

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética

Rodrigo Mendonça de Lucena

IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS GENÉTICOS DE
RESPOSTA AO ESTRESSE ÁCIDO EM
SACCHAROMYCES CEREVISIAE

Recife

2012

Rodrigo Mendonça de Lucena

**IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS GENÉTICOS DE
RESPOSTA AO ESTRESSE ÁCIDO EM
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Genética da Universidade Federal de Pernambuco
como parte dos requisitos exigidos para obtenção do
título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior

Co-orientador: Dra. Carolina Elsztein

Recife

2012

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lucena, Rodrigo Mendonça de

Identificação dos mecanismos genéticos de resposta ao estresse ácido em *Saccharomyces cerevisiae*/ Rodrigo Mendonça de Lucena– Recife: O Autor, 2012.

78 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Marcos Antonio de Moraes Júnior

Coorientadora: Carolina Elzstein

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas, Genética, 2012.

Inclui bibliografia

- 1. Genética de microorganismos 2. *Saccharomyces cerevisiae* 3. Fermentação I. Moraes Júnior, Marcos Antonio de (orientador)
II. Elztein, Carolina (coorientadora) III. Título**

579.135

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB- 2013- 219

Rodrigo Mendonça de Lucena

**IDENTIFICAÇÃO DOS MECANISMOS GENÉTICOS DE
RESPOSTA AO ESTRESSE ÁCIDO EM
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora:

Dr. Marcos Antonio de Moraes Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Roberto Lins Dias Neto
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Boris Juan Carlos Ugarte Stambuk
Universidade Federal de Santa Catarina

Recife
2012

In memoriam

Romualdo Mendonça de Lucena (1982-2011)

“Que imensa falta você faz meu irmão”

"Nós vamos morrer, e isso nos torna afortunados. A maioria das pessoas nunca vai morrer, porque nunca vai nascer. As pessoas potenciais que poderiam estar no meu lugar, mas que jamais verão a luz do dia, são mais numerosas que os grãos de areia da Arábia. Certamente esses fantasmas não nascidos incluem poetas maiores que Keats, cientistas maiores que Newton. Sabemos disso porque o conjunto das pessoas possíveis permitidas pelo nosso DNA excede em muito o conjunto de pessoas reais. Apesar dessas probabilidades assombrosas, somos eu e você, com toda a nossa banalidade, que aqui estamos..."

Richard Dawkins

AGRADECIMENTOS

- ✓ Ao professor Marcos Morais pela amizade e confiança em meu potencial, e por me inspirar como cientista, sempre formulando idéias inovadoras e brilhantes.
- ✓ A pesquisadora Carolina Elsztein por toda contribuição, amizade e apoio durante o período de convivência e trabalho.
- ✓ Aos professores Antônio Carlos, Diogo Simões, Tercílio Calsa e Valdir Balbino pelo valioso incentivo e conselhos importantes.
- ✓ Aos Professores Schuler e Silene pelos sábios e agradáveis momentos de descontração.
- ✓ A senhora Luzinete do Laboratório de Genética Humana, pela simpatia no fornecimento incansável de água destilada e gelo.
- ✓ Ao colega de laboratório Will Barros pelos momentos de descontração e discussão sobre PCR em tempo real.
- ✓ Aos meus amigos André Ribas, Fernanda Leite e Theresa Liberal que compartilharam de perto vários momentos da evolução deste trabalho, sempre incentivando e apoiando com críticas inteligentes e construtivas, tudo isso com muito humor e descontração.
- ✓ A todos os outros integrantes do grande grupo de pesquisa do prof. Marcos (NEM/Lab. Genética/CETENE/Lab. Central) que contribuíram de diversas maneiras com a minha formação, e que seria um risco citá-los um por um, porque poderia cometer a injustiça de esquecer alguém.
- ✓ Aos meus pais Eliane e Manoel por sempre terem estimulado a mim e meus irmãos, a seguir o caminho do conhecimento por meio da educação.
- ✓ Ao meu irmão e amigo Rodolfo pelos nossos encontros e discussões inteligentes que nos encoraja a viver a vida de maneiras plena e satisfatória.
- ✓ Em especial a Suzana Pedroza pelo amor, força, lealdade, amizade e por ter compartilhado vários momentos na evolução deste trabalho, como aqueles de felicidade quando o experimento dava certo; e por compreender momentos em que a deixei sozinha, enquanto eu passava as madrugadas lendo artigos e escrevendo esta tese.
- ✓ E a FACEPE por conceder a bolsa para o desenvolvimento deste trabalho.

“O diamante é apenas um pedaço de carvão que lidou com o estresse excepcionalmente bem!”

Autor desconhecido

RESUMO

Células de *S. cerevisiae* são submetidas a diferentes tipos de estresse durante o processo fermentativo para a produção de álcool combustível. No Brasil, este processo ocorre com ciclos celulares intercalados por etapas de pré-fermentação que inclui, entre outros procedimentos, o tratamento com ácido sulfúrico diluído para controle da população bacteriana. Este tratamento conduz a perda da viabilidade celular, com consequências no rendimento fermentativo. Considerando estes fatos, o presente trabalho tem o propósito de identificar a resposta genética e metabólica de *S. cerevisiae* ao estresse ácido, e revelar os mecanismos que conduzem a tolerância e adaptação celular. Foi realizada a triagem de mutantes com deleções crescendo em meio com pH neutro e ácido, onde foram comparados com a linhagem selvagem, assim como também foi avaliada a expressão gênica global e específica para genes envolvidos em diferentes vias metabólicas. Os resultados mostraram que a via de Integridade da Parede Celular é o principal mecanismo responsável pela tolerância celular ao pH ácido, onde este dano ativa a via da proteína quinase C (PKC) principalmente pelo sensor de membrana Wsc1p. Adicionalmente, danos a parede celular podem mimetizar o efeito do choque hiperosmótico e ativar a via HOG, a qual amplifica o sinal da via PKC e induz a ativação dos canais de Ca^{2+} pelo aumento da expressão do gene *SLT2*, promovendo o influxo de cálcio que ativará a calcineurina. Juntos, estes mecanismos conduzem a mudanças na expressão de genes envolvidos com a regeneração da parede celular, metabolismo de carboidratos, resposta a feromônios e regulação do ciclo celular.

Palavras-chave: fermentação alcoólica; ácido sulfúrico; estresse; CWI; HOG.

ABSTRACT

S. cerevisiae cells are subjected to different sorts of stress during the fermentation process for the fuel alcohol production. In Brazil, this process occurs using cell recyclings interspersed with steps of pre-fermentation which includes, among other procedures, treatment with dilute sulfuric acid to control of the bacterial population. This treatment leads to loss of cell viability, with consequences on yield fermentation. Considering these facts, the present study aims to identify the genetic and metabolic response of *S. cerevisiae* during acid stress, and reveal the mechanisms leading to tolerance and cellular adaptation. Screening was performed with deletion mutants grown in media with neutral and acid pH, which were compared with the wild strain, as well as also was evaluated the global and specific gene expression to genes involved in different metabolic pathway. The results showed that the Cell Wall Integrity pathway is the main mechanism responsible for cellular tolerance to acid pH, where the damage activates the protein kinase C (PKC) mainly by Wsc1p membrane sensor. In addition, cell wall injury might mimic the effects of high osmotic shock and activates the HOG pathway, which amplifies the signal in the upper part of PKC pathway and leads to the activation of Ca^{2+} channels by *SLT2* overexpression and this Ca^{2+} influx further activates calcineurin. Together, these mechanisms induce the expression of genes involved in cell wall regeneration, mating, carbohydrate metabolism and cell cycle regulation.

Key words: ethanol fermentation; sulfuric acid; stress; CWI; HOG.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Modelo para regulação da via PKA e alguns dos seus alvos	20
Figura 2. Regulação da resposta a estresse por PKA.....	21
Figura 3. Tpk's ativas podem fosforilar Msn2/4p e Rim15p	22
Figura 4. Nomenclatura das proteínas que compõem uma via MAPK	24
Figura 5. Rede de interações em <i>S. cerevisiae</i> entre Cdc14p, Net1p e Sir2p.....	25
Figura 6. Sinal de transdução em leveduras que contem o módulo de MAPK.....	26
Figura 7. Organização molecular da parede celular de <i>S. cerevisiae</i>	28
Figura 8. Via de sinalização CWI	30
Figura 9. Programa transcricional da via CWI	34
Figura 10. Ativação coordenada do sinal <i>cwi</i> , o sinal de Ca^{2+} , e Skn7p para induzir a expressão do gene FKS2	36
Figura 11. Modelo de ação da via HOG	37
Figura 12. Proposta de mecanismo de resposta a estresse osmótico em <i>S. cerevisiae</i>	38
Figura 13. Modelo de como <i>S. cerevisiae</i> responde aos efeitos inibitórios dos ácidos orgânicos	40
Figura 14. Proposta do mecanismo de resposta celular de <i>S. cerevisiae</i> a condições de baixo pH	43
Figura 15. Genes diferencialmente expressos comuns e específicos para cada um dos mutantes <i>hog1Δ</i> e <i>slt2Δ</i> , após tratamento com ácido sulfúrico	55
Figura 16. Rede de interações entre a proteína quinase <i>slt2p</i> e componentes da via da proteína quinase a (<i>pka</i>).....	56
Figura 17. Associações entre as proteínas quinases <i>hog1p</i> , <i>slt2p</i> e <i>kdx1p</i> (<i>ykl161c</i>) e os fatores de transcrição de resposta geral a estresse <i>msn2/4</i>	56
Figura 18. Modelo de mecanismo de resposta ao estresse com ácido sulfúrico em <i>S. cerevisiae</i>	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Macromoléculas da parede celular de <i>S.cerevisiae</i>	27
Tabela 2. Genes testados nas linhagens mutantes derivadas de <i>S. cerevisiae</i> by4741 submetidas a ensaios de crescimento em ácido para análise da expressão gênica por microarray	49
Tabela 3. Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante <i>hog1Δ</i> após estresse EM meio com ácido sulfúrico	52
Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante <i>slt2Δ</i> após estresse em meio com ácido sulfúrico	53

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AMP	Adenosine Monophosphate (Adenosina Monofosfato)
cAMP	Cyclic Adenosine Monophosphate (Adenosina Monofosfato Cíclica)
CWI	Cell Wall Integrity (Integridade da Parede Celular)
CWP	Cell Wall Proteins (Proteínas da Parede Celular)
ESR	Envirnmental Stress Response (Resposta a Estresse Ambiental)
GAP	GTPase-Activating Protein (Proteína Ativadora de GTPase)
GEF	Guanine Nucleotide Exchange Factor (Fator Trocador de Nucleotídeo Guanina)
HOG	Alta Osmolaridade Glicerol
HSP	Heat Shock Protein (Proteína de Choque Térmico)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase (Proteína Quinase Mitogênica Ativada)
MAPKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
PKA	Protein Kinase A (Proteína Quinase A)
PKC	Protein kinase C (Proteína Quinase C)
STRE	Stress Response Element (Elemento de Resposta a Estresse)

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão da literatura	14
2.1 Resposta da Levedura a Estímulos Ambientais	14
2.2 Como as Leveduras Combatem o Estresse.....	15
2.2.1 Resposta Geral a Estresse.....	15
2.2.2 A via PKA e a Resposta a Estresse	18
2.2.3 O Sinal via Map quinases.....	22
2.2.1 A via da Integridade da Parede Celular	25
2.2.2 A via de Sinalização Hog.....	36
2.3 Resposta Ao Estresse Ácido.....	38
3. Objetivos	44
3.1 Geral	44
3.2 Específicos	44
4. Capítulo I	45
Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> to low pH by inorganic acid	45
5. Capítulo II	46
A função das map quinases Hog1p e Slt2p no controle da expressão gênica de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em resposta ao estresse causado pelo ácido sulfúrico ...	46
5.1 Introdução	46
5.2 Material e Métodos	49
5.3 Resultados	51
5.4 Discussão	57
6. Discussão Geral.....	61
7. Conclusões Gerais	64
8. Referências Bibliográficas.....	65

1. INTRODUÇÃO

O processo fermentativo para a produção de álcool combustível é caracterizado por uma série de condições que induzem a estresse celular em *Saccharomyces cerevisiae*. Inicialmente as células são submetidas ao estresse osmótico quando são misturadas ao caldo de cana contendo de 120 a 140 g de sacarose por litro. Ao longo da fermentação, a concentração de sacarose cai e a de etanol é aumentada. Ao final da fermentação, as células são coletadas para serem reutilizadas. No entanto, antes de serem reutilizadas, em várias destilarias as células são transferidas para um pré-fermentador que recebe água e ácido sulfúrico para o controle da população bacteriana. Isto faz com que o pH do meio fique entre 2 e 2,5, o que causa perda de viabilidade celular e conseqüentemente queda no rendimento fermentativo. Portanto, compreender os processos celulares e genéticos envolvidos na resposta ao estresse ácido deve auxiliar na elaboração de estratégias que conduzam a adaptação celular, contribuindo assim, para aumento no rendimento industrial.

As células de levedura geralmente respondem ao estresse ambiental em três fases: inicialmente, mudanças imediatas na célula ocorrem como consequência direta da exposição ao estresse; em seguida, processos de defesa são disparados; e por fim, as células se adaptam e tornam a crescer. Algumas das respostas fisiológicas e genéticas ao estresse ácido incluem a redução do crescimento, indução da transcrição dos genes de resposta geral a estresse, indução de genes de trealose e glicerol, expressão de genes para HSPs, além da indução de genes de reparo e biossíntese da parede celular. Embora a lavagem com ácido sulfúrico utilizada nas destilarias seja um conhecido fator de estresse, ainda não está claro como esse ácido age e compromete a viabilidade das células de leveduras. Diante deste cenário, nós avaliamos os componentes de diferentes vias metabólicas quanto à resposta e tolerância de células de *S. cerevisiae* ao ácido sulfúrico. Os resultados mostraram que após o tratamento ácido, ocorrem danos na parede celular da levedura, e que é necessária a cooperação entre diferentes vias metabólicas para modulação da expressão gênica que conduzirá ao reparo dos danos, adaptação e sobrevivência celular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESPOSTA DA LEVEDURA A ESTÍMULOS AMBIENTAIS

Todos os tipos de células, mesmo células individuais em organismos multicelulares, possuem a habilidade de responder a variações nas condições ambientais. Tal resposta demanda uma complexa rede de percepção e transdução de sinal que conduz a um ajuste do programa de expressão gênica e metabolismo, para promover adaptação e proliferação celular. Quando as condições ambientais ameaçam a sobrevivência da célula, ou ao menos impedem a adequada sobrevivência, são comumente chamadas de estresse celular (Hohmann e Mager, 2003).

Células de leveduras evoluíram com excepcional habilidade para sobreviver a mudanças súbitas e severas em seu ambiente externo. No meio selvagem, as leveduras freqüentemente lidam com flutuações na temperatura, osmolaridade, pH, presença de radiação e compostos tóxicos, além de longos períodos de carência nutritiva. O crescimento sob esta variedade de condições requer uma manutenção do sistema interno, entretanto, o programa celular necessário para sua manutenção difere para cada desafio do meio externo. Desta forma, quando as condições ambientais mudam abruptamente, a célula deve rapidamente ajustar seu ambiente intracelular para conseguir crescer nas novas condições (Hohmann e Mager, 2003).

Entre as leveduras, linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* destacam-se por serem utilizadas em diversos processos industriais de fermentação, como na produção de vinhos, cerveja e a produção de bioetanol (Carrasco *et al.*, 2001; Cot *et al.*, 2007; Gibson *et al.*, 2007). Neste contexto, as linhagens são expostas a diversos tipos de alterações ambientais que caracterizam estresse, como mudanças de temperatura, acúmulo de etanol ao longo do processo, mudanças nas concentrações dos solutos, espécies reativas de oxigênio e ácidos orgânicos (Cot *et al.*, 2007; Garay-Arroyo *et al.*, 2004; Silva Filho *et al.*, 2005b).

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de bioetanol combustível. Ele é produzido a partir da utilização de células de *S. cerevisiae* na fermentação do caldo de

cana de açúcar ou melaço (Wheals *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2008). No Brasil, e em outros países, o processo de fermentação envolve o reciclo da população de leveduras a fim de reduzir o tempo e o custo de produção. No entanto, uma importante tarefa é manter as células de levedura com viabilidade e alta capacidade fermentativa. Como um processo aberto, a fermentação do mosto é frequentemente contaminada com leveduras selvagens e bactérias (Skinner and Leathers, 2004; Silva-Filho *et al.*, 2005a; Liberal *et al.*, 2007; Schell *et al.*, 2007; Basso *et al.*, 2008; Basilio *et al.*, 2008; Lucena *et al.* 2010). Contaminações por leveduras são raramente tratadas, apesar de alguns biocidas terem sido propostos (Elsztein *et al.*, 2008).

Entretanto, para manter a população bacteriana sob controle, algumas destilarias utilizam grandes quantidades de antibióticos ou tratam a biomassa de levedura com ácido. Este tratamento é realizado ao final da fermentação, onde o mosto é centrifugado e as células são coletadas para serem reutilizadas em nova fermentação. No entanto, antes de se iniciar a nova fermentação, as células de leveduras são transferidas para um pré-fermentador onde são submetidas a uma lavagem com solução de ácido sulfúrico em água, pH 2,0-2,5 por 1-2 h, promovendo a redução da contaminação bacteriana (Wheals *et al.*, 1999; Silva Filho *et al.*, 2005b; Basso *et al.*, 2008). Este procedimento pode comprometer a viabilidade celular e consequentemente provocar uma queda no rendimento fermentativo (Carmelo *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2010), especialmente quando usado em sinergia com outras condições de estresse como altas temperaturas e altas concentrações de etanol (Silva Filho *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2010; Stanley *et al.*, 2010).

2.2 COMO AS LEVEDURAS COMBATEM O ESTRESSE

2.2.1 RESPOSTA GERAL A ESTRESSE

Os fungos vivem em ambientes que variam muito, que vão desde o solo a superfície de plantas, animais ou hospedeiros humanos. Eles também podem habitar ambientes extremos como fontes hidrotermais, excrementos de pássaros, o ártico, ambientes aquáticos, minas de sal ou no caso de líquens, rocha exposta. Cada

ambiente apresenta desafios que devem ser superados para que o fungo sobreviva e cresça, incluindo mudanças osmóticas, estresse oxidativo, choque térmico, mudanças de pH e limitação nutricional. (Fuchs e Mylonakis, 2009).

Entre os fungos, a levedura *S. cerevisiae* também tem se tornado um organismo modelo para o estudo de como as células eucarióticas respondem ao estresse. Além disso, o elevado grau de conservação evolutiva das vias de resposta a estresse entre leveduras e eucariontes mais complexos, indica que as leveduras podem servir como um modelo apropriado para a caracterização da resposta a estresse também em organismos mais complexos. Estas informações sobre resposta a estresse, geradas a partir de organismos modelo, também podem ser utilizadas para desenhar novas estratégias com o objetivo de aumentar a tolerância a estresse em organismos de interesse industrial (Estruch, 2000).

As células geralmente respondem ao estresse em três fases: inicialmente, as mudanças imediatas na célula ocorrem como consequência direta da exposição ao estresse e dano; em seguida, processos de defesa são disparados; e por fim, as células se adaptam e tornam a crescer. A resposta a estresse frequentemente é estudada aplicando-se uma rápida mudança de condição de crescimento das células de levedura, por exemplo, de 25 °C para 42 °C ou meio com baixa concentração de sal para 1M NaCl, seguida da análise de aspectos do comportamento celular como a expressão de genes (Hohmann e Mager, 2003).

Detalhes com relação aos mecanismos que a levedura *S. cerevisiae* usa para se adaptar a novos ambientes tem sido revelados. Células de levedura expostas a moderado estresse desenvolvem tolerância não apenas a altas doses do mesmo estresse, mas também a estresse causado por outros agentes. Este fenômeno, chamado de *cross-protection* (proteção cruzada), sugere que existe um mecanismo comum de integração que sente e responde a diferentes formas de estresse (Lewis *et al.*, 1995; Estruch, 2000; Giannattasio *et al.*, 2005; Yamamoto *et al.*, 2008; Rangel, 2010). Estas observações despertaram para a idéia de que as células de levedura utilizavam um mecanismo geral de proteção celular que é acionado quando as células são expostas ao estímulo estressante. De acordo com este modelo, estudos mostraram que muitos genes chamados “heat shock” (que codificam para proteínas chaperonas –

HSP) foram induzidos não apenas pelo choque térmico, mas também por outras mudanças estressantes no ambiente, sugerindo que estes genes possuíam um papel mais geral na célula em resposta a estresse (Sanchez *et al.*, 1992; Lewis *et al.*, 1995; Yamamoto *et al.*, 2007; Stanley *et al.*, 2010). Neste contexto, a idéia de uma *resposta geral a estresse* surge como um sistema que regula a indução coordenada de muitos genes de estresse por meio de um elemento *cis* comum em seus promotores, conhecidos como *elementos de resposta a estresse* (STRE - *estresse response element*) (Estruch, 2000).

Dois fatores de transcrição codificados pelos genes *MSN2* e *MSN4*, regulam a resposta geral a estresse em *S. cerevisiae* (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt *et al.*, 1996). Msn2p e Msn4p regulam a expressão de aproximadamente 200 genes em resposta a vários estresses, incluindo choque térmico, choque osmótico, estresse oxidativo, baixo pH, falta de glicose, ácido sórbico e altas concentrações de etanol. Estes fatores de transcrição atuam ligando-se nos elementos STRE, 5' – CCCCT – 3', localizados nos promotores destes genes (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001). Uma simples cópia deste elemento é suficiente na indução de um gene repórter por diferentes tipos de estresse, e duas ou mais cópias desta sequência promove um aumento da indução dos genes. O STRE é funcional em ambas as direções (CCCCT ou AGGGG) e a expressão induzida por estresse conferida por STRE é negativamente regulada pela via cAMP-PKA (Kobayashi *et al.*, 1993; Marchler *et al.*, 1993).

Vários genes possuem a sequência de STRE em seus promotores, provavelmente sendo regulados pela via de resposta geral a estresse (Treger *et al.*, 1998a; Moskvina *et al.*, 1998). Fazem parte dessa lista genes envolvidos no metabolismo de carbono, transportadores, proteases e genes com funções de proteção a diferentes tipos de estresse, incluindo *HSP104* (choque térmico e etanol), *CTT1* (estresse oxidativo) e os genes do metabolismo de trealose *TPS1*, *TPS2*, *TPS3* e *TSL1* (Treger *et al.*, 1998b, Moskvina *et al.*, 1998, Boy-Marcotte *et al.*, 1998)

Msn2p e Msn4p são em grande parte, mas não completamente, funcionalmente redundantes e existem evidências de que a contribuição regulatória individual destes fatores de transcrição difere para específicos genes e sob específicas

condições de estresse (Estruch *et al.*, 1993). As duas proteínas compartilham 41% de identidade e possuem tamanhos e composição de aminoácidos semelhantes (Estruch, 2000). Enquanto uma única deleção de *MSN2* ou *MSN4* na levedura não apresenta fenótipo óbvio, o duplo mutante *msn2Δmsn4Δ* é hipersensível a falta de fonte de carbono, choque térmico, choque osmótico e estresse oxidativo. Por outro lado, a super expressão dos genes *MSN2* e *MSN4* diminui a sensibilidade a falta de carbono e estresse térmico (Estruch *et al.*, 1993; Estruch, 2000). Em sua parte N-terminal, Msn2/4p possuem um domínio ativador de transcrição e uma sequência de exportação nuclear (Görner *et al.*, 2002; Boy-Marcotte *et al.*, 2006). Na porção C-terminal, ambas as proteínas possuem um domínio de ligação zinc-finger que reconhece o elemento STRE (Martínez-Pastor *et al.*, 1996; Schmitt *et al.*, 1996).

Sob condições não estressantes, Msn2p e Msn4p se localizam no citoplasma (Görner *et al.*, 1998), enquanto diante do estresse, Msn2/4p são hiperfosforiladas, deslocando-se para o núcleo (Görner *et al.*, 1998; Garreau *et al.*, 2000; Jacquet *et al.*, 2003). A exportação de Msn2p do núcleo parece ser dependente da exportina Msn5p e a localização nuclear tanto na importação quanto na exportação é regulada por PKA (Görner *et al.*, 1998; Görner *et al.*, 2002; Jacquet *et al.*, 2003).

2.2.2 A VIA PKA E A RESPOSTA A ESTRESSE

A idéia de que poderia existir um grupo de genes ativados por uma via comum em resposta a diferentes condições de estresse, foi reforçado pela descoberta de que muitos genes induzidos nessas condições são negativamente regulados pela via da proteína quinase A (PKA) (Estruch, 2000). A via PKA está envolvida em muitos processos celulares em leveduras, incluindo percepção de nutrientes, regulação da propagação celular, estoque de carbono e resposta a estresse (Ruis e Schüller, 1995; Thevelein, 1994; Santangelo, 2006).

Os componentes da via PKA têm sido estudados amplamente (Figura 1). A via é ativada pelo aumento nos níveis de cAMP (AMP cíclico) intracelular. A enzima adenilato ciclase, codificada pelo gene *CYR1/CDC35*, é responsável pela conversão de ATP em cAMP. Ela pode ser ativada por Ras1p e Ras2p ou pelo sistema receptor acoplado a

proteína G, Gpr1p-Gpa2p após estímulo com glicose (Thevelein e de Winde, 1999; Santangelo, 2006; Zaman *et al.*, 2008). A adenilato ciclase em atividade produzirá cAMP, que ativará a proteína quinase A (PKA). Esta ativação ocorre com a ligação do cAMP na subunidade regulatória da PKA, que é codificada pelo gene *BCY1*. Após ligação do cAMP em Bcy1p, ocorre a dissociação da subunidade catalítica codificada pelos genes *TPK1*, *TPK2* e *TPK3* (Thevelein e de Winde, 1999; Santangelo, 2006), onde cada produto destes genes poderá fosforilar diferentes proteínas alvo, ou em alguns casos, fosforilam as mesmas proteínas (Ptacek *et al.*, 2005). Uma vez ativada, a via PKA promove mudanças em muitos sistemas, incluindo metabolismo de trealose, glicogênio, glicólise e gliconeogênese, os quais possuem componentes controlados pela via PKA por meio de fosforilação (Thevelein, 1994).

As proteínas Ras são GTPases monoméricas que funcionam como uma chave. Elas também são chamadas proteínas G, e permanecem na forma inativa quando ligadas a GDP e na forma ativa quando ligadas a GTP. A chave da forma ativa para a inativa envolve a hidrólise da ligação GTP pela atividade intrínseca GTPase da proteína Ras, que é estimulada pelas proteínas ativadoras de GTPase (GTPase-activating proteins - GAPs). A chave reversa, inativa para ativa, requer a substituição da ligação GDP por GTP, a qual é normalmente efetuada com o auxílio de uma proteína trocadora de nucleotídeo guanina (guanine nucleotide exchange factors - GEFs) (Santangelo, 2006). Mutações que ativam proteínas Ras (como em humanos *ras*^{val12} ou em leveduras *ras*^{val19}) aumentam a associação de GTP independente de uma GEF, sendo este tipo de mutação responsável por muitos tipos de cânceres em humanos (Wilson *et al.*, 1993; Dalley e Cannon, 1996). Os polipeptídeos codificados pelos dois genes RAS em *S. cerevisiae*, *RAS1* (309 resíduos) e *RAS2* (322 resíduos), possuem mais de 70% de similaridade em toda sequência, principalmente nos 180 resíduos da parte N-terminal (Powers *et al.*, 1984). Adicionalmente, as proteínas Ras de *S. cerevisiae* também possuem homologia com o oncogene RAS de mamíferos (Kataoka *et al.*, 1984). O crescimento em glicose não é alterado na ausência de *RAS1* ou *RAS2*, entretanto, perda de ambos causa suspensão do ciclo celular em G1 (Tatchell *et al.*, 1984; Toda *et al.*, 1985).

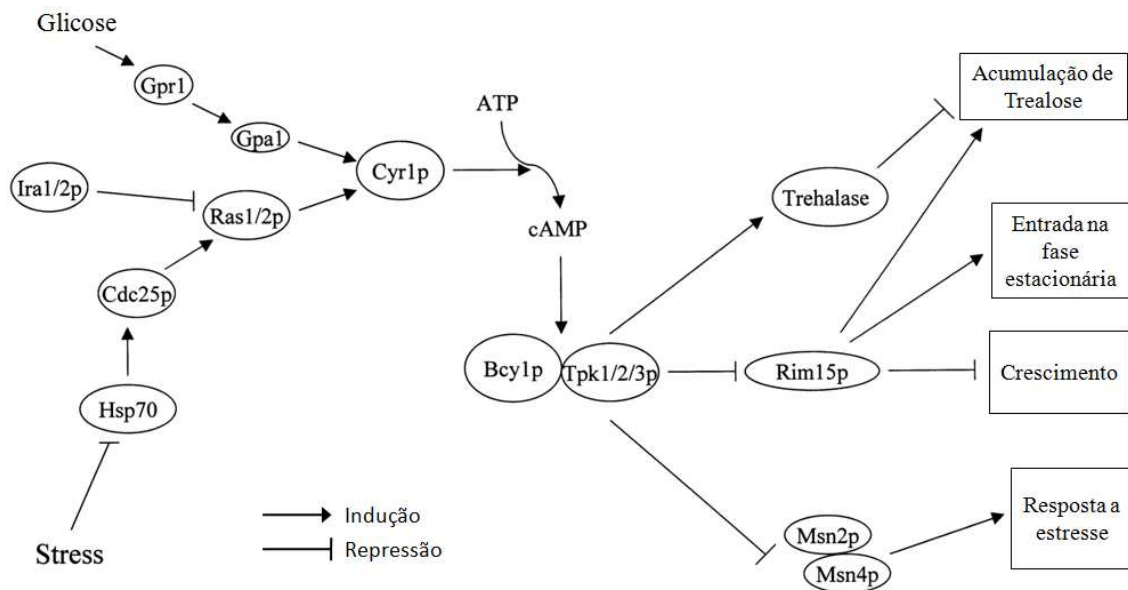


Figura 1. Modelo para regulação da via PKA e alguns dos seus alvos. Um sistema receptor acoplado a proteína G está envolvido na ativação da síntese de cAMP por glicose. O aumento na concentração de proteínas desnaturadas em resposta a condições de estresse convoca Hsps, reduzindo a interação com Cdc25p, e portanto, diminuindo a produção de cAMP. Regulação negativa de PKA por estresse ou por falta de glicose ativa a quinase Rim15p e induz a localização de Msn2/4p no núcleo resultando em suspensão do crescimento, acumulação de trealose e ativação de mecanismos de proteção. As interações não são necessariamente diretas. A proteína quinase A (PKA) é representada pelas subunidades Tpk1p, Tpk2p e Tpk3p. (Adaptado de Estruch, 2000).

As proteínas Ras1/2p são ativadas pelas proteínas GEFs Cdc25p e Sdc25p. Ras1/2p ativas induzem a ativação da enzima adenilato ciclase, codificada pelo gene *CYR1*, promovendo a conversão de ATP em cAMP (Matsumoto *et al.*, 1982). A Inativação de Ras1/2p é realizada pelas GAPs Ira1p e Ira2p, e isso resulta em na diminuição dos níveis celulares de cAMP (Tanaka *et al.*, 1990). Presumivelmente, devido a seus efeitos competidores na ativação de Ras1/2p, deleção do gene *IRA1* restaura a letalidade causada pela deleção do gene *CDC25* (Tanaka *et al.*, 1989). Fosfodiesterases de baixa e alta afinidade por cAMP em *S. cerevisiae* (Pde1p e Pde2p respectivamente) também antagonizam o sinal de Ras1/2p por meio da conversão enzimática de cAMP em AMP. Na presença de cAMP exógeno, deleção de *PDE2*, restaura o crescimento do duplo mutante *ras1Δras2Δ* (Nikawa *et al.*, 1987; Wilson e Tatchell, 1988).

Em células privadas de fontes de carbono, quando são suplementadas com glicose, um pico nos níveis intracelular de cAMP disparam a atividade da PKA (Mazon

et al., 1982; Francois *et al.*, 1988; Jiang *et al.*, 1998), promovendo o retorno do crescimento celular com o aumento na expressão de genes envolvidos na síntese protéica e a diminuição na expressão de genes alvo dos fatores de transcrição Msn2/4p (Figura 2) (Marchler *et al.*, 1993; Klein e Struhl, 1994; Görner *et al.*, 1998; Thevelein e de Winde, 1999; Norbeck e Blomberg, 2000). Estas observações sugerem que a atividade da PKA reprime a resposta a estresse diante de abundância de nutrientes, estimulando o crescimento celular. O efeito negativo do sinal da PKA na resposta a estresse é evidenciado pelo fato de que altos níveis intracelulares de cAMP artificial podem reprimir a resposta a estresse, mesmo na presença do estresse ambiental (Klein e Struhl, 1994; Neuman-Silberberg *et al.*, 1995; Görner *et al.*, 1998; Garreau *et al.*, 2000).

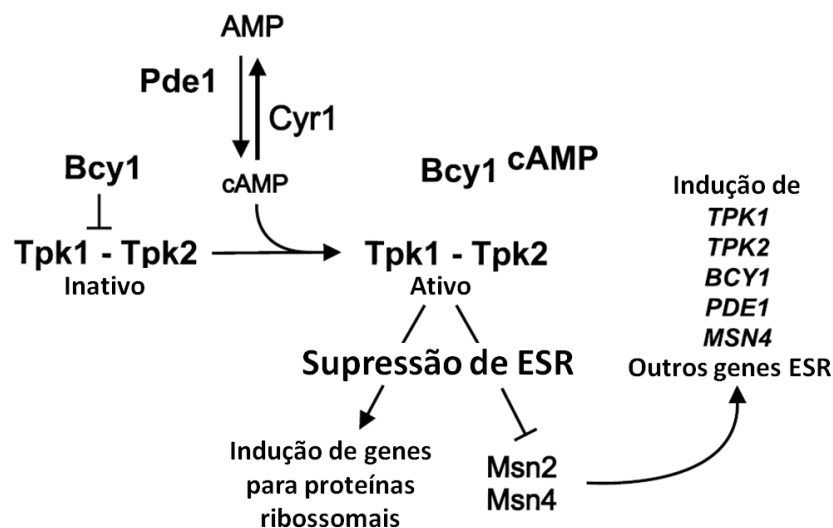


Figura 2. Regulação da resposta a estresse por PKA. Em resposta ao aumento nos níveis de cAMP, o repressor do sinal da via PKA (Bcy1p) se liga ao cAMP liberando o complexo ativo, que é composto por duas das três subunidades de PKA (Tpk1p, Tpk2p e Tpk3p). A atividade de PKA reprime a resposta ao estresse ambiental (Environmental Stress Response - ESR) pela indução de genes de síntese protéica, conduzindo a localização citoplasmática de Msn2/4p e diminuindo a expressão de outros alvos. Em contraste, após mudanças estressantes no ambiente, a iniciação da ESR conduz a localização nuclear de Msn2/4p e também a indução de seus genes alvos, incluindo genes que interferem no sinal da via PKA (Adaptado de Hohmann e Mager, 2003).

Interessantemente, a atividade da PKA é dispensável em linhagem deficiente na atividade de Msn2p e Msn4p. Desta maneira, Msn2p e Msn4p são antagônicos ao crescimento dependente de PKA e estimulam a expressão de genes que inibem o crescimento (Smith *et al.*, 1998). De acordo com estas observações, a função de

Msn2/4p é requerida para a expressão do gene *YAK1*, que codifica para uma quinase, e é antagonista do crescimento dependente de PKA (Smith *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 2008; Zaman *et al.*, 2008; Livas *et al.*, 2011) (Figura 3). A expressão gênica dependente de Msn2/4p também pode influenciar na maioria dos efeitos pleiotrópicos da PKA em leveduras, incluindo regulação do crescimento, resposta a estresse e acúmulo de carboidratos de reserva (Smith *et al.*, 1998).

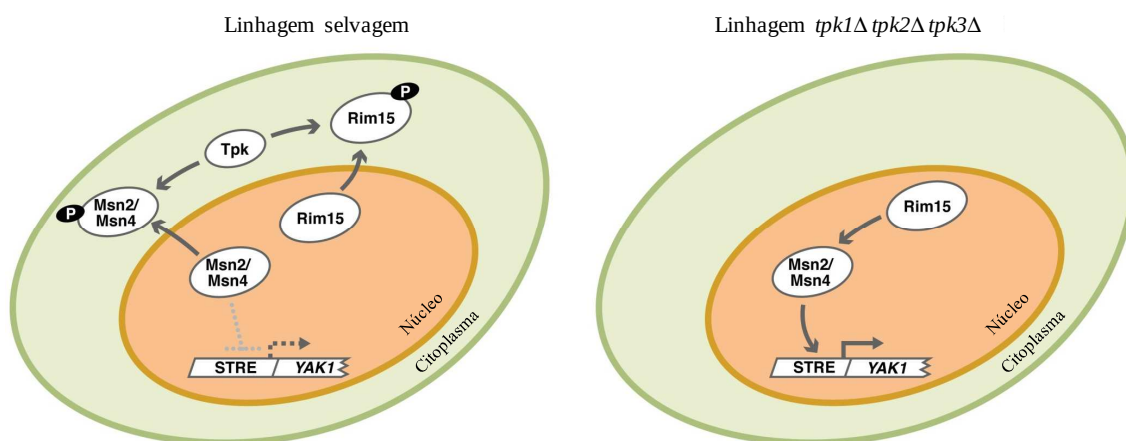


Figura 3. Tpk's ativas podem fosforilar Msn2/4p e Rim15p resultando em suas exportações para o citoplasma, assim como reduzindo a transcrição do gene *YAK1*, permitindo o crescimento celular. Na ausência de Tpk's, Rim15p e Msn2/4p não são fosforilados e permanecem no núcleo, em uma forma ativa ou potencialmente ativa. Rim15 ativa Msn2/4, que por sua vez ativa a transcrição de *YAK1*, e Yak1p bloqueia o crescimento celular (Adaptado de Livas *et al.*, 2011).

2.2.3 O SINAL VIA MAP QUINASES

Uma questão chave na biologia do desenvolvimento é como as células percebem e respondem apropriadamente a estímulos em seu ambiente. As células não devem apenas sentir e distinguir entre os estímulos, mas também realizar a transdução precisa do sinal para responder apropriadamente (Schwartz e Madhani, 2004). Um dispositivo molecular frequentemente utilizado para condução destas respostas é a sequência de três proteínas quinases conhecida como módulo: mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Chen e Thorner, 2007).

O eixo de cada via MAP quinase é uma série de três proteínas quinases, uma MAP quinase (MAPK), uma MAP quinase quinase (MAPKK ou MEK), e uma MAP

quinase quinase quinase (MAPKKK ou MEKK) (Figura 4). A MAPKKK ativa a MAPKK transferindo um grupo fosfato nos resíduos de serina e treonina dentro da região N-terminal conservada do domínio quinase. Em seguida, a MAPKK fosforila a MAPK nos resíduos de treonina (às vezes serina) e tirosina, que estão localizados adjacentes e separados por um outro aminoácido (Thr/Ser-X-Tyr) (Gustin *et al.*, 1998; Hohmann, 2002; Saito, 2010). Este sítio de fosforilação está localizado no laço de ativação do domínio catalítico, sendo necessária dupla fosforilação na treonina e tirosina para ativação da MAP quinase. Tipicamente, a fosforilação estimula a transferência da MAP quinase do citoplasma para o núcleo, onde ela irá fosforilar seus alvos nos resíduos serina/treonina seguidos por uma prolina. Entretanto uma porção de MAP quinases ativas permanecerá presente no citoplasma para mediar efeitos pós traducionais (Hohmann, 2002).

As MAPKKKs consistem de um domínio regulatório N-terminal e um domínio catalítico C-terminal. No estado inativo, o domínio regulatório bloqueia o domínio quinase C-terminal. A Ativação pode ocorrer pela fosforilação por meio de uma proteína quinase acima da cascata ou através da interação com outras proteínas, um processo que frequentemente envolve uma pequena proteína G. Os mecanismos de ativação e sistema de sensores acima da via MAP quinase são diversos: incluindo receptor tirosina-quinase (em sistemas animais), receptores acoplados a proteínas G, sistema dois componentes de transdução de sinal, entre outros (Hohmann, 2002). As MAP quinases são reguladas negativamente por proteínas fosfatases atuando em ambas as MAPKK e MAPK (serina-treonina fosfatases) ou apenas na MAPK (tyrosina fosfatases) (Keyse 2000).

Diferentes vias MAP quinases podem formar um sistema de interações de sinais. Uma MAPKK pode controlar diferentes MAP quinases, como é observado mesmo em sistemas relativamente simples como em leveduras.

Diferentes vias dentro do mesmo organismo frequentemente dividem quinases, especialmente em eucariontes mais complexos. No entanto, mesmo em *S. cerevisiae*, esta situação resulta em um sistema de redes altamente complexo de vias de sinalização (Hohmann, 2002; Schwartz e Madhani, 2004). Essa complexidade é mostrada no trabalho de Breitkreutz *et al.*, (2010), onde eles identificaram 1844

interações entre 887 proteínas quinases e fosfatases (KPI) em *S. cerevisiae*, utilizando espectrometria de massa de complexos protéicos (Figura 5).

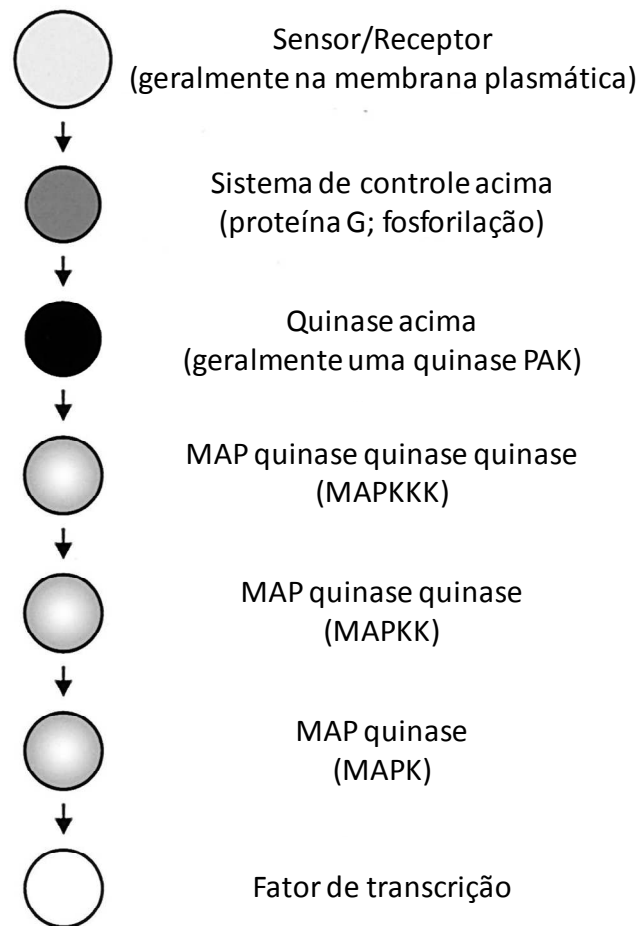


Figura 4. Nomenclatura das proteínas que compõem uma via MAPK. Setas indicam o fluxo da informação (Adaptado de Hohmann, 2002).

As cascatas de MAPK foram encontradas em animais (Cooper, 1994; Marshall, 1994), plantas (Hirt, 1997) e fungos (Errede *et al.*, 1995; Herskowitz, 1995). A levedura *S. cerevisiae* possui pelo menos cinco vias contendo cascatas de MAPKs: a via da integridade da parede celular, a via de formação de esporos, via de crescimento filamentosso/invasivo, via de resposta a feromônio e a via de alta osmolaridade glicérol – HOG (Figura 6) (Saito e Tatebayashi, 2004).

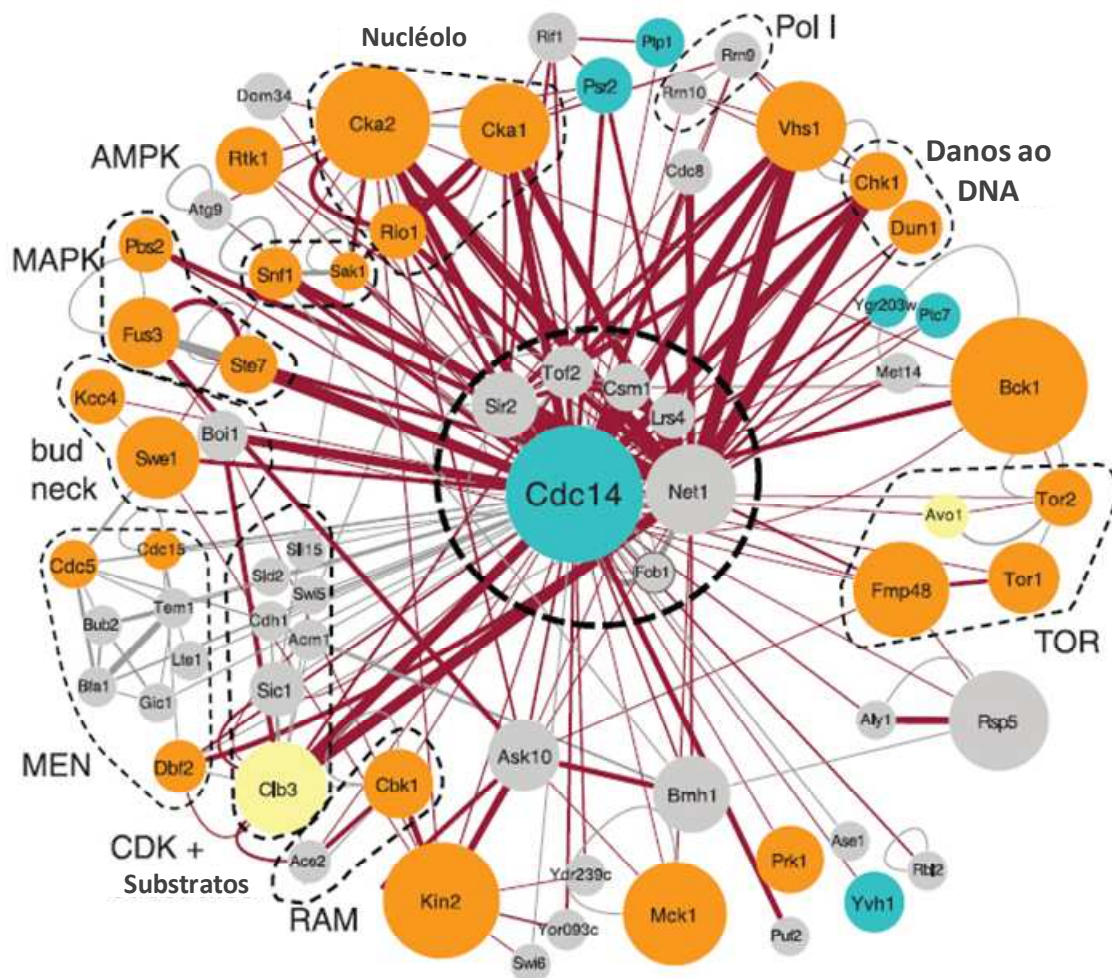


Figura 5. Rede de interações em *S. cerevisiae* entre Cdc14p (fosfatase essencial para saída da mitose e progressão da meiose), Net1p (núcleo do complexo envolvido no silenciamento nucleolar) e Sir2p (envolvida no silenciamento da cromatina e envelhecimento celular). Estas proteínas formam o complexo RENT (regulator of nucleolar silencing and telophase) importante no silenciamento do rDNA (Kasulke *et al.*, 2002). Quinases estão em laranja, fosfatases em azul, proteínas associadas a quinases em amarelo, e outras proteínas em cinza. Linhas de conexão vermelhas indicam interações KPI (quinases/fosfatases), linhas cinza são interações LTP (low-throughput), e linhas cinza tracejadas correspondem a interações HTP-HC (high-throughput – high-confidence). A espessura da linha indica o número de peptídeos interagindo. O Tamanho do nó é proporcional ao número total de interações KPI do conjunto de dados. Círculos tracejados em negrito correspondem ao complexo RENT e a proteínas associadas conhecidas (adaptado de Breitkreutz *et al.*, 2010).

2.2.1 A VIA DA INTEGRIDADE DA PAREDE CELULAR

A exposição de células de fungos a vários tipos de condições de estresse resulta em alterações na expressão gênica que habilitam a célula a resistir à ambientes adversos. Mudanças na expressão gênica requerem um coordenado esforço de múltiplas vias em sequência para permitir que uma quantidade adequada de proteínas

realize a tarefa de manter a célula sobrevivendo em condições não favoráveis. A chave da defesa para se impor a ambientes adversos é a parede celular. Devido a danos causados pelos fatores de estresse, a parede celular é reparada ou mesmo reforçada por meio da biossíntese e da integração de componentes da parede celular (Fuchs e Mylonakis, 2009).

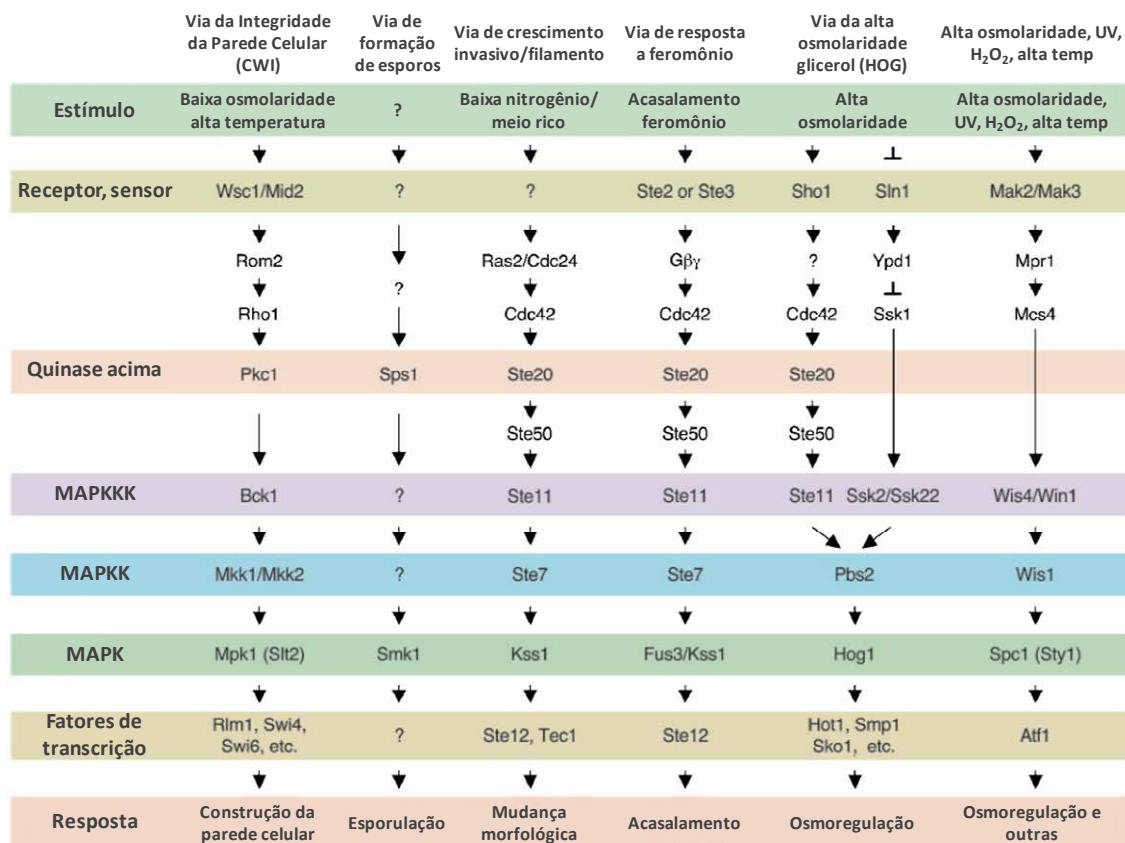


Figura 6. Sinal de transdução em leveduras que contêm o módulo de MAPK. A levedura *S. cerevisiae* possui pelo menos cinco vias contendo cascatas de MAPK. Muitas vias dividem os mesmos componentes. A via Spc1 da levedura de fissão *S. pombe*, possui muitas similaridades com a via HOG de *S. cerevisiae* (adaptado de Saito e Tatebayashi, 2004).

A parede celular de leveduras possui quatro principais funções: estabiliza as condições osmóticas internas; protege contra danos físicos; mantém a forma da célula, precondição para a morfogênese durante crescimento por pseudohifa ou acasalamento; e atua como estrutura de suporte para proteínas, limitando a permeabilidade da parede (Klis *et al.*, 2006). *Saccharomyces cerevisiae* gasta uma quantidade considerável de energia metabólica na construção da parede celular. Dependendo das condições de crescimento, sua massa em termos de peso seco pode

somar em torno de 10 – 25% da massa total da célula (Aguilar-Uscanga e François, 2003).

A parede celular de *S. cerevisiae* é composta de β 1,3-glucano, β 1,6-glucano, quitina e manoproteínas. A Tabela 1 mostra a composição da parede celular e a Figura 7 mostra a organização molecular dos componentes. As cadeias de β 1,3-glucano constituem uma estrutura tridimensional elástica que, junto com a quitina, contribuem para a forma da célula e sua resistência física. As moléculas de β 1,3-glucano possuem múltiplos ramos laterais, os quais podem funcionar como locais de fixação para quitina e cadeias β 1,6-glucano. As moléculas de β 1,6-glucano interligam uma grande classe de proteínas ligadas covalentemente à parede celular (Cell wall Proteins - CWPs), as glicosilfosfatidilinositol (GPI)-CWPs, a estrutura de β 1,3-glucano (Kollár *et al.*, 1997; Kapteyn *et al.*, 1999a). Outro grupo menos abundante de CWPs covalentemente ligadas, conhecidas como Pir-CWPs, estão ligadas a β 1,3-glucano sem uma interligação com a cadeia de β 1,6-glucano (Kapteyn *et al.*, 1999b), e podem ser liberadas da parede por extração alcalina moderada (Mrsă *et al.*, 1997).

Tabela 1. Macromoléculas da parede celular de *S.cerevisiae*.

Macromolécula	Massa da parede %
Manoproteínas	30 – 50
β 1,6-glucano	5 – 10
β 1,3-glucano	30 – 45
Quitina	1,5 – 6

Os componentes da parede celular estão representados na ordem em que eles se encontram na parede de fora para dentro. Estresse na parede celular pode levar a um aumento considerável nos níveis de quitina (Adaptado de Klis *et al.*, 2006).

Durante o crescimento e morfogênese e em face de mudanças externas que causam estresse na parede celular, *S. cerevisiae* utiliza vias de manutenção para a parede celular. Muitas vias de sinalização contribuem para a manutenção da parede celular, e uma das principais responsáveis por orquestrar mudanças em sua estrutura, é conhecida como via da integridade da parede celular ou CWI (cell wall integrity). A

via de sinalização CWI inclui uma família de sensores de superfície acoplados a pequenas proteínas G chamadas Rho1, as quais ativam um conjunto de efetores. Coletivamente estes efetores regulam uma diversidade de processos, incluindo síntese de glucanos no local de remodelagem da parede, expressão de genes relacionados com a biogênese da parede celular, e organização do citoesqueleto de actina (Levin, 2011). A via CWI utiliza proteínas indutoras da atividade GTPase (GAPs) e proteínas trocadoras de nucleotídeo guanil (GEFs) para regular a ativação da cascata de quinases que induz a ativação de fatores de transcrição (Fuchs e Mylonakis, 2009).

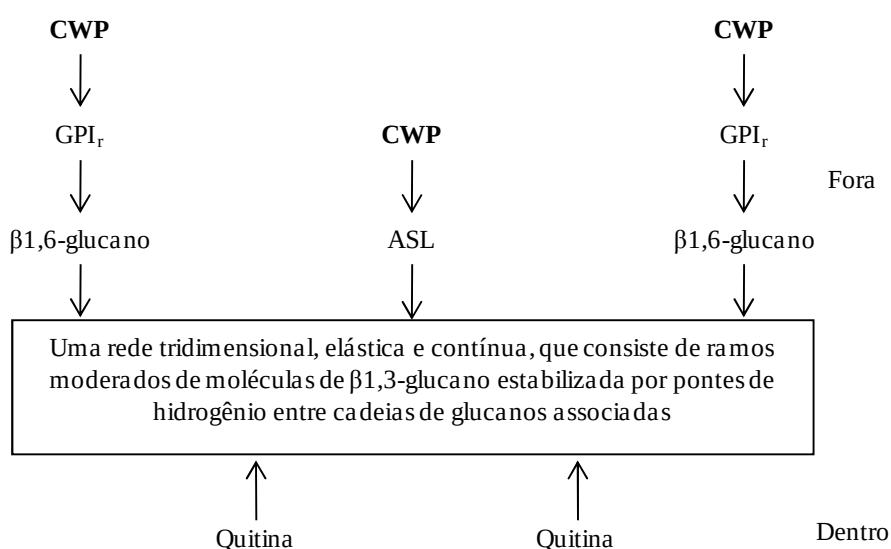


Figura 7. Organização molecular da parede celular de *S. cerevisiae*. As GPI – CWPs formam a maioria das proteínas ligadas covalentemente à parede celular. As ASL – CWPs incluem as Pir – CWPs (Pir1p, Hsp150, Pir3p e Cis3p). GPI_r, resíduo de uma âncora de GPI. ASL, ligação alcalina sensível (Adaptado de Klis *et al.*, 2006).

Em *S. cerevisiae* a cascata se inicia pelos sensores associados à membrana tais como Wsc1p e Mid2p (Verna *et al.*, 1997; Ketela *et al.*, 1999) (Figura 8) Estas proteínas interagem com Rom2p, a qual é GEF para Rho1p (Ozaki *et al.*, 1996; Philip e Levin, 2001). Rho1p induz a mudanças na composição da parede celular através da ativação da glucano sintase Fks1p (Drgonová *et al.*, 1996; Mazur e Baginsky, 1996; Qadota *et al.*, 1996), qual facilita a produção do componente que representa maior quantidade na parede celular, o β1,3-glucano (Douglas *et al.*, 1994). Rho1p também interage e ativa a quinase Pkc1p que regula a cascata (Nonaka *et al.*, 1995; Kamada *et al.*, 1996). Em

seguida, Pkc1 fosforila a quinase Bkc1p (MAPKKK) (Costigan *et al.*, 1992; Lee e Levin, 1992), que por sua vez, transmite o sinal fosforilando um par de quinases redundantes Mkk1p e Mkk2p (MAPKk) (Irie *et al.*, 1993). Estas duas quinases finalmente fosforilam a MAPK Slt2p/Mpk1p (Lee *et al.*, 1993). A ativação de Slt2p induz a fosforilação de fatores de transcrição, incluindo Rlm1p e o complexo formado pelos fatores de transcrição Swi4p e Swi6p, chamado SBF (Swi4-Swi6 cell cycle box binding factor). Ambos os fatores de transcrição irão iniciar a expressão de diversos genes incluindo genes para a síntese da parede celular e regulação do ciclo celular (Watanabe *et al.*, 1995; Dodou e Treisman, 1997; Madden *et al.*, 1997; Jung *et al.*, 2002; Gong e Siede, 2009).

Sensores de Estresse

Os sensores de superfície detectam e transmitem o estado da parede celular para Rho1p. Eles incluem Wsc1p (também chamado de Slg1p) (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998), Wsc2p e Wsc3p (Verna *et al.*, 1997), e Mid2p e Mtl1p (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999). Eles são proteínas transmembranas que residem na membrana celular (Philip e Levin, 2001). Suas estruturas são similares, possuindo um pequeno domínio C-terminal citoplasmático, um domínio transmembrana, e um ectodomínio periplasmático rico em resíduos Ser/Thr. Entre todos os sensores, Wsc1p e Mid2p parecem ser os mais importantes, pois o duplo mutante *wsc1Δmid2Δ* requer suporte osmótico para sobreviver (Rajavel *et al.*, 1999). Deleção de *WSC1* resulta em lise celular a elevadas temperaturas (de 37 para 39 °C), um fenótipo que é intensificado pela perda de *WSC2* e *WSC3*, e suprimido pela super expressão de *RHO1*, *ROM2* ou *PKC1* (Gray *et al.*, 1997; Verna *et al.*, 1997; Jacoby *et al.*, 1998). O gene *MID2* foi isolado inicialmente como supressor do defeito de crescimento associado com a super expressão da proteína quinase dependente de cAMP, TPK1 (Daniel, 1993). Super expressão de *WSC1* elimina o fenótipo de morte induzida por feromônio associado com *mid2Δ* e super expressão de *MID2* suprime o fenótipo de sensibilidade do mutante *wsc1Δ*, indicando uma sobreposição nos papéis destes sensores no sinal CWI (Ketela *et al.*, 1999; Rajavel *et al.*, 1999).

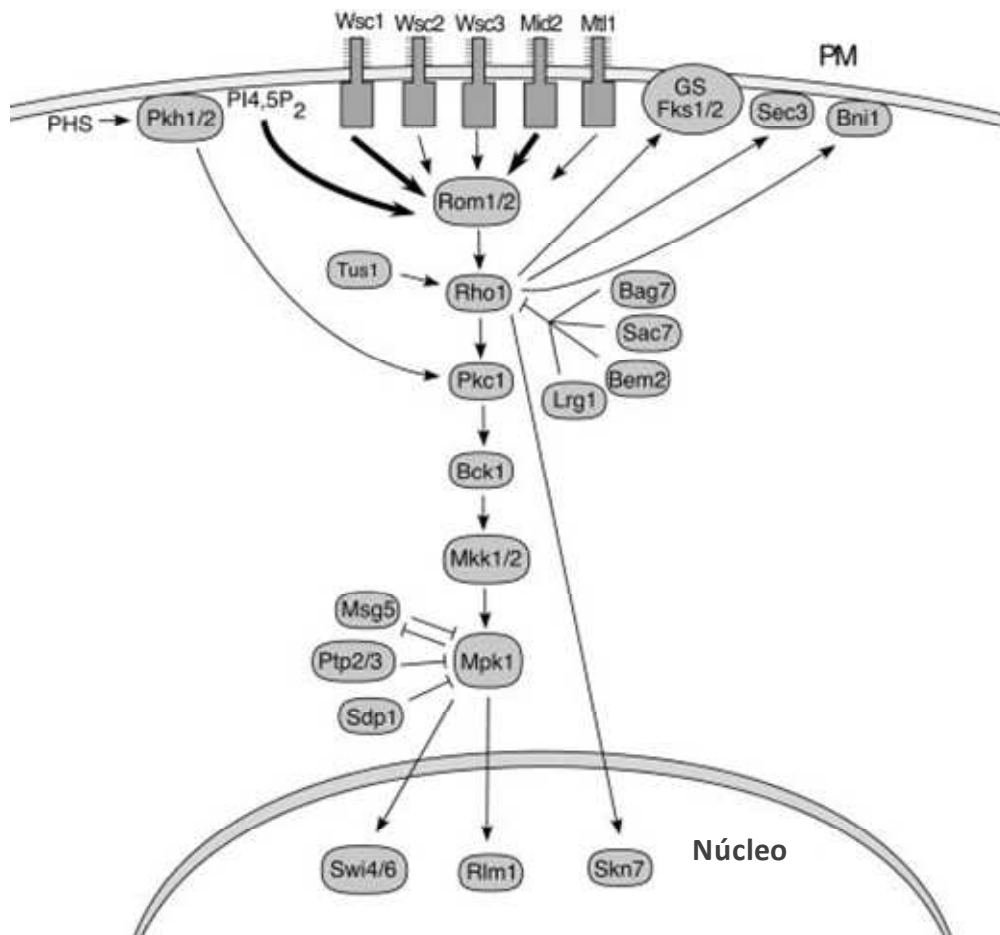


Figura 8. Via de sinalização CWI. Os sinais se iniciam na membrana plasmática (PM) através dos sensores de superfície Wsc1p, Wsc2p e Wsc3p, Mid2 e Mtl1. O domínio extracelular destas proteínas são altamente manosilados. Juntos com PI4,5P₂, no qual recruta Rom1/2p GEFs para a membrana plasmática, os sensores induzem a troca de GDP por GTP em Rho1p. A Participação relativa a entrada do sinal para cada sensor, é indicada pela espessura das setas. Rho1p ativa cinco efetores, incluindo a MAP quinase Pkc1, a β1,3-glucano sintase (GS), a Bni1p envolvida na formação de filamentos de actina, o componente da exocitose Sec3p, e o fator de transcrição Skn7p. Também é indicada a GEF (Tus1p) e as GAPs (Bag7, Sac7, Bem2 e Lrg1) de Rho1p. Pkh1/2p estão envolvidas com o sinal de controle de endocitose e são ativas por fitosfingosina (PHS). A cascata MAP quinase, é compreendida por Bck1p, Mkk1/2p e Slt2/Mpk1p. Os fatores de transcrição Rlm1p e o complexo SBF (Swi4p e Swi6p), são alvos da MAPK Slt2/Mpk1p (Adaptado de Levin, 2005).

As GEFs Rom1/2 da via CWI

O domínio N-terminal de Rom2p (e presumivelmente de Rom1p) é que é responsável pela associação com os sensores Wsc1p e Mid2p assim como outros sensores de superfície (Philip e Levin, 2001). Rho1p é estimulado primariamente pela ação de Rom1p e Rom2p (Ozaki *et al.*, 1996). Estes GEFs possuem uma função redundante na ativação de Rho1p (e igualmente em Rho2p). Perda de *ROM2* resulta em crescimento sensível a temperatura, onde perda de *ROM1* e *ROM2* é letal. Assim

como Rho1p, Rom2p (e provavelmente Rom1p) residem em locais de crescimento polarizado (Manning *et al.*, 1997). Rom1p e Rom2p possuem um domínio Dbl homólogo (DH), qual interage com a ligação GDP de Rho1 e possui a atividade de troca de nucleotídeo destas proteínas (Ozaki *et al.*, 1996) Elas também possuem um domínio homólogo (pleckstrin – PH), qual se liga a fosfatidilinositol – 4,5 – bifosfato (PI4,5P2) e são responsáveis por promover a localização de Rom1/2p na membrana plasmática (Audhya e Emr, 2002).

A Proteína G Rho1

Rho1p é considerada o principal regulador do sinal CWI, não apenas porque ela recebe a maior entrada de sinal da superfície da célula, mas também por que ela regula uma variedade de respostas envolvidas na biogênese da parede celular, organização da actina, e secreção polarizada. Ela está localizada em sítios de crescimento polarizado de maneira dependente do citoesqueleto de actina (Qadota *et al.*, 1996; Ayscough *et al.*, 1999; Yan e Lennarz, 2002). Como outras proteínas G, Rho1p apresenta ciclos entre o estado ativo, ligada a GTP, e inativo quando ligada a GDP. Os ciclos de Rho1p são regulados por proteínas trocadoras de nucleotídeo guanosina (GEFs) e por proteínas ativadores de GTPases (GAPs). As GEFs que ativam Rho1p são Rom1p e Rom2p (Ozaki *et al.*, 1996). Entre as 11 GAPs identificadas de Rho1p, as mais estudadas foram Bem2p, Sac7p, Bag7p, e Lrg1p (Peterson *et al.*, 1994; Lorberg *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 2002). Cinco alvos de Rho1p têm sido descritos: a proteína quinase Pkc1p; a β 1,3-glucano sintase (GS) codificada pelos genes *FKS1* e *FKS2/GSC2*; Bni1p e Bnr1p que estão envolvidos com a formação de filamento de actina, brotamento e formação do fuso; o fator de transcrição Skn7; e o componente exócrino Sec3 (Finger e Novick, 1998; Raitt *et al.*, 2000; Pruyne *et al.*, 2004; Levin, 2011).

A proteína quinase C

Células de mamíferos possuem pelo menos 10 isoformas da proteína quinase C (PKC) e duas quinases relacionadas a PKC (Mellor e Parker, 1998). Em contraste, o genoma de *S. cerevisiae* codifica apenas um homólogo da proteína quinase C de mamíferos, chamada de Pkc1 (Levin *et al.*, 1990). Ela foi o primeiro componente da via de sinalização CWI a ser descoberto. Apesar desta proteína quinase provavelmente ter

outros substratos intracelulares, apenas a regulação da cascata Bck1-Mkk1/2-Mpk1 MAP quinase foi bem estudada. Deleção de PKC1 é letal sob condições normais de crescimento, mas a viabilidade do mutante *pkc1Δ* pode ser restaurada por suporte osmótico (Levin *et al.*, 1990; Levin e Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini *et al.*, 1992). Perda do gene PKC1 resulta no mais severo defeito de crescimento do que a perda de qualquer outro membro da cascata de MAP quinase sobre o controle de Pkc1p, sugerindo que Pkc1p regula muitas vias (Lee e Levin, 1992).

Imagens de microscopia eletrônica do mutante *pkc1Δ* crescendo com suporte osmótico sugerem um conjunto de defeitos pleiotrópicos na parede celular (Levin *et al.*, 1994; Roemer *et al.*, 1994). Tanto a camada interna de glucanos quanto a externa de manoproteínas são mais finas no mutante *pkc1Δ*. Estas alterações são evidenciadas pela redução de aproximadamente 30% na composição de β 1,3-glucano e β 1,6-glucano, e de aproximadamente 20% das manoproteínas (Roemer *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994). Adicionalmente, a membrana plasmática de mutantes *pkc1Δ* parece separada da parede celular em alguns pontos (Paravicini *et al.*, 1992; Levin *et al.*, 1994).

Todas as Pkcs possuem um sítio pseudosubstrato, tipicamente posicionado na porção N-terminal (Newton, 1995). Quando Pkc1p não está ativa, o sítio pseudosubstrato inibe a atividade da proteína quinase através de uma interação intramolecular com o sítio ativo. Incapacitação mutacional no sítio pseudosubstrato resulta em atividade quinase independente de cofator. Quando o sítio pseudosubstrato está mutado, surge uma forma constitutiva (Watanabe *et al.*, 1994) que suprime o defeito apresentado no mutante *rho1Δ* (Nonaka *et al.*, 1995). Um estudo de localização intracelular de PKC1 revelou que ela reside em locais de crescimento polarizado (Andrews e Stark, 2000). No início do ciclo celular, Pkc1 foi detectada em um sítio de pré-brotamento e na ponta do broto, um padrão que é muito similar ao de Rho1p (Qadota *et al.*, 1996; Yan e Lennarz, 2002).

Módulo MAP quinase

Pkc1p fosforila Bck1p in vitro em muitos sítios (Ser939, Thr1119, e Ser1134) em uma região de articulação entre seu suposto domínio regulatório e seu domínio

catalítico (Levin *et al.*, 1994). De particular importância é o sítio de fosforilação Thr1119, que quando mutado para prolina resulta no alelo constitutivo BCK1-19 (Lee e Levin, 1992). Mutação no resíduo Thr1119 para Ala, Cys ou Tyr também resulta em sinal constitutivo, sugerindo que o rompimento da interação envolvendo Thr1119 (ou por fosforilação ou mutação) é a chave para a ativação desta MAPKKK (Levin, 2005).

De acordo com estudos de epistasia e interação duplo-híbrido, Bck1p fosforila e ativa Mkk1/2p (Irie *et al.*, 1993; Kamada *et al.*, 1996; Paravicini e Friedli, 1996). Seguindo a cascata, Mkk1/2p fosforila Slt2p nos resíduos vizinhos de tirosina e treonina no motivo T-X-Y que é característico para MAP quinases. Esta MAP quinase também é encontrada em *Candida albicans* e também realiza a mesma função na manutenção da integridade da parede celular (Navarro-García *et al.*, 1998). A perda de função de qualquer proteína quinase abaixo de Pkc1p (ou ambas Mkk1/2p) resulta em lise da célula quando crescendo em elevadas temperaturas. O defeito de crescimento destes mutantes pode ser remediado com suporte osmótico (1M de sorbitol) (Levin, 2005). Interessantemente, Bck1p não foi localizada em sítios de crescimento polarizado. Já Mkk1/2p são proteínas citoplasmáticas, mas assim como Slt2p, elas podem ser detectadas em sítios de polarização de crescimento (van Drogen e Peter, 2002).

A proteína quinase Slt2p reside predominantemente no núcleo sob condições não estressantes, mas rapidamente vai para o citoplasma em resposta a estresse na parede celular (Kamada *et al.*, 1995). Esta proteína também é encontrada em sítios de crescimento polarizado e deslocam-se frequentemente entre estes sítios e o núcleo (van Drogen e Peter 2002). Os fatores de transcrição Rlm1p e SBF são alvos de Slt2p (Watanabe *et al.*, 1995; . Madden *et al.*, 1997; Igual *et al.*, 1996). Muitos genes regulados por Rlm1p codificam proteínas de parede ou enzimas envolvidas na biossíntese da parede (Jung e Levin *et al.*, 1999). SBF é um complexo heterodímero composto de Swi4p e Swi6p, qual regulam a expressão gênica durante a transição G1/S do ciclo celular (Koch e Nasmyth, 1994). Os genes ativados por SBF estão envolvidos com o brotamento e a biossíntese da membrana e parede celulares (Iyer *et al.*, 2001). Foi demonstrado que Slt2p é regulada negativamente pelas fosfatases Ptp2p, Ptp3p,

Msg5p e também Sdp1p que regula Slt2p em condições de estresse (Hahn e Thiele, 2002).

Adicionalmente as proteínas quinases citadas, *S. cerevisiae* possui uma pseudoquinase paráloga a Slt2p, chamada Mlp1p (Kdx1p) (Watanabe *et al.*, 1997), a qual divide com Slt2p uma função especializada e não catalítica na transcrição (Levin, 2011). Kdx1p possui apenas um resíduo de tirosina em seu motivo, o qual pode ser fosforilado por Mkk1/2p (Kim *et al.*, 2008). O gene KDX1 é induzido por Rlm1p em resposta a atividade de Slt2p, causando uma retroalimentação, na qual aumenta especificamente a porção não catalítica do programa transcricional (Figura 9). Slt2p ou Kdx1 quando ativadas, podem formar um complexo com Swi4p e Swi6p independente da função catalítica, que se ligará em promotores de diversos genes associados com estresse da parede celular e com o ciclo celular (Levin, 2011).

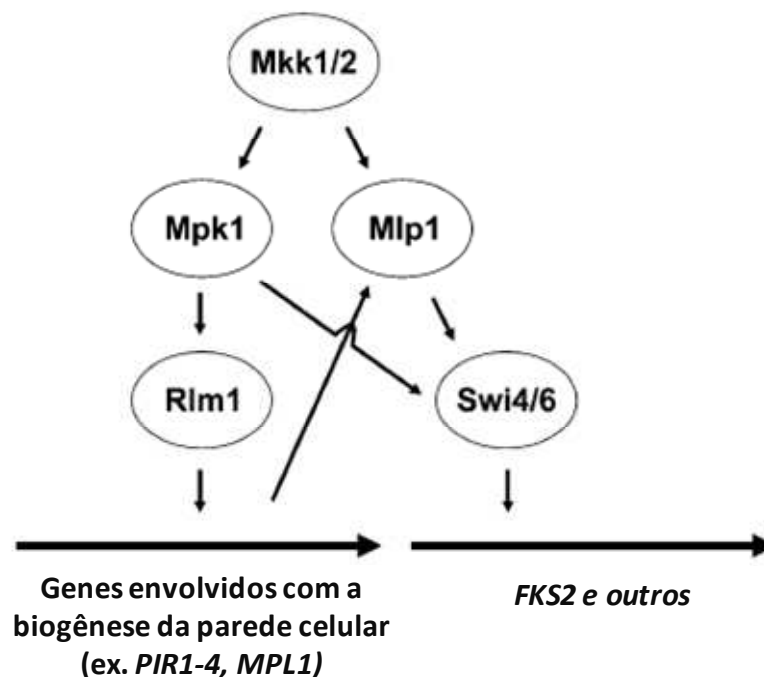


Figura 9. Programa transcricional da via CWI. A maioria dos genes regulados pelo sinal estão sobre o controle do fator de transcrição Rlm1p, que é fosforilado e ativado por Mpk1p (Slt2p). Entre estes genes está Mlp1p (Kdx1p), qual codifica para uma pseudoquinase paráloga de Mpk1p (Slt2p). Usando um mecanismo independente da atividade catalítica, Mlp1p (Kdx1p), conduz a expressão de um subgrupo de genes induzidos sob estresse através dos fatores de transcrição Swi4p/Swi6p, incluindo o gene FKS2 (adaptado de Levin, 2011).

Outro alvo de Slt2p, só que desta vez citoplasmático, é o canal de Ca^{2+} Cch1p/Mid1p. Em *S. cerevisiae*, as duas proteínas formam um sistema comum de influxo de Ca^{2+} (Locke *et al.* 2000; Muller *et al.*, 2001; Bonilla *et al.*, 2002). Ativação do canal Cch1p-Mid1p resulta em acumulação intracelular de Ca^{2+} e ativação da calcineurina, uma proteína calmodulina fosfatase (serina/treonina) dependente de Ca^{2+} (Figura 10). Os estímulos que causam ativação de Cch1p-Mid1p e calcineurina incluem o tratamento com feromônio (Cyert e Thorner, 1992; Iida *et al.*, 1994; Moser *et al.*, 1996; Flynn *et al.*, 1998), choque térmico brando (Zhao *et al.*, 1998), choque hiposmótico (Batiza *et al.*, 1996), estresse no retículo endoplasmático (Bonilla *et al.* 2002), e um aumento de cátions extracelulares como o Li^+ e Na^+ (Nakamura *et al.* 1993; Mendoza *et al.*, 1994; Aramburu *et al.*, 2000; Rusnak e Mertz, 2000).

A calcineurina defosforila muitos alvos, incluindo os fatores de transcrição Crz1p/Tcn1p (Matheos *et al.*, 1997; Stathopoulos e Cyert, 1997), o qual permite a entrada deste fator no núcleo (Stathopoulos-Gerontides *et al.*, 1999). A calcineurina também inibe o canal Cch1p/Mid1p no que parece ser uma retroalimentação negativa (Locke *et al.*, 2000; Muller *et al.*, 2001; Bonilla *et al.* 2002). Evidências indicam que um alvo da calcineurina é uma subunidade de Cch1p (Bonilla e Cunningham, 2003). Além disso, uma triagem de mutantes com deleções para proteínas quinases revelou que Slt2p é requerida para a ativação do canal Cch1p/Mid1p em resposta a estresse no retículo endoplasmático (qual pode causar estresse de parede celular indiretamente), sugerindo que a calcineurina antagoniza o sinal CWI nesta ocasião (Bonilla e Cunningham, 2003). Portanto, podem ocorrer três pontos de interação entre o sinal CWI e o sinal de Ca^{2+} : ativação do canal Cch1p-Mid1p por Slt2p, ativação de Crz1p por Rho1p-Skn7p (Alberts *et al.*, 1993; Tsuchiya *et al.*, 1998), e colaboração entre Slt2p e Crz1p para ativar a expressão de *FKS2* em resposta a estresse na parede celular (Zhao *et al.*, 1998) (Figura 10). O gene *FKS2*, assim como *FKS1*, codifica para a subunidade catalítica da β 1,3-glucano sintase, no entanto, a sua expressão torna-se mais evidente diante da privação de nutrientes, esporulação e resposta a feromônio (Mazur *et al.*, 1995).

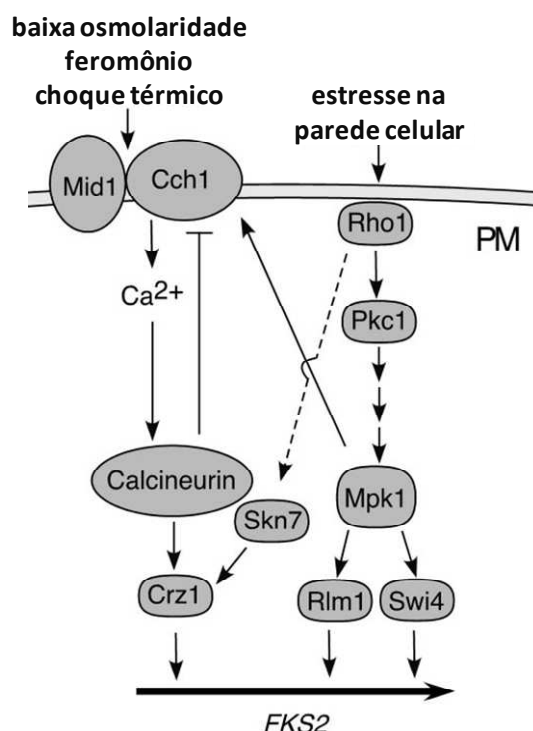


Figura 10. Ativação coordenada entre CWI, o sinal de Ca^{2+} e Skn7p para induzir a expressão do gene *FKS2*. Ativação de Slt2p resulta na ativação dos fatores de transcrição Rlm1p e Swi4p para dirigir a transcrição de *FKS2* (entre outros genes relacionados com a parede celular) e os genes para canal de Ca^{2+} Cch1p-Mid1p. A ativação do canal promove a entrada de Ca^{2+} e conseqüente ativação da proteína dependente de Ca^{2+} , calcineurina. Defosforilação do fator de transcrição Crz1p pela calcineurina, permitindo sua entrada no núcleo. Rho1p pode ativar o fator de transcrição Skn7p (linha tracejada), o qual induz a estabilização do fator de transcrição Crz1p, que por sua vez induz a expressão do gene *FKS2* (retirado de Levin, 2005).

2.2.2 A VIA DE SINALIZAÇÃO HOG

Em *S. cerevisiae*, mudanças osmóticas externas induzem a resposta pelas duas vias: CWI e a via de alta osmolaridade glicerol (HOG). Em geral, a via CWI pode responder a condições de estresse hipoosmóticas, mas a via HOG responde a condições hiperosmóticas. A resposta celular a condições hipoosmóticas é manifestada através da via CWI como indicado pela ativação da MAPK Slt2p. A fosforilação de Slt2p ocorre sem especificidade para com solutos osmóticos e é observada em soluções hipotônicas de sorbitol, NaCl ou glicose (Davenport *et al.*, 1995). A via CWI responde a condições hipoosmóticas baseando-se nos componentes do módulo MAPK e deleção de componentes do módulo MAPK, previne a fosforilação de Slt2p sob condições hipoosmóticas (Davenport *et al.*, 1995). Adicionalmente, as células mutantes *pkc1Δ*,

bck1Δ, e *mkk1Δ mkk2Δ* lisam na ausência de estabilizador osmótico (Levin *et al.*, 1992; Irie *et al.*, 1993; Kamada *et al.*, 1995).

Em contraste a resposta descrita para condições hipoosmóticas, condições hiperosmóticas disparam uma resposta da via HOG, na qual a inativação da quinase Sln1p conduz a defosforilação de Ssk1p. Ssk1p não fosforilada, ativa as MAPKKKs Ssk22p e Ssk2p (Hohmann *et al.*, 2007). Ssk2p então ativa Pbs2p. Pbs2p fosforila a MAPK Hog1p, que por sua vez, migra para o núcleo onde ativará fatores de transcrição. Uma via alternativa para ativar Hog1p, conhecida como via dependente de Sho1, também existe em *S. cerevisiae*. Nesta via Sho1p ativa Ste20p em resposta a estresse osmótico via GTPase Cdc42p, na qual então estimula a MAPKKK Ste11p. Ste11p juntamente com Ste50, ativarão Pbs2p que por sua vez, fosforila Hog1p (Bahn, 2008) (Figura 11).

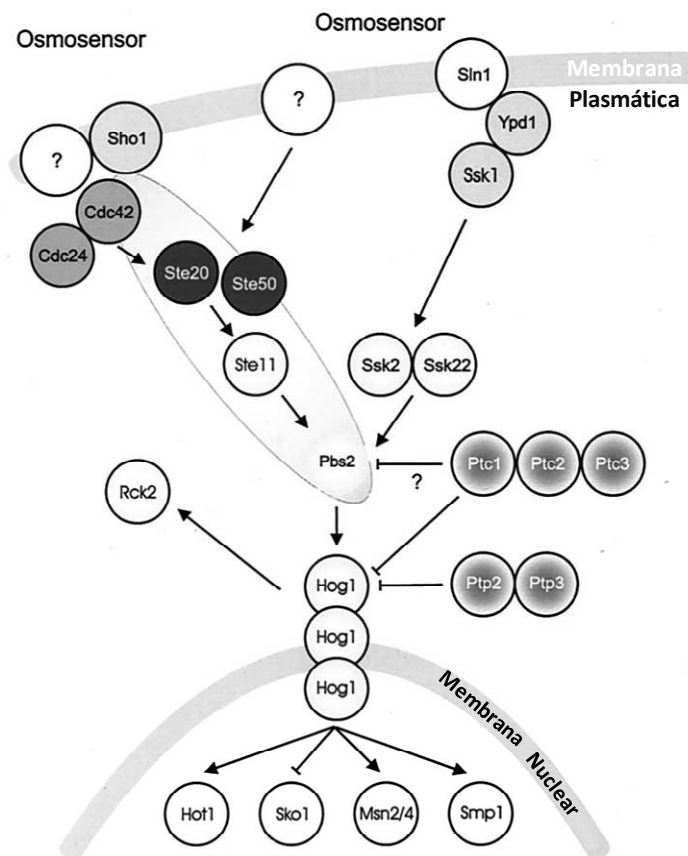


Figura 11. Modelo de ação da via HOG. Existem duas possibilidades de sinais que ativam Hog1p: uma pelo sensor Sln1p e a outra através do sensor Sho1p. Ambas as possibilidades conduzem a atividade de Pbs2p que irá ativar Hog1p, que entrará no núcleo para ativar vários fatores de transcrição (Adaptado de Hohmann, 2002).

Deste modo, condições osmóticas opostas ativam a via CWI e HOG. No entanto, percebe-se que ocorre algum tipo de interação para coordenar e regular as duas vias. O evento de interação de fato ocorre entre CWI e HOG, envolvendo Slt2p. Enquanto soluções hipotônicas induzem a fosforilação de Slt2p de maneira dependente da proteína quinase C (PKC), soluções hiperosmóticas induzem transcrição de Slt2p que é dependente de Hog1p e Rlm1p (Hahn e Thiele, 2002) (Figura 12).

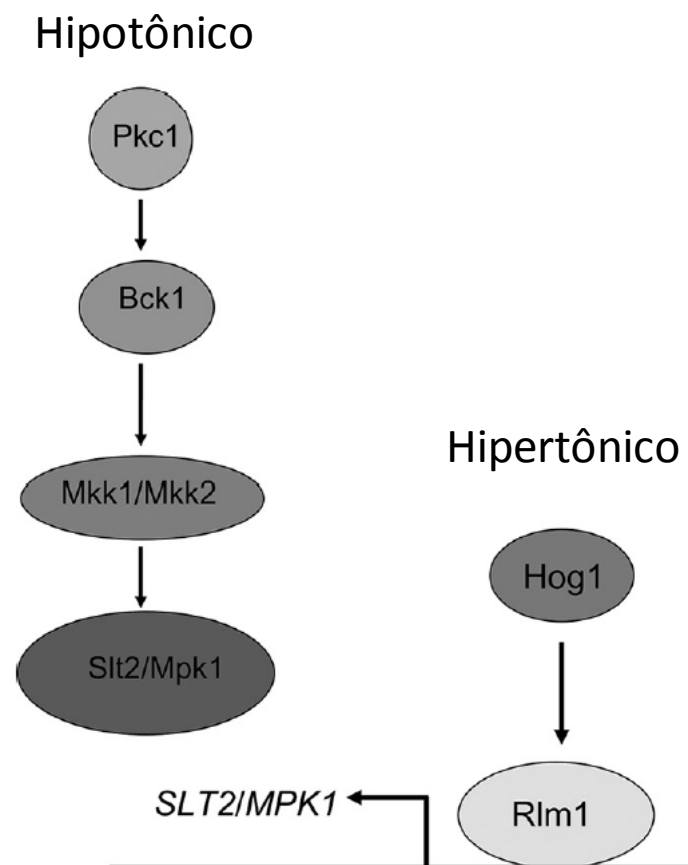


Figura 12. Proposta de mecanismo de resposta a estresse osmótico em *S. cerevisiae*. A via CWI é ativada em resposta a estresse hipoosmótico, conduzindo à dupla fosforilação em Slt2p. No entanto, a via HOG é ativada em resposta a condições de estresse hiperosmótico e leva à ativação do fator de transcrição Rlm1p, que então induz a transcrição do gene *SLT2* (Adaptado de Fuchs e Mylonakis, 2009).

2.3 RESPOSTA AO ESTRESSE ÁCIDO

Saccharomyces cerevisiae é utilizada no meio biotecnológico industrial, onde naturalmente acidifica o ambiente enquanto mantém seu pH intracelular próximo da

neutralidade. No entanto, foi observado resposta a estresse quando as leveduras foram expostas artificialmente a ácidos orgânicos como acético, láctico, succínico ou ácido cítrico (Causton *et al.*, 2001; Kapteyn *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2004; Kawahata *et al.*, 2006), conserva de alimentos como ácido sórbico (Schuller *et al.*, 2004), quando o pH foi ajustado com ácido clorídrico (Claret *et al.*, 2005; Kawahata *et al.*, 2006) ou ácido sulfúrico (Chen *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2010). Diversas respostas ao estresse ácido foram destacadas por estes autores, incluindo a redução do crescimento, indução da transcrição dos genes de resposta geral a estresse MSN2/4, indução de genes envolvidos no metabolismo de trealose e glicerol, redução da produção de etanol, indução de genes para HSPs e PDR12 (codifica para proteína que auxilia na extrusão de ânions), além da indução de genes de reparo e biossíntese da parede celular.

Os mecanismos de resposta a estresse a ácidos orgânicos em leveduras têm sido caracterizados como descrito no trabalho de Piper e colaboradores (2001). Em baixo pH, o ácido acético (pKa 4,75), ácido sórbico (pKa 4,76) ou ácido benzóico (pKa 4,19) irão existir na forma não dissociada (XCOOH), forma na qual eles são potentes inibidores do crescimento (Figura 13). A Figura 13a mostra uma visão geral de como o ácido orgânico inibe o crescimento microbiano. O ácido não dissociado, não estando carregado, prontamente passa através da membrana celular, e se dissocia quando entra em contato com o citoplasma que possui um ambiente com pH mais elevado. Tal dissociação gera prótons e o ânion ácido (XCOO⁻). O ânion ácido tenderá a se acumular em altos níveis no interior da célula, pois sendo carregado, não sairá da célula facilmente. Esta alta concentração de ânions poderá gerar uma pressão de turgor anormal. Isto também poderá influenciar na produção de radicais livres, conduzindo a um severo estresse oxidativo em condições de crescimento aeróbico. O próton liberado resultará em abaixamento do pH do citoplasma, inibindo muitas funções metabólicas. Após estes eventos, a célula responde com o aumento da atividade da enzima H⁺ ATPase (codificada pelo gene *PMA1*), qual catalisa a extrusão dos prótons H⁺, e induz a expressão da proteína Pdr12p, que atua na membrana plasmática catalisando a extrusão do ânion intracelular, tudo com gasto de ATP (Figura 13b) (Piper *et al.*, 2001).

No entanto, as células adaptadas devem de alguma maneira restringir a entrada do ácido orgânico através do envelope celular. Isto é uma parte muito importante do mecanismo de resposta, pois a célula deve evitar a ocorrência de um ciclo trivial de difusão do ácido na célula. Este mecanismo pode ser realizado, pela diminuição da porosidade da parede celular da levedura por meio de manoproteínas (De Nobel e Barnett, 1991) ou possivelmente pela reestruturação dos componentes da parede celular, que ocorre após estresse ácido (Kapteyn *et al.*, 2001).

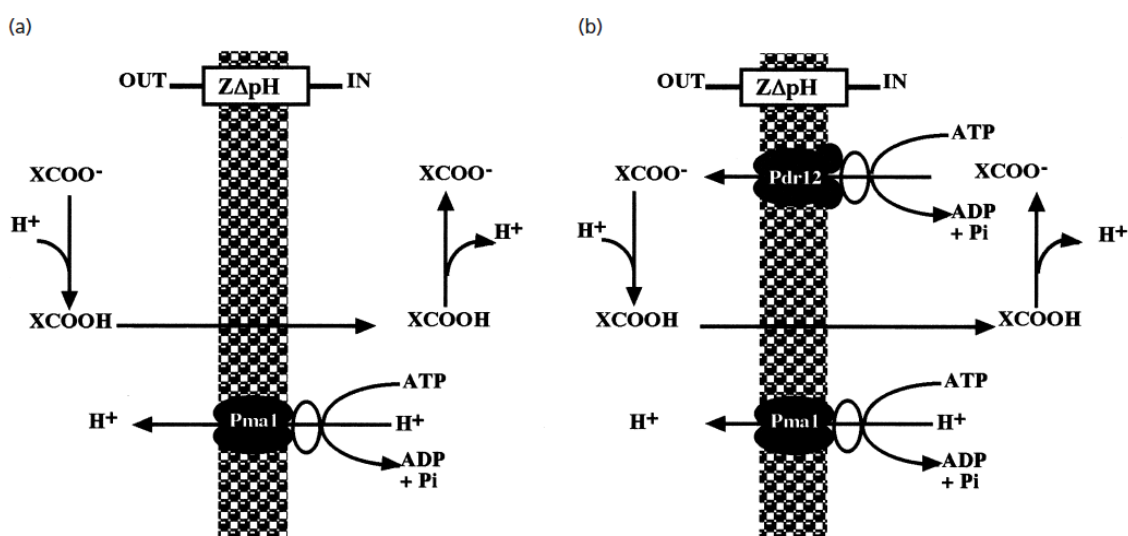


Figura 13. Modelo de como *S. cerevisiae* responde aos efeitos inibitórios dos ácidos orgânicos em células não adaptadas (a) e em células adaptadas ao crescimento em ácido orgânico (b). A forma não carregada do ácido ($XCOOH$) apresenta-se como permeável a membrana celular, passando para o interior da célula. O alto pH no citoplasma irá causar a dissociação deste ácido em um próton (H^+) e em seu ânion ($XCOO^-$), uma forma relativamente impermeável e que irá se acumular no interior da célula. Em células adaptadas (b), ocorre a expressão de Pdr12p na membrana plasmática, onde irá realizar a extrusão do ânion intracelular. A diferença de potencial eletroquímico ($Z\Delta pH$) através da membrana é mantida pela H^+ ATPase, codificada pelo gene *PMA1*, que catalisa a extrusão de H^+ (Adaptado de Piper *et al.*, 2001).

Estudos em populações de leveduras submetidas à exposição ao ácido sórbico, utilizando análises do perfil de indução de RNA mensageiro e microarray, conduziram a identificação do envolvimento do fator de transcrição War1p na indução do gene PDR12, assim como a regulação de outros genes por Msn2/4p (Schüller *et al.*, 2004). Em outro trabalho, Fernandes *et al.*, (2005) identificaram que o envolvimento do fator de transcrição Haa1p também é responsável pela adaptação de *S. cerevisiae* aos ácidos

orgânicos utilizados na preservação de alimentos como ácido acético e propiônico. O fator de transcrição Haa1p está envolvido com a transcrição de genes *TPO2* e *YRO2*, que codificam para transportadores multi-drogas na membrana, e também está envolvido na transcrição de *YGP1*, que codifica para uma glicoproteína da parede celular (Fernandes *et al.*, 2005).

Ambientes com baixo pH induzem ao estresse que interfere no metabolismo celular, levando a perda de viabilidade celular e capacidade fermentativa (Carmelo *et al.*, 1998). Parâmetros fisiológicos como o pH intracelular (pHi) interfere diretamente em todos os processo celulares. O pHi também interfere diretamente no estado redox da célula influenciando o equilíbrio NAD^+/NADH (Veine *et al.*, 1998). Ele determina os gradientes para transporte por membranas (Goffeau e Slayman, 1981; Wohlrab e Flowers, 1982), além de ser muito relevante na cinética das enzimas. O pH também interfere no estado de ionização das cadeias laterais de aminoácidos básicos ou ácidos, alterando estrutura, solubilidade e atividade protéica (Orij *et al.*, 2009).

As diferentes organelas em todas as células mantêm seu próprio pH específico, o qual é usado para definir e manter os processos associados com aquela organela. Vacúolos de leveduras, por exemplo, são descritos como tendo um pH ácido (Preston *et al.*, 1989; Brett *et al.*, 2005; Martínez-Muñoz e Kane, 2008; Li e Kane, 2009). O gradiente de prótons através das membranas vacuolares foi demonstrado ser essencial para o transporte de vários compostos (Ohsumi e Anraku, 1981; Nishimura *et al.*, 1998; Li e Kane, 2009), e perda da ATPase vacuolar causa sensibilidade celular a baixo pH ajustado com ácido clorídrico (Kawahata *et al.*, 2006). O pH da matriz mitocondrial por outro lado, é descrito como alcalino, com pH 8.0 (Llopis *et al.*, 1998). Este é o resultado da atividade da cadeia transportadora de elétrons, qual bombeia prótons de dentro da matriz mitocondrial, para gerar um gradiente de prótons (ΔpH) e um gradiente eletroquímico ($\Delta\Psi$) constituindo a força próton-motriz usada para a síntese de ATP. O pH do lumen do peroxissomo é relatado como 8,2; isto coincide com o pH ótimo para a maioria das enzimas dos peroxissomos (van Roermund *et al.*, 2004). Já a via secretória, apresenta uma variação no pH de 7,2 no retículo endoplasmático, para 5,2 em grânulos secretórios. Esta acidificação é necessária para promover o arranjo e a modificação de proteínas (Paroutis *et al.*, 2004).

Kawahata e colaboradores (2006) realizaram estudo de triagem de mutantes deficientes para genes de diversas vias e encontraram que genes importantes envolvidos com as vias de integridade da parede celular (CWI) e sinalização HOG, foram sensíveis a crescimento em meio ajustado com ácido clorídrico e ácido láctico. De fato, baixo pH induz alterações na arquitetura da parede celular de leveduras (Kapteyn *et al.*, 2001). Condições de baixo pH também induzem a fosforilação de SLT2p. Adicionalmente, ambos os genes *SLT2* e *BCK1* da via CWI, foram descritos serem necessários para crescimento em condições de baixo pH (Claret *et al.*, 2005). Sob condições de estresse ácido, o mutante para o sensor membrana, *mid2Δ* exibe diminuição na transcrição de *PST1*, um gene regulado pelo fator de transcrição Rlm1p (que é ativado por Slt2p) e faz parte da resposta CWI. Transcrição de *PST1* sob condições ácidas, particularmente não depende do sensor Wsc1p, mais sim de Mid2p que media a resposta a estresse ácido, e que induz a ativação do fator de transcrição Rlm1p (Claret *et al.*, 2005).

A via CWI recebe também a influência lateral de Rgd1p sob condições ácidas (Figura 14). O gene *RGD1* codifica para uma proteína ativadora de GTPase (GAP) que atua em Rho3p e Rho4p. Ela realiza papel importante na tolerância a condições ácidas, o qual é evidenciado pela sensibilidade do mutante *rgd1Δ* em meio com baixo pH. O defeito observado no mutante *rgd1Δ* é intensificado no duplo mutante *rgd1Δ mid2Δ*, sugerindo que o gene *RGD1* é importante para a resposta CWI (Claret *et al.*, 2005). O fenótipo do mutante *rgd1Δ* é abolido pelo aumento na atividade da Pkc1p, e um defeito em *RGD1* induz a problemas na atividade da Pk1cp (de Bettignies *et al.*, 2001). Isto indica que a via PKC funciona abaixo de Rgd1p. Além disso, a expressão do gene *RGD1* sob condições ácidas foi dependente de Hog1p (Gatti *et al.*, 2005).

Recentemente, evidências têm mostrado que as células de levedura respondem ao estresse imposto pelo ácido sulfúrico, induzindo genes da via de resposta geral ao estresse (GSR) (Melo *et al.*, 2010). Adicionalmente, foi mostrado que as células de levedura que falham em ativar eficientemente a via da proteína quinase A (PKA), são mais tolerantes ao baixo pH imposto pelo ácido sulfúrico (Melo *et al.*, 2010).

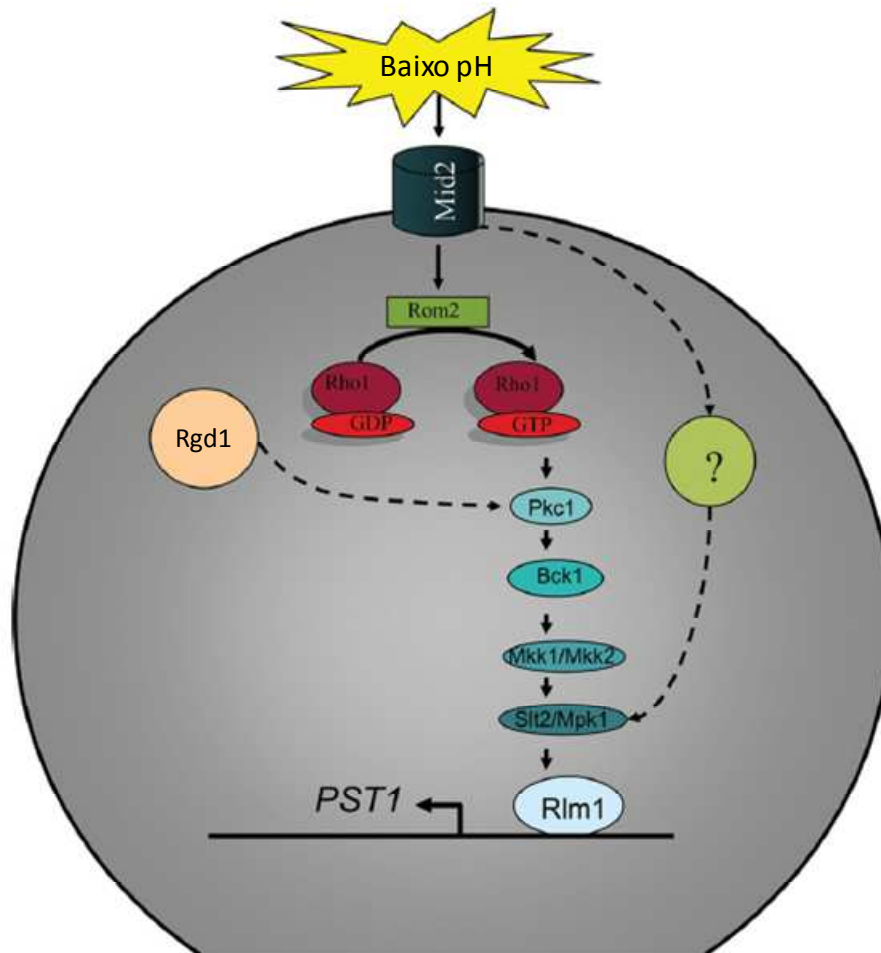


Figura 14. Proposta do mecanismo de resposta celular de *S. cerevisiae* a condições de baixo pH. Baixo pH extracelular ativa a via CWI por meio do sensor de estresse Mid2p. A ativação da cascata de transdução induz a estimulação do módulo MAPK. Uma potencial interação lateral com Rgd1p é sugerida. Existe também um mecanismo alternativo pelo qual o sinal é mediado de Mid2p para Slit2p, qual é independente de PKC. Linhas tracejadas indicam potenciais eventos de sinal de transdução (retirado de Fuchs e Mylonakis, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

- ✓ Identificar os principais mecanismos genéticos e celulares envolvidos na tolerância e adaptação ao estresse com ácido inorgânico em *Saccharomyces cerevisiae*.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Identificar as principais proteínas essenciais para a tolerância e resistência celular em *Saccharomyces cerevisiae* a baixo pH ajustado com ácido sulfúrico.
- ✓ Identificar os genes de *Saccharomyces cerevisiae* que respondem a acidificação do meio com ácido sulfúrico.
- ✓ Identificar as principais redes de conexão entre os mecanismos regulatórios em *Saccharomyces cerevisiae* que respondem à acidificação do meio com ácido sulfúrico.

4. CAPÍTULO I

PARTICIPATION OF CWI, HOG AND CALCINEURIN PATHWAYS IN THE TOLERANCE OF SACCHAROMYCES CEREVISIAE TO LOW PH BY INORGANIC ACID

Lucena RM, Elsztein C, Simões DA, de Moraes MA Jr. J Appl Microbiol. 2012 Sep;113(3):629-40. doi: 10.1111/j.1365-2672.2012.05362.x.

5. CAPÍTULO II

A FUNÇÃO DAS MAP QUINASES HOG1P E SLT2P NO CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* EM RESPOSTA AO ESTRESSE CAUSADO PELO ÁCIDO SULFÚRICO

5.1 INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos grandes produtores mundiais de etanol combustível que é uma importante fonte renovável de energia. Ele é produzido a partir da utilização de células de *Saccharomyces cerevisiae* na fermentação do caldo de cana de açúcar ou melaço (Wheals *et al.*, 1999; Basso *et al.*, 2008). Em muitas destilarias de bioetanol, ao final da fermentação, o mosto é centrifugado e as células são coletadas para serem reutilizadas em nova fermentação. No entanto, como o processo é aberto, a fermentação é frequentemente contaminada com leveduras selvagens e bactérias (Skinner e Leathers, 2004; Silva-Filho *et al.*, 2005a; Liberal *et al.*, 2007; Schell *et al.*, 2007; Basílio *et al.*, 2008; Basso *et al.*, 2008; Schaber *et al.*, 2010).

Contaminações por leveduras raramente são tratadas com o uso de alguns biocidas (Elsztein *et al.*, 2008). No entanto, para manter a população bacteriana sob controle, podem ser utilizadas grandes quantidades de antibióticos, ou tratar a biomassa, entre as fermentações, com uma solução de ácido sulfúrico em água: pH 2,0-2,5 por 1-2h (Wheals *et al.*, 1999; Silva Filho *et al.*, 2005b; Basso *et al.*, 2008). Este procedimento conduz a alterações do metabolismo podendo resultar em perda da viabilidade celular (Carmelo *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2010; Lucena *et al.*, 2012), especialmente quando em sinergia com outras condições de estresse, tais como altas temperaturas e altas concentrações de etanol (Silva Filho *et al.*, 2005b; Melo *et al.*, 2010).

No entanto, foi observado resposta a estresse quando as leveduras foram expostas artificialmente a ácidos orgânicos como acético, láctico, succínico ou ácido

cítrico (Causton *et al.*, 2001; Kapteyn *et al.*, 2001; Lawrence *et al.*, 2004; Kawahata *et al.*, 2006), conserva de alimentos como ácido sórbico (Schuller *et al.*, 2004), quando o pH foi ajustado com ácido clorídrico (Claret *et al.*, 2005; Kawahata *et al.*, 2006) ou ácido sulfúrico (Chen *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2010; Lucena *et al.*, 2012).

As células não apenas devem sentir e distinguir entre os estímulos, mas também realizar a transdução precisa do sinal para responder apropriadamente (Schwartz e Madhani, 2004). Um dispositivo molecular freqüentemente utilizado para condução destas respostas é a sequência de três proteínas quinases conhecida como módulo de proteína quinase mitógena (MAPK) (Chen e Thorner, 2007). A levedura *S. cerevisiae* possui pelo menos cinco vias contendo cascata de MAPK: a via da integridade da parede celular (CWI), a via de formação de esporos, via de crescimento filamentosso/invasivo, via de resposta a feromônio e a via de alta osmolaridade glicerol (HOG) (Saito e Tatebayashi, 2004). Durante o crescimento e morfogênese e em face de mudanças externas que causam estresse na parede celular, *S. cerevisiae* utiliza vias de manutenção para a parede celular. Uma das principais vias responsável por orquestrar mudanças em sua estrutura é a via da manutenção da parede celular ou CWI (Fuchs *et al.*, 2009; Levin, 2011).

Em *S. cerevisiae* a cascata de sinal CWI se inicia pelos sensores associados à membrana Wsc1,2,3p, Mid2p e Mtl1. Estas proteínas interagem com Rom2p, a qual é uma trocadora de nucleotídeo guanil (GEF) de Rho1p. Rho1p induz a mudanças na composição da parede celular através da ativação da glucano sintase Fks1p, qual facilita a produção do componente que representa maior quantidade na parede celular, o β 1,3-glucano. Rho1p também interage e ativa a quinase Pkc1p que regula a cascata CWI. Em seguida, Pkc1 fosforila a quinase quinase quinase Bck1p (MAPKKK), que por sua vez, transmite o sinal fosforilando um par de redundantes quinase quinases Mkk1p e Mkk2p (MAPKk). Estas duas quinases finalmente fosforilam a MAPK Slt2p/Mpk1p. A ativação de Slt2p induz a ativação dos fatores de transcrição incluindo Rlm1p e SBF (complexo formado pelos fatores de transcrição Swi4p e Swi6p), e ambos irão iniciar a indução de diversos genes incluindo genes para a síntese da parede celular e regulação do ciclo celular (Levin, 2011).

A via CWI não é apenas ativada sob condições de estresse na parede celular, mas também sob outras condições, incluindo choque hipoosmótico (Davenport *et al.*, 1995), tratamento com feromônio (Buehrer e Errede, 1997), depolarização da actina (Krause e Gray, 2002), estresse alcalino (Serrano *et al.*, 2006), estresse oxidativo (Alic *et al.*, 2003), baixo pH (Claret *et al.*, 2005; Lucena *et al.*, 2012), em resposta a proteínas desnaturadas (UPR) (Scrimale *et al.*, 2009), luz UV (Bryan *et al.*, 2004) ou tratamento com cafeína, vanadato (Martín *et al.*, 2000) ou rampamicina (de la Torre-Ruiz *et al.*, 2002) e o antisséptico PHMB (Elsztein *et al.*, 2011).

Outra via também importante é a via HOG que comanda a resposta adaptativa das células de levedura ao estresse hiperosmótico (Hohmann, 2002; Hohmann, 2009). Esta via tem como principal componente a proteína Hog1p que quando ativada, vai ao núcleo e ativa fatores de transcrição (Hohmann, 2002). A via HOG também está envolvida em resposta a outros estresses, incluindo estresse oxidativo (Bilsland *et al.*, 2004), estresse ácido (Lawrence *et al.*, 2004; Mollapour e Piper, 2006; Claret *et al.*, 2005; Lucena *et al.*, 2012), metilglioxal (Aguilera *et al.*, 2005), baixa temperatura (Panadero *et al.*, 2006), arsenite (Thorsen *et al.*, 2006), CsCl (Del Vescovo *et al.*, 2008), alta temperatura (Winkler *et al.*, 2002), zimoliase (Bermejo *et al.*, 2008).

Vários autores têm relatado a existência de participação cooperativa entre as vias da integridade da parede celular (CWI) e a via de alta osmolaridade glicérol (HOG) diante de situações de estresse celular (Bermejo *et al.*, 2008; Fuchs *et al.*, 2009; Garcia *et al.*, 2009; Petkova *et al.*, 2010; Rodríguez-Peña *et al.*, 2010; Saito, 2010; Lucena *et al.*, 2012). Em nosso estudo, avaliamos a resposta transcricional global nas linhagens de *S. cerevisiae* mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ* após choque em meio ajustado para pH 2,5 com ácido sulfúrico. A falta das MAP quinases Hog1p e Slp2p promove alterações importantes no programa de expressão gênica, revelando o papel de cada proteína em resposta ao baixo pH.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Linhagens de leveduras e crescimento celular

Foi utilizada a linhagem de laboratório BY4741 (MATa his3 Δ leu2 Δ met15 Δ ura3 Δ) e seus mutantes isogênicos portando deleções, provenientes da coleção EUROSCARF (European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis) da Universidade de Frankfurt. As funções biológicas dos genes deletados estão descritas na Tabela 2. As células foram mantidas em meio YPD sólido, e os estoques foram preparados em 30% de glicerol e armazenados a -80 °C.

Tabela 2. Genes testados nas linhagens mutantes derivadas de *S. cerevisiae* BY4741 submetidas a ensaios de crescimento em ácido para análise da expressão gênica por microarray.

Gene	Função Biológica do Gene
HOG1	Proteína quinase envolvida na osmoregulação
SLT2	Proteína quinase (MAPK) Ser-Thr envolvida com a integridade da parede celular

Extração de RNA e quantificação

O pré-inóculo contendo as células da linhagem BY4741 e dos mutantes *hog1* Δ e *slt2* Δ foram transferidos para YPD pH 7,0 estéril com concentração em densidade óptica (DO_{600nm}) de 0,1, e cultivadas até DO_{600nm} de 0,5. As células foram centrifugadas, e em seguida re-suspendidas em YPD ajustado para pH 2,5 com ácido sulfúrico. Após, as células foram incubadas por 1 h a 30 °C e com agitação de 120 rpm. Em seguida, as culturas foram centrifugadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80 °C até o uso. Os experimentos foram conduzidos em duplicatas biológicas

Para a extração total de RNA, as células foram re-suspendidas em 200 μ L de tampão AE (Acetato de sódio 50 m mol L⁻¹ e EDTA 10 m mol L⁻¹ pH 5,3) e 50 μ L de SDS 10%. Após homogeneização, as células foram lisadas por incubação a 65 °C por 5 min. Os lisados foram centrifugados a 13 000 *g* por 5 min a 4 °C, e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. O RNA foi purificado com kit NucleoSpin® RNA II (Macherey-Nagel, Düren, Germany), seguindo as instruções do fabricante. O RNA

purificado foi armazenado a -20 °C até o uso. A quantificação do RNA foi determinada com o espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 UV-Vis.

Análise da expressão gênica por Microarray

O cRNA marcado com cianina 3 (Cy3) ou cianina 5 (Cy5), foi preparado de acordo com o protocolo Two-Color v 6.5 Agilent Technologies. O cRNA proveniente da linhagem BY4741 foi marcado com Cy3 e usado como referência para os cRNAs das linhagens *hog1Δ* e *slt2Δ*. A purificação do cRNA marcado foi realizada com o kit Qiagen RNeasy mini spin e a quantificação e Incorporação da marcação foi verificada com o espectrofotômetro NanoDrop ND-2000 UV-Vis. A amostra marcada foi dispersa em lâmina (Agilent) com formato de 8 microarrays em alta definição. Em seguida a lâmina foi acoplada a câmera de hibridização Agilent, onde foi mantida em forno de hibridização com rotor, a 65 °C e 10 rpm por 17 h. Logo após, a lâmina foi lavada com solução GE wash buffer e em seguida foi lida em scanner Agilent de alta resolução.

A análise computacional, normalização e estatística dos dados de saída do scanner foram realizadas com o auxílio do software Bioconductor (<http://www.bioconductor.org>). Foram considerados diferencialmente expressos, apenas os genes com *p value* < 0,05 e logFC >1 ou <-1 (maior que duas vezes mais expresso ou menor que duas vezes menos expresso). A função dos genes foi citada de acordo com o Saccharomyces Genome Database –SGD (<http://www.yeastgenome.org>) e os agrupamentos funcionais foram realizados com a ferramenta do SGD Gene Ontology Slim Mapper (<http://www.yeastgenome.org/cgi-bin/GO/goSlimMapper.pl>).

Análise da rede de interações entre as proteínas

Para a análise de associações entre as proteínas envolvidas neste trabalho, utilizamos a ferramenta *String 9.0* que faz parte do banco de dados sobre interações conhecidas e prováveis entre proteínas (<http://string-db.org/>). As interações incluem associações diretas (físicas) e indiretas (funcionais). Ele integra informações a partir de numerosas fontes, incluindo dados experimentais, métodos de previsão computacionais e coleções de textos publicados que juntos são utilizados na construção de mapas de interações entre genomas e proteínas (Jensen *et al.*, 2009).

5.3 RESULTADOS

A expressão gênica no mutante *hog1Δ* diante do estresse ácido

Após o tratamento com ácido sulfúrico pH 2,5 foram identificados 103 genes com alteração no padrão de expressão no mutante *hog1Δ* em relação a linhagem parental, dos quais 59 apresentaram indução e 44 apresentaram repressão (Tabela 3). Estes genes diferencialmente expressos estão envolvidos em diferentes processos biológicos, incluindo biossíntese da parede celular, transporte de íons, estresse osmótico e oxidativo, resposta a feromônio (acasalamento), mitose e brotamento celular, reparo de DNA, organização do citoesqueleto e metabolismo de lipídeos e aminoácidos (Tabela 3).

Dentre os genes induzidos após o estresse ácido, os maiores grupos funcionais foram formados pelos genes relacionados com a resposta a feromônio, incluindo *FUS3* que codifica para proteína MAP quinase desta via, *FIG1* e *FIG2* (Tabela 3). Outros genes induzidos estão relacionados com a biossíntese e manutenção da parede celular, tais como, *TIP1* que codifica para manoproteína da parede celular e *KRE1* que está envolvida com a síntese de β -glucanos. Outro grupo de genes que também foram induzidos são os envolvidos com o transporte de íons, como *ATO3* que codifica uma proteína da membrana e *ZRT1* que codifica para um transportador de membrana de alta afinidade por zinco. Também encontramos genes relacionados com o metabolismo de lipídeos, tais como, *SCS2* que está envolvido com a produção de fosfolípidos na membrana plasmática.

Dentre os genes que foram reprimidos no mutante *hog1Δ*, destacaram-se aqueles envolvidos com a biossíntese e manutenção da parede celular *PST1*, *CWP1*, *PIR3*, *EXG1* e *FLC1* (Tabela 3). O gene *PST1* codifica para uma proteína de parede celular importante na resposta a danos na parede. Já *CWP1* codifica para manoproteína que é encontrada em cicatrizes da célula filha após o nascimento. Outros genes reprimidos estão envolvidos com resposta a estresse (*HSP12* e *DDR2*), estresse oxidativo (*CTT1*), resposta a estresse com ácido orgânico (*SPI1*), biossíntese de glicerol (*HOR2*) e trealose (*TPS2*), além do gene *KDX1* que codifica uma proteína quinase relacionada com o sinal da MAP quinase Slt2p.

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante *hog1Δ* após estresse em meio com ácido sulfúrico (GO: grupo de ontologia gênica).

GO ID	Processo	Genes Induzidos
42221	Resposta a estímulo químico	<i>FUS3 FIG1 FUS1 KAR4 FIG2 MFA1 HAC1 AGA2 FET3 PRM1 AGA1</i>
746	Conjugação	<i>FUS3 FIG1 FUS1 KAR4 FIG2 MFA1 AGA2 ASG7 PRM1 AGA1</i>
8150	Processos biológicos desconhecidos	<i>YCR051W GTT3 YER152C WWM1 YGR210C TIR3 YLL053C YLR179C</i>
71554	Biogênese e organização da parede celular	<i>TIP1SIM1 UTH1 CSR1 KRE1</i>
55085	Transporte transmembrana	<i>ATO3 SCS2 ZRT1 SEC61 FET3</i>
6811	Transporte de íon	<i>ATO3 ZRT1 FET3 FIT3</i>
6520	Metabolismo de aminoácido	<i>CYS3 ILV6 THR1 MAE1</i>
7010	Organização do citoesqueleto	<i>ATS1 ABP1 DSK2</i>
6629	Metabolismo de lipídios	<i>SCS2 NCP1 CSR1</i>
GO ID	Processo	Genes Reprimidos
8150	Processos biológicos desconhecidos	<i>OM14 YDR034WB FMP16 NQM1 PRM10 KDX1 TMA10 CSI2 PNS1</i>
5975	Metabolismo de aminoácidos	<i>TPS2MNN1 HOR2 SOL4 EXG1 DAK1 PGM2</i>
71554	Biogênese e organização da parede celular	<i>PST1 CWP1 PIR3 EXG1 FLC1</i>
42221	Resposta a estímulo químico	<i>HBT1 SPI1 HSP12 CTT1</i>
6970	Resposta a estresse osmótico	<i>GPD1 HOR2 HSP12</i>
9311	Metabolismo de oligossacarídeos	<i>TPS2 MNN1 PGM2</i>
6629	Metabolismo de Lipídeos	<i>CSH1 GRE2 SUR1</i>
278; 6281	Ciclo celular mitótico; reparo de DNA	<i>POL30 MCD1</i>
6979	Resposta a estresse oxidativo	<i>HSP12 CTT1</i>
6811; 6873	Transporte de íons e homeostase	<i>PHO84 PGM2</i>
7114	Brotamento celular	<i>AXL2</i>

A expressão gênica no mutante *slt2Δ* diante do estresse ácido

O mutante *slt2Δ* apresentou variação na expressão de 63 genes após estresse com ácido sulfúrico, 51 genes induzidos e 12 genes reprimidos (Tabela 4). Estes genes formaram vários agrupamentos funcionais de acordo com o processo em que participam (Tabela 4). Em relação aos genes induzidos, muitos fazem parte do metabolismo de carboidratos como o da citrato sintase (*CIT2*), resposta a altas concentrações de cobre (*CUP1-1* e *CUP1-2*), metabolismo de aminoácidos como (*CYS3*) envolvido com a biossíntese de cisteína, biossíntese e organização da parede celular (*HSP150*) e transporte de íons (*PMA1*) que codifica subunidade da H⁺ATPase da membrana plasmática. Também apresentaram indução, genes envolvidos na biossíntese de ergosterol (*NCP1*), proteína ligadora de actina (*ABP1*) e o gene *SSA1* onde seu produto tem função importante no dobramento de proteínas.

Os principais genes reprimidos, assim como no caso do mutante *hog1Δ*, estavam envolvidos com a biossíntese e manutenção da parede celular *PST1*, *CWP1*, *PIR3* e também o gene *KTR2* que codifica para uma manosiltransferase que participa da glicosilação de proteínas (Tabela 4). Interessantemente, o gene *SSK22* que codifica a MAP quinase quinase quinase (MAPKKK) da via HOG foi reprimido. Adicionalmente, o gene da quinase *KDX1* também foi reprimido no mutante *slt2Δ* após choque ácido.

Tabela 4. Genes diferencialmente expressos na linhagem mutante *slt2Δ* após estresse em meio com ácido sulfúrico.

GO ID	Processo	Genes Induzidos
5975	Metabolismo de carboidratos	<i>CIT2 SOL4 ENO2 RHR2 IMP2' HSP104 GCY1 GPH1</i>
42221	Resposta a estímulo químico	<i>GAT1 CTT1 SOD2 CUP1-1 CUP1-2 HSP104 YNL190W GCY1</i>
6457	Dobramento de proteínas	<i>SSA1HSP26 PDI1 SSC1 SSA2 HSP104</i>
55085	Transporte transmembrana	<i>SSA1YBR241C PMA1 SSC1 SSA2 SEC61</i>
6520	Metabolismo de aminoácidos	<i>CYS3 ILV6 CIT2 MET6 THR1 MAE1</i>
6979	Resposta a estresse oxidativo	<i>CTT1 SOD2 CUP1-1 CUP1-2 HSP104 GCY1</i>
8150	Processo biológico desconhecido	<i>MRH1 YER152C WWM1 TIR3 PRY1 GRE1</i>
71554	Biogênese e organização da parede celular	<i>TIP1 HSP150 CSR1</i>

GO ID	Processo	Genes Induzidos
6629	Metabolismo de lipídeos	<i>NCP1 OPI3 CSR1</i>
7010	Organização do citoesqueleto	<i>ABP1 DSK2</i>
6091	Metabolismo energético	<i>ENO2 GPH1</i>
7005	Organização mitocondrial	<i>SSA1 SSC1</i>
51603	Processo catabólico de proteínas	<i>SEC61 DSK2</i>
6811	Transporte de íons	<i>PMA1 FIT3</i>
6970	Resposta a estresse osmótico	<i>RHR2 ALD6</i>
GO ID	Processo	Genes Reprimidos
71554	Biogênese e organização da parede celular	<i>PST1 CWP1 PIR3 KTR2</i>
6468	Fosforilação protéica	<i>SSK22</i>
23052	Sinalização celular	<i>SSK22</i>
8150	Processo biológico desconhecido	<i>PRM5 KDX1</i>
6486	Glicosilação de proteínas	<i>KTR2</i>
5975	Metabolismo de Carboidratos	<i>KTR2</i>
43934	Esporulação	<i>CWP1</i>
6970	Resposta a estresse osmótico	<i>SSK22</i>

A expressão gênica comum aos mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ* após estresse ácido

Apesar da expressão diferencial de muitos genes ter apresentado particularidades para cada mutante, se levarmos em consideração os processos biológicos nos quais os genes diferencialmente expressos estavam incluídos, os mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ* apresentaram alterações semelhantes no programa de expressão gênica. Ambos mostraram a indução de alguns dos mesmos genes envolvidos em processos biológicos, incluindo metabolismo de cisteína (*CYS3*), biossíntese e manutenção da parede celular (*TIP1*), transporte de íons (*FIT3*) e também a indução do gene *CSR1* que está envolvido com o metabolismo de ácidos graxos (Figura 15). No entanto, os mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ* apresentaram apenas os genes *CWP1*, *PST1*, *PIR3* e *KDX1* reprimidos em comum, nos quais os três primeiros estão relacionados com a biossíntese e manutenção da parede celular, e o gene *KDX1* que

codifica uma proteína quinase relacionada com o sinal da MAP quinase Slt2p, e possivelmente também está envolvida com o sinal da integridade da parede celular.

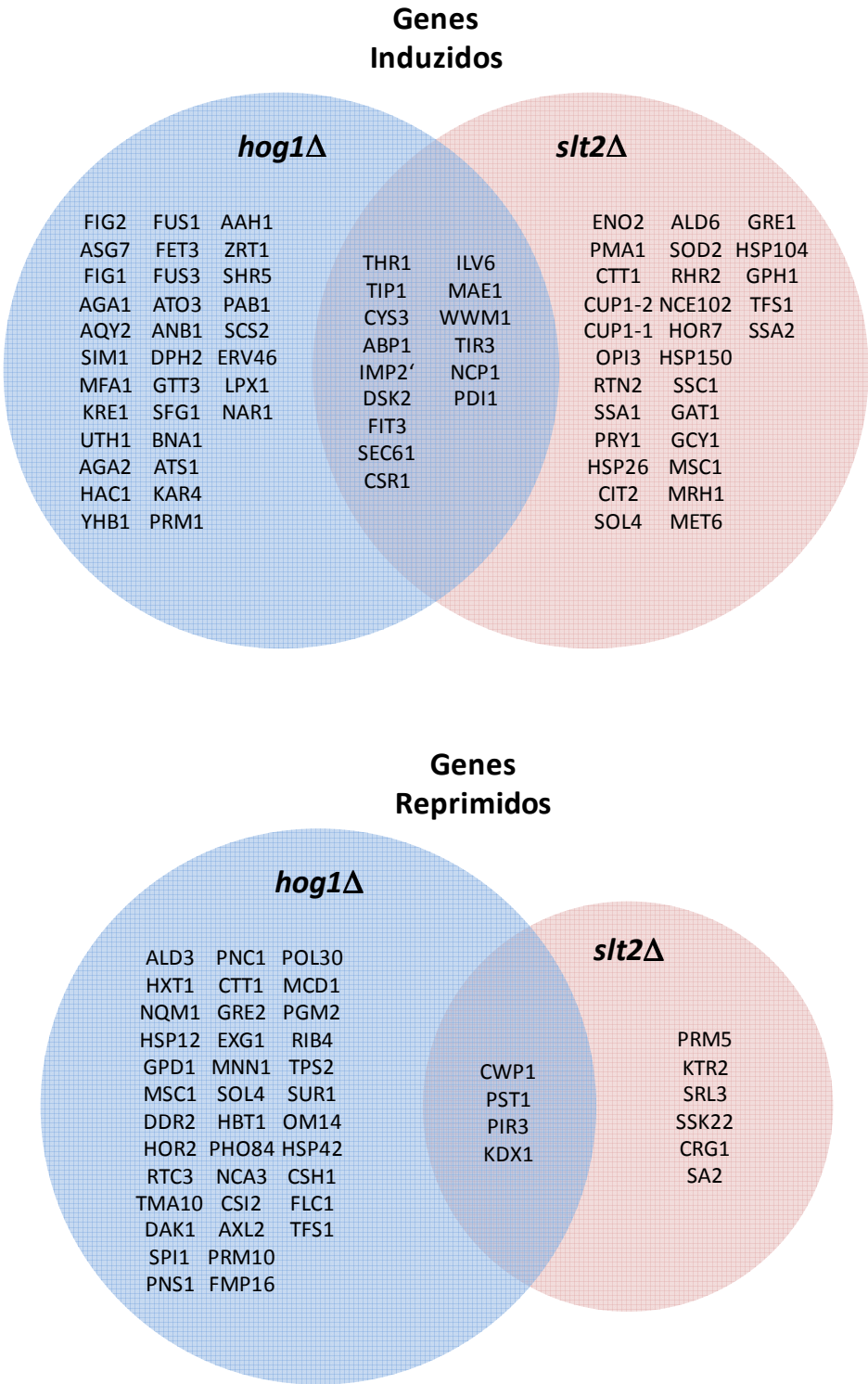


Figura 15. Genes diferencialmente expressos comuns e específicos para cada um dos mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ*, após tratamento com ácido sulfúrico.

Interações relevantes entre as MAP quinases Hog1p e Slt2p e outras vias

Com os resultados obtidos a partir da expressão gênica global dos mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ* após terem sido submetidos ao estresse ácido, realizamos uma busca por evidências que fornecessem suporte aos nossos dados experimentais. Encontramos interessantes associações diretas entre a MAPK Slt2p e a subunidade regulatória de PKA assim como a interação com proteína Ira2p que regula negativamente a atividade das proteínas Ras1/2 (Figura 16). Também encontramos que a proteína pseudoquinase Kdx1p, forma um elo entre as quinases Hog1p e Slt2p por meio do fator de transcrição Mn2p (Figura 17).

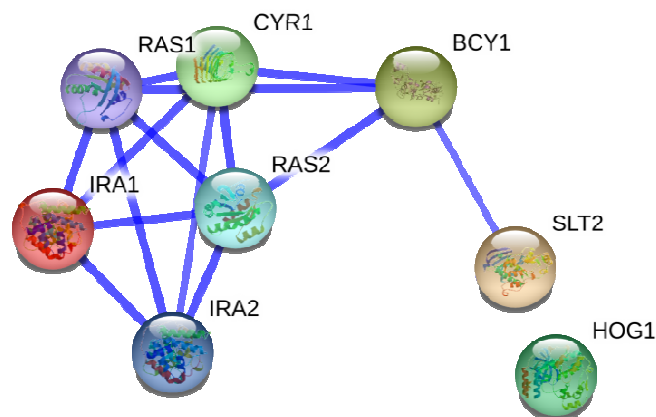


Figura 16. Rede de interações entre a proteína quinase Slt2p e componentes da via da proteína quinase A (PKA). Associações fortes são representadas por linhas mais espessas. Busca realizada com a ferramenta String 9.0.

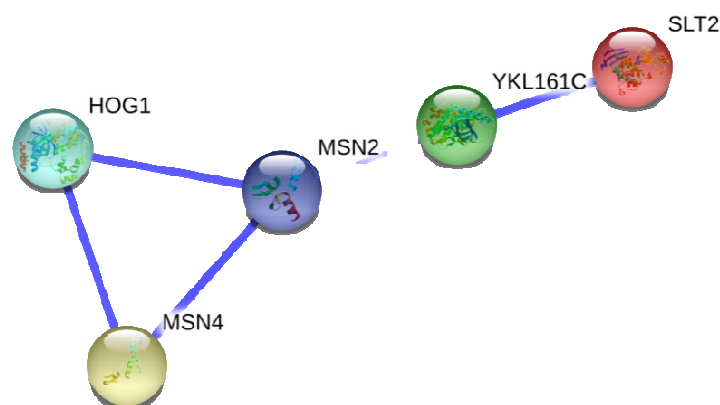


Figura 17. Associações entre as proteínas quinases Hog1p, Slt2p e Kdx1p (YKL161C) e os fatores de transcrição de resposta geral a estresse Msn2/4. Associações fortes são representadas por linhas mais espessas. Busca realizada com a ferramenta String 9.0.

5.4 DISCUSSÃO

Vários autores têm relatado a resposta transcricional global de *S. cerevisiae* após ter sido submetida a diversos tipos de estresse, incluindo choque térmico, osmótico, oxidativo, alcalino e estresse ácido (Causton *et al.*, 2001; Schüller *et al.*, 2004; Kawahata *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009; Melo *et al.*, 2010). Chen e colaboradores (2009) investigaram mudanças na expressão gênica global de *S. cerevisiae* após diminuição do pH do meio de 6,0 para 3,0 usando ácido sulfúrico. Eles encontraram alterações na expressão de genes relacionados com a biogênese e organização da parede celular, assim como genes do metabolismo de carbono. No entanto, em outro trabalho com experimentos de fermentação com pH 2 ajustado com ácido sulfúrico, foi observada a indução de vários genes, incluindo principalmente os que participam da resposta geral a estresse (GSR) (Melo *et al.*, 2010).

Adicionalmente aos estudos anteriores citados, neste trabalho analisamos a expressão gênica global nas linhagens de *S. cerevisiae* mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ* após estresse em meio ajustado para pH 2,5 com ácido sulfúrico. Nós mostramos que a ausência destas duas MAP quinases promove alterações importantes na expressão gênica e sugerimos possíveis funções para estas proteínas quinases após exposição da levedura ao ácido sulfúrico.

A via HOG é necessária para resposta das células de levedura a condições ambientais hiperosmóticas, sendo Hog1p a MAP quinase chave dessa via (Hohmann *et al.*, 2007). Entre os principais genes induzidos no mutante *hog1Δ* após o choque ácido, se destacaram aqueles envolvidos com a via de resposta a feromônio e acasalamento, incluindo o gene *FUS3* que codifica para importante MAP quinase da via (Tabela 3). A proteína Fus3p ativada, ativa o fator de transcrição Ste12p, o qual se liga ao elemento de resposta a feromônio nos promotores de genes específicos de acasalamento, e induz suas expressões. Os produtos destes genes específicos de acasalamento são necessários para fusão das células de levedura com suas parceiras na formação de células diplóides a/α (Bardwell, 2004).

Na literatura encontramos que a via HOG pode suprimir a atividade da via de resposta a feromônio diante de estresse osmótico (Hall *et al.*, 1996). Hog1p pode

impedir a indução da osmoregulação pela inibição do sensor Sho1p, talvez por um mecanismo de retroalimentação, e este mecanismo de inibição do sensor Sho1p, resultará também na inibição da resposta a feromônio (O'Rourke e Herskowitz, 1998). Rep e colaboradores (2000) também encontraram indução de genes relacionados com a via de resposta a feromônio, quando a linhagem mutante *hog1Δ* foi submetida a estresse osmótico com 0,7 M de NaCl ou 0,95 M de sorbitol. Também relatamos no presente trabalho a indução dos principais genes envolvidos na via de resposta a feromônio quando o mutante *hog1Δ* foi submetido ao estresse com ácido sulfúrico (pH 2,5) (Tabela 3). Desta maneira, os resultados encontrados neste trabalho, reforçam uma de nossas hipóteses formuladas em estudo anterior (Lucena *et al.* 2012). Naquele trabalho, sugerimos que o dano causado pelo ácido sulfúrico à parede celular, também poderia expor a membrana celular (como na formação de protoplastos), resultando na diminuição da pressão de turgor, o que mimetizaria um choque hiperosmótico e ativaria a via HOG.

Um dos principais grupos de genes que apresentaram diminuição da expressão gênica no mutante *hog1Δ* estava relacionado com a biossíntese e manutenção da parede celular, incluindo *PST1*, *CWP1* e *PIR3* (Tabela 3). Este resultado também conduz a idéia de que as vias HOG e CWI devem cooperar para a resposta ao estresse ácido. O gene *PST1* codifica para uma proteína que é secretada com o objetivo de regenerar protoplastos (Pardo *et al.*, 1999), sendo bastante induzido quando ocorre danos na parede celular após a ativação da via CWI (Jung e Levin, 1999; Terashima *et al.*, 2000).

A via CWI tem a função de detectar e responder a danos que surgem na parede celular durante as condições normais de crescimento ou quando ocorrem mudanças no ambiente (Levin, 2011). Em nosso trabalho também investigamos a resposta transcricional global da linhagem mutante com deleção para o gene *SLT2* que codifica para a principal proteína quinase da via CWI. Encontramos que os principais grupos de genes induzidos no mutante *slt2Δ* foram àqueles envolvidos com o metabolismo de carboidratos e relacionados com o estresse oxidativo (Tabela 4).

Uma das principais vias reguladoras do metabolismo de carboidratos é a PKA. Esta via é responsável pelo controle do metabolismo, resistência a estresse e

proliferação celular (Thevelein e Winde, 1999; Estruch, 2000; Santangelo, 2006; Zaman *et al.*, 2008). Livas *et al.*, (2011) realizaram experimento onde foi verificada a repressão de diversos genes envolvidos com o metabolismo de carboidratos no triplo mutante *tpk1,2,3Δ*, após adição de glicose ao meio. Em nosso estudo, encontramos que um dos principais grupos de genes induzidos no mutante *slt2Δ* após estresse ácido, estava relacionado com o metabolismo de carboidratos (Tabela 4). Este resultado talvez possa ser explicado através da inibição da via PKA após estresse com ácido sulfúrico. A MAP quinase Slt2p é fosforilada e ativada após danos na parede celular (Levin, 2011), e ela é essencial para o crescimento de *S. cerevisiae* em meio com pH 2,5 ajustado com ácido sulfúrico (Lucena *et al.*, 2012). A subunidade regulatória da proteína quinase A, Bcy1p, pode ser ativada quando fosforilada no resíduo T129 por Slt2p após danos na parede celular (Soulard *et al.*, 2010). Uma vez Bcy1p ativada, ela pode formar um heterodímero com as subunidades catalíticas da PKA Tpk1p, Tpk2p e Tpk3p, impedido sua atividade (Thevelein e de Winde 1999; Santangelo 2006). Desta forma, quando *S. cerevisiae* se encontra diante de um choque com ácido sulfúrico, ocorre ativação de Slt2p que irá fosforilar e ativar Bcy1p, e Bcy1p ativa poderá se ligar as subunidades Tpk1p, Tpk2p e Tpk3p impedindo sua dissociação, e consequentemente diminuindo a atividade da via PKA.

Uma alternativa à hipótese citada acima seria a inibição da via PKA após estresse ácido, por meio da interação de Slt2p com a GAP Ira2p. A proteína Ira2p estimula a atividade GTPase da proteína G Ras, inativando-a. E Ras inativada, não induz a adenilato ciclase a produzir cAMP a partir de AMP, resultando na inativação da via PKA (Thevelein e de Winde 1999; Santangelo 2006; Zaman *et al.*, 2008). Esta hipótese é bastante provável, porque existem evidências da interação entre Slt2p e Ira2p (Tong *et al.*, 2004; Costanzo *et al.*, 2010) (Figura 16).

Outro resultado interessante foi a diminuição na expressão do gene *SSK22* no mutante *slt2Δ* após choque ácido. O gene *SSK22* codifica para uma MAPKKK envolvida na via de sinalização a estresse hiperosmótico HOG. Ssk22p fosforila Pbs2p, que por sua vez fosforila e ativa Hog1p (Tatebayashi *et al.*, 2003; Hohmann, 2009). Em nossos trabalhos anteriores sugerimos a cooperação entre as vias CWI e HOG após danos a parede celular de *S. cerevisiae* causados pelo polihexametil bisguanida PHMB, um

anticéptico bastante utilizado para limpeza de hospitais e tratamento de parasitoses (Elsztein *et al.*, 2011), e causados pelo crescimento em meio com ácido sulfúrico (Lucena *et al.*, 2012). No entanto, ainda não tínhamos descoberto qual era a ligação entre estas duas vias. Sugerimos que esta ligação se faça pela proteína quinase Ssk22p, da seguinte forma: após danos na parede celular causados pelo ácido sulfúrico, Slt2p é fosforilada, onde em seguida ativará fatores de transcrição responsáveis pela indução de vários genes, incluindo *SSK22*. Um dos principais fatores de transcrição ativados por Slt2p é Rlm1p, que se liga na sequência TA(W)4TAG nos promotores de seus genes alvo (Boorsma *et al.*, 2004), sendo responsável pela indução de grande parte dos genes envolvidos com o sinal CWI (Levin, 2011). A MAPKKK Ssk22p também possui a sequência de ligação TA(W)4TAG para Rlm1p em seu promotor, evidenciando ser possível sua regulação via Slt2p-Rlm1p.

Em relação aos genes que foram reprimidos em ambos os mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ*, encontramos genes relacionados com a biossíntese e manutenção da parede celular (*CWP1*, *PST1*, *PIR3*) e o gene *KDX1* que codifica uma proteína pseudoquinase, que divide com Slt2p uma função especializada e não catalítica na transcrição de genes associados com estresse da parede celular e com o ciclo celular (Levin, 2011). Estes resultados revelam mais uma ligação entre as vias CWI e HOG em resposta ao estresse com ácido sulfúrico, tendo Kdx1p como elo. Slt2p ou Kdx1p quando ativadas, podem formar um complexo com Swi4p e Swi6p independente da função catalítica, que se ligará em promotores de diversos genes associados com estresse da parede celular e com o ciclo celular (Levin, 2011). Por outro lado existem evidências da interação da pseudoquinase Kdx1p com o fator de transcrição envolvido na resposta geral a estresse Msn2p (Hruby *et al.*, 2011) (Figura 17). Desta forma, uma vez que Hog1p pode interagir com Msn2p (Rep *et al.*, 2000; Capaldi *et al.*, 2008), seria possível uma conexão destas duas proteínas com Kdx1p para regulação dos genes de resposta a estresse osmótico e de danos a parede celular. Diante destas observações, estaria Kdx1p envolvida com a expressão gênica de *SSK22*? Ainda precisamos de mais investigação para resolver esta questão.

6. DISCUSSÃO GERAL

Diante de nossos resultados da triagem de mutantes e expressão gênica sob condições ácidas, nós elaboramos um modelo com os principais mecanismos envolvidos na resposta a estresse com ácido sulfúrico em *Saccharomyces cerevisiae* (Figura 18). O contato com um ambiente contendo ácido sulfúrico provoca danos a parede celular da levedura. Estes danos são percebidos pelos sensores de membrana, principalmente por Wsc1p. O sinal é conduzido pela via da integridade da parede celular (CWI) até ativar a proteína quinase C. Em seguida, Pkc λ transmite o sinal para a cascata de MAPks Bck1p-Mkk1/2p-Slt2p. Slt2p ativada poderá ativar Rlm1p e Swi4/6p. Rlm1p é responsável pela expressão da maior parte dos genes relacionados com danos a parede celular e Swi4/6p estão relacionadas principalmente com a regulação do ciclo celular (Levin, 2011).

Por outro lado, sugerimos que o dano causado pelo ácido sulfúrico à parede celular, também poderia expor a membrana celular (como na formação de protoplastos), resultando na diminuição da pressão de turgor, o que mimetizaria um choque hiperosmótico e ativaria a via HOG. A principal quinase da via HOG, Hog1p também induz a expressão do gene *SLT2* por meio da ativação de Rlm1p, que por sua vez, comanda a expressão do próprio *SLT2* (Hahn e Thiele 2002) promovendo a amplificação do sinal. Adicionalmente, Slt2p pode ativar as proteínas Cch1p e Mid1p que formam canais de Ca²⁺, conduzindo a um influxo de Ca²⁺ ativando assim, a calcineurina.

Também analisamos a expressão gênica global nas linhagens de *S. cerevisiae* mutantes *hog1Δ* e *slt2Δ* após estresse em meio ajustado para pH 2,5 com ácido sulfúrico. Nós mostramos que a falta destas duas MAP quinases promove alterações importantes no programa de expressão gênica. É possível que genes que estão envolvidos com a via de sinalização HOG sejam induzidos pela via CWI e vice e versa. Talvez o gene para a MAPKKK Ssk22p tenha sua expressão aumentada via Slt2p-Rlm1p uma vez que este gene possui a sequência de ligação TA(W)4TAG para Rlm1p em seu promotor (Boorsma *et al.*, 2004).

Além da hipótese citada acima, pode ocorrer mais uma ligação entre as vias CWI e HOG em resposta ao estresse com ácido sulfúrico, tendo Kdx1p como elo. Slt2p ou Kdx1p quando ativadas, podem formar um complexo com Swi4p e Swi6p independente da função catalítica, que se ligará em promotores de diversos genes associados com estresse da parede celular e com o ciclo celular (Levin, 2011). Por outro lado, existem evidências da interação da pseudoquinase Kdx1p com o fator de transcrição envolvido na resposta geral a estresse Msn2p (Hruby *et al.*, 2011). Desta forma, uma vez que Hog1p pode interagir com Msn2p (Rep *et al.*, 2000; Capaldi *et al.*, 2008), seria possível uma conexão destas duas proteínas com Kdx1p para regulação dos genes de resposta a estresse osmótico e de danos a parede celular (Figura 18).

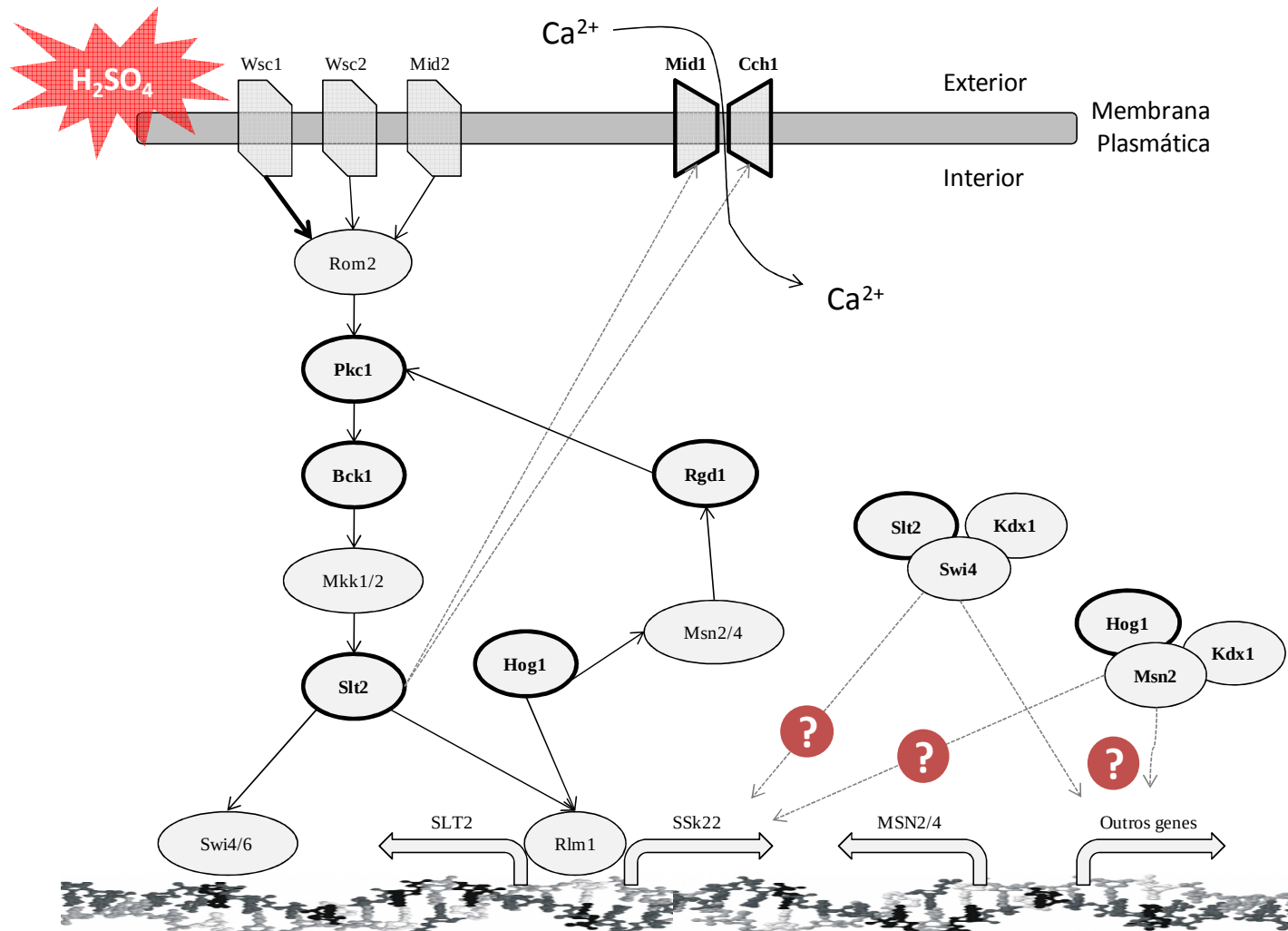


Figura 18. Modelo de mecanismo de resposta ao estresse com ácido sulfúrico em *S. cerevisiae*. As proteínas essenciais para o crescimento de *S. cerevisiae* em baixo pH estão em negrito. As setas mais espessas indicam maior importância para o estímulo da resposta, e as setas tracejadas são especulações funcionais.

7. CONCLUSÕES GERAIS

Em nosso estudo encontramos que os mecanismos celulares e genéticos de resposta ao estresse causado pelo ácido sulfúrico em *S. cerevisiae* surgem principalmente da cooperação entre as vias de integridade da parede celular (CWI) e resposta a alta osmolaridade (HOG). Utilizando os experimentos de crescimento celular e expressão gênica global e específica, encontramos que os principais genes envolvidos com as vias CWI, HOG e a via sinalizada por Ca^{2+} calcineurina, são essenciais na tolerância da levedura ao ambiente ácido. Sugerimos também que o dano causado pelo ácido sulfúrico à parede celular, pode resultar na diminuição da pressão de turgor, o que mimetizaria um choque hiperosmótico e ativaria a via HOG. Adicionalmente a falta das proteínas quinases Hog1p e Slt2p promovem alterações importantes na expressão gênica principalmente relacionada com a biossíntese da parede celular, metabolismo de carboidratos e resposta a feromônios. Finalmente, esta cooperação entre as vias conduzem a um programa de expressão gênica que auxilia e amplifica o sinal de resposta a danos na parede celular, permitindo a sobrevivência e adaptação das células a ambientes de baixo pH com ácido sulfúrico.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar-Uscanga B, François JM. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. *Lett Appl Microbiol*. 2003;37(3):268-74.
- Alberts AS, Bouquin N, Johnston LH, Treisman R. Analysis of RhoA-binding proteins reveals an interaction domain conserved in heterotrimeric G protein beta subunits and the yeast response regulator protein Skn7. *J Biol Chem*. 1998 Apr 10;273(15):8616-22.
- Andrews PD, Stark MJ. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *J Cell Sci*. 2000 Aug;113 (Pt 15):2685-93.
- Aramburu J, Rao A, Klee CB. Calcineurin: from structure to function. *Curr Top Cell Regul*. 2000;36:237-95. Review.
- Audhya A, Emr SD. Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev Cell*. 2002 May;2(5):593-605.
- Ayscough KR, Eby JJ, Lila T, Dewar H, Kozminski KG, Drubin DG. Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol Biol Cell*. 1999 Apr;10(4):1061-75.
- Baetz K, Moffat J, Haynes J, Chang M, Andrews B. Transcriptional coregulation by the cell integrity mitogen-activated protein kinase Slt2 and the cell cycle regulator Swi4. *Mol Cell Biol*. 2001 Oct;21(19):6515-28.
- Bahn YS. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryot Cell*. 2008 Dec;7(12):2017-36. Epub 2008 Oct 24. Review.
- Bardwell L. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides*. 2004 Sep;25(9):1465-76. Review.
- Basílio AC, de Araújo PR, de Moraes JO, da Silva Filho EA, de Moraes MA Jr & Simões DA (2008) Detection and identification of wild yeast contaminants of the industrial fuel ethanol fermentation process. *Curr Microbiol*. Apr;56(4):322-6.
- Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Res*. 2008 Nov;8(7):1155-63.
- Batiza AF, Schulz T, Masson PH. Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse. *J Biol Chem*. 1996 Sep 20;271(38):23357-62.
- Beck T, Hall MN. The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):689-92.
- Bonilla M, Cunningham KW. Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell*. 2003 Oct;14(10):4296-305.
- Bonilla M, Nastase KK, Cunningham KW. Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J*. 2002 May 15;21(10):2343-53.
- Boorsma A, de Nobel H, ter Riet B, Bargmann B, Brul S, Hellingwerf KJ, Klis FM. Characterization of the transcriptional response to cell wall stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*. 2004 Apr 15;21(5):413-27.
- Boy-Marcotte E, Garmendia C, Garreau H, Lallet S, Mallet L, Jacquet M. The transcriptional activation region of Msn2p, in *Saccharomyces cerevisiae*, is regulated by stress but is insensitive to the cAMP signalling pathway. *Mol Genet Genomics*. 2006 Mar;275(3):277-87.

- Boy-Marcotte E, Perrot M, Bussereau F, Boucherie H, Jacquet M. Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1998 Mar;180(5):1044-52.
- Breitkreutz A, Choi H, Sharom JR, Boucher L, Neduva V, Larsen B, Lin ZY, Breitkreutz BJ, Stark C, Liu G, Ahn J, Dewar-Darch D, Reguly T, Tang X, Almeida R, Qin ZS, Pawson T, Gingras AC, Nesvizhskii AI, Tyers M. A global protein kinase and phosphatase interaction network in yeast. *Science*. 2010 May 21;328(5981):1043-6.
- Brett CL, Tukaye DN, Mukherjee S, Rao R. The yeast endosomal Na⁺K⁺/H⁺ exchanger Nhx1 regulates cellular pH to control vesicle trafficking. *Mol Biol Cell*. 2005 Mar;16(3):1396-405. Epub 2005 Jan 5.
- Brewster JL, de Valoir T, Dwyer ND, Winter E, Gustin MC. An osmosensing signal transduction pathway in yeast. *Science*. 1993 Mar 19;259(5102):1760-3.
- Carmelo V, Santos R, Viegas CA, Sá-Correia I. Modification of *Saccharomyces cerevisiae* thermotolerance following rapid exposure to acid stress. *Int J Food Microbiol*. 1998 Jul 21;42(3):225-30.
- Carrasco P, Querol A, del Olmo M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol*. 2001 Jun;175(6):450-7.
- Causton HC, Ren B, Koh SS, Harbison CT, Kanin E, Jennings EG, Lee TI, True HL, Lander ES, Young RA. Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2001 Feb;12(2):323-37.
- Chen AK, Gelling C, Rogers PL, Dawes IW, Rosche B. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to stress-free acidification. *J Microbiol*. 2009 Feb;47(1):1-8. Epub 2009 Feb 20.
- Chen RE, Thorner J. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1773(8):1311-40. Epub 2007 May 22. Review.
- Claret S, Gatti X, Doignon F, Thoraval D, Crouzet M. 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*. 2005 Aug;4(8):1375-86.
- Cooper JA. MAP kinase pathways. Straight and narrow or tortuous and intersecting? *Curr Biol*. 1994 Dec 1;4(12):1118-21. Review.
- Costanzo M, Baryshnikova A, Bellay J, Kim Y, Spear ED, Sevier CS, Ding H, Koh JL, Toufighi K, Mostafavi S, Prinz J, St Onge RP, VanderSluis B, Makhnevych T, Vizeacoumar FJ, Alizadeh S, Bahr S, Brost RL, Chen Y, Cokol M, Deshpande R, Li Z, Lin ZY, Liang W, Marback M, Paw J, San Luis BJ, Shuteriqi E, Tong AH, van Dyk N, Wallace IM, Whitney JA, Weirauch MT, Zhong G, Zhu H, Houry WA, Brudno M, Ragibizadeh S, Papp B, Pál C, Roth FP, Giaever G, Nislow C, Troyanskaya OG, Bussey H, Bader GD, Gingras AC, Morris QD, Kim PM, Kaiser CA, Myers CL, Andrews BJ, Boone C. The genetic landscape of a cell. *Science*. 2010 Jan 22;327(5964):425-31.
- Costigan C, Gehrung S, Snyder M. A synthetic lethal screen identifies SLK1, a novel protein kinase homolog implicated in yeast cell morphogenesis and cell growth. *Mol Cell Biol*. 1992 Mar;12(3):1162-78. PubMed PMID: 1545797;
- Cot M, Loret MO, François J, Benbadis L. Physiological behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Res*. 2007 Jan;7(1):22-32. Epub 2006 Sep 28.
- Cyert MS, Thorner J. Regulatory subunit (CNB1 gene product) of yeast Ca²⁺/calmodulin-dependent phosphoprotein phosphatases is required for adaptation to pheromone. *Mol Cell Biol*. 1992 Aug;12(8):3460-9.

- Cyert MS. Calcineurin signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: how yeast go crazy in response to stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Nov 28;311(4):1143-50. Review.
- Dalley BK and Cannon JF. Novel, activated RAS mutations alter protein-protein interactions. *Oncogene*. 1996 Sep 19;13(6):1209-20.
- Daniel J. Potentially rapid walking in cellular regulatory networks using the gene-gene interference method in yeast. *Mol Gen Genet*. 1993 Aug;240(2):245-57.
- Davenport KR, Sohaskey M, Kamada Y, Levin DE, Gustin MC. A second osmosensing signal transduction pathway in yeast. Hypotonic shock activates the PKC1 protein kinase-regulated cell integrity pathway. *J Biol Chem*. 1995 Dec 15;270(50):30157-61.
- de Bettignies G, Thoraval D, Morel C, Peypouquet MF, Crouzet M. Overactivation of the protein kinase C-signaling pathway suppresses the defects of cells lacking the Rho3/Rho4-GAP Rgd1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 2001 Dec;159(4):1435-48.
- de Nobel H, Ruiz C, Martin H, Morris W, Brul S, Molina M, Klis FM. Cell wall perturbation in yeast results in dual phosphorylation of the Slt2/Mpk1 MAP kinase and in an Slt2-mediated increase in FKS2-lacZ expression, glucanase resistance and thermotolerance. *Microbiology*. 2000 Sep;146 (Pt 9):2121-32.
- De Nobel JG, Barnett JA. Passage of molecules through yeast cell walls: a brief essay-review. *Yeast*. 1991 May-Jun;7(4):313-23. Review.
- Dodou E, Treisman R. The *Saccharomyces cerevisiae* MADS-box transcription factor Rlm1 is a target for the Mpk1 mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 1997 Apr;17(4):1848-59.
- Douglas CM, Foor F, Marrinan JA, Morin N, Nielsen JB, Dahl AM, Mazur P, Baginsky W, Li W, el-Sherbeini M, et al. The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12907-11.
- Drgonová J, Drgon T, Tanaka K, Kollár R, Chen GC, Ford RA, Chan CS, Takai Y, Cabib E. Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):277-9.
- Errede B, Cade RM, Yashar BM, Kamada Y, Levin DE, Irie K, Matsumoto K. Dynamics and organization of MAP kinase signal pathways. *Mol Reprod Dev*. 1995 Dec;42(4):477-85. Review.
- Estruch F, Carlson M. Two homologous zinc finger genes identified by multicopy suppression in a SNF1 protein kinase mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1993 Jul;13(7):3872-81.
- Estruch F. Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev*. 2000 Oct;24(4):469-86. Review.
- Ezaki B, Gardner RC, Ezaki Y, Kondo H, Matsumoto H. Protective roles of two aluminum (Al)-induced genes, HSP150 and SED1 of *Saccharomyces cerevisiae*, in Al and oxidative stresses. *FEMS Microbiol Lett*. 1998 Feb 1;159(1):99-105.
- Fernandes AR, Mira NP, Vargas RC, Canelhas I, Sá-Correia I. *Saccharomyces cerevisiae* adaptation to weak acids involves the transcription factor Haa1p and Haa1p-regulated genes. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005 Nov 11;337(1):95-103.
- Finger FP, Novick P. Spatial regulation of exocytosis: lessons from yeast. *J Cell Biol*. 1998 Aug 10;142(3):609-12. Review.
- Flynn P, Mellor H, Palmer R, Panayotou G, Parker PJ. Multiple interactions of PRK1 with RhoA. Functional assignment of the Hr1 repeat motif. *J Biol Chem*. 1998 Jan 30;273(5):2698-705.

- Forgac M. Structure and properties of the vacuolar (H⁺)-ATPases. *J Biol Chem*. 1999 May 7;274(19):12951-4. Review.
- François J, Villanueva ME, Hers HG. The control of glycogen metabolism in yeast. 1. Interconversion in vivo of glycogen synthase and glycogen phosphorylase induced by glucose, a nitrogen source or uncouplers. *Eur J Biochem*. 1988 Jun 15;174(3):551-9.
- Fuchs BB, Mylonakis E. Our paths might cross: the role of the fungal cell wall integrity pathway in stress response and cross talk with other stress response pathways. *Eukaryot Cell*. 2009 Nov;8(11):1616-25. Review.
- Garay-Arroyo A, Covarrubias AA, Clark I, Niño I, Gosset G, Martinez A. Response to different environmental stress conditions of industrial and laboratory *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004 Feb;63(6):734-41.
- García R, Bermejo C, Grau C, Pérez R, Rodríguez-Peña JM, Francois J, Nombela C, Arroyo J. The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *J Biol Chem*. 2004 Apr 9;279(15):15183-95.
- Garreau H, Hasan RN, Renault G, Estruch F, Boy-Marcotte E, Jacquet M. Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 2000 Sep;146 (Pt 9):2113-20.
- Garrett-Engle P, Moilanen B, Cyert MS. Calcineurin, the Ca²⁺/calmodulin-dependent protein phosphatase, is essential in yeast mutants with cell integrity defects and in mutants that lack a functional vacuolar H⁺-ATPase. *Mol Cell Biol*. 1995 Aug;15(8):4103-14.
- Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell*. 2000 Dec;11(12):4241-57.
- Gatti X, de Bettignies G, Claret S, Doignon F, Crouzet M, Thoraval D. RGD1, encoding a RhoGAP involved in low-pH survival, is an Msn2p/Msn4p regulated gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 2005 May 23;351:159-69.
- Giannattasio S, Guaragnella N, Corte-Real M, Passarella S, Marra E. Acid stress adaptation protects *Saccharomyces cerevisiae* from acetic acid-induced programmed cell death. *Gene*. 2005 Jul 18;354:93-8.
- Gibson BR, Lawrence SJ, Leclaire JP, Powell CD, Smart KA. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol Rev*. 2007 Sep;31(5):535-69. Epub 2007 Jul 20. Review.
- Goffeau A, Slayman CW. The proton-translocating ATPase of the fungal plasma membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1981 Dec 30;639(3-4):197-223. Review.
- Görner W, Durchschlag E, Martinez-Pastor MT, Estruch F, Ammerer G, Hamilton B, Ruis H, Schüller C. Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev*. 1998 Feb 15;12(4):586-97.
- Görner W, Durchschlag E, Wolf J, Brown EL, Ammerer G, Ruis H, Schüller C. Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J*. 2002 Jan 15;21(1-2):135-44.
- Gray JV, Ogas JP, Kamada Y, Stone M, Levin DE, Herskowitz I. A role for the Pkc1 MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J*. 1997 Aug 15;16(16):4924-37.
- Green R, Lesage G, Sdicu AM, Ménard P, Bussey H. A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology*. 2003 Sep;149(Pt 9):2487-99.

- Gustin MC, Albertyn J, Alexander M, Davenport K. MAP kinase pathways in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev.* 1998 Dec;62(4):1264-300. Review.
- Hahn JS, Thiele DJ. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21278-84.
- Hahn JS, Thiele DJ. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21278-84.
- Hahn JS, Thiele DJ. Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem.* 2002 Jun 14;277(24):21278-84. Epub 2002 Mar 28.
- Herskowitz I. MAP kinase pathways in yeast: for mating and more. *Cell.* 1995 Jan 27;80(2):187-97. Review.
- Hirata R, Ohsumi Y, Nakano A, Kawasaki H, Suzuki K, Anraku Y. Molecular structure of a gene, VMA1, encoding the catalytic subunit of H(+)-translocating adenosine triphosphatase from vacuolar membranes of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1990 Apr 25;265(12):6726-33.
- Hirt H. Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends Plant Sci.* 1997 Jan;2:11-15.
- Hohmann S and Mager WH. Yeast Stress Response. Topics in Current Genetics, Vol. 1 Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 2003.
- Hohmann S, Krantz M, Nordlander B. Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol.* 2007;428:29-45. Review.
- Hohmann S. Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2002 Jun;66(2):300-72. Review.
- Hruby A, Zapotka M, Heucke S, Rieger L, Wu Y, Nussbaumer U, Timmermann S, Dünkler A, Johnsson N. A constraint network of interactions: protein-protein interaction analysis of the yeast type II phosphatase Ptc1p and its adaptor protein Nbp2p. *J Cell Sci.* 2011 Jan 1;124(Pt 1):35-46.
- Igual JC, Johnson AL, Johnston LH. Coordinated regulation of gene expression by the cell cycle transcription factor Swi4 and the protein kinase C MAP kinase pathway for yeast cell integrity. *EMBO J.* 1996 Sep 16;15(18):5001-13.
- Iida H, Nakamura H, Ono T, Okumura MS, Anraku Y. MID1, a novel *Saccharomyces cerevisiae* gene encoding a plasma membrane protein, is required for Ca²⁺ influx and mating. *Mol Cell Biol.* 1994 Dec;14(12):8259-71.
- Irie K, Takase M, Lee KS, Levin DE, Araki H, Matsumoto K, Oshima Y. 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.* 1993 May;13(5):3076-83.
- Iyer VR, Horak CE, Scafe CS, Botstein D, Snyder M, Brown PO. Genomic binding sites of the yeast cell-cycle transcription factors SBF and MBF. *Nature.* 2001 Jan 25;409(6819):533-8.
- Jacoby JJ, Nilius SM, Heinisch JJ. A screen for upstream components of the yeast protein kinase C signal transduction pathway identifies the product of the SLG1 gene. *Mol Gen Genet.* 1998 Apr;258(1-2):148-55.
- Jacquet M, Renault G, Lallet S, De Mey J, Goldbeter A. Oscillatory nucleocytoplasmic shuttling of the general stress response transcriptional activators Msn2 and Msn4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 2003 May 12;161(3):497-505. Epub 2003 May 5.

- Jensen LJ, Kuhn M, Stark M, Chaffron S, Creevey C, Muller J, Doerks T, Julien P, Roth A, Simonovic M, Bork P, von Mering C. STRING 8--a global view on proteins and their functional interactions in 630 organisms. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D412-6.
- Jiang Y, Davis C, Broach JR. Efficient transition to growth on fermentable carbon sources in *Saccharomyces cerevisiae* requires signaling through the Ras pathway. *EMBO J.* 1998 Dec 1;17(23):6942-51.
- Jiménez-Sánchez M, Cid VJ, Molina M. Retrophosphorylation of Mkk1 and Mkk2 MAPKKs by the Slt2 MAPK in the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem.* 2007 Oct 26;282(43):31174-85. Epub 2007 Aug 20.
- Jung US, Levin DE. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol.* 1999 Dec;34(5):1049-57.
- Jung US, Sobering AK, Romeo MJ, Levin DE. Regulation of the yeast Rlm1 transcription factor by the Mpk1 cell wall integrity MAP kinase. *Mol Microbiol.* 2002 Nov;46(3):781-9.
- Kamada Y, Jung US, Piotrowski J, Levin DE. The protein kinase C-activated MAP kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* mediates a novel aspect of the heat shock response. *Genes Dev.* 1995 Jul 1;9(13):1559-71.
- Kamada Y, Qadota H, Python CP, Anraku Y, Ohya Y, Levin DE. Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem.* 1996 Apr 19;271(16):9193-6.
- Kapteyn JC, ter Riet B, Vink E, Blad S, De Nobel H, Van Den Ende H, Klis FM. Low external pH induces HOG1-dependent changes in the organization of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Mol Microbiol.* 2001 Jan;39(2):469-79.
- Kapteyn JC, Van Den Ende H, Klis FM. The contribution of cell wall proteins to the organization of the yeast cell wall. *Biochim Biophys Acta.* 1999a Jan 6;1426(2):373-83. Review.
- Kapteyn JC, Van Egmond P, Sievi E, Van Den Ende H, Makarow M, Klis FM. The contribution of the O-glycosylated protein Pir2p/Hsp150 to the construction of the yeast cell wall in wild-type cells and beta 1,6-glucan-deficient mutants. *Mol Microbiol.* 1999b Mar;31(6):1835-44.
- Kasulke D, Seitz S, Ehrenhofer-Murray AE. A role for the *Saccharomyces cerevisiae* RENT complex protein Net1 in HMR silencing. *Genetics.* 2002 Aug;161(4):1411-23.
- Kataoka T, Powers S, McGill C, Fasano O, Strathern J, Broach J, Wigler M. Genetic analysis of yeast RAS1 and RAS2 genes. *Cell.* 1984 Jun;37(2):437-45.
- Kawahata M, Masaki K, Fujii T, Iefuji H. Yeast genes involved in response to lactic acid and acetic acid: acidic conditions caused by the organic acids in *Saccharomyces cerevisiae* cultures induce expression of intracellular metal metabolism genes regulated by Aft1p. *FEMS Yeast Res.* 2006 Sep;6(6):924-36.
- Ketela T, Green R, Bussey H. *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol.* 1999 Jun;181(11):3330-40.
- Keyse SM. Protein phosphatases and the regulation of mitogen-activated protein kinase signalling. *Curr Opin Cell Biol.* 2000 Apr;12(2):186-92. Review.
- Kim KY, Truman AW, Levin DE. Yeast Mpk1 mitogen-activated protein kinase activates transcription through Swi4/Swi6 by a noncatalytic mechanism that requires upstream signal. *Mol Cell Biol.* 2008 Apr;28(8):2579-89.
- Klein C, Struhl K. Protein kinase A mediates growth-regulated expression of yeast ribosomal protein genes by modulating RAP1 transcriptional activity. *Mol Cell Biol.* 1994 Mar;14(3):1920-8.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PW. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2006 Feb;23(3):185-202. Review.

- Kobayashi N, McEntee K. Identification of cis and trans components of a novel heat shock stress regulatory pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1993 Jan;13(1):248-56.
- Koch C, Nasmyth K. Cell cycle regulated transcription in yeast. *Curr Opin Cell Biol*. 1994 Jun;6(3):451-9. Review.
- Kollár R, Reinhold BB, Petráková E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonová J, Kapteyn JC, Klis FM, Cabib E. Architecture of the yeast cell wall. β 1,6-glucan interconnects mannoprotein, β 1,3-glucan, and chitin. *J Biol Chem*. 1997 Jul 11;272(28):17762-75.
- Konrad M. Analysis and in vivo disruption of the gene coding for adenylate kinase (ADK1) in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1988 Dec 25;263(36):19468-74.
- Lawrence CL, Botting CH, Antrobus R, Coote PJ. Evidence of a new role for the high-osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in yeast: regulating adaptation to citric acid stress. *Mol Cell Biol*. 2004 Apr;24(8):3307-23.
- Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem*. 1999 Jun 4;274(23):16040-6.
- Lee KS, Irie K, Gotoh Y, Watanabe Y, Araki H, Nishida E, Matsumoto K, Levin DE. A yeast mitogen-activated protein kinase homolog (Mpk1p) mediates signalling by protein kinase C. *Mol Cell Biol*. 1993 May;13(5):3067-75.
- Lee KS, Levin DE. 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*. 1992 Jan;12(1):172-82.
- Lee P, Cho BR, Joo HS, Hahn JS. Yeast Yak1 kinase, a bridge between PKA and stress-responsive transcription factors, Hsf1 and Msn2/Msn4. *Mol Microbiol*. 2008 Nov;70(4):882-95.
- Levin DE, Bartlett-Heubusch E. Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *J Cell Biol*. 1992 Mar;116(5):1221-9.
- Levin DE, Bowers B, Chen CY, Kamada Y, Watanabe M. Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res*. 1994;40(3):229-39.
- Levin DE, Fields FO, Kunisawa R, Bishop JM, Thorner J. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell*. 1990 Jul 27;62(2):213-24.
- Levin DE. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2005 Jun;69(2):262-91.
- Levin DE. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. 2011 Dec;189(4):1145-75. Review.
- Lewis JG, Learmonth RP, Watson K. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*. 1995 Mar;141 (Pt 3):687-94.
- Li SC, Kane PM. The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim Biophys Acta*. 2009 Apr;1793(4):650-63. Epub 2008 Aug 13. Review.
- Liberal ATS, Basílio ACM, Brasileiro BTRV, Silva-Filho EA, Simões DA & de Moraes-Jr MA (2007) Identification of the yeast *Dekkera bruxellensis* as major contaminant in continuous fuel ethanol fermentation. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 538-547.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
- Livas D, Almering MJ, Daran JM, Pronk JT, Gancedo JM. Transcriptional responses to glucose in *Saccharomyces cerevisiae* strains lacking a functional protein kinase A. *BMC Genomics*. 2011 Aug 9;12:405. doi: 10.1186/1471-2164-12-405.

- Llopis J, McCaffery JM, Miyawaki A, Farquhar MG, Tsien RY. Measurement of cytosolic, mitochondrial, and Golgi pH in single living cells with green fluorescent proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6803-8.
- Locke EG, Bonilla M, Liang L, Takita Y, Cunningham KW. A homolog of voltage-gated Ca(2+) channels stimulated by depletion of secretory Ca(2+) in yeast. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(18):6686-94.
- Lorberg A, Schmitz HP, Jacoby JJ, Heinisch JJ. Lrg1p functions as a putative GTPase-activating protein in the Pkc1p-mediated cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics*. 2001 Nov;266(3):514-26.
- Lucena BT, dos Santos BM, Moreira JL, Moreira AP, Nunes AC, Azevedo V, Miyoshi A, Thompson FL & de Morais MA Jr (2010) Diversity of lactic acid bacteria of the bioethanol process. *BMC Microbiol*. Nov 23;10:298.
- Lucena RM, Elsztein C, Simões DA, de Morais MA Jr. Participation of CWI, HOG and Calcineurin pathways in the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to low pH by inorganic acid. *J Appl Microbiol*. 2012 Jun 16.
- Madden K, Sheu YJ, Baetz K, Andrews B, Snyder M. SBF cell cycle regulator as a target of the yeast PKC-MAP kinase pathway. *Science*. 1997 Mar 21;275(5307):1781-4.
- Manning BD, Padmanabha R, Snyder M. The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 1997 Oct;8(10):1829-44.
- Marchler G, Schüller C, Adam G, Ruis H. A *Saccharomyces cerevisiae* UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions. *EMBO J*. 1993 May;12(5).
- Marshall CJ. MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr Opin Genet Dev*. 1994 Feb;4(1):82-9. Review.
- Martin H, Dagkessamanskaia A, Satchanska G, Dallies N, François J. KNR4, a suppressor of *Saccharomyces cerevisiae* cwh mutants, is involved in the transcriptional control of chitin synthase genes. *Microbiology*. 1999 Jan;145 (Pt 1):249-58.
- Martínez-Muñoz GA, Kane P. Vacuolar and plasma membrane proton pumps collaborate to achieve cytosolic pH homeostasis in yeast. *J Biol Chem*. 2008 Jul 18;283(29):20309-19.
- Martínez-Pastor MT, Marchler G, Schüller C, Marchler-Bauer A, Ruis H, Estruch F. The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J*. 1996 May 1;15(9):2227-35.
- Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Basmaji F, Lagorce A, Francois J. The interaction of Slt2 MAP kinase with Knr4 is necessary for signalling through the cell wall integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2003 Jul;49(1):23-35.
- Martin-Yken H, Dagkessamanskaia A, Talibi D, Francois J. KNR4 is a member of the PKC1 signalling pathway and genetically interacts with BCK2, a gene involved in cell cycle progression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*. 2002 Aug;41(5):323-32.
- Matheos DP, Kingsbury TJ, Ahsan US, Cunningham KW. Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11(24):3445-58.
- Matsumoto K, Uno I, Oshima Y, Ishikawa T. Isolation and characterization of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1982 Apr;79(7):2355-9.

- Mazón MJ, Gancedo JM, Gancedo C. Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-bisphosphatase in vivo by glucose and by proton ionophores. A possible role for cAMP. *Eur J Biochem.* 1982 Oct;127(3):605-8.
- Mazur P, Baginsky W. In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem.* 1996 Jun 14;271(24):14604-9.
- Mazur P, Morin N, Baginsky W, el-Sherbeini M, Clemas JA, Nielsen JB, Foor F. Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol.* 1995 Oct;15(10):5671-81.
- Mellor H, Parker PJ. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* 1998 Jun 1;332 (Pt 2):281-92. Review.
- Melo HF, Bonini BM, Thevelein J, Simões DA, Morais MA Jr. Physiological and molecular analysis of the stress response of *Saccharomyces cerevisiae* imposed by strong inorganic acid with implication to industrial fermentations. *J Appl Microbiol.* 2010 Jul;109(1):116-27.
- Mendoza I, Rubio F, Rodriguez-Navarro A, Pardo JM. The protein phosphatase calcineurin is essential for NaCl tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1994 Mar 25;269(12):8792-6.
- Moser MJ, Geiser JR, Davis TN. Ca²⁺-calmodulin promotes survival of pheromone-induced growth arrest by activation of calcineurin and Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase. *Mol Cell Biol.* 1996 Sep;16(9):4824-31.
- Moskvina E, Schüller C, Maurer CT, Mager WH, Ruis H. A search in the genome of *Saccharomyces cerevisiae* for genes regulated via stress response elements. *Yeast.* 1998 Aug;14(11):1041-50.
- Mrsá V, Seidl T, Gentzsch M, Tanner W. Specific labelling of cell wall proteins by biotinylation. Identification of four covalently linked O-mannosylated proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 1997 Sep 30;13(12):1145-54.
- Muller EM, Locke EG, Cunningham KW. Differential regulation of two Ca²⁺ influx systems by pheromone signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2001 Dec;159(4):1527-38.
- Nakamura T, Liu Y, Hirata D, Namba H, Harada S, Hirokawa T, Miyakawa T. 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.* 1993 Nov;12(11):4063-71.
- Navarro-García F, Alonso-Monge R, Rico H, Pla J, Sentandreu R, Nombela C. A role for the MAP kinase gene MKC1 in cell wall construction and morphological transitions in *Candida albicans*. *Microbiology.* 1998 Feb;144 (Pt 2):411-24.
- Neuman-Silberberg FS, Bhattacharya S, Broach JR. Nutrient availability and the RAS/cyclic AMP pathway both induce expression of ribosomal protein genes in *Saccharomyces cerevisiae* but by different mechanisms. *Mol Cell Biol.* 1995 Jun;15(6):3187-96.
- Nevitt T, Pereira J, Azevedo D, Guerreiro P, Rodrigues-Pousada C. Expression of YAP4 in *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Biochem J.* 2004a Apr 15;379(Pt 2):367-74.
- Nevitt T, Pereira J, Rodrigues-Pousada C. YAP4 gene expression is induced in response to several forms of stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2004b Dec;21(16):1365-74.
- Newton AC. Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J Biol Chem.* 1995 Dec 1;270(48):28495-8. Review.
- Nikawa J, Sass P, Wigler M. Cloning and characterization of the low-affinity cyclic AMP phosphodiesterase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1987 Oct;7(10):3629-36.
- Nishimura K, Igarashi K, Kakinuma Y. Proton gradient-driven nickel uptake by vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* 1998 Apr;180(7):1962-4.

- Nonaka H, Tanaka K, Hirano H, Fujiwara T, Kohno H, Umikawa M, Mino A, Takai Y. 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.* 1995 Dec 1;14(23):5931-8.
- Norbeck J, Blomberg A. The level of cAMP-dependent protein kinase A activity strongly affects osmotolerance and osmo-instigated gene expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast.* 2000 Jan 30;16(2):121-37.
- Ohsumi Y, Anraku Y. Active transport of basic amino acids driven by a proton motive force in vacuolar membrane vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 1981 Mar 10;256(5):2079-82.
- Orij R, Postmus J, Ter Beek A, Brul S, Smits GJ. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology.* 2009 Jan;155(Pt 1):268-78.
- O'Rourke SM, Herskowitz I. The Hog1 MAPK prevents cross talk between the HOG and pheromone response MAPK pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 1998 Sep 15;12(18):2874-86.
- Ozaki K, Tanaka K, Imamura H, Hihara T, Kameyama T, Nonaka H, Hirano H, Matsuura Y, Takai Y. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 1996 May 1;15(9):2196-207.
- Paravicini G, Cooper M, Friedli L, Smith DJ, Carpentier JL, Klig LS, Payton MA. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Mol Cell Biol.* 1992 Nov;12(11):4896-905.
- Paravicini G, Friedli L. Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet.* 1996 Jul 26;251(6):682-91.
- Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sánchez M, Gil C, Nombela C. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast.* 1999 Apr;15(6):459-72.
- Pardo M, Monteoliva L, Pla J, Sánchez M, Gil C, Nombela C. Two-dimensional analysis of proteins secreted by *Saccharomyces cerevisiae* regenerating protoplasts: a novel approach to study the cell wall. *Yeast.* 1999 Apr;15(6):459-72.
- Park JI, Collinson EJ, Grant CM, Dawes IW. Rom2p, the Rho1 GTP/GDP exchange factor of *Saccharomyces cerevisiae*, can mediate stress responses via the Ras-cAMP pathway. *J Biol Chem.* 2005 Jan 28;280(4):2529-35.
- Paroutis P, Touret N, Grinstein S. The pH of the secretory pathway: measurement, determinants, and regulation. *Physiology (Bethesda).* 2004 Aug;19:207-15. Review.
- Peterson J, Zheng Y, Bender L, Myers A, Cerione R, Bender A. Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J Cell Biol.* 1994 Dec;127(5):1395-406.
- Petkova MI, Pujol-Carrion N, de la Torre-Ruiz MA. Signal flow between CWI/TOR and CWI/RAS in budding yeast under conditions of oxidative stress and glucose starvation. *Commun Integr Biol.* 2010 Nov;3(6):555-7.
- Philip B, Levin DE. 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.* 2001 Jan;21(1):271-80.
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology.* 2001 Oct;147(Pt 10):2635-42. Review.

- Powers S, Kataoka T, Fasano O, Goldfarb M, Strathern J, Broach J, Wigler M. Genes in *S. cerevisiae* encoding proteins with domains homologous to the mammalian ras proteins. *Cell*. 1984 Mar;36(3):607-12.
- Preston RA, Murphy RF, Jones EW. Assay of vacuolar pH in yeast and identification of acidification-defective mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Sep;86(18):7027-31.
- Pruyne D, Gao L, Bi E, Bretscher A. Stable and dynamic axes of polarity use distinct formin isoforms in budding yeast. *Mol Biol Cell*. 2004 Nov;15(11):4971-89. Epub 2004 Sep 15.
- Ptacek J, Devgan G, Michaud G, Zhu H, Zhu X, Fasolo J, Guo H, Jona G, Breitkreutz A, Sopko R, McCartney RR, Schmidt MC, Rachidi N, Lee SJ, Mah AS, Meng L, Stark MJ, Stern DF, De Virgilio C, Tyers M, Andrews B, Gerstein M, Schweitzer B, Predki PF, Snyder M. Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature*. 2005 Dec 1;438(7068):679-84.
- Qadota H, Python CP, Inoue SB, Arisawa M, Anraku Y, Zheng Y, Watanabe T, Levin DE, Ohya Y. Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science*. 1996 Apr 12;272(5259):279-81.
- Raitt DC, Johnson AL, Erkin AM, Makino K, Morgan B, Gross DS, Johnston LH. The Skn7 response regulator of *Saccharomyces cerevisiae* interacts with Hsf1 in vivo and is required for the induction of heat shock genes by oxidative stress. *Mol Biol Cell*. 2000 Jul;11(7):2335-47.
- Rajavel M, Philip B, Buehrer BM, Errede B, Levin DE. Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1999 Jun;19(6):3969-76.
- Rangel DEN. Stress induced cross-protection against environmental challenges on prokaryotic and eukaryotic microbes. *World J Microbiol Biotechnol*. 2010 Oct 16; 26:001-050. Review.
- Rodrigues-Pousada C, Menezes RA, Pimentel C. The Yap family and its role in stress response. *Yeast*. 2010 May;27(5):245-58. Review.
- Roemer T, Paravicini G, Payton MA, Bussey H. Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *J Cell Biol*. 1994 Oct;127(2):567-79.
- Ruis H, Schüller C. Stress signaling in yeast. *Bioessays*. 1995 Nov;17(11):959-65. Review.
- Rusnak F, Mertz P. Calcineurin: form and function. *Physiol Rev*. 2000 Oct;80(4):1483-521. Review.
- Russo P, Simonen M, Uimari A, Teesalu T, Makarow M. Dual regulation by heat and nutrient stress of the yeast HSP150 gene encoding a secretory glycoprotein. *Mol Gen Genet*. 1993 May;239(1-2):273-80.
- Saito H, Tatebayashi K. Regulation of the osmoregulatory HOG MAPK cascade in yeast. *J Biochem*. 2004 Sep;136(3):267-72. Review.
- Saito H. Regulation of cross-talk in yeast MAPK signaling pathways. *Curr Opin Microbiol*. 2010 Dec;13(6):677-83. Epub 2010 Sep 27. Review.
- Sanchez Y, Taulien J, Borkovich KA, Lindquist S. Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO J*. 1992 Jun;11(6):2357-64.
- Santangelo GM. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2006 Mar;70(1):253-82. Review.
- Schell DJ, Dowe N, Ibsen KN, Riley CJ, Ruth MF & Lumpkin RE (2007) Contaminant occurrence, identification and control in a pilot-scale corn fiber to ethanol conversion process. *Bioresour Technol*. Nov;98(15):2942-8.
- Schmidt A, Schmelzle T, Hall MN. The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 2002 Sep;45(5):1433-41.
- Schmitt AP, McEntee K. Msn2p, a zinc finger DNA-binding protein, is the transcriptional activator of the multistress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5777-82.

- Schricker R, Angermayr M, Strobel G, Klinke S, Korber D, Bandlow W. Redundant mitochondrial targeting signals in yeast adenylate kinase. *J Biol Chem*. 2002 Aug 9;277(32):28757-64. Epub 2002 Jun 3.
- Schüller C, Brewster JL, Alexander MR, Gustin MC, Ruis H. The HOG pathway controls osmotic regulation of transcription via the stress response element (STRE) of the *Saccharomyces cerevisiae* CTT1 gene. *EMBO J*. 1994 Sep 15;13(18):4382-9.
- Schüller C, Mamnun YM, Mollapour M, Krapf G, Schuster M, Bauer BE, Piper PW, Kuchler K. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):706-20. Epub 2003 Nov 14.
- Schüller C, Mamnun YM, Mollapour M, Krapf G, Schuster M, Bauer BE, Piper PW, Kuchler K. Global phenotypic analysis and transcriptional profiling defines the weak acid stress response regulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 2004 Feb;15(2):706-20. Epub 2003 Nov 14.
- Schwartz MA, Madhani HD. Principles of MAP kinase signaling specificity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*. 2004;38:725-48. Review.
- Serrano R, Martín H, Casamayor A, Ariño J. Signaling alkaline pH stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* through the Wsc1 cell surface sensor and the Slt2 MAPK pathway. *J Biol Chem*. 2006 Dec 29;281(52):39785-95.
- Shimizu J, Yoda K, Yamasaki M. The hypo-osmolarity-sensitive phenotype of the *Saccharomyces cerevisiae* hpo2 mutant is due to a mutation in PKC1, which regulates expression of beta-glucanase. *Mol Gen Genet*. 1994 Mar;242(6):641-8.
- Silva Filho EA, de Melo HF, Antunes DF, dos Santos SK, do Monte Resende A, Simões DA, de Moraes MA Jr. Isolation by genetic and physiological characteristics of a fuel-ethanol fermentative *Saccharomyces cerevisiae* strain with potential for genetic manipulation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2005b Oct;32(10):481-6.
- Silva-Filho EA, Brito dos Santos SK, Resende Ado M, de Moraes JO, de Moraes MA Jr, Ardaillon Simões D. Yeast population dynamics of industrial fuel-ethanol fermentation process assessed by PCR-fingerprinting. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2005a Jul;88(1):13-23.
- Skinner KA and Leathers TD (2004). Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J Ind Microbiol Biotechnol*. Oct;31(9):401-8.
- Smith A, Ward MP, Garrett S. Yeast PKA represses Msn2p/Msn4p-dependent gene expression to regulate growth, stress response and glycogen accumulation. *EMBO J*. 1998 Jul 1;17(13):3556-64.
- Soulard A, Cremonesi A, Moes S, Schütz F, Jenö P, Hall MN. The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Mol Biol Cell*. 2010 Oct 1;21(19):3475-86.
- Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA. The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol*. 2010 Jul;109(1):13-24.
- Stathopoulos AM, Cyert MS. Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11(24):3432-44.
- Stathopoulos-Gerontides A, Guo JJ, Cyert MS. Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev*. 1999 Apr 1;13(7):798-803.
- Tanaka K, Matsumoto K, Toh-E A. IRA1, an inhibitory regulator of the RAS-cyclic AMP pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 1989 Feb;9(2):757-68.

- Tanaka K, Nakafuku M, Satoh T, Marshall MS, Gibbs JB, Matsumoto K, Kaziro Y, Toh-e A. S. *cerevisiae* genes IRA1 and IRA2 encode proteins that may be functionally equivalent to mammalian ras GTPase activating protein. *Cell*. 1990 Mar 9;60(5):803-7.
- Tatchell K, Chaleff DT, DeFeo-Jones D, Scolnick EM. Requirement of either of a pair of ras-related genes of *Saccharomyces cerevisiae* for spore viability. *Nature*. 1984 Jun 7-13;309(5968):523-7.
- Tatebayashi K, Takekawa M, Saito H. A docking site determining specificity of Pbs2 MAPKK for Ssk2/Ssk22 MAPKKs in the yeast HOG pathway. *EMBO J*. 2003 Jul 15;22(14):3624-34.
- Terashima H, Yabuki N, Arisawa M, Hamada K, Kitada K. Up-regulation of genes encoding glycosylphosphatidylinositol (GPI)-attached proteins in response to cell wall damage caused by disruption of FKS1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*. 2000 Sep;264(1-2):64-74.
- Thevelein JM, de Winde JH. Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol*. 1999 Sep;33(5):904-18. Review.
- Thevelein JM. Signal transduction in yeast. *Yeast*. 1994 Dec;10(13):1753-90. Review.
- Toda T, Uno I, Ishikawa T, Powers S, Kataoka T, Broek D, Cameron S, Broach J, Matsumoto K, Wigler M. In yeast, RAS proteins are controlling elements of adenylate cyclase. *Cell*. 1985 Jan;40(1):27-36.
- Tong AH, Lesage G, Bader GD, Ding H, Xu H, Xin X, Young J, Berriz GF, Brost RL, Chang M, Chen Y, Cheng X, Chua G, Friesen H, Goldberg DS, Haynes J, Humphries C, He G, Hussein S, Ke L, Krogan N, Li Z, Levinson JN, Lu H, Ménard P, Munyana C, Parsons AB, Ryan O, Tonikian R, Roberts T, Sdicu AM, Shapiro J, Sheikh B, Suter B, Wong SL, Zhang LV, Zhu H, Burd CG, Munro S, Sander C, Rine J, Greenblatt J, Peter M, Bretscher A, Bell G, Roth FP, Brown GW, Andrews B, Bussey H, Boone C. Global mapping of the yeast genetic interaction network. *Science*. 2004 Feb 6;303(5659):808-13.
- Treger JM, Magee TR, McEntee K. Functional analysis of the stress response element and its role in the multistress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998a Feb 4;243(1):13-9.
- Treger JM, Schmitt AP, Simon JR, McEntee K. Transcriptional factor mutations reveal regulatory complexities of heat shock and newly identified stress genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998b Oct 9;273(41):26875-9.
- Tsuchiya E, Hosotani T, Miyakawa T. A mutation in NPS1/STH1, an essential gene encoding a component of a novel chromatin-remodeling complex RSC, alters the chromatin structure of *Saccharomyces cerevisiae* centromeres. *Nucleic Acids Res*. 1998 Jul 1;26(13):3286-92.
- van Drogen F, Peter M. Spa2p functions as a scaffold-like protein to recruit the Mpk1p MAP kinase module to sites of polarized growth. *Curr Biol*. 2002 Oct 1;12(19):1698-703.
- Verna J, Lodder A, Lee K, Vagts A, Ballester R. 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*. 1997 Dec 9;94(25):13804-9.
- Vilella F, Herrero E, Torres J, de la Torre-Ruiz MA. 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*. 2005 Mar 11;280(10):9149-59.
- Watanabe M, Chen CY, Levin DE. *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *J Biol Chem*. 1994 Jun 17;269(24):16829-36.

- Watanabe Y, Irie K, Matsumoto K. Yeast RLM1 encodes a serum response factor-like protein that may function downstream of the Mpk1 (Slt2) mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol.* 1995 Oct;15(10):5740-9.
- Wheals AE, Basso LC, Alves DM, Amorim HV. Fuel ethanol after 25 years. *Trends Biotechnol.* 1999 Dec;17(12):482-7.
- Wilson BA, Khalil M, Tamanoi F, Cannon JF. New activated RAS2 mutations identified in *Saccharomyces cerevisiae*. *Oncogene.* 1993 Dec;8(12):3441-5.
- Wilson RB and Tatchell K. SRA5 encodes the low-K_m cyclic AMP phosphodiesterase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 1988 Jan;8(1):505-10.
- Wohlrab H, Flowers N. pH gradient-dependent phosphate transport catalyzed by the purified mitochondrial phosphate transport protein. *J Biol Chem.* 1982 Jan 10;257(1):28-31.
- Yamamoto A, Ueda J, Yamamoto N, Hashikawa N, Sakurai H. Role of heat shock transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae* oxidative stress response. *Eukaryot Cell.* 2007 Aug;6(8):1373-9.
- Yamamoto N, Maeda Y, Ikeda A, Sakurai H. Regulation of thermotolerance by stress-induced transcription factors in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell.* 2008 May;7(5):783-90.
- Yan Q, Lennarz WJ. Studies on the function of oligosaccharyl transferase subunits: a glycosylatable photoprobe binds to the luminal domain of Ost1p. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 10;99(25):15994-9. Epub 2002 Nov 20.
- Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR. How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet.* 2008;42:27-81. Review.
- Zhao C, Jung US, Garrett-Engle P, Roe T, Cyert MS, Levin DE. Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol.* 1998 Feb;18(2):1013-22.
- Zu T, Verna J, Ballester R. Mutations in WSC genes for putative stress receptors result in sensitivity to multiple stress conditions and impairment of Rlm1-dependent gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics.* 2001 Sep;266(1):142-55.