relacionados con la ATPasa vacuolar no pueden acidificar la vacuola a través de esta bomba y, en condiciones alcalinas, tampoco pueden hacerlo por endocitosis o por difusión pasiva de ácidos (Kane 2006).

El efecto de la delección de algunos otros genes puede ser igualmente explicada por defectos en la función vacuolar. Por ejemplo, mutaciones en la vía de biosíntesis del ergosterol como *erg2*, *erg6* o *arv1* pueden afectar la endocitosis y la función vacuolar (Heese-Peck *et al.* 2002; Swain *et al.* 2002). Las mutaciones de *ARV1* y *FEN1* afectan el metabolismo de los esfingolípidos, los cuales son necesarios para que el componente V1 de la ATPasa vacuolar sea funcional (Chung *et al.* 2003). Además, la mutación de genes implicados en el *sorting* vacuolar (genes VPS) produce uno de los efectos más fuertes en condiciones alcalinas, lo que indica que el tráfico entre membranas tiene un importante papel en resistencia a condiciones alcalinas.

En una publicación reciente se describe la existencia de una relación entre algunos genes *VPS* y la vía de Rim101 (Boysen and Mitchell 2006) y se muestra que, en concreto, la mutación de genes como *VPS4*, *VPS20*, *VPS23* y *VPS25* impide la localización de Rim20 en el endosoma impidiendo a su vez la activación de Rim101. Esta podría ser la causa de que, por ejemplo, el mutante *vps20* apareciera en nuestro análisis como sensible a pH alcalino. Sin embargo, el hecho de que dicha mutación confiera una mayor sensibilidad a pH alcalino que la delección de *RIM101*, sugiere que la función de Vps20 en la tolerancia a este estrés no se limita a su papel en la vía Rim101.

3.3.2. La alcalinidad medioambiental provoca una mimetiza una situación de escasez de fosfato.

Otra de las familias de genes identificadas en nuestro análisis de mutantes está relacionada con el metabolismo del fosfato. Los mutantes *pho2*, *pho4*, *pho81*, *pho85* y *pho86*, son sensibles en menor o mayor medida a este tipo de estrés. Los mutantes sencillos *pho84* y *pho89* en cambio no lo son, pero el doble mutante defectivo en ambos transportadores es incapaz de crecer incluso a pH 6.8 (figura 17).

En lo referente a la relación entre el estrés alcalino y el metabolismo del fosfato hemos acumulado numerosas evidencias que indican que: 1) parte de la respuesta transcripcional a estrés alcalino está dirigida a mejorar la captación de fosfato, 2) esta respuesta se basa en la misma vía que se activa en condiciones de escasez de este metabolito y 3) los elementos implicados en dicha vía de señalización, así como los transportadores de alta afinidad para este metabolito, son esenciales para la

supervivencia en condiciones alcalinas. Todo ello lleva a considerar que la alcalinización del medio extracelular está generando una situación de escasez de fósforo.

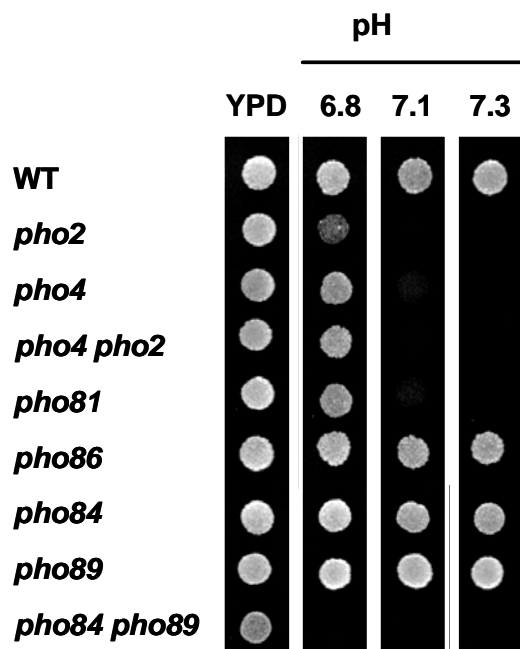


Figura 17. Sensibilidad a pH alcalino de mutantes defectivos en varios de los elementos implicados en la homeostasis de fósforo. Crecimiento a las 48 h de cultivos de la cepa salvaje DBY746 y los mutantes isogénicos indicados en medio sólido YPD o YPD 50 mM TAPS ajustado al pH indicado.

Una posible explicación de que el pH alcalino provoque una deficiencia de fósforo se basa en las propiedades químicas de este anión. La alcalinización extracelular podría desplazar el equilibrio ácido-base y disminuir la proporción de fósforo en forma $H_2PO_4^-$, que parece ser la forma transportada al interior celular (Goodman and Rothstein 1957). Sin embargo, la vía del fósforo se activa incluso a pHs relativamente bajos como se deduce de la observación de que *PHO84* empieza a inducirse ya a pH 6.2 con una expresión máxima a partir de pH 7.0 (figura 2 del artículo 1).

Otra posible explicación sería que el transporte de fósforo a través de Pho84 esté disminuido en condiciones alcalinas debido a las propiedades cinéticas de dicho transportador, ya que Pho84 es el principal responsable del transporte de alta afinidad de fósforo en condiciones basales y, como hemos mencionado en la introducción, su máxima actividad tiene lugar a pH ácido. La hipótesis sería que la alcalinización extracelular produciría una disminución en la velocidad de captación de fósforo por Pho84 que sería compensada por un incremento en la expresión de Pho84 y de Pho89, el otro transportador de fósforo de alta afinidad, que es más activo en condiciones alcalinas.

Por otro lado hemos observado que la activación de la vía del fosfato es un evento tardío en la respuesta a pH alcalino. Se ha demostrado que ante la alcalinización del medio extracelular se produce una rápida disminución en los niveles de polifosfatos que son degradados a ácido tripolifosfórico lo que, debido a un incremento en la producción de protones, contribuye a la neutralización del medio (Castro *et al.* 1995). Se ha observado que los niveles de polifosfato son restaurados posteriormente y nos planteamos que quizá la activación de la vía del fosfato por pH alcalino sea una forma de estimular el importe de fosfato desde el exterior para restablecer la homeostasis de fosfato intracelular. Esta teoría concuerda con que, en respuesta a estrés alcalino, se active la transcripción de algunos genes relacionados con la síntesis de polifosfatos como *VTC3* o *VTC4*.

3.3.3. La disponibilidad de hierro y cobre es un factor limitante para el crecimiento de *S. cerevisiae* en medio alcalino.

En nuestro análisis también detectamos un grupo de mutantes defectivos en genes relacionados con diferentes aspectos del metabolismo de los metales hierro y cobre. Entre ellos se identificaron *FET3* y *CTR1*, implicados en la captación extracelular de hierro y cobre respectivamente, *LYS7* y *CCC2*, que son intercambiadores intracelulares de cobre, el factor de transcripción implicado en la respuesta a escasez de hierro *RCS1/AFT1* o la superóxido dismutasa dependiente de cobre *SOD1*.

Dada la importancia que la homeostasis de estos metales parecía tener en la supervivencia a pH alcalino, decidimos analizar una amplia colección de mutantes defectivos en genes relevantes en estos procesos. En la figura 18 se muestran los fenotipos de sensibilidad a pH alcalino de todos ellos. De esta manera, aunque inicialmente desapercibidos, determinamos que los mutantes *ptr1* y *fet4*, implicados en el transporte de hierro y de hierro y cobre respectivamente, también presentan una cierta sensibilidad ante este estímulo. Aunque no se muestra, el mutante *mac1*, defectivo en el factor de transcripción responsable de la respuesta a falta de cobre, también presenta esta característica. En este punto cabe destacar que los fenotipos más severos son los que tienen lugar en mutantes *ctr1*, *rsc1*, *sod1*, *lys7* y *mac1*.

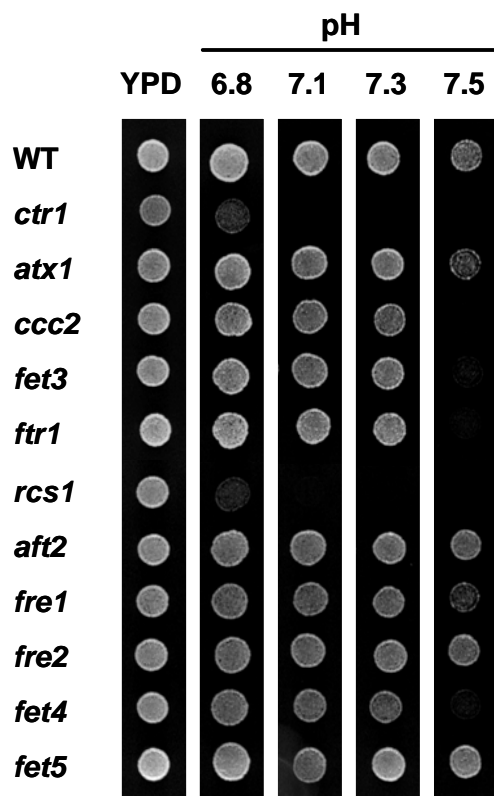


Figura 18. Fenotipo de sensibilidad a pH alcalino de mutantes defectivos en varios de los elementos implicados en el metabolismo del hierro y el cobre. Se analizó el crecimiento a las 48h de la cepa salvaje BY4741 y los mutantes isogénicos indicados en medio sólido YPD o YPD 50 mM TAPS ajustado a los pHs indicados.

El análisis transcripcional de la respuesta a pH alcalino revela que muchos de los genes relacionados con la homeostasis de estos metales como *FET3*, *FRE1*, *FIT2*, *ISU1*, *ARN1-3* o *CTR1* se inducen ante este tipo de estrés (tabla 1; Viladevall *et al.* 2004; Lamb *et al.* 2002). Esto señalaba la posibilidad de que, de forma similar a lo que sucede con el fosfato, la disponibilidad de los metales hierro y cobre también estuviera disminuida en condiciones alcalinas. En este caso, la situación de deficiencia de hierro y cobre podría ser atribuida a la menor solubilidad que ambos metales presentan a pH alcalino. De hecho, en nuestro laboratorio se han llevado a cabo experimentos que demuestran que el hierro y el cobre son los factores limitantes para el crecimiento de *S. cerevisiae* en un medio alcalino y que la simple adición al medio de cobre y/o hierro mejora sustancialmente la resistencia a estrés alcalino (Serrano *et al.* 2004). Además, en el mismo trabajo, se realizó un análisis para identificar genes que en multicopia mejoraran la tolerancia a pH alcalino de una cepa salvaje y únicamente se identificaron dos genes con esta capacidad: *FET4* y *CTR1*, que codifican, respectivamente, un transportador de hierro y cobre y el transportador de cobre de alta afinidad. Al parecer, la función en la captación de cobre constituía el elemento en común entre ambos, sugiriendo que la disponibilidad de cobre estaba alterada en condiciones alcalinas. Sin embargo, la sobreexpresión de

CTR1 no suprimía la sensibilidad a pH alcalino del mutante *fet3*, defectivo en el transportador de alta afinidad de hierro, y esto indicaba que la tolerancia a pH alcalino conferida por sobreexpresión de *CTR1* es debida a la correcta maduración de Fet3 (que requiere cobre), sugiriendo que el papel del cobre en la tolerancia a estrés alcalino es mejorar la captación de hierro.

3.3.4. La exposición a elevado pH da lugar a estrés oxidativo.

Una serie de evidencias nos permitieron plantearnos que la exposición a pH alcalino generaba una situación de estrés oxidativo. En primer lugar, la alcalinización extracelular provocaba la activación transcripcional de un número importante de genes relacionados funcionalmente con el estrés oxidativo como *SOD1*, *CCP1*, *GRX2*, *TRR1*, *UGA2*, *GRX1*, *HSP12*, *TRX2*, *MCR1*, *GAD1*, *GRE2* o *PRX1* (tabla1; Viladevall *et al.* 2004). Además, encontramos una serie de mutantes, especialmente sensibles a estrés alcalino, relacionados con los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo: *sod1*, defectivo en la superóxido dismutasa citoplasmática dependiente de cobre, *sod2*, defectivo en la superóxido dismutasa mitocondrial dependiente de manganeso y *lys7*, defectivo en la chaperona que le proporciona cobre a Sod1. Por último, la sensibilidad del mutante *ctr1*, que era similar a la del mutante *sod1*, no se recuperaba por la adición de hierro al medio, indicando que en la resistencia a estrés alcalino el cobre tenía otras funciones, además de asegurar una correcta captación de hierro, que podrían estar relacionadas con la presencia de Sod1 funcional (Serrano *et al.* 2004).

El estrés oxidativo genera lo que se denomina especies reactivas de oxígeno (ROS) así que, en primer lugar, procedimos a analizar la presencia de ROS intracelulares en células sometidas a estrés alcalino. Para ello utilizamos un compuesto denominado dihidrorodamina 123 (DHR123) que, en presencia de ROS, es oxidado y da lugar a un compuesto fluorescente. Se incubaron con DHR123 cultivos de células salvajes de la cepa DBY476 y posteriormente se las sometió a estrés alcalino. El análisis microscópico revelaba que después de 30 o 60 min de tratamiento alcalino, un 12 % de la población celular presentaba fluorescencia, indicando que la alcalinización medioambiental era efectivamente capaz de generar una situación de estrés oxidativo (figura 19A).

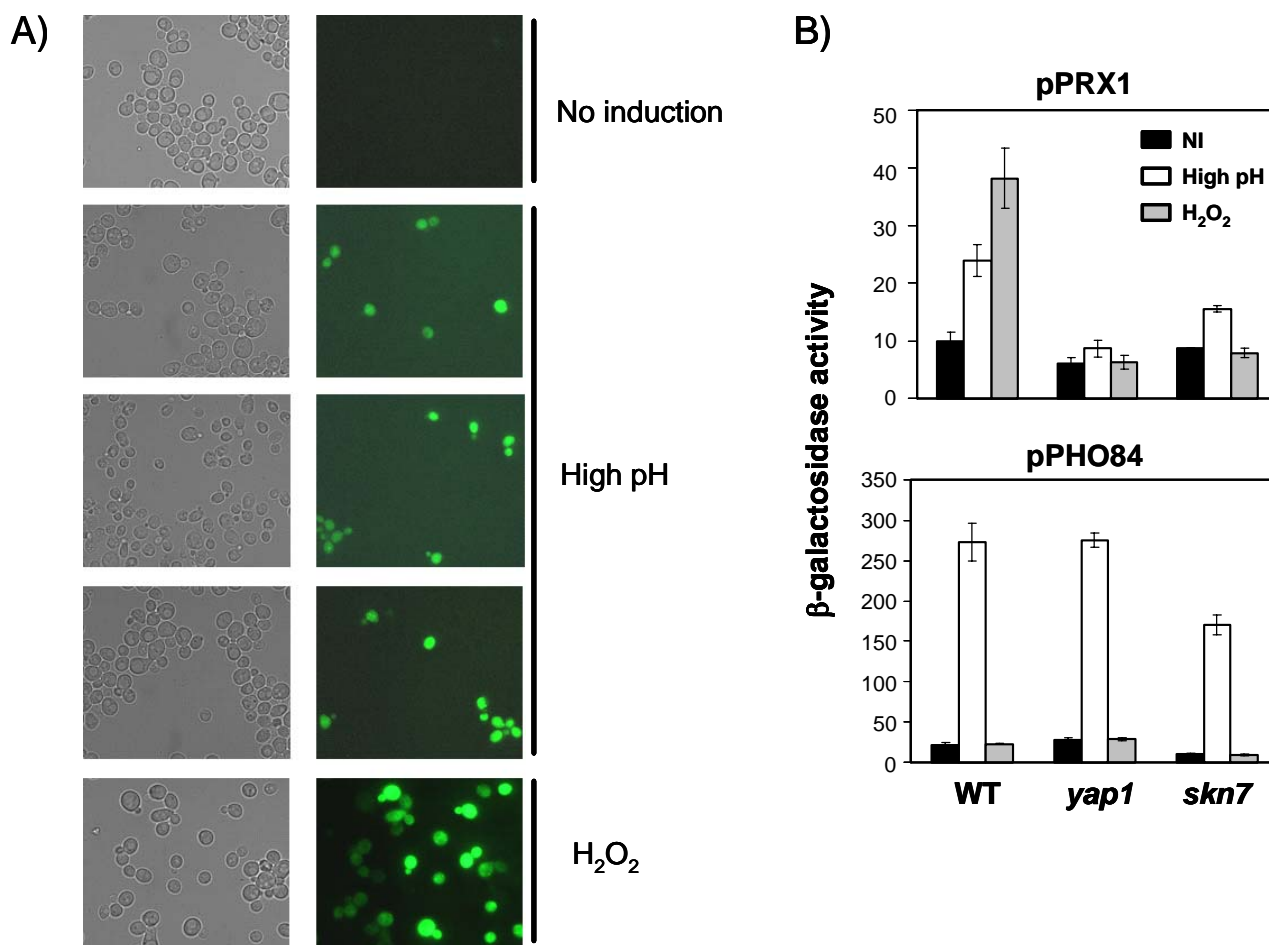


Figura 19. Análisis de la oxidación producida por estrés alcalino. **A.** Se incubaron células de la cepa salvaje DBY746 con DHR123 y se les añadió 30 mM de KOH para obtener un pH de 8.1 (High pH) o 2 mM de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) durante 30 min y 90 min respectivamente. **B.** Se transformó la cepa salvaje BY4741 y los mutantes *yap1* y *skn7* con los plásmidos *reporters* pPRX1 y pPHO84. Se muestra la actividad β -galactosidasa (expresada como la media \pm ESM de tres experimentos independientes) de células en condiciones basales, sometidas a pH alcalino (pH 8.0) o a estrés oxidativo (0.25 mM H₂O₂).

Por otro lado, si la hipótesis de que el pH alcalino produce estrés oxidativo es cierta, la inducción por pH alcalino debería activar la expresión de ciertos genes, cuya respuesta es típica de estrés oxidativo, de forma dependiente a los factores de transcripción responsables de la respuesta a estrés oxidativo Yap1 y/o Skn7. A modo de ejemplo, y mediante un sistema *reporter* basado en la fusión de su promotor a *LacZ*, examinamos la respuesta a pH alcalino del gen *PRX1*, que codifica una peroxiredoxina con actividad tioredoxina peroxidasa y que está inducido por estrés oxidativo y alcalino (figura 19B). Así determinamos que la activación de *PRX1*, tanto por pH alcalino como por peróxido de hidrógeno, era eliminada en un mutante *yap1* y casi totalmente en pH alcalino o totalmente por H₂O₂ en un mutante *skn7*. Aunque no se muestra, los factores

de transcripción de respuesta a estrés general Msn2 y Msn4 no están implicados en la respuesta de *PRX1* a pH alcalino. En cambio, en el caso de *PHO84*, como cabría esperar de un gen cuya expresión es totalmente independiente de estrés oxidativo, su respuesta a pH alcalino no depende de los factores de transcripción implicados en la respuesta oxidativa.

Ambos resultados demostraban que parte de los efectos fenotípicos y transcripcionales que conlleva la exposición a pH alcalino podrían ser el resultado de una situación de estrés oxidativo. Las causas están todavía por identificar aunque una posible explicación tiene que ver con la observación de que el estrés alcalino genera una situación que mimetiza la falta de glucosa (Ruiz *et al.* no publicado). Cuando disminuyen los niveles de glucosa se produce un incremento de la tasa de respiración y, por lo tanto, una mayor producción de ROS de origen mitocondrial. Se puede sustanciar este argumento gracias a la observación de que muchos de los genes implicados tanto en el ciclo de Krebs como en la cadena respiratoria y la síntesis de ATP se inducen a nivel transcripcional tras choque alcalino (Viladevall *et al.* 2004).

3.3.5. Identificación de mutaciones que resultan en sensibilidad al inhibidor de calcineurina FK506.

Las observaciones previas de que la respuesta a pH alcalino da lugar a un incremento en los niveles citoplasmáticos de calcio y de que el mutante *cnb1* es sensible a este tipo de estrés, nos motivó a analizar si existía una correlación entre el grupo de mutantes sensibles a pH alcalino y las mutaciones que provocan una deficiencia del crecimiento debida a ausencia de función calcineurina. Realizamos un análisis de la misma colección de 4825 mutantes en medio líquido en presencia de 1.5 $\mu\text{g/ml}$ del inhibidor de calcineurina FK506. En el primer análisis se seleccionaron un total de 241 mutantes, pero la recomprobación de su fenotipo en presencia de diferentes concentraciones de FK506 (de 0.5 a 2.5 $\mu\text{g/ml}$) nos permitió reducir considerablemente dicho número y obtener un listado final de 48 genes cuya delección daba lugar a problemas de crecimiento en ausencia de actividad calcineurina. En la tabla 2 del artículo 2 se muestra que más de la mitad de los genes identificados están involucrados en la biogénesis y organización de la vacuola, por un lado, y por el otro, en la correcta polarización de la morfología celular y la función de la pared celular. Este último grupo

estaba formado por genes que presentaban una sensibilidad bastante fuerte a FK506 e incluía genes como *FKS1* (que codifica la 1,3- β -glucano sintasa), *GAS1* (una 1,3- β -glucanosiltransferasa) y *KRE6* (necesario para la síntesis de 1,6- β -glucano).

Utilizando la misma biblioteca, en un estudio similar, se identificaron 30 mutantes con problemas de crecimiento en presencia del inhibidor de calcineurina FK506 (Parsons *et al.* 2004). Al comparar los datos de Parsons y colaboradores con los nuestros encontramos únicamente 18 genes en común. La diferencia entre los resultados de ambos análisis puede ser atribuida a diversas variables experimentales. Las diferencias más destacables entre los dos métodos son, por un lado, la concentración de FK506 utilizada (Parsons y colaboradores utilizan una única concentración de FK506 que es 2 $\mu\text{g/ml}$ mientras que nosotros ensayamos la sensibilidad en un rango de concentraciones entre 1 y 2.5 $\mu\text{g/ml}$) y, por otro, el tipo de medio utilizado (Parsons y colaboradores hacen el ensayo en medio sólido y nosotros en líquido). Muchos de los mutantes que sólo están presentes en nuestro listado se corresponden con los que presentaban fenotipos más leves en cuanto a sensibilidad a FK506. Esto sugiere que nuestra aproximación es más sensible posiblemente debido a que hemos utilizado un rango que incluye concentraciones menores de FK506 y a que la medida de la densidad óptica de un cultivo líquido permite detectar diferencias más sutiles. Por otro lado, algunos de los mutantes identificados exclusivamente en el análisis de Parsons y colaboradores presentaban una disminuida tasa de crecimiento en condiciones normales por lo que, debido a que nosotros realizamos el ensayo en medio líquido, no crecieron suficientemente durante el periodo de incubación y fueron descartados.

Lo más interesante de nuestros resultados fue observar que 20 de las mutaciones que conferían sensibilidad a FK506 (lo que representa un 43 % del total) habían sido identificadas también en el análisis de mutantes sensibles a pH alcalino que previamente hemos descrito. Cabe destacar que, si tenemos en cuenta que se han analizado 4825 mutaciones, únicamente se debería haber identificado una mutación en común entre ambos análisis en el caso de que la sensibilidad a FK506 y a pH alcalino fueran eventos totalmente independientes. Así, el gran solapamiento entre los conjuntos de genes identificados en ambas situaciones probablemente refleja la importancia de la calcineurina en la respuesta a pH alcalino.

3.4. El papel de la vía Pkc1/Slt2 de integridad de la pared celular en respuesta a estrés alcalino.

3.4.1. El pH alcalino da lugar a la activación transitoria de la MAPK Slt2.

Tal y como se ha descrito en 3.3., entre los mutantes sensibles a pH alcalino aparecía un número importante de genes relacionados con los procesos de biogénesis y remodelación de la pared celular. La observación de que dos de los miembros de la cascada de la MAPK Slt2, Bck1 y el propio Slt2, fueran altamente sensibles a dicho estrés nos llevó a considerar la relevancia de la vía de la integridad de la pared celular (CWI, por *Cell Wall Integrity*) en la respuesta adaptativa a la alcalinización y por ello procedimos a evaluar con detalle la tolerancia a estrés alcalino del resto de los elementos de la vía.

En la figura 20 se observa que, entre los elementos sensores de la vía, sólo presenta sensibilidad a pH alcalino el mutante defectivo en el sensor Wsc1, y no los mutantes *wsc2*, *wsc3*, *mid2*. Tampoco *mtl1* es sensible a estrés alcalino, aunque en este caso no se muestra el resultado. Sorprende que, a pesar de que su fenotipo es bastante intenso, el mutante *wsc1* no fuera previamente identificado como sensible a pH alcalino, ni en el análisis descrito en este trabajo (tabla 2) ni en el de Giaever y colaboradores (Giaever *et al.* 2002). En cambio, no da lugar a cambios fenotípicos ni la mutación de *ROM2* (no mostrado), que codifica una de las GEFs de Rho1, ni la de *MKK1* o *MKK2*, que codifican las MAPKK de Slt2. Esto es probablemente debido a la redundancia de funciones de Rom1 y Rom2 por un lado y Mkk1 y Mkk2 por el otro. La ausencia del factor de transcripción Rlm1, responsable de la mayor parte de la respuesta transcripcional mediada por Slt2, tampoco genera sensibilidad a estrés alcalino. En cambio, tanto los mutantes defectivos en Swi4 como en Swi6, que forman parte del complejo transcripcional SBF también regulado por Slt2, sí lo presentan. Hemos comparado este perfil fenotípico con el de otros estreses que afectan a la pared como la adición al medio de rojo congo, que interfiere con la quitina de la pared, o el estrés por altas temperaturas (42 °C). El perfil de sensibilidades a rojo congo es similar al del pH alcalino. En el caso de la temperatura además de los mutantes sensibles a pH alcalino, también presentaban sensibilidad los mutantes *wsc2*, *wsc3* y *mid2*.

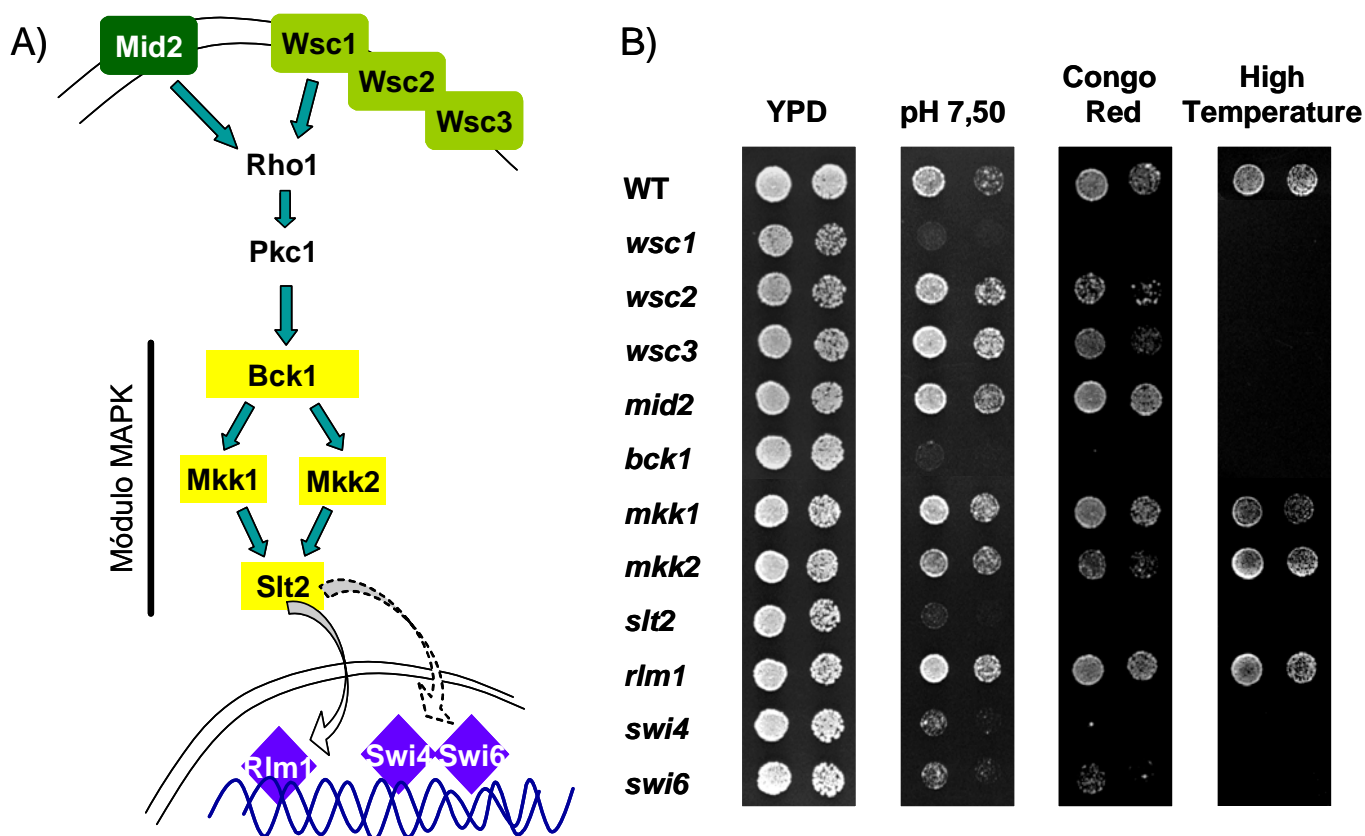


Figura 20. Análisis de la sensibilidad a pH alcalino de mutantes en elementos de la vía CWI. A. Se muestra un esquema de la vía CWI. B. Crecimiento en YPD agar en diferentes condiciones de la cepa salvaje BY4741 y los mutantes isogénicos indicados. Las placas de pH alcalino son YPD Agar 50 mM TAPS al pH indicado, el rojo congo se ha utilizado a una concentración de 100 µg/mL y el estrés por alta temperatura se ha realizado incubando las placas a 42 °C.

Tal y como se muestra en la figura 1 del artículo 3, la presencia del estabilizador osmótico sorbitol en el medio permite a los mutantes *slt2* y *bck1* crecer a pH alcalino como una cepa salvaje. Sin embargo, el resto de mutantes sensibles a estrés alcalino, es decir *wsc1*, *swi4* y *swi6*, siguen siéndolo aún en estas condiciones. Esto mismo sucede en el caso de estrés de pared provocado por rojo congo pero no en el caso de la temperatura donde todos los mutantes sensibles recuperan su capacidad de crecimiento en presencia de sorbitol.

La sensibilidad a pH alcalino conferida por mutaciones en diferentes elementos de la vía CWI que actúan por encima y por debajo de Slf2, nos llevó a considerar la posibilidad de que la vía estuviera activada en condiciones de estrés alcalino y de que su activación fuera importante en la tolerancia. Para validar esta hipótesis, se sometieron células salvajes a choque alcalino y se separaron diferentes alícuotas a tiempos

determinados (0, 5, 10, 15, 30 y 60 min). Extractos proteicos de dichos cultivos fueron fraccionados por electroforesis y se detectó mediante anticuerpos específicos la forma doblemente fosforilada de Slt2 (en los residuos Thr¹⁹⁰ Tyr¹⁹²). Como control, las mismas membranas se incubaron con el anticuerpo que reconoce tanto la forma fosforilada como no fosforilada de Slt2 (Slt2 total). Tal y como se puede apreciar en la figura 21A, la exposición a pH alcalino produce una activación rápida y transitoria de la MAPK Slt2, cuyo máximo se da a los 10-15 min y que empieza a decaer a los 30 min.

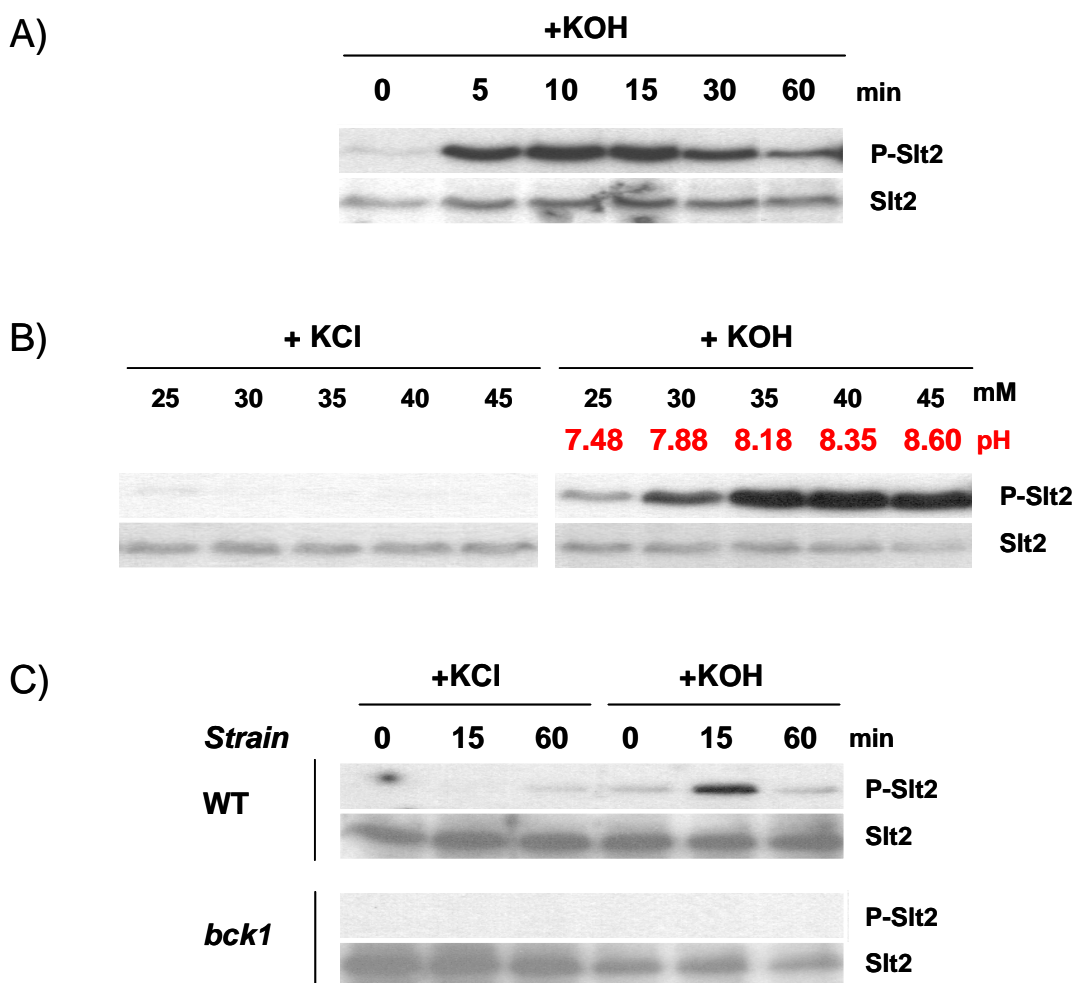


Figura 21. Fosforilación de la MAPK Slt2 en respuesta a estrés alcalino. **A.** Se sometió un cultivo de la cepa salvaje BY4741 a estrés alcalino (añadiendo al medio 35 mM de KOH lo que da lugar a un pH de 8.2) y se recuperaron alícuotas del cultivo a los 0, 5, 10, 15, 30 y 60 min. Las muestras fueron procesadas para inmunoblot para detectar la forma activa de Slt2 (P-Slt2) o Slt2 total (Slt2). **B.** Se expuso durante 15 min un cultivo de BY4741 a diferentes concentraciones de KOH (que se corresponden con los pHs indicados) para la posterior detección de Slt2 activa o total. **C.** La cepa salvaje o el mutante *bck1* fueron expuestos a pH alcalino (pH 8.2) durante los tiempos indicados y se determinó mediante inmunoblot la presencia de Slt2 activa o total.

Mediante experimentos de dosis-respuesta demostramos que la activación de Slt2 ya es notable a pH 7.5, aunque la máxima respuesta tiene lugar a pH en torno a 8.2 (figura 21B). La activación de Slt2 en respuesta a pH alcalino es totalmente dependiente de la integridad de la cascada MAPK ya que la ausencia de Bck1 anula totalmente esta respuesta (figura 21C).

Existen cinco vías MAPK diferentes en *S. cerevisiae* y algunos tipos de estrés son capaces de activar varias de ellas a la vez, tal y como sucede en el estrés por altas temperaturas o el estrés osmótico, que implican a las vías de Hog1 y de Slt2 (Winkler *et al.* 2002; Garcia-Rodriguez *et al.* 2005). En la respuesta a pH alcalino se puede descartar la implicación de las cascadas de las MAPK Fus3, Kss1 y Hog1, que regulan los procesos de apareamiento o *mating*, de invasividad y crecimiento filamentoso, y de respuesta a estrés osmótico, respectivamente. Hemos llegado a esta conclusión a partir de varias observaciones. En primer lugar, los mutantes defectivos en dichas quinasas no conferían sensibilidad a pH alcalino como en el caso de *slt2*. Además hemos corroborado que Kss1 y Fus3 no están fosforiladas en respuesta a estrés alcalino y que *FUS1*, cuya activación transcripcional está mediada por ambas quinasas (Cullen *et al.* 2000), no se induce en condiciones alcalinas (resultados no mostrados). El caso de Kss1 es especialmente destacable ya que también se ha relacionado con el mantenimiento de la integridad celular (Qi and Elion 2005). Por otro lado, hemos demostrado que Hog1 tampoco se activa por alto pH (no mostrado) lo que explica que la expresión del gen *ENA1* en situación de estrés por pH alcalino no depende de la vía de respuesta a estrés osmótico (figura 10; figura 3 del artículo 1). Todas estas evidencias nos permiten asegurar que la alcalinización extracelular resulta en la activación específica de la vía de la MAPK Slt2.

Dado que la integridad celular de los mutantes *slt2* tras daño a pared se puede preservar estabilizando osmóticamente el medio, decidimos investigar el efecto que tenía la adición de 1 M sorbitol a células estresadas con pH alcalino. Como se muestra en la figura 3A del artículo 3, la suplementación del medio con sorbitol evita la fosforilación de Slt2 en respuesta a pH alcalino, aunque da lugar a una activación de Slt2 tardía, tal y como se ha demostrado recientemente (Garcia-Rodriguez *et al.* 2005) y que es independiente del pH.

Una característica remarcable en la activación por pH alcalino de Slt2 es la naturaleza tan rápida y transitoria de la respuesta. Esto contrasta con cinéticas de activación más lentas y más duraderas como las observadas en el caso de exposición a rojo congo o estrés por elevada temperatura (figura 3 del artículo 3). Otros estreses que han demostrado tener una respuesta también más lenta son el blanco de calcoflúor (Ketela *et al.* 1999; De Nobel *et al.* 2000), la cafeína (Martin *et al.* 2000), el tratamiento con rapamicina (Torres *et al.* 2002) o con oxidantes como diamina o peróxido de hidrógeno (Vilella *et al.* 2005). Al parecer, los resultados indican que el pH extracelular es percibido más rápidamente por la célula que otros estreses que también llevan a la activación de Slt2. Sin embargo la activación de Slt2 por estrés alcalino también es mucho menos duradera, lo que podría deberse a mecanismos de retroalimentación negativa o a la rápida re-acidificación del medio extracelular durante el experimento.

Existen abundantes datos en la literatura que indican que diferentes situaciones de estrés sobre la pared dan lugar a la despolarización de la actina (Chowdhury *et al.* 1992; Lillie and Brown 1994). Con el objetivo de averiguar si esto también sucedía en el caso del estrés por alcalinización extracelular teñimos la actina en células salvajes estresadas con pH alcalino con rodamina-faloidina. La faloidina que forma parte de este complejo se une a los filamentos de actina y la rodamina es un marcador fluorescente que permite visualizar dicha unión. En nuestro experimento sometimos a células BY4741 salvajes a pH 8.2 y las recogimos a diferentes tiempos entre 5 y 120 min para su posterior tinción. Los resultados indicaban que no existe una distribución anormal de la actina en células sometidas a pH alcalino en ninguno de los tiempos ensayados mientras que células incubadas a 42 °C, utilizadas como control positivo, mostraron una evidente despolarización del citoesqueleto de actina (figura 3B del artículo 3).

3.4.2. Identificación de Wsc1 como señalizador en la respuesta a estrés alcalino.

Como hemos mostrado, de entre todos los sensores relacionados con la vía CWI conocidos, únicamente la mutación de Wsc1 daba lugar a un fenotipo de sensibilidad a pH alcalino (3.4.1.). Esto nos llevó a considerar que ésta podría ser la proteína implicada en recibir la señal en condiciones alcalinas y de transmitirla a través de la vía de Slt2. Para evaluar el papel de Wsc1 en la activación de Slt2 provocada por estrés alcalino analizamos el estado de fosforilación de la MAPK en el mutante *wsc1* y paralelamente en

mutantes *wsc2*, *wsc3*, *mid2* y *mtl1*. Tal y como muestran los resultados de la figura 22, la activación de Slit2 está claramente reducida en el mutante *wsc1* (un 40 %) respecto a la de una cepa salvaje. No se aprecia ningún efecto en los mutantes de los otros miembros de la familia Wsc: *wsc2* y *wsc3*. En cambio se puede detectar una leve disminución en la activación de Slit2 por pH alcalino en el mutante *mid2*, que no se aprecia en ausencia de Mtl1, cuya estructura es parecida a la de Mid2.

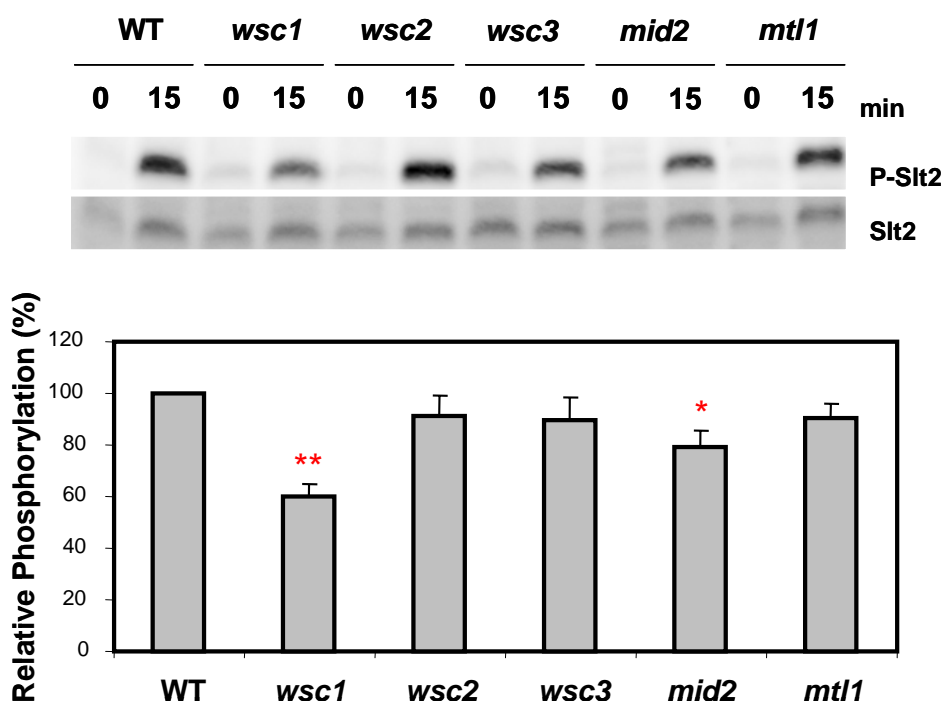


Figura 22. Análisis de la participación de los sensores de la vía CWI en la activación de Slit2. Cultivos de la cepa salvaje BY4741 y los mutantes indicados se sometieron a pH 8.2 durante los tiempos indicados y se procesaron para inmunoblot. Se detectó la presencia de Slit2 activa (P-Slit2) y total (Slit2). El panel inferior representa la activación de Slit2 en cada mutante, determinada como la relación entre la fosforilación de Slit2 en células estresadas por pH alcalino y la de células no estresadas, una vez corregida por la cantidad de Slit2 total. Se considera que la activación de Slit2 de la cepa salvaje (WT) se corresponde con la máxima activación en condiciones alcalinas (100 %). Los valores son el resultado de la media +/- ESM de la cuantificación de cinco experimentos independientes. (**) indica $p < 0.001$ y (*) indica $p < 0.05$.

Supusimos que si la sensibilidad del mutante *wsc1* a pH alcalino se debía a la incapacidad para activar totalmente Slit2, la activación artificial de Slit2 mediante la expresión de *bck1-20*, un alelo constitutivamente activo de la MAPKKK Bck1, contribuiría a remediar dicho fenotipo. Por lo tanto, se analizó el crecimiento del mutante *wsc1* conteniendo el alelo *bck1-20* tanto en condiciones de pH alcalino como en presencia de algunos agentes que dañan la pared. La figura 4B del artículo 3 demuestra que la

expresión de *bck1-20* confiere una cierta tolerancia a pH alcalino al mutante *wsc1*, cosa que no le ocurre al mutante *slt2*. Esto también sucede en el caso de la cafeína (Jacoby *et al.* 1998). En cambio, la activación constitutiva de Slt2 en el mutante *wsc1*, no confería tolerancia ni a rojo congo y ni a blanco de calcoflúor (datos no mostrados).

Las evidencias experimentales acumuladas hasta el momento nos permiten afirmar que el pH alcalino genera una señal captada por Wsc1 que activa la vía de la MAPK Slt2. Sin embargo, hemos observado que ninguno de los sensores de la vía CWI es el responsable único de la activación de Slt2 por estrés alcalino. Cabe la posibilidad de que, a pesar del papel predominante de Wsc1, en dicha activación participen de forma conjunta varios de los sensores o de que existan otros elementos capaces de activar Slt2 bajo estas condiciones, puesto que se ha descrito que el módulo MAPK puede recibir entradas de señal independientes a los elementos superiores de la vía CWI (Harrison *et al.* 2004). Recientemente se ha descrito que Rim21, el homólogo de PalH, y la vía de Rim101 contribuye al ensamblaje de la pared celular (Castrejon *et al.* 2006). Dado que, como hemos señalado anteriormente, la vía Rim101 participa en la respuesta a pH alcalino, dicha vía podría ser un buen candidato a regular el módulo MAPK Slt2 en condiciones de estrés alcalino. Por otro lado, el hecho de que la sensibilidad a pH alcalino del mutante *slt2* sea remediable por sorbitol mientras que la del mutante *wsc1* no lo sea, indica que Wsc1 debe tener funciones independientes de Slt2. Esto puede ser debido a que la señal transmitida por Wsc1 diverja a nivel de Rho1 y/o Pkc1 debido a las funciones independientes a Slt2 que poseen estas dos últimas proteínas. Este posible efecto independiente de Slt2, sin embargo, no estaría relacionado con la función de Rho1 y Pkc1 en la distribución de actina tal y como se ha demostrado previamente (ver 3.4.1). Otra posibilidad sería que Wsc1 tuviera una función en la resistencia a estrés alcalino completamente independiente a la vía CWI.

3.4.3. Análisis estructural del papel de Wsc1 en la señalización a pH alcalino.

Wsc1 es una proteína de membrana compuesta por un dominio extracelular amino terminal, un dominio hidrofóbico transmembrana y un dominio citoplasmático carboxi-terminal (ver figura 23A). El dominio extracelular contiene dos regiones claramente diferenciadas: una zona rica en cisteínas característica de las proteínas de la familia Wsc, a la que se ha denominado motivo WSC, y una zona rica en residuos serina y treonina

altamente manosilada (Lodder *et al.* 1999). El dominio citoplasmático está implicado en la señalización intracelular ya que es el responsable de unir Rom2, una de las GEFs de Rho1. Se ha demostrado que la interacción con Rom2 tiene lugar a través de la tirosina 303 y la región entre los residuos 369 y 375 (Vay *et al.* 2004).

Para evaluar la relevancia de las diferentes regiones de Wsc1 en la señalización del estrés alcalino expresamos en un mutante *wsc1* diferentes versiones mutantes de Wsc1 con la etiqueta HA. Como se muestra en la figura 23B la versión salvaje de Wsc1 remedia totalmente la sensibilidad a pH alcalino mientras que el resto de versiones no son capaces de restaurar la tolerancia a este estrés, al menos no hasta el mismo nivel. Así pues, la delección del dominio citoplásmico da lugar a una proteína totalmente inactiva al igual que la mutación de la tirosina 303 a alanina. Ello parece indicar que la transmisión de la señal desde Wsc1 al módulo MAPK en el caso del estrés alcalino, así como por cafeína o rojo congo, está mediada por Rom2 y Rho1.

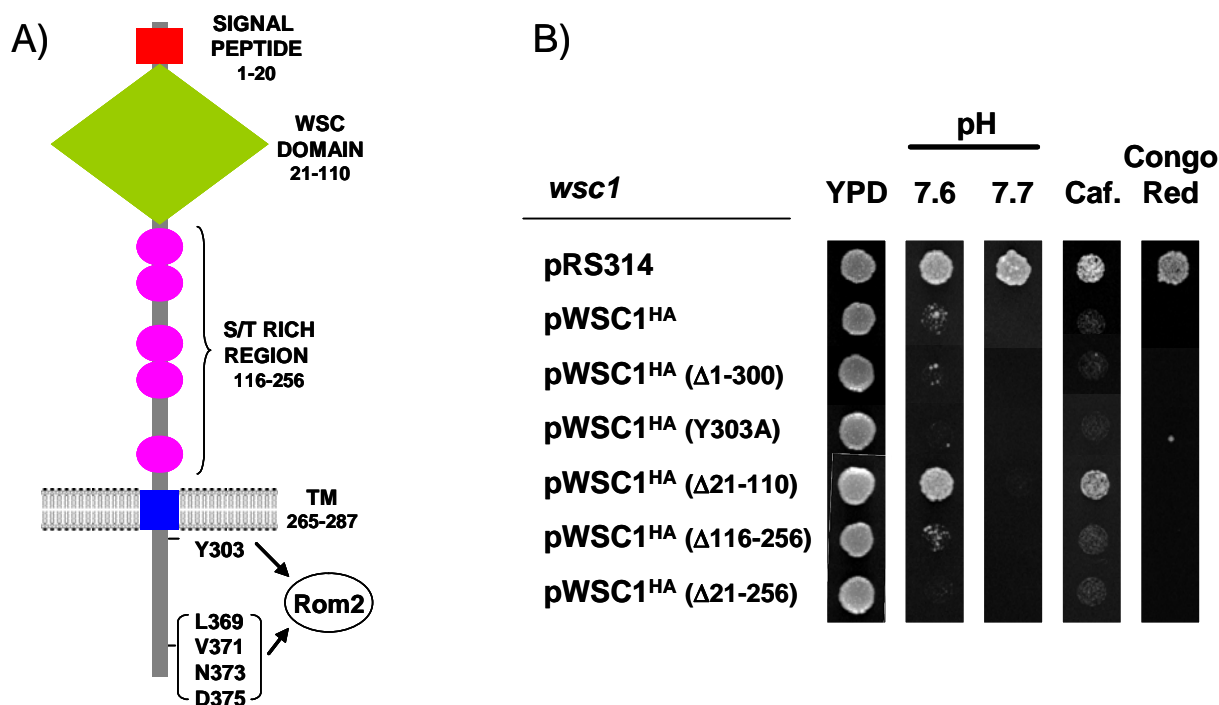


Figura 23. Análisis de las regiones importantes en la función de Wsc1 en la tolerancia a estrés alcalino. A. Representación esquemática de la estructura de Wsc1. Los números indican la posición de los aminoácidos y TM significa región transmembrana. B. Se transformó el mutante *wsc1*, en el fondo genético W303-1A, con los plásmidos indicados, y se analizó su crecimiento en varias situaciones. Se utilizaron placas de YPD 50 mM TAPS al pH indicado o placas de YPD con 7 mM de cafeína (Caf.) o con 100 µg/mL de rojo congo (Congo Red).

Por otro lado, y con el objetivo de evaluar el papel del dominio extracelular de Wsc1, construimos tres versiones delecionadas en diferentes regiones de dicho dominio. La primera de ellas, denominada pWSC1^{HA} (Δ 21-256), a la que le falta casi toda la región extracelular (exceptuando el péptido señal del extremo amino terminal) no era funcional. En cambio, pWSC1^{HA} (Δ 21-110), que contiene la deleción del motivo WSC, característico de la familia Wsc, era capaz de mejorar en cierto grado la tolerancia del mutante *wsc1* a pH alcalino, cafeína o rojo congo. Eso sugiere que, aunque conservada entre los miembros de la misma familia, dicha región tiene una relevancia funcional limitada. En cambio, la expresión de la versión en la que se ha delecionado la región rica en residuos serina y treonina, que se encuentra entre los residuos 116 y 256 (plásmido pWSC1^{HA} (Δ 116-256)), no mejora la sensibilidad a pH alcalino del mutante *wsc1*. En la misma figura se puede apreciar que la región rica en serina y treonina también es necesaria para la resistencia a estrés por cafeína y rojo congo, tal y como había sido descrito por exposición a elevadas temperaturas (Lodder *et al.* 1999). Por lo tanto, podemos afirmar que la región extracelular de Wsc1, y en especial la zona rica en residuos serina y treonina, es esencial para la función de dicha proteína en respuesta a pH alcalino y, en general, a otros tipos de estrés de pared como cafeína y rojo congo. Cabe destacar que la pérdida de función de las versiones mutadas de Wsc1 no es un reflejo de la falta de expresión o incorrecta localización de Wsc1 ya que el análisis por inmunoblot de extractos celulares indicaban que todas ellas expresan niveles similares de proteína y que ésta se recupera en fracciones particuladas (no mostrado).

En concordancia con los resultados previos, la falta de la región intracelular de Wsc1 o la mutación Y303A, incapaces de complementar el defecto de crecimiento en condiciones alcalinas de *wsc1*, también son incapaces de recuperar el nivel normal de activación de Slt2 en respuesta a este tipo de estrés (figura 5C del artículo 3). La suma de todos estos datos indica que en la función de Wsc1 como sensor en la respuesta a pH alcalino son imprescindibles tanto elementos estructurales extracelulares como elementos intracelulares implicados en señalización sobre Slt2.

La proteína Wsc1 se encuentra altamente manosilada en la región rica en serinas y treoninas del dominio periplasmático, región cuya deleción hemos observado que daba lugar a una proteína esencialmente inactiva. Esto está de acuerdo con el hecho de que la manosilación en estos residuos Ser-Thr, catalizada por la familia de las O-manosiltransferasas codificadas por *PMT1-7*, es imprescindible en la función de Wsc1

(Philip and Levin 2001; Lommel *et al.* 2004). Supusimos que si Wsc1 era importante en la tolerancia a estrés alcalino, dichas manosiltransferasas también podrían serlo. Para ello comprobamos la sensibilidad a pH alcalino de mutantes *pmt1*, *pmt2*, *pmt3*, *pmt5* y *pmt6*. En la figura 6A del artículo 3 se muestra que los mutantes *pmt1* y *pmt2* padecen un defecto significativo en el crecimiento en condiciones alcalinas mientras que el resto de mutantes analizados no lo padecen. Paralelamente, observamos una disminución de la forma de alto peso molecular de Wsc1 (100 kDa) en la membrana de células defectivas en *PMT2* y en el mutante *pmt1*. Esta disminución se correlaciona con la aparición de fragmentos proteicos menores que corresponden a la presencia de Wsc1 no manosilada (figura 6B del artículo 3). Estos resultados confirmaban que la correcta O-manosilación de Wsc1 es importante para su función a pH alcalino. Además, estos experimentos nos han permitido definir a *PMT1* como un nuevo elemento implicado en la manosilación de Wsc1 ya que previamente sólo *PMT2* y *PMT4* se habían relacionado con dicha función.

3.4.4. Perfil transcripcional en respuesta a estrés alcalino en el mutante *slt2*.

Hasta el momento, nuestros resultados sugerían que la activación de Slt2 representa un componente significativo en la respuesta adaptativa a pH alcalino. Se ha descrito en 2.4.2. que, en respuesta a estrés de pared, la MAPK Slt2 actúa controlando la expresión de ciertos genes relacionados con pared a través de la activación del factor de transcripción Rlm1 y/o del complejo SBF, formado por Swi4 y Swi6. Nos cuestionamos la repercusión transcripcional de la activación de Slt2 por pH alcalino, es decir, si la respuesta génica mediada por dicha MAPK es importante en la tolerancia a estrés alcalino.

Para evaluar la implicación de Slt2 en la respuesta transcripcional a pH alcalino realizamos un análisis mediante microarrays de DNA de los cambios en la expresión génica producidos por el estrés alcalino (pH 8.2) en la cepa salvaje BY4741 y en el mutante isogénico *slt2*. Los resultados revelaron que, en el caso de la cepa salvaje, 497 genes eran inducidos a los 15 min y 173 a los 30 (los resultados del experimento se encuentran en el anexo del artículo 3). Tras la comparación entre la respuesta transcripcional a pH alcalino de la cepa salvaje y de la cepa *slt2* consideramos que, de los 497 genes inducidos a los 15 min, sólo 42 eran dependientes de Slt2 (presentaban una reducción de la expresión igual o mayor al 25 % en dicho mutante). Entre ellos se

encuentra el gen *FKS2*, que codifica una de las subunidades catalíticas de la 1,3- β -glucano sintasa, cuya transcripción se halla bajo la regulación dual de calcineurina y Slt2 en estrés por altas temperaturas (Zhao *et al.* 1998). Además la inducción de *FKS2* por pH alcalino era también dependiente de calcineurina (Viladevall *et al.* 2004), lo que indicaba que la vía de la MAPK Slt2 y la vía de la calcineurina actúan también de forma conjunta regulando la transcripción de dicho gen en respuesta a estrés alcalino. En cambio, a los 30 min, sólo cuatro genes inducidos a pH alcalino se podían considerar dependientes de Slt2: *DFG5*, *SKT5*, *CRH1* y *ZRT1* (ver figura 24A). Resultaba interesante que los tres primeros codificaran proteínas relacionadas con la pared celular: Dfg5 es una manosidasa necesaria para la biosíntesis de la pared celular, Skt5 es un activador de la quitín sintasa 3 (Chs3) y Crh1 es una supuesta glucosidasa de la pared celular. La inducción de dichos genes por pH alcalino y su dependencia de Slt2 fue recomprobada por RT-PCR semi cuantitativa tal y como se muestra en la figura 24B.

El análisis fenotípico de mutantes defectivos en estos genes (figura 24C) reveló que sólo las deleciones de *DFG5* y *SKT5* producían un leve fenotipo de sensibilidad a pH alcalino, lo que había sido documentado previamente (Giaever *et al.* 2002). Puesto que ambos genes perdían totalmente su expresión en el mutante *slt2*, nos cuestionamos hasta qué punto la función de Slt2 en la tolerancia a pH alcalino se debía a su papel como activador de la expresión de *SKT5* y *DFG5*. Como se muestra en la figura 24C el doble mutante *skt5 dfg5* presenta una mayor sensibilidad a pH alcalino que los mutantes simples *skt5* o *dfg5* pero continúa siendo menos sensible que el mutante *slt2*. Además, el comportamiento de las cepas *slt2* por un lado y *skt5 dfg5* por otro no es exactamente el mismo ya que la sensibilidad a pH alcalino del doble mutante (y esto también sucede en el caso de los mutantes simples) no es solventable por estabilización osmótica del medio mientras que sí lo es en el caso de *slt2* (no mostrado).

Los datos previos de este apartado demuestran que el papel de Slt2 en la regulación génica de *SKT5* y *DFG5* en respuesta a estrés alcalino es relevante pero insuficiente para justificar la sensibilidad del mutante *slt2*. Esto apunta hacia la posibilidad de que la función de otros genes no analizados pero también dependientes de Slt2 sea imprescindible para la tolerancia a estrés alcalino, aunque también podría indicar que esta MAPK tiene funciones no transcripcionales relevantes para la tolerancia a este tipo de estrés.

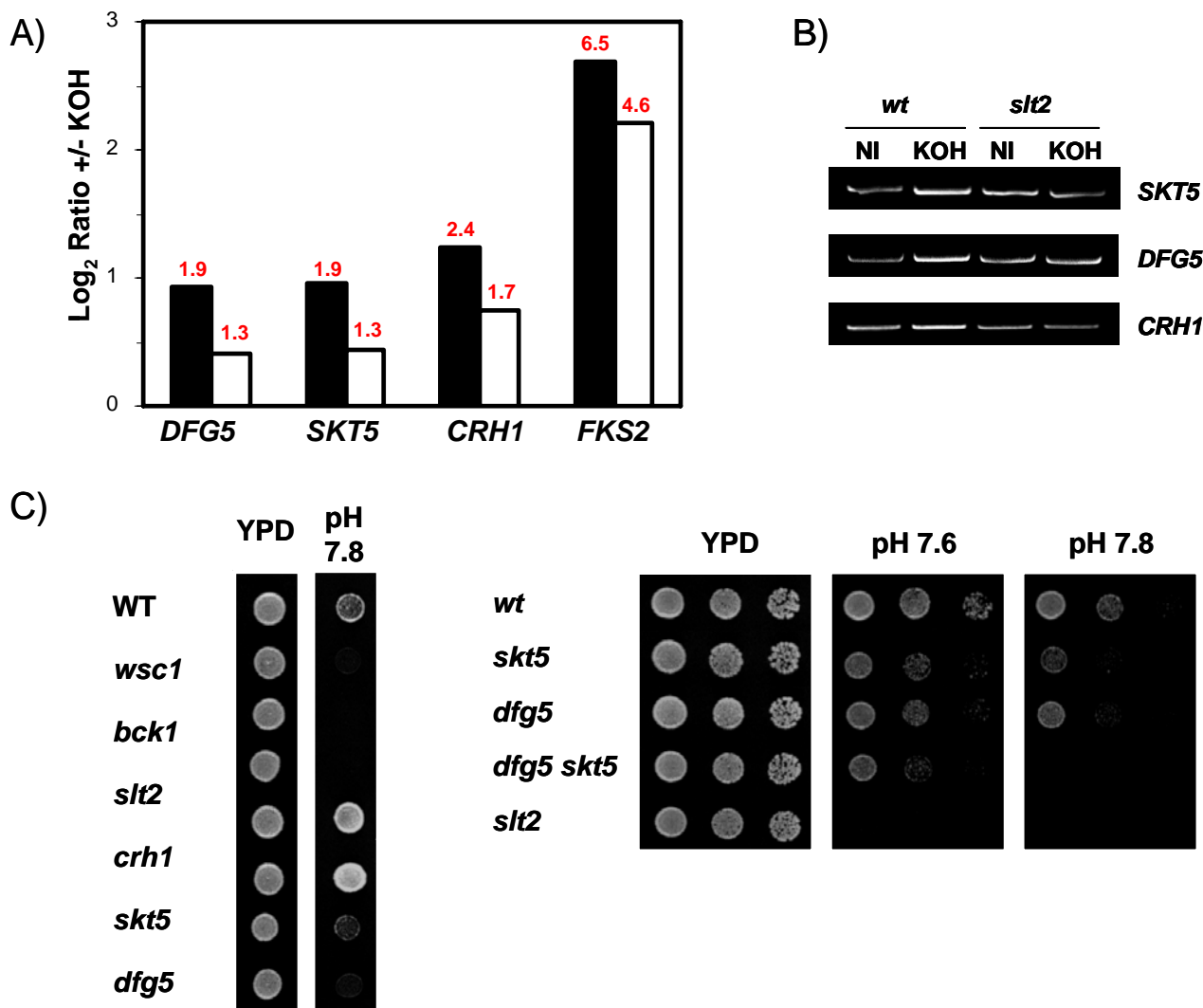


Figura 24. Identificación de proteínas relacionadas con la pared inducidas por pH alcalino. **A.** Se muestra las inducciones en la cepa salvaje y en el mutante *slt2* de varios genes relacionados con pared por estrés alcalino cuya expresión depende de Slit2. El tiempo de exposición a estrés alcalino fue 15 min para *FKS2* y de 30 min para el resto. Los números indican los valores de dicha inducción. **B.** Determinación por RT-PCR de los niveles de expresión de los genes indicados en condiciones basales o después de 30 min tras exposición a pH alcalino en la cepa salvaje y en *slt2*. **C.** Se analizó el crecimiento en medio sólido en condiciones de pH alcalino de las cepas indicadas. Se utilizaron placas de YPD 50 mM TAPS al pH indicado y se incubaron los cultivos durante 2-4 días.

Por otro lado, todos los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que el estrés alcalino provoca un daño a pared celular capaz de activar la vía CWI. Numerosos agentes o situaciones son capaces de alterar la pared celular de la levadura *S. cerevisiae* actuando sobre diferentes elementos de su estructura. Por ejemplo, el blanco de calcoflúor y el rojo congo interactúan con la quitina mientras que la zimoliasa, la caspofungina o las mutaciones *fks1* y *gas1* interfieren en la correcta estructuración de

la red de glucanos. Nos cuestionamos qué tipo de efecto tendría la alcalinización extracelular sobre la pared y pensamos que quizás podríamos responder a esta pregunta rastreando la bibliografía en busca de datos sobre la respuesta transcripcional a diferentes daños de la pared y comparándolos con el perfil de respuesta a estrés alcalino. Tal y como se muestra en la figura 25, el daño a pared provocado por zimoliasa (con actividad 1,3- β -glucano hidrolasa), por exposición a caspofungina (que inhibe la síntesis de 1-3- β -glucanos) o al agente reductor DTT generan un perfil transcripcional bastante similar al causado por estrés alcalino. En cambio, no existe apenas correlación entre los perfiles observados en respuesta a rojo congo o en presencia de α -factor. Por otro lado, entre la respuesta transcripcional a pH alcalino y los cambios transcripcionales inducidos por la mutación de diferentes componentes relacionados con la pared, la máxima correlación tiene lugar con los datos obtenidos por la mutación de *FKS1*, que codifica una subunidad catalítica de la glucano sintasa. También existe una cierta correlación con los perfiles de *gas1*, defectivo en una 1,3- β -glucosiltransferasa, con *kre6*, defectivo en una supuesta 1,6- β -glucano sintasa, y en menor medida con *knr4*, defectivo en una proteína involucrada en la regulación de la síntesis de la pared cuya función exacta es desconocida. Sin embargo, el perfil transcripcional del mutante *mnn9*, una de las subunidades del complejo manosiltransferasa de Golgi que está implicado en manosilación de proteínas de pared, no presenta correlación positiva con el perfil de respuesta a estrés alcalino.

Se puede observar una pauta común entre las acciones sobre la pared de todos aquellos compuestos y mutaciones cuyo perfil transcripcional es similar al del pH alcalino: su relación con la estructura de glucanos de la pared (caspofungina, zimoliasa y las mutaciones de *Fks1* y *Gas1*), lo que sugiere que el pH alcalino implica una alteración de la red de glucanos. Esta sugerencia se sustenta también por el hecho de que el sensor implicado en la respuesta a estrés alcalino sea *Wsc1*. Se ha encontrado una correlación entre algunos agentes que actúan sobre la pared y algunos sensores específicos. Por ejemplo, el sensor implicado en la respuesta a blanco de calcoflúor o a α -factor es *Mid2* mientras que en el caso de caspofungina se le puede atribuir un papel específico a *Wsc1* (Ketela *et al.* 1999; De Nobel *et al.* 2000; Reinoso-Martin *et al.* 2003). El hecho de que *Wsc1* sea el sensor específico en la respuesta a estrés alcalino (tal y como se ha descrito anteriormente) y que también lo sea en el caso de la caspofungina liga con la idea de que la alcalinización extracelular provoca un daño a la estructura de glucanos.

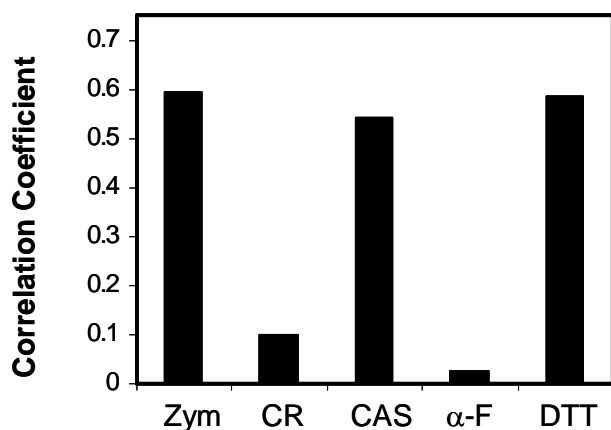
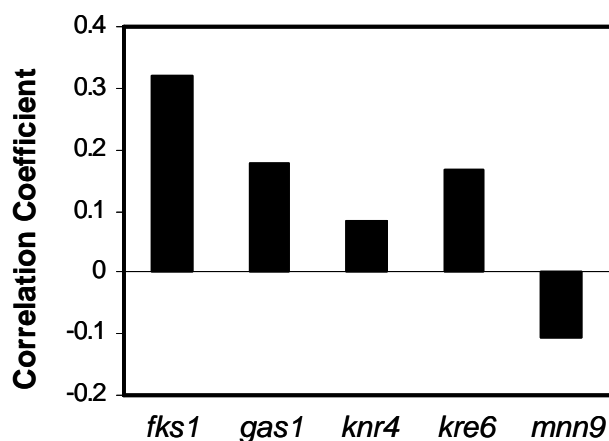


Figura 25. Correlación entre la respuesta transcripcional a estrés alcalino y a diferentes agentes o mutaciones que provocan daños en la pared. El método para calcular los coeficientes de correlación se describe en el artículo 3. El agente que daña la pared y el origen de los datos utilizados se detallan a continuación: Zym, Zimoliasa (Garcia *et al.* 2004), CR, Rojo Congo (Garcia *et al.* 2004), CAS, Caspofungina (J. Arroyo, comunicación personal), α -F, α -factor (Roberts *et al.*, 2000) y DTT, ditiotreitól (Gasch *et al.* 2000). Los datos de los mutantes se obtuvieron de Lagorce *et al.* 2003.



3.4.5. La vía CWI como nexo común en la detección de cambios repentinos de pH.

Los experimentos presentados nos han permitido implicar en la respuesta a pH alcalino a la vía Pkc1/Slt2 de integridad de la pared celular. Es notable que se haya demostrado recientemente que la exposición a estrés por pH ácido también da lugar a una activación de dicha vía y que Slt2 es imprescindible para la supervivencia en condiciones ácidas (Claret *et al.* 2005). Esto sugiere que, en realidad, la vía CWI lo que detecta son cambios bruscos en el pH extracelular. Sin embargo, aunque la activación del bloque central de dicha vía es común para estrés alcalino y el estrés ácido, los sensores implicados en detectar el estímulo parecen ser diferentes. Nuestro trabajo revela que en

el caso del estrés alcalino Wsc1 es el sensor principal en la activación de Slt2 mientras que en el caso del estrés por acidificación extracelular el más importante es Mid2.

También existen diferencias en cuanto a la cinética de respuesta. En el caso del pH alcalino la activación de Slt2 es rápida y transitoria y ello es probablemente debido a que la respuesta a este tipo de estrés implica una rápida re-acidificación del medio y, por lo tanto, el estrés desaparece. En cambio, el estrés por pH ácido provoca una activación de Slt2 que es más lenta pero también más duradera ya que la acidificación no es contrarrestada por la levadura y el estrés es permanente. Precisamente esta es la razón por la cual el pH ácido provoca un incremento en los niveles de Slt2 total, característico de las respuestas adaptativas al daño en la pared celular. En cambio, esto último no sucede en el caso del estrés alcalino sugiriendo que este tipo de estrés actúa sobre la pared como un daño puntual.

Las diferencias descritas sugieren que la célula es capaz de discernir entre estrés alcalino y el ácido y esto indica que el efecto provocado sobre la pared por cada uno de estos estímulos es diferente. Se ha demostrado que a pH ácido las células presentan una significativa reducción en los niveles de quitina probablemente debida a que, en estas condiciones, se produce un aumento de la actividad quitinasa (Cabib *et al.* 1989). Esto sugiere que el desencadenante en la activación de Slt2 por estrés ácido quizás sea la alteración en la estructura de la quitina mientras que el estrés alcalino actuaría sobre la pared afectando la red de glucanos.

3.5. ¿Cómo se enfrenta *Saccharomyces cerevisiae* al estrés alcalino?

El trabajo experimental descrito tenía como objetivo caracterizar los mecanismos de respuesta a estrés alcalino en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. La conclusión final que se extrae de los datos obtenidos es que, ante una exposición a pH alcalino, lejos de encontrar una única vía específica de señalización que medie la respuesta ante estrés alcalino, tal y como sucede en el hongo *A. nidulans*, *S. cerevisiae* pone en marcha toda una serie de mecanismos para poder sobrellevar los 'inconvenientes' que le supone la alcalinización medioambiental. De esta manera hemos descrito que la respuesta a estrés alcalino comprende la activación de diferentes vías de señalización como la vía de calcio/calcineurina, la vía de la integridad de la pared celular y las vías de respuesta a escasez de fosfato, y de metales como hierro y cobre. También hemos determinado que la función vacuolar ejerce un papel imprescindible en condiciones alcalinas y hemos presentado datos que corroboran que Rim101, el homólogo de PacC de *A. nidulans*, participa en dicha respuesta. Pero, a nivel fisiológico ¿qué le sucede a *S. cerevisiae* cuando se enfrenta a estrés alcalino?

La activación de la vía de la calcineurina ha resultado ser uno de los mecanismos más comunes en respuesta a estreses entre los cuales se encuentran el estrés salino, el estrés por daño a pared (por agentes que dañan directamente la pared o por estrés hiposmótico o presencia de feromonas) o el estrés de retículo. Las funciones de esta vía en respuesta a estrés alcalino podrían estar relacionadas con la resistencia a estrés, con la remodelación de la pared celular o con una parada de ciclo. Las funciones de la fosfatasa en cuanto a resistencia a estrés se han documentado en múltiples ocasiones (revisado en Cyert 2003). Por otro lado, tal y como hemos discutido en 3.2.5., existen evidencias experimentales de que la calcineurina podría actuar en respuesta al daño en la pared provocado por la alcalinización del medio, un daño que hemos demostrado que realmente sucede (3.4). Además, se conoce que la actividad de esta fosfatasa es capaz de producir una parada de ciclo entre las fases G2 y M e incluso se ha llegado a hipotetizar sobre que la calcineurina actúa de forma similar a un agente anti-apoptótico en la respuesta a feromonas, aunque la apoptosis no existe como tal en levaduras (Skulachev 2002). La acción de calcineurina sobre algunos genes como *ENA1* o *PHO89* nos sugieren que quizá su activación por pH alcalino esté también encaminada a controlar la homeostasis iónica o a la captación de fosfato.

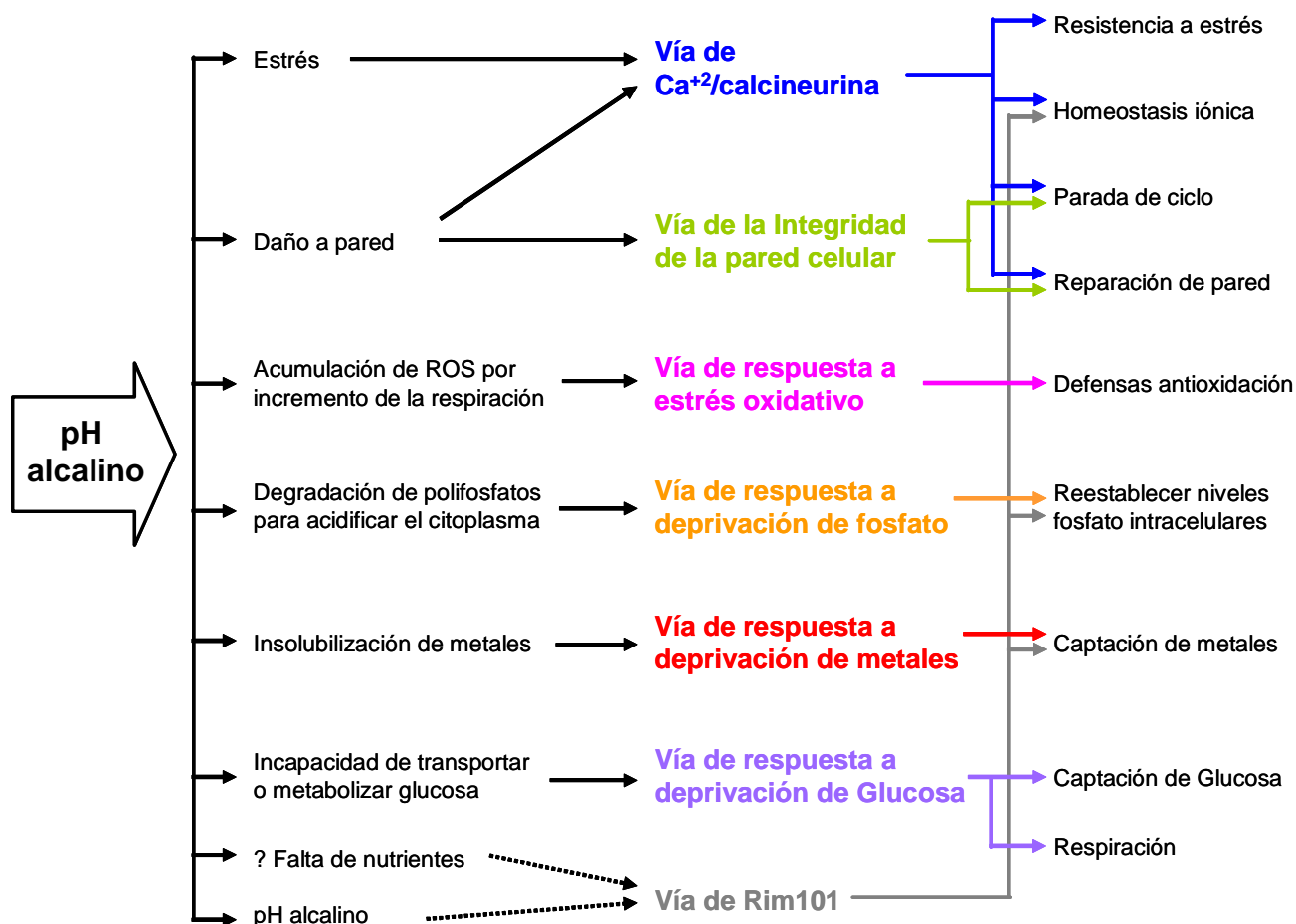


Figura 18. Esquema en el que se resumen las vías activadas por el estrés alcalino y las posibles causas y efectos de su activación.

En el caso de la activación de la vía de la integridad de la pared celular la finalidad parece estar algo más clara. Aunque Slt2 podría también estar actuando a nivel de parada de ciclo celular a través de su acción indirecta sobre Swe1, parece que su principal papel es el de actuar sobre la estructura y organización de la pared celular. Nuestra hipótesis es que Slt2 se activa en respuesta a un daño en pared producido por pH alcalino, probablemente a nivel de la estructura de glucanos tal y como se ha comentado previamente.

Otras vías activadas en respuesta a estrés alcalino son las de respuesta a escasez en metales hierro y cobre, en fosfato y en glucosa. La forma más sencilla de explicarlo es que la célula realmente perciba una deficiencia en dichos compuestos. Que exista una deficiencia real en el medio extracelular es más fácilmente explicable en el caso de los metales por su escasa solubilidad en condiciones alcalinas. En el resto de los

casos no parece que el problema sea una falta de dichos metabolitos en el medio. La falta de fosfato podría ser debida a la degradación de polifosfatos que tiene lugar tras exposición a pH alcalino y que disminuye las reservas de fosfato intracelulares tal y como se ha discutido en 3.3.2. En cambio, la falta de glucosa se podría deber a un defecto en su transporte o en metabolismo provocado por la alcalinización celular (ver 3.2.2.).

La activación de los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo por pH alcalino es debida a que la alcalinización extracelular provoca la generación de una mayor cantidad de ROS en el citoplasma presumiblemente debido a un incremento de la tasa respiratoria que tendría lugar por activación de la vía de déficit de glucosa (3.3.4.).

El papel de Rim101 también es importante en la respuesta a pH alcalino. A diferencia de PacC de *A. nidulans*, que está realmente especializado en la respuesta a pH alcalino, sabemos que Rim101 no tiene un papel tan específico en dicha respuesta. Rim101 se ha relacionado con la meiosis durante la esporulación de diploides y la invasividad en haploides (Li and Mitchell 1997). No obstante, su participación en la respuesta a pH alcalino es clara ya que existen genes que responden a pH alcalino de forma parcialmente dependiente de Rim101, como *ENA1*. Lo que no sabemos es si la vía RIM101 se activa directamente por cambios en el pH o por alguno de los efectos indirectos derivados de la alcalinización extracelular como podría ser la falta de nutrientes, capaz de activar procesos como invasividad o esporulación también relacionados con la función de Rim101.

Hasta el momento hemos analizado de que manera *S. cerevisiae* afronta temporalmente el problema de encontrarse en un medio alcalino. Pero un mecanismo muy importante puede ser disminuir lo más rápido posible el pH extracelular. A nivel experimental hemos observado que la levadura *S. cerevisiae* es extremadamente eficiente en este proceso ya que, por ejemplo, en un medio rico al que se le añade hidróxido potásico para conseguir un pH de 8.2, un cultivo en fase exponencial (OD_{660} de 1 aproximadamente) es capaz de reducir el pH hasta 7.5 en menos de 30 min (no mostrado). Los mecanismos que probablemente utilice son: 1) regular la actividad de la ATPasas de protón de membrana plasmática Pma1 para acelerar la salida de protones al medio, 2) degradar polifosfatos, lo que provoca la liberación de fosfato generando a su vez protones y 3) acelerar el metabolismo de azúcares para generar compuestos de naturaleza ácida.

4. CONCLUSIONES

1. Análisis de la respuesta transcripcional a estrés alcalino moderado.

1.1. Se han identificado 150 genes que incrementan su expresión al menos dos veces en condiciones de pH alcalino moderado (pH 7.6) en alguno de los tiempos analizados (5, 25 y/o 45 min). Entre ellos cabe destacar genes relacionados con estrés y otros relacionados con funciones más específicas como el metabolismo de fosfato o la homeostasis de los metales hierro y cobre.

1.2. También se han detectado unos 230 genes cuya expresión disminuye a un tercio o más de los niveles basales. Gran parte de ellos están relacionados con la biosíntesis de aminoácidos y la síntesis de purinas, sugiriendo que estos dos procesos están alterados en condiciones alcalinas.

2. La alcalinización mediambiental provoca la activación de la vía de la fosfatasa calcineurina.

2.1. El estudio de la respuesta de *ENA1* nos ha permitido determinar que su activación por pH alcalino depende de al menos tres vías de señalización: la vía de la fosfatasa calcineurina, la vía de Rim101 y otra/s vía/s por determinar.

2.2. El mapeo del promotor de *ENA1* ha permitido definir dos regiones de respuesta a pH alcalino que hemos denominado ARR1 y ARR2. Se ha determinado que ARR1 está regulada de forma dual por calcineurina y Rim101 mientras que ARR2 es parcialmente dependiente de Rim101 e independiente de calcineurina.

2.3. La respuesta de *PHO89* a pH alcalino se puede considerar totalmente dependiente de calcineurina ya que desaparece en presencia del inhibidor de calcineurina FK506 o en ausencia de Cnb1 o Crz1.

2.4. La alcalinización del medio provoca una rápida entrada de calcio al citoplasma desde el exterior a través del complejo Cch1-Mid1. Esto provoca un incremento en los niveles citoplasmáticos de calcio que es capaz de activar la calcineurina.

3. Identificación de genes cuya delección confiere sensibilidad a estrés alcalino.

3.1. Se han identificado un total de 118 mutantes en genes cuya delección afecta negativamente a la capacidad para crecer en condiciones alcalinas.

CONCLUSIONES

3.2. Entre ellos cabe destacar los mutantes que tienen una ATPasa vacuolar no funcional ya que indica que la función vacuolar es imprescindible en condiciones alcalinas. También son sensibles muchos mutantes relacionados con el metabolismo de fosfato y la homeostasis de los metales hierro y cobre, lo que sugiere que en condiciones alcalinas se produce una situación de déficit de estos iones.

3.3. La alcalinización medioambiental lleva asociada un estrés oxidativo, como se deduce de la detección de ROS en células expuestas a pH alcalino y la activación de genes de respuesta oxidativa. Esta hipótesis justifica que mutantes defectivos en proteínas relacionadas con la defensa contra la oxidación sean incapaces de sobrevivir en un medio alcalino.

4. El papel de la vía Pkc1/Slt2 de integridad de la pared celular en respuesta a estrés alcalino.

4.1. El estrés alcalino provoca una activación rápida y transitoria de Slt2, la MAPK central en la vía de la integridad de la pared celular, que depende totalmente de la integridad del módulo MAPK.

4.2. Wsc1 es el sensor principal implicado en la activación de Slt2 por pH alcalino. Elementos extracelulares de Wsc1 y determinados residuos intracelulares son necesarios para la transmisión de la señal.

4.3. Una fracción de los genes que se sobreexpresan en condiciones alcalinas depende de Slt2. Algunos de los genes dependientes de Slt2 están relacionados con la pared celular y su delección provoca deficiencias de crecimiento a pH alcalino.

4.4. La comparación de los perfiles transcripcionales en respuesta a diferentes agentes o mutaciones que tienen efectos sobre la pared celular con el perfil transcripcional en respuesta a estrés alcalino, indica que el efecto sobre la pared de la alcalinización extracelular podría estar relacionado con la alteración de la red de glucanos.

5. El conjunto de nuestros resultados permite postular que la alcalinización extracelular provoca una respuesta adaptativa que implica la activación de numerosas vías de señalización. Entre ellas se encuentran la vía de la calcineurina, la vía de la integridad de la pared celular, la vía de respuesta a estrés oxidativo y las vías de respuesta a déficit de fosfato y de metales hierro y cobre.

5. REFERENCIAS

- Alepuz PM, Cunningham KW, Estruch F (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated ENA1 gene. *Mol.Microbiol.* **26**, 91-98.
- Alic N, Felder T, Temple MD, Gloeckner C, Higgins VJ, Briza P, Dawes IW (2004) Genome-wide transcriptional responses to a lipid hydroperoxide: adaptation occurs without induction of oxidant defenses. *Free Radic.Biol.Med.* **37**, 23-35.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol.Rev.* **27**, 215-237.
- Arst HN, Bignell E, Tilburn J (1994) 2 New Genes Involved in Signaling Ambient Ph in Aspergillus-Nidulans. *Molecular & General Genetics* **245**, 787-790.
- Baetz K, Moffat J, Haynes J, Chang M, Andrews B (2001) Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol.Cell Biol.* **21**, 6515-6528.
- Barwell KJ, Boysen JH, Xu W, Mitchell AP (2005) Relationship of DFG16 to the Rim101p pH response pathway in Saccharomyces cerevisiae and Candida albicans. *Eukaryot.Cell* **4**, 890-899.
- Batiza AF, Schulz T, Masson PH (1996) Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J.Biol.Chem.* **271**, 23357-23362.
- Bensen ES, Martin SJ, Li M, Berman J, Davis DA (2004) Transcriptional profiling in Candida albicans reveals new adaptive responses to extracellular pH and functions for Rim101p. *Mol.Microbiol.* **54**, 1335-1351.
- Bonilla M, Cunningham KW (2002) Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Sci.STKE.* **2002**, E17.
- Bonilla M, Cunningham KW (2003) Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol.Biol.Cell* **14**, 4296-4305.
- Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW (2002) Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress *EMBO J.* **21**, 2343-2353.
- Borst-Pauwels GW, Peters PH (1977) Effect of the medium pH and the cell pH upon the kinetical parameters of phosphate uptake by yeast. *Biochim.Biophys.Acta* **466**, 488-495.
- Bostian KA, Lemire JM, Cannon LE, Halvorson HO (1980) In vitro synthesis of repressible yeast acid phosphatase: identification of multiple mRNAs and products *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **77**, 504-4508.
- Boustany LM, Cyert MS (2002) Calcineurin-dependent regulation of Crz1p nuclear export requires Msn5p and a conserved calcineurin docking site *Genes Dev.* **16**, 608-619.
- Boysen JH, Mitchell AP (2006) Control of Bro1-domain protein Rim20 localization by external pH, ESCRT machinery, and the Saccharomyces cerevisiae Rim101 pathway. *Mol.Biol.Cell* **17**, 1344-1353.
- Buehrer BM, Errede B (1997) Coordination of the mating and cell integrity mitogen-activated protein kinase pathways in Saccharomyces cerevisiae. *Mol.Cell Biol.* **17**, 6517-6525.
- Bun-ya M, Nishimura M, Harashima S, Oshima Y (1991) The PHO84 gene of Saccharomyces cerevisiae encodes an inorganic phosphate transporter. *Mol.Cell Biol.* **11**, 3229-3238.

REFERENCIAS

- Cabib E, Drgonova J, Drgon T (1998) Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu.Rev.Biochem.* **67**, 307-333.
- Cabib E, Sburlati A, Bowers B, Silverman SJ (1989) Chitin synthase 1, an auxiliary enzyme for chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **108**, 1665-1672.
- Caddick MX, Brownlee AG, Arst HN, Jr. (1986) Regulation of gene expression by pH of the growth medium in *Aspergillus nidulans*. *Mol.Gen.Genet.* **203**, 346-353.
- Castrejon F, Gomez A, Sanz M, Duran A, Roncero C (2006) The RIM101 pathway contributes to yeast cell wall assembly and its function becomes essential in the absence of mitogen-activated protein kinase Slt2p. *Eukaryot.Cell* **5**, 507-517.
- Castro CD, Meehan AJ, Koretsky AP, Domach MM (1995) In situ ³¹P nuclear magnetic resonance for observation of polyphosphate and catabolite responses of chemostat-cultivated *Saccharomyces cerevisiae* after alkalinization. *Appl.Environ.Microbiol.* **61**, 4448-4453.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol.Biol.Cell* **12**, 323-337.
- Chowdhury S, Smith KW, Gustin MC (1992) Osmotic stress and the yeast cytoskeleton: phenotype-specific suppression of an actin mutation. *J.Cell Biol.* **118**, 561-571.
- Chung JH, Lester RL, Dickson RC (2003) Sphingolipid requirement for generation of a functional v1 component of the vacuolar ATPase. *J.Biol.Chem.* **278**, 28872-28881.
- Cid VJ, Cenamor R, Sanchez M, Nombela C (1998) A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* **144 (Pt 1)**, 25-36.
- Claret S, Gatti X, Doignon F, Thoraval D, Crouzet M (2005) The Rgd1p Rho GTPase-activating protein and the Mid2p cell wall sensor are required at low pH for protein kinase C pathway activation and cell survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot.Cell* **4**, 1375-1386.
- Cockburn M, Earnshaw P, Eddy AA (1975) The stoichiometry of the absorption of protons with phosphate and L-glutamate by yeasts of the genus *Saccharomyces*. *Biochem.J.* **146**, 705-712.
- Collister M, Didmon MP, Maclsaac F, Stark MJ, MacDonald NQ, Keyse SM (2002) YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett.* **527**, 186-192.
- Costa V, Moradas-Ferreira P (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol.Aspects Med.* **22**, 217-246.
- Costigan C, Gehrung S, Snyder M (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.
- Cullen PJ, Schultz J, Horecka J, Stevenson BJ, Jigami Y, Sprague GF, Jr. (2000) Defects in protein glycosylation cause SHO1-dependent activation of a STE12 signaling pathway in yeast. *Genetics* **155**, 1005-1018.
- Cunningham KW, Fink GR (1994) Calcineurin-dependent growth control in *Saccharomyces cerevisiae* mutants lacking PMC1, a homolog of plasma membrane Ca²⁺ ATPases. *J.Cell Biol.* **124**, 351-363.

- Cunningham KW, Fink GR (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **16**, 2226-2237.
- Cyert MS (2003) Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **311**, 1143-1150.
- Cyert MS, Kunisawa R, Kaim D, Thorner J (1991) Yeast has homologs (CNA1 and CNA2 gene products) of mammalian calcineurin, a calmodulin-regulated phosphoprotein phosphatase 86. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88**, 7376-7380.
- Cyert MS, Thorner J (1992) Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol.Cell Biol.* **12**, 3460-3469.
- Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE, Gustin MC (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 D (2003) Adaptation to environmental pH in *Candida albicans* and its relation to pathogenesis. *Curr.Genet.* **44**, 1-7.
- Davis D, Wilson RB, Mitchell AP (2000) RIM101-dependent and -independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biology* **20**, 971-978.
- De Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, Klis FM (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 Steensma HY, de Jonge P, Kaptein A, Kaback DB (1989) Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: localization of a repeated sequence containing an acid phosphatase gene near a telomere of chromosome I and chromosome VIII. *Curr.Genet.* **16**, 131-137.
- Denis V, Cyert MS (2002) Internal Ca²⁺ release in yeast is triggered by hypertonic shock and mediated by a TRP channel homologue. *J.Cell Biol.* **156**, 29-34.
- Denison SH, Negrete-Urtasun S, Mingot JM, Tilburn J, Mayer WA, Goel A, Espeso EA, Penalva MA, Arst HN, Jr. (1998) Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *saccharomyces* are homologous. *Mol.Microbiol.* **30**, 259-264.
- Denison SH, Orejas M, Arst HN (1995) Signaling of Ambient Ph in *Aspergillus* Involves A Cysteine Protease. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 28519-28522.
- Diez E, Alvaro J, Espeso EA, Rainbow L, Suarez T, Tilburn J, Arst HN, Penalva MA (2002) Activation of the *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor requires two proteolytic steps. *Embo Journal* **21**, 1350-1359.
- Dix DR, Bridgham JT, Broderius MA, Byersdorfer CA, Eide DJ (1994) The FET4 gene encodes the low affinity Fe(II) transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **269**, 26092-26099.
- Dodou E, Treisman R (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, Gartner A, Ammerer G, Errede B, Shinkawa H, Sugimoto K, Matsumoto K (1994) MSG5, a novel protein phosphatase promotes adaptation to pheromone response in *S. cerevisiae*. *EMBO J.* **13**, 61-70.

REFERENCIAS

Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K (1995) Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol.Reprod.Dev.* **42**, 477-485.

Espeso EA, Roncal T, Diez E, Rainbow L, Bignell E, Alvaro J, Suarez T, Denison SH, Tilburn J, Arst HN, Jr., Penalva MA (2000) On how a transcription factor can avoid its proteolytic activation in the absence of signal transduction. *EMBO J.* **19**, 719-728.

Espeso EA, Tilburn J, Sanchez-Pulido L, Brown CV, Valencia A, Arst HN, Jr., Penalva MA (1997) Specific DNA recognition by the *Aspergillus nidulans* three zinc finger transcription factor PacC. *J.Mol.Biol.* **274**, 466-480.

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

Foor F, Parent SA, Morin N, Dahl AM, Ramadan N, Chrebet G, Bostian KA, Nielsen JB (1992) Calcineurin mediates inhibition by FK506 and cyclosporin of recovery from alpha-factor arrest in yeast. *Nature* **360**, 682-684.

Foury F, Roganti T (2002) Deletion of the mitochondrial carrier genes MRS3 and MRS4 suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J.Biol.Chem.* **277**, 24475-24483.

Futai E, Maeda T, Sorimachi H, Kitamoto K, Ishiura S, Suzuki K (1999) The protease activity of a calpain-like cysteine protease in *Saccharomyces cerevisiae* is required for alkaline adaptation and sporulation. *Mol.Gen.Genet.* **260**, 559-568.

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

Garcia-Rodriguez LJ, Valle R, Duran A, Roncero C (2005) Cell integrity signaling activation in response to hyperosmotic shock in yeast. *FEBS Lett.* **579**, 6186-6190.

Garciadeblas B, Rubio F, Quintero FJ, Banuelos MA, Haro R, Rodriguez-Navarro A (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **236**, 363-368.

Garland SA, Hoff K, Vickery LE, Culotta VC (1999) *Saccharomyces cerevisiae* ISU1 and ISU2: members of a well-conserved gene family for iron-sulfur cluster assembly. *J.Mol.Biol.* **294**, 897-907.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol.Biol.Cell* **11**, 4241-4257.

Georgatsou E, Alexandraki D (1994) Two distinctly regulated genes are required for ferric reduction, the first step of iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **14**, 3065-3073.

Georgatsou E, Mavrogiannis LA, Fragiadakis GS, Alexandraki D (1997) The yeast Fre1p/Fre2p cupric reductases facilitate copper uptake and are regulated by the copper-modulated Mac1p activator. *J.Biol.Chem.* **272**, 13786-13792.

Giaever G, Chu AM, Ni L, Connelly C, Riles L, Veronneau S, Dow S, Lucau-Danila A, Anderson K, Andre B, Arkin AP, Astromoff A, El Bakkoury M, Bangham R, Benito R, Brachat S, Campanaro S, Curtiss M, Davis K, Deutschbauer A, Entian KD, Flaherty P, Foury F, Garfinkel DJ, Gerstein M,

- Gotte D, Guldener U, Hegemann JH, Hempel S, Herman Z, Jaramillo DF, Kelly DE, Kelly SL, Kotter P, LaBonte D, Lamb DC, Lan N, Liang H, Liao H, Liu L, Luo C, Lussier M, Mao R, Menard P, Ooi SL, Revuelta JL, Roberts CJ, Rose M, Ross-Macdonald P, Scherens B, Schimmack G, Shafer B, Shoemaker DD, Sookhai-Mahadeo S, Storms RK, Strathern JN, Valle G, Voet M, Volckaert G, Wang CY, Ward TR, Wilhelmy J, Winzeler EA, Yang Y, Yen G, Youngman E, Yu K, Bussey H, Boeke JD, Snyder M, Philippsen P, Davis RW, Johnston M (2002) Functional profiling of the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Nature* **418**, 387-391.
- Goodman J, Rothstein A (1957) The active transport of phosphate into the yeast cell. *J.Gen.Physiol* **40**, 915-923.
- Gralla EB, Thiele DJ, Silar P, Valentine JS (1991) ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **88**, 8558-8562.
- Gray JV, Ogas JP, Kamada Y, Stone M, Levin DE, Herskowitz I (1997) A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J.* **16**, 4924-4937.
- Harrison JC, Bardes ES, Ohya Y, Lew DJ (2001) A role for the Pkc1p/Mpk1p kinase cascade in the morphogenesis checkpoint. *Nat.Cell Biol.* **3**, 417-420.
- Harrison JC, Zyla TR, Bardes ES, Lew DJ (2004) Stress-specific activation mechanisms for the "cell integrity" MAPK pathway. *J.Biol.Chem.* **279**, 2616-2622.
- Heath VL, Shaw SL, Roy S, Cyert MS (2004) Hph1p and Hph2p, novel components of calcineurin-mediated stress responses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot.Cell* **3**, 695-704.
- Heese-Peck A, Pichler H, Zanolari B, Watanabe R, Daum G, Riezman H (2002) Multiple functions of sterols in yeast endocytosis. *Mol.Biol.Cell* **13**, 2664-2680.
- Herranz S, Rodriguez JM, Bussink HJ, Sanchez-Ferrero JC, Arst HN, Jr., Penalva MA, Vincent O (2005) Arrestin-related proteins mediate pH signaling in fungi. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **102**, 12141-12146.
- Hilioti Z, Cunningham KW (2003) The RCN family of calcineurin regulators. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **311**, 1089-1093.
- Hilioti Z, Gallagher DA, Low-Nam ST, Ramaswamy P, Gajer P, Kingsbury TJ, Birchwood CJ, Levchenko A, Cunningham KW (2004) GSK-3 kinases enhance calcineurin signaling by phosphorylation of RCNs. *Genes Dev.* **18**, 35-47.
- Hong SK, Han SB, Snyder M, Choi EY (1999) SHC1, a high pH inducible gene required for growth at alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 116-122.
- Iida H, Nakamura H, Ono T, Okumura MS, Anraku Y (1994) MID1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca²⁺ influx and mating. *Mol.Cell Biol.* **14**, 8259-8271.
- Ikner A, Shiozaki K (2005) Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat.Res.* **569**, 13-27.
- Irie K, Takase M, Lee KS, Levin DE, Araki H, Matsumoto K, Oshima Y (1993) MKK1 and MKK2, which encode *Saccharomyces cerevisiae* mitogen-activated protein kinase-kinase homologs, function in the pathway mediated by protein kinase C. *Mol.Cell Biol.* **13**, 3076-3083.

REFERENCIAS

- Jacoby JJ, Nilius SM, Heinisch JJ (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.
- Jamieson DJ (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**, 1511-1527.
- Jung US, Levin DE (1999) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol.Microbiol.* **34**, 1049-1057.
- Jung US, Sobering AK, Romeo MJ, Levin DE (2002) Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol.Microbiol.* **46**, 781-789.
- Kafadar KA, Cyert MS (2004) Integration of stress responses: modulation of calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae* by protein kinase A. *Eukaryot.Cell* **3**, 1147-1153.
- Kafadar KA, Zhu H, Snyder M, Cyert MS (2003) Negative regulation of calcineurin signaling by Hrr25p, a yeast homolog of casein kinase I. *Genes Dev.* **17**, 2698-2708.
- Kaffman A, Herskowitz I, Tjian R, O'Shea EK (1994) Phosphorylation of the transcription factor PHO4 by a cyclin-CDK complex, PHO80-PHO85. *Science* **263**, 1153-1156.
- Kaffman A, Rank NM, O'Neill EM, Huang LS, O'Shea EK (1998a) The receptor Msn5 exports the phosphorylated transcription factor Pho4 out of the nucleus. *Nature* **396**, 482-486.
- Kaffman A, Rank NM, O'Shea EK (1998b) Phosphorylation regulates association of the transcription factor Pho4 with its import receptor Pse1/Kap121. *Genes Dev.* **12**, 2673-2683.
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE (1995) The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* **9**, 1559-1571.
- Kamada Y, Qadota H, Python CP, Anraku Y, Ohya Y, Levin DE (1996) Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J.Biol.Chem.* **271**, 9193-9196.
- Kane PM (2006) The where, when, and how of organelle acidification by the yeast vacuolar H⁺-ATPase. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **70**, 177-191.
- Kaneko Y, Hayashi N, Toh-e A, Banno I, Oshima Y (1987) Structural characteristics of the PHO8 gene encoding repressible alkaline phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **58**, 137-148.
- Ketela T, Green R, Bussey H (1999) *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J.Bacteriol.* **181**, 3330-3340.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PW (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 185-202.
- Klis FM, Mol P, Hellingwerf K, Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol.Rev.* **26**, 239-256.
- Kopecka M, Gabriel M (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.
- Krause SA, Gray JV (2002) The protein kinase C pathway is required for viability in quiescence in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Biol.* **12**, 588-593.

- Kumble KD, Kornberg A (1996) Endopolyphosphatases for long chain inorganic polyphosphate in yeast and mammals. *J.Biol.Chem.* **271**, 27146-27151.
- Kuno T, Tanaka H, Mukai H, Chang CD, Hiraga K, Miyakawa T, Tanaka C (1991) cDNA cloning of a calcineurin B homolog in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **180**, 1159-1163.
- Labbe S, Zhu Z, Thiele DJ (1997) Copper-specific transcriptional repression of yeast genes encoding critical components in the copper transport pathway. *J.Biol.Chem.* **272**, 15951-15958.
- Lagorce A, Hauser NC, Labourdette D, Rodriguez C, Martin-Yken H, Arroyo J, Hoheisel JD, Francois J (2003) Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **278**, 20345-20357.
- Lamb TM, Mitchell AP (2003) The transcription factor Rim101p governs ion tolerance and cell differentiation by direct repression of the regulatory genes NRG1 and SMP1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **23**, 677-686.
- Lamb TM, Xu W, Diamond A, Mitchell AP (2001) Alkaline response genes of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J.Biol.Chem.* **276**, 1850-1856.
- Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE (1993) A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol.Cell Biol.* **13**, 3067-3075.
- Lee KS, Levin DE (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.
- Levin DE (2005) Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **69**, 262-291.
- Levin DE, Bowers B, Chen CY, Kamada Y, Watanabe M (1994) Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol.Biol.Res.* **40**, 229-239.
- Levin DE, Fields FO, Kunisawa R, Bishop JM, Thorner J (1990) A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**, 213-224.
- Li WS, Mitchell AP (1997) Proteolytic activation of rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**, 63-73.
- Lillie SH, Brown SS (1994) Immunofluorescence localization of the unconventional myosin, Myo2p, and the putative kinesin-related protein, Smy1p, to the same regions of polarized growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Cell Biol.* **125**, 825-842.
- Lin SJ, Pufahl RA, Dancis A, O'Halloran TV, Culotta VC (1997) A role for the *Saccharomyces cerevisiae* ATX1 gene in copper trafficking and iron transport. *J.Biol.Chem.* **272**, 9215-9220.
- Lipke PN, Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J.Bacteriol.* **180**, 3735-3740.
- Liu XF, Culotta VC (1994) The requirement for yeast superoxide dismutase is bypassed through mutations in BSD2, a novel metal homeostasis gene. *Mol.Cell Biol.* **14**, 7037-7045.
- Liu Y, Ishii S, Tokai M, Tsutsumi H, Ohki O, Akada R, Tanaka K, Tsuchiya E, Fukui S, Miyakawa T (1991) The *Saccharomyces cerevisiae* genes (CMP1 and CMP2) encoding calmodulin-binding proteins homologous to the catalytic subunit of mammalian protein phosphatase 2B. *Mol.Gen.Genet.* **227**, 52-59.

REFERENCIAS

- Lodder AL, Lee TK, Ballester R (1999) Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **152**, 1487-1499.
- Lommel M, Bagnat M, Strahl S (2004) Aberrant processing of the WSC family and Mid2p cell surface sensors results in cell death of *Saccharomyces cerevisiae* O-mannosylation mutants. *Mol.Cell Biol.* **24**, 46-57.
- Maccheroni W, Jr., May GS, Martinez-Rossi NM, Rossi A (1997) The sequence of palF, an environmental pH response gene in *Aspergillus nidulans*. *Gene* **194**, 163-167.
- Madden K, Sheu YJ, Baetz K, Andrews B, Snyder M (1997) SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science* **275**, 1781-1784.
- Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC (1973a) The structure of a beta-(1 leads to 3)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem.J.* **135**, 19-30.
- Manners DJ, Masson AJ, Patterson JC, Bjorndal H, Lindberg B (1973b) The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls. *Biochem.J.* **135**, 31-36.
- Martin H, Arroyo J, Sanchez M, Molina M, Nombela C (1993) Activity of the yeast MAP kinase homologue Slt2 is critically required for cell integrity at 37 degrees C. *Mol.Gen.Genet.* **241**, 177-184.
- Martin H, Rodriguez-Pachon JM, Ruiz C, Nombela C, Molina M (2000) Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slt2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **275**, 1511-1519.
- Martinez P, Persson BL (1998) Identification, cloning and characterization of a derepressible Na⁺-coupled phosphate transporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **258**, 628-638.
- Martins LJ, Jensen LT, Simon JR, Keller GL, Winge DR (1998) Metalloregulation of FRE1 and FRE2 homologs in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **273**, 23716-23721.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW (1997) Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **11**, 3445-3458.
- Matsumoto TK, Ellsmore AJ, Cessna SG, Low PS, Pardo JM, Bressan RA, Hasegawa PM (2002) An osmotically induced cytosolic Ca²⁺ transient activates calcineurin signaling to mediate ion homeostasis and salt tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **277**, 33075-33080.
- Mattison CP, Spencer SS, Kresge KA, Lee J, Ota IM (1999) Differential regulation of the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase pathway in budding yeast by the protein tyrosine phosphatases Ptp2 and Ptp3. *Mol.Cell Biol.* **19**, 7651-7660.
- Mendizabal I, Pascual-Ahuir A, Serrano R, de Larrinoa IF (2001) Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast ENA1 gene. *Mol.Genet.Genomics* **265**, 801-811.
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **269**, 8792-8796.
- Mingot JM, Espeso EA, Diez E, Penalva MA (2001) Ambient pH signaling regulates nuclear localization of the *Aspergillus nidulans* PacC transcription factor. *Molecular and Cellular Biology* **21**, 1688-1699.

- Mingot JM, Tilburn J, Diez E, Bignell E, Orejas M, Widdick DA, Sarkar S, Brown CV, Caddick MX, Espeso EA, Arst HN, Jr., Penalva MA (1999) Specificity determinants of proteolytic processing of *Aspergillus* PacC transcription factor are remote from the processing site, and processing occurs in yeast if pH signalling is bypassed. *Mol. Cell Biol.* **19**, 1390-1400.
- Mizunuma M, Hirata D, Miyahara K, Tsuchiya E, Miyakawa T (1998) Role of calcineurin and Mpk1 in regulating the onset of mitosis in budding yeast. *Nature* **392**, 303-306.
- Mizunuma M, Hirata D, Miyaoka R, Miyakawa T (2001) GSK-3 kinase Mck1 and calcineurin coordinately mediate Hsl1 down-regulation by Ca²⁺ in budding yeast. *EMBO J.* **20**, 1074-1085.
- Moye-Rowley WS (2003) Regulation of the transcriptional response to oxidative stress in fungi: similarities and differences. *Eukaryot. Cell* **2**, 381-389.
- Muhlschlegel FA, Fonzi WA (1997) PHR2 of *Candida albicans* encodes a functional homolog of the pH-Regulated gene PHR1 with an inverted pattern of pH-dependent expression. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 5960-5967.
- Munn AL, Riezman H (1994) Endocytosis is required for the growth of vacuolar H(+)-ATPase-defective yeast: identification of six new END genes. *The Journal of Cell Biology* **127**, 373-386.
- Negrete-Urtasun S, Denison SH, Arst HN, Jr. (1997) Characterization of the pH signal transduction pathway gene *palA* of *Aspergillus nidulans* and identification of possible homologs. *J. Bacteriol.* **179**, 1832-1835.
- Negrete-Urtasun S, Reiter W, Diez E, Denison SH, Tilburn J, Espeso EA, Penalva MA, Arst HN, Jr. (1999) Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Mol. Microbiol.* **33**, 994-1003.
- Nelson H, Nelson N (1990) Disruption of Genes Encoding Subunits of Yeast Vacuolar H⁺-ATPase Causes Conditional Lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 3503-3507.
- Neves MJ, Francois J (1992) On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **288 (Pt 3)**, 859-864.
- Nonaka H, Tanaka K, Hirano H, Fujiwara T, Kohno H, Umikawa M, Mino A, Takai Y (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.
- Ogawa N, DeRisi J, Brown PO (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4309-4321.
- Ooi CE, Rabinovich E, Dancis A, Bonifacino JS, Klausner RD (1996) Copper-dependent degradation of the *Saccharomyces cerevisiae* plasma membrane copper transporter Ctr1p in the apparent absence of endocytosis. *EMBO J.* **15**, 3515-3523.
- Orejas M, Espeso EA, Tilburn J, Sarkar S, Arst HN, Penalva MA (1995) Activation of the *Aspergillus* PacC Transcription Factor in Response to Alkaline Ambient Ph Requires Proteolysis of the Carboxy-Terminal Moiety. *Genes & Development* **9**, 1622-1632.
- Oshima Y (1997) The phosphatase system in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Genet. Syst.* **72**, 323-334.

REFERENCIAS

- Ozaki K, Tanaka K, Imamura H, Hihara T, Kameyama T, Nonaka H, Hirano H, Matsuura Y, Takai Y (1996) Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 2196-2207.
- Paidhungat M, Garrett S (1997) A homolog of mammalian, voltage-gated calcium channels mediates yeast pheromone-stimulated Ca²⁺ uptake and exacerbates the cdc1(Ts) growth defect. *Mol.Cell Biol.* **17**, 6339-6347.
- Palmer CP, Zhou XL, Lin J, Loukin SH, Kung C, Saimi Y (2001) A TRP homolog in *Saccharomyces cerevisiae* forms an intracellular Ca(2+)-permeable channel in the yeast vacuolar membrane. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 7801-7805.
- Paravicini G, Friedli L (1996) Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol.Gen.Genet.* **251**, 682-691.
- Parsons AB, Brost RL, Ding H, Li Z, Zhang C, Sheikh B, Brown GW, Kane PM, Hughes TR, Boone C (2004) Integration of chemical-genetic and genetic interaction data links bioactive compounds to cellular target pathways. *Nat.Biotechnol.* **22**, 62-69.
- Pattison-Granberg J, Persson BL (2000) Regulation of cation-coupled high-affinity phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **182**, 5017-5019.
- Penalva MA, Arst HN, Jr. (2002) Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeasts. *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**, 426-46, table.
- Penalva MA, Arst HN (2004) Recent advances in the characterization of ambient pH regulation of gene expression in filamentous fungi and yeasts. *Annual Review of Microbiology* **58**, 425-451.
- Persson BL, Lagerstedt JO, Pratt JR, Pattison-Granberg J, Lundh K, Shokrollahzadeh S, Lundh F (2003) Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr.Genet.* **43**, 225-244.
- Persson BL, Petersson J, Fristedt U, Weinander R, Berhe A, Pattison J (1999) Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim.Biophys.Acta* **1422**, 255-272.
- Peterson J, Zheng Y, Bender L, Myers A, Cerione R, Bender A (1994) Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J.Cell Biol.* **127**, 1395-1406.
- Philip B, Levin DE (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.
- Polizotto RS, Cyert MS (2001) Calcineurin-dependent nuclear import of the transcription factor Crz1p requires Nmd5p. *J.Cell Biol.* **154**, 951-960.
- Porta A, Ramon AM, Fonzi WA (1999) PRR1, a homolog of *Aspergillus nidulans* palF, controls pH-dependent gene expression and filamentation in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **181**, 7516-7523.
- Portnoy ME, Jensen LT, Culotta VC (2002) The distinct methods by which manganese and iron regulate the Nramp transporters in yeast. *Biochem.J.* **362**, 119-124.
- Portnoy ME, Liu XF, Culotta VC (2000) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three functionally distinct homologues of the nramp family of metal transporters. *Mol.Cell Biol.* **20**, 7893-7902.

- Pozos TC, Sekler I, Cyert MS (1996) The product of HUM1, a novel yeast gene, is required for vacuolar Ca²⁺/H⁺ exchange and is related to mammalian Na⁺/Ca²⁺ exchangers. *Mol.Cell Biol.* **16**, 3730-3741.
- Proft M, Serrano R (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated ENA1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol.Cell Biol.* **19**, 537-546.
- Protchenko O, Ferea T, Rashford J, Tiedeman J, Brown PO, Botstein D, Philpott CC (2001) Three cell wall mannoproteins facilitate the uptake of iron in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **276**, 49244-49250.
- Qi M, Elion EA (2005) MAP kinase pathways. *J.Cell Sci.* **118**, 3569-3572.
- Rajavel M, Philip B, Buehrer BM, Errede B, Levin DE (1999) Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **19**, 3969-3976.
- Ramon AM, Porta A, Fonzi WA (1999) Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by PRR2. *Journal of Bacteriology* **181**, 7524-7530.
- Rao NN, Liu S, Kornberg A (1998) Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J.Bacteriol.* **180**, 2186-2193.
- Reinoso-Martin C, Schuller C, Schuetzler-Muehlbauer M, Kuchler K (2003) The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot.Cell* **2**, 1200-1210.
- Roberts RL, Bowers B, Slater ML, Cabib E (1983) Chitin synthesis and localization in cell division cycle mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Cell Biol.* **3**, 922-930.
- Roberts CJ, Nelson B, Marton MJ, Stoughton R, Meyer MR, Bennett HA, He YD, Dai H, Walker WL, Hughes TR, Tyers M, Boone C, Friend SH (2000) Signaling and circuitry of multiple MAPK pathways revealed by a matrix of global gene expression profiles. *Science* **287**, 873-880.
- Roncero C, Duran A (1985) Effect of Calcofluor white and Congo red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *J.Bacteriol.* **163**, 1180-1185.
- Rudolph HK, Antebi A, Fink GR, Buckley CM, Dorman TE, LeVitre J, Davidow LS, Mao JI, Moir DT (1989) The yeast secretory pathway is perturbed by mutations in PMR1, a member of a Ca²⁺ ATPase family. *Cell* **58**, 133-145.
- Rutherford JC, Jaron S, Ray E, Brown PO, Winge DR (2001) A second iron-regulatory system in yeast independent of Aft1p. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **98**, 14322-14327.
- Saporitoirwin SM, Birse CE, Sypherd PS, Fonzi WA (1995) Phr1, A Ph-Regulated Gene of *Candida-Albicans*, Is Required for Morphogenesis. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 601-613.
- Schilke B, Voisine C, Beinert H, Craig E (1999) Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S A* **96**, 10206-10211.
- Schmelzle T, Helliwell SB, Hall MN (2002) Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol.Cell Biol.* **22**, 1329-1339.
- Schmidt A, Schmelzle T, Hall MN (2002) The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **45**, 1433-1441.

REFERENCIAS

- Schneider KR, Smith RL, O'Shea EK (1994) Phosphate-regulated inactivation of the kinase PHO80-PHO85 by the CDK inhibitor PHO81. *Science* **266**, 122-126.
- Serrano R (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int.Rev.Cytol.* **165**, 1-52.
- Serrano R, Bernal D, Simon E, Arino J (2004) Copper and iron are the limiting factors for growth of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in an alkaline environment. *J.Biol.Chem.* **279**, 19698-19704.
- Skulachev VP (2002) Programmed death in yeast as adaptation? *FEBS Lett.* **528**, 23-26.
- Sopko R, Huang D, Preston N, Chua G, Papp B, Kafadar K, Snyder M, Oliver SG, Cyert M, Hughes TR, Boone C, Andrews B (2006) Mapping pathways and phenotypes by systematic gene overexpression. *Mol.Cell* **21**, 319-330.
- Stathopoulos AM, Cyert MS (1997) Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev.* **11**, 3432-3444.
- Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A (1996) A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* **271**, 1552-1557.
- Stevens TH, Forgac M (1997) STRUCTURE, FUNCTION AND REGULATION OF THE VACUOLAR (H⁺)-ATPase. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**, 779-808.
- Su SS, Mitchell AP (1993a) Molecular characterization of the yeast meiotic regulatory gene RIM1. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3789-3797.
- Su SSY, Mitchell AP (1993b) Identification of Functionally Related Genes That Stimulate Early Meiotic Gene-Expression in Yeast. *Genetics* **133**, 67-77.
- Swain E, Stuke J, McDonough V, Germann M, Liu Y, Sturley SL, Nickels JT, Jr. (2002) Yeast cells lacking the ARV1 gene harbor defects in sphingolipid metabolism. Complementation by human ARV1. *J.Biol.Chem.* **277**, 36152-36160.
- Tamai Y, Tohe A, Oshima Y (1985) Regulation of Inorganic-Phosphate Transport-Systems in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **164**, 964-968.
- Thiele DJ (1988) ACE1 regulates expression of the *Saccharomyces cerevisiae* metallothionein gene. *Mol.Cell Biol.* **8**, 2745-2752.
- Tilburn J, Sarkar S, Widdick DA, Espeso EA, Orejas M, Mungroo J, Penalva MA, Arst HN, Jr. (1995) The *Aspergillus* PacC zinc finger transcription factor mediates regulation of both acid- and alkaline-expressed genes by ambient pH. *EMBO J.* **14**, 779-790.
- Toh-e A, Kakimoto S (1975) Genes coding for the structure of the acid phosphatases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Gen.Genet.* **143**, 65-70.
- Tokes-Fuzesi M, Bedwell DM, Repa I, Sipos K, Sumegi B, Rab A, Miseta A (2002) Hexose phosphorylation and the putative calcium channel component Mid1p are required for the hexose-induced transient elevation of cytosolic calcium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol.Microbiol.* **44**, 1299-1308.
- Torres J, Di Como CJ, Herrero E, de la Torre-Ruiz MA (2002) Regulation of the cell integrity pathway by rapamycin-sensitive TOR function in budding yeast. *J.Biol.Chem.* **277**, 43495-43504.
- Urbanowski JL, Piper RC (1999) The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. *J.Biol.Chem.* **274**, 38061-38070.

- van der Rest ME, Kamminga AH, Nakano A, Anraku Y, Poolman B, Konings WN (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol.Rev.* **59**, 304-322.
- van Drogen F, Peter M (2002) Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr.Biol.* **12**, 1698-1703.
- Vay HA, Philip B, Levin DE (2004) Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology* **150**, 3281-3288.
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R (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.
- Viladevall L, Serrano R, Ruiz A, Domenech G, Giraldo J, Barcelo A, Arino J (2004) Characterization of the calcium-mediated response to alkaline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **279**, 43614-43624.
- Vilella F, Herrero E, Torres J, de la Torre-Ruiz MA (2005) Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J.Biol.Chem.* **280**, 9149-9159.
- Vincent O, Rainbow L, Tilburn J, Arst HN, Penalva MA (2003) YPXL/I is a protein interaction motif recognized by *Aspergillus* PalA and its human homologue, AIP1/Alix. *Molecular and Cellular Biology* **23**, 1647-1655.
- Watanabe Y, Takaesu G, Hagiwara M, Irie K, Matsumoto K (1997) Characterization of a serum response factor-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, Rlm1, which has transcriptional activity regulated by the Mpk1 (Slr2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol.Cell Biol.* **17**, 2615-2623.
- Winkler A, Arkind C, Mattison CP, Burkholder A, Knoche K, Ota I (2002) Heat stress activates the yeast high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway, and protein tyrosine phosphatases are essential under heat stress. *Eukaryot.Cell* **1**, 163-173.
- Withee JL, Sen R, Cyert MS (1998) Ion tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* lacking the Ca²⁺/CaM-dependent phosphatase (calcineurin) is improved by mutations in URE2 or PMA1. *Genetics* **149**, 865-878.
- Wurst H, Shiba T, Kornberg A (1995) The gene for a major exopolyphosphatase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Bacteriol.* **177**, 898-906.
- Wykoff DD, O'Shea EK (2001) Phosphate transport and sensing in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **159**, 1491-1499.
- Xu W, Mitchell AP (2001) Yeast PalA/AIP1/Alix homolog Rim20p associates with a PEST-like region and is required for its proteolytic cleavage. *J.Bacteriol.* **183**, 6917-6923.
- Yamaguchi-Iwai Y, Serpe M, Haile D, Yang W, Kosman DJ, Klausner RD, Dancis A (1997) Homeostatic regulation of copper uptake in yeast via direct binding of MAC1 protein to upstream regulatory sequences of FRE1 and CTR1. *J.Biol.Chem.* **272**, 17711-17718.
- Yamaguchi-Iwai Y, Stearman R, Dancis A, Klausner RD (1996) Iron-regulated DNA binding by the AFT1 protein controls the iron regulon in yeast. *EMBO J.* **15**, 3377-3384.

REFERENCIAS

- Yamaguchi-Iwai Y, Ueta R, Fukunaka A, Sasaki R (2002) Subcellular localization of Aft1 transcription factor responds to iron status in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **277**, 18914-18918.
- Yenush L, Mulet JM, Arino J, Serrano R (2002) The Ppz protein phosphatases are key regulators of K⁺ and pH homeostasis: implications for salt tolerance, cell wall integrity and cell cycle progression. *EMBO J.* **21**, 920-929.
- Yokoyama H, Mizunuma M, Okamoto M, Yamamoto J, Hirata D, Miyakawa T (2006) Involvement of calcineurin-dependent degradation of Yap1p in Ca²⁺-induced G(2) cell-cycle regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.*
- Yoshimoto H, Saltsman K, Gasch AP, Li HX, Ogawa N, Botstein D, Brown PO, Cyert MS (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J.Biol.Chem.* **277**, 31079-31088.
- Yuan DS, Stearman R, Dancis A, Dunn T, Beeler T, Klausner RD (1995) The Menkes/Wilson disease gene homologue in yeast provides copper to a ceruloplasmin-like oxidase required for iron uptake. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**, 2632-2636.
- Yun CW, Tiedeman JS, Moore RE, Philpott CC (2000) Siderophore-iron uptake in *saccharomyces cerevisiae*. Identification of ferrichrome and fusarinine transporters. *J.Biol.Chem.* **275**, 16354-16359.
- Zarzov P, Mazzoni C, Mann C (1996) The SLT2(MPK1) MAP kinase is activated during periods of polarized cell growth in yeast. *EMBO J.* **15**, 83-91.
- Zhao C, Jung US, Garrett-Engle P, Roe T, Cyert MS, Levin DE (1998) Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol.Cell Biol.* **18**, 1013-1022.

6. ARTÍCULOS

ARTÍCULO 1

The transcriptional response to alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*: evidence for calcium-mediated signalling

Raquel Serrano,¹ Amparo Ruiz,¹ Dolores Bernal,¹ James R. Chambers² and Joaquín Ariño^{1*}

¹Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, E-08193, Barcelona, Spain.

²Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA 92008, USA.

Summary

The short-time transcriptional response of yeast cells to a mild increase in external pH (7.6) has been investigated using DNA microarrays. A total of 150 genes increased their mRNA level at least twofold within 45 min. Alkalinization resulted in the repression of 232 genes. The response of four upregulated genes, *ENA1* (encoding a Na⁺-ATPase also induced by saline stress) and *PHO84*, *PHO89* and *PHO12* (encoding genes upregulated by phosphate starvation), was characterized further. The alkaline response of *ENA1* was not affected by mutation of relevant genes involved in osmotic or oxidative signalling, but was decreased in calcineurin and *rim101* mutants. Mapping of the *ENA1* promoter revealed two pH-responsive regions. The response of the upstream region was fully abolished by the drug FK506 or mutation of *CRZ1* (a transcription factor activated by calcium/calcineurin), whereas the response of the downstream region was essentially calcium independent. *PHO84* and *PHO12* responses were unaffected in *crz1* cells, but required the presence of Pho2 and Pho4. In contrast, part of the alkali-induced expression of *PHO89* was maintained in *pho4* or *pho2* cells, but was fully abolished in a *crz1* strain or in the presence of FK506. Heterologous promoters carrying the minimal calcineurin-dependent response elements found in *ENA1* or *FKS2* were able to drive alkaline pH-induced expression. These results demonstrate that the transcriptional response to alkaline pH involves different signalling mechanisms, and that calcium signalling is a relevant component of this response.

Accepted 4 September, 2002. *For correspondence. E-mail Joaquín. Ariño@uab.es; Tel. (+34) 93 581 2182; Fax (+34) 93 581 2006.

Introduction

Fast adaptation to stressing environmental changes is often a requirement for cell survival. Although post-transcriptional mechanisms can play an important role in stress response, in many cases, adaptation involves remodelling gene expression and is mediated by induction or repression of a more or less specific set of genes (Estruch, 2000).

Saccharomyces cerevisiae grows well in a relatively wide range of external pH, although it proliferates more rapidly at acidic pH. An important factor for the maintenance of an acidic environment is the yeast plasma membrane H⁺-ATPase, which actively extrudes protons. This activity generates a proton gradient, which drives the import of many nutrients and cations (van der Rest *et al.*, 1995; Serrano, 1996) and is essential for survival. Therefore, even exposure to a mild alkaline environment can be considered as a stress condition.

Regulation of gene expression by alkaline pH was first identified in the fungi *Aspergillus nidulans*, which facilitates adaptation for growth at a very wide pH range, and it has also been described in other fungi, such as *Candida albicans*, in this case linked to filamentous growth (for a review, see Denison, 2000). The response to alkaline pH in *A. nidulans* relies on the proteolytic activation of the PacC transcription factor. Homologues of this factor have been found in *S. cerevisiae* (Rim101), *Yarrowia lipolytica* and *C. albicans* (Lambert *et al.*, 1997; Li and Mitchell, 1997; Ramón *et al.*, 1999). At least in part, the transduction pathway that leads to the activation of the transcription factor is also conserved (Denison *et al.*, 1998). However, some aspects of the signalling mechanisms in *A. nidulans* do not reproduce fully in other fungi. For instance, cleavage of Rim101 occurs under both acidic and alkaline growth environments (Li and Mitchell, 1997), and the possibility of Rim101-independent pathways has been postulated recently in *C. albicans* (Davis *et al.*, 2000) and *Saccharomyces cerevisiae* (Lamb *et al.*, 2001).

In contrast to other fungi, the study of alkaline response in *S. cerevisiae* has received little attention. This is somewhat surprising, as the powerful genetics and genomics of budding yeast make this model organism a great tool for increasing our relatively scarce knowledge about how

pH changes are detected, and how this information is internalized and transmitted. Furthermore, as external pH is very easy and inexpensive to monitor and modify, the promoters of alkali-inducible genes may represent useful tools for large-scale gene expression. However, when this work was initiated, the number of *Saccharomyces* genes known to be responsive to alkalinization of the medium was surprisingly small: *ENA1*, encoding a P-type Na⁺-ATPase essential for sodium detoxification (Garcia-deblás *et al.*, 1993; Mendoza *et al.*, 1994), *SHC1* and *SCY1* (Hong *et al.*, 1999), and only during its development has more extensive information on the transcriptional response of *S. cerevisiae* cells to alkaline conditions become available (Causton *et al.*, 2001; Lamb *et al.*, 2001). The first report evaluated the genomic response to a rather large pH shift (pH 4–8) and found 71 genes that increased expression at least 2.1-fold after 2 h. The second report provided a detailed time course analysis of the transcriptional response after shifting the cells from pH 6 to 7.9, identifying almost 500 genes induced at least threefold. These studies were based on different technologies, and their results showed a relatively poor overlap. In addition, we had experimental evidence for a number of genes that large strain-to-strain differences in the transcriptional response to alkaline pH could exist, suggesting that there could be additional pH regulation targets that could be missed. Furthermore, we considered that a more detailed study of the signalling pathways responsible for this transcriptional response was required to understand how budding yeast identifies and adapts to alkaline pH stress.

Consequently, we report here a genome-wide analysis of the short-term transcriptional response of yeast cells to a mild alkalization of the extracellular medium, followed by a detailed analysis of the response of the *ENA1*, *PHO84*, *PHO89* and *PHO12* genes, revealing that the alkaline response involves different components and that calcium signalling participates in this response.

Results

Genome-wide analysis of the yeast transcriptional response to alkaline pH

The response of the genome of *S. cerevisiae* to mild alkaline conditions has been evaluated by DNA microarray analysis. It has been shown that transcriptional responses differ substantially in their timing after stress and that monitoring at different time points is essential. For that reason, analysis was carried out using mRNA from wild-type yeast cells exposed to pH 7.6 for 5, 25 and 45 min. Our results indicate that 150 genes were induced at least twofold at one or more of the time points tested. They can be found, grouped into functional families, in Table 1. A significant number of genes involved in phosphate transport and metabolism, as well as in ion transport and homeostasis (particularly of copper and iron), appear to be upregulated by mild alkaline conditions. A remarkable effect on genes involved in transcription and RNA processing was also observed. More than one-third of the induced genes (57) did not have a well-characterized function. The response to alkaline pH was fast and transient in some cases, but slower and more sustained in others. About one-third of the genes (42 cases, denoted as 'E' in Table 1) showed a peak response after 5 min. This is a very fast response, comparable with that obtained for specific responsive genes after exposure of cells to osmotic stress. It should be noted, however, that only a subset of genes was responsive to both alkaline and saline stresses (see specific examples in Fig. 1, where the response of several genes of interest is documented by Northern blot analysis, and *Discussion*). The response of other genes, such as *FRE1*, *ARN3* and *FIT2*, was also confirmed using *LacZ* fusion assays (not shown).

We have also detected an at least threefold decrease in 232 genes, which are listed in Table 2, grouped into functional families. It is remarkable that the expression of

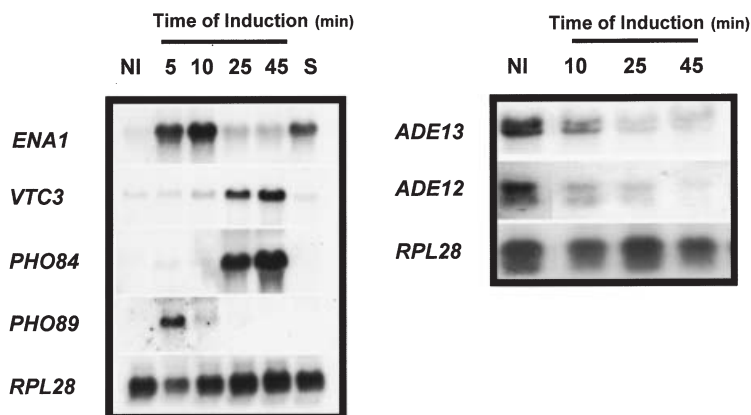


Fig. 1. Northern blot analysis of representative genes. Total RNA from cells grown in YPD at pH 6.4 (NI), exposed for the indicated times to pH 7.6 or for 10 min to 0.4 NaCl (S) was electrophoresed, transferred to membranes and probed with an *ENA1* *Xba*I–*Xba*I fragment (1.6 kbp) or the entire ORF of *VTC3/PHM2* (2.5 kbp), *PHO84* (1.7 kbp), *PHO89* (1.6 kbp), *RPL28A* (0.96 kbp), *ADE12* (1.3 kbp) and *ADE13* (1.4 kbp). The signal of *RPL28A*, unmodified after the treatments, is included for reference.

Table 1. Classification into functional families of ORFs whose transcripts are induced at least twofold after alkaline pH stress.

ORF	Gene	-Fold	Time	Function
Carbohydrate Metabolism / Energy				
YOR374W	<i>ALD4</i>	6.8	E	Mitochondrial aldehyde dehydrogenase
YPL061W	<i>ALD6</i>	5.0 (*)	I	Acetaldehyde dehydrogenase
YOR095C	<i>RKI1</i>	3.3	I	Ribose-5-phosphate ketol-isomerase
YEL071W	<i>DLD3</i>	3.9 (*)	I	D-lactate dehydrogenase
YIL162W	<i>SUC2</i>	4.6	E	Sucrose utilization
YDR178W	<i>SDH4</i>	2.4	E	Subunit succinate dehydrogenase complex
YCR005C	<i>CIT2</i>	4.1	I	Peroxisomal citrate synthase
Phosphate transport / metabolism				
YBR296C	<i>PHO89</i>	3.2	E	High-affinity Na ⁺ -phosphate symporter
YHR215W	<i>PHO12</i>	2.2	L	Inducible, secreted acid phosphatase
YML123C	<i>PHO84</i>	12.7	L	H ⁺ /phosphate permease
YJL012C	<i>VTC4</i>	2.9	I	Putative polyphosphate synthetase
YPL019C	<i>VTC3</i>	2.2	L	Putative polyphosphate synthetase
YER072W	<i>VTC1</i>	2.5	L	Putative polyphosphate synthetase
Other metabolism				
YLR303W	<i>MET17</i>	2.2	I	Methionine biosynthesis
YKL001C	<i>MET14</i>	4.2	I	Sulfate assimilation
YGL037C	<i>PNC1</i>	2.3	E	Pyridine nucleotide cycle
YML106W	<i>URA5</i>	5.0	I	Pyrimidine biosynthesis
YPL057C	<i>SUR1</i>	2.2	I	Sphingolipid metabolism
YLR056W	<i>ERG3</i>	2.1	L	Sterol metabolism
YOL165C	<i>AAD15</i>	2.8	I	Hypothetical aryl-alcohol dehydrogenase
YCR107W	<i>AAD3</i>	2.5	I	Putative aryl-alcohol dehydrogenase
YFL056C	<i>AAD6</i>	2.5	I	Probable aryl alcohol dehydrogenase
Ion transport & homeostasis / Other transports				
YBR158W	<i>CST13</i>	4.2	I	Cu ²⁺ ion homeostasis (putative)
YLR214W	<i>FRE1</i>	7.4	I	Iron and copper homeostasis
YOR382W	<i>FIT2</i>	6.6	L	Possibly involved in iron uptake
YPL135W	<i>ISU1</i>	2.3	I	Iron homeostasis
YEL065W	<i>ARN3</i>	5.4	I	Ferrioxamine B permease
YHL040C	<i>ARN1</i>	2.4	L	Transport of ferrichromes
YHL047C	<i>ARN2</i>	3.9	L	Triacetylfulvarin C transporter
YMR058W	<i>FET3</i>	2.6	L	Cell surface ferroxidase
YPR124W	<i>CTR1</i>	2.5	I	Required for high-affinity uptake of copper
YDR038C	<i>ENA5</i>	2.5	E	Na(+) ATPase
YDR040C	<i>ENA1</i>	2.0	E	Na(+) ATPase
YCR011C	<i>ADP1</i>	2.1	I	Putative ATP-dependent permease
YDR011W	<i>SNQ2</i>	3.1	I	Putative ATP-dependent permease
YGL077C	<i>HNM1</i>	2.2	E	Choline permease
YGR121C	<i>MEP1</i>	2.0	E	Ammonia permease
YHR092C	<i>HXT4</i>	2.3	E	Moderate- to low-affinity hexose transporter
YIL170W	<i>HXT12</i>	2.7	E	Hexose transporter
Transcription & RNA processing				
YBR112C	<i>CYC8</i>	2.9	I	General repressor
YBR154C	<i>RPB5</i>	7.2	I	Shared subunit of RNA pol. I, II, III
YCL066W	<i>HML₁</i>	2.3	I	Activates alpha-specific genes
YJR063W	<i>RPA12</i>	2.1	I	RNA polymerase I subunit
YKR025W	<i>RPC37</i>	2.0	I	RNA polymerase III 37 kDa subunit
YPR110C	<i>RPC40</i>	2.3	I	Shared subunit of RNA pol. I and III
YLR136C	<i>TIS11</i>	4.6	I	Pol II transcription
YDR395W	<i>SXM1</i>	2.3	I	mRNA export, nuclear protein targeting
YHR170W	<i>NMD3</i>	2.2	I	mRNA decay
YKL009W	<i>MRT4</i>	2.6	I	mRNA decay
YOL123W	<i>HRP1</i>	2.0	E	Nuclear poly(A) RNA-binding protein
YDR083W	<i>RRP8</i>	2.9	I	Ribosomal RNA processing
YHR169W	<i>DBP8</i>	2.1	I	RNA helicase
YJL116C	<i>NCA3</i>	9.7	I	RNA processing/modification
YDR087C	<i>RRP1</i>	3.8	I	rRNA processing
YJL033W	<i>HCA4</i>	3.5	I	rRNA processing
YOL142W	<i>RRP40</i>	2.2	I	rRNA processing
YDL051W	<i>LHP1</i>	2.3	I	tRNA processing
Stress response				
YMR174C	<i>PAI3</i>	4.5	I	Osmotic stress response
YJR104C	<i>SOD1</i>	2.1	I	Copper-zinc superoxide dismutase
YKR066C	<i>CCP1</i>	2.6	I	Cytochrome-c peroxidase
YCR021C	<i>HSP30</i>	2.0	L	Heat shock protein
YDR513W	<i>GRX2</i>	2.3	I	Glutaredoxin

ORF	Gene	-Fold	Time	Function			
YDR353W	<i>TRR1</i>	4.6 (*)	I	Thioredoxin reductase			
YBR111C	<i>YSA1</i>	2.1	I	Nucleoside diphosphate-sugar hydrolase			
YMR175W	<i>SIP18</i>	2.1	I	Induced by osmotic stress			
Protein degradation / synthesis / modification							
YER012W	<i>PRE1</i>	2.1	I	20S proteasome subunit C11(beta4)			
YGR135W	<i>PRE9</i>	2.2	I	20S proteasome subunit Y13 (alpha3)			
YLR120C	<i>YPS1</i>	2.7	E	GPI-anchored aspartyl protease			
YPL154C	<i>PEP4</i>	2.1	E	Vacuolar aspartyl protease			
YDR037W	<i>KRS1</i>	2.2	I	tRNA synthetase, lysyl			
YDR041W	<i>RSM10</i>	2.0	E	Mitochondrial ribosomal small subunit			
YBR418W	<i>RPL12B</i>	2.2 (*)	I	Ribosomal protein L12B			
YNL002C	<i>RLP7</i>	2.0	I	Similarity to ribosomal proteins			
YOL127W	<i>RPL25</i>	3.7	L	Ribosomal protein L25			
Protein degradation / synthesis / modification (cont.)							
YMR060C	<i>TOM37</i>	3.1	L	Outer membrane translocase			
YBR110W	<i>ALG1</i>	5.3	I	Beta-1,4-mannosyltransferase			
YBR205W	<i>KTR3</i>	3.0	I	Putative alpha-1,2-mannosyltransferase			
YMR101C	<i>SRT1</i>	2.0	L	Cis-prenyltransferase (putative)			
Other							
YAL059W	<i>ECM1</i>	2.0	I	Cell wall biogenesis			
YGR008C	<i>STF2</i>	2.3	E	Cell wall maintenance			
YKL096W	<i>CWP1</i>	2.2	E	Mannoprotein of the cell wall			
YBR160W	<i>CDC28</i>	2.4	I	Cyclin-dependent protein kinase			
YNL307C	<i>MCK1</i>	2.2	E	Member of the GSK-3 family of protein kinases			
YOR242C	<i>SSP2</i>	3.7	L	Sporulation			
YCR052W	<i>RSC6</i>	2.9	I	Chromatin remodeling complex subunit			
YCR009C	<i>RVS161</i>	2.1	I	Actin-binding protein			
YBR179C	<i>FZO1</i>	3.4	E	Mitochondrial membrane GTPase			
YIR012W	<i>SQT1</i>	2.5	I	Ribosome biogenesis, putative			
YNL036W	<i>NCE103</i>	7.6	E	Secretion			
YBR109C	<i>CMD1</i>	2.8	I	Calmodulin Ca ⁺ binding			
YGR023W	<i>MTL1</i>	2.3	L	Morphogenesis			
YKL043W	<i>PHD1</i>	3.1	E	Transcription factor involved in filamentous growth			
Unknown							
ORF	Gene	-Fold	Time	ORF	Gene	-Fold	Time
YAL049C		2.6	I	YKL175W	<i>ZRT3</i>	2.3	L
YAL053W		2.0	L	YLR108C		2.3	I
YBL108W		3.2	L	YLR186W		2.3	I
YBR004C		2.2	E	YLR205C		2.2	I
YBR207W	<i>FTH1</i>	2.6	I	YLR327C		5.2	E
YBR287W		3.7	E	YLR405W		2.1	L
YCL059C	<i>KRR1</i>	2.3	I	YLR414C		2.5	E
YCR054C	<i>CTR86</i>	3.0	I	YML058C-A		2.1	L
YDL046W		4.6	E	YML059C		2.1	L
YDL167C	<i>ARP1</i>	2.6	I	YML128C	<i>MSC1</i>	3.0	E
YDL213C		3.7	I	YML131W		2.9	I
YDR161W	<i>TCI1</i>	2.0	I	YMR031C		2.9	E
YDR370C		5.0	I	YMR173W	<i>DDR48</i>	5.4	I
YDR372C		2.7	I	YMR173W-A		5.9	I
YDR516C		2.3	E	YMR251W-A	<i>HOR7</i>	9.2	E
YDR534C		2.5	L	YMR304C-A		2.3	E
YER150W	<i>SPI1</i>	2.7	E	YMR316W	<i>DIA1</i>	2.8	E
YGL039W		2.0	I	YMR318C		2.8	I
YGL183C		5.0	I	YNL013C		2.6	L
YGR187C	<i>HGH1</i>	2.0	I	YNL134C		2.7	I
YGR211W	<i>ZPR1</i>	2.0	I	YNL149C		2.3	I
YGR213C	<i>RTA1</i>	3.4	E	YNL208W		2.2	I
YGR243W		2.5	E	YNL300W	<i>TOS6</i>	2.2	L
YHL021C		2.1	E	YOL150C		3.0	I
YHR052W		2.2	I	YOL151W	<i>GRE2</i>	4.1	I
YHR087W		2.4	E	YOR049C		3.7	E
YHR138C		2.6	E	YOR161C		2.4	E
YJL171C		2.4	E	YPL183C		2.3	L
YKL071W		13.8	I				

Data presented correspond to the maximal induction observed. Asterisks denote that the intensity of the hybridization signal was out of the linear range of detection and therefore induction might be stronger than that presented here. The 'Time' column indicates the kinetics of response. Genes showing the highest induction after 5 min at alkaline pH are denoted 'E' (Early), 'I' (Intermediate) indicates a peak at 25 min, and 'L' (Late) corresponds to genes that show the highest induction after 45 min at alkaline pH. Functional categories were assigned based on information provided by MIPS (Mewes *et al.*, 1999). Boldface indicates genes identified as responsive to a wide variety of stresses (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001).

Table 2. Classification into functional families of ORFs whose transcripts are repressed at least threefold after alkaline pH stress.

Amino acid metabolism
<i>GCV1, GCV2, GCV3, ARG5,6, ARG4, ARG3, ARG1, ARG81, ARO9, ASN1, ASN2, BAT1, GDH1, CPA2, GLN1, HIS1, HIS4, HIS5, HIS7, ILV2, ILV3, LEU1, LEU4, LYS20, LYS4, LYS12, LYS1, LYS9, MET6, STR2, MET22, SER1, SRY1, SHM1, SHM2, GAT1, SAM4, HOM2, TRP5</i>
Purine biosynthesis
<i>ADE1, ADE5,7, ADE3, ADE13, ADE4, ADE12, ADE2, IMD1, MTD1</i>
Carbohydrate metabolism and energetics
<i>GSY1, ADH5, PFK1, PGM2, PYK2, MAE1, PYC2, IDP1, ACO1, ATP15, ATP20, QCR6</i>
Other metabolism
<i>SUR2, ERG6, UPC2, OYE3, ACS2, DFR1</i>
Cell growth and division
<i>CLA4, CRN1, RNR4, RFC3, HHF1, CDC15, CKS1, SWI4, SIM1, FAR1, FAR3, MUM2, WTM1, NDD1, IME2</i>
Transcription
<i>HMRA1, BTT1, DAL81, TAF19, MCM1, RPA49, EGD1, DAT1, TAD2, SEN54, DIS3, FAL1, SMX2, CLF1, PSP2, DBP5</i>
Protein synthesis and degradation
<i>AOS1, UBA1, CCT7, HSP82, RPL34A, RPS7B, TUF1, RPL33B, RPL5, TIF5, YDR341c</i>
Transport
<i>CTP1, AGP1, YHM1, HXT12, HXT9, HXT8, GAL2, MDL1, AAC1, TAT2, HXT11, YOR383c, PMA2</i>
Endocytosis and secretion
<i>SEC4, KEX1, SEC9, SCD5, SEC16, YAP1801, ENT1, TLG2</i>
Others
<i>GFA1, EXG1, RLM1, SPR1, TIR1, SSA4, FLO8, GAL80, RTG1, EFD1, HAL5, RSE1, RGA2, YAK1, MTL1, HAC1, VMA13, SFL1</i>
Unknown
<i>YAR010C, YBR053C, YBL098W, YRO2, YBL101W-A, YBR012W-A, YBR043C, YBR147W, YBR134W, YBR113W, NGR1, YCL020W, COS2, YCL042W, YCL019W, OSH2, YDR380W, YEL045C, YER160C, YFL032W, YFR045W, YGL010W, YGL117W, YGL072C, YGL157W, YGR031W, YGR102C, YGR182C, YHL021C, YHR029C, YIL039W, YIL041W, YIL105C, YIL122W, YJL160C, YJL200C, YJR026W, YKL105C, YLL013C, YLR037C, YLR089C, YLR177W, YLR186W, ECM22, YLR257W, YML039W, YML040W, GIS4, YLR427W, YML045W, YLR437C, YML010W, YML095C-A, YMR051C, YMR046C, YMR048W, SNZ1, YMR124W, HAS1, YMR325W, YMR323W, YNL101W, YNL246W, YNR047W, YNL339C, YOL015W, YOL063C, INP54, YOL022C, MSB4, TIR2, PTC5, YOR108W, YOR138C, YOR203W, YOR223W, YOR192C, YPL133C, YPR011C, YPR012W, YPL281C, YPR014C, YPR022C, YPL229W, YPR037C</i>

Boldface indicates genes identified as responsive to a wide variety of stresses (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001).

a large number of amino acid biosynthetic genes was reduced. The effect seems to be quite general, as pathways for the biosynthesis of most amino acid families are affected. In addition, the expression of most genes involved in purine biosynthesis, a pathway responsible for *de novo* generation of AMP, was also severely affected (Table 2 and Fig. 1). This is not a general effect on nucleotide metabolism, as the pyrimidine biosynthetic pathway was not affected.

Characterization of the response of genes *ENA1*, *PHO84*, *PHO89* and *PHO12* to alkaline pH

Four alkali-upregulated genes were selected as models for further characterization on the basis of the different timing of their response and their transcriptional responsiveness to other stress situations, such as saline (*ENA1*) or phosphate starvation stress (*PHO84*, *PHO89* and *PHO12*). As shown in Table 1 and Fig. 1, the kinetics of the transcriptional response to alkaline pH can be rather different from gene to gene. For instance, *PHO89* and *ENA1* show a very rapid (and transient) response, within the first 5–10 min, whereas *PHO84* and *PHO12* are only

induced after 30 min of exposure to alkaline pH. These differential kinetics were confirmed using *LacZ* translational fusions (not shown). The same reporter constructs were used to demonstrate that the sensitivity to alkaline stress can also differ from gene to gene (Fig. 2). A substantial increase in expression can be observed for *PHO84* even below neutral pH, and most of the response is achieved barely above pH 7.0, with no further increase above pH 7.7–7.9. In contrast, the *ENA1* and *PHO89* promoters require a stronger signal. For instance, *ENA1* expression remains quite low until pH rises above 7.5.

The *ENA1/PMR2A* gene has a complex transcriptional response, as it is rapidly induced by osmotic shock, as well as by exposure to toxic concentrations of Na⁺ or Li⁺ and by alkaline pH. The Northern blot experiment shown in Fig. 1 suggested that the increase in *ENA1* expression upon shift to pH 7.6 could be as strong as that obtained after osmotic shock. This was tested further by comparing the change in β -galactosidase activity of an *ENA1-LacZ* transcriptional fusion (pKC201) in wild-type cells shifted from pH 6.4 (13 ± 2 Units) to pH 7.6 (200 ± 9), pH 8.0 (393 ± 49) or made 0.4 M NaCl (276 ± 53 Units). Therefore, the response to high pH of the *ENA1* promoter can

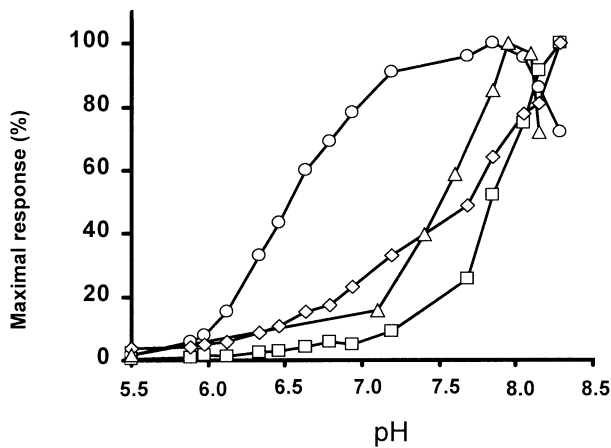


Fig. 2. Differential sensitivity of genes *ENA1*, *PHO84*, *PHO89* and *PHO12* to alkaline stress. Wild-type DBY746 cells were transformed with plasmids pKC201 (squares), pPHO84-LacZ (circles), pPHO89-LacZ (diamonds) or pPHO12-LacZ (triangles). Cells were shifted from pH 5.5 to the indicated pH and then grown for the periods of time and under the conditions stated in *Experimental procedures* (except that, for pH < 7.2, 50 mM Bis-Tris was used as buffer) before assay β -galactosidase activity. Data are expressed as the percentage of the maximal response obtained for each plasmid and correspond to a representative experiment.

be similar or even higher than that produced, under equivalent conditions, by an osmotic shock. However, the observation that a mutant lacking the Hog1 mitogen-activated protein (MAP) kinase, which mediates responses to osmotic stress (Márquez and Serrano, 1996), does not show a reduced alkaline pH response (Fig. 3) suggests that the osmotic sensing pathway is not involved in the response of *ENA1* to alkaline pH. Mutation of the *MSN2/MSN4* genes, encoding transcription factors involved in the general stress response through binding to the stress response element (STRE), did not reduce *ENA1* expression after exposure to high pH (in fact, the

response was even stronger in this mutant), nor did the absence of Yap1, a transcription factor required for efficient response to oxidative stress. In addition, a strain with a non-functional *SLT2/MPK1* gene, which codes for a MAP kinase involved in the maintenance of cell integrity, did not result in impaired expression. In contrast, we confirmed the previous finding (Lamb *et al.*, 2001) that cells lacking the *RIM101* gene, a homologue of the *A. nidulans* *PacC* required for alkaline response in this organism, display reduced *ENA1* expression in response to alkaline pH (it must be noted, however, that the degree of Rim101 dependence can be variable, as we have found that mutation of this gene in an otherwise wild-type background yields an essentially full response). Finally, alkaline pH response was consistently reduced in cells lacking the *CNB1* gene, encoding the regulatory subunit of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent Ser/Thr protein phosphatase calcineurin. This was indicative that calcium signalling could play a role in the alkaline response.

A similar analysis was carried out for the *PHO84*, *PHO89* and *PHO12* promoters. As shown in Fig. 4, lack of Pho2 or Pho4, required for the expression of genes that respond to phosphate starvation, fully abolished the alkaline response of *PHO84* and *PHO12*, whereas in the case of *PHO89*, a partial response could still be detected. Deletion of both *PHO2/4* genes had an additive effect, leading to an almost complete lack of *PHO89* induction. For all three genes, deletion of *PHO81*, encoding a positive regulatory protein of the phosphate pathway, mimicked the deletion of *PHO2* or *PHO4*. Interestingly, we have verified that cells lacking the *PHO2*, *PHO4* or *PHO81* genes display a growth defect under alkaline conditions (not shown). A very relevant result was derived from the use of a *cnb1* mutant. Alkaline induction of *PHO84* and *PHO12* was essentially unmodified by this mutation. In contrast, the response from the *PHO89* promoter was

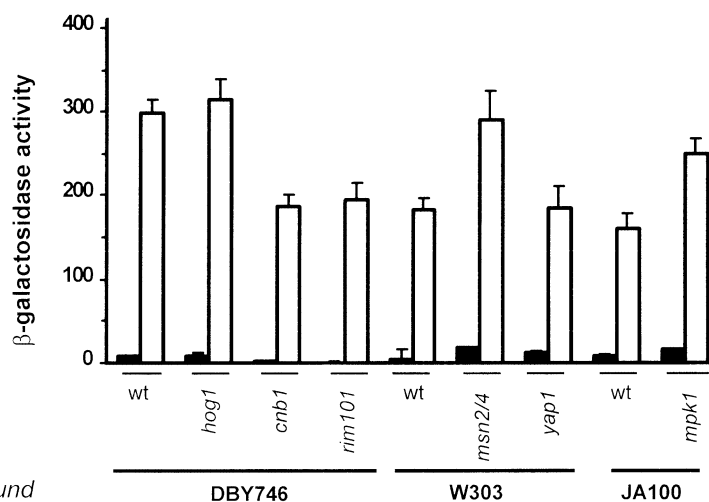


Fig. 3. Response of the *ENA1* gene to alkaline stress in cells lacking essential components of different stress response pathways. The indicated strains were transformed with plasmid pKC201. Cultures were subjected to alkaline stress (pH 8.0), and β -galactosidase activity was measured after 60 min in non-stressed (filled bars) or stressed (empty bars) cells. Data are mean \pm SEM from three to six independent clones.

Background

DBY746

W303

JA100

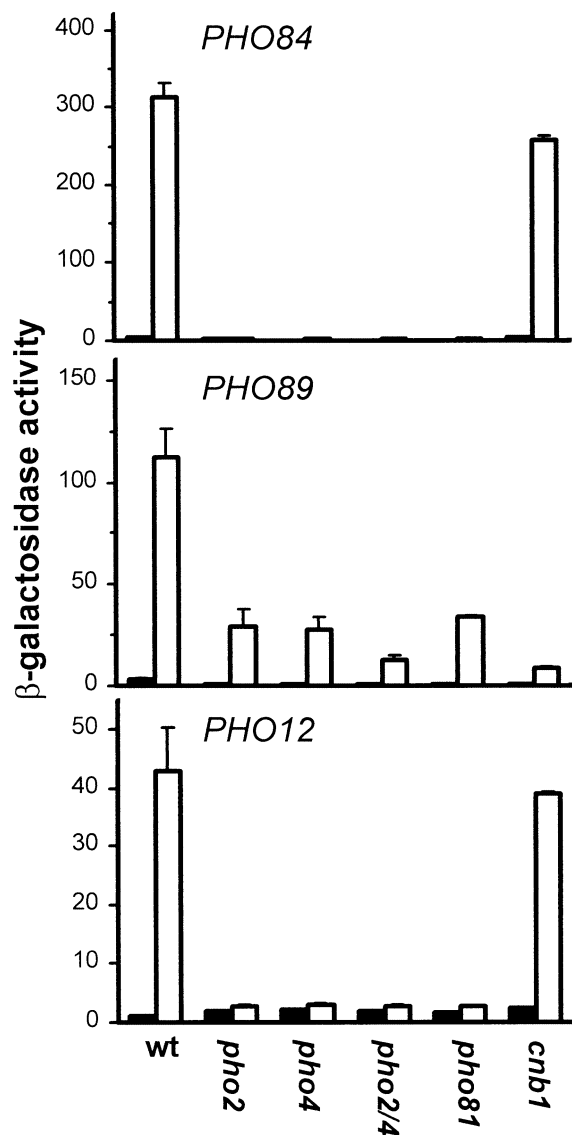


Fig. 4. Characterization of *PHO84*, *PHO89* and *PHO12* response to high pH in different mutant strains. The indicated strains were transformed with plasmids pPHO84-LacZ, pPHO89-LacZ or pPHO12-LacZ, and cultures were subjected to alkaline stress (pH 8.0) for 90 min (pPHO84-LacZ and pPHO89-LacZ) or 120 min (pPHO12-LacZ). β -Galactosidase activity was measured in non-stressed (filled bars) or stressed (empty bars) cells. Data are mean \pm SEM from six independent clones.

completely lost, suggesting that calcium signalling plays a fundamental role in alkaline pH activation of the *PHO89* promoter.

A remarkable outcome from these experiments was that calcineurin appeared to mediate the effects of alkaline stress on the expression of *ENA1* (in part) and *PHO89* (fully), suggesting a role for calcium signalling in the alkaline response. To verify this possibility further, we tested all four promoters under alkaline pH or high calcium, either in the presence of FK506, a drug that inhibits calcineurin,

or in cells lacking Crz1/Tcn1/Hal8, the transcription factor that mediates a number of calcium-dependent, calcineurin-mediated transcriptional responses (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos and Cyert, 1997). As shown in Fig. 5, *PHO84* and *PHO12* did not respond to calcium, and their alkaline response was not compromised by incubation with FK506 or in the absence of Crz1. As expected, the response of *ENA1* to calcium was fully abolished by FK506 and by lack of *CRZ1*, whereas the alkaline response was only partially lost in both cases. Finally, *PHO89* was able to respond with roughly equal potency to alkaline pH and high calcium, and these responses were completely lost when cultures were grown in the presence of FK506 or when cells were deficient for Crz1 function. These results confirm the notion that calcium mediates the alkaline response of *ENA1* and *PHO89*, partially in the first case and completely in the second one.

Functional mapping of the ENA1 promoter reveals a calcium-dependent and a calcium-independent pH-responsive region

To identify the region(s) in the *ENA1* promoter responsible for the alkaline pH response, a preliminary mapping based on *CYC1-LacZ* reporter constructs containing different regions of the *ENA1* gene promoter (Alepez *et al.*, 1997) was made (not shown). This allowed us to identify the region between nucleotides (nt) -853 to -358 as responsible for pH response. A more detailed mapping (Fig. 6) showed that a region between nt -742 and -490 (pMP211) was fully able to elicit the alkaline response. This region is rather complex and contains most of the regulatory elements relevant for *ENA1* expression described so far (see *Discussion*). Within this region, a fragment from nt -751 to -667 (pMR706) did produce a significant response, whereas an adjacent downstream region (-681 to -565, pMR605), containing the AGGGG sequence matching a typical STRE, was essentially inactive. The evidence that relevant elements might lie further downstream in the promoter was obtained by testing constructs pMP212, pMP209 and pMP213, which showed that a small region from nt -573 to -490 was sufficient to elicit a very substantial part of the *ENA1* alkaline response. Therefore, it appears that the Na⁺-ATPase promoter contains at least two separate elements that could act as targets for signal(s) triggered by exposure to alkaline conditions. For descriptive purposes, the upstream region will be denoted as ARR1 (for alkaline responsive region) and the downstream segment as ARR2 (see Fig. 6 for sequence information).

The evidence that part of the alkaline pH response of the *ENA1* promoter may be mediated by calcium and the

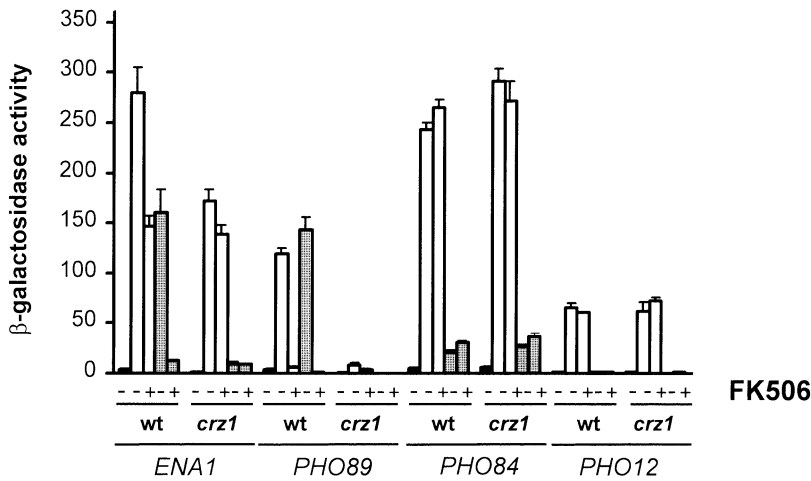


Fig. 5. Dependence of a functional calcineurin pathway on high pH response of *ENA1*, *PHO84*, *PHO89* and *PHO12*. Wild-type DBY746 or the isogenic strain EDN92 (*crz1*) was transformed with plasmids pKC201 (*ENA1*), pPHO84-LacZ (*PHO84*), pPHO89-LacZ (*PHO89*) or pPHO12-LacZ (*PHO12*) and subjected to alkaline stress (pH 8.0, empty bars) or CaCl₂ addition to the medium (0.2 M, dotted bars), as described in *Experimental procedures*, in the presence or absence of the drug FK506 (1.5 μ g ml⁻¹). Filled bars denote β -galactosidase activity in the absence of any treatment. Data are mean \pm SEM from three to six independent clones.

presence of a CDRE element within ARR1 prompted us to undertake a more detailed analysis. To this end, the regions from nt -742 to -577 (containing the CDRE element) and from -573 to -490 (ARR2) were cloned into plasmid pSLF Δ -178K to yield plasmids pMRK212 and

pMRK213, respectively, and tested for the ability to drive transcription under conditions that would impair a calcium-mediated response. As shown in Fig. 7, plasmid pMRK212 exhibited an alkaline- and calcium-dependent response that was, in both cases, fully abolished in the

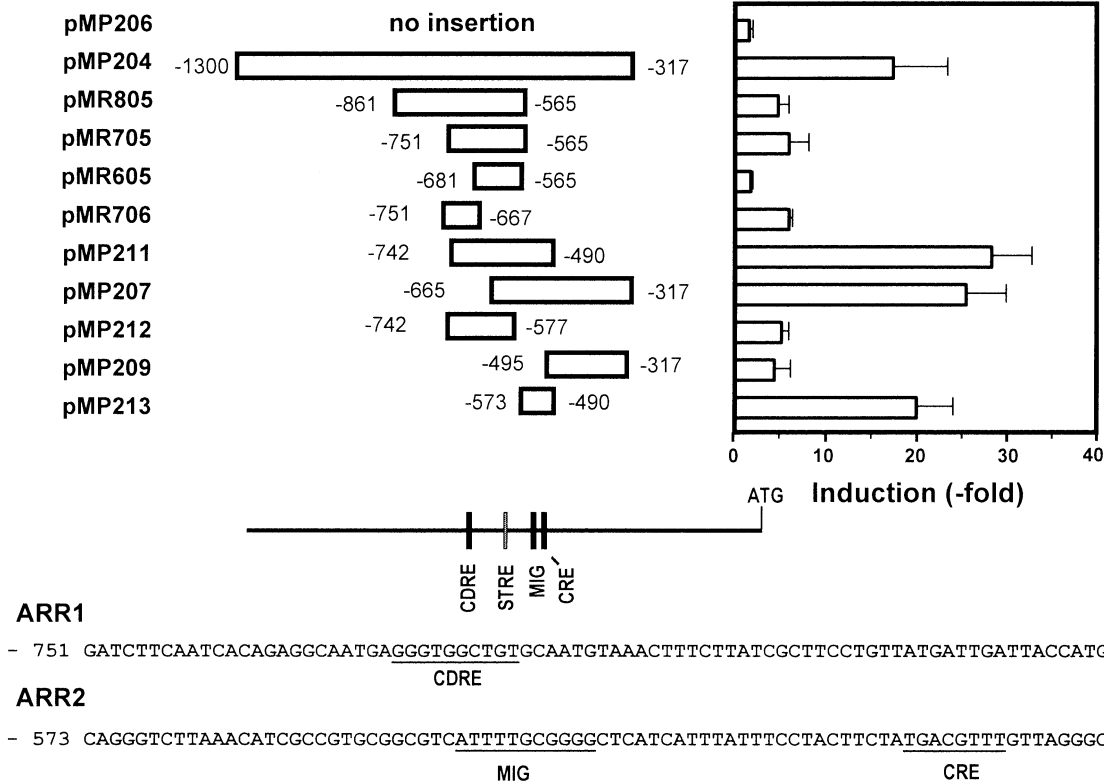


Fig. 6. Functional mapping of the *ENA1* promoter in response to alkaline stress. Wild-type DBY746 cells were transformed with the indicated constructs and exposed to alkaline stress (pH 8.0) for 60 min. The induced/non-induced β -galactosidase activity ratio is presented as mean \pm SEM from six independent clones. The segments of the *ENA1* promoter included in each plasmid are denoted by boxes, and their relative position is indicated by numbers (nt positions from the initiating Met codon) flanking each box. Relevant known regulatory elements are depicted schematically as well as underlined within the nucleotide sequence of regions ARR1 and ARR2 (see text for further information). Details on the construction of plasmids can be found in *Experimental procedures*.

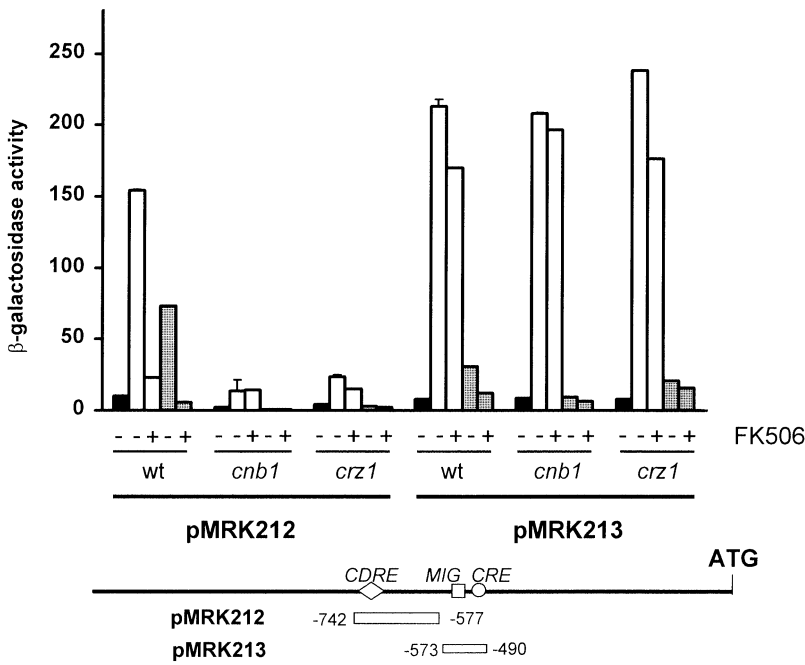


Fig. 7. Evidence for calcium-dependent and calcium-independent pH-responsive regions in the *ENA1* promoter. The indicated strains were transformed with the reporter plasmids pMRK212 (-742/-577) and pMRK213 (-573/-490), which contain the ARR1 and ARR2 regions of the *ENA1* promoter respectively. β -Galactosidase activity was tested under conditions described in the legend to Fig. 5. Data are mean \pm SEM from three to six independent clones. It should be noted that the pMRK reporter constructs have a lower basal activity than the pMP or pMR series, which accounts for the apparent differences in induction when compared with equivalent promoter fragments shown in Fig. 6.

presence of the calcineurin inhibitor FK506 or when the experiment was performed in cells lacking calcineurin or the calcineurin-activated transcription factor Crz1. In contrast, pMRK213 promoted a strong response to pH that was essentially unaltered in the presence of FK506 or in cells lacking *CNB1* or *CRZ1*. These results demonstrate that *ENA1* response to alkaline pH due to ARR1 is triggered by calcium, whereas the response involving ARR2 is essentially calcium independent.

Blocking of the Rim101- and calcineurin-dependent pathways does not fully abolish alkaline pH response from the ENA1 promoter

The evidence that *rim101* cells display reduced expression from the *ENA1* promoter under alkaline stress prompted us to evaluate whether the calcineurin-insensitive response driven from the ARR2 region of this promoter could be Rim101 dependent. As shown in Fig. 8,

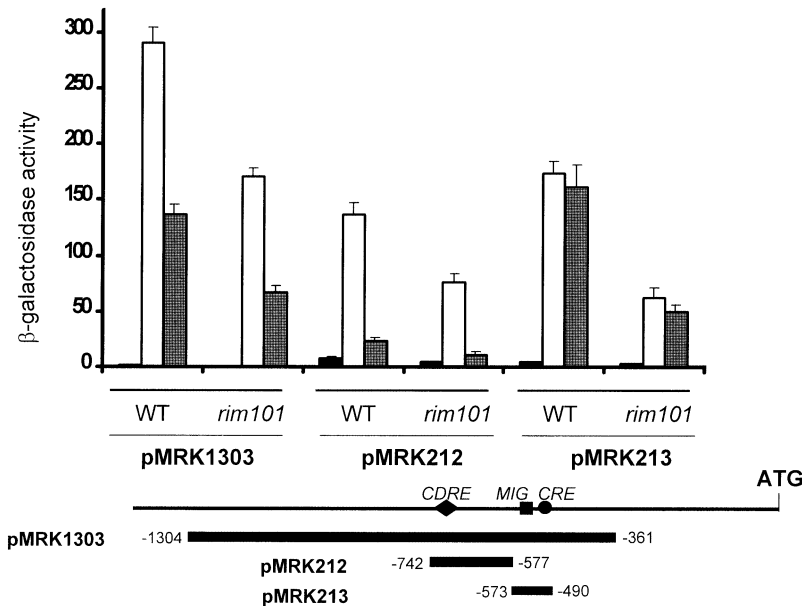


Fig. 8. Evidence for Rim101- and calcineurin-independent activation of the *ENA1* promoter under alkaline stress. The indicated strains were transformed with the plasmids depicted, and β -galactosidase activity was tested in the absence of any treatment (filled bars) or after shifting to pH 8.0 in the absence (empty bars) or the presence (dotted bars) of the drug FK506 ($1.5 \mu\text{g ml}^{-1}$). Data are mean \pm SEM from six independent clones.

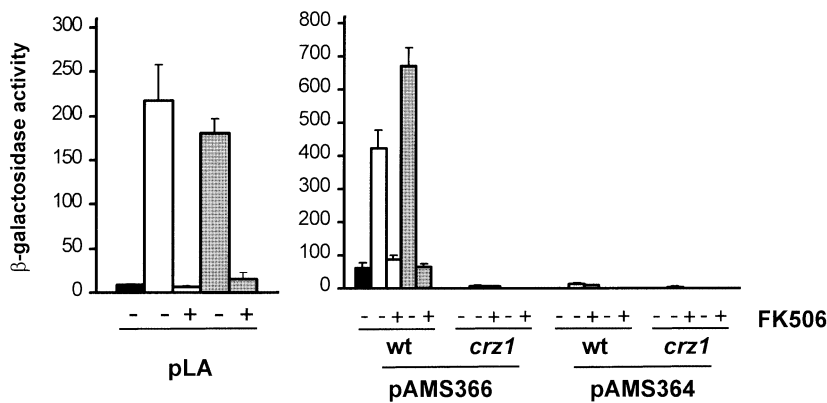


Fig. 9. Calcineurin-dependent response elements are sufficient to elicit an alkaline pH response. Wild-type DBY746 cells were transformed with the reporter plasmid pLA, which contains the $-732/-711$ CDRE found in the *ENA1* promoter. Plasmids pAMS366, containing a tandem of four copies of the CDRE found in *FKS2*, and pAMS364, carrying a mutated, non-functional version of the tandem (Stathopoulos and Cyert, 1997), were introduced into wild-type or *crz1* cells. Cells were grown in high pH or high calcium in the presence or absence of FK506 as indicated in the legend to Fig. 5. Data are mean \pm SEM from three to six independent clones.

lack of Rim101 diminishes the expression of the reporter gene from both ARR1 (pMRK212) and ARR2 (pMRK213) regions. The activity driven from region ARR1 in *rim101* cells was fully abrogated by incubation with the calcineurin inhibitor FK506 but, interestingly, in the presence of this drug, a significant response from region ARR2 was still observed in *rim101* cells. This suggests that a Rim101- and calcineurin-independent pathway, able to modulate the *ENA1* promoter, must exist and that this pathway acts through the ARR2 region.

Calcineurin-dependent response elements are sufficient to elicit an alkaline pH response

The evidence that CDRE-containing promoters, such as *ENA1* and *PHO89*, can respond to alkaline pH in a calcium-dependent manner led us to test whether such elements would be sufficient to generate a response to alkaline stress. This was tested using the reporter plasmids pLA, containing only nt -732 to -711 from the *ENA1* promoter (i.e. the downstream CDRE described by Mendizabal *et al.*, 2001), and pAMS366, which includes four tandem copies of the CDRE found in the *FKS2* promoter (Stathopoulos and Cyert, 1997). As shown in Fig. 9, both calcium-responsive elements were able to drive expression of the *LacZ* gene, and this ability was fully abolished by incubation of the cells with FK506. Furthermore, a mutated version of the *FKS2* CDRE unable to bind Crz1 (Stathopoulos and Cyert, 1997) and to respond in the presence of calcium ions (pAMS364) also failed to induce *LacZ* expression under alkaline pH stress.

Discussion

The analysis of the transcriptional response of yeast to changing environmental conditions can provide not only very relevant information about fundamental cellular functions but also useful tools, such as regulatable promoters suitable for gene expression studies or large-scale protein

production. As modification of the pH of the culture medium is a very simple and inexpensive procedure, we considered that it would be interesting to learn how many *S. cerevisiae* genes would develop a transcriptional response under mild alkaline stress (i.e. under conditions that would not compromise cell growth) and to gain insight into the molecular basis of the alkaline response in the yeast *S. cerevisiae*.

We have found that about 150 genes can be induced at least twofold under mild alkaline conditions. A relevant question is how many of the pH-responsive genes detected in this work are also induced in most other stress conditions (i.e. heat shock, saline, reductive, oxidative, starvation) and can therefore be considered members of the set of genes involved in the general stress response. By pooling our information with different sets of data regarding the transcriptional response to other stress conditions, such as heat shock, saline, oxidative, etc. (Gasch *et al.*, 2000; Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001), we have found that 28 genes induced under our conditions (Table 1) can be considered members of the environmental stress response (ESR) or the common environmental response (CER) gene categories (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). This does not mean that the remaining genes display a fully specific response to alkaline exposure, as the expression of a significant number of them can also be modified to some extent under a particular type of stress. For instance, about 65% of the genes listed in Table 1 are also induced by saline stress (Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000). This implies that, although there is a relatively large number of genes in which the alkaline and saline stress responses coincide, these are most probably independent events, as suggested by Lamb *et al.* (2001) and by our own results.

Our data show that a number of genes involved in phosphate transport and metabolism appear to be upregulated by alkaline pH. These include not only *PHO84* and *PHO89*, encoding high-affinity phosphate/ H^+ and phosphate/ Na^+ co-transporters, respectively (for a review, see

Persson *et al.*, 1999), and *PHO12*, a repressible acid phosphatase, but also the recently characterized genes *VTC1/PHM4*, *VTC3/PHM2* and *VTC4/PHM3*. These genes have been identified as members of a yeast chaperone family involved in the distribution of the vacuolar H⁺-ATPase (Cohen *et al.*, 1999), as well as possibly responsible for polyphosphate synthesis at the vacuole (Ogawa *et al.*, 2000). Therefore, alkaline pH seems to trigger a transcriptional response quite similar to that of phosphate starvation. Our observation that lack of components of the phosphate starvation response pathway (such as *PHO81*) abolishes the alkaline response of *PHO12* and *PHO84* suggests that exposure to alkali actually generates a situation of phosphate starvation that would be responsible for the induction of some of these genes. This hypothesis is reinforced by our observations that *pho2*, *pho4* and *pho81* mutants display an alkaline-sensitive phenotype and that, for *PHO84* and *PHO12*, the kinetics of transcriptional response to alkaline pH and phosphate starvation are quite similar (not shown). However, the situation could be quite different in the case of *PHO89*, as deduced from the faster pH response shown in Fig. 1, the differential calcineurin-dependence documented in Fig. 4 and the observation that exposure to low phosphate results in an induction almost insignificant when compared with the increase in expression after shift to alkaline pH (data not shown).

An additional function clearly disturbed by alkaline pH conditions refers to copper and iron transport and homeostasis. Components of both the *AFT1/RCS1*-regulated (*ARN1*, *ARN2* and *ARN3*) and the high-affinity ferrous (*FET3*) siderophore-iron uptake system are induced, as well as the predominant membrane-associated ferric and cupric reductase encoded by *FRE1*. Most of these genes are also induced when the availability of copper or iron is markedly decreased (Askwith and Kaplan, 1998). As copper and iron solubility can be reduced by alkaline pH, the observed increase in expression might simply reflect a decreased concentration of these cations in the medium. Although quantitative determination by atomic absorption spectrometry of both total and 0.22 µm filterable copper and iron present in the medium did not reveal significant differences when control and alkaline media were compared (data not shown), it is still possible that the actual availability of these cations could be impaired by alkaline conditions.

While this work was in progress, two reports have addressed the study of changes in transcriptional response after alkaline pH exposure. One of these (Lamb *et al.*, 2001) identified 71 candidate alkaline-responsive genes that increased their mRNA level at least 2.1-fold after 2 h of exposure to pH 8.0. Fourteen of these genes are also identified in our study. The relatively low number of genes found by these authors can possibly be attributed

to the transient nature of the mRNA increase, a feature common to many responsive genes under a variety of stresses. This is supported by the observation that, with the only exception of *PHO89* and *ENA1*, all 14 common genes display an intermediate or late response in our study. The second study (Causton *et al.*, 2001) addressed the evaluation of changes in expression after different periods (from 10 to 100 min) of exposure to pH 7.9, and reported 476 genes with at least a threefold increase at any given time point. Interestingly, comparison of this set of data with that presented in Table 1 reveals only 33 common genes. As microarray data are expressed as the ratio between basal and stress conditions, a possible explanation for this relatively low level of concordance could be both the lower initial pH (6.0 versus 6.4 in our case) and higher final pH used in this study (7.9 versus 7.6). In addition, the different yeast genetic background used in these experiments could have a substantial influence, at least for a number of specific genes. In this regard, we have tested the response of *PHO84* and *PHO89* promoters to pH 8.0 in five distinct yeast strains using *LacZ* fusion assays, and found large differences (more than 10-fold in some cases) in the non-induced/induced ratio, essentially as a result of strain-to-strain differences in the level of expression under non-induced conditions (not shown).

Exposure of yeast to alkaline pH also results in a decrease in the mRNA level of a set of genes. It should be noted that this alkaline-induced decrease in expression is largely independent of the general stress response. In fact, only 21 out of 232 repressed genes (Table 2) are also repressed by a variety of stresses (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). As exposure to different stress conditions, such as heat shock, oxidative or osmotic stress, has been shown to slow growth and induce G1 arrest transiently (Rowley *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1996; Bellí *et al.*, 2001), it could be argued that the observed decrease in expression of the amino acid and purine biosynthetic genes could be part of a general downregulation effect on the biosynthetic machinery, associated with slow growth. However, this is probably not the case, as this decrease has been observed under mild alkaline conditions (pH 7.6), which do not alter growth in this strain, as judged by monitoring cell growth rate and budding index (not shown).

The selection of several alkaline pH-responsive genes, also involved in other stress responses, combined with the use of yeast mutants defective in different stress signalling transduction pathways has provided a useful insight into the molecular basis of the alkaline response. Our data indicate that the alkaline effect on the *ENA1* promoter involves at least two different signalling pathways that exclude the osmotic responsive, the general stress and the oxidative response pathways. These pathways have

different regions of the promoter as targets. The upstream target (ARR1) essentially corresponds to the 3' CDRE element (nt -727 to -719) recently dissected by Mendizabal *et al.* (2001). We show, in agreement with these authors, that the upstream, low-affinity Crz1-binding element found in the *ENA1* promoter (nt -826 to -807) does not contribute significantly to the alkaline response (compare constructs pMR805 and pMR705 in Fig. 6). Therefore, calcium signalling represents one of the components of the *ENA1* response to alkaline pH, which would explain the previous finding that calcineurin was required for the full response of *ENA1* to saline and alkaline conditions (Mendoza *et al.*, 1994). The downstream alkaline pH-responsive region of *ENA1* (ARR2, nt -573 to -490), which accounts for 60–70% of the response, is rather complex and contains most of the regulatory elements relevant for *ENA1* expression described so far, such as the Mig1-binding motif (-533 to -544), which was characterized as an upstream-repressing sequence regulated by carbon source, as well as the Sko1-binding motif (-502 to -513), which is responsible for transcriptional repression regulated by osmotic stress (Proft and Serrano, 1999). However, the data presented here (Fig. 3) indicate that the Hog1-mediated osmotic stress signal is not necessary for alkaline induction of the *ENA1* promoter, and published evidence suggested that a *mig1* strain retains the ability to induce an *ENA1-LacZ* reporter when shifted at high pH (Alepez *et al.*, 1997). Furthermore, we have verified that most of the response derived from the ARR2 region is preserved in *sko1* or *mig1* mutants (not shown). Therefore, it seems reasonable to assume that this region may contain an unidentified regulatory element involved in alkaline response.

The functional analysis of *PHO84*, *PHO89* and *PHO12* promoters reveals that *ENA1* is not the only gene able to be induced through a calcium-mediated mechanism after exposure to high pH. Although response of *PHO84* and *PHO12* is not affected by conditions that would block calcium signalling, we confirm here the recent finding (Yoshimoto *et al.*, 2002) that expression of *PHO89* can be induced by external calcium, in agreement with the existence in its promoter of a CDRE-like consensus sequence at positions -515 to -504. We also show that induction of *PHO89* after alkaline stress is roughly equal in potency to that observed after exposure to calcium, and that both responses are fully dependent on the Cnb1 and Crz1 functions. Therefore, in the case of *PHO89*, the only signalling component for high pH seems to be calcium mediated, which is in agreement with our finding that CDRE sequences are sufficient to promote expression under alkaline pH stress. From these observations, it would be expected that a burst of intracellular calcium should follow exposure to alkaline pH. An ongoing project in our laboratory aims to monitor this hypothetical change in calcium

levels and to identify the source of this cation. It is worth noting that a very recent genome-wide survey on calcineurin-mediated response to high calcium and sodium (Yoshimoto *et al.*, 2002) has identified about 160 genes showing calcineurin dependence (defined as a >50% response in *cnb1* cells compared with the wild-type strain). In addition, these authors provided a DNA consensus sequence for Crz1 binding (GNGGC[G/T]CA). We have found that 38 genes from our Table 1 correspond to genes experimentally determined as calcineurin dependent or containing the consensus Crz1-binding sequence within the 1 kbp upstream untranslated region. This indicates that, although we prove that placing a Crz1p site in front of a reporter can make it pH responsive, not all genes known to be activated through calcineurin or containing putative Crz1 binding sites do respond to high pH. This is perhaps because of the presence of additional regulatory elements in these promoters.

The early finding that calcineurin mutants are alkali sensitive (Nakamura *et al.*, 1993) might lead to speculation about the functional significance of calcium signalling in adaptation to high pH conditions. However, it has been reported that *crz1* mutants are not sensitive to alkaline pH (Stathopoulos and Cyert, 1997) and, in our hands, lack of Crz1 results in only a very mild phenotype, much less apparent than that produced by deletion of *CNB1* (not shown). As it has been shown that Crz1 is the major (if not the only) effector of calcineurin-regulated gene expression in yeast (Yoshimoto *et al.*, 2002), it must be concluded that, in budding yeast, the calcium-induced and calcineurin-mediated transcription response is probably not responsible for survival at high pH. This implies that additional targets for calcineurin with a relevant role in high pH adaptation must exist.

In addition to those cases in which the transcriptional response could be secondary to alkaline-derived deprivation of nutrients (such as perhaps *PHO84* and *PHO12*), from the data presented here and from recent evidence (Lamb *et al.*, 2001), it is clear that transcriptional response to high pH in *S. cerevisiae* involves different signalling pathways. One of these pathways would be mediated by Rim101, as mutation of *RIM101* results in poor growth under high pH and failure to induce expression of several genes under alkaline conditions, such as *ARN4* and *YOL154w* (Lamb *et al.*, 2001). These same authors, however, reported other cases in which the response appeared to be only partially Rim101 dependent or even fully independent of the presence of the transcription factor. In fact, the existence of RIM101-independent alkaline pH responses has also been proposed recently in the case of *C. albicans* (Davis *et al.*, 2000). We document here the existence of a second, calcium-mediated pathway that can be fully (*PHO89*) or partially (*ENA1*) responsible for high pH response. The case of *ENA1* is

particularly interesting, as we also show that blocking of the calcium-mediated pathway in a *rim101* mutant does not fully abolish the transcriptional *ENA1* response to high pH, suggesting that additional, Rim101- and calcineurin-independent pathways involved in the alkaline pH response may exist in *S. cerevisiae*.

Experimental procedures

Yeast strains and growth conditions

Yeast cells were grown at 28°C in YPD medium (10 g l⁻¹ yeast extract, 20 g l⁻¹ peptone and 20 g l⁻¹ dextrose) or, when indicated, in synthetic minimal (SD) or complete minimal (CM) medium (Adams *et al.*, 1997). The relevant genotype of the strains described in this work can be found in Table 3. Disruption of *HOG1* and *RIM101* was made by replacing sequences from +40 to +1311 of the *HOG1* open reading frame (ORF), and sequences from +44 to +1865 of the *RIM101* ORF by the heterologous marker *KANMx4*, according to the short flanking homology replacement strategy (Wach *et al.*, 1994). Deletion of *CRZ1* was accomplished by replacing the entire ORF exactly as described by Stathopoulos and Cyert (1997). Mutation of *CNB1* was made by polymerase chain reaction (PCR) amplification of the mutant locus present in the *cnb1* strain generated by Winzeler *et al.* (1999). This DNA fragment was subsequently used to transform the wild-type strains used in this work. Disruption of *PHO2* was accomplished as follows: a *Bam*HI–*Bam*HI fragment containing the *TRP1* gene (from plasmid YDp-W) was inserted into the *Bgl*II site of the *PHO2* gene (cloned into the p2AAH plasmid) to give pDPPHO2. A *Dra*I 1.7 kbp fragment was excised from pDPPHO2 and used to transform cells. Disruption of *PHO4* with a 2.2 kbp *LEU2* marker gene was performed by transforming cells with a 3.8 kbp *Ava*I–*Hind*III fragment derived from plasmid pDPPHO4. Plasmids p2AAH and pDPPHO4 were generous gifts from W. Hörz, University of Munich. Deletion of *PHO81* was performed as follows. A 4.1 kbp region of the *PHO81* genomic locus spanning from nt –428 to –160 downstream of the stop codon was amplified by PCR and cloned into the *Kpn*I site of pUC19 to give plasmid pPHO81. Then, a 1.8 kbp *Bgl*II fragment of the ORF

was replaced by a 1.6 kbp *LEU2* marker recovered from plasmid YDp-L by digestion with *Bam*HI, yielding plasmid pPHO81Δ-La. This plasmid was digested with *Ava*I, and the resulting 2.9 kbp fragment was used to transform cells. All gene deletions generated in this work were confirmed by PCR.

Genomic microarray analysis

Genomic yeast DNA fragments were amplified by PCR, purified as described by Posas *et al.* (2000) and arrayed onto SuperAldehyde substrates (TeleChem International). For RNA preparation, DBY746 cells were grown in YPD to an optical density of 0.8 and split into aliquots. Cells were centrifuged and resuspended in either fresh YPD (pH 6.4) or YPD containing 20 mM TAPS (pH 7.6). Cultures were centrifuged for 5 min at 7000 r.p.m., and total RNA was extracted using hot phenol and glass beads as described previously (Köhler and Dombey, 1991). Poly (A)⁺ RNA was purified from total RNA with an mRNA isolation kit (Roche) based on biotin-labelled oligo (dT) probes and streptavidin bound to magnetic particles according to the manufacturer's instructions. Before cDNA synthesis, RNAs were tested by Northern blot using specific probes.

Fluorescently labelled cDNA was prepared from poly (A)⁺ RNA by oligo dT-primed polymerization using Superscript II reverse transcriptase (LT1) and Cy3-dCTP (Amersham Pharmacia Biotech) essentially as described by Posas *et al.* (2000). Probes were purified using Qiaquick PCR purification kits (Qiagen). Yeast microarrays were hybridized in duplicate for 4 h under cover slides with a Cy3-dCTP-labelled cDNA probe. After hybridization, microarrays were washed, dried and subsequently scanned using a confocal laser ScanArray 3000 system (Packard). Data were collected using IMAGENE software (BioDiscovery). The complete set of data will be available through the following web address: <http://quiroy.uab.es/Jarino>.

Northern blot analysis

For Northern blot analysis, total RNA (20 µg per lane) was electrophoresed on 0.7% agarose–formaldehyde gels and

Table 3. *Saccharomyces cerevisiae* strains used in this study.

Name	Relevant genotype	Source/reference
DBY746	<i>MATα ura3-52 leu2-3112 his3-Δ1 trp1-Δ239</i>	D. Botstein
EDN92	DBY746 <i>crz1::KAN</i>	This work
RSC1	DBY746 <i>hog1::KAN</i>	This work
RSC4	DBY746 <i>pho4::LEU2</i>	This work
RSC5	DBY746 <i>pho2::TRP1</i>	This work
RSC6	DBY746 <i>pho2::TRP1 pho4::LEU2</i>	This work
RSC17	DBY746 <i>pho81::LEU2</i>	This work
RSC21	DBY746 <i>rim101::KAN</i>	This work
MAR15	DBY746 <i>cnb1::KAN</i>	This work
JA100	<i>MATα ura3-52 leu2-3112 his4 trp1-1 can-1r</i>	De Nadal <i>et al.</i> (1998)
JC10	JA100 <i>mpk1::LEU2</i>	Vissi <i>et al.</i> (2001)
W303.1A	<i>MATα ade-2-2 his3-11,15 leu2-3112 ura3-1 trp1-1</i>	R. Rothstein
PEY70	W303.1A <i>msn2::HIS3 msn4::TRP1</i>	Alepuz <i>et al.</i> (1997)
Wyap1	W303.1A <i>yap1::KAN</i>	F. Estruch

transferred to positively charged nylon membranes (Roche) under vacuum. Probes were labelled using the random-primed DNA labelling kit (Roche). Membranes were hybridized at 65°C in the presence of hybridization buffer (700 mM NaCl, 40 mM NaH₂PO₄, pH 7.6, 4 mM EDTA, 0.2% polyvinylpyrrolidone, 0.2% Ficoll, 0.1% SDS, 0.2 mg ml⁻¹ salmon sperm DNA) and 10⁶ c.p.m. ml⁻¹ of the appropriate ³²P-labelled DNA fragment. Filters were washed in 0.1× SSC (1× SSC is 150 mM NaCl, 15 mM sodium citrate, pH 7.0), 0.1% SDS at 68°C.

Plasmids construction and β-galactosidase analysis

To evaluate the response of the different promoters under alkaline pH conditions, a number of β-galactosidase reporter plasmids were used. Initial mapping of the *ENA1* response was made using the multicopy pKC plasmid series (Cunningham and Fink, 1996; Alepuz *et al.*, 1997). These constructs derive from plasmid pKC201, which contains *ENA1* sequences from -1385 to +35 (relative to the starting initiating Met) fused to *LacZ*. A more precise mapping was accomplished using the pMP (Proft and Serrano, 1999) and pMR (this work) series. Both series contain different PCR-amplified stretches from the *ENA1* promoter with added *Pst*I and *Xho*I restriction sites to facilitate cloning into the *CYC1*-*LacZ* reporter plasmid pJS205 (Schuller *et al.*, 1992). Plasmids pMRK212 and 213 were prepared by excising the appropriate promoter fragment from the pMP vector by *Pst*I-*Xho*I digestion, cloning into these sites of plasmid pBluescript SK and transfer into the *Sma*I-*Xho*I of plasmid pSLFΔ-178K (Idrissi *et al.*, 1998). Plasmid pMRK1303 was constructed by amplification from genomic DNA of the -1304/-361 region of the *ENA1* promoter, with added *Sma*I-*Xho*I sites and cloning into these sites of pSLFΔ-178K. The pMP and pMR series of plasmids differ from the pMRK one, in that the latter displays virtually no reporter activity in the absence of a transcriptionally active DNA insert. Plasmid pLA (a gift from I. Fernandez de Larrinoa, UPV, Spain) derives from plasmid pLGΔ312s (Guarente and Mason, 1983) by cloning into the *Sal*I site the -732/-711 sequence of the *ENA1* promoter. This sequence contains the downstream, high-affinity Crz1-binding element identified by Mendizabal *et al.* (2001). Plasmids pAMS366 and pAMS364, which drive the expression of the *lacZ* reporter gene from four copies in tandem of the CDRE (calcineurin-dependent response element) present in the *FKS2* promoter, were a gift from M. Cyert (Stanford, CA, USA). pAMS366 carries a wild-type version of these elements, whereas pAMS364 contains a mutated form, unable to bind to Crz1 (Stathopoulos and Cyert, 1997). To analyse the expression of *PHO84*, *PHO89* and *PHO12*, *LacZ* translational fusions were constructed as follows. The regions comprising nt -603 to +19 (pPHO84-*LacZ*), -671 to +33 (pPHO89-*LacZ*) or -1275 to +78 (pPHO12-*LacZ*) were amplified by PCR with added *Eco*RI and *Hind*III sites and cloned into these sites of plasmid YEp357 (Myers *et al.*, 1986).

Except where stated otherwise, cells were grown to an OD₆₆₀ of 0.5–1.0, and 2.5 ml aliquots were made, centrifuged and resuspended in the appropriate media. For alkaline stress, cells were resuspended in rich medium containing 50 mM TAPS adjusted to the appropriate pH with potassium

hydroxide (taking into account that autoclaving leads to a decrease in the pH of the medium). For all promoters, non-induced cells were resuspended in the same medium (low pH medium) adjusted to pH 6.3, except in the case of *PHO84*, in which pH was decreased to 5.6 to ensure that the starting pH in all cases would not result in significant activity of the promoter. It should be noted that the *PHO84* promoter displays substantial activity even below neutrality (see Fig. 2). For calcium treatment, solid CaCl₂ was added to the low-pH medium to achieve a final concentration of 0.2 M. FK506-containing media were made by adding the appropriate volume of a stock solution (10 mg ml⁻¹ made in 90% ethanol, 10% Tween P-20) to give a final concentration of 1.5 μg ml⁻¹. In all cases, growth was resumed for 60 min (*ENA1*), 90 min (*PHO84* and *PHO89*) or 120 min (*PHO12*) to ensure maximal response; cells were then centrifuged, and β-galactosidase activity was measured as described by Reynolds *et al.* (1997).

Acknowledgements

The contribution of F. Posas to the earliest steps of this work is acknowledged. We thank F. Estruch, M. Proft, R. Serrano, I. López-Calderón, M. Cyert and W. Hörz for plasmids, strains and advice. The excellent technical assistance of Anna Vilalta and Manuel Clemente is acknowledged. This work was supported by a research grant from the 'Fundación Ramón Areces' to J.A., which also supported a fellowship awarded to R. Serrano. A. Ruiz is the recipient of a fellowship from the CIRIT (Generalitat de Catalunya).

References

- Adams, A., Gottschlings, D.E., Kaiser, C.A., and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Alepuz, P.M., Cunningham, K.W., and Estruch, F. (1997) Glucose repression affects ion homeostasis in yeast through the regulation of the stress-activated *ENA1* gene. *Mol Microbiol* **26**: 91–98.
- Askwith, C., and Kaplan, J. (1998) Iron and copper transport in yeast and its relevance to human disease. *Trends Biochem Sci* **23**: 135–138.
- Bellí, G., Garí, E., Aldea, M., and Herrero, E. (2001) Osmotic stress causes a G1 cell cycle delay and downregulation of Cln3/Cdc28 activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **39**: 1022–1035.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G., *et al.* (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**: 333–337.
- Cohen, A., Perzov, N., Nelson, H., and Nelson, N. (1999) A novel family of yeast chaperons involved in the distribution of V-ATPase and other membrane proteins. *J Biol Chem* **274**: 26885–26893.
- Cunningham, K.W., and Fink, G.R. (1996) Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **16**: 2226–2237.
- Davis, D., Wilson, R.B., and Mitchell, A.P. (2000) RIM101-

- dependent and-independent pathways govern pH responses in *Candida albicans*. *Mol Cell Biol* **20**: 971–978.
- De Nadal, E., Clotet, J., Posas, F., Serrano, R., Gómez, N., and Ariño, J. (1998) The yeast halotolerance determinant Hal3p is an inhibitory subunit of the Ppz1p Ser/Thr protein phosphatase. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 7357–7362.
- Denison, S.H. (2000) pH regulation of gene expression in fungi. *Fungal Genet Biol* **29**: 61–71.
- Denison, S.H., Negrete-Urtasun, S., Mingot, J.M., Tilburn, J., Mayer, W.A., Goel, A., et al. (1998) Putative membrane components of signal transduction pathways for ambient pH regulation in *Aspergillus* and meiosis in *Saccharomyces* are homologous. *Mol Microbiol* **30**: 259–264.
- Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469–486.
- Garcia-deblás, B., Rubio, F., Quintero, F.J., Bañuelos, M.A., Haro, R., and Rodríguez-Navarro, A. (1993) Differential expression of two genes encoding isoforms of the ATPase involved in sodium efflux in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **236**: 363–368.
- Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G., et al. (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241–4257.
- Guarente, L., and Mason, T. (1983) Heme regulates transcription of the CYC1 gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32**: 1279–1286.
- Hong, S.K., Han, S.B., Snyder, M., and Choi, E.Y. (1999) SHC1, a high pH inducible gene required for growth at alkaline pH in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **255**: 116–122.
- Idrissi, F.-Z., Fernandez-Larrea, J.B., and Piña, B. (1998) Structural and functional heterogeneity of Rap1p complexes with telomeric and UASprg-like DNA sequences. *J Mol Biol* **284**: 925–935.
- Lamb, T.M., Xu, W., Diamond, A., and Mitchell, A.P. (2001) Alkaline response genes of *S. cerevisiae* and their relationship to the RIM101 pathway. *J Biol Chem* **276**: 1850–1856.
- Lambert, M., Blanchin-Roland, S., Le Louedec, F., Lepingle, A., and Gaillardin, C. (1997) Genetic analysis of regulatory mutants affecting synthesis of extracellular proteinases in the yeast *Yarrowia lipolytica*: identification of a RIM101/pacC homolog. *Mol Cell Biol* **17**: 3966–3976.
- Lee, J., Romeo, A., and Kosman, D.J. (1996) Transcriptional remodeling and G1 arrest in dioxygen stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **271**: 24885–24893.
- Li, W., and Mitchell, A.P. (1997) Proteolytic activation of Rim1p, a positive regulator of yeast sporulation and invasive growth. *Genetics* **145**: 63–73.
- Márquez, J.A., and Serrano, R. (1996) Multiple transduction pathways regulate the sodium-extrusion gene *PMR2/ENA1* during salt stress in yeast. *FEBS Lett* **382**: 89–92.
- Matheos, D.P., Kingsbury, T.J., Ahsan, U.S., and Cunningham, K.W. (1997) Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**: 3445–3458.
- Mendizabal, I., Pascual-Ahuir, A., Serrano, R., and de Larriñoa, I.F. (2001) Promoter sequences regulated by the calcineurin-activated transcription factor Crz1 in the yeast *ENA1* gene. *Mol Gen Genet* **265**: 801–811.
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodríguez-Navarro, A., and Pardo, J.M. (1994) The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **269**: 8792–8796.
- Mewes, H.W., Heumann, K., Kaps, A., Mayer, K., Pfeiffer, F., Stocker, S., and Frishman, D. (1999) MIPS: a database for protein sequences and complete genomes. *Nucleic Acids Res* **27**: 44–48.
- Myers, A.M., Tzagoloff, A., Kinney, D.M., and Lusty, C.J. (1986) Yeast shuttle and integrative vectors with multiple cloning sites suitable for construction of lacZ fusions. *Gene* **45**: 299–310.
- Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T., and Miyakawa, T. (1993) Protein phosphatase type 2B (calcineurin)-mediated, FK506-sensitive regulation of intracellular ions in yeast is an important determinant for adaptation to high salt stress conditions. *EMBO J* **12**: 4063–4071.
- Ogawa, N., De Risi, J., and Brown, P.O. (2000) New components of a system for phosphate accumulation and polyphosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* revealed by genomic expression analysis. *Mol Biol Cell* **11**: 4309–4321.
- Persson, B.L., Petersson, J., Fristedt, U., Weinander, R., Berhe, A., and Pattison, J. (1999) Phosphate permeases of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function and regulation. *Biochim Biophys Acta* **1422**: 255–272.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E., and Ariño, J. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249–17255.
- Proft, M., and Serrano, R. (1999) Repressors and upstream repressing sequences of the stress-regulated *ENA1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*: bZIP protein Sko1p confers HOG-dependent osmotic regulation. *Mol Cell Biol* **19**: 537–546.
- Ramón, A.M., Porta, A., and Fonzi, W.A. (1999) Effect of environmental pH on morphological development of *Candida albicans* is mediated via the PacC-related transcription factor encoded by *PRR2*. *J Bacteriol* **181**: 7524–7530.
- Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M., and Hohmann, S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290–8300.
- van der Rest, M.E., Kamminga, A.H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W.N. (1995) The plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*: structure, function, and biogenesis. *Microbiol Rev* **59**: 304–322.
- Reynolds, A., Lundblad, V., Dorris, D., and Keaveney, M. (1997) Yeast vectors and assays for expression of cloned genes. In *Current Protocols in Molecular Biology*. Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (eds). New York, USA: John Wiley & Sons, pp. 13.6.1–13.6.6.
- Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Werner-Washburne, M., and Singer, R.A. (1993) Heat shock-mediated cell cycle

- blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**: 1034–1041.
- Schuller, H.J., Hahn, A., Troster, F., Schutz, A., and Schweizer, E. (1992) Coordinate genetic control of yeast fatty acid synthase genes FAS1 and FAS2 by an upstream activation site common to genes involved in membrane lipid biosynthesis. *EMBO J* **11**: 107–114.
- Serrano, R. (1996) Salt tolerance in plants and microorganisms: toxicity targets and defense responses. *Int Rev Cytol* **165**: 1–52.
- Stathopoulos, A.M., and Cyert, M.S. (1997) Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* **11**: 3432–3444.
- Vissi, E., Clotet, J., De Nadal, E., Barceló, A., Bakó, E., Gergely, P., *et al.* (2001) Functional analysis of the *Neurospora crassa* Pz11 protein phosphatase by expression in budding and fission yeast. *Yeast* **18**: 115–124.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793–1808.
- Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., *et al.* (1999) Functional characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science* **285**: 901–906.
- Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A.P., Li, H.X., Ogawa, N., Botstein, D., *et al.* (2002) Genome-wide analysis of gene expression regulated by the calcineurin/Crz1p signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 31079–31088.

ARTÍCULO 2

Characterization of the Calcium-mediated Response to Alkaline Stress in *Saccharomyces cerevisiae**[§]

Received for publication, April 1, 2004, and in revised form, July 19, 2004
Published, JBC Papers in Press, August 6, 2004, DOI 10.1074/jbc.M403606200

Laia Viladevall[‡], Raquel Serrano^{‡§}, Amparo Ruiz^{‡¶}, Gema Domenech^{||}, Jesús Giraldo^{||},
Anna Barceló^{‡**}, and Joaquín Ariño^{‡***‡}

From the [‡]Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, ^{||}Grup de Modelització Estructural i Funcional de Sistemes Biològics (Institut de Neurociències and Unitat de Bioestadística), and ^{**}Servei de DNA Microxips i Seqüenciació, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain

Exposure of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* to alkaline stress resulted in adaptive changes that involved remodeling the gene expression. Recent evidence suggested that the calcium-activated protein phosphatase calcineurin could play a role in alkaline stress signaling. By using an aequorin luminescence reporter, we showed that alkaline stress resulted in a sharp and transient rise in cytoplasmic calcium. This increase was largely abolished by addition of EGTA to the medium or in cells lacking Mid1 or Cch1, components of the high affinity cell membrane calcium channel. Under these circumstances, the alkaline response of different calcineurin-sensitive transcriptional promoters was also blocked. Therefore, exposure to alkali resulted in entry of calcium from the external medium, and this triggered a calcineurin-mediated response. The involvement of calcineurin and Crz1/Tcn1, the transcription factor activated by the phosphatase, in the transcriptional response triggered by alkalization has been globally assessed by DNA microarray analysis in a time course experiment using calcineurin-deficient (*cnb1*) and *crz1* mutants. We found that exposure to pH 8.0 increased at least 2-fold the mRNA levels of 266 genes. In many cases (60%) the response was rather early (peak after 10 min). The transcriptional response of 27 induced genes (10%) was reduced or fully abolished in *cnb1* cells. In general, the response of *crz1* mutants was similar to that of calcineurin-deficient cells. By analysis of a systematic deletion library, we found 48 genes whose mutation resulted in increased sensitivity to the calcineurin inhibitor FK506. Twenty of these mutations (42%) also provoked alkaline pH sensitivity. In conclusion, our results demonstrated that calcium signaling and calcineurin activation represented a significant component of the yeast response to environmental alkalization.

Calcium-mediated signaling mechanisms are used by virtually every eukaryotic cell to regulate a wide variety of cellular processes, including gene expression. Transient increases in cytosolic calcium results in activation of diverse enzymes, such as the protein phosphatase calcineurin. Calcineurin is a heterodimer of catalytic subunit and regulatory subunits. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, the catalytic subunit is encoded by two genes, *CNA1* and *CNA2* (1), whereas a single gene, *CNB1*, encodes the regulatory subunit (2). Cells lacking the catalytic subunits, or the regulatory subunit, are deficient in calcineurin activity.

Exposure of yeast cells to a number of signals, such as α -factor (3, 4), glucose (5), sphingosine (6), and certain stress conditions (7–9), triggers a rise in cytoplasmic calcium. This increase in calcium can be a consequence of external calcium influx or release from internal stores, such as the vacuole, and results in activation of calcineurin. For instance, hyperosmotic shock has been reported to provoke calcium release from vacuolar stores (8) through Yvc1, a member of the transient receptor potential channel family, and to trigger influx of the cation from the external medium (9) through the Mid1-Cch1 high affinity Ca^{2+} influx system. Activated calcineurin dephosphorylates and activates the transcriptional factor Crz1/Tcn1 (10, 11), which enters the nucleus (12) and, in turn, activates a set of responsive genes by binding to calcineurin-dependent responsive elements (CDRE)¹ (10, 13). It has been documented that most of the transcriptional responses driven by activation of calcineurin are mediated by Crz1/Tcn1 (13).

Recent evidence from our laboratory (14) supports early data (15, 16) showing that calcineurin might be involved in the tolerance to alkaline pH. We showed (14) that a significant part of the alkaline response of the *ENA1* promoter, and most of the *PHO89* response, was blocked by the calcineurin inhibitor FK506 as well as by the absence of Cnb1 or Crz1/Tcn1, suggesting that the transcriptional response of certain genes to alkalization of the medium could be, at least in part, dependent on calcineurin. These findings led us to speculate the possibility that exposure to alkaline pH could trigger a burst in cytoplasmic calcium, which in turn would activate the phosphatase. Here we confirm and expand this hypothesis by showing that alkalization of the medium provokes entry of calcium from the external medium and by defining, using DNA microarray technology, the subset of genes whose alkaline transcriptional response is mediated by the calcineurin pathway.

* This work was supported in part by a research grant from the "Fundación Ramón Areces" and by Grants BMC2002-04011-C05-04, GEN2001-4707-C08-03, and BIO2001-4357-E from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain, and Fondo Europeo de Desarrollo Regional (to J. A.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains Tables 1 and 2.

[§] Recipient of a fellowship from the Ministerio de Ciencia y Tecnología, Spain.

[¶] Recipient of a fellowship from the Generalitat de Catalunya.

[‡] To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola 08193, Barcelona, Spain. Tel.: 34-93-5812182; Fax: 34-935812006; E-mail: Joaquin.Ariño@uab.es.

¹ The abbreviations used are: CDRE, calcineurin-dependent responsive elements; WT, wild type; TAPS, 3-[(2-hydroxy-1,1-bis(hydroxymethyl)ethyl)amino]-1-propanesulfonic acid.

TABLE I
Yeast strains used in this work

Name	Relevant genotype	Source/Ref.
DBY746	<i>MATα ura3-52 leu2-3112 his3-Δ1 trp1-Δ239</i>	D. Botstein
EDN92	DBY746 <i>crz1::KAN</i>	14
RSC21	DBY746 <i>cnb1::KAN</i>	14
RSC28	DBY746 <i>mid1::KAN</i>	This work
RSC31	DBY746 <i>cch1::KAN</i>	This work
RSC46	DBY746 <i>yvc1::KAN</i>	This work
JA100	<i>MATα ura3-52 leu2-3112 his4 trp1-1 can-1r</i>	56
BY4741	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	21

MATERIALS AND METHODS

Strains and Growth Conditions—Yeast cells were grown at 28 °C in YPD medium (10 g/liter yeast extract, 20 g/liter peptone, and 20 g/liter dextrose) or, when indicated, in synthetic minimal (SD) or complete minimal (CM) medium (17). The relevant genotype of the strains described in this work can be found in Table I.

Plasmids and Gene Disruptions—Strains carrying deletions of the *MID1* and *CCH1* genes were generated as follows. Deletion cassettes were amplified by PCR from genomic DNA prepared from *mid1::KanMX* and *cch1::KanMX* deletion mutants in the BY4741 background (18). The oligonucleotides used spanned nucleotides –489 to +2021 (*MID1*) and –532 to +6708 (*CCH1*). Positions are relative to the initiating ATG codon. The amplification fragments were purified and used to transform the DBY746 wild type strain.

A deletion cassette used to disrupt the *YVC1* gene (p Δ YVC1_Wa) was generated as follows. The region from –1118 to +3010 relative to the ATG of the *YVC1* locus was amplified by PCR from genomic DNA prepared from the DBY746 wild type strain by using oligonucleotides 5'-GCTCTAGAAGCTTCATGGATACTTC-3' (which contains an artificial XbaI site) and 5'-GCGGTACCACCATTGGTGCAGCATTC-3' (which has an added KpnI restriction site). This fragment was cloned into the same sites of plasmid pBluescript and was digested with EcoRI to remove a 1.8-kbp internal region (from nucleotide –41 to +1780). To generate p Δ YVC1_Wa, this region was replaced by an EcoRI fragment, containing the *TRP1* marker, isolated from plasmid pUC19_W_2RI. This construct was made by cloning into pBluescript the *TRP1*-containing SmaI-NheI fragment of YDpW (19), to yield pBS_W, and recovering the marker as an HincII-SacI fragment, for final cloning into pUC19. Strain RSC46 (*yvc1::TRP1*), was then generated by transformation with the 2.1-kbp SpeI-HpaI fragment isolated from p Δ YVC1_Wa. All gene disruptions were verified by PCR.

The reporter plasmid pPRX1-*LacZ* was generated as follows. The *PRX1* upstream DNA region enclosed between –1288 and +33 (relative to the starting ATG) was amplified by PCR with added EcoRI/HindIII restriction sites and was cloned into the same sites of YEplac357 (20). Reporter plasmids pPHO84-*LacZ*, pMRK212, and pPHO89-*LacZ* were described previously in Ref. 14 and plasmid pAMS366 in Ref. 10.

Calcium Measurements—Evaluation of cytoplasmic calcium burst was carried out essentially as described previously (8). Briefly, yeast strains were transformed with plasmid pEVP11/AEQ (7) and grown in SD medium lacking leucine to an A_{660} of 1.8. Cells were pelleted and resuspended in 250 μ l of fresh medium containing 2 μ M coelenterazine (Sigma) and incubated for 5.5 h in the dark. The culture was centrifuged, and cells were resuspended in 173 μ l of fresh medium (which included 10 mM EGTA when chelating external calcium was desired). Three μ l of the culture was removed, and cells were fixed by addition of a formaldehyde solution (7% v/v final concentration) and kept at 4 °C for cell counting. The remaining culture was transferred to luminometer tubes after 15 min (to ensure that the transient calcium increase induced by the glucose present in the fresh medium has vanished), and then the luminescence was integrated every second by using a Berthold LB9507 luminometer. Calcium shock was performed by adding 30 μ l of a 1.33 M calcium chloride solution. Alkaline shock was accomplished by adding 30 μ l of 100 mM KOH (which raises the pH to ~8.2). Potassium chloride was added as a negative control at the same concentration as KOH. In all experiments, the luminescence values were corrected according to the number of cells present in the sample.

Screen of a Systematic Deletion Library for FK506 Sensitivity—A systematic *kanMX* deletion library constructed in the BY4741 genetic background (21) was grown in YPD medium supplemented with 150 μ g/ml G418 up to saturation (3–4 days). The cultures were replicated by using a stainless steel 96-pin replicator (Nalge Nunc International) into

duplicate 96-well plates. One set of plates contained 200 μ l/well YPD (control plates) and the other YPD plus 1.5 μ g/ml FK506 (Fujisawa Co.). Growth was monitored by using a Labsystem multiwell photometer at A_{620} after 18, 20, 22, 24, and 48 h of incubation at 28 °C. For each clone, the ratio between the absorbance of the culture in the absence and in the presence of the drug was calculated. This value was divided by the average of the ratios for the entire plate (to normalize for hypothetical differences in the inoculation step). Clones giving a growth ratio equal or higher than 2.0 were initially considered positive. These clones were diluted until the A_{620} was 0.005 and re-tested for FK506 sensitivity at four different concentrations of the drug (0.5, 1.0, 1.5, and 2.0 μ g/ml) at different growth times. Clones consistently yielding a ratio of at least 1.2 were considered as sensitive to FK506. The ratio of absorbance of cultures in the absence and in the presence of each concentration of the drug was calculated, and the highest value obtained was considered as an indicator of the sensitivity of the strain.

β -Galactosidase Assays—The wild type DBY746 strain and its derivatives RSC46 (*yvc1 Δ*), RSC28 (*mid1 Δ*), and RSC31 (*cch1 Δ*) were transformed with the reporter plasmids pAMS366 (10), pMRK212 (14), or pPHO89-*lacZ* (14). Cultures were centrifuged (5 min at 750 \times g), and cells were resuspended in YPD, 50 mM TAPS adjusted to pH 8.0 (containing 10 mM EGTA when required for chelating calcium cations), and incubated for 60 min (pAMS366 and pMRK212) or 90 min (pPHO89-*lacZ*). To evaluate the response of the *PRX1* promoter to alkaline and oxidative stress, the wild type strain BY4741 and its *yap1::KANMX* and *shn7::KANMX* derivatives (21) were transformed with pPRX1-*lacZ* or pPHO84-*lacZ*. Cells were grown up to an A_{660} of 0.5–1.0, and 1-ml aliquots were made and centrifuged. Cells were resuspended in YPD media made with 50 mM TAPS and adjusted to pH 8.1 (alkaline treatment), YPD containing 0.25 mM H₂O₂ (oxidative stress) or YPD adjusted to pH 5.6 (untreated cells), and growth was resumed for 90 min. In all cases, β -galactosidase activity was measured as described previously (14).

RNA Preparation and Northern Blot Analysis—For RNA preparation, yeast cells were grown in YPD to an optical density of 0.8 and split into aliquots. Cells were centrifuged and resuspended either in fresh YPD (nonstressed cells, pH 6.2) or YPD containing 50 mM TAPS (stressed cells, pH 8.0) for different periods. Cultures were then centrifuged for 5 min at 3000 rpm, and total RNA was extracted by using hot phenol and glass beads as described (22). Total RNA (15 μ g/lane) was transferred to filters and probed as described (14) with a 0.65-kbp fragment encompassing the entire coding region of gene *PNC1*.

DNA Microchips Analysis—Fifteen μ g of total RNA was used for cDNA synthesis and labeling, using either the direct (CyScribe first strand labeling kit) or indirect (CyScribe post-labeling kit) labeling kits, in conjunction with Cy3-dUTP and Cy5-dUTP fluorescent nucleotides from Amersham Biosciences. Fluorescently labeled cDNAs were combined and hybridized to yeast genomic microchips constructed in our laboratory by arraying 6014 different PCR-amplified open reading frames from *S. cerevisiae* on CMT-Ultragaps (Corning) and Genorama SA-1 (Asper Biotech) amino-coated glass slides, using a MicroGrid™ II (BioRobotics) machine. Details on the construction of the slides will be provided elsewhere (23). In addition, the slides included 286 duplicated genes, corresponding to genes responsive under a variety of stress conditions, plus a number of positive and negative control spots. Dyes were swapped for wild type and mutant cells to avoid dye-specific bias. Prehybridization, hybridization, and washing conditions were essentially as described previously (24). Slides were scanned with a ScanArray 4000 fluorescence scanner and analyzed using both commercial (QuantArray) and in-house developed software. The data from different experiments (5 slides/time point for wild type and *cnb1* cells and 3 slides/time point for *crz1/ten1* cells) were combined, and the median was calculated. A given gene was considered to be induced or repressed when the ratio stressed/nonstressed was higher than 2.0 or lower than 0.5, respectively, in at least three (for wild type and *cnb1* cells) or two experiments (for *crz1* cells). Expression ratios were logarithm (base 2)-transformed for statistical analysis. Statistical significance of both gene induction and repression was assessed by testing the null hypothesis log ratio equal to zero under the Student's *t* test. A *p* value lower than 0.1 was considered significant for initial gene selection. The differences between the three strains (wild type, *cnb1*, and *crz1*) for each selected gene was analyzed by a two-way (slide/time, strain) analysis of variance. The *post hoc* Tukey's test was used for multiple comparisons between strains (25) with statistical significance set at a *p* value lower than 0.05. Data analysis was carried out with the SAS/STAT® release 8.01 statistical package (SAS Institute Inc., Cary, NC).

Quantitative Real Time PCR—First strand cDNAs were synthesized from 1 μ g of total RNA, using the Reverse Transcription System (In-

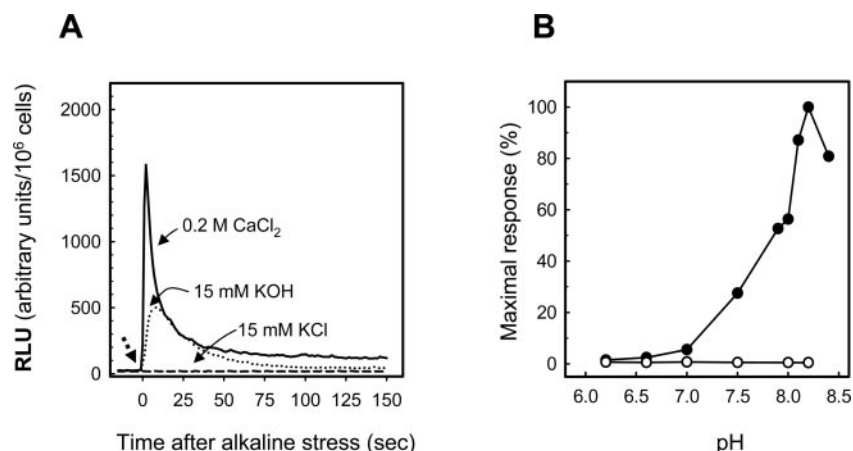
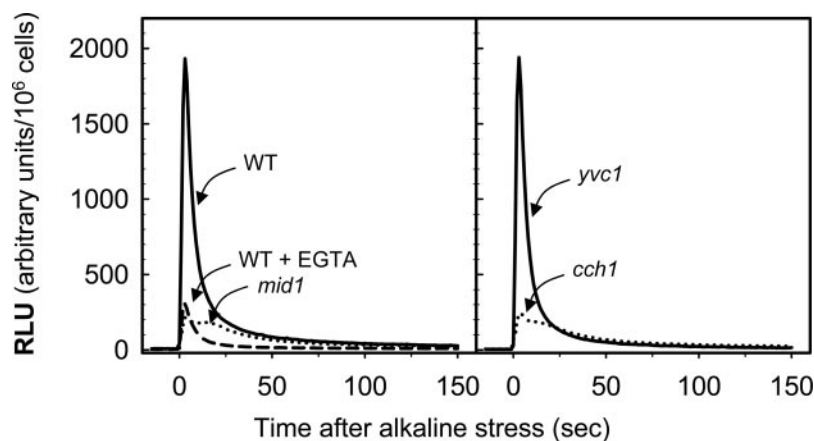


FIG. 1. Changes in cytoplasmic calcium concentration upon exposure of cells to alkaline pH. A, wild type strain JA100 was transformed with plasmid pEVP11/AEQ and incubated with coelenterazine for 5.5 h. Cells were centrifuged and resuspended in 173 μ l of fresh SD medium (lacking leucine). Three μ l of the culture were removed, and cells were fixed by adding a formaldehyde solution (7% final concentration) and kept at 4 $^{\circ}$ C for cell counting. After 15 min, the culture was transferred to luminometer tubes, and the appropriate solution was injected at zero time (indicated by the dotted arrow). The luminescence was integrated every second and is expressed as relative luminescence units (RLU) per 10^6 cells. Treatments are as follows: 0.2 M calcium chloride (solid line), 15 mM KOH (pH 8.1, dotted line), and 15 mM potassium chloride (dashed line). B, the wild type strain DBY746 was subjected to alkaline shock by injection of different concentrations of KOH to produce the indicated pH in the culture, and the intracellular calcium peak was measured as described for the A (closed circles). The data are presented as the percentage of the peak for a given pH divided by the maximal response obtained. Open circles correspond to the response of control cultures in which the equivalent concentrations of potassium chloride were injected.

FIG. 2. Effect of mutations affecting calcium fluxes in the response to alkaline pH. Wild type strain DBY746 and its isogenic derivatives RSC46 (*yvc1* Δ), RSC28 (*mid1* Δ), and RSC31 (*cch1* Δ) were subjected to alkaline shock (pH 8.2), and intracellular calcium was measured as described for Fig. 1A. When included, EGTA was present in the medium at 10 mM.



vitrogen). Quantitative real time PCR analysis of *PNC1*, *SPI1*, and *PRB1* expression was carried out in the ABI Prism 7900 HT sequence detection system (Applied Biosystems). *RPL28*, which was not induced by alkali, was used as a control. A 20- μ l amplification reaction was set up by mixing 2 μ l of a 100-fold dilution of the first strand cDNA reaction, 2 \times SYBRGreen Universal Master Mix (Applied Biosystems), and 900 nM primer pairs (ISOGEN Bioscience) designed using the Primer Express software (Applied Biosystems). The following forward and reverse primers were used for amplification: *PNC1*-Fw, 5'-CAC CCT TCC AGA CAT ATT TCG TT-3', and *PNC1*-Rw, 5'-ATA CCC TCT TGC GTG GAA TCA T-3'; *SPI1*-Fw, 5'-CTA GTT CCT CTG TAA TCG TGG TAC CAT-3', and *SPI1*-Rw, TGC AGT AGC AGT CGA GTT GTA GAA TAT T; *PRB1*-Fw, 5'-TGC TTT GGT CAT CCC AAA TCT-3', and *PRB1*-Rw, 5'-TCT GGG TCT CTC GTG GTG ATC-3'; and *RPL28*-Fw, 5'-GTT ATC GTC AAA GCT AGA TTC G-3', and *RPL28*-Rw, 5'-ACC AGC AGC TCT GAT TTT T-3'. Reaction parameters are as follows: 2 min at 50 $^{\circ}$ C, 10 min at 95 $^{\circ}$ C, and 40 cycles of 15 s at 95 $^{\circ}$ C and 1 min at 60 $^{\circ}$ C.

Two different extractions of total RNA were analyzed, at least by duplicate PCRs. The results presented are the mean of the two different RNA extractions. Basic analysis was performed by using SDS software (Applied Biosystems). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (26) was used for relative quantification using the cDNA from the noninduced sample of each strain as calibrator and *RPL28* as the endogenous control.

Evaluation of Oxidative Stress after High pH Exposure—Exponentially growing wild type DBY746 cells (A_{660} 0.5) in YPD medium were incubated for 1 h with dihydrorhodamine 123 (D1054, Sigma) at 2.5 μ g/ml essentially as described previously (27). Aliquots were taken and

made 30 mM KOH (which raised the pH to 8.1) or 2 mM hydrogen peroxide and further incubated with shaking for 30 and 90 min, respectively. Cultures were centrifuged, and cells were resuspended in phosphate-buffered saline solution and examined through a fluorescein filter using a Nikon Eclipse E800 fluorescence microscope. The percentage of cells showing fluorescence was determined after scoring \sim 2000 cells for each condition.

RESULTS

Exposure of Yeast Cells to Alkaline pH Results in a Transient Increase in Cytoplasmic Calcium Levels—To evaluate the changes in cytoplasmic calcium after exposure of yeast cells to alkalization of the medium, the wild type strain JA100 was transformed with a plasmid expressing the luminescent Ca^{+2} reporter aequorin and then challenged with 15 mM potassium hydroxide, to raise the pH to 8.1. This treatment resulted in a sharp increase in luminescence, which peaked about 15–20 s after the treatment and declined to base-line levels after approximately 1 min, indicating a transient increase in cytosolic calcium level (Fig. 1A). Treatment of the cells with KCl under the same conditions, which does not result in pH change, did not elicit this response. Exposure of the cells to 0.2 M $CaCl_2$ resulted in a sharp increase in luminescence, with kinetics very similar to the calcium burst induced by exposure to alkali. The intracellular calcium increase observed in response to alkali

was confirmed in three different wild type strains available in our laboratory, although the intensity of the response varies from strain to strain. In fact, in strain DBY746 the calcium burst triggered by alkali was particularly intense, even more than that observed in response to 0.2 M CaCl₂ (compare Figs. 1 and 2). For this reason we selected this strain for further studies. The effect of pH on cytoplasmic calcium increase was dose-dependent. As shown in Fig. 1B, the increase becomes

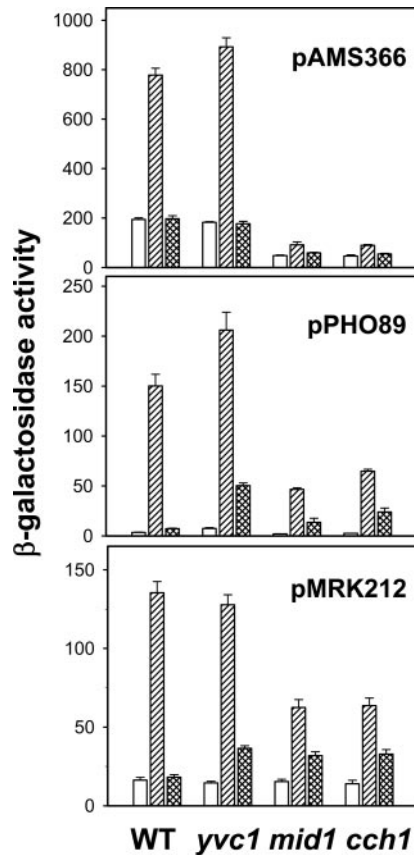


FIG. 3. Alkaline pH induction of CDRE-containing promoters is reduced in *cch1*Δ and *mid1*Δ mutants. Wild type strain DBY746 and its isogenic derivatives RSC46 (*yvc1*Δ), RSC28 (*mid1*Δ), and RSC31 (*cch1*Δ) were transformed with plasmid pAMS366, containing four copies in tandem of the CDRE from the *FKS2* promoter (10), plasmid pPHO89-*lacZ*, or plasmid pMRK212 (14). β-Galactosidase activity was determined in cells incubated for 60 min (pAMS366 and pMRK212) or 90 min (pPHO89-*lacZ*) in YPD medium at pH 6.2 (open bars), YPD-50 mM TAPS at pH 8.0 (hatched bars), or the same alkaline medium containing 10 mM EGTA (crossed bars). Data are mean ± S.E. from six independent transformants.

noticeable when cells are exposed to pH 7.5 and maximal at pH 8.2. These results indicate that budding yeast responds to alkaline stress with an intense and transient calcium burst.

To characterize the origin of the calcium, we repeated these experiments under different conditions by using mutants in genes involved in calcium homeostasis. Most interestingly, we observed that addition of the calcium chelating EGTA to the medium resulted in an almost negligible increase in intracellular calcium. As this could indicate that the main source for intracellular calcium may be of extracellular origin, we evaluated the intensity of the calcium burst in cells lacking genes encoding components of the main calcium channel, such as *mid1* and *cch1* mutants. As shown in Fig. 2, the calcium burst in response to alkalization was largely abolished in both cases. In contrast, mutation of *YVC1*, encoding a vacuolar membrane channel responsible for release of calcium from the vacuole to the cytosol, resulted in a calcium burst identical to that of the wild type strain. Therefore, exposure of yeast to alkali appears to trigger entry of calcium from the extracellular medium.

We considered that if alkaline stress is followed by a rise in cytosolic calcium, this should result in activation of a number of calcium-responsive promoters. To test this possibility, we transformed wild type cells as well as *yvc1*, *mid1*, and *cch1* mutants with constructs containing different CDRE fused to β-galactosidase as a reporter gene, and we tested their response to alkali. As shown in Fig. 3, alkaline induction observed in wild type cells transformed with plasmid pAMS366, which contains a tandem of four synthetic CDRE from the *FKS2* gene, is fully blocked by the presence of EGTA in the external medium. Most interestingly, although the response of the *yvc1* mutant mimics that of the wild type strain, the reporter gene was not induced by alkaline stress in *mid1* and *cch1* cells. When the different strains were transformed with plasmids pPHO89-*lacZ* (which carries the entire *PHO89* promoter fused to β-galactosidase) or plasmid pMRK212, containing a region of the *ENA1* promoter which includes a CDRE, the response to alkali was essentially lost in the presence of external EGTA and largely reduced in *mid1* and *cch1* mutants. These results demonstrate that exposure to alkali stress results in a burst of calcium that triggers a calcineurin-mediated transcriptional response.

Identification of Mutations That Result in Sensitivity to the Calcineurin Inhibitory Drug FK506—The observations that alkaline stress results in a burst of calcium and that calcineurin mutants were sensitive to high pH prompted us to investigate whether it could be some significant overlap between the set of mutations that results in sensitivity to high pH and those that present a synthetic phenotype with the loss

TABLE II
Mutations that result in growth defects in the presence of the calcineurin inhibitor FK506

Numbers in parentheses indicate the level of sensitivity to the drug (expressed as the ratio between of the absorbance of the culture in the absence and in the presence of the drug, see text for details). Genes in boldface type correspond to those identified in a recent report (28) as conferring a growth defect at alkaline pH when deleted. Underlines indicate that the gene was also identified in a recent survey for FK506-sensitive mutations on semi-solid media (48).

Function	FK506-sensitive mutants
Vacuole organization and biogenesis	<i>SAC1</i> (6.7), <i>VMA7</i> (4.1), <i>PEP3</i> (3.9), <i>VMA4</i> (3.7), <i>TFP1</i> (3.7), <i>CWH36</i> (3.5), <i>TFP3</i> (3.3), <i>CUP5</i> (3.3), <i>PEP5</i> (3.2), <i>VPS15</i> (2.9), <i>VMA21</i> (2.8), <i>VPS45</i> (2.7), <i>VMA8</i> (1.4), <i>KCS1</i> (1.2)
Transport in other organelles	<i>SUR4</i> (1.5), <i>ERV14</i> (1.4), <i>SEC28</i> (1.4), <i>VPS63</i> (1.3), <i>VPS61</i> (1.3), <i>RGPI</i> (1.3), <i>NPL3</i> (1.3)
Cell polarity, cell wall organization, and biogenesis	<i>FKS1</i> (21.7), <i>THP1</i> (10.7), <i>SIN4</i> (9.5), <i>KRE6</i> (8.8), <i>GAS1</i> (6.1), <i>BEM1</i> (3.9), <i>CAX4</i> (3.7), <i>GUP1</i> (2.4), <i>ILM1</i> (2.3), <i>OST3</i> (2.1), <i>YUR1</i> (1.8), <i>END3</i> (1.2)
Others	<i>KEX2</i> (14.4), <i>BTS1</i> (2.8), <i>OST4</i> (2.1), <i>LEM3</i> (2.1), <i>FYV6</i> (1.8), <i>HOM6</i> (1.6), <i>ERG2</i> (1.5), <i>CSF1</i> (1.5), <i>UBP3</i> (1.4), <i>RML2</i> (1.4), <i>SSN8</i> (1.3), <i>SHP1</i> (1.3)
Unknown	<i>YOR331C</i> (4.7), <i>YPR099C</i> (1.3), <i>GON5</i> (1.3)

TABLE III—continued

ORF	Gene	Time	-Fold	ORF	Gene	Time	-Fold	ORF	Gene	Time	-Fold
Others				YOR187W	<i>TUF1</i>	I	2.9	YMR002W		I	4.3
YBR008C	<i>FLR1</i>	E	2.2	YPL003W	<i>ULA1</i>	I	4.0	YMR090W		E	2.3
YBR202W	<i>CDC47</i>	L	2.8	YPL097W	<i>MSY1</i>	I	2.1	YMR110C		E	3.0
YCL020W		E	2.6	YPL154C	<i>PEP4</i>	I	3.9	YMR173W-a		E	3.0
YCR009C^b	<i>RVS161</i>	I	2.5	YPR108W	<i>RPN7</i>	I	4.4	YMR195W	<i>ICY1</i>	E	3.0
YDL161W	<i>ENT1</i>	E	2.0	YPR149W	<i>NCE102</i>	E	2.9	YMR291W		E	4.8
YDR077W ^a	<i>SED1</i>	E	2.7	Transcription and RNA processing				YMR316W^b	<i>DIA1</i>	E	9.5
YDR168W	<i>CDC37</i>	I	2.3	YBR142W	<i>MAK5</i>	L	2.5	YNL036W	<i>NCE103</i>	L	2.2
YGL037C^a	<i>PNC1</i>	I	6.1	YCR004C	<i>YCP4</i>	E	2.3	YNL208W^{a,b}	<i>SRF6</i>	I	3.6
YGR180C	<i>RNR4</i>	I	2.9	YDL014W	<i>NOPI</i>	E	3.7	YOL036W		I	2.0
YHR071W ^b	<i>PCL5</i>	I	4.7	YDR463W	<i>STP1</i>	E	2.0	YOL053W		E	2.3
YJL141C	<i>YAK1</i>	E	2.2	YGR200C	<i>ELP2</i>	E	3.3	YOR042W	<i>CUE5</i>	I	2.4
YJR028W		E	7.5	YKL043W	<i>PHD1</i>	E	6.2	YOR215C		E	4.5
YJR135C	<i>MCM22</i>	E	2.2	YLR270W	<i>DCS1</i>	E	3.0	YOR220W ^b		E	2.3
YKL193C	<i>SDS22</i>	L	2.8	YMR064W	<i>AEP1</i>	E	4.9	YPL004C	<i>LSP1</i>	E	2.4
YKR076W ^a	<i>ECM4</i>	E	2.2	YMR153W	<i>NUP53</i>	I	4.4	YPL066W		E	2.1
YML045W		E	9.9	YMR302C	<i>PRP12</i>	E	2.2	YPL206C		E	5.5
YML057W	<i>CMP2</i>	E	2.1	YNL016W	<i>PUB1</i>	I	2.4				
YML128C	<i>MSC1</i>	E	9.2	YOL123W	<i>HRP1</i>	E	2.1				
YMR276W	<i>DSK2</i>	E	2.1								
YNR026C	<i>SEC12</i>	I	2.7								

^a This gene is also induced by damage to the cell wall (52, 53).

^b This gene is also induced by addition of high calcium to the medium (13).

of calcineurin function. To this end, we monitored the growth of roughly 4800 haploid mutants in the presence of 1.5 μ g/ml of the calcineurin inhibitor FK506. A total number of 241 putative positive clones were isolated. Upon retesting these clones at different FK506 concentrations, we obtained 48 mutants presenting a measurable growth defect in the presence of (at least) one concentration of the drug. As shown in Table II, more than one-half of these mutations affected genes involved in either vacuolar organization and biogenesis or cell polarization and cell wall organization. This second functional subset of genes presented rather intense phenotypes and included *FKS1* (encoding a β -1,3-glucan synthase), *GAS1* (a β -1,3-glucanoyltransferase), and *KRE6* (required for β -1,6-glucan biosynthesis). Most interestingly, 20 genes presented in Table II (42% of the total number of genes, denoted in boldface type) were also identified in a recent search carried out in our laboratory that yielded 118 gene deletions producing hypersensitivity to high pH (28).

Global Analysis of the Transcriptional Response to Alkaline pH Mediated by Calcineurin—The experiments described above raised the possibility that calcium and calcineurin could represent important components of the transcriptional response to alkaline pH. To evaluate this possibility, we have performed DNA microarray experiments in which wild type cells, calcineurin-deficient mutants (*cnb1*), and cells lacking the calcineurin-activated Crz1/Tcn1 transcription factor (*crz1*) were challenged with high pH (8.0) for different times (10, 20, and 45 min). Exposure of wild type cells to pH 8.0 resulted in at least a 2-fold increase in the mRNA level of 266 genes (Table III). Among these genes, 159 showed a peak at 10 min (early response), 86 peaked 20 min after alkaline challenge (intermediate), and 21 showed a late response (peak after 45 min). They belong to diverse functional categories, according to the “Saccharomyces Genome Data base” classification (29). It is remarkable that 77 genes (29% of the total number of induced genes) can be listed as involved in metabolic pathways, and 37 of those correspond to carbohydrate metabolism or energy-generating pathways. A substantial number of genes related to stress response are also activated in response to high pH. Remarkably, the list contains several genes known to be involved in the response to oxidative stress, such as *GRX1*, *TRX2*, *PRX1*, and others. Exposure to alkali resulted in a decrease in mRNA levels of at least 2-fold for 157 genes. It is remarkable

that a substantial number (33 genes) corresponds to ribosomal proteins or to proteins related to ribosome assembly. Additional data on induced and repressed genes can be found in the supplemental Tables I and II, respectively.

DNA microarray experiments were conducted in cells lacking calcineurin or the Crz1 transcription factor. The ratio between the responses of *cnb1* cells and wild type cells was calculated, and different levels of calcineurin dependence were established. Thus, a *cnb1*/wild type ratio of <0.67 was considered the threshold for defining the dependence of calcineurin. Genes showing a ratio $0.67 > X > 0.50$ were considered “weakly dependent”; those with a ratio $0.50 > X > 0.25$ were defined as “strongly dependent,” and those with a ratio <0.25 were ranked as “totally dependent.” Genes induced more than 2.5-fold in wild type cells and considered not induced (ratio high pH/low pH <1.3) in *cnb1* cells were also considered as totally dependent. Twenty-seven genes showed some level of calcineurin dependence at its peak response (Table IV). The induction of 21 (78%) of these genes was totally or strongly dependent on the presence of Cnb1, indicating that calcineurin signaling is a major component of its transcriptional response to alkaline pH. Most calcineurin-dependent genes (74%) corresponded to early responsive genes, and three additional genes showed very similar induction 10 and 20 min after stress.

Similar experiments were carried out by using *crz1tcn1* cells, defective in the transcription factor known to be activated by calcineurin. In this case, 21 genes were found to be sensitive in response to the absence of the transcription factor using the criteria employed to define calcineurin sensitivity. As shown in Table IV, most genes whose induction is affected by the *cnb1* mutation are also affected by the absence of Crz1, and in many cases, the intensity of the effect of both mutations is similar. The existence of experimental data regarding the sequences that could be recognized by Crz1 in responsive promoters allowed us to search within both strands of the $-800/-1$ upstream regions of the calcineurin-sensitive genes for putative Crz1-binding sites (a GAGGCT core sequence plus some variants such as GNGGCKCA and GWGGCTG) by using the DNA pattern algorithm (30) available at the “Regulatory Sequence Analysis Tools” website (rsat.ulb.ac.be/rsat/). We found 16 sequences in 11 of the calcineurin-sensitive genes (41%). A similar analysis performed with 400 randomly selected genes in-

TABLE IV
Genes whose alkaline pH induction is reduced by calcineurin deficiency

Timing of the response is defined in the text. Numbers indicate the induction level for each strain at the indicated timing(s). ND, not dependent; WD, weakly dependent; SD, strongly dependent; TD, totally dependent. See text for details.

ORF	Timing	WT	<i>cnb1</i>	Calcineurin dependence	<i>crz1</i>	Crz1 dependence	CDRE motif
YAL005C (<i>SSA1</i>)	E/I	2.2/2.2	1.1/0.8	SD/SD	1.6/1.7	SD/SD	0
YBR016W	E/I	2.7/2.7	1.5/1.8	WD/WD	1.0/1.1	WD/WD	0
YBR287W	E	3.8	1.9	SD	2.0	SD	1
YBR296C (<i>PHO89</i>)	E	4.9	0.7	TD	1.0	TD	2
YCL020W	E	2.6	1.1	TD	0.9	TD	0
YDR077W (<i>SED1</i>)	E	2.7	1.4	WD	1.7	WD	0
YDR372C (<i>VPS74</i>)	E	2.9	1.2	SD	1.3	SD	1
YEL060C (<i>PRB1</i>)	E	9.1	3.8	SD	4.1	SD	2
YER062C (<i>HOR2</i>)	E/I	2.8/2.8	1.0/1.3	TD/TD	2.5/1.5	ND/WD	0
YGL253W (<i>HXK2</i>)	E	4.1	1.3	SD	1.9	SD	0
YGR032W (<i>GSC2</i>)	I	2.5	0.8	TD	0.9	TD	2
YGR157W (<i>CHO2</i>)	E	2.9	1.3	TD	1.1	TD	0
YGR211W (<i>ZPR1</i>)	E	2.8	1.3	TD	2.0	ND	0
YJR032W (<i>CPR7</i>)	L	3.2	1.3	SD	1.2	TD	0
YKL043W (<i>PHD1</i>)	E	4.1	2.2	WD	2.4	WD	0
YKL152C (<i>GPM1</i>)	E	2.2	1.1	SD	1.0	SD	1
YLR012C	L	2.1	1.0	SD	1.0	SD	0
YLR089C (<i>ALT1</i>)	E	3.7	2.0	WD	2.5	ND	0
YLR142W (<i>PUT1</i>)	E	2.6	1.2	TD	2.4	ND	1
YMR011W (<i>HXT2</i>)	E	21.1	9.7	SD	15.3	ND	0
YMR083W (<i>ADH3</i>)	E	2.2	1.1	SD	0.9	SD	0
YNL160W (<i>YGP1</i>)	E	2.7	1.5	WD	1.1	TD	1
YNL208W	E	3.1	1.8	WD	2.7	ND	0
YOR049C (<i>RSB1</i>)	E	3.3	1.2	TD	2.5	ND	0
YOR220W	E	4.5	1.9	SD	3.0	WD	2
YPL057C (<i>SUR1</i>)	E	3.2	1.4	SD	1.9	WD	2
YPL154C (<i>PEP4</i>)	I	3.9	1.6	SD	2.2	WD	1

indicated that only 28% of the genes contained one or more copies of the query sequences.

The relationship between the effect of the *cnb1* and *crz1* mutations in the response to alkaline pH can be deduced from Fig. 4. In this figure, the ratio between the induction level in *cnb1* or *crz1* mutants and the wild type cells has been calculated and their logarithms plotted. Analysis of the data reveals that in most cases a good correlation is found ($r = 0.81$). Most interestingly, four genes (*YAL061w*, *PNC1*, *SPI1*, and *PRB1*) lie clearly outside the main data and appear as dependent on Crz1 but not on calcineurin. Northern blot analysis of one of these genes (*PNC1* (see inset in Fig. 4)) and quantitative real time PCR analysis (Table V) of three of them (*PNC1*, *PRB1*, and *SPI1*) confirmed the DNA microarray data. A computer analysis of the $-800/-1$ upstream region revealed that all four genes contain one (*YAL061w* and *SPI1*) or two (*PNC1* and *PRB1*) putative Crz1-binding sequences. *PRB1* was also induced at 10 min, and at this time the effect was strongly dependent on calcineurin (Table IV).

Exposure to High pH May Result in Oxidative Stress—The observation that a number of genes functionally related to oxidative stress were induced after alkaline stress or were required to display normal sensitivity to high pH (28) prompted us to investigate whether alkalization of the media could somehow result in oxidative stress. To this end, cells were loaded with dihydrorhodamine 123 (which is commonly used as a probe for oxidative stress because it can be oxidized inside the cells to the fluorescent derivative rhodamine 123) and exposed to high pH or to the oxidizing agent hydrogen peroxide. As it can be observed in Fig. 5A, microscopic examination revealed that a number of cells exposed for 30 min to alkaline pH presented fluorescence. The percentage of fluorescent cells was around 12% of the total population, and fluorescence was maintained (although somewhat less intense) after 60 min of exposure to alkali (not shown).

We then considered the possibility that if exposure to high pH involved oxidative stress to some extent, then the enhanced expression of certain genes as a result of alkaline stress could

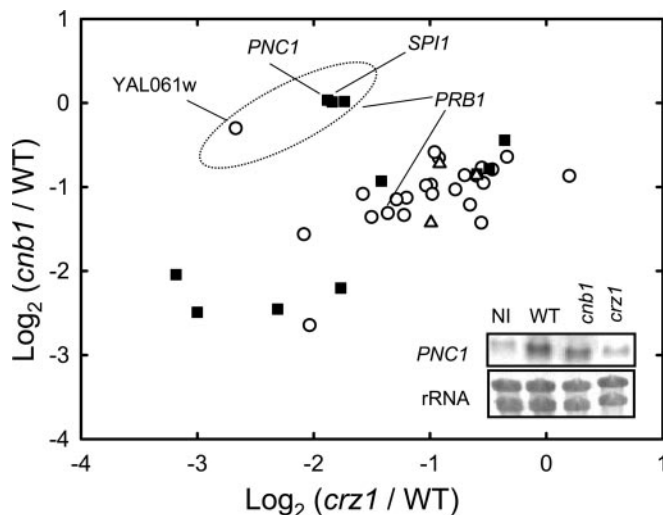


FIG. 4. Relationship between calcineurin dependence and Crz1 dependence in the transcriptional response to alkaline stress. The scatter plot represents the \log_2 of the degree of dependence of the response to alkaline pH in calcineurin (*cnb1*/WT) and *crz1* mutants (*crz1*/WT) for genes whose response is significantly affected in at least one of these mutant strains after 10 (circles), 20 (squares), or 45 min (triangles) of stress. The dotted ellipse includes the genes sensitive to the absence of Crz1 but unaffected in the calcineurin mutant. The inset shows the Northern blot analysis of one example (*PNC1*). Methylene blue staining of the rRNA is included as reference for loading and transfer efficiency. NI, noninduced wild-type cells.

be mediated, at least in part, by well known oxidative stress-response mechanisms. To this end, we tested the response to high pH and hydrogen peroxide of *PRX1*, which encodes a thioredoxin peroxidase known to be induced upon oxidative stress, by using a *lacZ* translational fusion. As shown in Fig. 5B, exposure to high pH or to hydrogen peroxide increased the activity of the promoter, and in both cases, the increase was abolished in the absence of the Yap1 transcriptional promoter. Deletion of the *SKN7* gene affected only partially the response

TABLE V

Evaluation by DNA microarray and quantitative real time PCR of the alkaline pH induction of genes *PCN1*, *PRB1*, and *SPI1*

Numbers indicate fold of induction for strain DBY746 (wild type), RSC21 (*cnb1*), and EDN92 (*crz1*), as well as the ratio of induction calculated for strains EDN92 and RSC21 (*crz1/cnb1*). Microarray data correspond to the mean of three different microchip experiments (from two independent RNA preparations), and real time PCR results are the means from these two RNA preparations, determined in duplicate. Note that in this table microarray data for the wild type strain may differ from Table III, which results from calculation of the median from five microchips. RT indicates reverse transcriptase.

Gene	Wild type		<i>cnb1</i>		<i>crz1</i>		<i>crz1/cnb1</i>	
	Arrays	RT-PCR	Arrays	RT-PCR	Arrays	RT-PCR	Arrays	RT-PCR
<i>PNC1</i>	4.8	7.6	5.3	11.1	2.8	4.0	0.48	0.36
<i>PRB1</i>	5.7	7.1	7.0	15.0	1.5	2.8	0.21	0.19
<i>SPI1</i>	7.8	13.3	7.7	21.0	2.8	9.3	0.36	0.44

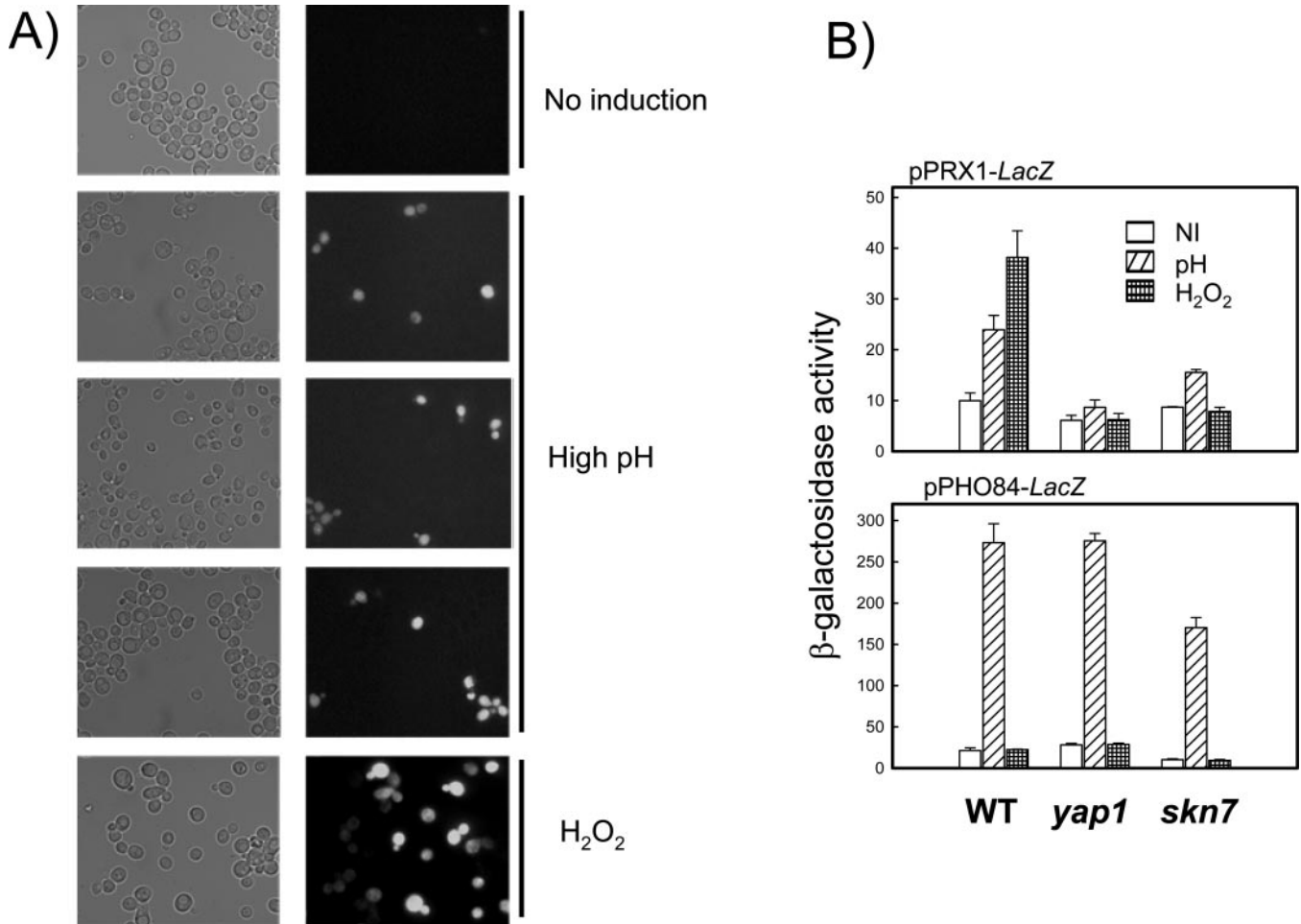


FIG. 5. **Alkaline stress may result in oxidative stress.** A, DBY746 wild type cells were loaded with dihydrorhodamine 123 and exposed to pH 8.1 for 30 min or to 2 mM hydrogen peroxide for 90 min, as indicated. Reactive oxygen species oxidizes dihydrorhodamine 123 to the fluorescent derivative rhodamine 123. B, the wild type strain BY4741 and its isogenic *yap1* and *skn7* derivatives were transformed with the indicated reporter plasmids, and cells were subjected to high pH stress (pH 8.1) or oxidative stress (0.25 mM hydrogen peroxide). Cells were collected, and β -galactosidase activity was determined. Data are mean \pm S.E. from three independent clones.

of the *PRX1* promoter to high pH. Under the same conditions, the alkaline-responsive *PHO84* promoter (14) did not respond to oxidative stress, and its pH-dependent activation was not affected by deletion of *YAP1* or *SKN7*.

DISCUSSION

In a recent report (14), we described a genome-wide analysis of the transcriptional response of yeast cells to mild alkaline stress, and we presented evidence that in specific cases (such as *ENA1* or *PHO89*) the signaling pathway involving calcineurin and the calcineurin-activated transcription factor *Crz1/Tcn1* was necessary for partial or even full response to this specific stress condition. Activation of calcineurin has been commonly considered as the result of an increase of cytosolic calcium

levels (31). However, recent evidence indicates that the functional regulation of the phosphatase can be quite complex. For instance, calcineurin activity can be regulated by members of the RCN (regulators of calcineurin) family, also termed calcipressins (32–34), represented in the budding yeast by the *RCN1* gene (32). Most interestingly, the effect of *Rcn1* on calcineurin activity depends on its phosphorylation state, and recent data points to *Mck1*, a member of the glycogen synthase kinase 3 family, as the major *Rcn1* kinase *in vivo* (35). Furthermore, the subcellular location and function of *Crz1/Tcn1* is also regulated by phosphorylation (12, 36). Therefore, the calcineurin pathway probably integrates diverse signals at different levels. Consequently, we considered it necessary to test directly *in vivo* whether exposure to alkali would represent a

rise in the level of cytosolic calcium and, if so, to evaluate the kinetics of the process and to investigate the origin of the cation.

To this end, we used a reporter system based in the expression of apoaequorin (5), a method employed by several laboratories to monitor *in vivo* changes in calcium concentration under a number of circumstances. Our results indicate that alkali stress triggers a very rapid and transient burst of calcium, very similar to what has been observed for hypotonic or saline stress (7–9), and much faster than that described for sphingosine treatment (6). This increase is only apparent when cells are exposed at pH 7.5 (Fig. 1B) and increases until pH 8.2 is reached. This profile fits well with the dose response for the alkaline pH induction of *PHO89*, a gene known to be activated by alkaline pH through the calcineurin pathway, whose activation becomes significant around pH 7.4–7.5 (14). In contrast, activation by alkaline pH of a related gene, *PHO84*, which requires a lower pH, is independent of calcineurin (14).

An increase in cytosolic calcium can result from entry of the cation from the external medium or by release from internal stores, thus being the vacuole of the major calcium storage site in yeast (38, 39). For instance, the initial increase of intracellular calcium upon hypotonic shock has been attributed to release from intracellular stores, whereas the sustained one would have an extracellular origin (7). There is some controversy regarding the origin of cytosolic calcium upon saline stress. Thus, it has been defined as being of vacuolar origin and mediated by the Yvc1 channel (8) or of extracellular origin and imported into the cells through the Mid1-Cch1 channel (9). In our case, the absence of Yvc1 did not result in a significant decrease in the peak of calcium, suggesting that the contribution of the vacuole to this burst is negligible. In contrast, our data are consistent with the notion that the increase in cytosolic calcium observed after alkaline stress is the result of an enhanced influx from the external medium and that the vast majority of this effect requires the presence of both the Cch1 and Mid1 proteins. This is important to note because, although there is plenty of biochemical and genetic evidence that both Cch1 and Mid1 work together as a high affinity calcium influx system (4, 9, 40–42), recent evidence indicates that in some cases, such as the amiodarone-induced transient cytosolic calcium burst, Mid1 but not Cch1 is required (43). The residual calcium increase observed in *mid1* and *cch1* cells could be explained by the existence of a recently identified low affinity calcium influx system (4, 44, 45).

Our data also indicate that the transient increase in intracellular calcium triggered by alkaline stress can result in functional changes at the transcriptional levels. We show (Fig. 3) that several transcriptional elements containing known CDRE do respond to increases in external pH in a fashion that closely agrees with the profiles of the observed calcium burst. For instance, the lack of Yvc1 does not affect the response of any of the calcium-responsive reporters tested. In contrast, addition of EGTA or deletion of either *MID1* or *CCH1* fully blocks the response from reporter pAMS366, which contains a tandem of four CDRE from the *FKS2* gene (10), or largely abolishes the response from a fragment of the *ENA1* promoter, which contains a CDRE (pMRK212), as well as from the entire *PHO89* promoter. The partial response to high pH observed with reporter pMRK212 could be because of the residual calcium entry observed in such mutants (Fig. 1) and/or to the existence of additional alkaline pH-responsive elements. In this regard, it is worth noting the existence of an Nrg1 binding site at positions –730/–724 of the *ENA1* promoter, which is included in pMRK212 and largely overlaps the CDRE. NrgI is a transcriptional repressor that has been recently shown to be the target

of Rim101, a C₂H₂ zinc finger protein important for a subset of transcriptional alkaline pH responses (46, 47).

Our systematic screening for mutations conferring sensitivity to the calcineurin inhibitor FK506 yielded 48 genes. In a recent report, 35 mutations were defined as FK506-sensitive by growing the cells in semi-solid (agar) medium (48). Eighteen of these mutations were also found in our screening (see Table II). It must be noted that most mutations reported here and missed in Ref. 48 correspond to relatively weak phenotypes, suggesting that our screen was probably more sensitive. On the other hand, most mutations reported in Ref. 48 that are not present in our Table II correspond to strains that show rather slow growth and, consequently, presented unreliable absorbance values even after the largest incubation period (48 h). Therefore, both sets of data can be considered as complementary. In any case, we show that 20 mutations (42%) that confer sensitivity to FK506 (Table II) also resulted in sensitivity to high pH in a recent screen of the same library (28). It is worth noting, given a total number of 4825 common deletions analyzed in both screens and assuming that FK506 sensitivity and high pH sensitivity were independent events, that one should expect only one gene sharing both phenotypes. This large overlap probably reflects the importance of a functional calcineurin pathway in the response to high pH stress.

We have tested the transcriptional response of wild type yeast cells 10, 20, and 45 min after a shift from standard growth conditions (pH 6.2) to pH 8.0, and we found that 266 genes were induced at least 2-fold and at least one of the time points was investigated. We carried out a similar time course experiment some time ago (14) aiming to identify genes responsive to a milder pH stress (pH 7.6). By using the same wild type genetic background, this experiment resulted in the induction of only 150 genes. Comparison of both sets of data reveals that 46 genes are also induced when cells are challenged at pH 8.0. Therefore, different stress intensity is able to elicit a different transcriptional response, indicating that some promoters are more sensitive to alkaline pH conditions than others. This is in agreement with the results obtained in our previous work in which four pH-responsive promoters were analyzed under different alkaline pH conditions (14). The intensity of the pH stress used in the present work resembles quite closely the conditions studied by Causton *et al.* (49), in which cells were switched from pH 6.0 to 7.9. This resulted in 463 genes with at least a 3-fold increase in expression from 10 to 60 min. In our case, we detect 113 overlapping genes (43%), a figure much higher than that previously observed in wild type cells shifted to pH 7.6 (33 genes, 22%). In any case, it should be noted that the different technological platforms used in both experiments make it difficult to carry out direct comparison of the results.

As can be deduced from Table III, the genes induced by alkaline stress are involved in a large number of cellular functions. It is remarkable, however, that a significant number of these genes, such as *UGA2*, *GRX1*, *HSP12*, *TRX2*, *MCR1*, *GAD1*, *GRE2*, or *PRX1*, are related to the response to oxidative stress. A recent screen carried out in our laboratory, using a systematic deletion mutant library, for mutations that result in sensitivity to alkaline pH revealed that mutation of *SOD1*, *SOD2*, or *CCS1* (*LYS7*), encoding key enzymes in tolerance to oxidative stress, results in a dramatic alkaline phenotype (28). A possible explanation would be that exposure to an alkaline environment could involve, to some degree, oxidative stress. Here we tested this hypothesis by using two different approaches. We found that a significant percentage of cells exposed to high pH stress produced positive (fluorescent) signal upon preincubation with dihydrorhodamine 123, a widely used probe for detection of reactive oxygen species, although the

response was not as intense as that obtained by using 2 mM hydrogen peroxide as the oxidative agent. Furthermore, the alkaline response of the *PRX1* promoter (a gene known to respond to oxidative stress) was fully abolished in cells lacking the *YAP1* gene, which codes for a bZip transcription factor required for oxidative stress tolerance (for a recent review see Ref. 50). This is not a general effect, because the induction of the alkaline-responsive gene *PHO84* was unaltered in *yap1* cells. In fact, *PRX1* contains a TTAGTGA sequence 705 nucleotides upstream of the start codon, which represent a potential binding site for Yap1. Most interestingly, *PRX1* expression seems to be regulated by multiple pathways in response to different stress conditions, and one of these involves the Msn2/Msn4 activators (51). However, we have observed that the pH-induced response of *PRX1* is not altered in *msn2* or *msn4* cells (not shown). In any case, our data support the notion that part of the phenotypic effects derived from exposure to high pH (including part of the transcriptional response) might be the result of an oxidative stress situation.

Two recent reports (52, 53) have addressed the transcriptional response to cell wall damage as a result of specific mutations or chemical or enzymatic treatment. These authors identify 178 genes whose expression is increased at least 1.9-fold upon exposure to Congo Red or zymolyase. Comparison of these results with our microarray data reveals a striking overlap of 28 genes, well above the expected overlap (8 genes) if both events were fully unrelated. These common genes include relevant elements of the cell wall, such as *GSC2* (component of β -1,3-glucan synthase), *CRH1* (a cell wall glycosidase), *SED1* (a cell surface glycoprotein that contributes to cell wall integrity and stress resistance), or its structural homolog *SPI1* (a glycosylphosphatidylinositol-anchored cell wall protein). It is remarkable that all four genes are also induced by mutation of certain cell wall-related genes (52) and that *SED1* has been also reported as required for oxidative stress tolerance (54). These results suggest that exposure to alkaline pH might lead (at least up to some extent) to a situation of cell wall damage. This hypothesis is reinforced by the observation that mutation of key elements of the cell wall maintenance of the mitogen-activated protein kinase pathway (*BCK1* and *SLT2*) or several cell wall components, such as *SED1*, *KRE1*, *GAS1*, and others, results in a severe phenotype of alkaline pH sensitivity (21, 28). Most interestingly, 12 of the 48 genes (25%) whose deletion results in sensitivity to FK506 (Table II) correspond to genes related to cell polarity and cell wall organization and biogenesis. This may reflect the link between alkaline stress and cell wall damage and the requirement for a functional calcineurin pathway under both stress situations. It is worth noting that it has been reported that exposure to low external pH promotes changes in the organization of the cell wall, although in this case the Slt2/Mpk1 mitogen-activated protein kinase does not seem to be involved (55).

Our data show that the response of 27 genes (10%) that are induced by alkaline stress involves, at least in part, the calcineurin pathway, indicating that this pathway contributes significantly to the alkaline transcriptional response. It is worth noting that, almost without exception, the calcineurin-sensitive genes can be classified as early genes (even if they are classed as intermediate, they show already a response after 10 min of stress). This rapid transcriptional response is in agreement with the very rapid kinetics of the calcium burst observed after exposure to alkali. Exposure to external high calcium results in a transcriptional response, recently characterized at the genomic level, which involves increased expression of 153 genes (13). We have compared our data with that of Yoshimoto *et al.* (13) and found that 22 genes that are presented in Table

III are also induced by high calcium in the medium. Seven of these genes (*YBR287W*, *PHO89*, *PRB1*, *PUT1*, *YNL208W*, *YOR220W*, and *SUR1*) have also been defined as sensitive to the absence of calcineurin in this work.

Comparison of the transcriptional response to alkaline stress in *cnb1* and *crz1* mutants indicates that in most cases the absence of *CRZ1* results in a decrease in the response quite similar to that observed in a *cnb1* strain. This would be in agreement with the observation by Yoshimoto *et al.* (13) that most of the calcineurin-dependent transcriptional response to high levels of external calcium is lost in a *crz1* strain and supports the notion that this transcription factor is the main mediator for the calcineurin-dependent transcriptional response. It should be noted, however, that computer analysis of the upstream regions of calcineurin- and *crz1*-sensitive genes in Table IV, using consensus sequences reported for Crz1 binding (13, 52), gave positive results only in ~50% of the cases. This could mean that further work is required to refine the consensus sequence for Crz1 binding. On the other hand, the observation that certain genes are sensitive to the absence of Crz1 but not to that of calcineurin is rather intriguing. A possible explanation would be that this transcription factor could be also regulated in a calcineurin-independent way.

Acknowledgments—We thank Martha Cyert and Ann Batiza for strains, plasmids, and advice in the use of the aequorin reporter. We are grateful to Joaquim Ros and Elisa Cabiscol for advice on testing oxidative stress and to F. Pérez-Bermejo and A. Friedrich (Fujisawa Co.) for kindly supplying the calcineurin inhibitor FK506. The excellent technical assistance of Anna Vilalta and María Jesús Álvarez is acknowledged.

REFERENCES

- Cyert, M. S., Kunisawa, R., Kaim, D., and Thorner, J. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 7376–7380
- Kuno, T., Tanaka, H., Mukai, H., Chang, C. D., Hiraga, K., Miyakawa, T., and Tanaka, C. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **180**, 1159–1163
- Iida, H., Yagawa, Y., and Anraku, Y. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 13391–13399
- Muller, E. M., Locke, E. G., and Cunningham, K. W. (2001) *Genetics* **159**, 1527–1538
- Nakajima-Shimada, J., Iida, H., Tsuji, F. I., and Anraku, Y. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **88**, 6878–6882
- Birchwood, C. J., Saba, J. D., Dickson, R. C., and Cunningham, K. W. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 11712–11718
- Batiza, A. F., Schulz, T., and Masson, P. H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 23357–23362
- Denis, V., and Cyert, M. S. (2002) *J. Cell Biol.* **156**, 29–34
- Matsumoto, T. K., Ellsmore, A. J., Cessna, S. G., Low, P. S., Pardo, J. M., Bressan, R. A., and Hasegawa, P. M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 33075–33080
- Stathopoulos, A. M., and Cyert, M. S. (1997) *Genes Dev.* **11**, 3432–3444
- Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S., and Cunningham, K. W. (1997) *Genes Dev.* **11**, 3445–3458
- Stathopoulos-Gerontides, A., Guo, J. J., and Cyert, M. S. (1999) *Genes Dev.* **13**, 798–803
- Yoshimoto, H., Saltsman, K., Gasch, A. P., Li, H. X., Ogawa, N., Botstein, D., Brown, P. O., and Cyert, M. S. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 31079–31088
- Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R., and Arino, J. (2002) *Mol. Microbiol.* **46**, 1319–1333
- Mendoza, I., Rubio, F., Rodriguez-Navarro, A., and Pardo, J. M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 8792–8796
- Nakamura, T., Liu, Y., Hirata, D., Namba, H., Harada, S., Hirokawa, T., and Miyakawa, T. (1993) *EMBO J.* **12**, 4063–4071
- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Winzler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connolly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., and Davis, R. W. (1999) *Science* **285**, 901–906
- Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., and Hilger, F. (1991) *Yeast* **7**, 475–477
- Myers, A. M., Tzagoloff, A., Kinney, D. M., and Lusty, C. J. (1986) *Gene (Amst.)* **45**, 299–310
- Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachet, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J.,

ARTÍCULO 3

Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAP kinase pathway

Raquel Serrano*, Humberto Martín†, Antonio Casamayor* and Joaquín Ariño*‡

*Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Ed. V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, and †Departamento de Microbiología II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain

Running Title: MAP kinase pathway and high pH stress

‡ Address for correspondence: Dr. Joaquín Ariño, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Facultat de Veterinària, Ed. V, Universitat Autònoma de Barcelona, 08193 Bellaterra, Barcelona, Spain. Tel. 34-93-5812182. FAX: 34-93-5812006. e-mail: Joaquin.Arino@uab.es

Alkalinization of the external environment represents a stress situation for *Saccharomyces cerevisiae*. Adaptation to this circumstance involves the activation of diverse response mechanisms, whose components are still largely unknown. We show here that mutation of members of the cell integrity Pkc1/Slt2 MAP kinase module, as well as upstream and downstream elements of the system confers sensitivity to alkali. Alkalinization results in a fast and transient activation of the Slt2 MAP kinase that depends on the integrity of the kinase module and is largely abolished by sorbitol. Lack of Wsc1, removal of specific extracellular and intracellular domains or substitution of Y303 in this putative membrane stress sensor, renders cells sensitive to alkali and considerably decreases alkali-induced Slt2 activation. In contrast, constitutive activation of Slt2 by the *bck1-20* allele increases pH tolerance in a *wsc1* mutant. DNA microarray analysis revealed that several genes encoding cell wall proteins, such as *GCS2/FKS2*, *DFG5*, *SKT5* and *CRH1*, are induced by high pH in a Slt2-dependent manner. We observe that *dfg5*, *skt5*, and particularly *dfg5 skt5* cells, are alkali sensitive. Therefore, our results show that an alkaline environment imposes a stress condition on the yeast cell wall. We demonstrate that the Slt2-mediated MAPK pathway plays an essential role in the adaptive response to this insult, and that Wsc1 participates as an essential cell surface pH sensor. Moreover, these results provide a new example of the complexity of the response in budding yeast to the alkalinization of the ambient.

The yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a model organism in biology with an

unquestionable biotechnological interest, grows better at acidic than at neutral or alkaline pH. Maintenance of an acidic environment is primarily based on the active proton extrusion mediated by its plasma membrane H⁺-ATPase, and this proton gradient is critical for the uptake of different nutrients, including diverse cations (1;2). Therefore, sudden alkalinization of the environment represents a stress condition for this yeast and, in order to survive, *S. cerevisiae* must detect the change and react to it, triggering an adaptive response.

The response of budding yeast to alkalinization of the environment has been characterized in some detail in the last few years, in many cases through the study of mutants sensitive to high pH conditions and/or the definition of the transcriptional adjustments after exposure to alkaline pH. Interestingly, the response in *S. cerevisiae* seems to be more complex than that characterized in other fungi, such as *Aspergillus nidulans*. In this fungus, the zinc finger PacC transcription factor plays a pivotal role in mediating pH regulation by directly activating pH responsive promoters (see (3;4) for reviews). *S. cerevisiae* encodes a PacC homolog, Rim101, which has been shown to play a role in alkaline pH response and adaptation, although Rim101 is responsible only for a limited set of alkali-induced transcriptional responses. In addition, its activation requires a single proteolytic step, in contrast to the two-step described for *A. nidulans*, and its action on responsive promoters seems to be an indirect one, by repressing the expression of transcriptional repressors such as *NRG1* (5-8). In addition to the Rim101 pathway, adaptation to external high pH involves the activation of the calcium-activated phosphatase calcineurin (8-10). It has been shown that exposure to alkali triggers a strong and transient intracellular calcium burst (10),

which results in activation of calcineurin and the calcineurin-regulated transcription factor Crz1/Tcn1. Activation of the calcineurin/Crz1 pathway has relevance in high pH adaptation, as deduced from the alkali-sensitive phenotype of *cnb1* mutants. About 10% of the alkali-induced transcriptional response is partially or fully dependent of the activation of this pathway (8;10). The analysis of the transcriptional profile after alkaline stress also reveals that alkalinization of the medium probably affects the availability of different nutrients, such as phosphate, and that of specific cations, such as copper and iron (6;8;11;12). Similarly, high pH stress involves some degree of oxidative stress (12).

A recent screen for strains sensitive to high pH carried out in our laboratory using a systematic library of deletion mutants revealed 118 genes that were important to ensure normal alkaline tolerance (12). Interestingly, our list included *BCK1* and *SLT2/MPK1*, which are components of the MAP kinase cascade involved in cell wall remodeling and maintenance of cellular integrity (see (13) for a recent review and references therein). This kinase module includes yeast protein kinase C (Pkc1), which in response to cell wall stress phosphorylates and activates the Bck1 kinase. Activated Bck1 can phosphorylate a pair of redundant MAP kinase kinases (Mkk1/2), which will activate the Slt2 MAP kinase. Upstream components of this pathway are a number of presumed membrane sensors (Wsc1-4, Mid2, Mtl1), which in some cases have been shown to signal through the Rho1 GTPase. Activation of Slt2 results in the phosphorylation of several nuclear and cytosolic targets. Among the nuclear targets are the transcription factors Rlm1, which seems responsible for most of the transcriptional effects derived from the activation of Slt2, and SBF (Swi4/Swi6).

The identification of *bck1* and *slt2* mutants as sensitive to high pH, supported by the results of an independent survey using liquid cultures (14), prompted us to consider the possibility that the Slt2 MAP kinase pathway might be involved in alkaline pH signaling, perhaps as a result of the generation of some sort of cell wall stress. In this report we demonstrate that alkaline stress rapidly and transiently activates Slt2, that this activation is largely mediated by the Wsc1 cell membrane sensor (also known as *SLG1* and *HCS77*), and that it results in an increase in the expression of several

specific genes, some of which are relevant for adaptation to high pH stress.

Experimental Procedures

Bacterial and yeast strains and culture conditions - *Escherichia coli* DH5 α was used as a host for DNA cloning experiments. Bacterial cells were grown at 37 °C in LB medium containing, when needed, 50 μ g/ml ampicillin for plasmid selection. *S. cerevisiae* cells were usually grown at 28 °C in YPD medium (10 g/liter yeast extract, 20 g/liter peptone, and 20 g/liter dextrose) or, when indicated, in synthetic minimal or complete minimal medium (15). All mutant strains were *kanMX* deletions (16) derived from wild type BY4741 (*his3 Δ 1 leu2 Δ met15 Δ ura3 Δ*), with exception of strains shown in Figure 5B, which were in the W303-1A background (*MATa ade2-1 his3-11,15 ura3-1 leu2-3,112 trp1*), because of the availability of the *TRP1* marker.

Recombinant DNA Techniques - *E. coli* cells were transformed by standard treatment with calcium chloride (17). *S. cerevisiae* cells were transformed by a modification of the lithium acetate method (18). Restriction mapping, DNA ligation, and other DNA recombinant techniques were carried out by standard methods (17).

Plasmids and Gene Disruption - Strain RSC74 was generated by replacement in the W303-1A background of the entire *WSC1* coding region by the *KanMx* marker. To this end, a PCR-amplified *wsc1::KanMx* cassette was obtained using genomic DNA of the BY4741 *wsc1::KanMx* strain (16) as a template and oligonucleotides 5'_WSC1_DISR and 3'_WSC1_DISR as primers (see Supplemental Table 1 for oligonucleotides used in this work).

The deletion cassette used to disrupt the *SKT5* gene was generated as follows. A region containing the *SKT5* gene from -683 to +2143 relative to its initiating ATG codon was amplified by PCR. Genomic DNA from the BY4741 wild type strain was used as a template and the oligonucleotides SKT5_DISR_5' (which contains a XbaI site) and the SKT5_DISR_3' as primers. The 2.8 kbp resulting fragment was digested with XbaI and HindIII and cloned into pUC19, obtaining plasmid pUC-SKT5. The 1.6 kbp SalI-SmaI restriction fragment from YDpL (19) containing the *LEU2* gene was cloned into the XhoI-HincII digested pUC-SKT5, to yield plasmid pDSKT5_L. The 3.1 kbp XbaI-HindIII fragment from pDSKT5_L containing the

skt5::LEU2 disruption cassette was used to transform the BY4741 *dfg5::KANMx* strain to yield strain RSC78.

WSC1 directed mutagenesis was performed as follows. All DNA fragments used to obtain mutated versions of the *WSC1* gene were amplified by PCR with High Fidelity Expand Taq polymerase (Roche) using as a template the pRS314-*WSC1*^{HA} centromeric plasmid described in (20). PCR amplification products were gel-purified with the GeneClean kit (Bio101 Systems) before use for yeast transformation. Sequences of all amplified and cloned DNA products were verified by automated DNA sequencing. Constructs expressing versions of *Wsc1* containing different deletions of its extracellular domain were obtained by *in vivo* DNA-recombination, after co-transformation of yeast cells with the pRS314 vector (21) digested with *KpnI* and *PstI* and two additional overlapping DNA fragments (**a** and **b**). The forward primer to obtain the different **a** fragments for all mutations was always the standard M13 Reverse, which hybridizes to the pRS314 plasmid. In the same way, the standard Universal primer was used as a reverse primer to amplify all the **b** fragments. In order to get pWSC1(Δ 21-110), oligonucleotides WSC1N3_REV and WSC1N4_FOR were used as reverse for fragment **a** and forward for fragment **b**, respectively. The pWSC1(Δ 116-256) construct was obtained with oligonucleotides WSC1N1_REV and WSC1N2_FOR as reverse for fragment **a** and forward for fragment **b**, respectively, and oligonucleotides WSC1N5_REV and WSC1N2_FOR were used, respectively, to generate fragments **a** and **b** for the pWSC1(Δ 21-256) construct. Constructs in pRS314 expressing the mutations in the cytoplasmic domain of *Wsc1*, such as pRS314-*WSC1*-Y303A^{HA} and pRS314-*WSC1*-(1-300)^{HA}, YEp352-*WSC1*^{HA} and the *bck1-20* construction have been previously described (20;22;23). In some cases, diverse *Wsc1* versions were transferred from plasmid pRS314 (*TRP1* Marker) to pRS316 (*URA3* marker) by digestion with *KpnI* and *SacI* and subsequent ligation.

Preparation of Yeast Extracts and Immunoblot Analysis - For immunodetection of the *Slt2* MAPK, saturated cell cultures of the indicated strains in YPD medium were diluted to an A₆₆₀ of 0.2 in fresh YPD and grown until A₆₆₀ of 1.3-1.4. Then the alkaline shock was performed by adding KOH (from a 1M stock) to reach a final concentration of 35 mM (which leads to a pH

value of 8.2). At the specified times after KOH addition, 5 ml of the cell culture were harvested by filtration, washed once with pre-chilled water, snap-frozen and kept at -80 °C. Control cells received the same amount of KCl. For dose-response experiments, different final concentrations of KOH were used as indicated elsewhere. Cell wall stress was carried out by addition of Congo Red to the medium, to reach a final concentration of 100 µg/ml (from a 10 mg/ml stock solution). Heat stress was accomplished by rapidly shifting the temperature of the cultures to 40°C. When indicated, YPD was supplemented with 1 M Sorbitol.

Total cell protein extracts were prepared basically as previously described (24). Briefly, cell pellets were resuspended in 150 µl of lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl 10% Glycerol, 1% Triton X-100 and 0.1% SDS) containing phosphatase and kinase inhibitors (50 mM NaF, 1 mM sodium ortovanadate, 50 mM β-glycerolphosphate, 5 mM sodium pyrophosphate, 0.5 mM EDTA pH 8.0), 1 mM PMSF and a protease inhibitors mix (complete EDTA-free protease inhibitor cocktail tablets, Roche). One volume of acid-washed glass beads was added and cells were broken by vigorous shaking in a Fast Prep cell breaker (Bio 101; setting 5.5 for 25 s). After sedimentation at 16,000 xg the clear lysate was recovered and the protein concentration quantified by Bradford assay. Forty µg of total protein were fractionated by 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and transferred to nitrocellulose membranes (Hybond C-Extra, Amersham Biosciences). Membranes were incubated for 2h with either anti-phospho-p44/42 MAPK (Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴, New England Biolabs), at 1:2000 dilution, anti-phospho-p38 MAP kinase (Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸², Cell Signalling) at 1:1000 dilution, or anti-GST-Slt2 antibodies (25), at 1:10000 dilution, to detect dually phosphorylated *Slt2*, dually phosphorylated *Hog1* or total *Slt2*, respectively. A 1:25000 dilution of horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody was used to detect primary antibodies. Immunocomplexes were visualized by the ECL Advance Western blotting detection kit (Amersham Biosciences). The chemiluminescence was recorded by the Luminescent Image Analyzer LAS-3000 (Fuji) and the Multi Gauge V 3.0 software was used to quantify signal intensities.

Immunodetection of HA-tagged *Wsc1* versions was accomplished as follows. Yeast cells from 5 ml exponentially growing cultures

were collected by centrifugation, washed with cold water and kept dried at -80 °C. Two hundred μ l of ice-cold lysis buffer (50 mM Tris HCl pH 7.5, 150 mM NaCl and 5 mM EDTA) supplemented with 1 mM PMSF and protease inhibitors were added to the dried cell pellets together with one volume of glass beads. Cells were broken by 5 cycles of one minute of vigorous shaking and glass beads were removed by sedimentation at 750 xg. Total protein concentration was quantified by the Bradford assay and 40 μ g of protein were centrifuged at 16,000 xg for 15 min. Pellets were resuspended in SDS-loading buffer, fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (8%) and transferred to PVDF membranes (Immobilon-P, Millipore). Monoclonal anti HA antibody (Anti HA 12CA5, Roche) was used at 1:5000 dilution. The anti-mouse secondary antibody coupled to horseradish peroxidase was diluted 1:25000 and the Supersignal West Dura System kit (Pierce) was used to visualize the protein-antibody complexes in a LAS-3000 (Fuji).

RNA purification, DNA microarray experiments and Reverse Transcription-PCR.- For RNA purification 20 ml of yeast cultures were grown at 28 °C in YPD medium until an A_{660} of 1.3. KOH or KCl was added from concentrated stock (1M) to reach a final concentration of 33 mM. Yeast cells were harvested by filtration after 15 and 30 min, washed once with cold water and dried cells were kept at -80 °C until RNA purification. Total RNA was purified using the RiboPure-Yeast kit (Ambion) following the manufacturer instructions. RNA quality was assessed by denaturing 0.8% agarose gel electrophoresis and RNA quantification was performed by measuring absorbance at 260 nm in a BioPhotometer (Eppendorf).

Transcriptional analyses were performed using DNA microarrays containing PCR-amplified fragments from 6014 *S. cerevisiae* ORFs (10;26). Fluorescent Cy-3 and Cy-5-labelled cDNA probes were prepared from 8 μ g of purified total RNA by the indirect dUTP-labelling method, using the CyScribe Post-Labelling Kit (Amersham Biosciences). Pre-hybridization, hybridization and washes were carried out as recommended by The Institute for Genomic Research (<http://www.tigr.org/tdb/microarray/conciseguide.html>) with minor modifications. For the hybridizations of the DNA microarrays, both dried Cy3- and Cy5-labelled probes were resuspended in 35 μ l of hybridization solution

(50% formamide, 5x SSC and 0.1% SDS) and mixed. Five μ g of salmon sperm DNA was added to the mix before denaturalization for 3 min at 95 °C. Hybridizations were carried out in an ArrayBooster Hybridization Station (Sunergia Group) for 14 h at 42 °C. The ScanArray 4000 scanner (Packard) was used to obtain the Cy3 and Cy5 images at 10 μ m resolution. The fluorescent intensity of the spots was measured and processed using the GenePix Pro 6.0 software (Molecular Devices).

For each condition assayed two independent experiments were performed, and dye-swapping was carried out in each case. Data from different experiments were combined and the mean was calculated. A given gene was considered to be induced or repressed when the ratio (alkaline stress vs. no stress) was higher than 1.9 or lower than 0.50 respectively. Software from GEPAS server (<http://gepas.bioinfo.cipf.es/>) was used to carry out clustering and other data analyses (27). To confirm some of the results obtained by the microarray experiments, RT-PCR analyses were performed using the OneStep RT-PCR kit (QIAGEN) and 1 μ g of total RNA. The following pairs of oligonucleotides: RT_SKT5_UP and RT_SKT5_DO; RT_DFG5_UP and RT_DFG5_DO; RT_CRH1_UP and RT_CRH1_DO (Supplemental Table 1) were used to determine, after 24 cycles, the levels of mRNA corresponding to *SKT5*, *DFG5* and *CRH1*, respectively.

Actin Staining - BY4741 wild type cells were diluted into fresh YPD medium to an A_{660} of 0.2 from a saturated culture and growth resumed until an A_{660} of 1.3 was reached. Alkaline stress was initiated by adding KOH from a 1 M stock, to reach a final concentration of 35 mM (leading to pH 8.2). One hundred μ l aliquots of this culture were collected at different times and processed for actin staining with rhodamine-phalloidin essentially as in (28). KCl instead of KOH was used for non-stressed conditions. Temperature stress was accomplished by transferring cultures to a water incubator set at 42 °C.

Growth tests - Sensitivity of different yeast strains to alkaline pH, high temperature, caffeine, Congo Red or Calcofluor White was assayed by drop test on YPD plates. For testing alkaline stress sensitivity plates containing 50 mM TAPS adjusted with KOH at different pH values were used. When required, 1 M Sorbitol was added to the medium prior to sterilization by autoclaving.

Growth in liquid medium at high pH was performed in 96-well plates. Two hundred fifty μ l cultures at an initial A_{660} of 0.001 were grown for 23h at 28 °C in YPD containing 50 mM TAPS buffered at the indicated pHs. Growth was monitored in an iEMS Reader MF (Labsystems) at 620 nm.

RESULTS

Alkaline stress results in transient activation of the Slt2 MAP kinase- The finding that mutation of non-redundant members of the Slt2 MAP kinase cascade resulted in a strong alkali-sensitive phenotype (12) prompted us to evaluate in detail high pH tolerance for upstream and downstream members of this module. As shown in figure 1, mutants in upstream components such as the *wsc1* strain (but not *wsc2*, *wsc3*, or *mid2*) displayed sensitivity to alkali. *mtl1* cells were as tolerant as wild type cells (not shown). Mutation of *ROM2*, a GDP/GTP exchange protein for the Pkc1 activator Rho1 (not shown), or either *MKK1* or *MKK2*, the kinases directly upstream Slt2, did not result in altered pH tolerance, which could be explained by a redundant role of the pair Rom1/2 and Mkk1/2 in this signaling pathway.

Mutation of the transcription factor Rml1, an important nuclear target for Slt2, did not confer high pH sensitivity. In contrast, lack of either component of the SBF transcription factor, Swi4 and Swi6, resulted in sensitivity to alkali. These strains were subjected to the same stress in the presence of 1 M sorbitol. Interestingly, the presence of the osmotic stabilizer did rescue sensitivity of the *bck1* and *slt2* mutants to high pH, Congo Red or high temperature (42 °C) but, in contrast, *wsc1*, *swi4* and *swi6* strains still showed a significant growth defect in the presence of high pH or Congo Red.

The sensitivity to high pH conferred by mutation of upstream and downstream components of the Slt2 cascade supported the notion that this pathway might be activated by alkalinization of the medium, thus being involved in the response to this kind of stress. To directly test this hypothesis, wild type cells were subjected to alkaline shock and samples taken at different times. Extracts were prepared, electrophoresed and immunoblotted with antibodies able to detect the active, phosphorylated form of Slt2, as well as with anti-Slt2 antibodies. As shown in Figure 2A, exposure to high pH results in a fast and transient phosphorylation of Slt2, peaking between 5-15

min after the stress and declining after 30 min. Dose-response experiments (Figure 2B) showed that phosphorylation of Slt2 was already noticeable around pH 7.5, peaked around pH 8.2 and was not further enhanced at higher pHs. Activation of Slt2 in response to external alkalinization was fully depended on the integrity of the MAP kinase cascade, as demonstrated by the absence of Slt2 phosphorylation in a *bck1* mutant (Figure 2C). Alkalinization of the medium did not result in phosphorylation of the Hog1 MAP kinase during the first hour after stress, as deduced from immunoblot analyses using anti phospho-p38 MAP kinase antibodies (not shown).

As cell integrity of *slt2* mutants after cell wall damage can be preserved if osmotically stabilized, we investigated the effect on Slt2 activation of the presence of 1M sorbitol in the alkaline medium. As shown in figure 3A, addition of sorbitol largely attenuated the fast phosphorylation of Slt2 in response to high pH, although it resulted in a pH-independent, late (30-60 min) activation of Slt2. A similar time-course experiment showed that phosphorylation of Slt2 in response to alkaline stress is much faster than in response to other stresses, such as exposure to Congo Red or high temperature (Figure 3A). As it has been documented that different stress situations lead to actin depolarization, we sought to investigate if this was the case for alkaline stress. To this end, cultures were shifted to pH 8.2 and samples taken at different times ranging from 5 to 120 min. However, we did not observe abnormal alterations in actin distribution at any time, while control cells shifted to 42 °C showed a marked actin depolarization after 15-30 min (Figure 3B).

Identification of Wsc1 as a signaling component in the alkaline pH stress response - The observation that mutation of *WSC1* resulted in increased pH sensitivity raised the possibility that this membrane protein might perceive the signal(s) generated by high pH and transmit it through the Slt2 pathway. To test this hypothesis, wild type and *wsc1* cells were subjected to alkaline stress and the phosphorylation state of Slt2 was monitored. As shown in Figure 4A, phosphorylation of Slt2 was markedly reduced in the *wsc1* mutant, while this effect was not observed for *wsc2* or *wsc3* mutants. Phosphorylation of Slt2 was affected only slightly in a *mid2* strain and did not change in cells lacking Mtl1, a protein with structural and

functional similarity to Mid2. Therefore, the sensitivity of the *wsc1* mutant was compatible with loss of full activation of the SlT2 cascade.

We presumed that if hypersensitivity of the *wsc1* mutant could be, at least in part, the result of impaired signaling through SlT2, artificial activation of the SlT2 pathway may reduce sensitivity to high pH in the *wsc1* strain. To this end, we expressed in a *wsc1* mutant strain the *bck1-20* allele, which provides constitutive activation of the SlT2 pathway and tested tolerance of these cells to high pH and other cell wall stresses. As shown in Figure 4B, expression of the *bck1-20* allele did improve high pH tolerance of the *wsc1* strain, but was without effect on a *slt2* mutant. A similar effect was previously observed when cells were grown in the presence of caffeine (29). In contrast, activation of the SlT2 pathway did not improve tolerance to Congo Red or Calcofluor White in cells lacking Wsc1 (not shown).

Identification of Wsc1 structural elements required for signaling in alkaline pH stress- It has been proposed that normal Wsc1 function requires both extracellular and intracellular domains of the protein (20;30). To test the functional relevance of these elements in alkaline stress signaling, we expressed from a centromeric plasmid in the *wsc1* mutant a HA-tagged version of both wild type Wsc1 and Wsc1(1-300), which lacks the entire cytosolic region (Figure 5A). As shown in Figure 5B, while the tagged wild type protein was able to restore normal tolerance to high pH and other cell wall damaging agents, the deleted version was not. Interestingly, a version carrying a change of the intracellular residue Y303 to Alanine, which has been shown to disrupt the interaction of Wsc1 with Rom2 (20), was also unable to rescue the alkaline sensitive phenotype of the *wsc1* mutant. We then constructed and expressed in the *wsc1* strain three different versions of Wsc1 carrying diverse deletions of the extracellular region (Figure 5A and B). The first one, lacking virtually all the extracellular segment (Δ 21-256) except the NH₂-terminal signal peptide, was not functional at all. Interestingly, removal of residues 21-110, which correspond to the characteristic WSC domain, yielded a protein still able to confer a certain degree of tolerance in front of alkaline stress. Finally, deletion of residues 116-256 yielded a protein devoid of the large Ser/Thr-rich region that was essentially ineffective. Loss of function of the mutated versions cannot be attributed to a

defective expression or localization, as immunoblot analysis of cell protein extracts indicated that all versions were recovered in the particulate fractions and expressed at levels at least equivalent to that of the wild type form (not shown). In agreement with these observations, expression of Wsc1 forms lacking the intracellular region or bearing the Y303A mutation, which were unable to return cells to their normal pH tolerance, also failed in restoring normal levels of SlT2 phosphorylation upon alkaline stress (Figure 5C). Therefore, both extracellular structural elements and intracellular signaling components are required for Wsc1 to perform its function on high pH tolerance.

Mannosylation of the periplasmic ectodomains of Wsc1 has been shown to be important for function and it has been attributed to several members of the protein O-mannosyltransferases family encoded by *PMT1-6* (31;32). We reasoned that if Wsc1 was an important element for alkaline pH tolerance, it would be possible that certain mannosyltransferase mutants may exhibit an alkaline sensitive phenotype. To this end, the pH sensitivity of five different mutants was compared to that of the wild type strain (Figure 6A). As it can be observed, *pmt1* and *pmt2* mutants display a significant degree of sensitivity to high pH, while *pmt3*, *pmt5* and *pmt6* had a wild type phenotype. Interestingly, immunoblot analysis of HA tagged Wsc1 (Figure 6B) showed that the total amount of the high molecular mass form (ca. 100 KDa) decreased in the *pmt2* mutant (and also slightly in the *pmt1* strain) in concurrence with the appearance of smaller protein fragments (ca. 40 Kda). Therefore, mutations affecting proper O-mannosylation of Wsc1 (and probably the stability of the protein) do result in increased alkaline sensitivity.

Transcriptional profiling in response to alkaline stress in SlT2-deficient cell - It has been documented that exposure of *S. cerevisiae* to high pH results in a substantial and complex transcriptional response. Activation of SlT2 after cell wall damage also gives rise to changes in the transcriptional profile. We considered that the comparison of the transcriptional profiles between wild type and *slt2* cells may provide information about the relevance of this kinase in remodeling gene expression after alkaline stress and, perhaps, reveal new genes important for tolerance to alkali. To this end, we exposed wild type cells and *slt2* mutants to pH 8.2 by addition

to the medium of the necessary amount of KOH, collected the cells after 15 and 30 min of stress and prepared total RNA for DNA microchip analysis (see <http://quiro.uab.es/Jarino/> for the complete set of data). Exposure to high pH resulted in an at least 1.9-fold induction of 497 genes after 15 min, and 173 after 30 min (Supplemental Table 2). Comparison of the level of induction after 15 min in wild type cells with that of the *slt2* mutant revealed that the induction of 42 genes was reduced at least by 25% in the mutant strain (including the gene *GSC2/FKS2*, encoding a subunit of the 1,3- β -D-glucan synthase). In contrast, after 30 min of exposure to alkali, only 4 genes (*DFG5*, *SKT5*, *CRH1* and *ZRT1*) reached the indicated threshold for Slt2-dependence. Interestingly, three of them (*DFG5*, *SKT5* and *CRH1*) encode cell wall proteins. Figure 7A shows the induction of *DFG5*, *SKT5*, *CRH1* and *GSC2/FKS2* after alkaline stress in wild type and *slt2* cells. The induction by high pH of three of these genes and their dependence of Slt2 was confirmed by semiquantitative RT-PCR (Figure 7B). Phenotypic analysis of these mutants for alkaline tolerance revealed that *crh1* or *zrt1* strains were similar to wild type cells. In contrast, *skt5* and *dfg5* cells grew very poorly at pH 7.8 (Figure 7C). A *skt5 dfg5* double mutant was more alkali sensitive than any of the single mutants. This phenotype was rather intense, but not as strong as that of the *slt2* mutant.

The recent availability of transcriptional profiles in response to diverse cell wall damaging drugs, or to mutation of specific genes relevant for cell wall maintenance prompted us to construct an array of expression data that would allow correlating these changes with those produced by exposure to high pH. As shown in Figure 8, cell wall damage provoked by zymolyase treatment or exposure to caspofungin or DTT results in a transcriptional profile rather close to the one caused by high pH stress, while there was almost no correlation with the profiles observed after Congo Red or α -factor treatment. Similarly, comparison with changes induced by mutation in relevant cell wall components illustrate that the similarity profile follows the order *fks1* > *gas1* = *kre6* > *knr4*, while the *mnn9* profile showed no positive correlation at all.

DISCUSSION

In a recent paper (10) we pointed out the striking overlap between the transcriptional profile of yeast cells subjected to severe alkaline

stress and that observed after mutation of genes encoding certain cell wall components or exposure to cell wall damaging agents (33;34). Since mutation of a significant number of genes related to cell wall biogenesis or maintenance results in sensitivity to alkalinization (12;14), we raised the hypothesis that alkaline pH might lead, at least up to some extent, to a situation of cell wall damage. To test this hypothesis, the following questions were addressed: 1) Does exposure to high pH triggers the activation of the cell wall integrity pathway mediated by the Slt2 MAP kinase?. 2) If so, would it be possible to identify a potential upstream sensor for high pH stress?, and 3) does Slt2 activation results in increased expression of cell wall components relevant for adaptation to high pH?.

We show here that alkalinization of the ambient results in specific activation of the Slt2 MAP kinase pathway. *S. cerevisiae* has five different MAP kinase modules (35-37) and, in some cases, a given stress situation results in activation of several modules. Examples are the activation of both the Slt2 and Hog1 MAP kinases by heat stress (38) or by hyperosmotic shock (39). However, in our case, we observe a very specific involvement of Slt2 in the response to alkaline stress: while *slt2* mutants are highly sensitive to alkaline pH, *hog1*, *kss1* or *fus3* cells are not. Our data also indicates that Kss1 and Fus3 MAP kinases are not phosphorylated after exposure to alkali, and that *FUS1*, whose activation is mediated by Fus3 and Kss1 (40), is not induced by high pH (not shown). This is remarkable, as Kss1 has been previously proposed to be involved in maintaining cell wall integrity (36). Similarly, we have observed that Hog1 is not phosphorylated by high pH stress. Therefore, high pH appears to specifically activate the Slt2 MAP kinase module.

A remarkable characteristic of the Slt2 activation after alkaline stress is its fast (5-15 min) and transient nature. A very fast phosphorylation of Slt2 was reported some time ago as a result of hypotonic shock (41), although in this case peaked after one min and disappeared in 10-20 min. This differential kinetics suggests that the events triggered by hypotonic shock and ambient alkalinization are not the same. The relatively fast response to high pH is in contrast with the slower kinetics observed in cells exposed to Calcofluor White (42;43), caffeine (24) or heat shock (24;42). A slower response was also observed in cells treated with rapamycin (28) or with oxidants such as diamide or

hydrogen peroxide (44). This contrast cannot be attributed to strain background differences, as we confirm here slower phosphorylation kinetics in response to increased temperature and Congo Red treatment. From these results, it appears that external high pH is perceived faster than many other situations that also result in Slt2 activation. While in all these cases phosphorylation of Slt2 is maintained for a relatively long period, the alkaline response is transient. This could be due to feed-back regulatory mechanisms or simply explained by the progressive acidification of the medium during the experiment. In any case, this phosphorylation kinetics correlates well with the rapid Slt2-dependent transcriptional response, more important after 15 min of the stimulus than after 30 min. Therefore, in contrast to that observed for most Slt2-inducing stimuli, yeast cells would use the cell integrity pathway for eliciting an almost immediate response to the medium alkalization that would be eventually essential for their survival.

It is commonly accepted that cell wall status is monitored by a family of five cell surface proteins (Wsc1-3, Mid2 and Mtl1). Among those, Wsc1 and Mid2 play a major role in maintaining cell wall integrity and, although they may have specific functions, their role in signaling is partially overlapping (see (13) and references therein). We show here that *wsc1* mutants are the only ones sensitive to high pH and that activation of Slt2 is significantly decreased in *wsc1* mutants, while it is only marginally affected in *mid2* cells. It is remarkable that the *WSC1* gene was not identified as relevant for alkaline tolerance neither in our previous systematic screen for alkaline-sensitive mutations (12) nor by a similar search using liquid cultures (14). It was recently reported (20) that a conserved intracellular residue (Y303) is essential for complementation of the lytic defect at normal temperature (30 °C) of a *wsc1 mid2* strain and for interaction with downstream Rom2, the GDP/GTP exchange protein for Rho1. We show here (Figure 5) that this residue is also crucial for tolerance to specific cell wall damaging agents (such as Congo Red) or high pH in an otherwise wild type strain, as well as for activation of the Slt2 pathway in response to ambient alkalization. This reinforces the idea that Wsc1 is stimulated by high pH and that this generates a signal that, probably through Rom2 and Rho1, activates the Slt2 MAP kinase module. Our data also indicates that the extracellular domain of Wsc1 is crucial for high pH tolerance

and downstream signaling in response to this type of stress. Interestingly, deletion of the Cys-rich WSC domain only results in limited loss of function when cells are challenged with high pH or caffeine, similarly to what was previously observed for high temperature (30), thus suggesting that, albeit characteristic for the four members of the family (Wsc1-4), the WSC motif may have little functional relevance. In contrast, a deletion of the S/T-rich extracellular region, which renders the protein unable to rescue growth of the *wsc1* strain at 35 °C (30), also results in inability to support growth in the presence of cell wall damaging drugs or high pH. This region is the target for O-mannosylation reactions that have been reported to be relevant for Wsc1 function (31;32). Protein O-mannosyltransferases are represented in the yeast *S. cerevisiae* by a six member family, *PMT1-6*, (45) among which only Pmt2 and Pmt4 are believed to act on WSC and Mid2 proteins (31;32). According to this, we observed that Wsc1 displays abnormal processing in a *pmt2* mutant and that this mutant strain is sensitive to alkalinization (Figure 6). Interestingly, we also detected altered Wsc1 processing and alkali sensitivity in a *pmt1* mutant. These findings confirm that correct O-mannosylation is important for Wsc1 function and supports the notion that integrity of Wsc1 is essential for alkaline tolerance. In addition, our data suggest a possible, previously unnoticed role for Pmt1 in O-mannosylation of Wsc1.

An interesting issue raised by our findings would be the nature of the cell wall alterations provoked by exposure to high pH. Although this would require a specific study that is out of the scope of this work, our observation (Figure 8) that the transcriptional profile in response to high pH stress correlate much better with certain cell damaging agents (such as caspofungin) or mutations (*fks1*) than with others (i.e. Congo Red) might provide some clue on this question. As mentioned above, although Wsc1 and Mid2 serve partially overlapping functions in cell wall integrity signaling (22;42) there are also examples of specific roles attributable to each protein. For instance, *wsc1* mutants are sensitive to caspofungin and this mutation prevents activation of Slt2 after exposure to this drug (46), while activation of Slt2 by exposure to Calcofluor White and α -factor would involve Mid2 but not Wsc1 (42;43). Caspofungin has been shown to inhibit the activity of β -1,3-D-glucan synthase (47), while Calcofluor White and

Congo Red would interfere chitin synthesis (48). This would fit with the positive correlation between the transcriptional profile in response to high pH stress and the one found in an *fks1* mutant, since *FKS1* encodes one of the two catalytic subunit of 1,3- β -D-glucan synthase. Interestingly, the gene encoding the alternate 1,3-glucan synthase subunit, *GCS2/FKS2*, is induced by high pH, while a *gas1* mutant (lacking a β -1,3-glucanosyltransferase activity) is sensitive to high pH. In contrast, *CHS1* and *CHS3*, which encode two of the three chitin synthase in yeast and are responsible for most of this catalytic activity, are induced by exposure to Congo Red but not to high pH (10;34). These results reinforce the notion that Wsc1 acts as a sensor of high pH and suggest that alkalinization of the environment may cause cell wall damage by affecting glucan integrity or organization. It is remarkable that a recent report has pointed out that sudden acidification of the medium also results in activation of the Slt2 pathway (49). However, in this case the kinetics of the response is slower, more sustained and it depends mainly on Mid2. These differences points to a specialized role for both cell membrane sensors in front of sudden environmental pH modifications.

It is worth noting that, while osmotically protected *slt2* cells are no longer sensitive to alkaline pH, *wsc1* mutants still display a substantial degree of sensitivity (Figure 1). This suggests that, in addition to impaired Slt2 signaling, cells lacking Wsc1 suffer other deficiencies that are relevant to endure alkaline pH stress. In any case, since our data indicate that alkaline stress does not lead to abnormal actin localization, these deficiencies cannot be attributed to the proposed role of Wsc1 in actin distribution (50;51).

Our results suggest that Slt2 activation represents a significant component of the yeast adaptive response to high pH. Part of this response implies a change in gene expression, as it seems the case for *SKT5* or *DFG5* (Figure 7). We observe that *skt5* and *dfg5* are alkali-

sensitive, confirming the results of a previous systematic mutant screen (14), and we show here that the double mutant is more sensitive than the single ones, suggesting independent roles on high pH tolerance. However, it must be noted that the double *skt5 dfg5* mutant is not as sensitive as the *slt2* strain, indicating that other Slt2 targets relevant for high pH tolerance must exist. In addition, while our data clearly shown an important role for Wsc1 in Slt2 signaling in front of high pH stress, it is also evident that activation of Slt2 by high pH is not fully abolished by the absence of Wsc1, indicating that the pathway receives alternative inputs. One possibility would be that other cell wall sensors, such as Mid2, may provide such additional inputs, although our data suggest that, if so, their role must be certainly minor. Alternatively, the MAP kinase module might receive regulatory inputs, triggered by alkalinization, independently of the upstream signaling elements, as it has been suggested for other types of stress (52). While this manuscript was in preparation, it has been reported that the Rim21/Rim101 pathway can contribute to the assembly of the yeast cell wall (53). This pathway has been shown in the past to be relevant for alkaline pH tolerance (6-8). Therefore, the Rim101 pathway appears as a possible candidate for additional regulatory inputs to the Slt2 MAP kinase module under alkaline pH stress.

In conclusion, our data demonstrates that alkalinization of the ambient generates a cell wall damage that is mainly sensed by Wsc1. Wsc1 triggers a signal that is transmitted to the Slt2 MAP kinase module, which is responsible for part of the transcriptional adaptive response to high pH. It is remarkable that a recent report has shown that a substantial number of genes related to cell wall construction are induced in *Candida albicans* by alkalinization of the medium (54), suggesting that the adaptive response to high pH described here could be conserved in this pathogenic fungus.

References

1. van der Rest, M. E., Kamminga, A. H., Nakano, A., Anraku, Y., Poolman, B., and Konings, W. N. (1995) *Microbiol.Rev.* **59**, 304-322
2. Serrano, R. (1996) *Int.Rev.Cytol.* **165**, 1-52
3. Penalva, M. A. and Arst, H. N., Jr. (2002) *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **66**, 426-46, table
4. Penalva, M. A. and Arst, H. N., Jr. (2004) *Annu.Rev.Microbiol.* **58**, 425-451
5. Xu, W., Smith, F. J., Jr., Subaran, R., and Mitchell, A. P. (2004) *Mol.Biol.Cell* **15**, 5528-5537
6. Lamb, T. M., Xu, W., Diamond, A., and Mitchell, A. P. (2001) *J.Biol.Chem.* **276**, 1850-1856
7. Lamb, T. M. and Mitchell, A. P. (2003) *Mol.Cell Biol.* **23**, 677-686
8. Serrano, R., Ruiz, A., Bernal, D., Chambers, J. R., and Arino, J. (2002) *Mol.Microbiol.* **46**, 1319-1333
9. Alepuz, P. M., Cunningham, K. W., and Estruch, F. (1997) *Mol.Microbiol.* **26**, 91-98
10. Viladevall, L., Serrano, R., Ruiz, A., Domenech, G., Giraldo, J., Barcelo, A., and Arino, J. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 43614-43624
11. Causton, H. C., Ren, B., Koh, S. S., Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., Lee, T. I., True, H. L., Lander, E. S., and Young, R. A. (2001) *Mol.Biol.Cell* **12**, 323-337
12. Serrano, R., Bernal, D., Simon, E., and Arino, J. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 19698-19704
13. Levin, D. E. (2005) *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **69**, 262-291
14. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Veronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., Andre, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Guldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kotter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelmy, J., Winzeler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002) *Nature* **418**, 387-391
15. Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A., and Stearns, T. (1997) *Methods in Yeast Genetics*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY,
16. Winzeler, E. A., Shoemaker, D. D., Astromoff, A., Liang, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J. D., Bussey, H., Chu, A. M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S. W., El Bakkoury, M., Foury, F., Friend, S. H., Gentalen, E., Giaever, G., Hegemann, J. H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., and Davis, R. W. (1999) *Science* **285**, 901-906
17. Sambrook, J., F. E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,
18. Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983) *J.Bacteriol.* **153**, 163-168
19. Berben, G., Dumont, J., Gilliquet, V., Bolle, P. A., and Hilger, F. (1991) *Yeast* **7**, 475-477
20. Vay, H. A., Philip, B., and Levin, D. E. (2004) *Microbiology* **150**, 3281-3288
21. Sikorski, R. S. and Hieter, P. (1989) *Genetics* **122**, 19-27
22. Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B. M., Errede, B., and Levin, D. E. (1999) *Mol.Cell Biol.* **19**, 3969-3976
23. Lee, K. S. and Levin, D. E. (1992) *Mol.Cell Biol.* **12**, 172-182
24. Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M. (2000) *J.Biol.Chem.* **275**, 1511-1519
25. Martin, H., Arroyo, J., Sanchez, M., Molina, M., and Nombela, C. (1993) *Mol.Gen.Genet.* **241**, 177-184
26. Alberola, T. M., Garcia-Martinez, J., Antunez, O., Viladevall, L., Barcelo, A., Arino, J., and Perez-Ortin, J. E. (2004) *Int.Microbiol.* **7**, 199-206
27. Herrero, J., Al Shahrour, F., Diaz-Uriarte, R., Mateos, A., Vaquerizas, J. M., Santoyo, J., and Dopazo, J. (2003) *Nucleic Acids Res.* **31**, 3461-3467

28. Torres, J., Di Como, C. J., Herrero, E., and De La Torre-Ruiz MA (2002) *J.Biol.Chem.* **277**, 43495-43504
29. Jacoby, J. J., Nilius, S. M., and Heinisch, J. J. (1998) *Mol.Gen.Genet.* **258**, 148-155
30. Lodder, A. L., Lee, T. K., and Ballester, R. (1999) *Genetics* **152**, 1487-1499
31. Philip, B. and Levin, D. E. (2001) *Mol.Cell Biol.* **21**, 271-280
32. Lommel, M., Bagnat, M., and Strahl, S. (2004) *Mol.Cell Biol.* **24**, 46-57
33. Lagorce, A., Hauser, N. C., Labourdette, D., Rodriguez, C., Martin-Yken, H., Arroyo, J., Hoheisel, J. D., and Francois, J. (2003) *J.Biol.Chem.* **278**, 20345-20357
34. Garcia, R., Bermejo, C., Grau, C., Perez, R., Rodriguez-Pena, J. M., Francois, J., Nombela, C., and Arroyo, J. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 15183-15195
35. Martin, H., Flandez, M., Nombela, C., and Molina, M. (2005) *Mol.Microbiol.* **58**, 6-16
36. Qi, M. and Elion, E. A. (2005) *J.Cell Sci.* **118**, 3569-3572
37. Gustin, M. C., Albertyn, J., Alexander, M., and Davenport, K. (1998) *Microbiol.Mol.Biol.Rev.* **62**, 1264-1300
38. Winkler, A., Arkind, C., Mattison, C. P., Burkholder, A., Knoche, K., and Ota, I. (2002) *Eukaryot.Cell* **1**, 163-173
39. Garcia-Rodriguez, L. J., Valle, R., Duran, A., and Roncero, C. (2005) *FEBS Lett.* **579**, 6186-6190
40. Cullen, P. J., Schultz, J., Horecka, J., Stevenson, B. J., Jigami, Y., and Sprague, G. F., Jr. (2000) *Genetics* **155**, 1005-1018
41. Davenport, K. R., Sohaskey, M., Kamada, Y., Levin, D. E., and Gustin, M. C. (1995) *J.Biol.Chem.* **270**, 30157-30161
42. Ketela, T., Green, R., and Bussey, H. (1999) *J.Bacteriol.* **181**, 3330-3340
43. De Nobel, H., Ruiz, C., Martin, H., Morris, W., Brul, S., Molina, M., and Klis, F. M. (2000) *Microbiology* **146 (Pt 9)**, 2121-2132
44. Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., and De La Torre-Ruiz MA (2005) *J.Biol.Chem.* **280**, 9149-9159
45. Willer, T., Valero, M. C., Tanner, W., Cruces, J., and Strahl, S. (2003) *Curr.Opin.Struct.Biol.* **13**, 621-630
46. Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K. (2003) *Eukaryot.Cell* **2**, 1200-1210
47. Groll, A. H. and Walsh, T. J. (2001) *Expert.Opin.Investig.Drugs* **10**, 1545-1558
48. Imai, K., Noda, Y., Adachi, H., and Yoda, K. (2005) *J.Biol.Chem.* **280**, 8275-8284
49. Claret, S., Gatti, X., Doignon, F., Thoraval, D., and Crouzet, M. (2005) *Eukaryot.Cell* **4**, 1375-1386
50. Delley, P. A. and Hall, M. N. (1999) *J.Cell Biol.* **147**, 163-174
51. Gualtieri, T., Ragni, E., Mizzi, L., Fascio, U., and Popolo, L. (2004) *Yeast* **21**, 1107-1120
52. Harrison, J. C., Zyla, T. R., Bardes, E. S., and Lew, D. J. (2004) *J.Biol.Chem.* **279**, 2616-2622
53. Castrejon, F., Gomez, A., Sanz, M., Duran, A., and Roncero, C. (2006) *Eukaryot.Cell* **5**, 507-517
54. Bensen, E. S., Martin, S. J., Li, M., Berman, J., and Davis, D. A. (2004) *Mol.Microbiol.* **54**, 1335-1351
55. Roberts, C. J., Nelson, B., Marton, M. J., Stoughton, R., Meyer, M. R., Bennett, H. A., He, Y. D., Dai, H., Walker, W. L., Hughes, T. R., Tyers, M., Boone, C., and Friend, S. H. (2000) *Science* **287**, 873-880
56. Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., Botstein, D., and Brown, P. O. (2000) *Mol.Biol.Cell* **11**, 4241-4257

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank D. Levin, M. Molina, N. Gómez, and J. Arroyo for plasmid, reagents and sharing unpublished information and A. Barceló for DNA sequencing. The excellent technical assistance of Anna Vilalta and María Jesús Álvarez is acknowledged. This work was supported by grants BMC2002-04011-C05-04 and BFU2005-06388-C4-04-BMC to J.A., BIO2001-1386 and BIO2004-02019 to H.M., and BFU2004-00014 to ACG (Ministerio de Educación y Ciencia, Spain and Fondo Europeo de

Desarrollo Regional). J.A. is recipient of an "Ajut de Suport a les Activitats dels Grups de Recerca" (2005SGR-00542, Generalitat de Catalunya).

Abbreviations: MAP, Mitogen Activated Kinase; PMSF, Phenylmethylsulphonylfluoride

FIGURE LEGENDS

Figure 1.- Alkaline pH sensitivity of mutants in upstream and downstream elements of the SlT2 MAP kinase cascade. The indicated mutants in the BY4741 background were grown on YPD agar plates at the specific conditions. Alkaline plates were buffered with TAPS 50 mM. Congo Red was used at 100 µg/ml. Growth was monitored after 2-3 days.

Figure 2.- Phosphorylation of the SlT2 MAP kinase in response to alkaline stress. Panel A. Wild type BY4741 cultures were made 35 mM KOH (which raise the pH up to 8.2) and samples taken at the indicated times and processed for immunoblotting as described in Material & Methods. Membranes were incubated with antiphospho-p44/42 antibodies to detect the phosphorylated form of SlT2 (P-SlT2), stripped and reprobed with anti SlT2 antibodies, to detect the total amount of the protein (SlT2p). Panel B. Cultures as in panel A received the indicated concentrations of KCl (control cells) or KOH (stressed cells). The pH achieved in each case is indicated in parentheses. Samples were taken after 15 min of the addition of KCl or KOH and processed for immunoblot as described above. Panel C. Wild type BY4741 strain and its isogenic *bck1* derivative were treated as in Panel A, cells recovered at the indicated times and processed for immunoblot.

Figure 3.- Effect of sorbitol in the phosphorylation of SlT2 in alkaline pH stressed cells. Panel A. Wild type cells were subjected to high pH stress in the presence or absence of 1 M sorbitol, received 100 µg/ml Congo Red or were shifted to 40 °C by resuspension in pre-warmed medium. Samples were processed for immunoblotting using antibodies against phosphorylated SlT2 (shown in the Figure) and the SlT2 protein (not shown). The figure at the bottom represents the level of phosphorylation of SlT2 in cells subjected to the indicated conditions, at the given times, once corrected for the amount of total SlT2 protein. The highest value for each treatment was considered as 100%. Panel B. Wild type BY4741 cells were subjected to the indicated treatments for 30 min, processed for actin staining as described (28) and visualized by fluorescence microscopy.

Figure 4.- Lack of Wsc1 results in impaired SlT2 phosphorylation after alkaline stress. Panel A. The indicated mutants in the BY4741 background were subjected for 15 min to alkaline stress (pH 8.2) and processed for immunoblot as in Figure 1. Lower panel represents the relative activation in each case determined by the ratio of alkali-induced SlT2 phosphorylation compared with unstressed cells, once corrected by the amount of total SlT2 protein. Wild type cells are considered to have a 100% response. Data represents the average ± SEM of five independent experiments. (**) $p < 0.001$, (*) $p < 0.05$. Panel B. The BY4741 wild type strain (circles), *wsc1* (squares) or *slt2* (triangles) derivatives were transformed with an empty plasmid (empty symbols) or the *bck1-20* allele (filled symbols). Cells were grown in synthetic medium up to saturation as described under Materials and Methods, inoculated into YPD medium buffered at the indicated pH and A_{620} was recorded after 23 h. Data is presented as the percentage of growth with respect to an equivalent culture at pH 5.5 and correspond to the mean ± SEM from three independent clones.

Figure 5.- Mutational analysis of Wsc1 reveals intra- and extracellular regions relevant for tolerance to alkali. Panel A, schematic depiction of the structure of Wsc1. Numbers indicates amino acid positions. Tm, predicted transmembrane region. Arrows indicate residues or regions that have been defined as relevant for signaling to Rom2 in a previous work (20). Panel B. A *wsc1* mutant in the W303-1A background was transformed with the indicated plasmids (*TRP1* marker) and spotted on YPD plates at the indicated pHs or containing caffeine (7 mM) or Congo Red (10 µg/ml). Growth was monitored for 3-5 days. Panel C. BY4741 wild type strain and its *wsc1* derivative were transformed with an empty pRS316 plasmid (*URA3* marker) or the same plasmid bearing the indicated versions of HA-tagged Wsc1. Transformants were grown and subjected to pH 8.2 for 15 min before collecting the cells and

processing them for immunoblot analysis using antibodies that detect the phosphorylated form of Slp2 (P-Slp2) or the Slp2 protein (Slp2p). Extract from a *slp2* strain is included as negative control.

Figure 6.- Effect of mutation of different members of the O-mannosyltransferase family on pH tolerance and Wsc1 stability. Panel A. The indicated BY4741 mutant derivatives were inoculated in liquid YPD media or YPD buffered at the indicated pHs and grown as indicated in Materials and Methods. Relative growth is represented as the ratio between the absorbance of the different cultures with respect to the wild type strain and expressed as percentage, and correspond to the mean \pm SEM from three independent experiments. Panel B. The indicated mutants were transformed with a multicopy plasmid bearing a functional HA-tagged version of Wsc1. Protein extracts were prepared, electrophoresed, and subjected to immunoblotted using anti-HA antibodies

Figure 7.- Identification of cell wall proteins induced by high pH in a Slp2-dependent manner. Panel A. Genes induced at least 1.9-fold after 15 or 30 min after exposure of wild type cells to high pH (8.2) were selected. The induction level in wild type cells (filled bars) was compared to that obtained in *slp2* cells (open bars) subjected to the same treatment and those genes presenting at least a 25% decrease in expression in the MAP kinase mutant were considered Slp2 dependent for high pH induction. The panel shows the result of this analysis in the case of four genes functionally related to cell wall structure or maintenance. Numbers at the top of the bars indicate increase in expression (-fold). Panel B. Expression levels of the indicated genes in non-stressed (-) or stressed (+, pH 8.2 for 30 min) wild type or *slp2* cells determined by reverse transcription-PCR. Panel C. The indicated strains were spotted and grown for 2-4 days in YPD plates buffered at the indicated pHs.

Figure 8.- Correlation between the transcriptional response to high pH stress and to cell wall damaging drugs or specific mutations. A table was generated with the expression level of genes induced by the indicated treatments or in specific mutants, which was crossed with the list of genes induced by severe alkaline stress, as defined in a previous work (10). This produced a final list of 29 genes. The correlation coefficient between the induction values at high pH stress and each of the indicated conditions was then calculated and plotted. When data for a specific condition was not available for a given gene, a value of 1 (no change) was assumed. Symbols and source of the data are: Zym, Zymolyase (34), CR, Congo Red (34), CAS, caspofungin (J. Arroyo, personal communication), α -F, α -factor (55), DTT, dithiothreitol (56). Data for mutant strains was obtained from (33).

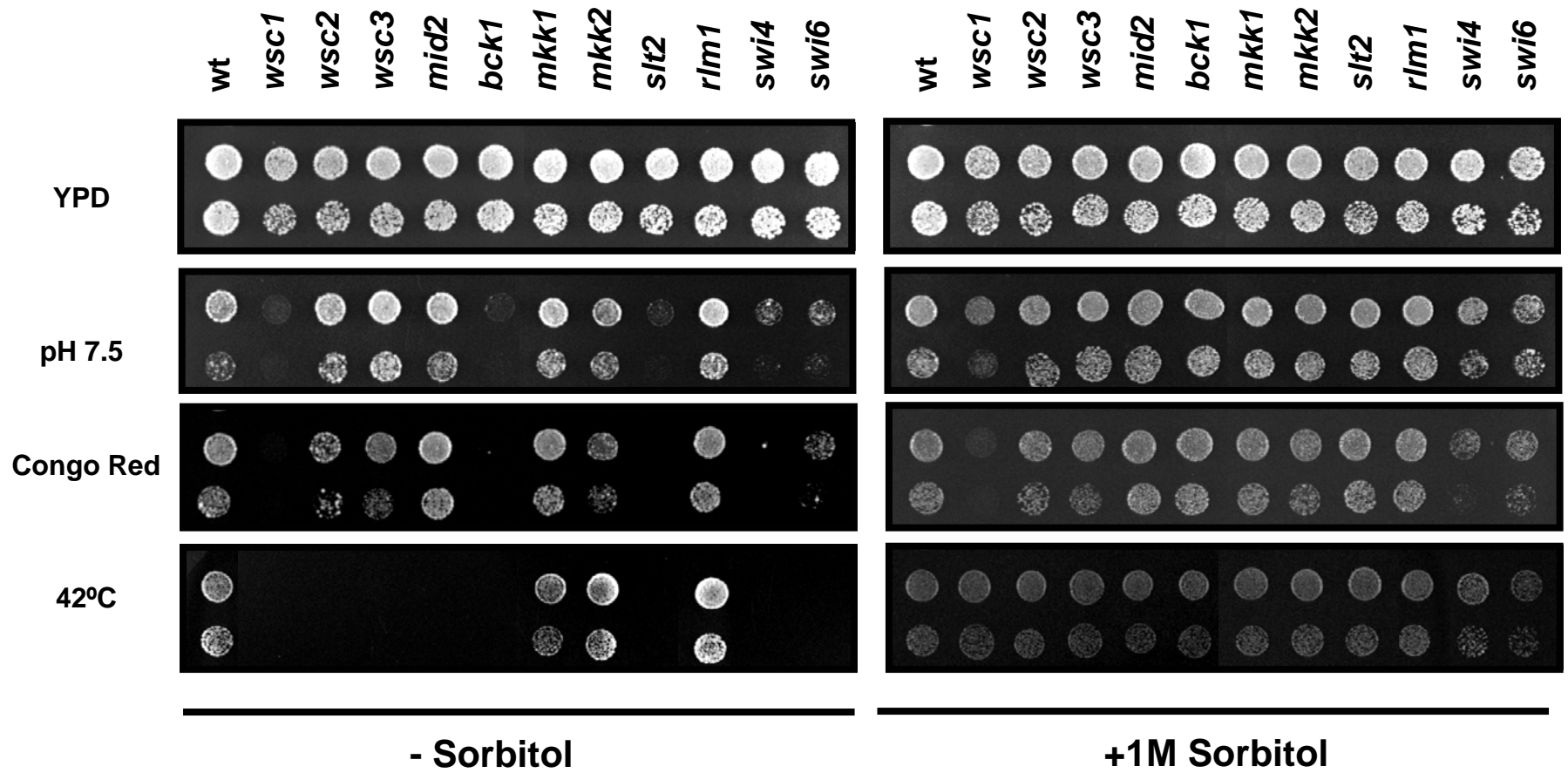


Figure 1, Serrano *et al.*

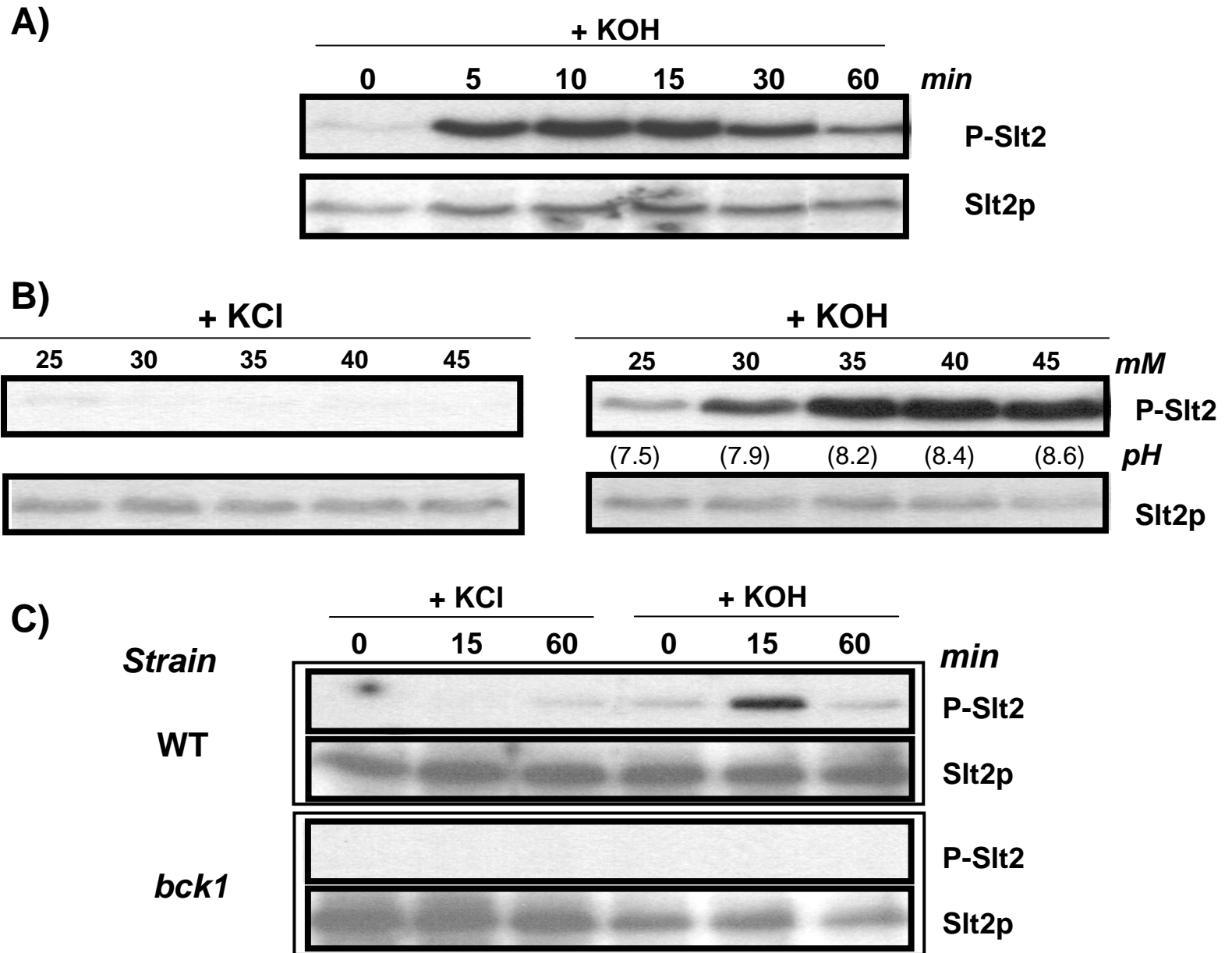


Figure 2, Serrano *et al.*

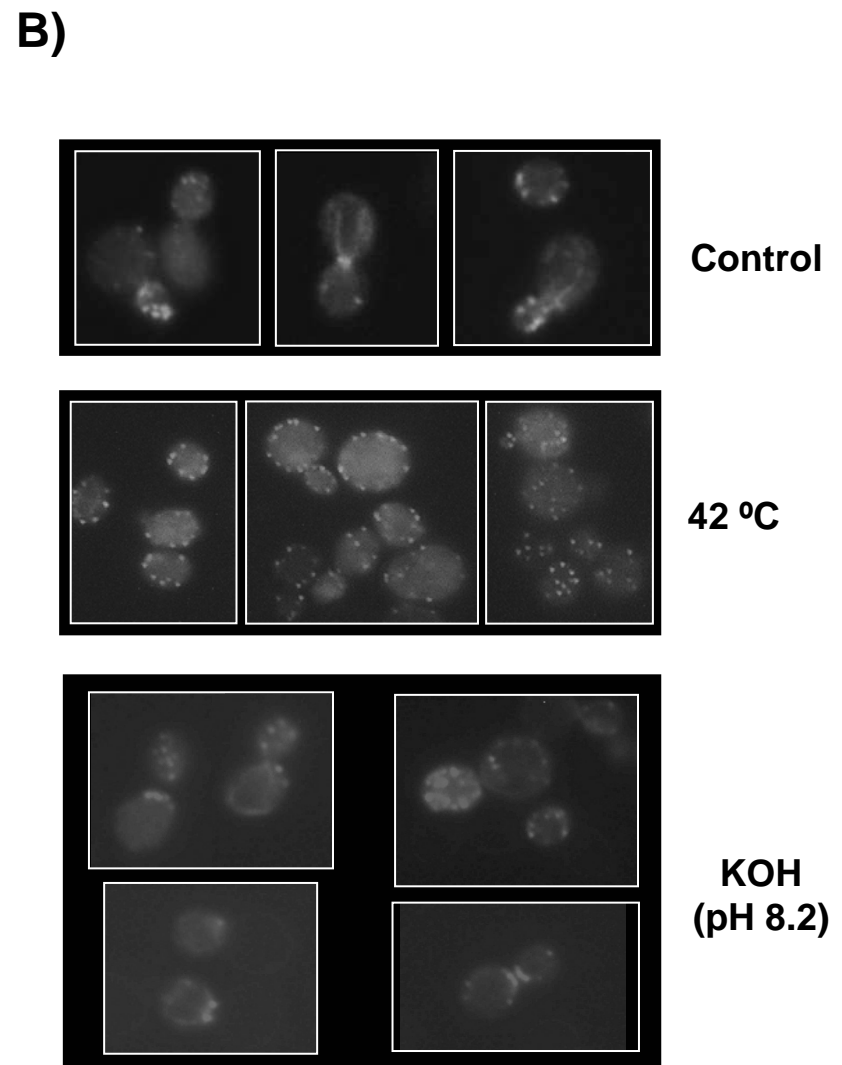
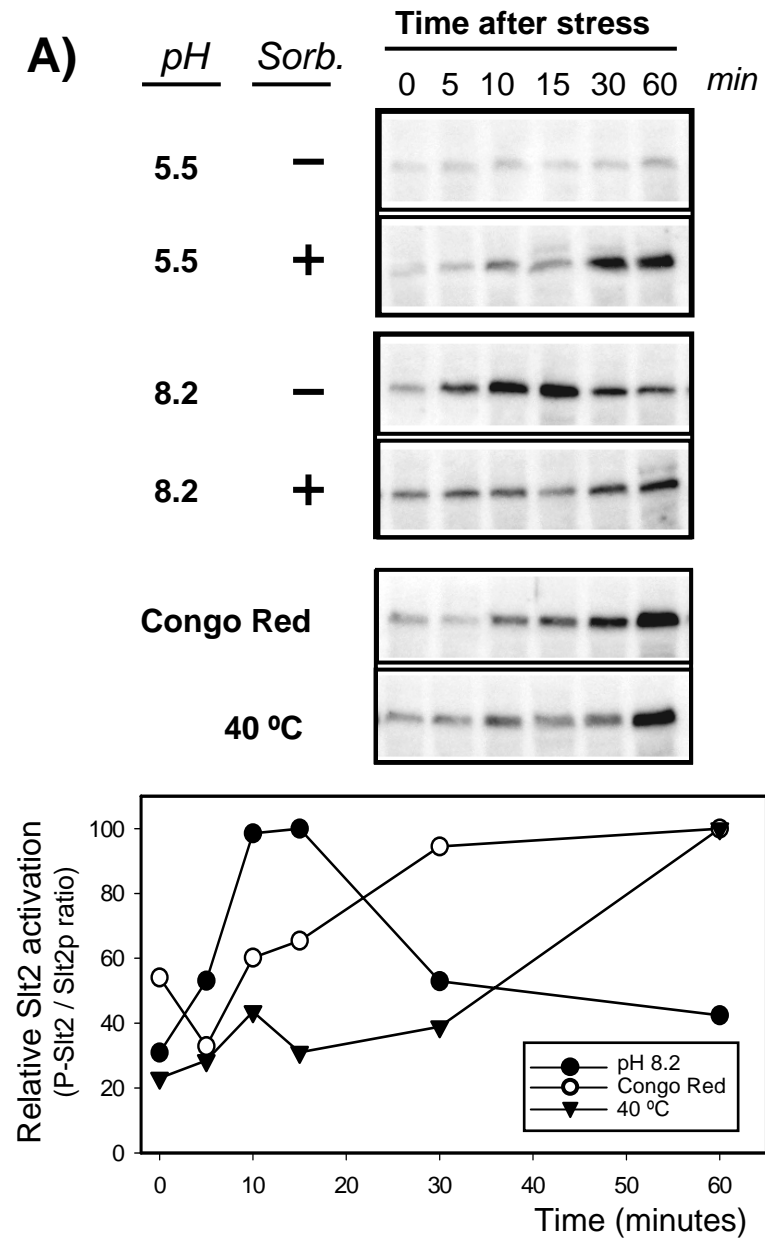


Figure 3, Serrano *et al.*

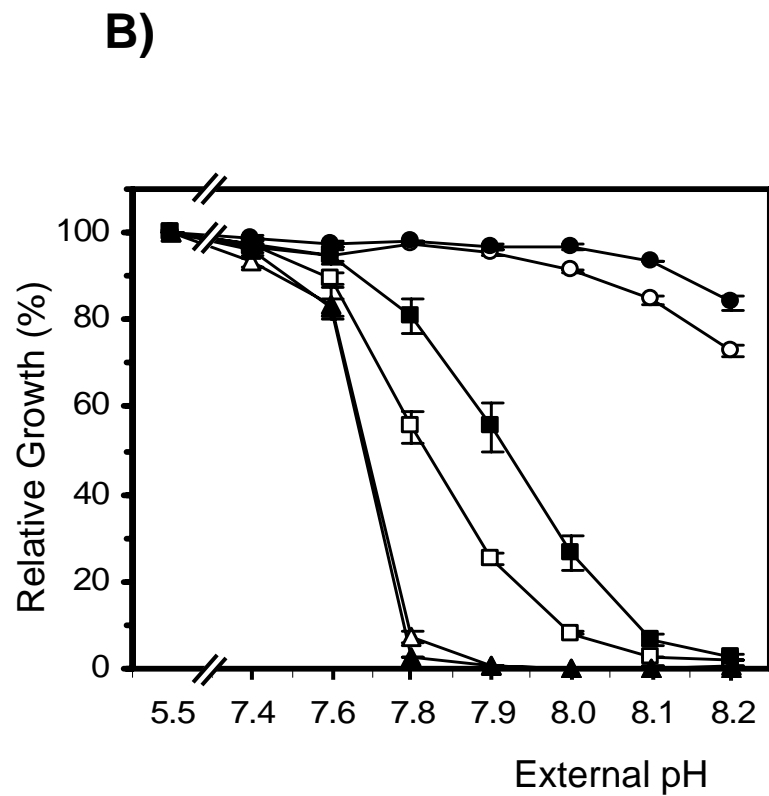
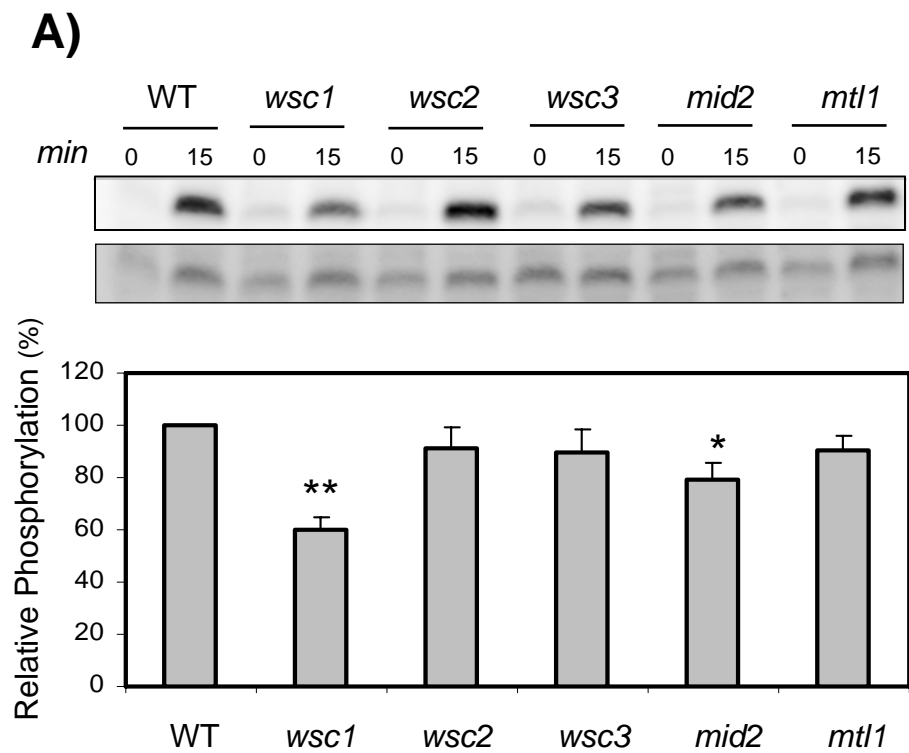


Figure 4, Serrano *et al.*

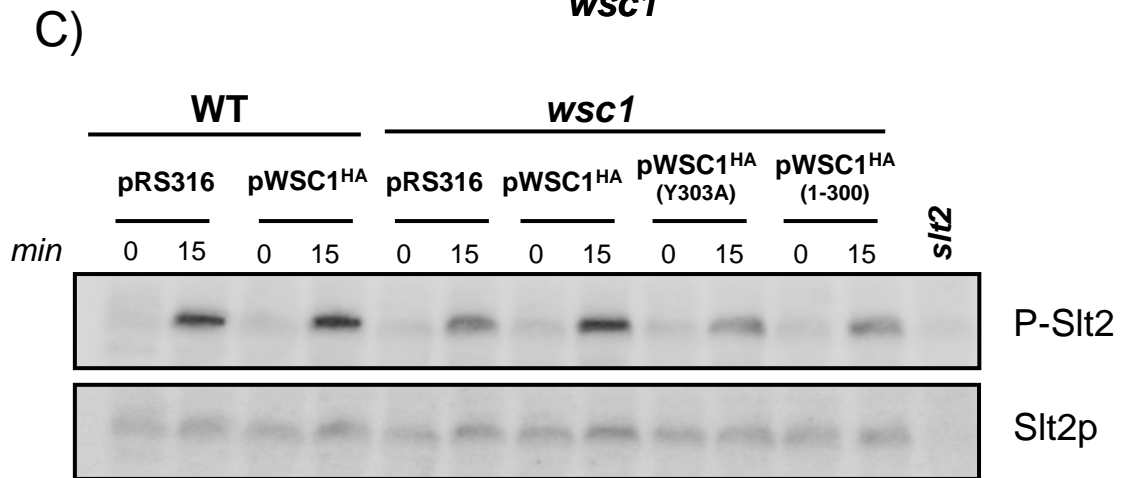
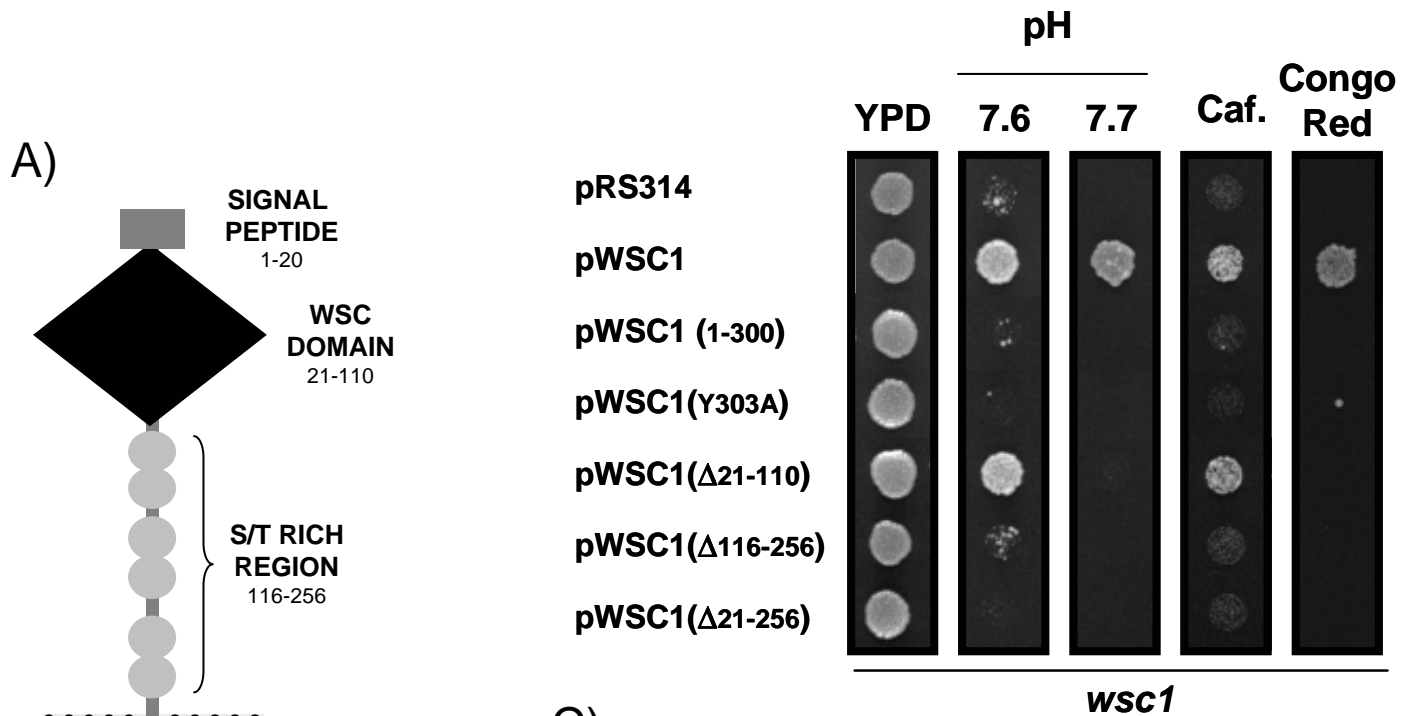


Figure 5, Serrano et al.

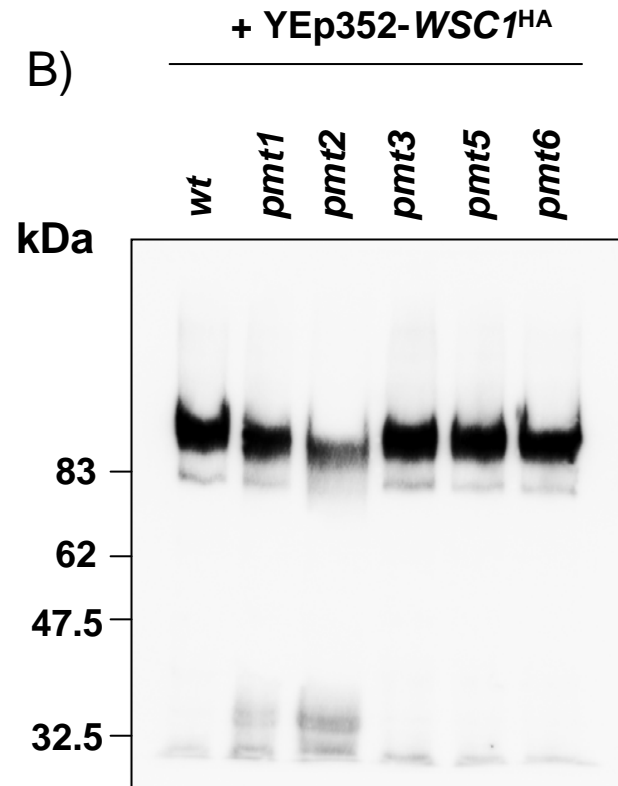
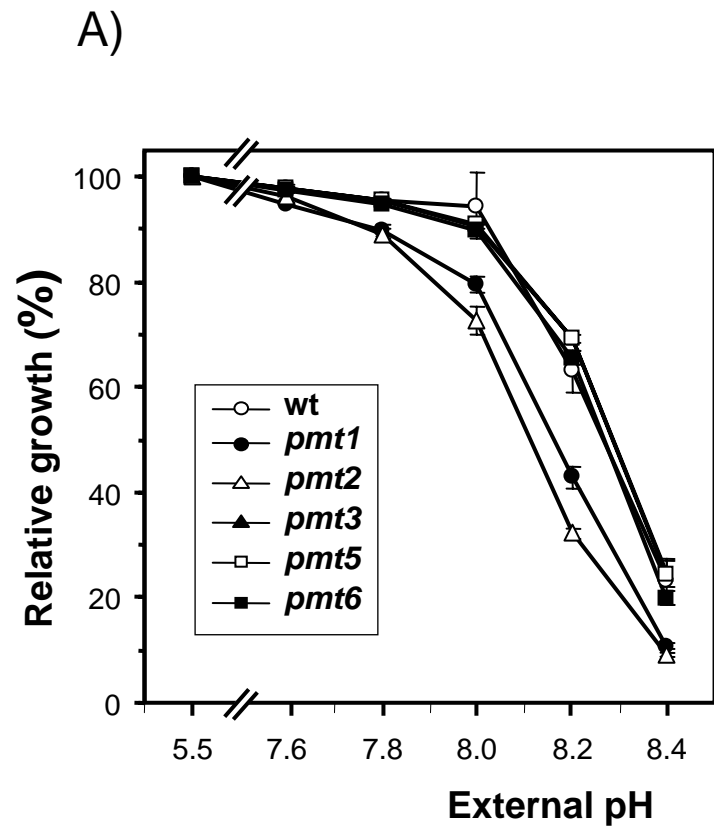


Figure 6, Serrano *et al.*

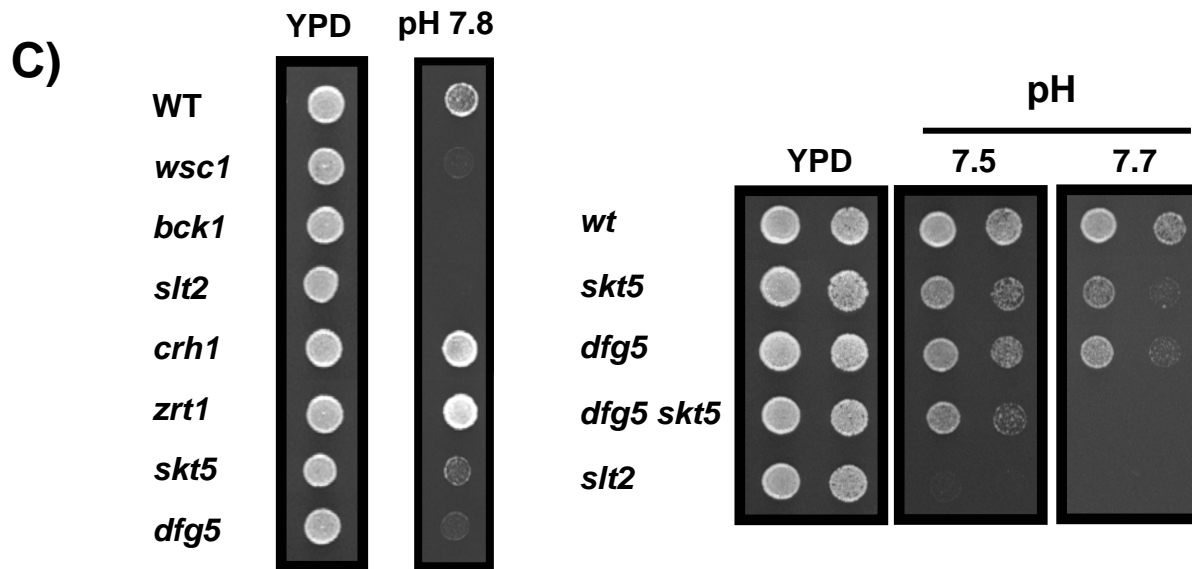
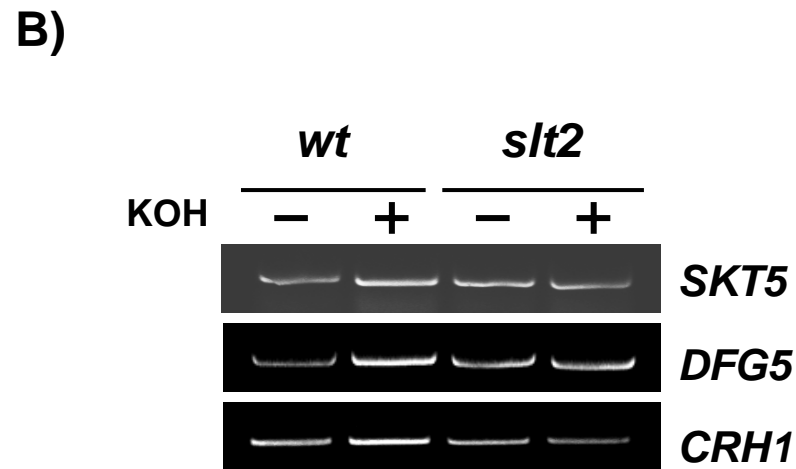
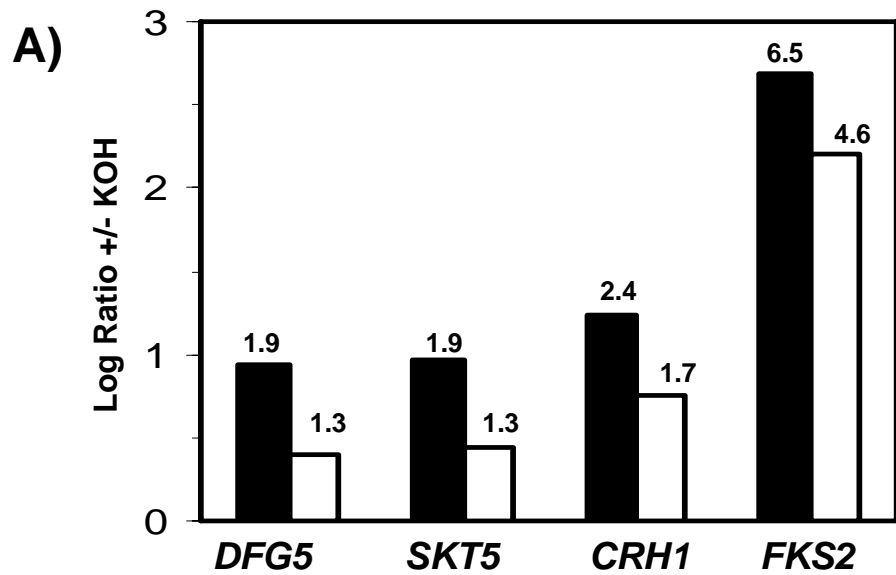


Figure 7 Serrano *et al.*

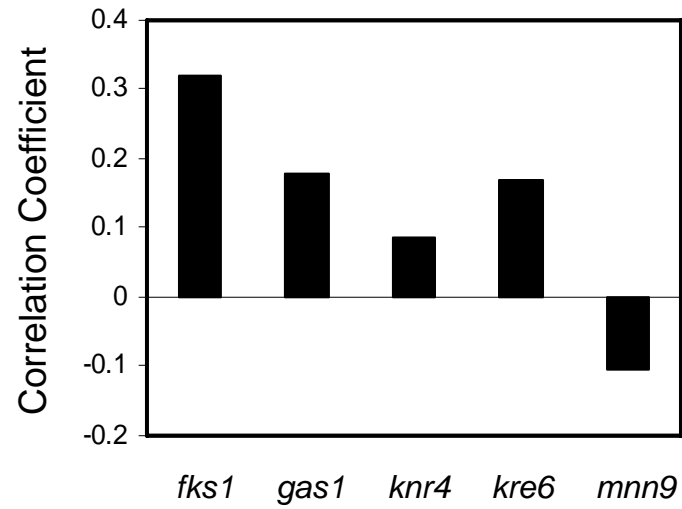
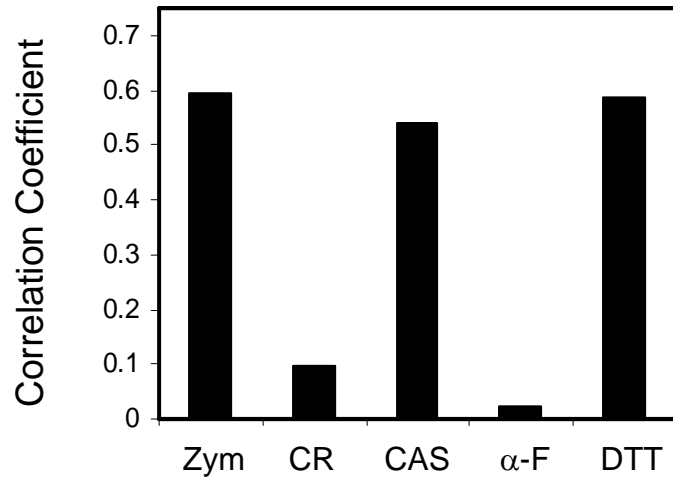


Figure 8, Serrano *et al.*

TABLE 1. List of oligonucleotides used in this study.

Name	Sequence
5'_WSC1_DISR	5'-GCGGTACCGCCTTTCCTCTCTGAAGATG-3'
3'_WSC1_DISR	5'-GCTCTAGAAGGGCTAAGTGTTGTGATTAG-3'
SKT5_DISR_5'	5'-GCTCTAGACCATCGTGGGAGACTGTAG-3'
SKT5_DISR_3'	5'-TGAGTGTAAACTGTTGCACC-3'
RT_SKT5_UP	5'-GGTCGGCAAACCAACCGC-3'
RT_SKT5_DO	5'-GATTCAATAGTCAGTGCGG-3'
RT_DFG5_UP	5'-AAGCCACTCATGCCATGG-3'
RT_DFG5_DO	5'-AACCTCGCCGCAATCTGG-3'
RT_CRH1_UP	5'-ACTGCTTCGTGTAACCCG-3'
RT_CRH1_DO	5'-TGGTTTCACCACCAGCCC-3'
WSC1N3_REV	5'-AGAAGTAGACTCCGTACTTGAATCTGAGCTGCTTATG CTATTCGCTTGCATAAAAATGG-3'
WSC1N5_REV	5'-CACCTACAACGCCGCCTACAATTGCCCTACATTGGC TTTCGCTTGCATAAAAATGG-3'
WSC1N2_FOR	5'-GAAAGCCAATGTAGGGGC-3'
WSC1N4_FOR	5'-TAGCATAAGCAGCTCAGATTC-3'
WSC1N1_REV	5'-CACCTACAACGCCGCCTACAATTGCCCTACATTGGC TTTGCTATTTGTGTCAGAGTC-3'
WSC1N6_REV	5'-ACCACCTACAACGCCGCC-3'
WSC1N7_REV	5'-CAGAAGTAGACTCCGTAC-3'

Induced by alkaline stress after 15 min

ID	Gene	log2 WT	SD WT	log2 slt2 Mut	SD slt2
YAL013W	DEP1	0.96	0.39	0.80	0.22
YAL017W	PSK1	1.15	0.14	1.08	0.33
YAL027W		1.20	0.18	1.03	0.49
YAL028W	FRT2	1.58	0.41	1.31	0.33
YAL031C	FUN21	0.93	0.29	0.83	0.45
YAL039C	CYC3	1.33	0.13	1.28	0.11
YAL053W		1.53	0.26	1.55	0.13
YAL060W	BDH1	0.95	0.11	0.94	0.19
YAL061W		4.88	0.44	5.07	0.20
YAR027W	UIP3	1.79	0.20	1.86	0.50
YAR028W		1.36	0.10	1.64	0.20
YAR042W	SWH1	1.49	0.43	0.82	0.35
YAR044W		0.97	0.32	0.74	0.37
YBL010C		1.11	0.34	0.70	0.45
YBL015W	ACH1	1.17	0.46	1.18	0.55
YBL064C	PRX1	1.00	0.13	1.12	0.30
YBL075C	SSA3	1.74	0.40	1.11	0.38
YBL078C	ATG8	2.19	0.34	2.23	0.12
YBL086C		1.47	0.30	1.50	0.15
YBL101C	ECM21	2.26	0.25	2.25	0.15
YBL103C	RTG3	1.46	0.16	1.20	0.27
YBR001C	NTH2	2.27	0.29	2.22	0.38
YBR004C	FMP44	1.14	0.25	1.21	0.24
YBR005W	RCR1	2.26	0.38	2.30	0.39
YBR006W	UGA2	1.50	0.08	1.39	0.48
YBR016W		1.99	0.17	1.96	0.09
YBR040W	FIG1	1.37	0.10	1.05	0.51
YBR049C	REB1	0.94	0.42	1.04	0.40
YBR056W		1.65	0.24	1.87	0.38
YBR068C	BAP2	1.65	0.11	1.76	0.11
YBR105C	VID24	0.95	0.16	0.85	0.22
YBR113W		0.97	0.06	0.41	0.13
YBR126C	TPS1	1.91	0.18	2.21	0.45
YBR132C	AGP2	2.53	0.21	2.43	0.25
YBR147W		1.42	0.36	1.07	0.27
YBR149W	ARA1	1.26	0.19	1.34	0.29
YBR152W	SPP381	1.28	0.30	0.95	0.50
YBR165W	UBS1	1.12	0.13	0.75	0.50
YBR176W	ECM31	1.02	0.20	0.69	0.47
YBR183W	YPC1	1.02	0.16	1.10	0.30
YBR211C	AME1	1.22	0.23	0.94	0.60
YBR212W	NGR1	1.70	0.21	1.73	0.11
YBR214W	SDS24	2.04	0.26	2.12	0.24
YBR216C	YBP1	1.29	0.24	1.17	0.34
YBR225W		1.69	0.38	1.39	0.39
YBR228W	SLX1	0.93	0.22	0.71	0.35
YBR230C		2.24	0.19	2.24	0.19
YBR235W		1.81	0.45	1.64	0.19
YBR251W	MRPS5	0.94	0.22	0.77	0.49
YBR269C	FMP21	1.27	0.29	1.38	0.18
YBR280C		2.07	0.35	1.89	0.39
YBR284W		2.43	0.37	2.17	0.58
YBR287W	ZSP1	2.16	0.18	2.29	0.28
YBR290W	BSD2	1.33	0.13	1.37	0.16

YCL005W		1.09	0.10	0.66	0.37
YCL032W	STE50	0.98	0.13	1.05	0.18
YCL040W	GLK1	2.11	0.33	2.44	0.47
YCL047C		1.16	0.28	0.72	0.47
YCL052C	PBN1	0.98	0.15	1.07	0.12
YCR004C	YCP4	0.95	0.15	1.00	0.26
YCR005C	CIT2	3.98	0.26	4.05	0.36
YCR010C	ADY2	1.12	0.37	0.69	0.23
YCR030C	SYP1	1.34	0.41	1.51	0.22
YCR051W		1.61	0.33	1.64	0.50
YCR091W	KIN82	2.23	0.48	1.90	0.33
YCR100C		1.00	0.31	0.72	0.47
YCRX13W		0.93	0.17	0.80	0.14
YDL009C		1.36	0.15	1.28	0.18
YDL010W		1.21	0.14	1.20	0.17
YDL019C	OSH2	0.99	0.27	1.07	0.11
YDL023C		1.32	0.30	1.49	0.37
YDL025C		1.62	0.27	1.57	0.15
YDL045C	FAD1	1.12	0.25	0.76	0.44
YDL080C	THI3	3.35	0.18	3.39	0.30
YDL085W	NDE2	1.33	0.42	1.34	0.48
YDL113C	ATG20	1.75	0.31	1.66	0.39
YDL132W	CDC53	1.04	0.20	1.05	0.36
YDL142C	CRD1	1.13	0.24	1.19	0.18
YDL161W	ENT1	1.13	0.10	1.10	0.22
YDL172C		1.09	0.26	0.74	0.29
YDL173W		1.29	0.14	1.18	0.20
YDL174C	DLD1	2.30	0.14	2.29	0.28
YDL203C		1.19	0.31	1.06	0.29
YDL215C	GDH2	1.54	0.19	1.52	0.06
YDL220C	CDC13	1.37	0.36	0.81	0.14
YDL234C	GYP7	3.30	0.47	3.36	0.58
YDR003W	RCR2	1.24	0.11	1.37	0.25
YDR006C	SOK1	1.60	0.47	1.23	0.11
YDR027C	VPS54	1.20	0.37	1.09	0.16
YDR040C	ENA1	3.76	0.25	3.73	0.52
YDR041W	RSM10	1.42	0.18	1.48	0.16
YDR043C	NRG1	1.49	0.37	1.64	0.20
YDR059C	UBC5	1.20	0.34	1.22	0.32
YDR069C	DOA4	1.54	0.37	1.44	0.12
YDR073W	SNF11	1.06	0.17	1.09	0.17
YDR074W	TPS2	2.44	0.23	2.69	0.38
YDR096W	GIS1	2.12	0.29	2.16	0.27
YDR122W	KIN1	1.01	0.16	1.05	0.32
YDR129C	SAC6	1.01	0.31	1.13	0.39
YDR171W	HSP42	0.99	0.16	1.04	0.52
YDR178W	SDH4	1.12	0.26	1.16	0.39
YDR185C		1.37	0.26	1.37	0.23
YDR230W		1.18	0.27	1.08	0.16
YDR231C	COX20	1.11	0.36	1.23	0.38
YDR247W	VHS1	1.48	0.27	1.14	0.17
YDR251W	PAM1	1.14	0.13	1.31	0.22
YDR270W	CCC2	1.18	0.18	0.86	0.24
YDR293C	SSD1	1.13	0.16	1.25	0.33
YDR319C		1.14	0.26	0.99	0.25
YDR325W	YCG1	1.55	0.15	1.48	0.54

YDR342C	HXT7	2.11	0.19	2.33	0.13
YDR343C	HXT6	1.23	0.45	1.09	0.59
YDR358W	GGA1	1.62	0.19	1.73	0.32
YDR409W	SIZ1	0.94	0.33	0.67	0.16
YDR436W	PPZ2	1.34	0.38	1.12	0.36
YDR460W	TFB3	0.96	0.17	0.77	0.28
YDR477W	SNF1	1.01	0.06	0.93	0.35
YDR479C	PEX29	1.12	0.08	1.12	0.19
YDR490C	PKH1	1.44	0.24	1.41	0.28
YDR516C	EMI2	2.07	0.40	2.21	0.42
YEL005C	VAB2	1.13	0.26	0.72	0.42
YEL011W	GLC3	2.96	0.16	3.21	0.51
YEL019C	MMS21	1.47	0.27	0.98	0.49
YEL021W	URA3	1.10	0.37	1.01	0.16
YEL024W	RIP1	0.98	0.18	0.92	0.30
YEL060C	PRB1	3.55	0.13	3.70	0.28
YEL065W	SIT1	1.15	0.42	1.15	0.28
YEL071W	DLD3	1.67	0.12	1.81	0.10
YER020W	GPA2	2.69	0.14	2.98	0.54
YER035W	EDC2	1.80	0.21	2.00	0.16
YER039C	HVG1	1.24	0.17	0.88	0.36
YER040W	GLN3	1.62	0.45	1.18	0.23
YER042W	MXR1	1.28	0.16	1.22	0.27
YER046W	SPO73	1.23	0.07	1.22	0.24
YER054C	GIP2	2.91	0.18	2.85	0.26
YER061C	CEM1	1.12	0.33	0.99	0.33
YER062C	HOR2	0.95	0.23	0.78	0.39
YER067W		3.62	0.37	3.96	0.21
YER088C	DOT6	0.93	0.20	0.89	0.35
YER098W	UBP9	1.49	0.33	1.37	0.31
YER099C	PRS2	0.94	0.22	0.59	0.35
YER100W	UBC6	0.94	0.26	0.60	0.42
YER106W	MAM1	0.97	0.24	0.71	0.40
YER116C	SLX8	0.99	0.20	0.61	0.33
YER130C		1.03	0.15	0.89	0.23
YER144C	UBP5	2.38	0.43	2.22	0.02
YER153C	PET122	1.09	0.41	0.66	0.11
YER161C	SPT2	1.12	0.15	0.82	0.53
YER162C	RAD4	1.35	0.46	1.29	0.34
YER175C	TMT1	1.06	0.21	0.88	0.10
YER179W	DMC1	0.98	0.29	0.60	0.34
YER188W		1.34	0.18	0.76	0.57
YFL030W	AGX1	1.34	0.20	0.57	0.38
YFL043C		1.12	0.27	0.79	0.18
YFL046W	FMP32	0.95	0.29	0.61	0.48
YFL060C	SNO3	1.12	0.29	0.69	0.37
YFL061W	DDI2	1.03	0.25	0.67	0.42
YFR008W	FAR7	0.94	0.34	0.95	0.50
YFR014C	CMK1	1.86	0.33	1.78	0.17
YFR015C	GSY1	3.38	0.13	3.24	0.33
YFR017C		1.46	0.39	1.65	0.40
YFR020W		1.13	0.13	0.61	0.37
YFR029W	PTR3	1.13	0.10	0.75	0.15
YFR030W	MET10	1.40	0.27	1.31	0.09
YFR039C		1.16	0.30	1.18	0.16
YFR043C		1.19	0.31	0.88	0.50

YFR053C	HXK1	1.90	0.34	2.16	0.48
YFR054C		1.72	0.14	1.55	0.13
YGL015C		1.18	0.34	1.43	0.30
YGL017W	ATE1	0.94	0.22	0.95	0.12
YGL035C	MIG1	1.26	0.39	1.24	0.16
YGL036W		1.46	0.28	1.42	0.18
YGL037C	PNC1	1.24	0.22	1.44	0.49
YGL046W		1.28	0.20	0.93	0.32
YGL053W	PRM8	1.60	0.30	1.54	0.46
YGL059W		0.99	0.14	1.12	0.29
YGL062W	PYC1	2.53	0.10	2.55	0.32
YGL071W	RCS1	1.13	0.27	0.86	0.33
YGL073W	HSF1	1.01	0.45	0.83	0.17
YGL080W	FMP37	1.00	0.20	0.95	0.40
YGL081W		1.42	0.34	0.87	0.56
YGL085W		1.31	0.26	0.91	0.58
YGL104C	VPS73	1.15	0.25	1.05	0.41
YGL117W		1.11	0.30	0.81	0.12
YGL146C		1.15	0.37	0.90	0.17
YGL154C	LYS5	0.98	0.21	0.83	0.45
YGL156W	AMS1	1.78	0.47	1.68	0.40
YGL161C	YIP5	1.01	0.20	0.87	0.21
YGL162W	SUT1	1.08	0.23	0.63	0.20
YGL165C		1.63	0.13	1.72	0.35
YGL167C	PMR1	1.15	0.18	1.14	0.14
YGL181W	GTS1	0.94	0.18	0.92	0.20
YGL208W	SIP2	1.09	0.20	0.83	0.36
YGL224C	SDT1	1.24	0.15	0.70	0.41
YGL227W	VID30	1.68	0.43	1.56	0.50
YGL237C	HAP2	1.36	0.21	1.00	0.41
YGL248W	PDE1	0.93	0.18	0.89	0.09
YGL250W		1.40	0.21	1.05	0.47
YGL256W	ADH4	0.96	0.39	0.88	0.08
YGR008C	STF2	1.99	0.28	2.24	0.54
YGR021W		0.97	0.21	0.50	0.31
YGR023W	MTL1	1.56	0.20	1.35	0.22
YGR028W	MSP1	1.32	0.18	1.38	0.27
YGR032W	GSC2	2.69	0.35	2.21	0.58
YGR033C	FMP17	1.03	0.13	1.01	0.24
YGR046W		0.98	0.14	1.11	0.15
YGR052W	FMP48	1.41	0.29	1.72	0.45
YGR053C		1.38	0.27	1.12	0.50
YGR055W	MUP1	1.66	0.08	1.68	0.29
YGR065C	VHT1	1.25	0.31	1.34	0.21
YGR070W	ROM1	1.04	0.24	1.16	0.15
YGR071C		0.98	0.26	0.97	0.22
YGR086C	PIL1	1.04	0.10	1.12	0.09
YGR120C	COG2	1.01	0.45	0.63	0.41
YGR127W		1.70	0.23	1.52	0.40
YGR136W	LSB1	0.95	0.19	0.78	0.21
YGR144W	THI4	1.44	0.37	0.77	0.25
YGR147C	NAT2	1.20	0.35	0.88	0.49
YGR194C	XKS1	1.72	0.08	1.70	0.32
YGR200C	ELP2	1.57	0.36	1.54	0.23
YGR205W		1.42	0.33	1.36	0.30
YGR213C	RTA1	1.41	0.35	1.06	0.50

YGR230W	BNS1	1.32	0.06	0.93	0.58
YGR236C	SPG1	1.39	0.22	1.03	0.53
YGR237C		1.65	0.43	1.71	0.31
YGR241C	YAP1802	1.14	0.32	1.15	0.23
YGR242W		1.44	0.19	1.06	0.56
YGR247W	CPD1	1.02	0.30	0.77	0.16
YGR259C		1.07	0.16	0.86	0.18
YGR266W		1.13	0.38	1.27	0.39
YGR288W	MAL13	1.70	0.28	1.77	0.30
YHL018W		1.20	0.45	0.73	0.49
YHL021C	FMP12	4.19	0.14	4.60	0.19
YHL027W	RIM101	1.17	0.19	1.17	0.38
YHL035C	VMR1	0.99	0.27	0.87	0.43
YHL036W	MUP3	2.15	0.21	1.93	0.32
YHL037C		1.39	0.33	0.95	0.56
YHR016C	YSC84	1.12	0.26	1.23	0.32
YHR022C		1.34	0.20	0.84	0.55
YHR030C	SLT2	0.95	0.33	0.91	0.45
YHR033W		1.22	0.38	1.20	0.33
YHR038W	RRF1	1.27	0.15	0.86	0.45
YHR067W	RMD12	1.13	0.22	0.61	0.37
YHR071W	PCL5	1.41	0.17	1.38	0.21
YHR080C		1.01	0.20	0.98	0.36
YHR090C	YNG2	1.13	0.31	0.68	0.47
YHR092C	HXT4	1.16	0.14	1.28	0.27
YHR105W	YPT35	1.34	0.30	0.78	0.50
YHR113W		1.32	0.22	1.38	0.31
YHR116W	COX23	1.22	0.21	0.89	0.41
YHR126C		1.64	0.20	1.42	0.32
YHR131C		1.09	0.40	0.63	0.42
YHR136C	SPL2	1.70	0.04	1.17	0.39
YHR138C		2.13	0.42	2.08	0.35
YHR140W		1.44	0.15	1.16	0.29
YHR153C	SPO16	1.18	0.10	0.93	0.32
YHR157W	REC104	1.50	0.23	1.01	0.57
YHR161C	YAP1801	1.71	0.47	1.81	0.36
YHR171W	ATG7	1.86	0.32	1.89	0.38
YHR173C		1.34	0.24	0.98	0.58
YHR175W	CTR2	1.13	0.14	0.89	0.38
YHR181W	SVP26	0.93	0.13	0.79	0.29
YHR195W	NVJ1	1.18	0.11	1.08	0.29
YHR198C	FMP22	1.02	0.15	1.18	0.19
YHR212C		1.13	0.28	0.84	0.48
YHR213W		1.30	0.45	0.68	0.59
YIL012W		1.32	0.36	0.83	0.44
YIL036W	CST6	1.66	0.47	1.80	0.11
YIL042C		1.06	0.24	0.80	0.09
YIL046W	MET30	0.95	0.34	0.79	0.33
YIL055C		2.65	0.31	2.35	0.35
YIL056W		1.59	0.45	1.62	0.17
YIL065C	FIS1	1.21	0.10	0.99	0.19
YIL077C		1.32	0.17	1.14	0.16
YIL106W	MOB1	1.19	0.13	0.90	0.56
YIL107C	PFK26	1.54	0.33	1.58	0.44
YIL112W	HOS4	2.03	0.47	1.88	0.36
YIL136W	OM45	1.88	0.28	1.81	0.23

YIL162W	SUC2	1.76	0.32	1.80	0.35
YIR025W	MND2	1.20	0.02	1.10	0.34
YIR043C		0.94	0.12	1.05	0.26
YJL016W		1.17	0.26	1.23	0.22
YJL036W	SNX4	0.93	0.26	1.04	0.27
YJL048C	UBX6	1.26	0.14	1.33	0.52
YJL060W	BNA3	1.08	0.18	1.25	0.41
YJL066C	MPM1	1.17	0.26	1.24	0.48
YJL083W		1.20	0.37	1.21	0.33
YJL084C		0.94	0.35	0.72	0.32
YJL094C	KHA1	2.57	0.12	2.74	0.25
YJL139C	YUR1	1.13	0.04	1.02	0.16
YJL141C	YAK1	3.09	0.49	2.88	0.28
YJL142C		2.17	0.26	2.33	0.31
YJL155C	FBP26	1.82	0.22	2.04	0.35
YJL163C		1.92	0.39	1.99	0.38
YJL164C	TPK1	1.51	0.28	1.76	0.44
YJL165C	HAL5	2.49	0.35	2.53	0.27
YJL166W	QCR8	1.25	0.19	1.46	0.23
YJL171C		1.09	0.15	1.44	0.30
YJL172W	CPS1	1.38	0.34	1.38	0.26
YJL185C		1.31	0.28	1.01	0.48
YJL210W	PEX2	0.93	0.32	0.86	0.29
YJR059W	PTK2	1.67	0.12	1.75	0.18
YJR062C	NTA1	0.95	0.11	1.14	0.31
YJR091C	JSN1	1.64	0.23	1.51	0.15
YJR109C	CPA2	1.15	0.21	1.08	0.46
YKL001C	MET14	2.12	0.12	2.10	0.23
YKL023W		1.10	0.11	1.34	0.29
YKL032C	IXR1	1.20	0.27	1.11	0.09
YKL035W	UGP1	1.19	0.19	1.50	0.44
YKL043W	PHD1	1.89	0.26	1.96	0.43
YKL061W		1.30	0.42	1.03	0.07
YKL091C		1.92	0.18	2.09	0.34
YKL093W	MBR1	1.53	0.34	1.34	0.51
YKL100C		1.23	0.11	1.43	0.28
YKL103C	LAP4	1.03	0.12	1.30	0.25
YKL124W	SSH4	1.40	0.13	1.50	0.18
YKL133C		1.40	0.26	1.29	0.36
YKL159C	RCN1	1.51	0.44	1.63	0.44
YKL162C		1.53	0.49	1.78	0.40
YKL168C	KKQ8	1.00	0.15	0.93	0.20
YKL171W		1.82	0.28	1.72	0.20
YKR011C		1.38	0.20	1.50	0.30
YKR017C		0.94	0.27	0.67	0.34
YKR021W		1.10	0.18	0.85	0.36
YKR052C	MRS4	1.96	0.07	1.82	0.23
YKR058W	GLG1	1.66	0.17	1.59	0.34
YKR076W	ECM4	1.87	0.28	1.93	0.45
YKR089C	STC1	1.29	0.20	1.45	0.08
YLL055W		1.21	0.38	1.02	0.29
YLL061W	MMP1	3.28	0.42	2.89	0.24
YLL062C	MHT1	2.48	0.23	2.33	0.27
YLR001C		1.23	0.20	1.14	0.08
YLR089C	ALT1	1.21	0.31	1.43	0.23
YLR099C	ICT1	1.33	0.15	1.26	0.12

YLR102C	APC9	1.14	0.26	1.30	0.40
YLR107W	REX3	1.24	0.18	1.16	0.22
YLR120C	YPS1	3.53	0.23	3.58	0.32
YLR132C		1.22	0.28	1.08	0.19
YLR133W	CKI1	1.16	0.20	1.22	0.21
YLR142W	PUT1	2.55	0.25	2.38	0.54
YLR149C		1.27	0.35	1.46	0.42
YLR151C	PCD1	1.04	0.16	1.07	0.45
YLR173W		1.00	0.32	0.87	0.32
YLR174W	IDP2	1.64	0.20	1.24	0.33
YLR178C	TFS1	2.58	0.49	2.87	0.29
YLR187W	SKG3	1.35	0.30	1.11	0.13
YLR194C		2.64	0.31	2.70	0.26
YLR205C	HMX1	2.36	0.10	1.90	0.46
YLR206W	ENT2	1.06	0.26	1.02	0.34
YLR228C	ECM22	1.52	0.24	1.24	0.17
YLR251W	SYM1	1.40	0.19	1.52	0.35
YLR254C		0.96	0.27	0.97	0.37
YLR257W		1.29	0.34	1.43	0.25
YLR258W	GSY2	1.77	0.44	1.59	0.34
YLR267W	BOP2	4.87	0.38	4.68	0.41
YLR270W	DCS1	0.95	0.16	1.13	0.29
YLR282C		1.40	0.06	1.60	0.23
YLR294C		1.02	0.13	1.18	0.14
YLR312C		1.53	0.24	1.28	0.37
YLR327C		1.80	0.11	2.01	0.29
YLR331C		1.00	0.20	1.20	0.23
YLR337W		1.64	0.25	1.33	0.38
YLR345W		1.69	0.29	1.83	0.39
YLR350W	ORM2	2.24	0.38	2.23	0.33
YLR356W		1.19	0.19	1.25	0.22
YLR392C		2.44	0.45	1.97	0.38
YLR417W	VPS36	2.11	0.20	2.11	0.54
YLR431C	ATG23	0.99	0.12	0.61	0.29
YLR438W	CAR2	1.12	0.26	1.12	0.31
YML057W	CMP2	0.99	0.06	0.93	0.22
YML100W	TSL1	2.70	0.24	2.95	0.37
YML117W	NAB6	1.11	0.28	1.06	0.23
YML117W-a		1.05	0.11	0.88	0.13
YML118W	NGL3	1.21	0.23	1.37	0.54
YML120C	NDI1	1.55	0.04	1.80	0.20
YML127W	RSC9	1.11	0.13	1.10	0.28
YML131W		1.84	0.19	1.77	0.19
YMR004W	MVP1	0.92	0.31	0.98	0.34
YMR009W		1.18	0.14	1.18	0.08
YMR011W	HXT2	5.05	0.27	4.79	0.31
YMR020W	FMS1	0.96	0.17	1.10	0.45
YMR030W	RSF1	1.02	0.12	0.92	0.17
YMR035W	IMP2	1.37	0.20	1.55	0.29
YMR040W	YET2	1.14	0.23	1.33	0.45
YMR064W	AEP1	2.58	0.28	2.46	0.35
YMR085W		1.89	0.38	1.96	0.43
YMR096W	SNZ1	2.36	0.43	2.20	0.55
YMR102C		1.08	0.26	1.00	0.26
YMR110C		1.39	0.17	1.55	0.36
YMR114C		1.00	0.17	1.07	0.37

YMR135C	GID8	1.44	0.33	1.34	0.27
YMR136W	GAT2	1.60	0.34	1.76	0.30
YMR139W	RIM11	1.42	0.09	1.54	0.20
YMR140W	SIP5	1.74	0.42	1.71	0.28
YMR158W-a		1.53	0.47	1.68	0.10
YMR160W		0.98	0.32	0.98	0.38
YMR173W	DDR48	1.18	0.26	1.27	0.20
YMR173W-a		0.95	0.11	1.07	0.33
YMR181C		1.61	0.22	1.69	0.07
YMR191W	SPG5	1.42	0.05	1.44	0.17
YMR195W	ICY1	1.49	0.20	1.57	0.24
YMR211W	DML1	1.20	0.46	0.92	0.07
YMR251W-a	HOR7	1.82	0.49	1.90	0.22
YMR253C		1.17	0.08	0.90	0.49
YMR258C		0.99	0.08	1.13	0.21
YMR261C	TPS3	1.16	0.10	1.20	0.27
YMR262W		1.96	0.23	1.86	0.15
YMR265C		1.40	0.37	1.10	0.15
YMR273C	ZDS1	1.01	0.16	0.60	0.37
YMR281W	GPI12	1.43	0.05	1.19	0.21
YMR284W	YKU70	0.99	0.32	1.08	0.36
YMR287C	MSU1	1.19	0.48	0.96	0.06
YMR291W		2.34	0.29	2.39	0.19
YMR302C	PRP12	1.13	0.13	1.22	0.13
YMR304W	UBP15	1.00	0.33	1.03	0.54
YMR311C	GLC8	1.00	0.24	1.10	0.41
YMR325W		1.32	0.13	1.24	0.38
YNL015W	PBI2	1.09	0.23	1.30	0.27
YNL025C	SSN8	0.93	0.30	0.61	0.30
YNL036W	NCE103	5.54	0.26	5.39	0.19
YNL100W		1.42	0.15	1.40	0.13
YNL115C		1.27	0.10	1.26	0.40
YNL134C		1.04	0.21	0.57	0.56
YNL156C	NSG2	1.44	0.27	1.24	0.26
YNL157W		1.01	0.21	1.14	0.17
YNL173C	MDG1	1.21	0.18	1.16	0.13
YNL183C	NPR1	1.02	0.29	0.97	0.17
YNL192W	CHS1	1.78	0.24	1.79	0.28
YNL208W		2.19	0.25	2.25	0.24
YNL274C		0.96	0.31	1.23	0.26
YNL276C		1.70	0.15	1.38	0.29
YNL278W	CAF120	1.28	0.37	0.91	0.31
YNL293W	MSB3	1.44	0.30	1.34	0.26
YNL307C	MCK1	1.08	0.44	0.86	0.33
YNR004W		1.04	0.19	1.01	0.11
YNR005C		1.57	0.31	1.43	0.49
YNR007C	ATG3	1.51	0.44	1.10	0.37
YNR032W	PPG1	0.94	0.28	0.82	0.31
YNR034W	SOL1	0.95	0.15	0.82	0.22
YNR059W	MNT4	1.68	0.22	1.74	0.38
YOL011W	PLB3	1.68	0.23	1.66	0.41
YOL016C	CMK2	4.59	0.10	4.45	0.29
YOL025W	LAG2	1.10	0.30	1.00	0.34
YOL036W		1.10	0.23	1.03	0.20
YOL053W		0.96	0.18	1.01	0.19
YOL082W	ATG19	1.11	0.11	1.44	0.41

YOL119C	MCH4	1.00	0.30	0.85	0.24
YOL126C	MDH2	1.16	0.26	1.25	0.39
YOR005C	DNL4	1.25	0.21	0.97	0.27
YOR023C	AHC1	1.12	0.43	1.24	0.10
YOR028C	CIN5	1.03	0.31	1.12	0.34
YOR036W	PEP12	2.16	0.14	2.13	0.31
YOR088W		1.27	0.30	1.41	0.18
YOR092W	ECM3	1.12	0.22	1.11	0.40
YOR132W	VPS17	1.03	0.15	0.89	0.12
YOR138C	RUP1	1.00	0.30	0.97	0.30
YOR162C	YRR1	1.58	0.19	1.41	0.32
YOR181W	LAS17	1.25	0.43	0.97	0.24
YOR185C	GSP2	1.13	0.49	0.98	0.41
YOR208W	PTP2	1.63	0.22	1.62	0.40
YOR219C	STE13	2.07	0.48	1.98	0.11
YOR220W		3.64	0.20	3.72	0.16
YOR223W		1.08	0.23	1.10	0.24
YOR275C	RIM20	1.01	0.35	1.10	0.17
YOR289W		1.75	0.18	1.90	0.57
YOR303W	CPA1	0.96	0.20	0.82	0.20
YOR327C	SNC2	1.15	0.16	1.09	0.25
YOR329C	SCD5	1.29	0.16	1.21	0.16
YOR347C	PYK2	1.49	0.23	1.36	0.55
YOR384W	FRE5	2.14	0.19	1.17	0.39
YPL003W	ULA1	0.98	0.07	1.14	0.19
YPL004C	LSP1	1.30	0.13	1.50	0.21
YPL014W		1.11	0.14	0.77	0.27
YPL015C	HST2	1.04	0.20	0.83	0.35
YPL023C	MET12	1.04	0.16	1.13	0.19
YPL024W	NCE4	0.98	0.11	0.83	0.34
YPL055C	LGE1	1.25	0.32	0.86	0.07
YPL057C	SUR1	2.01	0.35	2.10	0.38
YPL061W	ALD6	2.05	0.30	2.13	0.26
YPL064C	CWC27	1.20	0.24	0.92	0.31
YPL087W	YDC1	1.10	0.39	1.00	0.29
YPL135W	ISU1	2.13	0.32	2.04	0.25
YPL149W	ATG5	1.25	0.40	1.33	0.28
YPL156C	PRM4	1.57	0.42	1.62	0.05
YPL159C	PET20	1.08	0.12	1.10	0.22
YPL186C	UIP4	1.49	0.19	1.40	0.52
YPL203W	TPK2	1.01	0.27	1.07	0.11
YPL221W	BOP1	1.53	0.20	1.47	0.14
YPL222W	FMP40	1.32	0.27	1.03	0.60
YPL229W		1.12	0.28	0.74	0.13
YPL259C	APM1	1.17	0.24	1.21	0.11
YPL265W	DIP5	1.34	0.24	1.23	0.39
YPR026W	ATH1	1.95	0.32	2.03	0.47
YPR066W	UBA3	1.49	0.32	1.15	0.51
YPR091C		1.01	0.39	0.99	0.19
YPR155C	NCA2	1.09	0.12	1.15	0.39
YPR184W	GDB1	2.78	0.37	2.87	0.21

Induced by alkaline stress after 30 min

ID	Gene	log2 WT	SD WT	log2 slt2 Mut	SD slt2 Mut
YAL044C	GCV3	0.96	0.23	0.78	0.33

YAR015W	ADE1	1.37	0.30	1.33	0.10
YAR042W	SWH1	1.23	0.34	1.37	0.38
YBL043W	ECM13	0.99	0.35	1.53	0.47
YBL061C	SKT5	0.96	0.55	0.44	0.18
YBL078C	ATG8	1.00	0.54	1.42	0.82
YBL103C	RTG3	0.94	0.17	1.24	0.21
YBR006W	UGA2	1.42	0.40	1.64	0.45
YBR056W		1.13	0.44	1.45	0.61
YBR065C	ECM2	0.94	0.44	0.93	0.18
YBR104W	YMC2	1.06	0.10	0.86	0.25
YBR105C	VID24	1.05	0.22	1.31	0.27
YBR132C	AGP2	0.94	0.44	1.18	0.34
YBR149W	ARA1	1.03	0.26	1.32	0.48
YBR152W	SPP381	1.05	0.38	1.19	0.43
YBR248C	HIS7	1.17	0.11	1.33	0.12
YCL030C	HIS4	1.42	0.23	1.64	0.37
YCL035C	GRX1	0.95	0.20	1.19	0.63
YCR005C	CIT2	3.65	0.19	3.73	0.17
YCR015C		0.98	0.49	1.17	0.38
YDL080C	THI3	1.25	0.48	2.18	0.38
YDL172C		1.04	0.08	1.22	0.13
YDL173W		1.25	0.08	1.18	0.09
YDL174C	DLD1	2.21	0.56	2.71	0.29
YDL182W	LYS20	1.20	0.36	1.61	0.49
YDL220C	CDC13	1.16	0.19	1.43	0.16
YDR019C	GCV1	0.99	0.23	1.02	0.27
YDR039C	ENA2	1.46	0.56	2.40	0.25
YDR264C	AKR1	1.04	0.36	1.21	0.20
YDR476C		0.97	0.31	1.17	0.39
YDR481C	PHO8	1.36	0.30	1.55	0.12
YDR534C	FIT1	1.07	0.26	1.05	0.38
YEL019C	MMS21	1.12	0.35	1.41	0.36
YEL021W	URA3	0.93	0.08	0.96	0.36
YEL065W	SIT1	2.92	0.54	2.91	0.28
YEL071W	DLD3	3.22	0.08	3.20	0.17
YER034W		1.23	0.28	0.92	0.13
YER039C	HVG1	0.98	0.27	1.03	0.20
YER040W	GLN3	1.02	0.40	1.33	0.21
YER042W	MXR1	0.99	0.27	1.07	0.48
YER052C	HOM3	1.39	0.22	1.62	0.25
YER072W	VTC1	1.12	0.27	1.24	0.36
YER076C		1.65	0.27	1.50	0.34
YER081W	SER3	5.29	0.18	5.34	0.11
YER139C		1.10	0.23	0.90	0.13
YER153C	PET122	1.12	0.08	1.14	0.56
YER175C	TMT1	2.25	0.47	3.03	0.35
YER188W		1.07	0.30	1.32	0.43
YFL044C	YOD1	0.97	0.12	0.88	0.16
YFL058W	THI5	0.92	0.33	2.01	0.48
YFL060C	SNO3	0.98	0.32	1.12	0.32
YFR030W	MET10	1.24	0.31	1.27	0.57
YGL062W	PYC1	2.59	0.23	3.09	0.19
YGL085W		0.99	0.30	1.07	0.26
YGL088W		1.03	0.35	1.63	0.95
YGL117W		1.50	0.31	2.11	0.64
YGL156W	AMS1	1.68	0.45	2.25	0.37

YGL218W		1.02	0.56	1.11	0.28
YGL224C	SDT1	0.95	0.32	1.23	0.33
YGL240W	DOC1	0.95	0.32	1.41	0.31
YGL255W	ZRT1	1.45	0.20	1.02	0.22
YGL256W	ADH4	1.87	0.06	1.71	0.21
YGR032W	GSC2	2.63	0.47	2.76	0.30
YGR053C		1.06	0.39	1.23	0.35
YGR110W		0.96	0.56	1.62	0.38
YGR144W	THI4	1.10	0.27	1.86	0.12
YGR161C	RTS3	1.11	0.25	1.20	0.34
YGR189C	CRH1	1.23	0.20	0.75	0.23
YGR204W	ADE3	1.24	0.16	1.15	0.21
YGR213C	RTA1	1.18	0.46	2.56	0.90
YGR233C	PHO81	1.05	0.02	1.23	0.18
YGR236C	SPG1	1.21	0.34	1.40	0.31
YGR293C		1.19	0.35	1.88	0.83
YHL018W		1.14	0.23	1.16	0.35
YHL037C		1.09	0.40	1.20	0.48
YHL046C		1.14	0.40	1.77	0.89
YHL047C	ARN2	1.65	0.48	1.69	0.31
YHR018C	ARG4	2.22	0.34	2.88	0.52
YHR029C		0.96	0.22	0.89	0.13
YHR046C	INM1	1.02	0.25	1.25	0.24
YHR062C	RPP1	1.11	0.41	0.81	0.28
YHR071W	PCL5	2.27	0.20	2.32	0.20
YHR136C	SPL2	1.81	0.18	2.31	0.50
YHR138C		1.29	0.57	1.75	0.62
YHR140W		0.94	0.30	1.22	0.43
YHR148W	IMP3	1.03	0.35	0.91	0.31
YHR157W	REC104	1.07	0.36	1.32	0.27
YHR168W	MTG2	1.38	0.24	1.93	0.38
YHR173C		1.03	0.45	1.23	0.39
YHR180W		1.17	0.23	1.36	0.43
YHR212C		0.95	0.39	1.02	0.37
YHR213W		1.04	0.04	1.70	0.79
YIL066C	RNR3	1.34	0.39	1.24	0.26
YIL074C	SER33	1.66	0.27	1.73	0.36
YIL116W	HIS5	1.35	0.16	1.38	0.32
YIL117C	PRM5	1.41	0.31	1.38	0.31
YIR034C	LYS1	1.27	0.15	1.82	0.29
YIR038C	GTT1	1.03	0.24	1.36	0.45
YJL056C	ZAP1	1.35	0.29	1.62	0.13
YJL060W	BNA3	1.01	0.41	1.03	0.41
YJL130C	URA2	1.02	0.37	0.64	0.31
YJL172W	CPS1	1.44	0.47	1.64	0.45
YJL199C		1.23	0.30	1.45	0.68
YJL217W		0.99	0.21	0.75	0.26
YJR026W		1.28	0.51	1.57	0.45
YJR028W		1.26	0.50	1.54	0.41
YJR073C	OPI3	1.08	0.37	1.59	0.53
YJR109C	CPA2	2.44	0.20	2.88	0.44
YKL001C	MET14	1.25	0.45	1.22	0.65
YKL023W		0.95	0.24	1.10	0.29
YKL103C	LAP4	1.14	0.31	1.50	0.53
YKL151C		1.04	0.53	1.89	0.62
YKL164C	PIR1	1.13	0.13	0.86	0.28

YKL211C	TRP3	1.37	0.05	1.34	0.20
YKL216W	URA1	0.99	0.03	0.86	0.10
YKR013W	PRY2	1.22	0.20	0.84	0.18
YKR076W	ECM4	1.67	0.56	2.19	0.46
YLL006W	MMM1	0.97	0.32	1.06	0.12
YLR089C	ALT1	1.04	0.17	1.07	0.17
YLR211C		1.08	0.54	1.14	0.71
YLR245C	CDD1	1.21	0.13	1.09	0.17
YLR356W		1.15	0.18	1.36	0.47
YLR359W	ADE13	1.12	0.24	0.95	0.18
YML040W		1.26	0.56	1.47	0.42
YML045W		1.23	0.53	1.45	0.39
YML118W	NGL3	0.95	0.14	1.52	0.08
YML131W		1.37	0.26	1.60	0.38
YMR035W	IMP2	0.96	0.36	1.12	0.58
YMR042W	ARG80	1.37	0.19	1.18	0.43
YMR046C		1.13	0.43	1.52	0.47
YMR051C		1.29	0.44	1.60	0.49
YMR062C	ECM40	1.65	0.47	2.07	0.48
YMR068W	AVO2	1.20	0.52	1.31	0.32
YMR085W		0.97	0.53	1.64	0.21
YMR096W	SNZ1	4.27	0.49	5.01	0.36
YMR120C	ADE17	1.35	0.28	1.19	0.13
YMR153W	NUP53	1.25	0.52	1.33	0.32
YMR164C	MSS11	1.64	0.36	1.98	0.33
YMR173W	DDR48	1.35	0.27	1.24	0.39
YMR189W	GCV2	2.08	0.06	2.28	0.33
YMR211W	DML1	1.21	0.50	1.23	0.32
YMR238W	DFG5	0.94	0.36	0.40	0.25
YMR251W		1.34	0.26	1.99	0.31
YMR265C		1.01	0.32	0.98	0.22
YMR287C	MSU1	1.10	0.57	0.99	0.16
YMR304W	UBP15	1.09	0.25	1.01	0.06
YMR319C	FET4	0.94	0.34	1.32	0.61
YMR325W		1.42	0.44	1.46	0.58
YNL015W	PBI2	1.11	0.39	1.31	0.62
YNL037C	IDH1	1.50	0.07	1.32	0.05
YNL104C	LEU4	1.00	0.16	1.03	0.12
YNL208W		2.44	0.12	2.54	0.25
YNL311C		1.02	0.21	1.10	0.20
YNR019W	ARE2	1.42	0.33	1.52	0.17
YOL026C	MIM1	0.94	0.12	0.66	0.23
YOL036W		1.09	0.25	1.13	0.26
YOL058W	ARG1	2.79	0.33	2.69	0.24
YOL133W	HRT1	0.93	0.30	0.69	0.64
YOR128C	ADE2	1.28	0.23	1.76	0.22
YOR135C		1.22	0.22	0.82	0.24
YOR184W	SER1	1.54	0.30	1.42	0.14
YOR185C	GSP2	1.02	0.32	1.25	0.47
YOR202W	HIS3	0.95	0.19	0.95	0.19
YOR220W		1.41	0.55	1.87	0.82
YOR316C	COT1	1.01	0.53	1.51	0.47
YOR327C	SNC2	1.36	0.20	1.28	0.19
YOR374W	ALD4	1.13	0.46	1.08	0.53
YOR383C	FIT3	1.92	0.37	1.73	0.30
YPL019C	VTC3	1.68	0.37	1.96	0.51

YPL135W	ISU1	1.41	0.43	1.74	0.36
YPL156C	PRM4	1.35	0.22	1.49	0.19
YPL274W	SAM3	1.14	0.36	1.11	0.31
YPR167C	MET16	1.01	0.50	1.11	0.60