

LEYDI ROXANA GUTIERREZ ARMIJOS

**Estudo dos mecanismos de perturbação da manutenção das
paredes celulares fúngicas mediados por esteróis anormais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2019

LEYDI ROXANA GUTIERREZ ARMIJOS

Estudo dos mecanismos de perturbação da manutenção das paredes celulares fúngicas mediados por esteróis anormais

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientador: Dr. Agustín Hernández López
Versão Original.

São Paulo
2019

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Gutierrez Armijos , Leydi Roxana

Estudo dos mecanismos de perturbação da manutenção das paredes celulares fúngicas mediados por esteróis anormais / Leydi Roxana Gutierrez Armijos ; orientador Agustín Hernández López. -- São Paulo, 2019.

79 p.

Dissertação (Mestrado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Fungos. 2. Sinalização celular. 3. Parede celular. 4. Ergosterol. 5. Glucano sintase. I. Hernández López, Agustín , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Leydi Roxana Gutierrez Armijos

Título da Dissertação/Tese: Estudo dos mecanismos de perturbação da manutenção das paredes celulares fúngicas mediados por esteróis anormais

Orientador: Dr. Agustín Hernández López

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinador(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:

Trabalho realizado com auxílio financeiro concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) número de processo 2016/07896-8.

RESUMO

L. Roxana Gutierrez. Estudo dos mecanismos de perturbação da manutenção das paredes celulares fúngicas mediados por esteróis anormais. [Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Em plantas e fungos é conhecida a relação entre defeitos na homeostase dos esteróis e a fragilidade da parede celular. Por exemplo, em fungos, mutações nas últimas etapas da via de biossíntese do ergosterol ou tratamento com inibidores da biossíntese de esteróis (fungicidas SBI) resultam naquela fragilidade. O mecanismo para este fenômeno ainda é desconhecido, embora seja de interesse para entender os efeitos estáticos dos fungos destes importantes compostos médicos e agrícolas, bem também como o envolvimento dos lipídios na regulação dos processos biológicos. Anteriormente, nosso grupo reportou que os 8-desidroesteróis inibem a atividade da V-ATPase em vivo, com consequências negativas para a endocitose e localização anormal de Pma1p, uma proteína da membrana plasmática, no vacúolo. Isto levou-nos a pensar que a acumulação de esteróis anormais poderia estar afetando a biossíntese da parede celular através de uma interação inibitória lipídeo-proteína ou através da deslocalização das proteínas da membrana plasmática. As primeiras proteínas candidatas a considerar susceptíveis de encontrarem-se afetadas seriam, as responsáveis pela síntese de polímeros da parede celular, particularmente Fks1p (principal subunidade da Glucano Sintase (GS)), sendo que o glucano é o principal polímero da parede celular. As primeiras análises mostraram que os mutantes para o gene *ERG2* apresentavam níveis reduzidos de glucano nas suas paredes celulares, concomitantemente com uma menor atividade de glucano sintase em extratos celulares. Particularmente, no mutante condicional *erg2^{Gal}* derivado de selvagem crescido em meio de glucose (semelhante a uma célula fúngica tratada com fungicida), apresentou uma redução significativa na V_{max} da glucano sintase que pode ser explicada por queda nos níveis de polipeptídeo medidos por Western blot. Entretanto, nenhuma alteração na atividade da via de sinalização CWI foi observada. Os dados sobre a localização de Fks1p no selvagem e nos mutantes para o gene *ERG2* mostraram que está proteína encontra-se distribuída amplamente em membranas intracelulares junto com a membrana plasmática, porém diferindo em quantidade de Fks1p dependendo do mutante. No geral, nossos dados mostraram que provavelmente há uma retenção da principal subunidade Fks1p da GS em membranas associadas ao retículo endoplasmático e aparelho de Golgi, além disso também há uma redução de aproximadamente um terço na quantidade de Fks1p isso explicaria porque se observa uma fragilidade na parede celular nos mutantes para o gene *ERG2*.

Palavras-chave: Sinalização celular; parede celular; ergosterol; glucano sintase.

ABSTRACT

L. Roxana Gutierrez. Study of disturbance mechanisms of maintenance of fungal cell walls mediated by abnormal sterols. [Masters thesis (Host-Pathogen Relationship Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

In both plants and fungi it is known the relation between defects in sterol homeostasis and fragility of the cell wall. For example, in fungi, mutations in the late steps of the ergosterol biosynthesis pathway or treatment with **S**terol **B**iosynthesis **I**nhibitors (SBI fungicides) results in such fragility. The mechanism for this phenomenon is still unknown, although it is of capital importance to understand the fungistatic effects of these medical and agricultural important compounds, as well as the involvement of lipids in the regulation of biological processes. Previously, our group reported that 8-dehydrosterols inhibit V-ATPase activity *in vivo*, with negative consequences for endocytosis and normal localization of Pma1p, a plasma membrane protein, which was relocated partially to the vacuole. This prompted us to think that accumulation of abnormal sterols may be affecting cell wall biosynthesis through either an inhibitory lipid-protein interaction or through mislocalization of membrane proteins. The first candidate proteins to consider likely to be affected would be those responsible for the synthesis of cell wall polymers, particularly Fks1p (the main glucan synthase) since glucan is the major polymer in the cell wall. Mutants in the *ERG2* gene showed reduced levels of glucan in their cell walls concomitant with a smaller glucan synthase activity in whole cell extracts. Particularly, in a W303-1a-derived *GALI_{prom}ERG2* conditional mutant grown on glucose media (akin to a fungicide-treated fungal cell), a reduction in the glucan synthase V_{max} was clear. Similarly, Fks1p protein levels showed a decrease in *erg2⁻* mutants, with a drop similar in extent to that observed in the V_{max} . However, no alteration in the activity of the CWI signalling pathway was observed. Data on the location of Fks1p in wild-type cells and mutants for the *ERG2* gene showed this protein present in a wide array of intracellular membranes, as well as at the plasma membrane, although they differed in their levels. On the whole, our data showed that endoplasmic reticulum/Golgi apparatus retention of the main glucan synthase subunit Fks1p, together with a lower polypeptide level, are probably some of the main mechanisms for cell wall weakness in *ERG2* mutants.

Keywords: *Cell signalling; cell wall; ergosterol; glucan synthase.*

1. INTRODUÇÃO

Os fungos podem trazer contribuições positivas para os ecossistemas e agroecossistemas, por exemplo, nas associações micorrízicas, mas eles também podem ter impactos devastadores como patógenos de plantas, animais e humanos. Em relação a infecções de fungos em humanos, a alta taxa de mortalidade é preocupante devido a estar associada a infecções nosocomiais oportunistas e imunossupressão e, frequentemente, excedem 50%. Apesar da necessidade urgente de testes de diagnósticos eficientes e novas drogas, vacinas seguras e eficazes, a pesquisa sobre as infecções por fungos em humanos tem ficado atrás em comparação com outros organismos (Brown *et al.*, 2012).

Uma pesquisa que foi publicada pela Molecular Plant Pathology, reportou uma lista dos 10 patógenos fúngicos de plantas mais importantes desde o ponto de vista científico e econômico. Nesta lista encontrou-se vários dos fungos que causam perdas na área agrícola no Brasil, como é o caso de *Fusarium graminearum*, um dos fungos que infeta a produção do milho (Dean *et al.*, 2012; Fones *et al.*, 2017; Ramos *et al.*, 2014).

A levedura *Saccharomyces cerevisiae* é um modelo celular bem estabelecido para estudos bioquímicos e celulares. Entre muitos outros estudos, este modelo foi utilizado para a avaliação da via de síntese de esteróis em eucariotas. Relacionado com isso, também tem servido para desenvolver fungicidas baseados na inibição desta via, que estão em uso ainda hoje (Duina *et al.*, 2014; Klug & Daum, 2014; Revie *et al.*, 2018). Atualmente, estes compostos representam aproximadamente 30% das vendas (Menne & Köcher, 2012), com um valor de mercado global acima de R\$ 21 bilhões (Cools & Hammond-Kosack, 2013). Entre estes compostos, duas classes são as mais importantes: os azóis e as aminas conhecidas anteriormente como morfolinás. Os fungicidas do tipo amina são os mais úteis na hora de controlar a proliferação de alguns dos fungos que mais causam perdas econômicas para o Brasil, como por exemplo, o da sigatoka amarela, um parasita fúngico responsável pela perda de aproximadamente 50% da colheita de banana no país (Z. Cordeiro *et al.*, 2005).

Os alvos dos fungicidas do tipo amina foram estudados nos anos 90 e foi determinado que as enzimas esterol- Δ^8, Δ^7 -isomerase e esterol- Δ^{14} -reductase são os alvos desses antifúngicos. Em leveduras, estas enzimas estão codificadas pelos genes *ERG2* e

ERG24, respectivamente, a inibição dos seus produtos destes genes induz ao acúmulo de esteróis anormais o também chamados esteróis tóxicos. A inibição do produto do gene *ERG2* (esterol- Δ^8, Δ^7 -isomerase ou Erg2p) induz o acúmulo de 8-deshidroesterol (como o ergosta-5,8,22-trien-3 β -ol) e a do Erg24p (esterol- Δ^{14} -redutase) o acúmulo de ignosterol (5 α -ergosta-8,14-dien-3 β -ol) e seus derivados, tanto em leveduras quanto em fungos fitopatogénos (Loeffler & Hayes, 1992; Marcireau *et al.*, 1990). Notavelmente, a proporção da inibição de um ou outro alvo depende do fungo, do fungicida e da concentração utilizada (Loeffler & Hayes, 1992) o que faz muito difícil a atribuição dos efeitos destes compostos à inibição de uma ou outra das enzimas.

A membrana plasmática, junto com a parede celular, protegem os fungos das alterações ambientais. Uma composição adequada da membrana plasmática é essencial e deve ser cuidadosamente controlada pela célula. (Kodedova & Sychrova, 2015). O ergosterol é o esteroide maioritário da membrana plasmática. Além disso, sabe-se que o ergosterol é o equivalente ao colesterol em células de mamíferos; assim, ambos os lípidos são necessários para a regulação da permeabilidade e fluidez da membrana e para regular a atividade dos transportadores de membrana (Tanaka & Tani, 2018; Zakany *et al.*, 2019).

Em células de levedura, a síntese de ergosterol é um processo complexo. Em sua totalidade, a via biossintética do ergosterol envolve mais de 20 reações distintas (Daum *et al.*, 1998). O ergosterol é sintetizado na membrana do retículo endoplasmático (ER) através de uma cascata de reações enzimáticas acopladas. Posteriormente, o ergosterol é transportado do ER para a membrana plasmática. Muitos dos genes que participam nesta via são essenciais; portanto, os mutantes nesses genes da via são inviáveis (Jacquier & Schneider, 2012; Klug & Daum, 2014). Porém, deve-se mencionar aqui que a essencialidade dos genes depende da espécie. Assim, *ERG11* é essencial em *S. cerevisiae* mas não em *Candida albicans* (Sanglard *et al.*, 2003).

Deleções dos genes que codificam enzimas para os últimos passos da via de biossintese do ergosterol são viáveis em sua maioria, não entanto, acumulam esteróis que diferem do ergosterol no número e posição das ligações duplas no anel B e na cadeia lateral da molécula de esteroide, (Lees *et al.*, 1995). Um exemplo é o caso do gene *ERG2*; este gene codifica para a enzima esteroide- Δ^8, Δ^7 -isomerase. A mutação do gene ou a inibição farmacológica do seu produto, Erg2p, induz o acúmulo de 8-deshidroesterol. Isso acontece, por exemplo, quando as células estão expostas a antifúngicos do grupo amina (Loeffler & Hayes, 1992; Marcireau *et al.*, 1990).

Contudo, ainda não é conhecido como a substituição dos esteróis normais por outros anormais contribui para o controle da proliferação e quais são os mecanismos pelos quais é induzida a morte celular. Por isso, o estudo dos efeitos celulares dos esteróis anormais pode contribuir grandemente para ao desenvolvimento racional de novos fungicidas e fornecer informações importantes sobre as funções celulares dos esteróis normais. Além disso, estes estudos poderiam ter usos em outros campos, como na pesquisa relacionada com doenças genéticas humanas (Kelley & Herman, 2001).

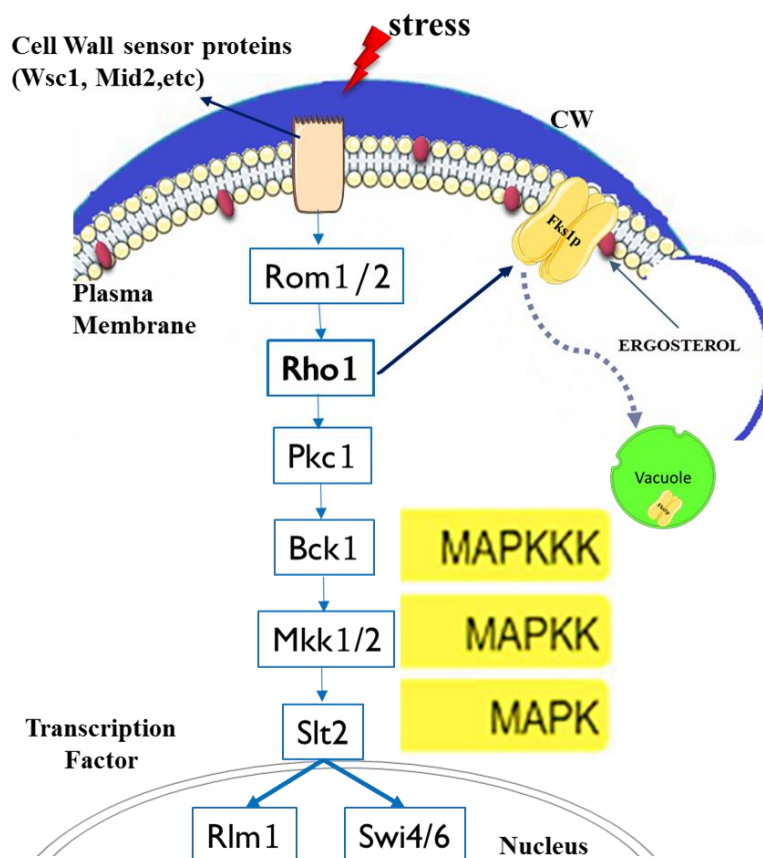
Tanto a membrana plasmática quanto a parede celular estão inter-relacionadas já que muitos dos componentes da parede celular são sintetizados por proteínas que estão localizadas na membrana plasmática. A parede celular, ao igual que a membrana plasmática, desempenha funções primordiais na proteção das células, como por exemplo: contra o choque osmótico, o estresse mecânico, ou sendo necessária também para estabelecer e manter a forma da célula. Além disso, a parede celular serve como um suporte para as proteínas da superfície celular (Levin, 2011). Por outro lado, em fungos parasitas, é essencial para a patogenicidade e a virulência (Free, 2013). Este aspecto é facilmente compreensível tendo em consideração que a parede celular porta a maioria dos alvos de reconhecimento que um hospedeiro encontrará no caso de uma infecção e que, habitualmente, a invasão requer crescimento dimórfico que dependerá da remodelação da parede celular por enzimas específicas; como no caso de *Candida albicans* ou de *Ustilago maydis* (Gow *et al.*, 2017; Ruiz-Herrera, 2016).

A composição da parede celular é muito complexa e variável segundo as condições de crescimento. Os polímeros de glicano são os componentes maioritários (80-90%), os quais estão constituídos principalmente por cadeias β -1,3-glucano em sua maioria ramificadas através de ligações β -1,6, e quitina, que representa um 1-6% do total. Estes componentes formam uma primeira camada em contato com a membrana plasmática; acima desta encontra-se uma segunda camada composta principalmente por manoproteínas (30-50%) (Klis *et al.*, 2006; Levin, 2011). A síntese de β -1,3-glucano é realizada principalmente pelas glucano sintases Fks1-3p, porém só Fks1p é de importância em condições vegetativas (Levin, 2011). É muito importante ressaltar que as enzimas sintetizadoras de glucano são proteínas integrais de membrana, transportadas desde o retículo endoplasmático para a membrana plasmática e, por estas razões, supostamente sensíveis ao entorno lipídico por várias vias. Em estudos anteriores, nosso grupo mostrou que proteínas de membrana plasmática como Pma1p eram redirecionadas ao vacúolo quando a célula acumula 8-deshidroesteróis (Hernandez *et al.*, 2015).

É bem conhecida a correlação entre defeitos na homeostase de esteróis e alterações na parede celular, nos organismos que a possuem. Assim, em plantas, a síntese e deposição de celulose e a atividade da pectina metiltransferase, dois importantes aspectos da manutenção da parede celular, estão grandemente influenciados pela composição de esteróis da célula. (Schrick *et al.*, 2012; Xie *et al.*, 2011). Por outro lado, em fungos, tanto mutações em genes envolvidos na biossíntese de esteróis quanto o tratamento com antifúngicos inibidores destes mesmos genes, tem como resultado a fragilidade das paredes celulares (García *et al.*, 2015; Sorgo *et al.*, 2011). O mecanismo deste fenômeno ainda não é bem conhecido. Por outro lado, foi determinado também que a síntese de glucano é uma parte essencial da resposta a dano nas paredes celulares de levedura (Levin, 2011).

Em leveduras, a manutenção da parede celular está regulada principalmente pela via de sinalização CWI (*Cell Wall Integrity*). Esta via está composta por uma cascata de MAP quinases que integra e amplifica o sinal recebido desde os sensores Wsc1-3p, entre outros, (**Fig. 1**). Segundo este modelo, defeitos na parede celular são detectados por uma série de sensores na membrana plasmática que abrangem os polipeptídios Wsc1p e Mid2p, que traduzem sinais para a cascata de MAP quinases da via CWI quando existirem condições estressantes que afetam a parede celular, por exemplo, estresse por calor (Levin, 2011). Em condições de crescimento vegetativo, a sinalização resultante em um incremento na formação de glucano β -1,3-glucano é realizado por Wsc1-3p, sendo Wsc1p o mais importante (Levin, 2011). Estes sensores transmitem seus sinais através de Rom2p, Rho1p e Pkc1p; esta última quinase ativa a cascata de MAP quinases CWI, a qual ativa os fatores de transcrição Rlm1p e Swi4/6p; esses são os últimos responsáveis pela regulação da expressão dos genes de manutenção da parede celular, por exemplo, *FKSI* (Klis *et al.*, 2006). É interessante que a perda da correta dinâmica de localização dos sensores Wsc1-3p afeta sua função e, conseqüentemente, a fortaleza da parede celular. Por exemplo, defeitos na endocitose produzem paredes celulares mais fracas devido à dificuldade de internalização e ao acúmulo conseqüente dos sensores Wsc1-3p na membrana plasmática (Wilk *et al.*, 2010). Neste contexto, cabe mencionar que nosso grupo tem mostrado que, em caso de acúmulo de 8-deshidroesteróis, a endocitose está inibida devido a falhas na acidificação luminal (Hernandez *et al.*, 2015).

Figura 1. Figura 1. Cascata sinalizadora CWI (Cell Wall Integrity) em *Saccharomyces cerevisiae*

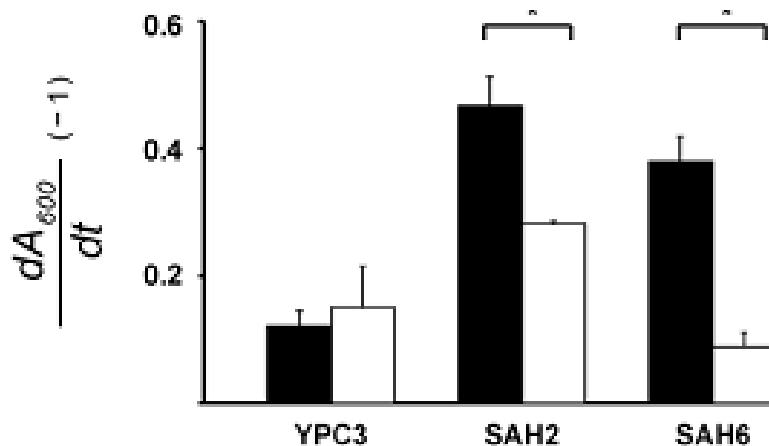


Integração dos sinais dos sensores de manutenção da parede celular e a cascata sinalizadora CWI (*Cell Wall Integrity*) em *Saccharomyces cerevisiae*. (L. Roxana Gutierrez)

Isso nos levou a testar se o fenótipo de fragilidade da parede estava relacionado com uma interdição do tráfego de membranas através de uma incorreta acidificação luminal. Experimentos feitos por nosso grupo demonstraram que as paredes celulares de mutantes *erg2Δ* (SAH2) e o mutante de V-ATPase (SAH6) reverteriam a uma situação similar ao selvagem se a acidificação do vacúolo era restaurada mediante a expressão de uma bomba alternativa de prótons desde um plasmídeo (**Fig. 2**) (Hernandez *et al.*, 2015). Isto sugere que os esteróis anormais podem estar afetando a qualidade da parede celular através da localização incorreta de Wsc1p ou Fks1p devido a falhas no tráfego intracelular dependentes de uma correta acidificação luminal. Porém, a restauração no mutante *erg2Δ* (SAH2) foi parcial, diferente do observado com o mutante de (SAH6) V-ATPase (**Fig. 2**). Isto nos sugere que outros mecanismos podem estar atuando conjuntamente no caso

do acúmulo de esteróis anormais (exemplo, inibição da atividade catalítica de Fks1p por sua interação direta com esteróis ou através de Rho1p).

Figura 2. Dependência da resistência da parede celular da correta acidificação vacuolar.



Resistência da parede celular à degradação com enzimas hidrolíticas medida em função da velocidade de formação e ruptura de protoplastos em meio hipoosmótico. Células de levedura foram cultivadas até a metade da fase log, lavadas e incubadas com liticase em tampão fosfato hipoosmótico. A dispersão luminosa a 600 nm foi medida à cada 5 minutos durante 90 minutos. As velocidades foram calculadas a partir da inclinação do gráfico. Barras pretas, cepas transformadas com plasmídeo de expressão pIPP1; barras brancas, cepas transformadas com pAVP1; YPC3, cepa mutante de levedura que depende da expressão de uma pirofosfatase desde plasmídeo para sua sobrevivência; SAH2, YPC3 *erg2Δ* (acúmulo de esteróis anormais); SAH6, YPC3 *vph1Δ* (defeito na V-ATPase vacuolar translocadora de H⁺); *IPP1*, pirofosfatase solúvel; *AVP1*, pirofosfatase translocadora de H⁺ (restauração da acidificação vacuolar). Os asteriscos indicam diferenças significativas segundo *t*-testes ($p \leq 0.005$), $n=3$. (Extraído de Hernandez (Hernandez *et al.*, 2015)).

Em resumo, a GS é uma proteína ancorada na membrana e por tanto em contato direto com os lipídeos da membrana. Assim, é razoável pensar que os esteróis anormais poderiam ter uma influência direta sobre sua atividade catalítica. Além disso, a cascata sinalizadora CWI poderia estar sendo inibida, talvez através da interação de alguns dos componentes (como Wsc1p ou Rho1p) com as membranas. Por outro lado, como dito acima, os mutantes de levedura afetados em genes de componentes da V-ATPase apresentam um fenótipo de fragilidade nas paredes muito similar ao observado em mutantes de genes na síntese de ergosterol que, recentemente, foi visto relacionado com o acúmulo de Wsc1p no vacúolo (Ueno *et al.*, 2014). Isto pode estar relacionado com a inibição da atividade V-ATPase por 8-deshidroesteróis que foi reportado por nós anteriormente (Hernandez *et al.*, 2015), incluindo suas consequências negativas sobre a endocitose e a localização incorreta de proteínas de membrana plasmática no vacúolo. Estes fenômenos poderiam estar afetando também Fks1p.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Descrever os mecanismos pelos quais a quantidade de glucano da parede celular dos fungos depende da composição em esteróis nas membranas celulares.

2.2. Objetivos específicos

- 2.2.1. Determinação, análise de parâmetros cinéticos e comparativa da atividade GS em células selvagens e mutantes para o gene *ERG2*.
- 2.2.2. Determinação da quantidade da Fks1p e a localização de Fks1p e Wsc1p em células selvagens e mutantes para o gene *ERG2*.
- 2.2.3. Determinação da dependência destes fenômenos da atividade da cascata CWI em ambos os tipos de células.

3. CONCLUSÕES

- ✓ A quantidade de glucano da parede celular nos mutante *eg2Δ* e *erg2^{Gal}* está diminuída aproximadamente em 30% e 70% respectivamente em comparação com o selvagem.
- ✓ Uma das causas das alterações da parede celular no mutante *erg2^{Gal}* é devido a uma redução de aproximadamente um terço nos níveis de proteína Fks1 na membrana plasmática. No mutante *erg2Δ* há uma alteração dos parâmetros cinéticos apresentado uma cooperatividade negativa.
- ✓ Não à inibição da atividade enzimática por interações lipídeo-proteína ou regulação defeituosa na sinalização através da via CWI.
- ✓ A localização Fks1p encontra-se no selvagem e nos mutantes para o gene *ERG2* não somente na membrana plasmática (membranas de alta densidade), mas também em membranas de densidades ligeiras e medias, concordante com sua presença no interior celular em vesículas com origem no retículo endoplasmático, em trânsito ao longo das vias secretórias.
- ✓ O acúmulo de esteróis Δ^8 -insaturados induz retenção intracelular do polipeptídeo Fks1p em membranas associadas ao retículo endoplasmático e/ou aparelho de Golgi, contribuindo para o fenótipo de fraqueza da parede celular nos mutantes no gene *ERG2*.

4. BIBLIOGRAFIA

- Abe, M., Qadota, H., Hirata, A., & Ohya, Y. (2003). Lack of GTP-bound Rho1p in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 162(1), 85-97. doi: 10.1083/jcb.200301022
- Bhattacharya, S., Esquivel, B. D., & White, T. C. (2018). Overexpression or Deletion of Ergosterol Biosynthesis Genes Alters Doubling Time, Response to Stress Agents, and Drug Susceptibility in *Saccharomyces cerevisiae*. *MBio*, 9(4), e01291-01218. doi: 10.1128/mBio.01291-18
- Birnboim, H. C., & Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, 7(6), 1513-1523.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G., & White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 4(165), 165rv113. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404
- Bulik, D. A., Olczak, M., Lucero, H. A., Osmond, B. C., Robbins, P. W., & Specht, C. A. (2003). Chitin synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* in response to supplementation of growth medium with glucosamine and cell wall stress. *Eukaryot Cell*, 2(5), 886-900.
- Cools, H. J., & Hammond-Kosack, K. E. (2013). Exploitation of genomics in fungicide research: current status and future perspectives. *Mol Plant Pathol*, 14(2), 197-210. doi: 10.1111/mpp.12001
- Chang, J., Ruiz, V., & Vancura, A. (2008). Purification of yeast membranes and organelles by sucrose density gradient centrifugation. *Methods Mol Biol*, 457, 141-149.
- Chen, D., Yang, B.-C., & T Kuo, T. (1992). One-step transformation of yeast in stationary phase. *21*, 83-84. doi: 10.1007/BF00318659
- Daicho, K., Uritani, M., Ueno, M., Makino, N., Ushimaru, T., Abe, F., & Hiraki, T. (2009). Sorting defects of the tryptophan permease Tat2 in an *erg2* yeast mutant. *FEMS Microbiology Letters*, 298(2), 218-227. doi: 10.1111/j.1574-6968.2009.01722.x
- Daum, G., Lees, N. D., Bard, M., & Dickson, R. (1998). Biochemistry, cell biology and molecular biology of lipids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14(16), 1471-1510. doi: 10.1002/(sici)1097-0061(199812)14:16<1471::aid-yea353>3.0.co;2-y
- Davies, B. S., Wang, H. S., & Rine, J. (2005). Dual activators of the sterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*: similar activation/regulatory domains but different response mechanisms. *Mol Cell Biol*, 25(16), 7375-7385. doi: 10.1128/mcb.25.16.7375-7385.2005
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., . . . Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol Plant Pathol*, 13(4), 414-430. doi: 10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x

- Dijkgraaf, G. J., Abe, M., Ohya, Y., & Bussey, H. (2002). Mutations in Fks1p affect the cell wall content of beta-1,3- and beta-1,6-glucan in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *19*(8), 671-690. doi: 10.1002/yea.866
- Duina, A. A., Miller, M. E., & Keeney, J. B. (2014). Budding yeast for budding geneticists: a primer on the *Saccharomyces cerevisiae* model system. *Genetics*, *197*(1), 33-48. doi: 10.1534/genetics.114.163188
- Fones, H. N., Fisher, M. C., & Gurr, S. J. (2017). Emerging Fungal Threats to Plants and Animals Challenge Agriculture and Ecosystem Resilience. *Microbiol Spectr*, *5*(2). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0027-2016
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet*, *81*, 33-82. doi: 10.1016/b978-0-12-407677-8.00002-6
- García, R., Botet, J., Rodríguez-Peña, J. M., Bermejo, C., Ribas, J. C., Revuelta, J. L., . . . Arroyo, J. (2015). Genomic profiling of fungal cell wall-interfering compounds: identification of a common gene signature. *BMC Genomics*, *16*(1), 683. doi: 10.1186/s12864-015-1879-4
- Gardner, J. M., & Jaspersen, S. L. (2014). Manipulating the yeast genome: deletion, mutation, and tagging by PCR. *Methods Mol Biol*, *1205*, 45-78. doi: 10.1007/978-1-4939-1363-3_5
- Giaever, G., & Nislow, C. (2014). The yeast deletion collection: a decade of functional genomics. *Genetics*, *197*(2), 451-465. doi: 10.1534/genetics.114.161620
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, *350*, 87-96.
- Gow, N. A. R., Latge, J. P., & Munro, C. A. (2017). The Fungal Cell Wall: Structure, Biosynthesis, and Function. *Microbiol Spectr*, *5*(3). doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0035-2016
- Green, & Sambrook., J. (2012). Molecular cloning a Laboratory Manual (Accessed from <https://nla.gov.au/nla.cat-vn6039452>).
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, *166*(4), 557-580.
- Hanes, C. S. (1932). Studies on plant amylases: The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem J*, *26*(5), 1406-1421. doi: 10.1042/bj0261406
- Hernandez, A., Cooke, D. T., & Clarkson, D. T. (1994). Lipid composition and proton transport in *Penicillium cyclopium* and *Ustilago maydis* plasma membrane vesicles isolated by two-phase partitioning. *Biochim Biophys Acta*, *1195*(1), 103-109.
- Hernandez, A., & Ruiz, M. T. (1998). An EXCEL template for calculation of enzyme kinetic parameters by non-linear regression. *Bioinformatics*, *14*(2), 227-228.
- Hernandez, A., Serrano-Bueno, G., Perez-Castineira, J. R., & Serrano, A. (2015). 8-Dehydrosterols induce membrane traffic and autophagy defects through V-ATPase dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*, *1853*(11 Pt A), 2945-2956. doi: 10.1016/j.bbamcr.2015.09.001
- Hernández, A., Serrano-Bueno, G., Perez-Castineira, J. R., & Serrano, A. (2015). 8-Dehydrosterols induce membrane traffic and autophagy defects through V-ATPase dysfunction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1853*(11, Part A), 2945-2956. doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.09.001>
- Hoffman, C. S., & Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, *57*(2-3), 267-272.

- Huang, C., Zhao, F., Lin, Y., Zheng, S., Liang, S., & Han, S. (2018). RNA-Seq analysis of global transcriptomic changes suggests a roles for the MAPK pathway and carbon metabolism in cell wall maintenance in a *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 mutant. *Biochem Biophys Res Commun*, *500*(3), 603-608. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.04.113
- Inoue, S. B., Takewaki, N., Takasuka, T., Mio, T., Adachi, M., Fujii, Y., . . . Watanabe, T. (1995). Characterization and gene cloning of 1,3-beta-D-glucan synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, *231*(3), 845-854.
- Jacquier, N., & Schneider, R. (2012). Mechanisms of sterol uptake and transport in yeast. *J Steroid Biochem Mol Biol*, *129*(1-2), 70-78. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.11.014
- Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., . . . Knop, M. (2004). A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes. *Yeast*, *21*(11), 947-962. doi: 10.1002/yea.1142
- Jonasson, E. M., Rossio, V., Hatakeyama, R., Abe, M., Ohya, Y., & Yoshida, S. (2016). Zds1/Zds2-PP2ACdc55 complex specifies signaling output from Rho1 GTPase. *J Cell Biol*, *212*(1), 51-61. doi: 10.1083/jcb.201508119
- Jung, U. S., & Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol*, *34*(5), 1049-1057.
- Kelley, R. I., & Herman, G. E. (2001). Inborn errors of sterol biosynthesis. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, *2*, 299-341. doi: 10.1146/annurev.genom.2.1.299
- Kim, K. Y., & Levin, D. E. (2010). Transcriptional reporters for genes activated by cell wall stress through a non-catalytic mechanism involving Mpk1 and SBF. *Yeast*, *27*(8), 541-548. doi: 10.1002/yea.1782
- Klis, F. M., Boorsma, A., & De Groot, P. W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *23*(3), 185-202. doi: 10.1002/yea.1349
- Klug, L., & Daum, G. (2014). Yeast lipid metabolism at a glance. *FEMS Yeast Res*, *14*(3), 369-388. doi: 10.1111/1567-1364.12141
- Ko, Y.-T., & Cheng, W. Y. (2005). Fluorescence versus radioactivity for assaying antifungal compound inhibited yeast 1,3- β -glucan synthase activity. *13*, 184-191+196.
- Ko, Y. T., Frost, D. J., Ho, C. T., Ludescher, R. D., & Wasserman, B. P. (1994). Inhibition of yeast (1,3)-beta-glucan synthase by phospholipase A2 and its reaction products. *Biochim Biophys Acta*, *1193*(1), 31-40.
- Kock, C., Arlt, H., Ungermann, C., & Heinisch, J. J. (2016). Yeast cell wall integrity sensors form specific plasma membrane microdomains important for signalling. *Cell Microbiol*, *18*(9), 1251-1267. doi: 10.1111/cmi.12635
- Kodedova, M., & Sychrova, H. (2015). Changes in the Sterol Composition of the Plasma Membrane Affect Membrane Potential, Salt Tolerance and the Activity of Multidrug Resistance Pumps in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*, *10*(9), e0139306. doi: 10.1371/journal.pone.0139306
- Ladner, C. L., Yang, J., Turner, R. J., & Edwards, R. A. (2004). Visible fluorescent detection of proteins in polyacrylamide gels without staining. *Anal Biochem*, *326*(1), 13-20. doi: 10.1016/j.ab.2003.10.047
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, *227*, 680. doi: 10.1038/227680a0
- Lees, N. D., Skaggs, B., Kirsch, D. R., & Bard, M. (1995). Cloning of the late genes in the ergosterol biosynthetic pathway of *Saccharomyces cerevisiae*--a review. *Lipids*, *30*(3), 221-226.

- Levin, D. E. (2011). Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*, *189*(4), 1145-1175. doi: 10.1534/genetics.111.128264
- Loeffler, R. S. T., & Hayes, A. L. (1992). Effects of Sterol Biosynthesis Inhibitor Fungicides on Growth and Sterol Composition of *Ustilago maydis*, *Botrytis cinerea* and *Pyrenophora teres*. *Pesticide Science*, *36*(1), 7-17. doi: 10.1002/ps.2780360103
- Marcireau, C., Guilloton, M., & Karst, F. (1990). In vivo effects of fenpropimorph on the yeast *Saccharomyces cerevisiae* and determination of the molecular basis of the antifungal property. *Antimicrob Agents Chemother*, *34*(6), 989-993.
- Martin-Perez, M., & Villen, J. (2017). Determinants and Regulation of Protein Turnover in Yeast. *Cell Syst*, *5*(3), 283-294.e285. doi: 10.1016/j.cels.2017.08.008
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B., & Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol*, *15*(10), 5671-5681.
- Menne, H., & Köcher, H. (2012). HRAC Classification of Herbicides and Resistance Development *Modern Crop Protection Compounds*.
- Miller, J. (1972). Miller JH.. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, NY.
- Munn, A. L., Heese-Peck, A., Stevenson, B. J., Pichler, H., & Riezman, H. (1999). Specific sterols required for the internalization step of endocytosis in yeast. *Mol Biol Cell*, *10*(11), 3943-3957. doi: 10.1091/mbc.10.11.3943
- Okada, H., & Ohya, Y. (2016). Fluorescent Labeling of Yeast Cell Wall Components. *Cold Spring Harb Protoc*, *2016*(8), pdb.prot085241. doi: 10.1101/pdb.prot085241
- Ramos, D. P., Barbosa, R. M., Vieira, B. G. T. L., Panizzi, R. d. C., & Vieira, R. D. (2014). Infecção por *Fusarium graminearum* e *Fusarium verticillioides* em sementes de milho. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, *44*, 24-31.
- Reinoso-Martin, C., Schuller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., & Kuchler, K. (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slt2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell*, *2*(6), 1200-1210.
- Reinoso-Martín, C., Schüller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., & Kuchler, K. (2003). The Yeast Protein Kinase C Cell Integrity Pathway Mediates Tolerance to the Antifungal Drug Caspofungin through Activation of Slt2p Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. *Eukaryot Cell*, *2*(6), 1200-1210. doi: 10.1128/ec.2.6.1200-1210.2003
- Revie, N. M., Iyer, K. R., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2018). Antifungal drug resistance: evolution, mechanisms and impact. *Curr Opin Microbiol*, *45*, 70-76. doi: 10.1016/j.mib.2018.02.005
- Ruiz-Herrera, J. (2016). Fungal cell wall: structure, synthesis, and assembly.
- Sanglard, D., Ischer, F., Parkinson, T., Falconer, D., & Bille, J. (2003). *Candida albicans* mutations in the ergosterol biosynthetic pathway and resistance to several antifungal agents. *Antimicrob Agents Chemother*, *47*(8), 2404-2412. doi: 10.1128/aac.47.8.2404-2412.2003
- Sanz, A. B., Garcia, R., Rodriguez-Pena, J. M., Diez-Muniz, S., Nombela, C., Peterson, C. L., & Arroyo, J. (2012). Chromatin remodeling by the SWI/SNF complex is essential for transcription mediated by the yeast cell wall integrity MAPK pathway. *Mol Biol Cell*, *23*(14), 2805-2817. doi: 10.1091/mbc.E12-04-0278

- Schrack, K., Debolt, S., & Bulone, V. (2012). Deciphering the molecular functions of sterols in cellulose biosynthesis. *Front Plant Sci*, 3, 84. doi: 10.3389/fpls.2012.00084
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., . . . Ohya, Y. (2002). Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 162(2), 663-676.
- Serrano, R. (1978). Characterization of the plasma membrane ATPase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 22(1), 51-63. doi: 10.1007/bf00241470
- Shedletzky, E., Unger, C., & Delmer, D. P. (1997). A microtiter-based fluorescence assay for (1,3)-beta-glucan synthases. *Anal Biochem*, 249(1), 88-93. doi: 10.1006/abio.1997.2162
- Sherman, F. (1991). Getting started with yeast *Methods Enzymol* (Vol. 194, pp. 3-21): Academic Press.
- Sikorski, R. S., & Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 122(1), 19-27.
- Silver, P. (2009). Indirect immunofluorescence labeling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2009(11), pdb.prot5317. doi: 10.1101/pdb.prot5317
- Sorgo, A. G., Heilmann, C. J., Dekker, H. L., Bekker, M., Brul, S., de Koster, C. G., . . . Klis, F. M. (2011). Effects of fluconazole on the secretome, the wall proteome, and wall integrity of the clinical fungus *Candida albicans*. *Eukaryot Cell*, 10(8), 1071-1081. doi: 10.1128/ec.05011-11
- Tanaka, S., & Tani, M. (2018). Mannosylinositol phosphorylceramides and ergosterol coordinately maintain cell wall integrity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Febs j*, 285(13), 2405-2427. doi: 10.1111/febs.14509
- Ueno, K., Saito, M., Nagashima, M., Kojima, A., Nishinoaki, S., Toshima, J. Y., & Toshima, J. (2014). V-ATPase-dependent luminal acidification is required for endocytic recycling of a yeast cell wall stress sensor, Wsc1p. *Biochem Biophys Res Commun*, 443(2), 549-555. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.12.008
- Utsugi, T., Minemura, M., Hirata, A., Abe, M., Watanabe, D., & Ohya, Y. (2002). Movement of yeast 1,3-beta-glucan synthase is essential for uniform cell wall synthesis. *Genes Cells*, 7(1), 1-9.
- Valiante, V., Macheleidt, J., Foge, M., & Brakhage, A. A. (2015). The *Aspergillus fumigatus* cell wall integrity signaling pathway: drug target, compensatory pathways, and virulence. *Front Microbiol*, 6, 325. doi: 10.3389/fmicb.2015.00325
- Wilk, S., Wittland, J., Thywissen, A., Schmitz, H.-P., & Heinisch, J. J. (2010). A block of endocytosis of the yeast cell wall integrity sensors Wsc1 and Wsc2 results in reduced fitness in vivo. *Molecular Genetics and Genomics*, 284(3), 217-229. doi: 10.1007/s00438-010-0563-2
- Xie, L., Yang, C., & Wang, X. (2011). Brassinosteroids can regulate cellulose biosynthesis by controlling the expression of CESA genes in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 62(13), 4495-4506. doi: 10.1093/jxb/err164
- Zakany, F., Pap, P., Papp, F., Kovacs, T., Nagy, P., Peter, M., . . . Varga, Z. (2019). Determining the target of membrane sterols on voltage-gated potassium channels. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 1864(3), 312-325. doi: 10.1016/j.bbalip.2018.12.006