

ibfg

**Caracterización de la función del Rho-GEF
Rgf1 en el núcleo de la levadura
*Schizosaccharomyces pombe***

SOFÍA MUÑOZ FÉLIX

TESIS DOCTORAL

2014



**VNIVERSIDAD
D SALAMANCA**



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética



INSTITUTO DE BIOLOGÍA
FUNCIONAL Y GENÓMICA

**Caracterización de la función del Rho-GEF Rgf1 en el núcleo
de la levadura *Schizosaccharomyces pombe***

Tesis Doctoral

Sofía Muñoz Félix

2014

EL DR. SERGIO MORENO PÉREZ, PROFESOR DE INVESTIGACIÓN DEL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y DIRECTOR DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA FUNCIONAL Y GENÓMICA, CENTRO MIXTO DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA Y EL CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Caracterización de la función del Rho-GEF Rgf1 en el núcleo de la levadura *Shizosaccharomyces pombe*”, presentada por la licenciada Sofía Muñoz Félix para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Yolanda Sánchez Martín, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ___ de _____ de 201_.

Fdo. Dr. Sergio Moreno Pérez

LA DRA. YOLANDA SÁNCHEZ MARTÍN, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “Caracterización de la función del Rho-GEF Rgf1 en el núcleo de la levadura *Shizosaccharomyces pombe*”, presentada por la licenciada Sofía Muñoz Félix para optar al grado de Doctor en Biotecnología por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ___ de _____ de 201_.

Fdo. Dra. Yolanda Sánchez Martín

Me gustaría dar las gracias a todas las personas que han formado parte de esta etapa tan enriquecedora, tanto en lo profesional como en lo personal, que ha sido la realización de esta Tesis Doctoral.

En primer lugar quería dar las gracias a Yolanda, por haberme dado la oportunidad de trabajar en un buen grupo y de formar parte de un proyecto, desde mi punto de vista, emocionante. Gracias por ser tan cercana, por estar siempre disponible, por haberme enseñado con tanta paciencia al principio y por confiar en mi criterio en la parte final del trabajo. Muchas gracias también a mis compañeras de laboratorio, Patri, Sandra y Elvira, por el día a día, por todos los buenos ratos y por todas las cosas que me han enseñado.

A todos aquellos que científicamente nos han echado una mano con el trabajo ya sea por aportar ideas o sugerencias, discutir resultados, enseñarme nuevas técnicas, pasarme protocolos o prestarnos cepas y plásmidos: Henar Valdivieso, Pilar Pérez, Juan Carlos Ribas, César Roncero, Carlos Rodríguez, Avelino Bueno, Sergio Moreno, Paco Antequera, etc. Especialmente quiero agradecer a Pedro Coll sus consejos sobre *cloning* que tan útiles nos han sido y su constante buen humor. Gracias también a Per Sunnerhagen y a la gente de su laboratorio, que me contagiaron su entusiasmo por la ciencia y me hicieron pasar tres meses estupendos en Gotemburgo.

Al personal de apoyo del IBFG, Carmen Castro, Paco y Javier, el equipo de cocina, administración y todo el personal técnico, por el esfuerzo extra que ha supuesto poner en marcha la nueva sede y por lo bien que funciona día a día.

A todas las personas que he tenido la suerte de conocer durante estos años y que, en muchos casos se han convertido en amigos para muchos años más. A Alberto, Miguel, Lorena y el resto de "mis queridos fans" (Charlie, Raúl, Patri y José) por nuestros pinchos de croqueta diploide, nuestras celebraciones de tesis ajenas y nuestros saltos en el Tun Tun. A Charlie, por sus buenos consejos, por sus palabras de ánimo y por no ser en absoluto un chico serio. A Raúl, por su ayuda con la bibliografía, papeleos y otras formalidades de la tesis y por el gran vacío que queda cuando no está. A Marta, por su dulzura, por nuestras confidencias y porque algún día de éstos haremos El Camino. A David, Laura (Parri) y Álvaro, por nuestras sesiones de terapia de grupo en los últimos tiempos que tanto me han animado y por ser tan fáciles de engañar para pedir otra. A Nagore, por decir siempre lo que piensa. A las chicas de la comida (o de las cañas, o de los conciertos de jazz): Esther, Alicia, Rebe, Rosana, Cami, Marta, etc. por vuestra espontaneidad y por la risoterapia diaria (¡Nunca comer de "tupper" fue tan divertido!). A Rebe, Maite, Antonio, Mariona, Mari, Irene, Sara, Elvira, Carlos, Sandra, Fran y el resto del grupo "café pared" por nuestras conversaciones matutinas y otros eventos. A Pepín, Anita, Sergio, Laura S., Nacho, Javi E, Junior, Jaquie, Charo y un largo etcétera de estupendos compañeros que aún están o que ya se han ido, porque nunca me ha faltado una palabra amable, una broma de pasillo o ayuda cuando la he necesitado.

A mis amigos de fuera de la "caja roja", por animarme siempre y por hacerme reír tanto. A los de "toda la vida" por no tener en cuenta mi incompatibilidad de horarios y de calendarios, los "Biotec" por

AGRADECIMIENTOS

nuestro "grupo whatsapp de la esperanza" y por todos los lugares que han ido y por supuesto irán detrás del "-on" y a mis "Monstruos S. A." por formar parte de ese entorno que escapa de las reglas de la lógica en el que me siento "en casa" y que cura todos los males.

A mis padres, por todo el tiempo que les ha robado esta tesis, porque sin su apoyo día tras día no hubiese podido llegar hasta este punto. Porque aunque no entienden casi nada de todo lo que viene a continuación, entienden mejor que nadie lo que significa para mí y porque, junto con mis abuelos, han sido siempre un ejemplo de constancia y honradez; dos valores, a mi modo de ver, imprescindibles para trabajar en ciencia. A José Manuel, porque poca gente tiene la suerte de llegar al mundo con un hermano "fuera de serie" bajo el brazo y que comparta contigo formación, profesión y tiempo de ocio. Por la complicidad y el apoyo que eso conlleva y por toda la ayuda (de diversa índole) prestada durante la tesis. A mis abuelos, por ser ejemplares y por estar tan orgullosos de mí y al resto de mi familia (tíos, primos y familia palentina) por ser únicos e irrepetibles y por hacer tuyas mis alegrías y mis disgustos.

Y a Maruan, por estar siempre y para todo, por su optimismo que casi roza la inconsciencia y por transmitirme confianza en mí misma e ilusión por el futuro.

A mis padres

ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS Y SIGLAS

aa: Aminoácido

APC/C: *Anaphase Promoting Complex / Cyclosome*

Arp: *Actin related protein*

ATM: *Ataxia Telangiectasia Mutated*

ATP: Adenosina 5' tri-fosfato

ATR: *Ataxia Telangiectasia Related*

cdc: Ciclo de División Celular (*Cell Division Cycle*)

CDK: Quinasa Dependiente de Ciclina (*Cyclin Dependent kinase*)

cDNA: DNA complementario

ChIP: Inmuno-Precipitación de Cromatina (*Chromatin Immuno-Precipitation*)

CNH: Dominio de proteínas con homología a la quinasa Citron (*Citron Kinase Homology*)

CPC: *Chromosomal Passenger Proteins*

Cpt: Camptotecina

CR: Región Conservada (*Conserved Region*)

Csp: Caspofungina

Dbl: *Diffuse B-cell lymphoma*

DEP: Dominio de proteínas con homología a *Dishevelled*, *Egl-10* y *Pleckstrin*

DH: Dominio de proteínas con homología a Dbl (*Dbl Homology*)

DIC: Contraste Interferencial de Fases (*Differential Interference Contrast*)

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTPs: Desoxirribonucleótidos tri-fosfato

DO: Densidad Óptica

DSBs: Roturas de Doble Cadena (*Double-Strand Breaks*)

dsDNA: DNA de doble cadena (*Double-Strand DNA*)

dsRNA: RNA de doble cadena (*Double-Strand RNA*)

DTT: Ditiotreitól

DYRK: *Dual specificity Yak-Related Kinase*

EB: *End Binding*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético

ehs: *Equinocandin Hypersensitive*

EMM: *Edinburg Minimal Medium*

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FHA: *ForkHead Associated*

FPC: *Fork Protection Complex*

GAP: Proteína Activadora de la actividad GTPásica (*GTPase Activating Protein*)

GDI: Inhibidor de la disociación de GDP (*GDP Dissociation inhibitor*)

GDP: Guanina 5' di-fosfato

GEF: Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (*Guanine Exchange Factor*)

GFP: Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent Protein*)

GS: Glucán Sintasa

ABREVIATURAS

GST: Glutation S Transferasa

GTP: Guanina 5' tri-fosfato

HA: Epítopo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe (*Hemagglutinin Antigen*)

HR: Recombinación Homóloga (*Homologous Recombination*)

HRP: Peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*)

HU: Hidroxiurea

INCENP: *Inner Centromere Protein*

IPTG: Isopropil β -D-tiogalactopiranosido

Kb: Kilobase

KDa: KiloDaltons

LatA: Latrunculina A

LB: Medio Luria-Bertani (*Luria-Bertani medium*)

LMB: Leptomycin B

MAPK: Proteína Quinasa Activada por Mitógeno (*Mitogen Activated Protein kinase*)

MAPs: Proteínas Asociadas a Microtúbulos (*Microtubule Associated Proteins*)

Mb: Megabase

MBC: metil benzimidazol-2-ilcarbamato

MBF: *Mlul-Binding Factor*

MCC: *Mitotic Checkpoint Complex*

mCherry: Versión de la proteína roja fluorescente

MCM: *Minichromosome Maintenance*

MDa: MegaDaltons

MEA: Medio agar extracto de malta (*Malt Extract Agar*)

miRNA: microRNA

MM: Medio Mínimo

MMS: Metil Metano Sulfonato

MPF: *M-phase Promoting Factor*

MTOCs: Centros Organizadores de Microtúbulos (*Microtubule Organizing Centers*)

NDR: *Nuclear Dbf2-Related*

NES: Secuencia de Exporte Nuclear (*Nuclear Export Signal*)

NETO: Inicio del crecimiento por el polo nuevo (*New End Take Off*)

NIMA: Quinasa relacionada con NimA de *Aspergillus nidulans* (*Never In Mitosis A*)

NLS: Secuencia de Localización Nuclear (*Nuclear Localization Sequence*)

OETO: Inicio del crecimiento por el polo viejo (*Old End Take Off*)

ORF: Fase de lectura abierta (*Open Reading Frame*)

PAA: Distribución de microtúbulos tras anafase (*Post Anaphase Array*)

PAGE: Electroforesis en Gel de Poliacrilamida (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)

pb: Pares de bases

PBS: Tampón Fosfato Salino (*Phosphate-Buffered Saline*)

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferación Celular (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*)
 PCR: Reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)
 PEG: Polietilenglicol
 PH: Dominio de proteínas con homología a Pleckstrin (*Pleckstrin Homology*)
 PMSF: Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
 PRMs: Motivos Ricos en Prolinas (*Proline Rich Motifs*)
 PVDF: Fluoruro de polivinilideno

qPCR: PCR cuantitativa

RBD: Dominio de unión a RhoA (*RhoA Binding Domain*)
 RFC: Factor de Replicación C (*Replication Factor C*)
 RFP: Proteína Roja Fluorescente (*Red Fluorescent Protein*)
 Rho: *Ras Homology*
 RITS: *RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing*
 RNA: Ácido Ribonucleico
 ROCK: *Rho-kinase*
 RPA: *Replication Protein A*

SAC: *Spindle Assembly Checkpoint*
 SDS: Dodecil Sulfato Sódico
 SIN: *Septation Initiation Network*
 siRNA: RNA de interferencia (*small interfering RNA*)
 SMC: *Structural Maintenance of Chromosomes*
 SPB: Cuerpo polar del huso (*Spindle Pole Body*)
 ssDNA: DNA de cadena sencilla (*Single-Strand DNA*)

TAE: Tampón Tris-Acético EDTA
 TAP: *Tandem Affinity Purification*
 TBS-T: Tampón tris salino con Tween-20 (*Tris-Buffered Saline Tween-20*)
 TBZ: Tiabendazol
 T_m: Temperatura media de anillamiento

UTR: Región no traducida (*Untranslated Region*)
 UV: Ultravioleta

vic: viable en presencia de inmunosopresor e iones cloruro (*viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion*)

WASP: *Wiscott-Aldrich Syndrome Protein*
 wt: Tipo silvestre (*wild type*)

YEPD: Medio rico para *S. cerevisiae* (*Yeast Extract Peptone and Dextrose*)
 YES: Medio rico para *S. pombe* (*Yeast Extract Supplemented*)
 YFP: Proteína Amarilla Fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*)
 YNB: Medio mínimo para *S. cerevisiae* (*Yeast Nitrogen Base*)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN..... 1

1. *Schizosaccharomyces pombe*: organismo modelo para el estudio del ciclo y la morfogénesis celular..... 3

1.1. Ciclo de vida de *S. pombe*..... 3

1.2. Ciclo celular y ciclo morfogénético en *S. pombe*..... 5

2. Regulación del ciclo celular..... 6

2.1. Regulación de Cdc2 a lo largo del ciclo celular de *S. pombe*..... 6

2.1.1. La transición G₂/M: Cdc25 y Wee1..... 6

2.1.2. La transición G₁/S: APC/Ste9, APC/Slp1, Rum1 y los dímeros Cdc2-ciclina..... 8

2.2. Regulación de la segregación de cromosomas..... 9

2.2.1. El centrómero..... 10

2.2.2. El cinetocoro..... 11

2.2.3. Otros factores implicados en la segregación de cromosomas..... 12

2.3. Los checkpoints..... 13

2.3.1. Sensores..... 14

2.3.2. Adaptadores y proteínas de andamiaje..... 16

2.3.3. Efectores..... 16

2.4. El checkpoint de bloqueo en replicación..... 17

2.4.1. Activación de Cds1..... 17

2.4.2. Efectores de Cds1..... 19

2.5. El checkpoint de daño en el DNA..... 20

2.6. El Spindle Assembly Checkpoint (SAC)..... 21

3. Regulación de la morfología y la polaridad: El citoesqueleto de actina y de microtúbulos..... 22

3.1. El citoesqueleto de actina..... 22

3.1.1. Los parches de actina..... 23

3.1.2. Los cables de actina..... 24

3.1.3. El anillo de actomiosina..... 24

3.2. El citoesqueleto de microtúbulos..... 24

3.2.1. Nucleación y organización de microtúbulos..... 25

3.2.2. Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)..... 25

3.3. Regulación del crecimiento polarizado mediante la regulación coordinada del citoesqueleto de actina y de microtúbulos..... 26

4. GTPasas de la familia Rho..... 28

4.1. Regulación de las GTPasas de la familia Rho..... 28

4.1.1. Regulación por cambio de nucleótido..... 28

4.1.2. Regulación por cambio de localización subcelular..... 29

4.1.3. Regulación por mecanismos no convencionales..... 29

4.2. La GTPasa Rho1 de *S. pombe*..... 30

4.2.1. Regulación de la GTPasa Rho1 de *S. pombe*..... 30

4.3. GEFs de las GTPasas de la familia Rho..... 32

4.3.1. Características estructurales de las proteínas Rho-GEF..... 32

4.3.2. Regulación de los factores Rho-GEF..... 33

4.4. Rgf1, el principal GEF de la GTPasa Rho1 en *S. pombe*..... 33

4.4.1. Identificación de *rgf1*⁺..... 33

4.4.2. Las células del mutante *rgf1Δ* muestran defectos en el mantenimiento de la integridad celular y en el crecimiento bipolar..... 34

4.4.3. Rgf1 actúa como regulador positivo de Rho1..... 35

4.4.4. Rgf1 señala por encima de la cascada de MAPK de Pmk1..... 35

OBJETIVOS..... 37

RESULTADOS..... 41

Capítulo 1: Caracterización del papel de los dominios de la proteína Rho-GEF Rgf1 en la activación del crecimiento bipolar y en el mantenimiento de la integridad celular..... 43

1.1. Construcción de mutantes de Rgf1..... 45

1.2. El extremo C'-terminal de Rgf1 es esencial para su función en el mantenimiento de la integridad celular..... 47

1.3. El extremo C'-terminal de Rgf1 es esencial para su función en polaridad..... 49

1.4. Análisis de la localización de las versiones mutadas de la proteína Rgf1..... 50

Capítulo 2: Rgf1 se acumula en el núcleo en condiciones de estrés replicativo de forma regulada por elementos en su propia secuencia, el *checkpoint* de bloqueo en replicación y la proteína 14-3-3 Rad24..... 53

2.1. Rgf1 posee una secuencia de localización nuclear (NLS) en su extremo N'-terminal..... 55

2.2. Rgf1 se localiza en el núcleo cuando la replicación está bloqueada por la presencia de HU..... 56

2.3. El extremo N'-terminal y la NLS de Rgf1 son necesarias para su acumulación nuclear en respuesta a estrés replicativo..... 58

2.4. Rgf1 tiene dos secuencias de exporte nuclear (NES) que participan en su transporte núcleo-citoplasma después del tratamiento con HU..... 59

2.5. Rgf1 se acumula en el núcleo en mutantes que tienen un bloqueo en fase S..... 62

2.6. La acumulación nuclear de Rgf1 depende del *checkpoint* de bloqueo en replicación..... 62

2.7. La acumulación de Rgf1 en el núcleo en respuesta a estrés replicativo depende de Rad24..... 64

2.8. Rad24 y Cds1 regulan la acumulación en el núcleo en respuesta a estrés replicativo inhibiendo su salida del núcleo..... 66

Capítulo 3: Rgf1 es necesario para la supervivencia en HU y esta función está regulada por fosforilación de Cds1 y posterior unión a Rad24..... 69

3.1. La presencia de Rgf1 en el núcleo es esencial para la supervivencia en hidroxurea..... 71

3.2. La fosforilación de Rgf1 es necesaria para su acumulación en el núcleo en presencia de HU..... 72

3.3. La fosforilación de Rgf1 es necesaria para su unión a Rad24..... 76

3.4. El transporte de Rgf1 a los polos no está bloqueado en presencia de estrés replicativo..... 77

3.5. La función de Rgf1 en el núcleo depende de su actividad GEF..... 79

Capítulo 4: Rgf1 es necesaria para la correcta recuperación tras un bloqueo en replicación.....	81
4.1. sensibilidad del mutante <i>rgf1Δ</i> a otros agentes de daño en el DNA y paradas del ciclo celular.....	83
4.2. Las células del mutante <i>rgf1Δ</i> muestran un retraso en la recuperación tras un bloqueo en replicación.....	84
4.3. Las células del mutante <i>rgf1Δ</i> presentan más focos de daño en el DNA que las de la cepa silvestre.....	86
4.4. Relación de la función de Rgf1 en condiciones de estrés replicativo con los mecanismos de <i>checkpoint</i>	88
 Capítulo 5: Caracterización de un posible papel de Rgf1 durante la segregación cromosómica.....	91
5.1. Rgf1-GFP se localiza en el <i>Spindle Pole Body</i>	93
5.2. El mutante <i>rgf1Δ</i> presenta defectos en el proceso de segregación cromosómica.....	94
5.3. El mutante <i>rgf1Δ</i> interacciona genéticamente con mutantes en genes implicados en la conexión microtúbulo-cinetocoro.....	96
5.4. La proteína Rgf1 es necesaria para el correcto agrupamiento centromérico.....	98
5.5. El <i>Spindle Assembly Checkpoint</i> retrasa el inicio de la anafase en ausencia de <i>rgf1+</i>	100
 DISCUSIÓN.....	103
1. Caracterización de los dominios de Rgf1.....	105
2. Rgf1 se acumula en el núcleo en presencia de HU.....	107
3. ¿Cómo se regula el transporte nucleo-citoplásmico de Rgf1?.....	109
4. ¿Cuál es la función de Rgf1 en el núcleo cuando se activa el <i>checkpoint</i> de replicación?.....	111
5. ¿Cuál es la relación entre la función de Rgf1 en el núcleo y Rho1?.....	112
6. Papel de Rgf1 durante la segregación de cromosomas.....	113
 CONCLUSIONES.....	117
 MATERIALES Y MÉTODOS.....	121
1. Microorganismos utilizados.....	123
2. Medios de cultivo.....	123
2.1. Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	123
2.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	123
2.3. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	124
3. Condiciones y estimación del crecimiento.....	124
3.1. Condiciones de cultivo para <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i>	124
3.2. Condiciones de cultivo para <i>E. coli</i>	124
4. Métodos genéticos.....	124
4.1. Conjugación.....	125
4.2. Aislamiento de ascosporas al azar o técnica " <i>random spores</i> ".....	125
5. Técnicas generales de biología molecular.....	125
5.1. Obtención de DNA.....	125
5.2. Tratamientos enzimáticos del DNA.....	125

5.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	126
5.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	126
5.5. Secuenciación de ácidos nucleicos.....	126
5.6. Mutagénesis dirigida.....	127
5.7. Transformación de <i>E. coli</i>	127
5.8. Transformación de <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i>	127
5.9. Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo y delección de genes mediante cassettes obtenidos por PCR.....	128
6. Vectores empleados.....	128
6.1. Vectores de <i>E. coli</i>	128
6.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	129
6.3. Vectores de <i>S. cerevisiae</i>	130
6.4. Vectores contruídos en este trabajo.....	130
7. Valoración de la cantidad de DNA mediante FACS.....	135
8. Análisis de proteínas.....	135
8.1. Obtención de extractos celulares.....	135
8.2. Precipitación con GST.....	135
8.3. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	136
8.4. Inmunodetección de proteínas.....	136
8.5. Valoración de GTP-Rho1.....	137
8.5.1. Producción de GST-C21RBD.....	137
8.5.2. Ensayo de unión.....	138
9. Técnicas microscópicas.....	138
9.1. Microscopía de contraste de fases y contraste interferencial (<i>Nomarski</i>).....	138
9.2. Microscopía de fluorescencia.....	138
9.2.1. Fluorescencia directa con GFP.....	138
9.2.2. Tinción con calcoflúor.....	139
10. Análisis bioinformático de los datos.....	139
Anexo I.....	141
Anexo II.....	149
BIBLIOGRAFÍA.....	155

“La verdadera ciencia enseña, por encima de todo, a dudar y a ser ignorante.”

Miguel de Unamuno

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas.”

Marie Curie



INTRODUCCIÓN

1

1. *Schizosaccharomyces pombe*: ORGANISMO MODELO PARA EL ESTUDIO DEL CICLO Y LA MORFOGÉNESIS CELULAR

El organismo elegido para realizar este trabajo ha sido la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Este hongo unicelular pertenece a los ascomicetos y posee un genoma de 13,8 Mb con 4.824 genes repartidos en 3 cromosomas; I (5.7 Mb), II (4.6 Mb) y III (3.5 Mb) (Wood et al., 2002).

S. pombe fue descrito por primera vez por P. Lindner, quién lo aisló de una cerveza de mijo del este de África. Su nombre taxonómico para el género hace referencia a que se trata de una levadura (-*saccharomyces*) y que se divide por fisión (*Schizo*-). En cuanto a la especie, la palabra "pombe" proviene del Swahili y significa cerveza (figura 1). La mayoría de cepas usadas hoy en día en el laboratorio derivan de una especie homotética h^{90} aislada en Francia en 1921 por A. Ostewalder de la que se obtuvieron posteriormente cepas heterotéticas con dos tipos sexuales opuestos, h^+ y h^- (Leupold, 1950).

En las últimas décadas *S. pombe* se ha convertido en un organismo muy atractivo para el estudio de multitud de procesos biológicos por varios motivos: es fácil de manipular en el laboratorio, no es patógeno, presenta un ciclo de vida y un ciclo sexual de corta duración y es susceptible de análisis genético clásico y molecular.

La levadura de fisión ha sido especialmente útil en el estudio del control del ciclo celular eucariota (Armstrong et al., 2007). Además, *S. pombe* es un microorganismo ideal para la realización de estudios de morfogénesis y polaridad, ya que su forma, tamaño y su ciclo de división celular son

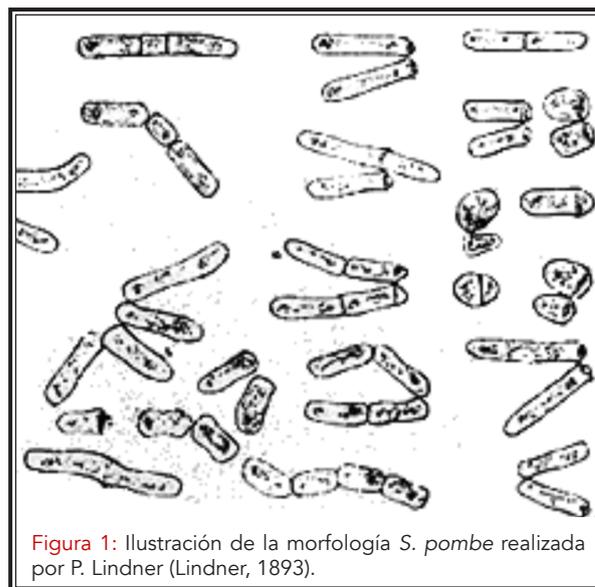


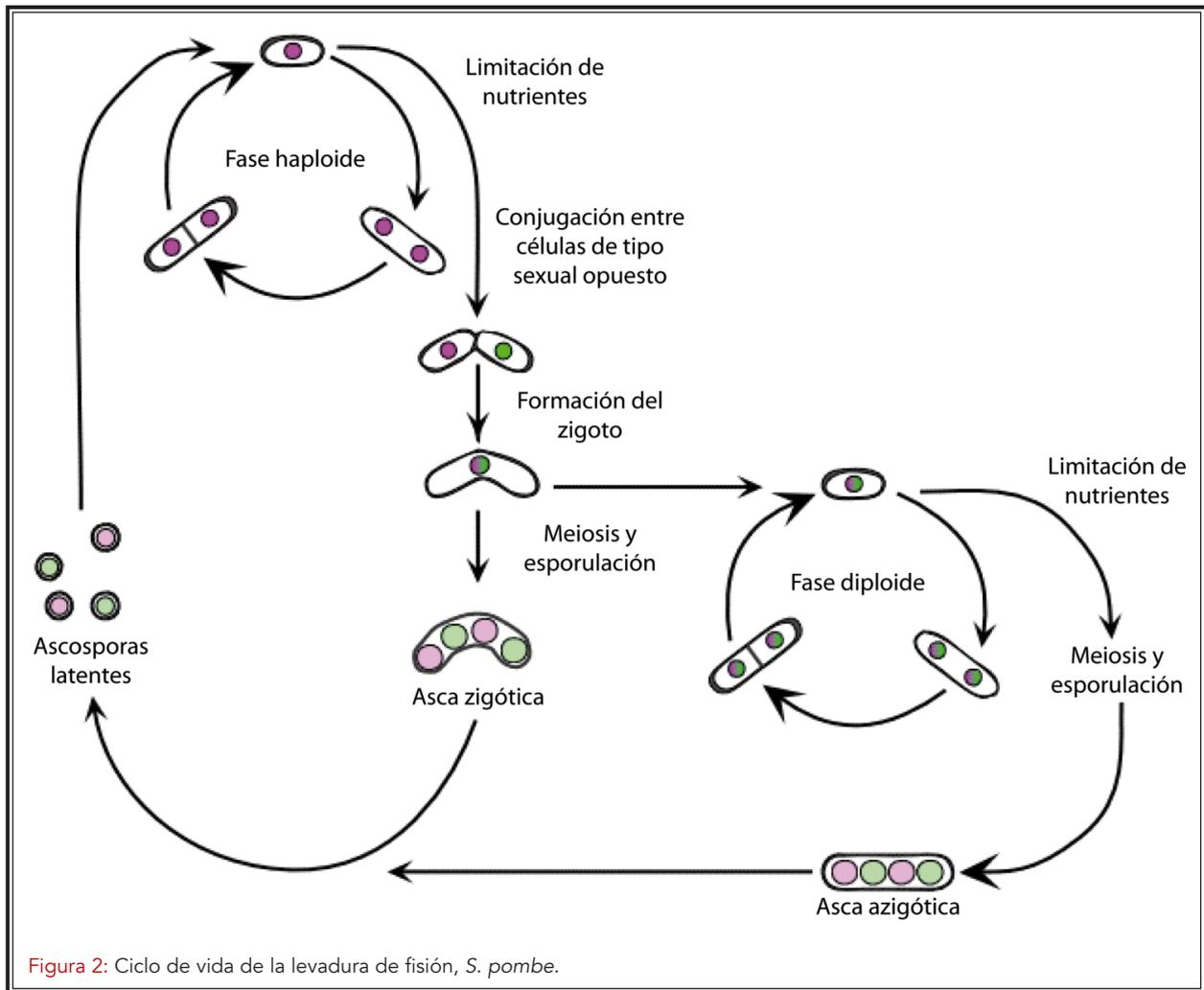
Figura 1: Ilustración de la morfología *S. pombe* realizada por P. Lindner (Lindner, 1893).

extremadamente reproducibles en el laboratorio y se pueden obtener mutantes con morfologías aberrantes sin pérdida de la viabilidad (Hayles y Nurse, 2001).

1.1 Ciclo de vida de *S. pombe*

S. pombe es un organismo con un ciclo de vida haplodiplonte, con una fase haploide y otra diploide. Durante la fase haploide, que es la predominante en este organismo, las células presentan una forma cilíndrica y al nacer tienen un tamaño aproximado de 3-4 μm de diámetro y 7-8 μm de longitud. Durante el crecimiento, las células mantienen un diámetro constante y aumentan en longitud hasta alcanzar 12-15 μm , que es el tamaño necesario para dividirse. La reproducción vegetativa se produce por fisión transversal, mediante la formación de un septo perpendicular al eje mayor de la célula que tras la citocinesis se disuelve dando lugar a dos células hijas de idéntico tamaño. Las cepas de *S. pombe* utilizadas en el laboratorio se pueden mantener de forma continua en estado haploide.

Las células haploides pertenecen a dos tipos sexuales diferentes h^+ y h^- (Leupold, 1950).



Cuando células h^+ y h^- se encuentran en un medio desfavorable, sobre todo pobre en nitrógeno, comienzan a secretar feromonas características de su tipo sexual y a producir receptores para la hormona del tipo sexual complementario. La unión de las feromonas a sus receptores desencadena el proceso de conjugación. Éste empieza con la formación de una proyección denominada "schmoo" en un extremo de la célula, hacia la fuente de feromonas del tipo sexual complementario. A continuación, las células se unen por parejas y finalmente se fusionan formando un cigoto diploide (Egel, 1994).

Los cigotos así formados pueden ser mantenidos como células diploides si se reinoculan inmediatamente en un medio rico. Estas células diploides presentan un tamaño mayor que las ha-

ploides, siendo de 11-14 μm de longitud al formarse y de 20-25 μm antes de la división.

Las células diploides de *S. pombe* son muy inestables y en medios pobres suelen sufrir inmediatamente un proceso de meiosis que conduce a la formación de cuatro núcleos haploides, cada uno de los cuales quedará incluido en el interior de una espora y éstas a su vez en el interior de un asca. Finalmente, la pared del asca se rompe y libera las esporas haploides que permanecerán latentes hasta que encuentren condiciones favorables, entonces germinan reiniciando el ciclo (figura 2).

1.2 Ciclo celular y ciclo morfológico en *S. pombe*

En *S. pombe* el crecimiento se produce de forma polarizada y asimétrica y está coordinado temporalmente con el avance del ciclo celular. En condiciones normales de crecimiento, las células de *S. pombe* presentan un ciclo celular eucariota típico que comprende las fases G_1 , S, G_2 y M. La fase G_1 supone un intervalo entre la mitosis y la replicación de los cromosomas, caracterizado por la síntesis de RNA y proteínas necesarias para la duplicación del DNA. En este punto, si la disponibilidad de nutrientes es limitada, las células

pueden iniciar el ciclo sexual. Si no es así, entran en la fase S, comenzando la replicación del DNA de forma simultánea en varios puntos del genoma. En *S. pombe*, la fase G_1 es muy corta y la fase S coincide con la septación, de forma que las dos células hijas recién separadas mediante la disolución del septo emergen en la fase G_2 de su ciclo celular (figura 3).

El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por presentar una fase G_2 muy amplia que abarca aproximadamente el 70% del ciclo. Tras la división celular, las células inician el crecimiento por el "polo viejo" que ya existía en la célula madre

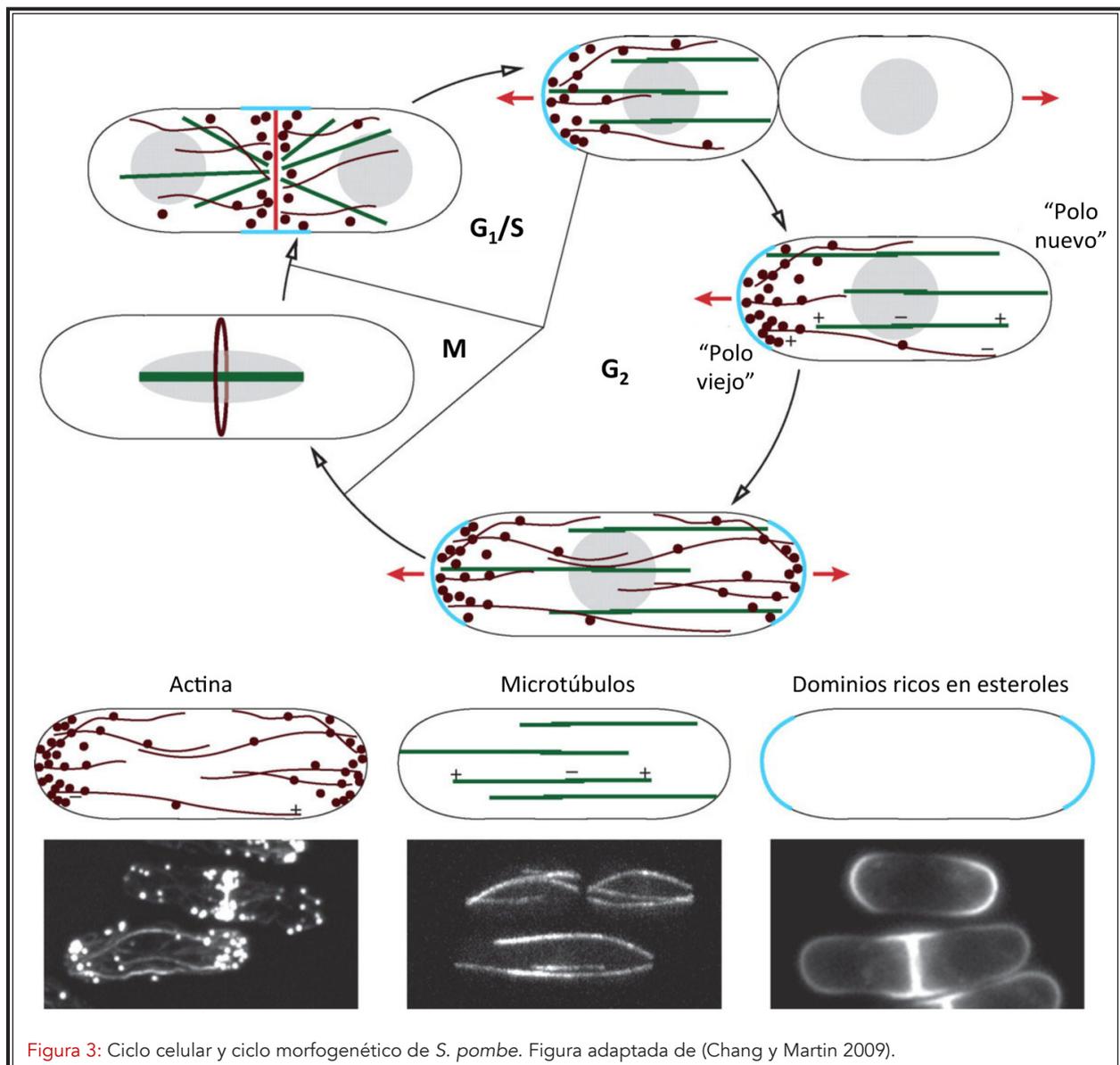


Figura 3: Ciclo celular y ciclo morfológico de *S. pombe*. Figura adaptada de (Chang y Martin 2009).

antes de la división. A este momento en el que las células crecen por un único polo se le conoce con el nombre de OETO "Old End Take Off" en el ciclo morfogénico de *S. pombe*.

El crecimiento monopolar continua hasta un momento de la fase G_2 en el que se activa el crecimiento por el "polo nuevo" (el generado durante la división celular), a este momento se le denomina NETO "New End Take Off" (figura 3) (Mitchison y Nurse, 1985). Después de NETO, la célula sigue creciendo de forma bipolar hasta alcanzar un tamaño crítico y entra en mitosis (fase M). Entonces se produce la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico y la segregación de las cromátidas hermanas a ambos polos celulares. Al comenzar la mitosis, la maquinaria biosintética se dirige al centro de la célula para formar el septo de división entre las células hijas, comenzando un nuevo ciclo (Chang y Martin, 2009; Hayles y Nurse, 2001).

2. REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR

En eucariotas, el ciclo celular está controlado por la activación e inactivación periódica de las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La concentración de estas quinasas se mantiene constante a lo largo del ciclo celular. Sin embargo, sus niveles de actividad varían de forma periódica lo que condiciona la mayoría de las transiciones del ciclo celular (figura 4) (Tyson y Novak, 2011).

La actividad CDK está fuertemente regulada por su unión a ciclinas (proteínas de expresión oscilatoria) y la formación de complejos CDK-ciclina específicos para cada etapa del ciclo celular. Si la CDK no está unida a una ciclina, su sitio activo queda bloqueado, reduciéndose así su actividad quinasas (De Bondt et al., 1993). Además, las CDKs

también están reguladas por fosforilación/desfosforilación y por su unión a inhibidores (Fisher et al., 2012).

En *S. pombe* existe una única CDK (Cdc2), cuatro ciclinas: tres ciclinas tipo B (Cig1, Cig2 y Cdc13) y una tipo Cln (Puc1) y una proteína inhibidora (Rum1).

2.1 Regulación de Cdc2 a lo largo del ciclo celular de *S. pombe*

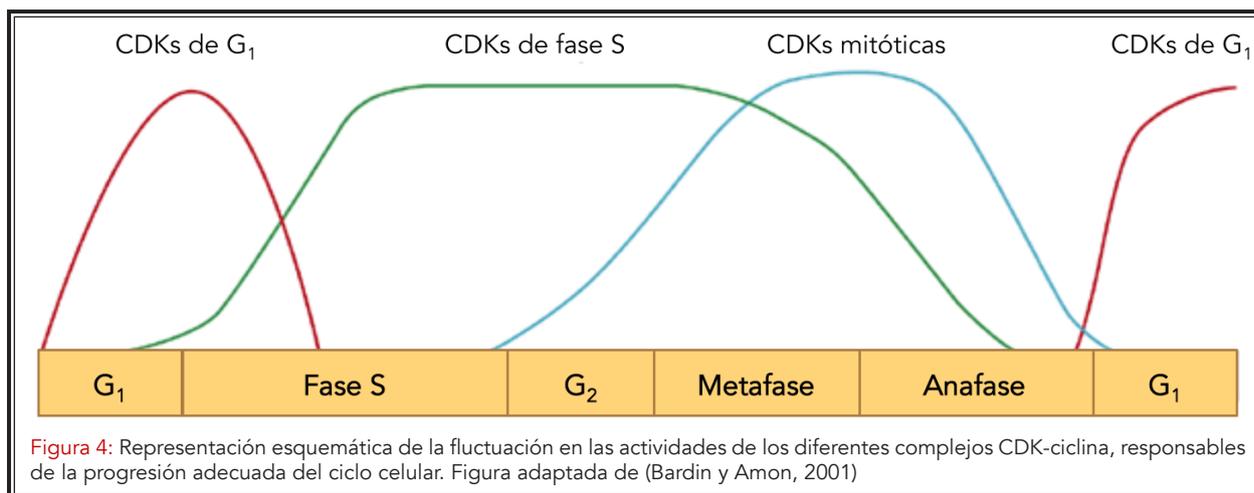
2.1.1 La transición G_2/M : Cdc25 y Wee1

Cdc13 es la única ciclina esencial en *S. pombe* (Fisher y Nurse, 1996; Martin-Castellanos et al., 1996; Mondesert y Reed, 1996). Sus niveles son bajos en G_1 , aumentan en G_2 y se mantienen altos hasta la transición metafase-anafase (Creanor y Mitchison, 1996).

El complejo Cdc13-Cdc2, conocido como MPF (*M-phase Promoting Factor*), se acumula en el núcleo durante las fases S y G_2 y puede ser detectado en el nucléolo, SPB y el huso mitótico (Alfa et al., 1989; Alfa et al., 1990).

Durante G_2 , el MPF permanece inactivo por acción de las quinasas Wee1 y Mik1, que fosforilan a Cdc2 en el residuo de Tirosina-15 (Tyr15), inhibiendo su actividad (Gould y Nurse, 1989; Lundgren et al., 1991; Russell y Nurse, 1987). Esta fosforilación es revertida por la fosfatasa Cdc25 al final de G_2 para inducir la mitosis (figura 5) (Russell y Nurse, 1986).

S. pombe entra en mitosis cuando las células alcanzan un tamaño crítico y su DNA se ha replicado correctamente (Kellogg, 2003; Rupes, 2002). La conexión entre el tamaño celular y la decisión de entrar en mitosis depende de Pom1.



Pom1 pertenece a la familia de quinasas DYRK (*Dual specificity Yak-Related Kinase*) (Bähler y Pringle, 1998) y actúa a través de Wee1 (Bhatia et al., 2014; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009).

Los principales reguladores negativos de la actividad de Wee1 son las quinasas Cdr2 y Cdr1/Nim1. Cdr2 fosforila y activa a Cdr1, y ambas son capaces de inhibir a Wee1 (Moseley et al., 2009). El módulo Cdr2-Cdr1-Wee1 se localiza en los nodos interfásicos -una región en el centro de la célula justo debajo de la membrana celular y alrededor del núcleo- y esta localización depende de Cdr2 (Moseley et al., 2009).

Pom1 actúa como un inhibidor de Cdr2 y se localiza en los polos de la célula. De esta manera, en las células de pequeño tamaño hay más Pom1 en la zona central y éste inhibe a Cdr2 -que a su vez actúa sobre Cdr1-, de modo que Wee1 puede llevar a cabo su acción sobre la Tyr15 de Cdc2, inhibiendo así al MPF y evitando la entrada en mitosis.

Sin embargo, conforme la célula va creciendo, los polos quedan más alejados del centro celular, y por tanto del módulo Cdr2-Cdr1-Wee1. En estas condiciones, Pom1 ya no es capaz de actuar

sobre Cdr2 que, una vez activo, fosforila a Wee1, anulando así su actividad sobre el MPF (Bhatia et al., 2014; Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley et al., 2009).

Recientemente se ha puesto en duda la solidez de este modelo en el que Pom1 funcionaría como un sensor directo de la longitud celular ya que células *pom1Δ* son capaces de adaptar su longitud tras perturbaciones (Wood y Nurse, 2013).

La cantidad de Cdc25 está regulada a lo largo del ciclo celular mostrando unos niveles de proteína máximos al final de G_2 (Daga y Jiménez, 1999; Ducommun et al., 1990; Moreno et al., 1990). En este momento, la inhibición de Wee1 y la acumulación de la fosfatasa Cdc25 conducen al alcance de un umbral de activación del MPF que a su vez promueve la activación de más complejos Cdc13-Cdc2 mediante un doble mecanismo de retroalimentación positiva por inhibición de Wee1 y por la fosforilación y activación de Cdc25 controlada por la quinasa Polo, Plo1, localizada en el SPB (Grallert et al., 2013a; Mulvihill et al., 1999).

Este mecanismo de retroalimentación positiva dispara la actividad CDK hasta alcanzar los niveles requeridos para entrar en mitosis (Fisher et al., 2012). El reclutamiento de reguladores mitó-

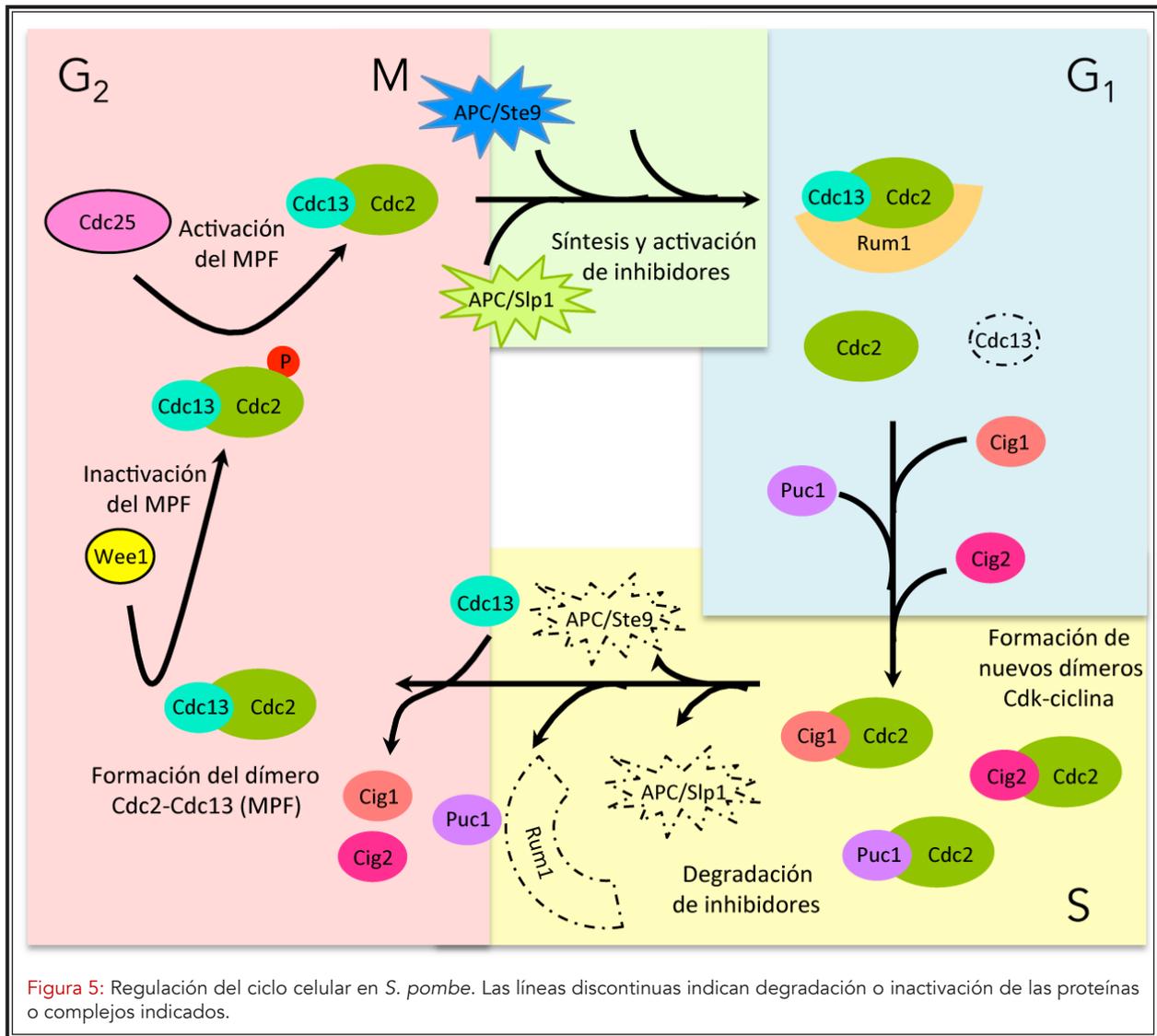


Figura 5: Regulación del ciclo celular en *S. pombe*. Las líneas discontinuas indican degradación o inactivación de las proteínas o complejos indicados.

ticos en el cuerpo polar del huso (SPB) juega un papel esencial en el establecimiento del umbral para este mecanismo de retroalimentación positiva (Meadows y Millar, 2013). Recientemente se ha descrito que la fosfatasa Dis2 unida a Cut12 -un componente del SPB (Bridge *et al.*, 1998)- restringe la asociación de Plo1 al SPB antagonizando así la activación de Cdc2 por Cdc25.

La fosforilación de Cut12 por la quinasa tipo NIMA Fin1 y por Cdc2 promueve la liberación de Dis2 y el reclutamiento de Plo1 disparando así la activación de la CDK (Grallert *et al.*, 2013b). Además Fin1 también promueve la entrada en mitosis a través de la ruta (Pom1-Cdr2-Wee1) (Grallert *et al.*, 2012).

2.1.2 La transición G₁/S: APC/Ste9, APC/Slp1, Rum1 y los dímeros Cdc2-Ciclina

La actividad del propio MPF durante la entrada en mitosis estimula la activación del complejo E3 ubiquitín-ligasa 20S APC/C (*Anaphase-Promoting Complex/Ciclosome*) encargado de señalar la degradación de varios reguladores del ciclo celular (Amon *et al.*, 1994). La formación de los complejos APC/Slp1 y APC/Ste9 promueven la degradación de Cdc13 mientras la célula avanza hacia la fase G₁ (Kitamura *et al.*, 1998).

También en esta etapa se acumula Rum1, un inhibidor estequiométrico que se une al dímero Cdc2-Cdc13 y lo inactiva (Correa-Bordes y Nurse, 1995; Martin-Castellanos *et al.*, 1996; Moreno

y Nurse, 1994). De este modo, tanto la disminución de los niveles de la ciclina Cdc13 como la inhibición llevada a cabo por Rum1 conducen a un descenso de la actividad del MPF (figura 5).

La fosfatasa Flp1 también juega un papel importante en la salida de mitosis ya que antagoniza la actividad CDK mitótica mediante la desfosforilación y señalización de Cdc25 para su degradación (Esteban *et al.*, 2004; Wolfe y Gould, 2004).

Durante la fase G_1 se expresan otras ciclinas y la formación de nuevos complejos que permiten el progreso del ciclo: Cdc2-Cig1, que fosforila y marca a Rum1 para su degradación durante las fases S y G_2 (Correa-Bordes *et al.*, 1997), Cdc2-Puc1 (Martin-Castellanos *et al.*, 2000) y, fundamentalmente, Cdc2-Cig2 estimulado por el factor de transcripción Cdc10.

El complejo Cdc2-Cig2 no es degradado por APC/Ste9 y no se inhibe eficazmente por Rum1, de modo que en las células se incrementa la actividad de Cdc2 lo suficiente para fosforilar e inactivar a Ste9, disociar el APC/C (Blanco *et al.*, 2000) y eliminar a Rum1.

Así se alcanzan los niveles de actividad de Cdc2 necesarios para fosforilar y modular la actividad de proteínas implicadas en el comienzo de la fase S y terminar de degradar a los inhibidores. Cuando finaliza la replicación del DNA, las células se encuentran en fase G_2 temprana, iniciando un nuevo ciclo (figura 5).

2.2 Regulación de la segregación de cromosomas

La correcta transmisión de la información genética de la célula madre a las células hijas es

necesaria para el desarrollo y la supervivencia de todos los seres vivos (Meadows, 2013).

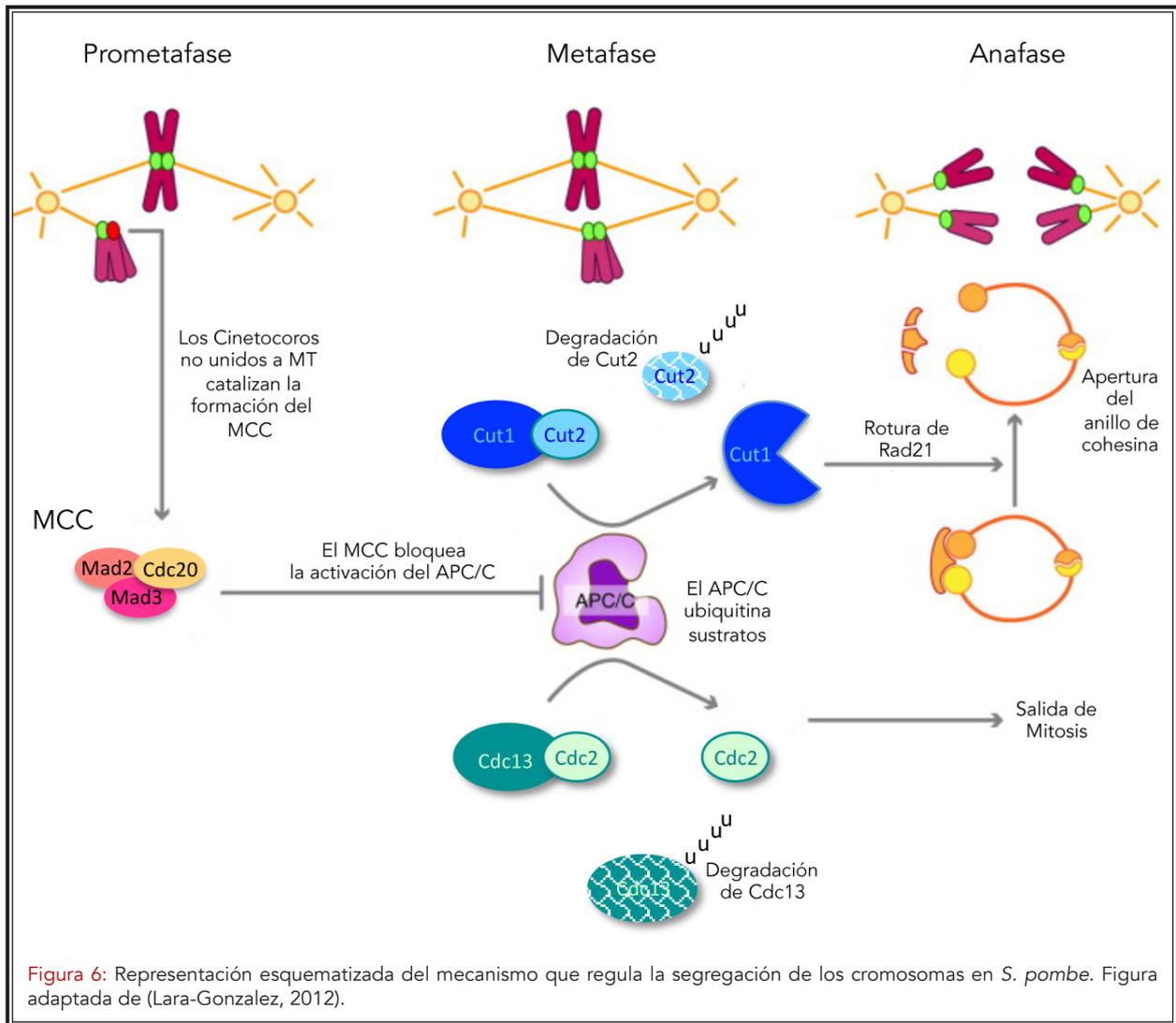
En *S. pombe* la mitosis es cerrada, es decir, no se degrada la envuelta nuclear y presenta las mismas fases que presenta la mitosis de todos los organismos eucariotas.

Durante la profase, los cromosomas se condensan y se ensambla un pequeño huso mitótico. A continuación los cinetocoros de cromátidas hermanas se asocian a microtúbulos del huso mitótico que proceden de polos opuestos, lo que se conoce como bi-orientación.

Este proceso es crítico y cuando hay problemas en la asociación cinetocoro-microtúbulo (como falta de asociación o falta de tensión porque el cinetocoro está asociado a dos microtúbulos procedentes del mismo polo) se activa un mecanismo de supervivencia denominado SAC (*Spindle Assembly Checkpoint*). El SAC no se desactiva hasta que los cromosomas están perfectamente bi-orientados antes de que se produzca la pérdida de cohesión irreversible en el centrómero que desencadena la anafase (Fuller y Stukenberg, 2009).

El SAC actúa inhibiendo a la subunidad Cdc20 del APC/C. Durante la transición metafase-anafase, el APC/C cataliza la ubiquitinación de la ciclina B, Cdc13, y de la securina, Cut2 (Tatebe y Yanagida, 2000).

Cut2 se encuentra formando un complejo con la separasa, Cut1, que es liberada cuando Cut2 es degradada por el proteasoma 26S (Funabiki *et al.*, 1996; Kumada *et al.*, 1998). Una vez libre, Cut1 degrada la subunidad Rad21 del complejo cohesina presente en el centrómero, se-



parándose así las dos cromátidas hermanas (figura 6) (Tomonaga et al., 2000).

Durante la anafase A cada una de las cromátidas hermanas viaja hasta un polo del huso mitótico gracias a la catástrofe de los microtúbulos unidos al cinetocoro y una vez allí comienza la anafase B, durante la cual, las cromátidas hermanas se desplazan hacia polos opuestos de la célula mediante la extensión del huso mitótico (Hagan, 2004). Finalmente durante la telofase los dos juegos de cromosomas llegan a los polos celulares y se descondensan para dar lugar a dos núcleos independientes.

Para que la segregación del material ge-

nético se produzca de una manera fiel, tiene que existir una coordinación perfecta entre la regulación de la morfología y el comportamiento de los cromosomas y los cambios en el citoesqueleto (Takahashi, 2004). A continuación se describen con más detalle los actores principales que, junto con el citoesqueleto de microtúbulos, participan en la segregación de los cromosomas y en su regulación.

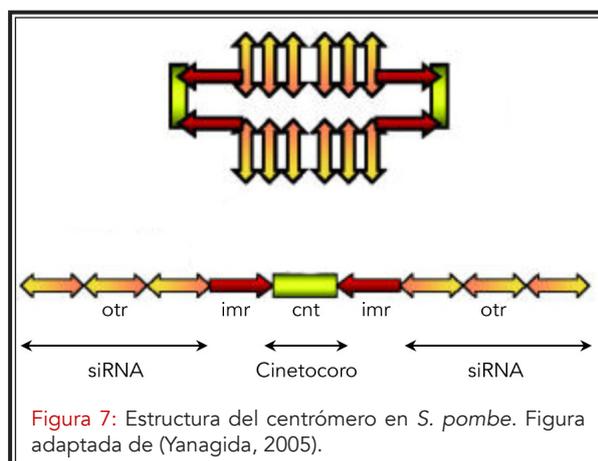
2.2.1 El centrómero

La estructura del centrómero de *S. pombe* consta de un dominio central *cnt* rodeado por dos repeticiones invertidas largas. Cada flanco se divide en dos regiones: las repeticiones internas *imr*, que son específicas de cada uno de los tres

centrómeros de *S. pombe* y las regiones externas *otr*, compuestas por elementos llamados *dg* y *dh*, cuya disposición también es diferente en cada centrómero (figura 7) (Bjerling y Ekwall, 2002).

El DNA centromérico está ensamblado en forma de heterocromatina. La transcripción en los elementos *dg* y *dh* por la RNA polimerasa II genera RNA de doble cadena (dsRNA) que produce una respuesta de RNA de interferencia (siRNA). La ribonucleasa Dcr1 rompe estos dsRNAs en pequeños siRNAs que guían al complejo RITS (*RNA-induced Initiation of Transcriptional gene Silencing*) a transcritos nacientes por complementariedad de secuencia. El complejo RITS asociado a la cromatina recluta a la histona-metiltransferasa Clr4 en las repeticiones centroméricas. La metilación de la lisina 9 de la histona H3 por Clr4 crea un sitio de unión para las proteínas con cromodominios Swi6, Chp1 y Chp2 resultando en la formación de heterocromatina. Además, el estado desacetilado de las histonas que caracteriza a la heterocromatina implica tres histona-deacetilasas: Clr3, Clr6 y Sir2 (Buscaino et al., 2013).

Una característica que se conserva en todos los centrómeros eucariotas es la presencia en sus nucleosomas de una variante de la histona H3 específica de centrómero, CENP-A, que en el caso



de *S. pombe* está codificada por el gen *cnp1*⁺. La histona Cnp1 parental es depositada en los centrómeros durante fase S, mientras que la que se sintetiza *de novo* es depositada en etapas posteriores del ciclo celular. La carga de Cnp1 en fase S está regulada por el factor tipo GATA Ams2, mientras que su incorporación durante G₂ depende de Hip1 (Takahashi et al., 2005).

La deposición de Cnp1 en los nucleosomas del centrómero también depende de las proteínas Sim3, Scm3 y del complejo Mis16/Mis18 que median su incorporación a la cromatina (Dunleavy et al., 2007; Hayashi et al., 2004; Pidoux et al., 2009; Williams et al., 2009).

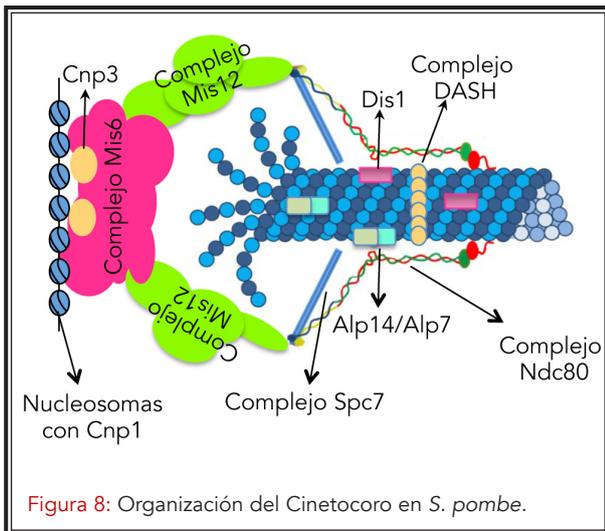
2.2.2 El cinetocoro

El cinetocoro es una estructura proteica cuya función principal es conectar el centrómero a los extremos positivos de los microtúbulos del huso mitótico, pero también funciona como una plataforma para la transmisión de la señal del SAC (Fuller y Stukenberg, 2009).

A pesar de que las secuencias de DNA centromérico no están conservadas a lo largo de la evolución, sí lo están las proteínas que interactúan con el centrómero, lo que hace que la estructura de los cinetocoros esté conservada evolutivamente (Yanagida, 2005).

La mayoría de las proteínas del cinetocoro se organizan en módulos estructurales y funcionales que a su vez dan lugar a dos regiones: el cinetocoro interno y el externo (figura 8) (Liu et al., 2005).

En *S. pombe*, el cinetocoro interno está formado por proteínas que se unen directamente a la cromatina como Cnp3, la proteína homóloga a



CENP-C de vertebrados (Tanaka *et al.*, 2009) o el complejo formado por las proteínas Mis6, Sim4, Mal2, Dad1, Mis15, Mis17 y Fta1-7 (Liu *et al.*, 2005), mientras que el cinetocoro externo está formado por tres complejos proteicos estrechamente asociados entre sí: el complejo Ndc80 -formado por las subunidades Spc24, Spc25, Nuf2 y Ndc80-, el complejo MIND -formado por Mis12, Mis13, Mis14 y Nnf1- y el complejo Spc7 -formado por Spc7 y Sos7- (Liu *et al.*, 2005).

Además de estos factores asociados al cinetocoro durante todo el ciclo celular, en mitosis se unen otras proteínas como el complejo DASH, que se une al cinetocoro a través de la subunidad Dad1 (que forma parte del complejo DASH y del complejo de Mis6 al mismo tiempo) (Liu *et al.*, 2005), las proteínas Dis1 y Alp14, que se asocian al cinetocoro a través de la proteína Ndc80 (Tang *et al.*, 2013), las kinesinas Klp5 y Klp6 y las proteínas del SAC.

En *S. pombe*, los cinetocoros están agrupados cerca del SPB en interfase, lo que se conoce como configuración *Rabl*. Esta configuración facilita la eficiencia de la captura de los cinetocoros por parte de los microtúbulos así como el establecimiento de la bi-orientación de los cromosomas

en metafase (Franco *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2013). Recientemente se ha descrito que esta configuración depende de una proteína llamada Csi1. Esta proteína mantiene los cinetocoros unidos al SPB durante la interfase debido a que es capaz de unirse a la proteína Sad1 del SPB y a la proteína del cinetocoro Spc7 (Hou *et al.*, 2012).

2.2.3 Otros factores implicados en la segregación de cromosomas

El complejo Cohesina

El complejo cohesina mantiene unidas las hebras de DNA de las cromátidas hermanas, lo que es necesario para la segregación de cromosomas en mitosis y para la reparación de roturas en el DNA en G₂. La cohesina consiste en un complejo en forma de anillo formado por dos proteínas SMC (*Structural Maintenance of Chromosomes*) Smc1 y Smc3, una subunidad kleisina Rad21 y otra subunidad no SMC Scc3 (Tanaka *et al.*, 2001; Vaur *et al.*, 2012).

La cohesina se carga en los cromosomas durante G₁ por el complejo Scc2/Scc4 y se hace cohesiva durante la replicación mediante la acetilación de Smc3 por Eso1 (Tanaka *et al.*, 2001; Toyoda *et al.*, 2002). En metafase se pierde la cohesina de los brazos de los cromosomas mediante un mecanismo desconocido diferente de la rotura de Rad21 por parte de la separasa como sucede en el caso de *S. cerevisiae* (Tapia-Alveal *et al.*, 2010). En el comienzo de la anafase, las cromátidas hermanas se separan debido a la pérdida de la cohesina remanente en el centrómero mediante la degradación de Rad21 por la separasa (Tomonaga *et al.*, 2000).

El complejo condensina

La condensación de cromosomas es un pro-

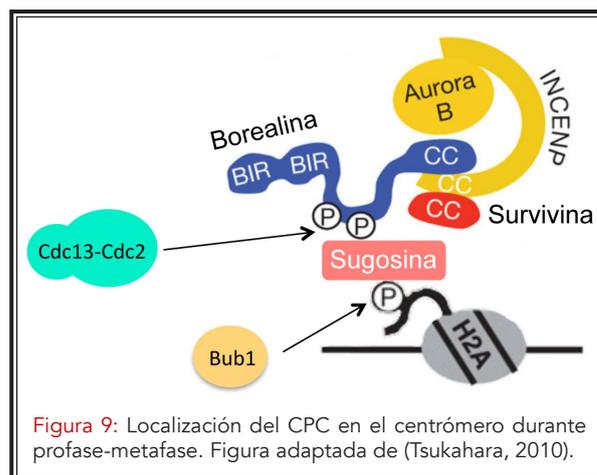
ceso de compactación estrictamente necesario para que el huso mitótico capture los cromosomas y los separe sin que ocurran enredos en las hebras de DNA (Takahashi, 2004). El complejo condensina consiste en dos subunidades SMC Psm2 y Psm4 y tres subunidades no SMC Cnd1, Cnd2 y Cnd3.

La carga de la condensina a los cromosomas ocurre a los largo de profase/metafase y culmina en anafase. La asociación de la condensina con la cromatina depende de su asociación con la histona H2A y su variante H2A.Z que actuarían como receptores de la condensina en el DNA. Esta asociación ocurre cuando la quinasa Aurora B, Ark1, fosforila la subunidad Cnd2 (Tada et al., 2011).

El complejo CPC (*Chromosomal Passenger Proteins*)

La quinasa Aurora B, INCENP (*Inner Centromere Protein*), survivina y borealina (Ark1, Pic1, Bir1 y Nbl1 en *S. pombe*) forman un complejo conservado a lo largo de la evolución. Su componente catalítico es Aurora B que juega un papel central en tanto en la bi-orientación de los cromosomas como en el SAC.

El complejo CPC, procedente de los brazos cromosómicos, se concentra en los centrómeros desde profase hasta metafase y se relocaliza en la zona media del huso mitótico en la transición metafase-anafase (Meadows, 2013; Tsukahara et al., 2010). La localización del CPC en el centrómero durante profase-metafase depende de la fosforilación de la borealina por parte de Cdc2. Esta fosforilación promueve la unión del CPC a la sugosina Sgo2 (Tsukahara et al., 2010), que funciona como un adaptador del complejo en el centrómero (Kawashima et al., 2007; Vanoosthuysen et al., 2007). A su vez Sgo2 se une al centrómero a través de



su unión a la histona H2A previamente fosforilada por Bub1 (figura 9) (Kawashima et al., 2010).

Se cree que la asociación de la quinasa Aurora B al centrómero crea un gradiente de actividad de fosforilación de tal manera que en el caso de asociaciones cinetocoro-microtúbulo incorrectas -que no generan tensión- los sustratos del cinetocoro externo están muy próximos a la quinasa Aurora B y son fosforilados. Esta fosforilación desestabiliza la interacción cinetocoro-microtúbulo aberrante y activa el SAC (ver apartado 2.6).

2.3 Los checkpoints

El mantenimiento de la integridad del genoma durante sucesivos ciclos de división celular es esencial para prevenir la acumulación de alteraciones genéticas y reordenamientos cromosómicos. Para proteger la estabilidad genómica, los sistemas de replicación y reparación del DNA deben actuar de forma coordinada con el mecanismo de segregación de los cromosomas. El *checkpoint* de daño en el DNA y el SAC regulan estos procesos y acoplan su finalización con la progresión del ciclo celular (Lee et al., 2013).

Los mecanismos de *checkpoint* de daño en el DNA son un conjunto de rutas de señalización

INTRODUCCIÓN

mediante los cuales el DNA dañado o el DNA que no haya sido replicado correctamente es detectado por proteínas sensoras para posteriormente activar respuestas celulares que garanticen la estabilidad genómica (Ciccía y Elledge, 2010).

Estas respuestas incluyen bloqueo del ciclo celular, estabilización de las horquillas de replicación, reparación del DNA, alteración del programa transcripcional, remodelación de la cromatina y apoptosis. Del mismo modo, existen mecanismos de recuperación y de adaptación que permiten que se reanude el ciclo celular cuando el origen del estrés es eliminado o cuando la amenaza persiste durante demasiado tiempo. El objetivo de las respuestas de *checkpoint* es, por tanto, proporcionar a los organismos el tiempo necesario para hacer frente a daños en el DNA tanto endógenos como exógenos y coordinar los mecanismos para solventarlos (Ciccía y Elledge, 2010).

En *S. pombe* existen dos rutas de señalización distintas que responden a daño en el DNA: el *checkpoint* de replicación que se activa cuando el DNA no se ha replicado correctamente y el *checkpoint* de daño en el DNA que responde a lesiones en el DNA ocurridas durante la fase G_2 .

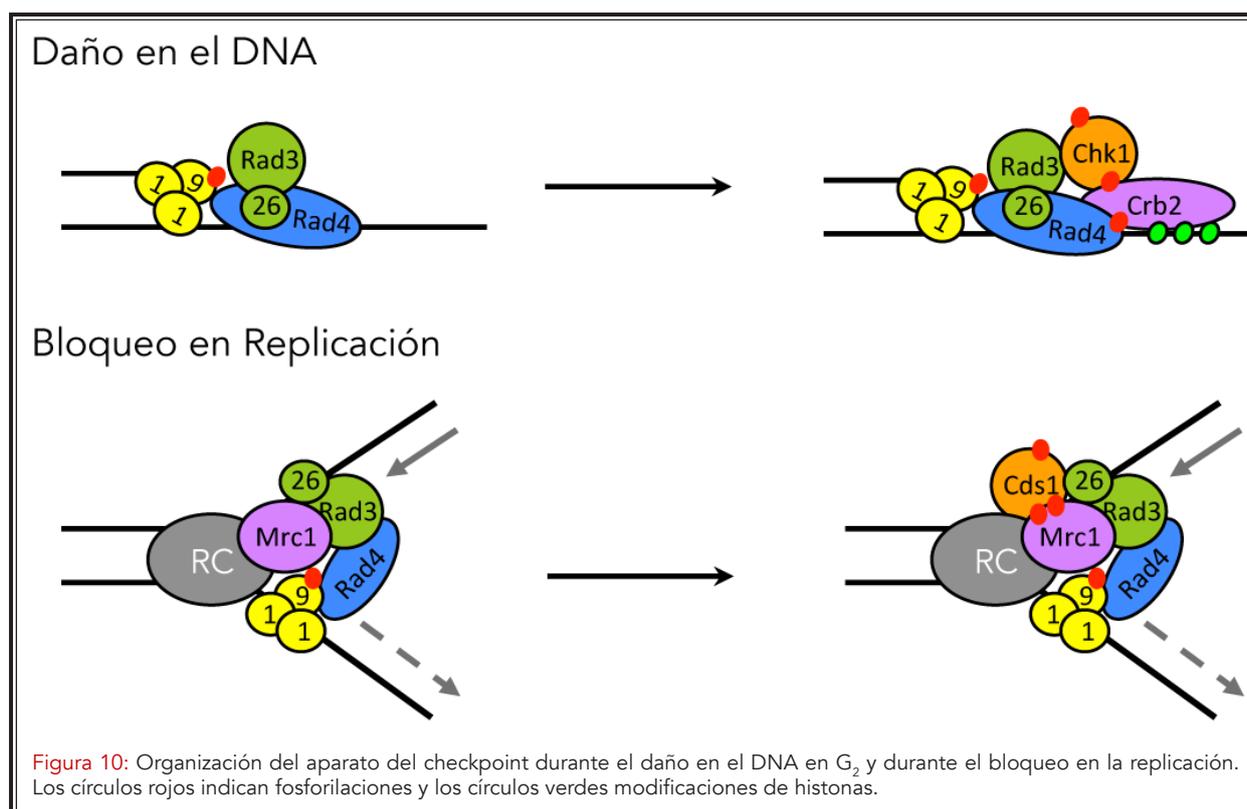
Las respuestas de *checkpoint* se ajustan a un esquema general en el cual el estrés correspondiente es sentido por proteínas sensoras y la señal es transmitida a proteínas efectoras a través de adaptadores. A continuación serán descritos los componentes de este esquema general en *S. pombe*.

2.3.1 Sensores

Las proteínas sensoras principales de la ruta son el complejo formado por Rad3, una quinasa tipo fosfatidilinositol 3-quinasa homóloga a la proteína ATR en humanos (hATR), y la proteína Rad26 (hATRIP) y el complejo 9-1-1, formado por las pro-

		<i>S. pombe</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Mamíferos
Sensores	Cargador de abrazadera	Rad17	Rad24	Rad17
		RFC ₂₋₅	RFC ₂₋₅	RFC ₂₋₅
	Abrazadera	Rad9	Ddc1	Rad9
		Rad1	Rad17	Rad1
		Hus1	Mec3	Hus1
	Reconocimiento de DSBs	Mre11	Mre11	Mre11
		Rad50	Rad50	Rad50
		Nbs1	Xrs2	Nbs1
	Quinasas apicales y proteínas de interacción	Rad3	Mec1	ATR
		Tel1	Tel1	ATM
		Rad26	Ddc2	ATRIP
	Adaptadores	Crb2	Rad9	BRCA1
Mrc1		Mrc1	Claspina	
Rad4/Cut5		Dbp11	TopBP1	
Efectores	Cds1	Rad53	Chk2	
	Chk1	Chk1	Chk1	

Tabla I: Principales sensores, mediadores y efectores de la respuesta de *checkpoint* de daño en DNA en levaduras y mamíferos.



teínas Rad9, Rad1 y Hus1. Ambos complejos se unen a los sitios de daño en el DNA de forma independiente (Melo *et al.*, 2001).

Además de Rad3, *S. pombe* posee otra fosfatidilinositol 3-quinasa, Tel1, homóloga a hATM, que tiene un papel minoritario en la señalización del *checkpoint* excepto cuando la resección de los extremos del DNA en las roturas de doble cadena (DSBs) está inhibida (Limbo *et al.*, 2011) y cuya función principal es el mantenimiento de los telómeros (Nakamura *et al.*, 2002).

A pesar de que las señales que desencadenan la respuestas del *checkpoint* de bloqueo en replicación y del *checkpoint* de daño en el DNA son claramente diferentes (horquillas de replicación bloqueadas o DSBs respectivamente), el desencadenante del reclutamiento de proteínas sensoras en el DNA es común en ambos casos y se debe a la presencia de DNA de cadena sencilla (ssDNA) recubierto del complejo heterotrimé-

rico RPA (*Replication Protein A*). Este ssDNA es reconocido por el complejo formado por Rad3 y Rad26 (figura 10) (Zou y Elledge, 2003).

La presencia de ssDNA en las horquillas de replicación se debe a un desacoplamiento entre el desenrollamiento del DNA por la helicasa MCM (*MiniChromosome Maintenance*) y la progresión de la DNA polimerasa debido a la presencia de DNA molde dañado o a la escasez de dNTPs (Sogo *et al.*, 2002). Sin embargo, el origen del ssDNA en el caso de las DSBs que aparecen durante la fase G_2 depende de la unión del complejo MRN (Mre11, Rad50, Nbs1) a dichas roturas. Una vez unido este complejo, Nbs1 se asocia con la proteína Ctp1 lo que provoca una resección inicial con sentido de 5' a 3' en los extremos del DNA generando ssDNA con extremos 3' protuberantes (Langerak *et al.*, 2011; Limbo *et al.*, 2011). Esta resección es extendida posteriormente por la nucleasa Exo1 (Tomita *et al.*, 2003).

Rad9, Rad1 y Hus1 forman un complejo heterotrimérico con una estructura tridimensional muy similar a la de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), un homotrímero con forma de anillo que actúa como una abrazadera deslizante sobre el DNA a la cual se unen las polimerasas replicativas (Dore et al., 2009). El complejo 9-1-1 es cargado en las transiciones de DNA de cadena sencilla a DNA de cadena doble de forma dependiente del complejo formado por Rad17 y las proteínas RFC₂₋₅ (*Replication Factor C*) (Majka et al., 2006; Venclovas y Thelen, 2000).

2.3.2 Adaptadores y proteínas de andamiaje

Las proteínas adaptadoras o mediadoras de la respuesta de *checkpoint* son las responsables de transmitir la señal desde la proteína sensora Rad3 a las quinasas efectoras Cds1 y Chk1 (figura 10).

La proteína Crb2 es el adaptador que conecta el complejo Rad3-Rad26 con Chk1. Crb2 es hiperfosforilado por Rad3 en respuesta a daño en el DNA (Saka et al., 1997), lo que permite su unión con Chk1 (Qu et al., 2012). De esta forma Chk1 es reclutado a los DSBs donde es fosforilado por Rad3 activándose así el *checkpoint* de daño en el DNA.

Mrc1 (*Mediator of replication checkpoint*) media la transducción de la señal desde Rad3-Rad26 a Cds1. Mrc1 se expresa predominantemente en fase S y es fosforilada por Rad3 y Tel1 tras un tratamiento con HU (Tanaka y Russell, 2001; Tanaka y Russell, 2004; Zhao et al., 2003), promoviendo su interacción con Cds1 (Xu et al., 2006).

Rad4 es una proteína de andamiaje capaz de acoplar físicamente el complejo 9-1-1, el complejo Rad3/Rad26 y la proteína Crb2 y es neces-

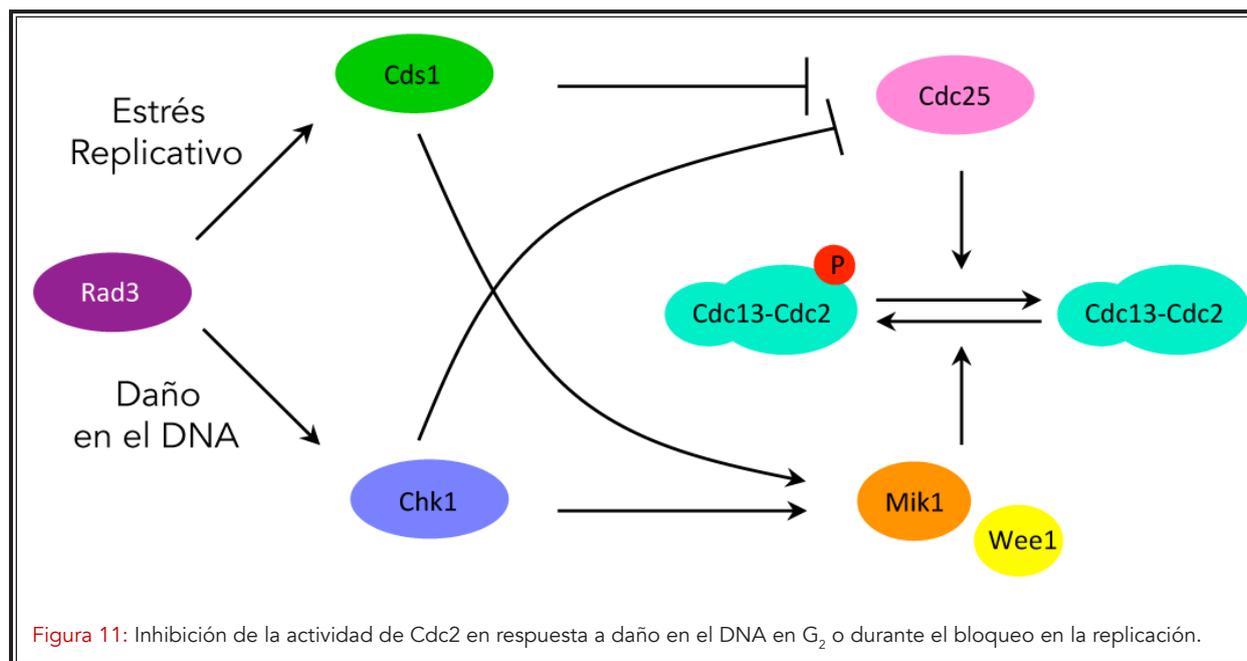
aria tanto para la activación de Chk1 como para la activación de Cds1 (Furuya et al., 2004; Harris et al., 2003; Qu et al., 2013; Taricani y Wang, 2006).

2.3.3 Efectores

El acontecimiento principal desencadenado en respuesta a estrés genotóxico es la fosforilación de las proteínas quinasa efectoras Chk1 y Cds1 por Rad3 (Lopez-Girona et al., 1999; Tanaka y Russell, 2001), ya que se cree que Rad3 actúa localmente fosforilando factores asociados a la cromatina mientras que las quinasas efectoras pueden difundir y propagar la señalización del *checkpoint* a efectores distantes (Smolka et al., 2007).

El estrés replicativo y el daño en el DNA ocurrido durante fase S llevan a la activación de Cds1 (Brondello et al., 1999; Lindsay et al., 1998; Murakami y Okayama, 1995), mientras que cuando el daño en el DNA se produce en fase G₂ se activa Chk1 (Brondello et al., 1999; Walworth et al., 1993). En ambos casos se produce una parada del ciclo celular que impide la entrada en mitosis de células con DNA dañado o no replicado. Así, la activación de Cds1 y/o Chk1 lleva a la inhibición de la fosfatasa Cdc25 y a la activación de la quinasa Mik1 (Furnari et al., 1999; Furnari et al., 1997; Rhind et al., 1997; Rhind y Russell, 2001), lo que acentúa la fosforilación inhibitoria la Tyr15 de Cdc2 y el correspondiente descenso de la actividad CDK necesario para evitar la entrada en mitosis (figura 11).

Sin embargo, el bloqueo del ciclo celular no es la única respuesta celular mediada por las quinasas efectoras una vez que el *checkpoint* está activo. Estas quinasas también juegan un papel importante en la estabilidad, reparación y recuperación durante y después de la parada de *check-*



point.

2.4 El checkpoint de bloqueo en replicación

El *checkpoint* de replicación es una ruta de transducción compleja que se activa cuando la reserva de dNTPs se vuelve limitante para la síntesis de DNA o cuando las horquillas de replicación se encuentran con lesiones en el DNA molde (Branzei y Foiani, 2009; Jossen y Bermejo, 2013; Labib y De Piccoli, 2011). Las horquillas de replicación bloqueadas suponen una seria amenaza para la integridad genómica ya que son propensas a sufrir colapsos o reorganizaciones (Lambert y Carr, 2013).

Una vez activo, el *checkpoint* desencadena una serie de respuestas celulares que permiten que la replicación pueda ser reanudada cuando se recuperan las condiciones normales (Branzei y Foiani, 2009; Jossen y Bermejo, 2013; Labib y De Piccoli, 2011).

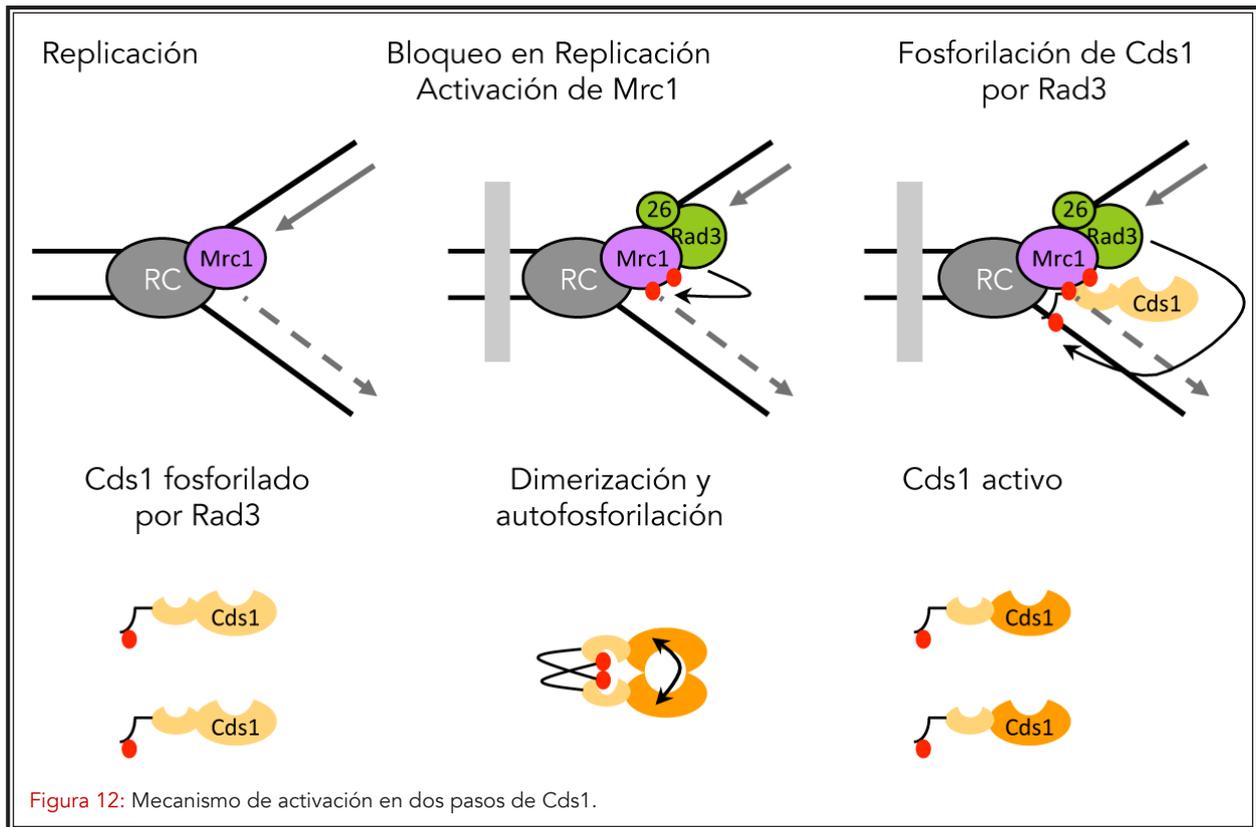
2.4.1 Activación de Cds1

Cds1 es una serina/treonina proteína quina-

sa que pertenece a la familia de las *checkpoint*-quinasas tipo Chk2 que incluye Dun1, Rad53 y Mek1 de *S. cerevisiae* y Chk2 humana. Como todos los miembros de esta familia, Cds1 presenta un dominio FHA (*ForkHead-Associated*) en su región N'-terminal que media interacciones proteína-proteína y un dominio quinasa (Durocher *et al.*, 2000; Murakami y Okayama, 1995).

Cds1 se localiza por toda la célula concentrándose en el núcleo durante la fase S. La localización nuclear constitutiva de la proteína no promueve su activación, indicando que su papel en el *checkpoint* no depende exclusivamente de esta localización (Brondello *et al.*, 1999).

Cds1 es activada por estrés replicativo en un mecanismo de dos pasos (figura 12). En el primer paso, Cds1 interacciona a través de su dominio FHA con Mrc1 previamente fosforilada por Rad3 en los residuos Thr412 y Thr653. Esta interacción es un requisito para que se produzca la aproximación entre Rad3/Rad26 y Cds1 y por consiguiente para que Rad3 fosforile a Cds1 en su residuo Thr11 (Tanaka y Russell, 2004; Xu *et al.*, 2006; Yue



et al., 2011). En la segunda etapa dos moléculas de Cds1 fosforiladas en su Thr11 interactúan entre sí de forma dependiente del dominio FHA para formar un homodímero que es activado por autofosforilación en los residuos Thr328 y Thr332 (Xu et al., 2006; Yue et al., 2011). Para que esto ocurra, además de las fosforilaciones en Mrc1 y Cds1 también es necesaria la fosforilación de Rad9 por Rad3 en su Thr412 (Furuya et al., 2004; Yue et al., 2011).

Otras proteínas como el complejo Swi1-Swi3, también conocido como FPC (*Fork Protection Complex*), y Sap1 también son necesarias para la activación completa de Cds1 (Noguchi y Noguchi, 2007; Noguchi et al., 2003; Shimmoto et al., 2009; Tanaka et al., 2010).

El complejo Swi1-Swi3 está asociado a la cromatina durante la fase S y viaja junto con la maquinaria de replicación (Noguchi et al., 2004). Este complejo fue descubierto por su función en

el intercambio del tipo sexual en *S. pombe* (Egel et al., 1984) y está implicado en la ralentización de la progresión de las horquillas de replicación en zonas del genoma difíciles de replicar favoreciendo su estabilidad (Leman y Noguchi, 2012). Además, juega un papel en el establecimiento de la cohesión entre las cromátidas hermanas de forma coordinada durante la replicación (Ansbach et al., 2008; Leman y Noguchi, 2012; Rapp et al., 2010).

El reclutamiento del complejo Swi1-Swi3 a la cromatina depende de Sap1 (Noguchi y Noguchi, 2007). Sap1 está implicada en la parada de las horquillas de replicación en el locus de conjugación y en las repeticiones de DNA ribosómico (Arcangioli et al., 1994; Mejia-Ramirez et al., 2005). Posteriormente se ha visto que Sap1 también se une a los orígenes de replicación y es necesaria para la iniciación de la replicación (Sun y Kong, 2010).

La activación eficiente de Cds1 requiere,

además, un estado de replicación activo ya que proteínas implicadas en el inicio y la progresión de la replicación como Hsk1, Ctf18, Orc1 y Cdc45 también son necesarias para su activación (Ansbach *et al.*, 2008; Matsumoto *et al.*, 2010; Nitani *et al.*, 2006).

2.4.2 Efectores de Cds1

Cómo se mencionó anteriormente, Cds1 inhibe la entrada en mitosis en respuesta a estrés replicativo a través de la inhibición de Cdc25 y la activación de Mik1. Sin embargo, aunque las células *cds1Δ* sufren parada de *checkpoint* debido a la activación de Chk1, rápidamente pierden viabilidad tras un tratamiento con HU. Esto puso de manifiesto la importancia de Cds1 en el mantenimiento de la estabilidad de las horquillas de replicación (Boddy *et al.*, 1998; Lindsay *et al.*, 1998). De hecho, la mayoría de los efectores caracterizados de Cds1 poseen funciones relacionadas con la ralentización de la replicación o la inhibición de los mecanismos de reparación que pueden ser perjudiciales cuando la replicación está bloqueada (figura 13).

Cds1 se une a la subunidad de la helicasa MCM Mcm4 y la fosforila en presencia de HU (Bailis *et al.*, 2008). La regulación del complejo MCM por Cds1 ha sido propuesto como un mecanismo necesario para evitar el excesivo desenrollamiento del DNA en presencia de estrés replicativo (Forsburg, 2008; Sabatinos *et al.*, 2012).

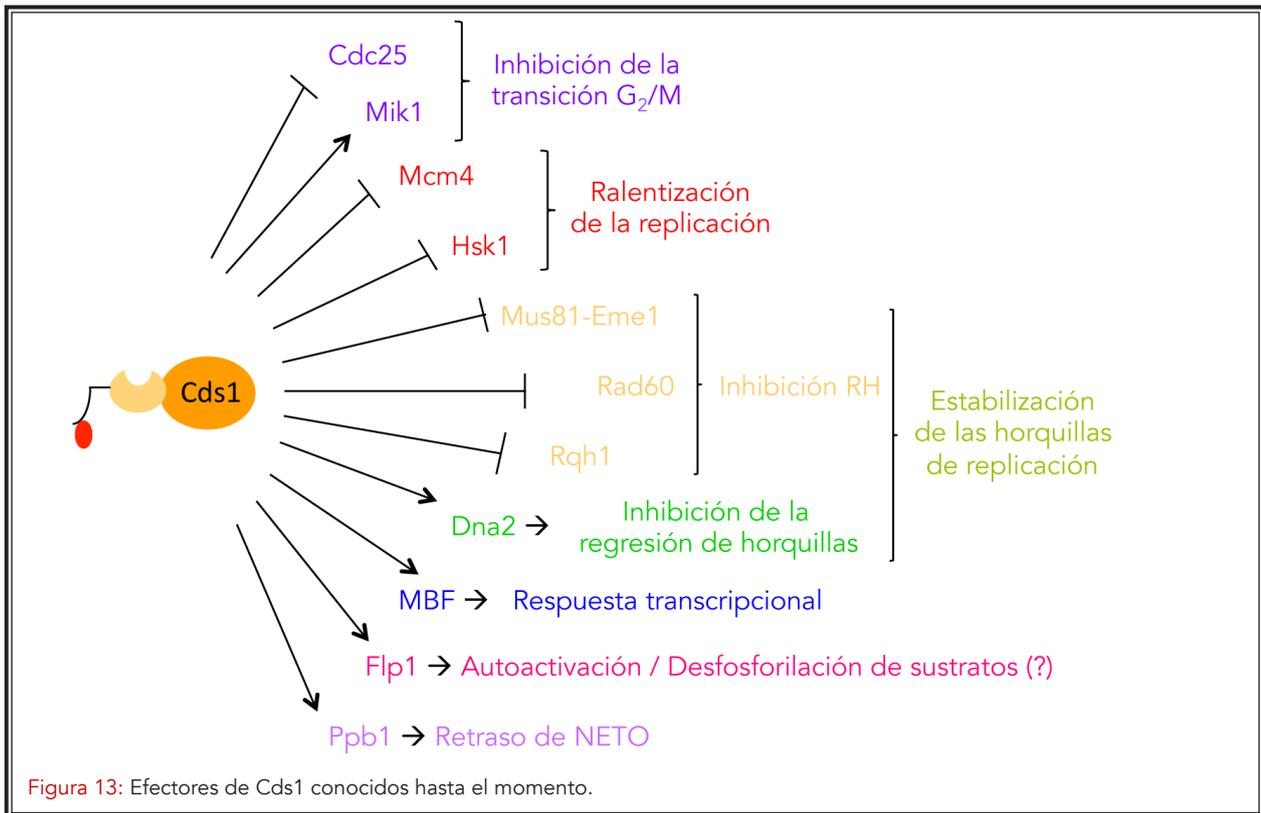
Cds1 también inhibe a Hsk1, una quinasa implicada en la activación de orígenes de replicación (Snaith *et al.*, 2000; Takeda *et al.*, 2001). De esta manera Cds1 impide que se disparen los orígenes de replicación tardíos, lo que supone la principal causa de la ralentización de la replicación en presencia de estrés replicativo conocida como

el “intra-fase S *checkpoint*” (Jossen y Bermejo, 2013; Kumar y Huberman, 2004).

Cds1 regula directamente la maquinaria de recombinación homóloga para evitar procesos de recombinación deletéreos en condiciones de estrés replicativo, como es el caso del complejo endonucleasa Mus81-Eme1, la helicasa Rqh1 y Rad60 (Froget *et al.*, 2008; Kai *et al.*, 2005; Miyabe *et al.*, 2009; Willis y Rhind, 2009). Además, Cds1 es necesaria para inhibir la regresión de las horquillas de replicación a través de la asociación de la nucleasa Dna2 a las horquillas bloqueadas. Dna2 degrada eficientemente los precursores necesarios para la inversión de las horquillas (Hu *et al.*, 2012).

Además de coordinar los mecanismos necesarios para la estabilidad de las horquillas de replicación mencionados anteriormente, Cds1 también promueve una respuesta transcripcional que tiene como objetivo incrementar la concentración de dNTPs necesaria para que se reanude la replicación. Cds1 activa la transcripción dependiente del MBF (*MluI-Binding Factor*) mediante la fosforilación de varios componentes de dicho complejo como Cdc10, el corepresor Nrm1, el represor Yox1 y el coactivador Rep2 (Chu *et al.*, 2009; de Bruin *et al.*, 2008; Dutta *et al.*, 2008; Gomez-Escoda *et al.*, 2011; Ivanova *et al.*, 2013).

Cds1 fosforila también la fosfatasa Flp1 promoviendo su liberación del nucléolo al núcleo en respuesta a HU (Broadus y Gould, 2012; Diaz-Cuervo y Bueno, 2008). Flp1 contribuye a la activación de Cds1 (Diaz-Cuervo y Bueno, 2008). Sin embargo, no es necesaria para la viabilidad celular en respuesta a estrés genotóxico por lo que no está clara su función en el núcleo en estas condiciones. Se ha postulado que podría desfosforilar



sustratos fosforilados por las *checkpoint*-quinasas (Broadus y Gould, 2012).

Recientemente se ha descrito que Cds1 no sólo bloquea la progresión del ciclo celular, sino también el crecimiento polarizado dependiente de microtúbulos en respuesta a estrés replicativo ya que activa por fosforilación a Ppb1, la subunidad catalítica de la fosfatasa calcineurina. La calcineurina desfosforila a Tip1 produciendo un retraso en el establecimiento del crecimiento por el segundo polo (NETO) (Kume *et al.*, 2011).

2.5 El *checkpoint* de daño en el DNA

El *Checkpoint* de daño en el DNA coordina la parada de ciclo celular en G_2 con los mecanismos de reparación para preservar la integridad genómica cuando se detectan lesiones en el DNA (Yasuhira *et al.*, 2012).

En *S. pombe*, la entrada en mitosis es inhibi-

da por la activación de la quinasa Chk1 en respuesta a DNA dañado durante las fases G_2 y S tardía (Martinho *et al.*, 1998; Walworth y Bernards, 1996). Además, este mecanismo de *checkpoint* también se activa en respuesta a horquillas dañadas o colapsadas, una situación que ocurre tras un procesamiento deletéreo de ciertas estructuras durante la fase S o como resultado de una respuesta defectuosa del *checkpoint* de replicación (Boddy *et al.*, 1998; Wan *et al.*, 1999).

Chk1 es esencial para la supervivencia en presencia de daño en el DNA ya que las células que carecen de *chk1+* no paran la progresión del ciclo celular (Walworth *et al.*, 1993). Para que se produzca la activación de Chk1 mediante su fosforilación por Rad3 en su Ser345 son necesarias, además de Rad3 y Rad26, las proteínas Rad9, Rad1, Hus1, Rad17, Rad4/Cut5 y Crb2 (al-Khodairy *et al.*, 1994; Enoch *et al.*, 1992; Qu *et al.*, 2013; Qu *et al.*, 2012; Saka *et al.*, 1997; Walworth y Bernards, 1996).

2.6 El Spindle Assembly Checkpoint (SAC)

El *Spindle Assembly Checkpoint* es una ruta de señalización que controla la unión de los cromosomas al huso mitótico e inhibe la transición metafase-anafase hasta que todos los cromosomas están bi-orientados correctamente (Lara-Gonzalez et al., 2012). Los componentes del SAC son Mps1 (Mph1 en *S. pombe*), Mad1, Mad2, Mad3 (BubR1 en algunos organismos), Bub1 y Bub3 (Musacchio y Salmon, 2007). Además está la quinasa Ark1 (Aurora B) que es necesaria para la activación del SAC (Petersen y Hagan, 2003; Santaguida et al., 2011). Estas proteínas están conservadas evolutivamente y están enriquecidas en los cinetocoros no unidos a microtúbulos.

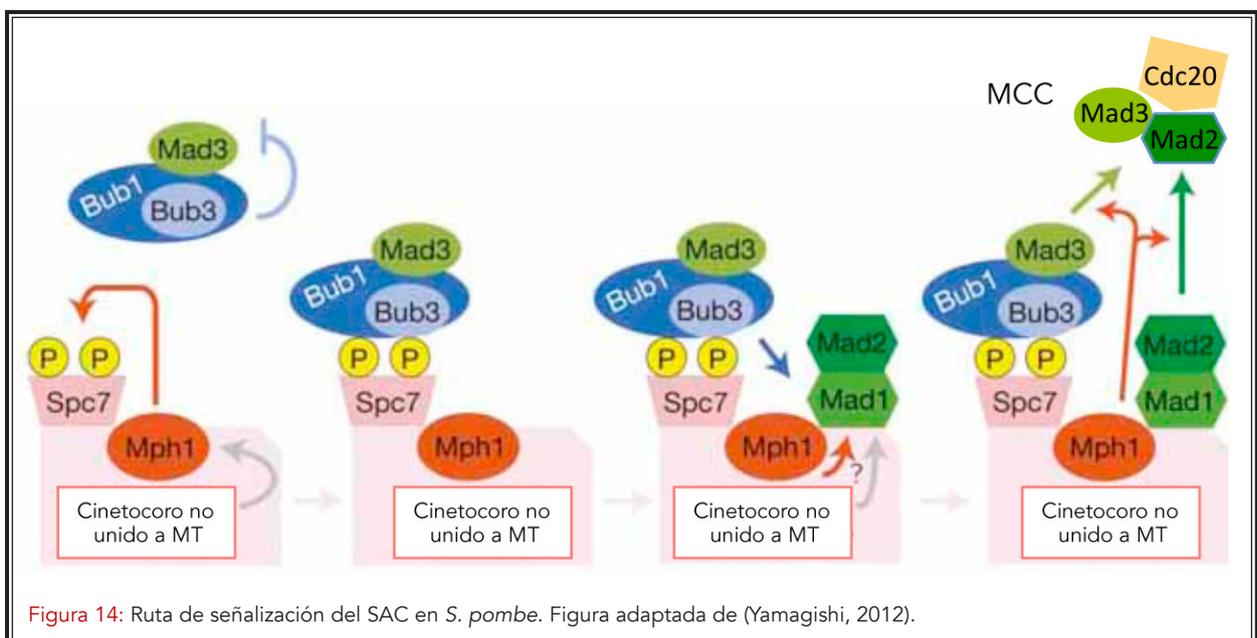
Mph1 actúa por encima del resto de componentes del SAC ya que en su ausencia ninguna de las demás proteínas de la ruta se localiza en el cinetocoro y el SAC no se activa. La localización de Mph1 depende de la actividad de la Ark1 (Heinrich et al., 2012). Aurora B fosforila proteínas del cinetocoro dependiendo de si el cinetocoro está o no está unido al microtúbulo (Liu et al., 2009) lo que podría generar un sitio de unión para Mph1 y la

activación de la ruta (Heinrich et al., 2012).

Mph1 promueve la unión de Bub1 y Bub3 al cinetocoro mediante fosforilación de la proteína Spc7. Además se sabe que Bub1 y Bub3 solamente interactúan con la forma fosforilada de Spc7 si se encuentran unidas formando un complejo (Shepherd et al., 2012; Yamagishi et al., 2012). La unión del complejo Bub1-Bub3 al cinetocoro podría iniciar un proceso de retroalimentación positiva ya que la unión de Ark1 al cinetocoro a su vez depende de la fosforilación de la histona H2A por Bub1 (Kawashima et al., 2010). Por otro lado, Mad1, Mad2 y Mad3 no se localizan en los cinetocoros en ausencia de Bub1 o Bub3 (figura 14) (Heinrich et al., 2012).

Mad2 es un componente clave del SAC que se activa mediante un cambio de conformación promovido usando como cebador el complejo Mad1-Mad2, enriquecido en los cinetocoros no unidos a microtúbulos (De Antoni et al., 2005).

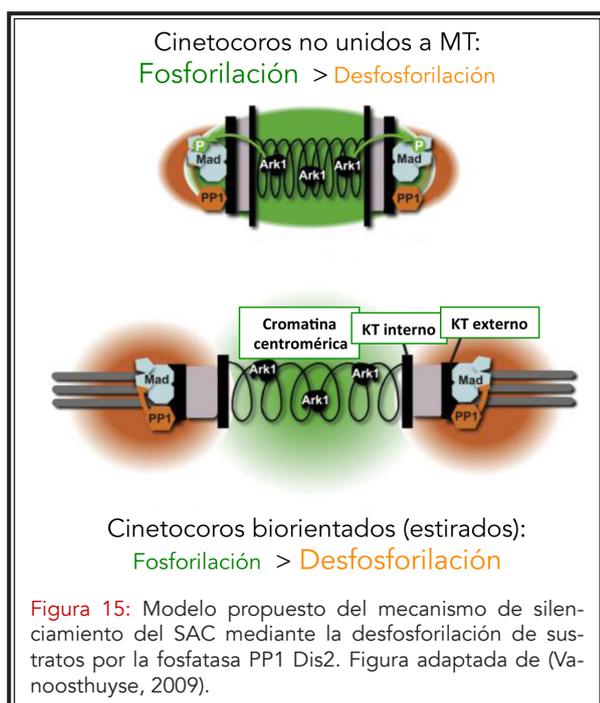
Una vez activo, Mad2 se asocia en el nucleoplasma con Mad3 y Cdc20 dando lugar al MCC (*Mitotic Checkpoint Complex*) que se une



e inhibe al complejo APC/C (figura 14) (Millband y Hardwick, 2002). Recientemente se ha descrito que Mph1 estabiliza la unión Mad2-Mad3-Cdc20 mediante la fosforilación de Mad2 (Zich *et al.*, 2012). Es posible que esta fosforilación sea una de las varias modificaciones postraduccionales en los componentes del MCC que confieran estabilidad al complejo ya que en *S. cerevisiae* el MCC es estabilizado mediante la fosforilación de Mad3 por Aurora B (King *et al.*, 2007) y Bub1 fosforila a Cdc20 en células animales (Tang *et al.*, 2004). Además se han identificado sitios de fosforilación por Mph1 en la proteína Mad3 de *S. pombe*.

Como hemos visto anteriormente, la fosforilación por Ark1 de las proteínas del cinetocoro externo desestabiliza las interacciones cinetocoro-microtúbulo aberrantes y activa el SAC. El desprendimiento de uniones aberrantes es necesario para que se produzcan sucesivas rondas de anclaje hasta que se consigue la bi-orientación del cromosoma.

Cuando la asociación de los cinetocoros de cromátidas hermanas a microtúbulos de polos



opuestos se produce correctamente, se genera una tensión que tiene como consecuencia la separación de Aurora B de sus sustratos del cinetocoro externo. Sin embargo, los sustratos necesitan ser desfosforilados y esta desfosforilación es llevada a cabo por la fosfatasa PP1 Dis2, cuya función es antagonizar a la quinasa Aurora B estabilizando las uniones cinetocoro-microtúbulo y silenciando el SAC (figura 15) (Vanoosthuyse y Hardwick, 2009). La fosfatasa Dis2 se localiza en el cinetocoro externo mediante su asociación tanto a Spc7 como a las kinesinas Klp5 y Klp6 (Meadows *et al.*, 2011).

3. REGULACIÓN DE LA MORFOLOGÍA Y LA POLARIDAD. EL CITOESQUELETO DE ACTINA Y DE MICROTÚBULOS

En *S. pombe*, la progresión del ciclo celular está íntimamente ligada al ciclo morfogénico. La fase del ciclo en la que se encuentra la célula determina el patrón de crecimiento que dará lugar a la forma de la misma. Sin embargo, el crecimiento polarizado, es controlado en última instancia por una compleja red de interacciones entre la maquinaria de polarización celular, los microtúbulos y el citoesqueleto de actina.

3.1 El citoesqueleto de actina

En *S. pombe* la actina está codificada por un único gen, *act1+*, y existe en dos estados: la actina globular, G-actina, que es la forma minoritaria y la actina polimerizada o filamentosa, F-actina. El citoesqueleto de actina de *S. pombe* es relativamente simple y durante el crecimiento vegetativo se organiza en tres estructuras bien definidas: los parches de actina, los cables de actina y el anillo contráctil de actomiosina (figura 16) (Marks y Hyams, 1985).

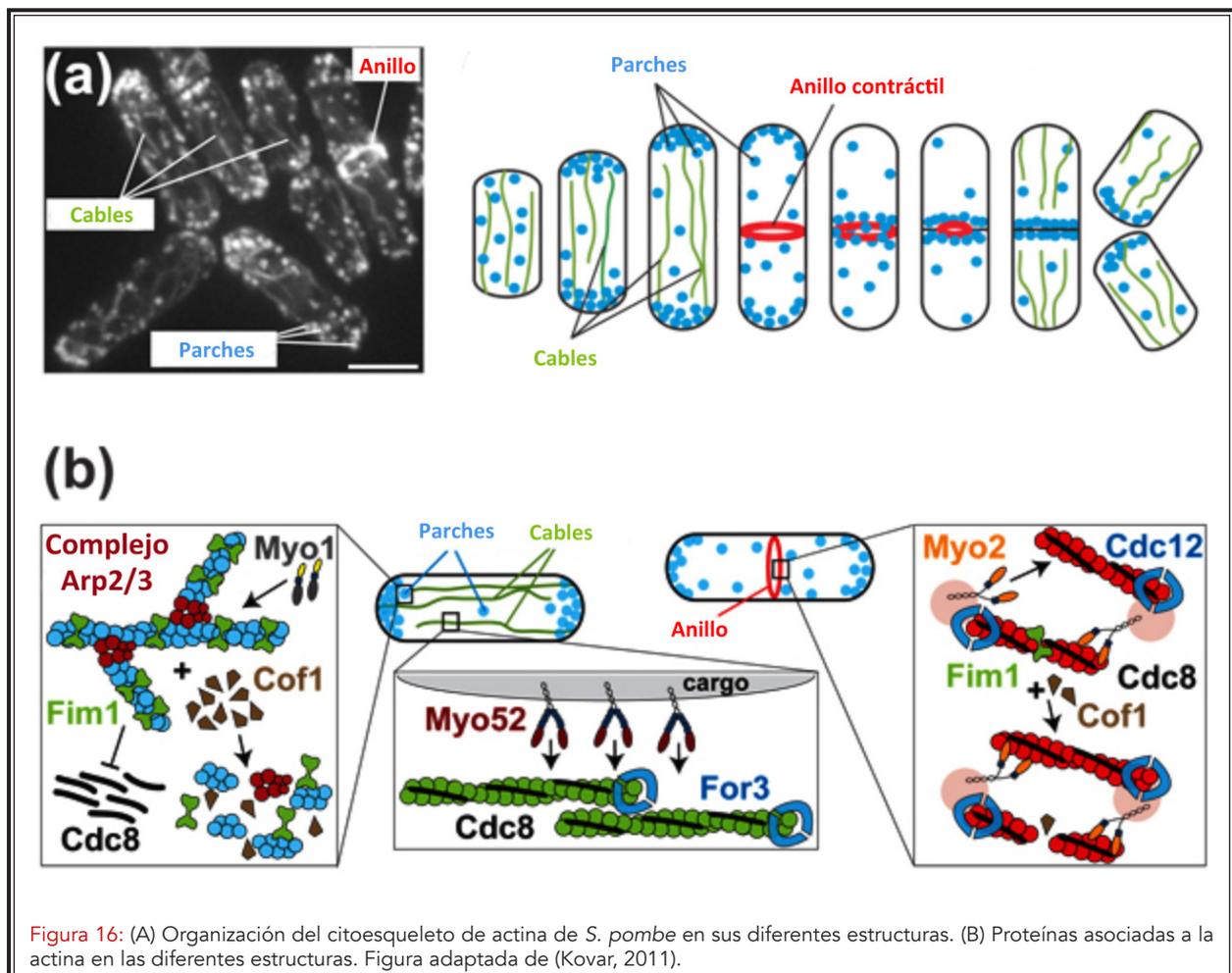
3.1.1 Los parches de actina

Los parches de actina son filamentos cortos y ramificados enormemente dinámicos que se ensamblan en los sitios de endocitosis que acompañan al crecimiento polarizado en los polos durante la interfase y en la zona media cuando las células se dividen (Gachet y Hyams, 2005). La función endocítica de los parches de actina se ha relacionado con la síntesis y remodelación de la pared celular (Kovar *et al.*, 2011).

La nucleación de los parches de actina es llevada a cabo por el complejo Arp2/3 (*actin related protein*), un complejo formado por varias subunidades que incluyen dos proteínas parecidas a la actina (Arp2 y Arp3) y otras cinco proteínas únicas (Rotty *et al.*, 2013). Este complejo es estimulado por tres factores promotores de nucleación: Pan1,

similar al adaptador endocítico Eps15; Wsp1 de la familia WASP (*Wiscott-Aldrich Syndrome Protein*) y la miosina de tipo I Myo1 (Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2010).

Además, en los parches hay otras proteínas implicadas en la estabilidad y en la regulación de la dinámica de los parches y de otras estructuras de actina (Figura 16). Así, la fimbrina, Fim1, da rigidez a la estructura del parche de actina; la profilina, Cdc3, es una proteína de unión a actina implicada en nucleación y polimerización de los filamentos de actina; la coronina, Crn1, está asociada a los parches y determina la extensión de los filamentos de actina; y las cofilinas, Adf1 y Gmf1 se unen a los filamentos e inducen su ruptura en fragmentos más cortos para que el parche de actina se desensamble más rápidamente una vez finalizado el pro-



ceso de endocitosis asociado a la internalización del parche (Kovar *et al.*, 2011).

3.1.2 Los cables de actina

Los cables de actina se extienden a lo largo del eje longitudinal de las células en interfase orientados de tal manera que la inserción de nuevos monómeros ocurre por el extremo más cercano a los polos (Kamasaki *et al.*, 2005). Esta orientación asegura el transporte a los polos del material requerido para el crecimiento polarizado ya que sirven como vías a través de las cuales viajan las miosinas de tipo V, como Myo52, que transportan vesículas de secreción para que se produzca el crecimiento polarizado (Motegi *et al.*, 2001).

Los cables de actina están compuestos de haces de filamentos cortos de actina paralelos que son ensamblados por la actividad nucleadora de la formina For3 (Feierbach y Chang, 2001; Kamasaki *et al.*, 2005). En *S. pombe* se han descrito pocas proteínas de unión a filamentos de actina que se unan a los cables, tan solo la tropomiosina Cdc8, una proteína estabilizadora de filamentos de actina y la coronina, Crn1 (Figura 16) (Pelham y Chang, 2001).

3.1.3 El anillo de actomiosina

Es una estructura esencial para la división celular que está formada por filamentos de actina y de miosina de tipo II (Balasubramanian *et al.*, 2004). El anillo contráctil se ensambla en la región media de la célula durante la mitosis, siendo la formina Cdc12 la responsable del ensamblaje de los filamentos de actina que se asocian con la tropomiosina Cdc8 y con Myo2 (Yonetani y Chang, 2010). La contracción del anillo depende de la activación de una ruta de señalización conocida como SIN (*Septation Initiation Network*) y se produce de forma coordinada con el depósito y la in-

vaginación de nueva membrana. Ambos procesos guían la deposición del material de pared celular que forma el septo de división (Balasubramanian *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2012).

3.2 El citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos son polímeros de forma cilíndrica presentes en todas las células eucariotas, formados por la asociación no covalente de monómeros de tubulina (α y β -tubulina). Debido a la naturaleza del ensamblaje de los dímeros de tubulina, los microtúbulos son estructuras polares con dos extremos bien definidos. El polo (+) es capaz de añadir o perder subunidades adicionales de dímeros de tubulina y así crecer o despolimerizarse (proceso conocido como catástrofe), y el polo (-) es estático y se asocia a sitios de nucleación de microtúbulos (Desai y Mitchison, 1997; Mitchison y Kirschner, 1984).

En *S. pombe*, los microtúbulos se organizan de diversas formas y desde distintos lugares en la célula, que se han denominado "Centros Organizadores de Microtúbulos" o MTOCs. Durante interfase, la célula contiene entre 3-5 haces de microtúbulos que desempeñan funciones relacionadas con el posicionamiento del núcleo, que a su vez condicionará la posición del sitio de división, el crecimiento y la morfología celular (Daga y Chang, 2005; Daga y Nurse, 2008). Estos microtúbulos se organizan desde el SPB, la membrana nuclear, los propios microtúbulos o el citoplasma. Al conjunto de estos MTOCs que funcionan durante interfase se les conoce como iMTOCs.

En mitosis, los microtúbulos citoplasmáticos se desensamblan y se forman los microtúbulos intranucleares (huso mitótico) y los microtúbulos astrales, ambos desde el SPB. Los microtúbulos

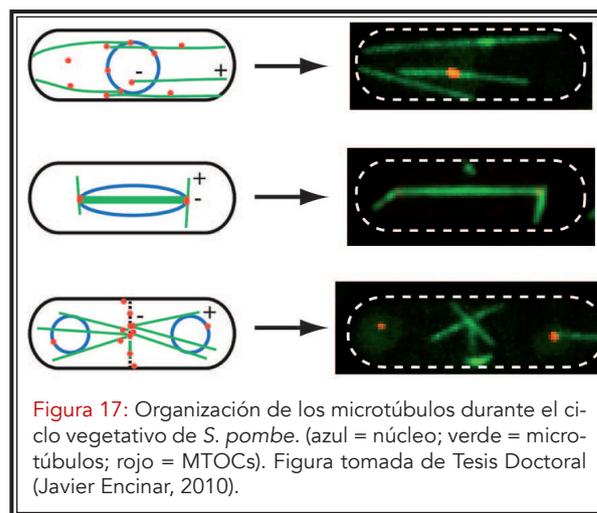
astrales han sido relacionados con el alineamiento del huso mitótico con respecto al eje celular, pero no con su elongación (Sawin y Tran, 2006).

En las últimas etapas de la mitosis desaparecen los microtúbulos intranucleares y astrales y se forma una nueva estructura en la región del septo de división, el "Post-Anaphase Array" o PAA. Al concluir la mitosis, esta estructura se desorganiza y se forman de nuevo los microtúbulos citoplasmáticos. El PAA estabiliza el anillo de actomiosina durante la citocinesis y mantiene alejados a los núcleos de las células hijas de la zona de división (figura 17) (Hagan y Hyams, 1988; Pardo y Nurse, 2003).

3.2.1 Nucleación y organización de microtúbulos

La polimerización de los microtúbulos *in vivo* requiere del complejo de la γ -tubulina, un complejo de unos 2 MDa formado por distintas proteínas entre las que se incluye la γ -tubulina. Al igual que en eucariotas superiores, en *S. pombe* se han identificado dos posibles versiones del complejo de la γ -tubulina. La versión pequeña (γ -TUSC), compuesta por las proteínas Gtb1, Alp4 y Alp6, que es más abundante y relativamente inactiva, y la versión grande (γ -TURC), que está formada por la versión pequeña más Alp16, Gfh1 y Mod21, y es más escasa y eficiente (Anders *et al.*, 2006). El complejo de la γ -tubulina es incorporado a los MTOCs a través de otro complejo formado por las proteínas Mto1 y Mto2 (Samejima *et al.*, 2005; Sawin *et al.*, 2004).

La organización de los microtúbulos en haces durante la interfase se mantiene gracias a las proteínas Ase1 y la kinesina Klp2. Ase1 forma homodímeros que se unen a las regiones superpuestas de los extremos negativos de dos microtúbulos orientados de forma antiparalela y los mantiene



unidos (Loiodice *et al.*, 2005), mientras que Klp2 facilita el deslizamiento de estos microtúbulos uno sobre otro (Braun *et al.*, 2009). De esta manera, los extremos positivos de los microtúbulos están orientados hacia los polos celulares y los extremos negativos empaquetados en el centro de la célula dando lugar a una matriz antiparalela y simétrica.

3.2.2 Proteínas asociadas a microtúbulos (MAPs)

Los microtúbulos no son simples polímeros de tubulina, a ellos se asocian numerosas proteínas que regulan la dinámica y las funciones del citoesqueleto de microtúbulos.

Entre estas proteínas se encuentran las proteínas motoras que mediante la hidrólisis de ATP son capaces de desplazar sustratos a través de los microtúbulos o de mover un microtúbulo a través de una estructura estática. *S. pombe* contiene únicamente un gen que codifica una cadena pesada de dineína (*dhc1+*) (Hiraoka *et al.*, 2000) y nueve genes que codifican diferentes cadenas pesadas de kinesinas (*pk11+*, *klp2+*, *klp3+*, *tea2+*, *klp5+*, *klp6+*, *cut7+*, *klp8+* y *klp9+*) (Fu *et al.*, 2009). Las proteínas Klp5 y Klp6, dos miembros de la familia de la kinesina-8, son capaces de inducir tanto la catástrofe como el crecimiento de los microtúbulos y son necesarias para la segregación de cromosomas y el silenciamiento del SAC (Erent *et al.*, 2012; García

et al., 2002; Grissom *et al.*, 2009; Meadows *et al.*, 2011; Syrovatkina *et al.*, 2013).

Un segundo grupo de proteínas asociadas a microtúbulos son las +TIPs, proteínas que se asocian al extremo positivo de los microtúbulos y regulan tanto la dinámica de microtúbulos como las interacciones de los microtúbulos con otras estructuras celulares.

Entre las +TIPs destacan las proteínas EB (*End Binding*), cuyo representante en *S. pombe* es la proteína Mal3 (Asakawa *et al.*, 2005). Estas proteínas se unen de forma autónoma al extremo positivo de los microtúbulos en crecimiento estabilizándolo y además, de ellas depende la unión de otras +TIPs (Duellberg *et al.*, 2013).

Otra familia de proteínas +TIP es la familia de "Proteínas Asociadas al Citoesqueleto ricas en Glicina" (CAP-Gly) a las que pertenece Tip1, el homólogo en *S. pombe* de CLIP-170. Tip1 se asocia al extremo positivo de los microtúbulos a través de la kinesina Tea2 y es necesaria para evitar que los microtúbulos sufran catástrofe al tocar cualquier punto de la corteza celular que no sean los polos (Busch y Brunner, 2004). Tip1 también participa en el establecimiento del crecimiento polarizado ya que transporta el complejo Tea1-Tea4 en la punta del microtúbulo a los polos de la célula (Browning *et al.*, 2003).

Dis1 y Alp14 pertenecen a la familia de +TIPs TOG/XMAP215, los miembros de esta familia son los principales reguladores de la dinámica de microtúbulos en la célula. Estas dos proteínas tienen actividad polimerasa sobre los microtúbulos, están relacionadas con la formación del huso mitótico y tienen un papel muy importante en la interacción microtúbulo-cinetocoro, al que se unen a través de

la proteína Ndc80 (Al-Bassam *et al.*, 2012; Hsu y Toda, 2011; Tang *et al.*, 2013).

El complejo DASH es un grupo peculiar de proteínas +TIP, ya que es exclusivo de levaduras. Este complejo está formado por diez subunidades (Dam1, Duo1, Ask1, Dad1, Dad2, Dad3, Dad4, Dad5, Spc19 y Spc34) y se cree que forma estructuras de tipo anillo que abrazan el microtúbulo (Buttrick y Millar, 2011). El complejo DASH está implicado en la bi-orientación de los cromosomas durante la metafase (Sanchez-Perez *et al.*, 2005).

3.3 Control del crecimiento polarizado mediante la regulación coordinada del citoesqueleto de actina y de microtúbulos

El establecimiento del crecimiento por el segundo polo (NETO) es un buen ejemplo de cómo interactúan el citoesqueleto de actina con el de microtúbulos. La capacidad del citoesqueleto de microtúbulos para regular la polaridad celular y establecer los lugares de crecimiento se debe a que transporta hasta allí las proteínas necesarias para la activación de la nucleación de la actina en estos lugares.

Las células con defectos en los microtúbulos interfásicos crecen de forma polarizada pero en posiciones aberrantes, dando lugar a células curvadas y en forma de T (Hirata *et al.*, 1998; Radcliffe *et al.*, 1998; Umesono *et al.*, 1983; Zimmerman *et al.*, 2004). Uno de los primeros componentes de la maquinaria de polarización celular identificado fue la proteína Tea1, cuyo gen fue aislado a partir de uno de estos mutantes que mostraban células en forma de T y defectos en NETO similares a los descritos en los mutantes de microtúbulos (Mata y Nurse, 1997). Tea1 es una proteína con repeticiones "kelch" y se localiza en los extremos positivos

de los microtúbulos y en el cortex celular (Behrens, 2002; Feierbach *et al.*, 2004; Mata y Nurse, 1997).

Posteriormente, estudios bioquímicos demostraron que Tea1 formaba un complejo con Tea4 (Martin *et al.*, 2005). El complejo Tea1-Tea4 es transportado a los polos en los extremos (+) de los microtúbulos asociado al complejo +TIP (Mal3-Tea2-Tip1) y se deposita de forma punteada en el córtex. Su localización depende de la interacción de Tea1 con las proteínas Mod5 y Tea3 (Arellano *et al.*, 2002; Snaith y Sawin, 2003; Snaith *et al.*, 2005).

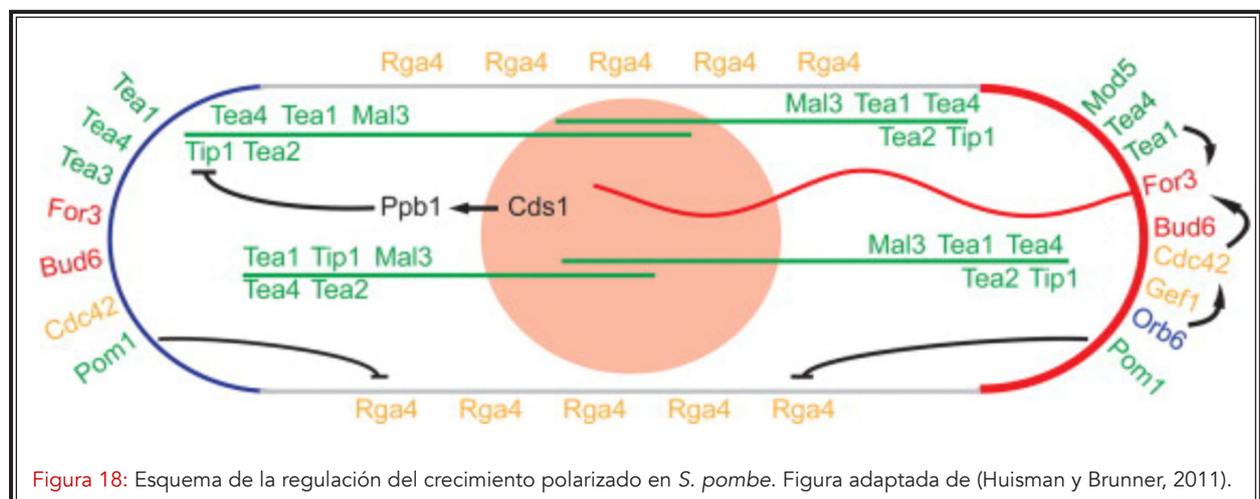
Mod5 es una proteína anclada a la membrana mediante prenilación y es necesaria para el anclaje de Tea1 en ambos polos, mientras que Tea3 es una proteína similar a Tea1 que secuestra a Tea1 en el polo nuevo antes de NETO. Además, Tea4 también juega un papel en el anclaje del complejo Tea1-Tea4 en el polo de crecimiento (Martin *et al.*, 2005; Tatebe *et al.*, 2005). De esta manera, Tea3 y Tea4 promueven el anclaje de Tea1 cada una en un polo específico.

En el polo de crecimiento, Tea4 se une directamente a For3, lo que promueve la nucleación de los cables de actina en ese polo (Martin *et al.*, 2005). Al complejo formado por Tea1-Tea4-For3 se unen los activadores de la formina: la GTPasa

de la familia Rho Cdc42, Bud6 (que se une a actina y a For3) y Pob1 (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009). Se ha propuesto que Cdc42 activa libera a For3 de su autoinhibición disparando la polimerización de los cables de actina a través de los cuales las miosinas de tipo V transportan las vesículas de secreción necesarias para el crecimiento (Martin *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que la regulación de Cdc42 es crítica en este punto. La inhibición de la localización en los polos de Rga4 -inhibidor de la actividad de Cdc42- por la quinasa Pom1, y la acumulación de Gef1 -activador de Cdc42- regulada por la quinasa Orb6, podrían proporcionar el umbral de actividad de la GTPasa necesario para que se desencadene el ensamblaje de la actina en este polo (figura 18) (Das *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2007; Kokkoris *et al.*, 2014; Tatebe *et al.*, 2008).

También se ha propuesto que la quinasa Pom1 podría actuar por debajo de Tea1 conectando la señalización de microtúbulos y actina para asegurar la posición del crecimiento. Pom1 se localiza en los polos de forma dependiente de Tea4, y en menor medida de Tea1. Pom1 se une directamente a fosfolípidos de la membrana plasmática cargados negativamente a través de



un motivo con carga positiva. La autofosforilación de Pom1 en este dominio inhibe su localización en la membrana. La fosfatasa Dis2, que se localiza en los polos mediante su interacción con Tea4 (Alvarez-Tabarés *et al.*, 2007) desfosforila a Pom1 favoreciendo su asociación con la membrana plasmática. Cuando Pom1 difunde lateralmente por la membrana plasmática, Dis2 no puede desfosforilarla, disociándose gradualmente de la membrana y creándose un gradiente de Pom1 desde los polos de la célula. Este gradiente le permite a la célula integrar información espacial relativa al tamaño y la geometría celular de una manera que depende indirectamente de los microtúbulos (Martin y Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009).

4. GTPasas DE LA FAMILIA RHO

Las GTPasas de la familia Rho (*Ras homology*) controlan funciones biológicas tan importantes como la morfogénesis y la progresión del ciclo celular en todos los organismos estudiados (Hall, 2012; Militello y Colombo, 2013). En levaduras, regulan la integridad celular coordinando la síntesis de la pared celular, esencial para la supervivencia de las células fúngicas, con la regulación del citoesqueleto de actina y de microtúbulos y con la secreción (Park y Bi, 2007; Perez y Rincón, 2010).

Las GTPasas de la familia Rho forman parte de la superfamilia de pequeñas GTPasas relacionadas con Ras y se encuentran en todas las células eucariotas (Hall, 2012; Militello y Colombo, 2013). Estas proteínas comparten con los demás miembros de la superfamilia Ras un diseño estructural y un mecanismo molecular mediante el cual, actúan como interruptores moleculares alternando entre un estado activo cuando están unidas a GTP e inactivo cuando están unidas a GDP. En su estado activo, estas GTPasas se unen a una gran

cantidad de moléculas efectoras, activando así las cascadas de señalización que a su vez promueven respuestas celulares generales, como cambios del citoesqueleto de actina, dinámica de microtúbulos, tráfico de vesículas, polaridad celular y progresión del ciclo celular (Bourne *et al.*, 1991; Bustelo *et al.*, 2007; Hall, 2012).

La plasticidad de las proteínas Rho en términos de localización subcelular, regulación, unión a sus efectores y relación con proteínas de otras rutas de señalización, sitúan a estas GTPasas en un punto central de la regulación de una gran cantidad de procesos celulares (Hall, 2012; Militello y Colombo, 2013).

4.1 Regulación de las GTPasas de la familia Rho

4.1.1 Regulación por cambio de nucleótido

La activación de las GTPasas se produce por la unión de GTP mediada por las proteínas GEF (*Guanine Exchange Factor*). Estas proteínas se unen a la GTPasa en su estado inactivo (unida a GDP) y producen un cambio en su conformación que promueve la salida del GDP y su intercambio por GTP. La transición desde el estado activo a un estado inactivo depende de la hidrólisis de GTP por parte de la GTPasa. Éste es un proceso muy lento que se ve acelerado por la unión de las proteínas GAP (*GTPase Activating Protein*) (figura 19) (Bos *et al.*, 2007; Cherfils, 2013).

La simplicidad de este modelo contrasta con la complejidad de las rutas reguladas por estas proteínas. De hecho, el estudio de las proteínas que controlan el intercambio de nucleótido de las GTPasas ha sido crucial para entender esta paradoja. Tanto GEFs como GAPs son proteínas mayores y más complejas que las GTPasas en sí

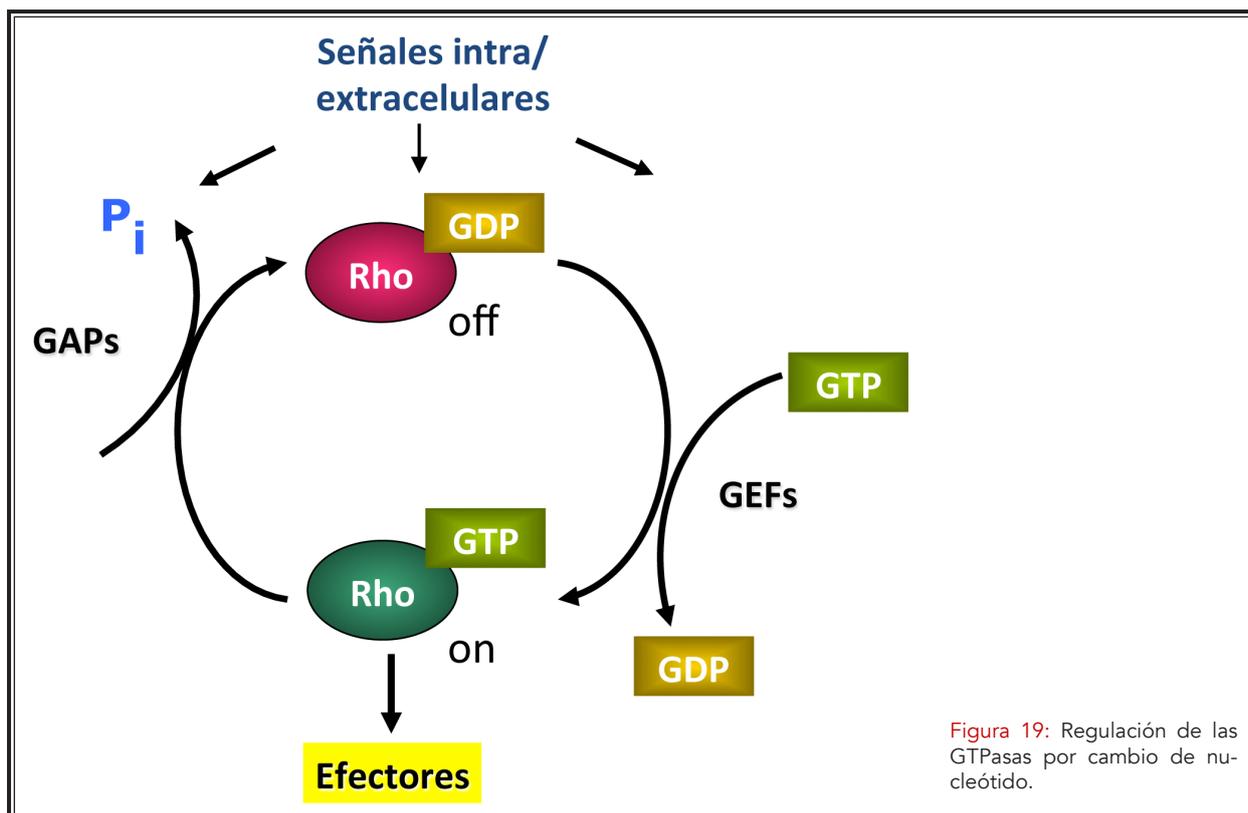


Figura 19: Regulación de las GTPasas por cambio de nucleótido.

mismas y contienen múltiples dominios capaces de interactuar con otras proteínas y con lípidos, indicando que pueden actuar como señales de localización o como adaptadores en complejos multiproteicos (Bos *et al.*, 2007; García *et al.*, 2006b; Perez y Rincón, 2010).

4.1.2 Regulación por cambio de localización subcelular

La localización subcelular de las GTPasas Rho es uno de los mecanismos más importantes en la regulación de estas proteínas. Por ejemplo, muchas GTPasas de la familia Rho ciclan entre el citosol y la membrana plasmática, guiadas por la incorporación de un grupo de naturaleza isoprenoide en una cisteína conservada en el motivo C-terminal "CAAX", lo que les permite anclarse a la membrana (Bustelo *et al.*, 2007; Wennerberg *et al.*, 2005).

También existe la regulación en sentido contrario y ésta es llevada a cabo por las proteínas GDI

(*GDP Dissociation Inhibitors*). Los GDIs se unen a las Rho-GTPasas unidas a GTP extrayéndolas de las membranas y secuestrándolas en el citosol en su conformación inactiva. La función de los GDIs es importante para la liberación de estas proteínas de la membrana cuando termina el proceso de señalización. La disociación de los GDIs y las GTPasas, es un requisito esencial para que se produzca la activación de éstas por parte de los GEFs y su subsiguiente asociación con las membranas (Cherfils, 2013; DerMardirossian y Bokoch, 2005).

4.1.3 Regulación por mecanismos no convencionales

A los mecanismos convencionales de regulación por GEFs, GAPs y GDIs, se han sumado recientemente otros mecanismos "no convencionales": 1) regulación por microRNA (miRNA) del procesamiento postranscripcional de los RNA mensajeros que codifican Rho-GTPasas; 2) palmitoilación y localización en el núcleo que afectan a la distribución intracelular de las GTPasas; 3) mo-

dificaciones postraduccionales como fosforilación, transglutaminación y AMPilación que afectan a la señalización, y 5) ubiquitinación que controla la estabilidad y reciclaje de las proteínas Rho (Liu et al., 2012)

4.2 La GTPasa Rho1 de *S. pombe*

La familia Rho en *S. pombe* está compuesta por seis miembros: Cdc42, Rho1, Rho2, Rho3, Rho4 y Rho5. De los cuales sólo dos, Cdc42 y Rho1, son esenciales para la supervivencia de las células (Arellano et al., 1999a; García et al., 2006b; Perez y Rincón, 2010).

El crecimiento polarizado en *S. pombe* está necesariamente relacionado con la síntesis de pared celular y con la regulación del citoesqueleto de actina y la GTPasa Rho1 participa en ambos procesos. Cuando se elimina la expresión de *rho1*⁺ durante el crecimiento vegetativo en *S. pombe*, las células pierden la integridad y se lisan, la mayoría como parejas, en el momento de la separación. Además, la actividad β -glucán sintasa (β -GS) también disminuye drásticamente (Arellano et al., 1999a; Arellano et al., 1996). De acuerdo con esto, los efectores de Rho1 mejor conocidos son enzimas relacionadas con la síntesis de la pared celular: la β -(1,3)-GS y las proteínas quinasas C, Pck1 y Pck2 (figura 20) (Arellano et al., 1996; Arellano et al., 1999b; Sayers et al., 2000).

Rho1 también tiene un papel como activador de la cascada de MAPK de Pmk1, conocida como ruta de integridad celular (García et al., 2009a). Recientemente se ha visto que Rho1 activa esta ruta tanto a través de Pck1 como de Pck2 (Sanchez-Mir et al., 2014). El estudio de una cepa termosensible que lleva un alelo mutante de *rho1*⁺, *rho1-596*, ha demostrado, además de la relación de Rho1 con la

ruta de integridad, una relación funcional de Rho1 con la calcineurina (Viana et al., 2013).

Rho1 se localiza en los lugares de crecimiento celular, polos y septo. La disminución progresiva de Rho1 en las células produce la desaparición de la actina polimerizada, mientras que un incremento de su expresión da lugar a puntos de actina mayores y distribuidos aleatoriamente por toda la célula (Arellano et al., 1997). Parece ser que un equilibrio adecuado en la cantidad de Rho1 es importante para la regulación del citoesqueleto de actina, sin embargo aún no se ha descrito ninguna proteína que medie en este proceso (figura 20).

4.2.1 Regulación de la GTPasa Rho1 de *S. pombe*

Se han identificado tres GEFs de Rho1, denominados Rgf1, Rgf2 y Rgf3. Rgf1 activa a Rho1 durante el crecimiento polarizado y participa en la reorganización de la actina necesaria para la transición del crecimiento monopolar a crecimiento bipolar conocido como NETO (García et al., 2006a). Rgf1 es el objeto de estudio en este trabajo y de él hablaremos en el apartado 5.4. Rgf2 activa a Rho1 durante el proceso de esporulación y además, actúa de forma redundante con Rgf1 durante el crecimiento vegetativo ya que los genes *rgf1*⁺ y *rgf2*⁺ son sintéticos letales (García et al., 2009b). Por último, Rgf3 activa a Rho1 durante la citocinesis, siendo esencial para la integridad celular, y regula específicamente la síntesis del β -(1,3)-glucano del septo de división (figura 20) (Morrell-Falvey et al., 2005; Tajadura et al., 2004).

Recientemente se ha demostrado que la proteína Rho-GEF Gef2, que coordina junto a la quinasa Plo1 la elección del sitio de división y la contracción del anillo de actomiosina (Guzman-Vendrell et al., 2013; Ye et al., 2012), interacciona con Rho1, Rho4 y Rho5 (Zhu et al., 2013).

Hasta el momento se han identificado tres GAPs de Rho1, Rga1, Rga5 y Rga8 y una proteína GDI, Rdi1, el único GDI descrito en *S. pombe*, que también se une a Rho4 y Cdc42, aunque se desconoce el proceso celular en el participa (Nakano et al., 2003). Rga1 es el principal regulador negativo de Rho1 y tiene un papel importante en el crecimiento celular y la morfogénesis (Nakano et al., 2001). Rga5 regula negativamente la actividad β -(1,3)-glucán sintasa y el mutante presenta defectos en citocinesis (Calonge et al., 2003). Por último, se ha descrito que la proteína Rga8 tiene actividad GAP in vivo para Rho1 en *S. pombe*, pero su función es desconocida (figura 20) (Yang et al., 2003).

Además de la regulación por cambio de nucleótido mediante proteínas GEF y GAP, se han descrito otras proteínas que regulan la actividad de Rho1 como es el caso de la proteína homóloga a la paxilina de células de mamíferos, Pxl1, que tiene un papel en la formación y contracción del anillo de actomiosina y que regula negativamente a Rho1 (Pinar et al., 2008).

Recientemente también se ha descrito que Edt1, una proteína clave en la ruta SIN (Daga et al., 2005), se une directamente a Rho1 actuando como un activador (Alcaide-Gavilan et al., 2014). Ya que Edt1 no muestra actividad GEF *in vitro* (García-Cortes y McCollum, 2009), se ha propuesto que podría activar a Rho1 compitiendo con sus GAPs o reguladores negativos (Alcaide-Gavilan et al., 2014). Además, los mismos autores han descrito que Rho1 activa la ruta SIN, situándola en el centro de un mecanismo de retroalimentación positiva que conecta la ruta SIN con la citocinesis (Alcaide-Gavilan et al., 2014).

Por último, se ha descrito que la subunidad reguladora B de la fosfatasa PP2A, Pab1, actúa también como un regulador negativo de Rho1 (Alcaide-Gavilan et al., 2014).

Los mecanismos de señalización desde la superficie celular a las GTPasas Rho son poco conocidos en *S. pombe*. Recientemente se ha descrito que las proteínas transmembrana Wsc1 y Mtl2, homólogas a los sensores de la ruta de integridad

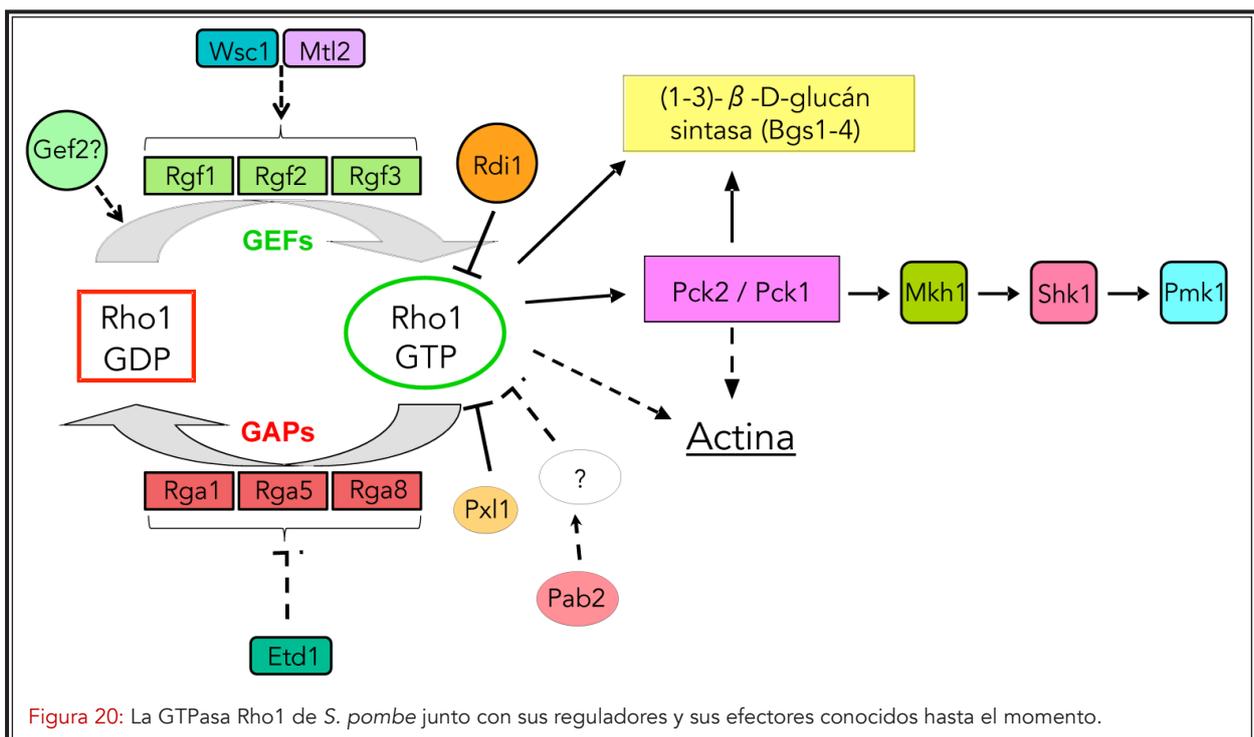


Figura 20: La GTPasa Rho1 de *S. pombe* junto con sus reguladores y sus efectores conocidos hasta el momento.

Wsc1 y Mid2 de *S. cerevisiae*, actúan a través de Rho1 y son necesarias para el mantenimiento de los niveles activos de Rho1 en condiciones de estrés crónico en la pared celular. Sin embargo, ni Wsc1 ni Mtl2 parecen tener un papel importante en la activación de Pmk1 en estas condiciones (Cruz et al., 2013).

4.3 GEFs de las GTPasas de la familia Rho

Las proteínas Rho ciclan entre una forma inactiva (unida a GDP) y una forma activa (unida a GTP). Las células regulan estas GTPasas modulando la interconversión y la accesibilidad de estas dos isoformas. Los GEFs se unen a la GTPasa unida a GDP y desestabilizan este complejo, mientras que estabilizan el intermediario de reacción libre de nucleótido. Gracias a la mayor concentración de GTP en la célula, el GDP es reemplazado por GTP, dando lugar a la activación de la GTPasa, que es así capaz de reconocer sus dianas moleculares o efectores (Bos et al., 2007; Cherfils, 2013).

El número de reguladores GEF supera al de GTPasas en todos los organismos estudiados (Hall, 2012). Se ha propuesto que los Rho-GEFs podrían actuar regulando la especificidad de activación de unos efectores u otros, debido a su capacidad de unión a diferentes proteínas y al reclutamiento o activación de las GTPasas en diferentes lugares de la célula. De esta forma los GEFs se comportarían como integradores de señales para la activación de respuestas celulares concretas (García et al., 2006b; Papadaki et al., 2002; Perez y Rincón, 2010).

4.3.1 Características estructurales de las proteínas Rho-GEF

Los factores GEF se caracterizan por la presencia de un dominio DH (*Dbl homology*) en su secuencia proteica. *Dbl* (*Diffuse B-cell lymphoma*),

fue la primera proteína Rho-GEF descrita en células de mamífero y fue aislada como un oncogén capaz de inducir la transformación de la línea celular NIH3T3 (Eva et al., 1988).

Los dominios DH de distintos GEFs presentan muy poca identidad a nivel de secuencia, sin embargo, su estructura tridimensional está muy conservada (Liu et al., 1998; Soisson et al., 1998; Worthylake et al., 2000). Esta estructura consta de tres regiones denominadas CR1, CR2 y CR3. De ellas, CR1 y CR3 están expuestas hacia la superficie y forman el núcleo en el que se une la GTPasa (figura 21). Mutaciones en esta zona afectan a la actividad catalítica de las proteínas GEF (García et al., 2006a; Liu et al., 1998; Soisson et al., 1998; Tajadura et al., 2004).

Además del dominio DH o Rho-GEF, casi todas las proteínas GEF presentan un dominio PH (*Plekstrin homology*) adyacente al dominio DH. El

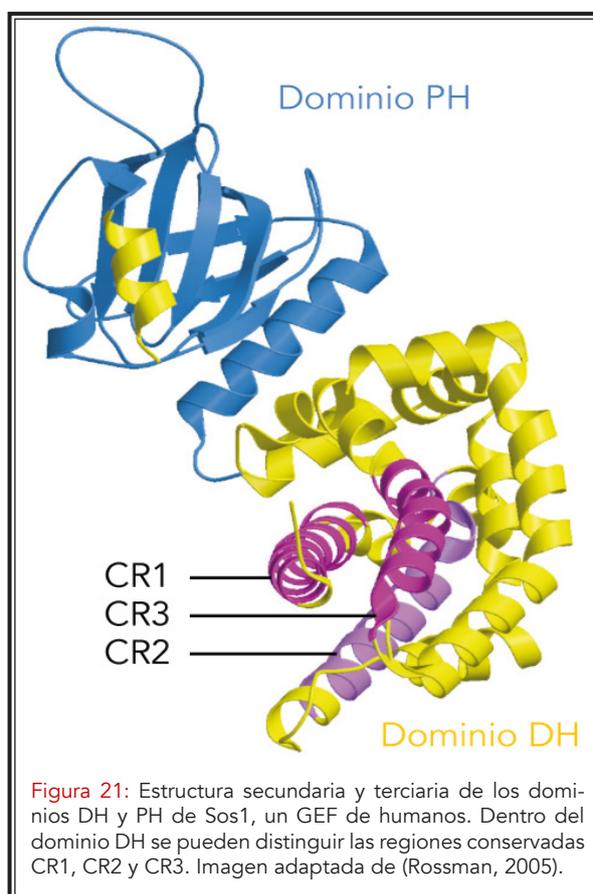


Figura 21: Estructura secundaria y terciaria de los dominios DH y PH de Sos1, un GEF de humanos. Dentro del dominio DH se pueden distinguir las regiones conservadas CR1, CR2 y CR3. Imagen adaptada de (Rossman, 2005).

dominio PH es un dominio de unión a fosfolípidos de membrana como los fosfoinosítidos y también se une a otras proteínas, regulando de esta manera la localización de los Rho-GEFs, la actividad catalítica del dominio DH y la unión de la GTPasa (figura 21) (Viaud et al., 2012).

La mayoría de los GEFs poseen otros dominios como SH2, SH3, Ser/Thr o Tyr quinasa, Ras-GEF, Rho-GAP, Ran-GEF, BRCT, PDZ o dominios PH adicionales, implicados interacciones con otras proteínas de cascadas de señalización, proteína quinasa, receptores o complejos enzimáticos (Bos et al., 2007; Buchsbaum, 2007; Rossman et al., 2005; Schmidt y Hall, 2002a). Estas interacciones y modificaciones podrían inducir cambios en la localización y/o topología de los GEFs importantes para su función en la célula.

4.3.2 Regulación de los factores Rho-GEF

Las proteínas GEF por sí mismas también son reguladas de manera muy precisa y cada miembro de esta familia parece poseer un mecanismo de activación y desactivación único. Sin embargo, se han descrito algunos patrones generales que se detallan a continuación (figura 22):

1) *Inhibición intramolecular*: Algunos GEFs poseen un dominio regulador que bloquea la actividad de la proteína mediante una interacción intramolecular, de forma que se bloquea el sitio activo en el dominio DH. La liberación de la autoinhibición se puede producir mediante la unión a otras proteínas, por fosforilación o por otros mecanismos (Cherfils, 2013).

2) *Interacción proteína-proteína*: Muchos GEFs son estimulados por la interacción con otras proteínas o por fosforilación, sin necesidad de eliminar ningún mecanismo autoinhibitorio. Otra variación es la oligomerización mediada por el dominio DH, en la que es necesaria la secuencia

conservada CR2 (Schmidt y Hall, 2002a).

3) *Regulación por localización*: La localización subcelular de los GEFs es un aspecto importante para su función ya que muchas de las funciones asociadas a las GTPasas dependen del control espacial de su activación. Existen Rho-GEFs que ante determinados estímulos se mueven desde el núcleo, el citosol o el citoesqueleto, a las membranas para activar a las GTPasas (Rossman et al., 2005; Schmidt y Hall, 2002a)

4) *Desactivación de los factores GEFs*: Se pueden revertir los mecanismos de activación, a través de la eliminación de la fosforilación o de la unión a la proteína activadora. Se ha propuesto también que su unión a determinados reguladores podría favorecer su poliubiquitinación y degradación (Schmidt y Hall, 2002a).

4.4 Rgf1, el principal GEF de la GTPasa Rho1 en *S. pombe*

4.4.1 Identificación de *rgf1*⁺

Con el objetivo de identificar nuevos genes que participasen en la biosíntesis y regulación del β -glucano, en nuestro laboratorio se obtuvieron una serie de mutantes hipersensibles a calcoflúor y equinocandina (Carnero et al., 2000). Ambos compuestos actúan sobre los polímeros de la pared de la levadura. Las equinocandinas son antibióticos lipopeptídicos de origen natural que inhiben específicamente la síntesis de $\beta(1,3)$ -glucano (Abruzzo et al., 2000; Douglas et al., 1994), mientras que el calcoflúor afecta a la pared celular de manera más general, interacciona con polímeros lineales de $\beta(1,3)$ y $\beta(1,4)$ -glucano y los desorganiza (Nicholas et al., 1994).

En el proceso de identificación del gen afectado en uno de estos mutantes, *ehs2-1* (*equinocandina hipersensible*), se encontraron dos ORFs

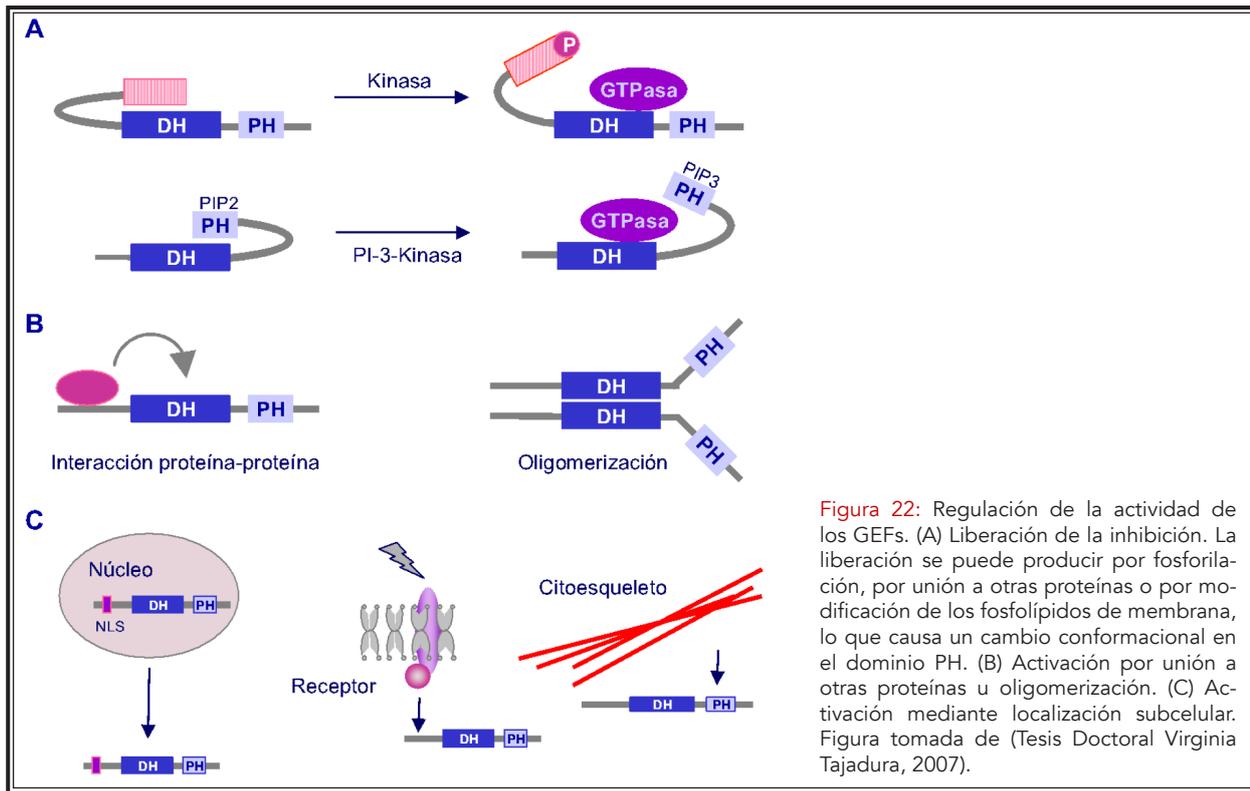


Figura 22: Regulación de la actividad de los GEFs. (A) Liberación de la inhibición. La liberación se puede producir por fosforilación, por unión a otras proteínas o por modificación de los fosfolípidos de membrana, lo que causa un cambio conformacional en el dominio PH. (B) Activación por unión a otras proteínas u oligomerización. (C) Activación mediante localización subcelular. Figura tomada de (Tesis Doctoral Virginia Tajadura, 2007).

consecutivas y divergentes: *rgf1⁺* y *rgf3⁺*. Ambos genes codifican proteínas con un dominio DH. Mediante mapeo genético y análisis de complementación se descubrió que *rgf3⁺* era el gen estructural afectado en el mutante *ehs2-1*, mientras que *rgf1⁺* suprime parcialmente el defecto en el crecimiento en presencia de calcoflúor y equinocandina, pero no la lisis a 37°C (Tajadura *et al.*, 2004).

rgf1⁺ codifica una proteína de 1.334 aminoácidos. El análisis detallado de su secuencia proteica revela además del módulo DH-PH presente en la mayoría de las proteínas Rho-GEF, la presencia de dos dominios conservados, un dominio DEP (*Dishevelled*, *Egl-10* y *Pleckstrin*, aa 424-497) y un dominio CNH (*Citron kinase homology*, aa 935-1239) (Figura 24).

4.4.2 Las células del mutante *rgf1Δ* muestran defectos en el mantenimiento de la integridad celular y en el crecimiento bipolar

El estudio de la función del gen *rgf1⁺* comenzó con la eliminación del gen y la caracteriza-

ción del mutante *rgf1Δ*. En un cultivo líquido en fase logarítmica, aproximadamente el 15-30% de las células se encuentran lisadas (figura 23). Este fenotipo de lisis es similar al observado en un mutante condicional de *rho1⁺* (Arellano *et al.*, 1997), y es suprimido en presencia de un estabilizador osmótico en el medio. Esto sugeriría que este mutante podría estar afectado en la organización de la pared celular, por lo que se analizó su crecimiento en presencia de caspofungina (CANCIDAS™) (Balkovec *et al.*, 2014). *rgf1Δ* resultó ser extremadamente sensible a este compuesto (García *et al.*, 2006a).

La activación de las GTPasas de la familia Rho es necesaria para la organización del citoesqueleto de actina en muchos organismos (Jaffe y Hall, 2005). Para determinar si Rgf1 participaba en este proceso, se analizó el patrón de crecimiento y la organización del citoesqueleto de actina en el mutante *rgf1Δ*. En un cultivo asincrónico, el 80% de las células *rgf1Δ* muestran un crecimiento monopolar, comparado con el 20% que presenta la cepa silvestre (figura 23). Además, esto se corre-

laciona con un defecto en la organización de los parches de actina en el polo que no está creciendo (García *et al.*, 2006a).

4.4.3 Rgf1 actúa como regulador positivo de Rho1

Al mismo tiempo que se caracterizaba el fenotipo del mutante *rgf1Δ* se realizaron estudios para saber a cuál de las GTPasas de la familia Rho podría activar Rgf1.

1) Entre todas las GTPasas de la familia Rho, sólo la sobreexpresión de Rho1 es capaz de suprimir la hipersensibilidad a Csp de la cepa *rgf1Δ* (García *et al.*, 2006a).

2) La ausencia de *rgf1⁺* suprime parcialmente el defecto de crecimiento del mutante nulo del GAP de Rho1 *rga1Δ* (García *et al.*, 2006a; Nakano *et al.*, 2001), indicando que Rgf1 y Rga1 realizan funciones opuestas, actuando ambas sobre Rho1.

3) En un ensayo de precipitación con rotequina en el que se analizó la cantidad de Rho1 unido a GTP en presencia de diferentes niveles de Rgf1, se observó que la cantidad de Rho1 activo es proporcional a la cantidad de Rgf1, es decir, aumenta mucho tras la sobreexpresión de *rgf1⁺* y apenas se detecta en el mutante *rgf1Δ* (García *et al.*, 2006a).

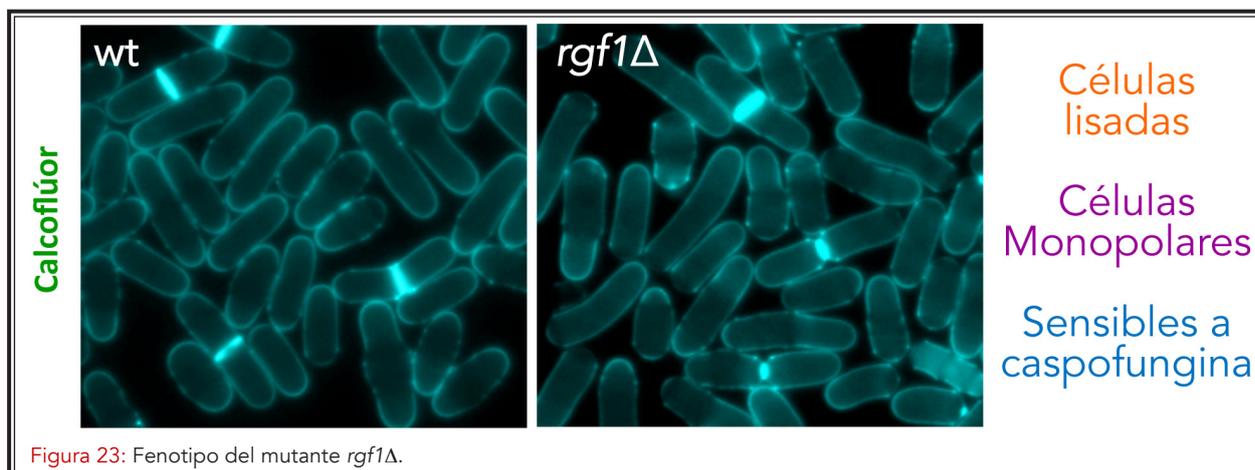
4) Por otro lado, Rgf1 interacciona físicamente con Rho1 en ensayos de coprecipitación.

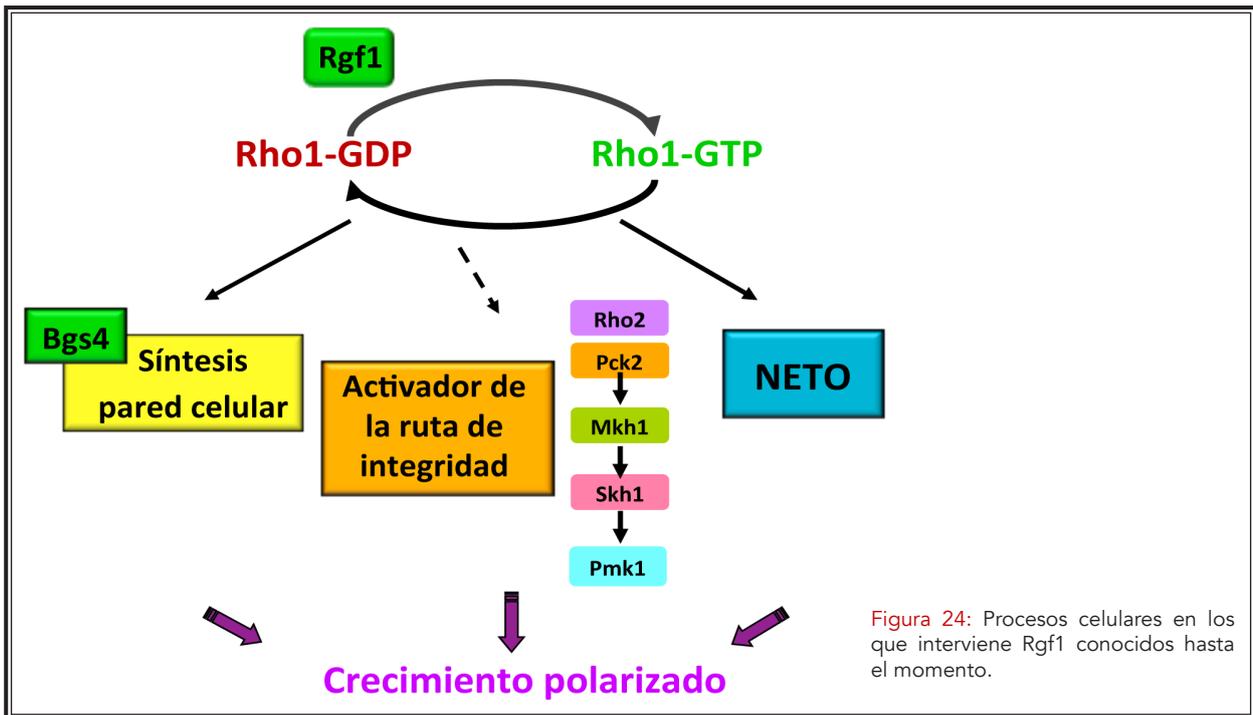
Además, ambas proteínas presentan el mismo patrón de localización, en los polos de crecimiento activo y en el septo (Arellano *et al.*, 1997; García *et al.*, 2006a) (figura 24). Todos estos resultados demuestran que Rgf1 funciona como un GEF de Rho1 en *S. pombe*.

4.4.4 Rgf1 es un activador de la cascada de MAPK de Pmk1

Para determinar la relación de Rgf1 con alguno de los efectores conocidos de Rho1, se analizó si la sobreexpresión moderada de alguno de ellos suprimía el fenotipo de hipersensibilidad a antifúngicos en el mutante *rgf1Δ*. De las cuatro subunidades catalíticas de la β -GS (Bgs1-4) sólo la expresión de *bgs4⁺* en un plásmido multicopia con su propio promotor restableció el crecimiento del mutante en presencia de Csp (García *et al.*, 2006a). Además, la sobreexpresión de *pck1⁺* y de *pck2⁺* también suprimen este defecto (García *et al.*, 2006a).

Pck2 es un activador de ruta de integridad (Barba *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2006), una ruta compuesta por una MAPKKK denominada Mkh1, una MAPKK, Pek1/Shk1, y una MAPK, Pmk1/Spm1 (Loewith *et al.*, 2000; Sengar *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996b; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997), que está relacionada con los pro-





cesos de construcción de la pared celular, citocinesis y homeostasis iónica en *S. pombe* y participa en la respuesta a una gran variedad de estreses, incluyendo estrés hiper e hipotónico, ausencia de glucosa, presencia de compuestos que dañan la pared celular, altas temperaturas y estrés oxidativo, entre otros (Pérez y Cansado, 2010).

Al investigar la relación de Rgf1 con esta ruta, se vio que la cepa *rgf1Δ* muestra el fenotipo *vic* (*viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion*), que es característico de los mutantes nulos de los genes implicados en la ruta de integridad. En *S. pombe* se sabe que la eliminación del gen de la calcineurina, *ppb1⁺*, o la inhibición de su actividad mediante inmunosupresores (como FK506), produce hipersensibilidad al Cl⁻, mientras que una mutación adicional en los miembros de la ruta de MAPKs suprime este fenotipo (Sugiura *et al.*, 1999).

Además, tanto el mutante *rgf1Δ* como los mutantes de la ruta son sensibles a estrés osmótico y muestran un retraso en la re-entrada al ciclo celular desde fase estacionaria (García *et al.*, 2009a)

Rgf1 también es necesario para la activación de Pmk1 en respuesta a estrés osmótico y a estrés de la pared celular (García *et al.*, 2009a). Además, tanto la sobreexpresión de *rho1⁺* como la de un alelo constitutivamente activo de *rho1⁺*, *rho1G15V*, aumentan los niveles de Pmk1 fosforilado y lo hacen de forma dependiente de Pck2 y de Mkh1 (García *et al.*, 2009a). Todos estos datos sitúan a Rgf1 como un activador de la ruta de MAPKs que podría actuar a través de Rho1 y/o de Pck2 (figura 24) (García *et al.*, 2009a).



OBJETIVOS

2

El objetivo principal de este trabajo es estudiar la función de la proteína Rgf1 y su participación en el crecimiento polarizado y morfogénesis. Para ello nos planteamos los objetivos siguientes:

- 1) Discernir qué dominios de Rgf1 son importantes para la función y/o regulación de la proteína.
- 2) Estudiar la localización de la proteína Rgf1-GFP en diferentes fases del ciclo celular y condiciones de estrés.
- 3) Determinar su relación con otros componentes de la maquinaria de polaridad y del ciclo celular.



RESULTADOS

3

CAPÍTULO 1.

Caracterización del papel de los dominios de la proteína Rho-GEF Rgf1 en la activación del crecimiento bipolar y en el mantenimiento de la integridad celular

Al iniciar este trabajo, uno de nuestros objetivos fue estudiar el mecanismo por el cual las células de *S. pombe* activan el crecimiento por el polo nuevo. Para ello decidimos analizar las causas que determinan el crecimiento monopolar en el mutante que carece de Rgf1. En este capítulo intentaremos definir los dominios, motivos y modificaciones postraduccionales de Rgf1 que sean importantes para su localización en los polos y por consiguiente para su función en la activación del crecimiento bipolar.

También intentaremos determinar que partes de Rgf1 contribuyen en mayor medida a su papel en el mantenimiento de la integridad celular. Estas dos funciones podrían estar relacionadas. Sin embargo, hasta ahora los mutantes clásicos que presentan defectos en la activación del polo nuevo como *tea1Δ*, *tea4Δ* o *for3Δ* no tienen defectos en la integridad celular, por lo que nos parece interesante demostrar si en el caso de Rgf1 ambos defectos están relacionados o tienen causas independientes.

1.1 CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES DE Rgf1

Rgf1 es una proteína de 1.334 aa y 150,11 kDa. Para estudiar las señales que regulan la localización y la actividad de Rgf1, decidimos construir mutantes en los distintos dominios de la proteína: N'-terminal, DEP (aa 428-503), DH (aa 604-825), PH (aa 834-980) y CNH (aa 1001-1290) (<http://www.pombase.org/spombe/result/SPCC645.07>).

Como punto de partida disponíamos en el laboratorio de un vector multicopia pAL en el que se había clonado la ORF del gen *rgf1+* de 4,26 kb junto con sus regiones promotora y terminadora; además de otro plásmido pAL similar al anterior pero en el que al extremo C'-terminal de la ORF

del gen *rgf1+* se había fusionado, en fase, la secuencia de la proteína verde fluorescente GFP.

Mediante técnicas de biología molecular que se describen detalladamente en la sección de materiales y métodos de esta memoria, se construyeron, en plásmido multicopia, las siguientes versiones mutadas del gen *rgf1+*:

1) pAL-*rgf1-N1Δ*: se eliminaron 200 pb del extremo N'-terminal de gen *rgf1+*.

2) pAL-*rgf1-N2Δ*: se delecionaron 900 pb del extremo N'-terminal de gen *rgf1+*.

3) pAL-*rgf1-DEPΔ*: se realizó una delección de 80 pb, eliminando la mayor parte del dominio DEP de la proteína Rgf1.

4) pAL-*rgf1-FPTP*: por mutagénesis dirigida se cambió la secuencia que codifica una fenilalanina y una tirosina muy conservadas dentro del dominio DEP, por una secuencia que codifica dos prolinas.

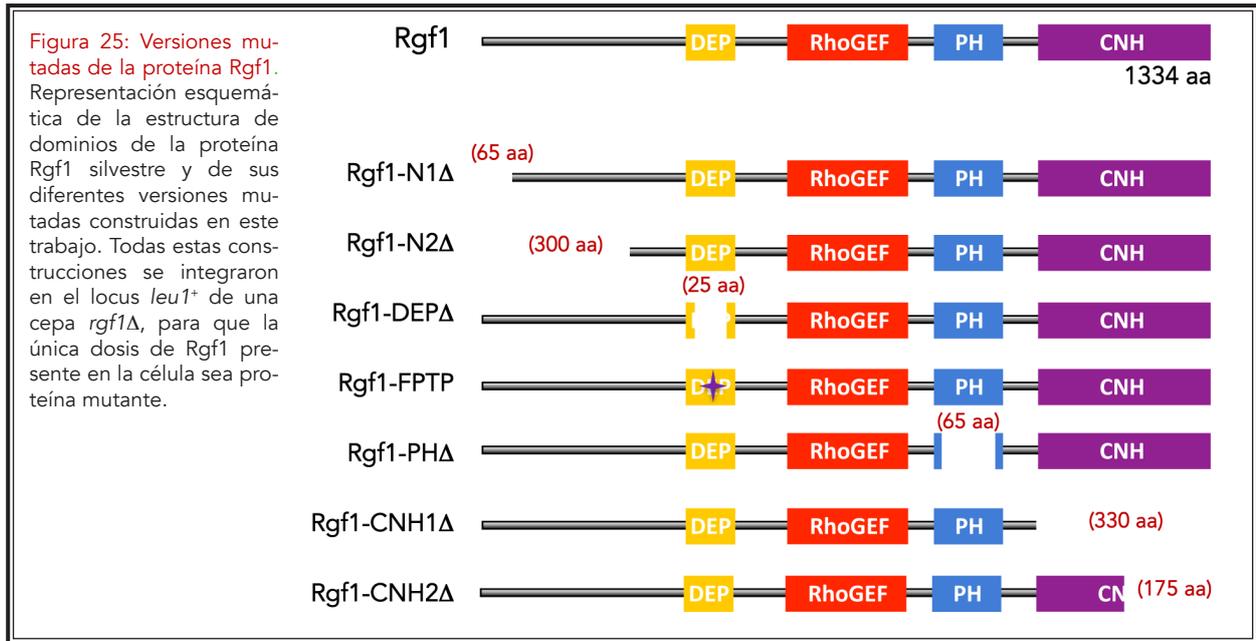
5) pAL-*rgf1-PHΔ*: se eliminaron 200 pb en la región que codifica el dominio PH.

6) pAL-*rgf1-CNH1Δ*: se eliminó un fragmento de 1000 pb en el extremo C'-terminal de gen *rgf1+*, correspondiente al dominio CNH completo de la proteína Rgf1.

7) pAL-*rgf1-CNH2Δ*: se realizó una delección de 500 pb en el extremo C'-terminal de gen *rgf1+*, eliminando 165 amino ácidos del final del dominio CNH de la proteína Rgf1.

Todas estas construcciones, que se representan esquemáticamente en la **figura 25**, se realizaron tanto en el plásmido pAL-*rgf1+* como en el plásmido pAL-*rgf1-GFP*, obteniendo así las proteínas mutadas fusionadas a GFP.

Las diferentes versiones mutadas del gen *rgf1+* obtenidas en plásmido pAL (episomal, con

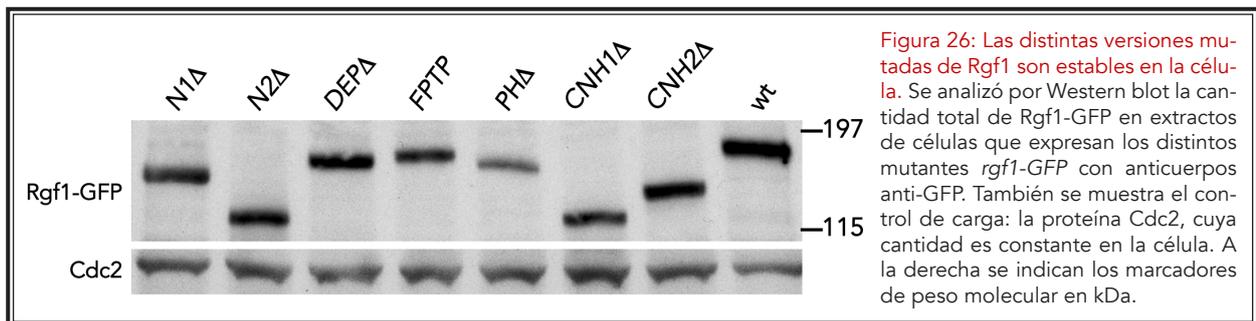


número de copias variable) fueron trasladadas a un plásmido integrativo pJK148 para poder ser expresadas de manera endógena con su propio promotor. Este vector lleva como marcador de selección el gen *leu1+* de *S. pombe*. Los diferentes plásmidos derivados de pJK148 fueron linearizados dentro del gen *leu1+* y con ellos se transformó la cepa VT14 que lleva el alelo *leu1-32* y carece del gen *rgf1+*. De esta manera solo aquellas células que hayan integrado la correspondiente versión mutada del gen *rgf1+* seguirán siendo protótrofas para leucina y además, ésta es la única copia del gen *rgf1+* presente en el genoma.

Para seleccionar los mutantes de *rgf1+* que se hayan integrado en el genoma de forma estable, de cada una de las construcciones se seleccionaron 20 transformantes en placas de medio mínimo (MM) sin leucina. Estas colonias se repli-

caron en medio rico cinco veces consecutivas para favorecer la pérdida de fragmentos integrados de forma no homóloga y posteriormente se seleccionaron los clones estables (los que seguían siendo protótrofos para leucina). Además, para comprobar si la integración se había realizado correctamente, de cada mutante se analizaron al menos 2 clones mediante reacciones de PCR con parejas de oligonucleótidos que flanquean la mutación o la deleción correspondiente. Todas las cepas portadoras de alguna mutación en *rgf1+* construidas en este trabajo han sido seleccionadas de esta manera.

Para comprobar si las distintas versiones mutadas de Rgf1 eran estables dentro de la célula y también para conocer de manera aproximada el tamaño de Rgf1 en las distintas construcciones, obtuvimos extractos proteicos, las proteínas fue-



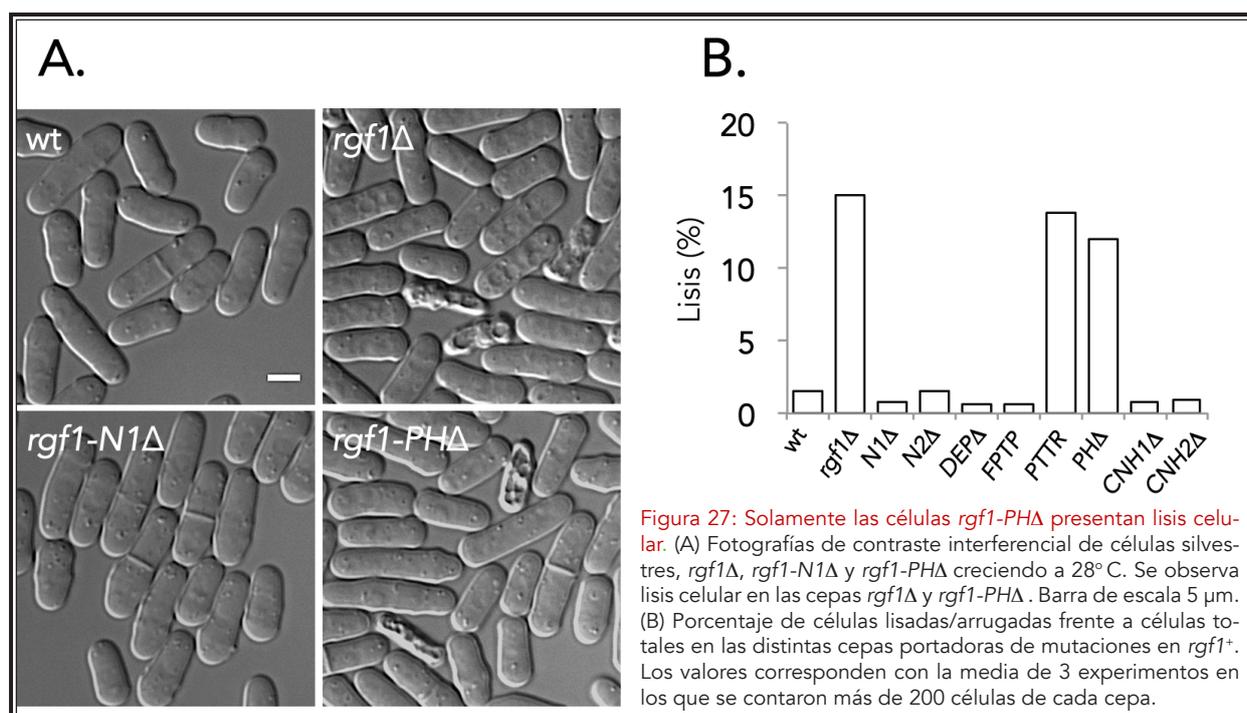


Figura 27: Solamente las células *rgf1-PHΔ* presentan lisis celular. (A) Fotografías de contraste interferencial de células silvestres, *rgf1Δ*, *rgf1-N1Δ* y *rgf1-PHΔ* creciendo a 28° C. Se observa lisis celular en las cepas *rgf1Δ* y *rgf1-PHΔ*. Barra de escala 5 μm. (B) Porcentaje de células lisadas/arrugadas frente a células totales en las distintas cepas portadoras de mutaciones en *rgf1*⁺. Los valores corresponden con la media de 3 experimentos en los que se contaron más de 200 células de cada cepa.

ron separadas en un gel de gradiente de poliacrilamida del 3 al 8% y posteriormente fueron detectadas por Western blot con anticuerpos anti-GFP.

Como se puede observar en la **figura 26**, todas las versiones mutadas del gen *rgf1*⁺ codifican proteínas estables y se expresan de forma similar a la proteína Rgf1 silvestre. La única excepción es la proteína que carece del dominio PH, Rgf1-PHΔ-GFP, cuya expresión es un poco menor que la de la proteína Rgf1 silvestre.

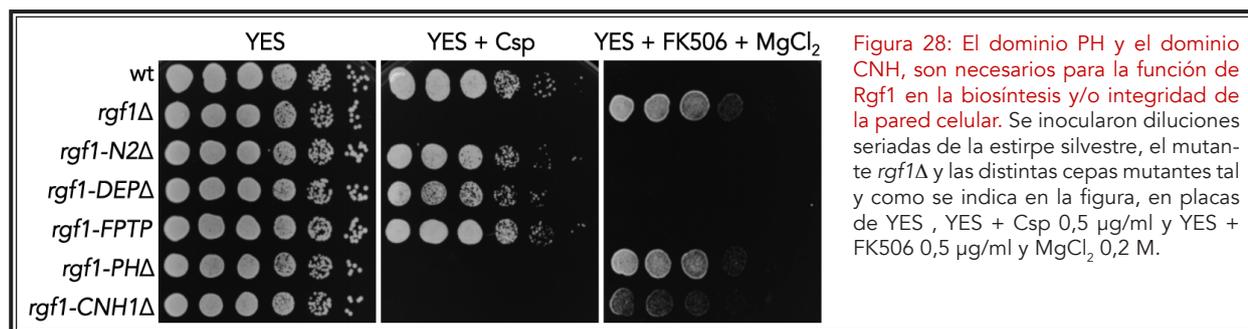
1.2 EL EXTREMO C'-TERMINAL DE Rgf1 ES ESENCIAL PARA SU FUNCIÓN EN EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD CELULAR

En este y en los siguientes apartados mostramos los resultados correspondientes al porcentaje de células lisadas, la sensibilidad a caspofungina, el porcentaje de células monopolares y la localización de las proteínas mutadas. En algunos de los análisis, además de la cepa silvestre, el mutante nulo *rgf1Δ* y las estirpes mutantes construidas, se incluye el mutante *rgf1-PTTRΔ*, un mutante en el

que se delecionaron 4 aminoácidos (prolina-treonina-treonina-arginina) de la región más conservada del dominio DH. Las células de este mutante presentan muy poca actividad intercambiadora de GDP/GTP hacia Rho1, se lisan como las del mutante nulo y no muestran fosforilación de Pmk1 en respuesta a estrés osmótico ni a caspofungina (García et al., 2006a; García et al., 2009a).

En primer lugar observamos la morfología de las células procedentes de cultivos líquidos en fase logarítmica de cada una de las cepas y analizamos el porcentaje de lisis en las mismas. En la **figura 27A** se muestran las fotos tomadas al microscopio de el mutante *rgf1Δ*, la cepa silvestre y dos de los mutantes, *rgf1-N1Δ* y *rgf1-PHΔ*, como ejemplo.

Los resultados que se muestran en la **figura 27B** son la media de 3 experimentos en los que se contaron más de 200 células de cada cepa. Únicamente la cepa que carece del dominio PH presenta un porcentaje de lisis (12%) similar al del mutante nulo *rgf1Δ* (15%) y al del mutante en el dominio



catalítico de la proteína Rgf1, *rgf1-PTTR*. El resto de los mutantes, *rgf1-N1Δ*, *rgf1-N2Δ*, *rgf1-DEPA*, *rgf1-FPTP* y los dos mutantes del dominio CNH, se comportan como la estirpe silvestre.

A continuación, y con el objetivo de buscar defectos en la integridad de la pared celular más sutiles que la lisis de las células, analizamos el crecimiento de los mutantes en presencia de caspofungina. Puesto que las células del mutante *rgf1Δ* no crecen en placas que contienen cantidades de Csp superiores a 0,1 μg/ml (García *et al.*, 2006a), analizamos el crecimiento de los mutantes en placas de medio rico (YES) suplementadas con distintas cantidades de la droga (0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 y 2,5 μg/ml).

En la **figura 28** se muestra el crecimiento en placas suplementadas con 0,5 μg/ml de caspofungina. En la figura no aparecen los mutantes *rgf1-N1Δ* y *rgf1-CNH2Δ*, pero hemos visto que se comportan de forma similar a los mutantes *rgf1-N2Δ* y *rgf1-CNH1Δ* respectivamente. El mutante nulo *rgf1Δ* y los mutantes en el dominio PH y CHN (*rgf1-PHA*, *rgf1-CNH1Δ* y *rgf1-CNH2Δ*) no crecen en presencia de la droga; sin embargo, los mutantes en el extremo N'-terminal (*rgf1-N1Δ* y *rgf1-N2Δ*) y en el dominio DEP (*rgf1-DEPA* y *rgf1-FPTP*) se comportan como la cepa silvestre y crecen perfectamente hasta en las últimas diluciones.

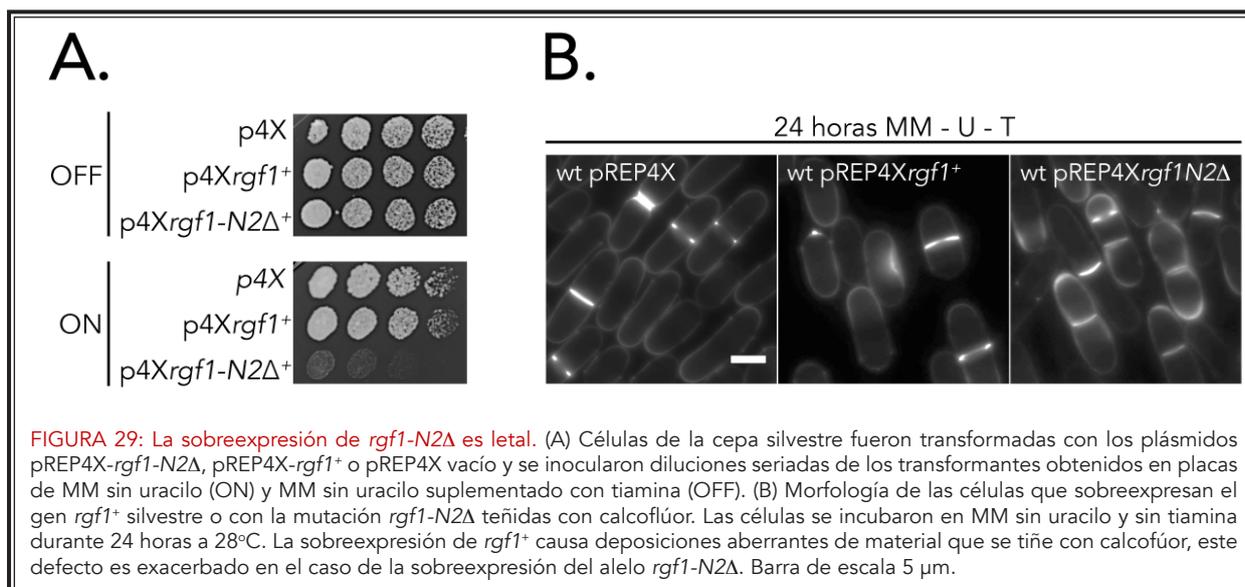
Por último, y para determinar que parte de

la proteína Rgf1 podría estar implicada en la activación de la ruta de MAPK de Pmk1, comprobamos si alguna de las cepas portadoras de los diferentes alelos de *rgf1+* presentan fenotipo *vic*. Para ello analizamos su crecimiento en placas de YES suplementadas con FK506 y MgCl₂.

Los datos obtenidos se muestran en la **figura 28**, y son muy parecidos a los datos de crecimiento en caspofungina. Los mutantes en el dominio PH y CHN muestran un fenotipo similar a *rgf1Δ*, ya que crecen en presencia de inmunosupresor e iones cloruro; sin embargo, los mutantes en el extremo amino terminal y en el dominio DEP son sensibles a esta combinación al igual que la cepa silvestre.

En resumen, nuestros resultados sugieren que ambos, el dominio PH y el dominio CNH, son necesarios para la función de Rgf1 en el mantenimiento de la integridad celular, mientras que el extremo N'-terminal no parece tener un papel importante en este aspecto.

En algunos GEFs el extremo N'-terminal ejerce un efecto regulador negativo sobre la proteína completa de manera que cuando se elimina, la proteína se activa llegando a ser oncogénica en algunos casos, como el de *Dbl*, *Vav* y *Tiam* (Schmidt y Hall, 2002a). Nosotros no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto a la sensibilidad a caspofungina entre los mutantes *rgf1-N1Δ* y *rgf1-N2Δ* y la cepa silvestre. Sin embar-



go, la sobreexpresión del alelo *rgf1-N2Δ* (en el que se han eliminado 300 aa del principio de la proteína) bajo el control de un promotor reprimible por tiamina fuerte (*nmt* 4X) es letal, mientras que las células que sobreexpresan el gen *rgf1*⁺ silvestre crecen en estas condiciones (figura 29A). En medio líquido sin tiamina las células que sobreexpresan *rgf1*⁺ presentan deposiciones aberrantes de pared celular que se tiñe con calcoflúor, este defecto se hace mucho más patente en el caso de la sobreexpresión de *rgf1-N2Δ* (figura 29B). Estos datos indican que el extremo N'-terminal tiene un efecto inhibitorio y podría participar en la regulación de Rgf1.

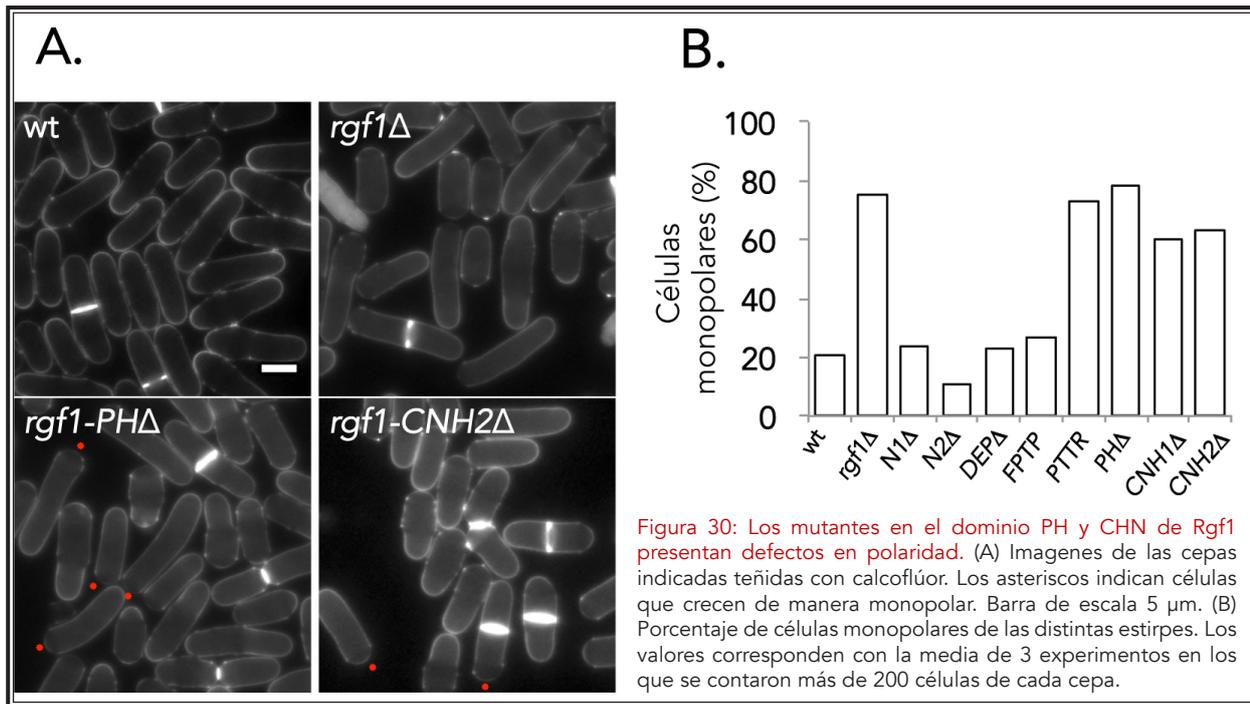
1.3 EL EXTREMO C'-TERMINAL DE Rgf1 ES ESENCIAL PARA SU FUNCIÓN EN POLARIDAD

Para determinar la participación de los distintos dominios de Rgf1 en la activación del crecimiento bipolar, analizamos el crecimiento por uno o los dos polos en las células de las diferentes cepas mutantes, comparándolas con las de la cepa silvestre y las del mutante *rgf1Δ*, como controles. Las áreas de deposición de nueva pared celular fueron visualizadas con calcoflúor, que marca preferentemente las zonas de crecimiento activo.

En la figura 30A se muestran cuatro ejemplos representativos; la cepa silvestre, la cepa *rgf1Δ* y dos de los mutantes en *rgf1*⁺: *rgf1-PHΔ* y *rgf1-CNH2Δ* y se marcan con asteriscos rojos algunas células monopolares, que son más abundantes en los mutantes.

El porcentaje de células monopolares en las distintas cepas construidas se recogen en la figura 30B; cada barra es la media de 3 experimentos en los que se contaron más de 200 células. Solo los mutantes en los dominios PH y CHN presentan un número elevado de células monopolares, similar al del mutante nulo *rgf1Δ* y al del mutante puntual en el dominio catalítico de la proteína Rgf1, *rgf1-PTTR*. Los mutantes en el extremo amino terminal (*rgf1-N1Δ* y *rgf1-N2Δ*) y en el dominio DEP se comportan como la cepa silvestre, es decir, crecen correctamente por ambos polos.

Estos resultados junto con los obtenidos en el apartado anterior indican que el dominio PH y el dominio CNH son esenciales para la función de Rgf1 en el mantenimiento de la integridad y en la capacidad para activar/mantener el crecimiento por el segundo polo.



Los mutantes en el dominio PH y CNH presentan los mismos defectos que el mutante de delección *rgf1*Δ y que el mutante en el dominio DH. La única diferencia que hemos observado es que en los cultivos de las cepas *rgf1*-CNH1Δ y *rgf1*-CNH2Δ apenas hay células lisadas. En este sentido, no hay que olvidar que existe un segundo GEF, Rgf2, que comparte una función esencial con Rgf1 durante el crecimiento vegetativo (García et al., 2009b) y que podría estar más activo en los mutantes del extremo CNH como parte de un mecanismo compensatorio para preservar la integridad celular. Sin embargo, la parte N'-terminal de Rgf1, que comprende el extremo amino y el dominio DEP, no parece tener un papel importante en el mantenimiento de la integridad celular ni en la activación del crecimiento bipolar.

1.4 ANÁLISIS DE LA LOCALIZACIÓN DE LAS VERSIONES MUTADAS DE LA PROTEÍNA Rgf1

Para completar el estudio de estructura-función de Rgf1, analizamos la localización de las proteínas mutadas en los distintos dominios. La pro-

teína Rgf1 silvestre marcada con GFP se localiza en uno o en ambos polos en células en interfase, antes de NETO se localiza en el polo viejo que ya existía en la célula madre y después de NETO se localiza en ambos polos. Durante la división celular desaparece de los polos y se concentra en la zona media (septo de división).

Como se muestra en la figura 31, las proteínas truncadas Rgf1-N1Δ-GFP y Rgf1-N2Δ-GFP se localizan en los dos polos y en el septo de división. Sin embargo, a diferencia de la proteína silvestre en la que la fluorescencia es más brillante y aparece confinada en los polos, en este caso la fluorescencia es menos intensa en los polos pero se extiende hacia los laterales de la célula y en algunos casos aparece difuminada por todo el contorno y también en el interior celular.

Este resultado sugiere que el extremo N'-terminal de la proteína -que no es esencial para la función de Rgf1 en polaridad o en integridad- sí es necesario para que Rgf1 se concentre en los extremos de la célula evitando su dispersión lateral

por la membrana plasmática. También sugiere que el extremo N-terminal podría albergar el sitio de unión a proteínas o lípidos de membrana. Curiosamente, hemos visto que un pequeño fragmento del extremo N'-terminal de Rgf1 (que lleva los primeros 302 aminoácidos de la proteína fusionados la GFP) se localiza en uno de los polos de la célula (figura 32C).

Los primeros 120 aa del extremo N'-terminal de Rgf1 contienen varios motivos ricos en prolinas llamados PRMs (Ball *et al.*, 2005; Williamson, 1994). Los PRMs son dominios que median interacciones moleculares y se ha descrito su participación en situaciones que requieren el reclutamiento o el intercambio rápido de proteínas, tal y como ocurre en cascadas de señalización y reorganizaciones del citoesqueleto. Por consiguiente, podríamos especular que los PRMs pueden crear un sitio de unión para Rgf1 a un complejo o complejos en la membrana plasmática.

Tanto la proteína Rgf1-DEPΔ-GFP, como la proteína con una mutación puntual en el dominio

DEP, Rgf1-FPTP-GFP, se localizan claramente en el núcleo de la célula (figura 31). Además, observamos que las proteínas mutantes también aparecen en el SPB y en los microtúbulos del huso mitótico. No obstante, parte de la cantidad total de esta proteína mutante se mantiene en los polos de la célula y el septo de división, lo que explicaría por qué estos mutantes no presentan los defectos de integridad y polaridad del mutante nulo *rgf1Δ* sino que se comportan como la cepa silvestre.

La localización de Rgf1-DEPΔ-GFP en el núcleo es sorprendente puesto que nunca se había observado en la proteína silvestre en las condiciones de estudio habituales. Es más, en la figura 31 se puede observar que la proteína Rgf1 silvestre está excluida del núcleo. Este resultado cambió el rumbo de este trabajo, tal y como se verá a continuación en la memoria.

Siguiendo con la caracterización de los mutantes vimos que Rgf1-PHΔ-GFP, se localiza exclusivamente en uno de los polos (figura 31). Sabemos que es el polo que crece porque Rgf1-PHΔ-GFP se

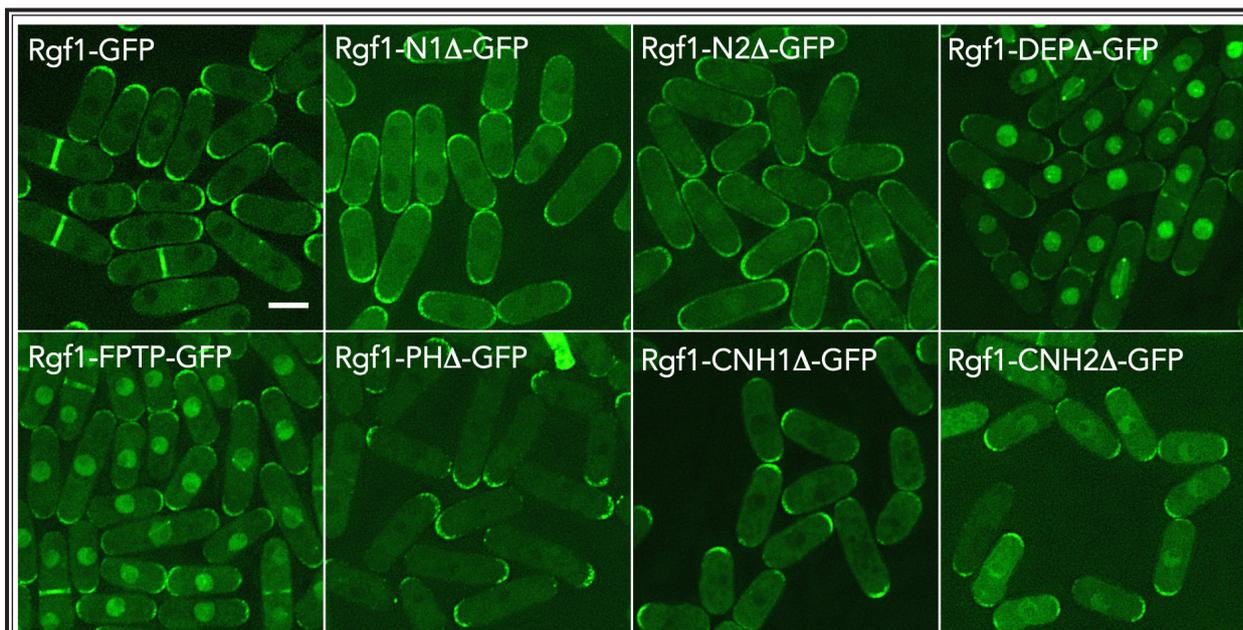


Figura 31: Localización subcelular de la proteína Rgf1 silvestre y sus diferentes versiones mutadas. Imágenes de fluorescencia de la localización de Rgf1 en células de las cepas que llevan el gen *rgf1** silvestre o los distintos alelos mutantes, marcados con GFP e integrados en el genoma bajo el control de su propio promotor. Barra de escala 5 μ m.

RESULTADOS

localiza en el polo teñido con calcoflúor, que marca las zonas de crecimiento activo (datos no mostrados). Este resultado indica que el dominio PH -que es esencial para la función de Rgf1- también participa en la localización correcta de la proteína al menos en el polo nuevo; aunque de momento no podemos saber si el defecto en la localización se debe a un defecto en la función o viceversa, puesto que las células *rgf1-PHΔ* son monopolares.

Además, estos resultados sugieren que los mecanismos de los que depende la localización de Rgf1 en los polos podrían ser diferentes en el polo viejo que en el polo nuevo.

Las proteínas truncadas Rgf1-CNH1Δ-GFP y Rgf1-CNH2Δ-GFP se localizan en los polos de la célula y en el septo de división, pero ambas presentan una menor cantidad de proteína que la cepa silvestre en uno de los polos, que hemos identificado como el polo nuevo (figura 31). La escasez de proteína en el polo nuevo podría explicar por qué las células que portan estas versiones mutadas de Rgf1 son monopolares. Curiosamente, la proteína Rgf1-CNH2Δ-GFP también se localiza en el núcleo aunque de manera más tenue que en los mutantes del dominio DEP (figura 31).

CAPÍTULO 2.

Rgf1 se acumula en el núcleo en condiciones de estrés replicativo de forma regulada por elementos en su propia secuencia, el *checkpoint* de bloqueo en replicación y la proteína 14-3-3 Rad24

2.1 Rgf1 POSEE UNA SECUENCIA DE LOCALIZACIÓN NUCLEAR (NLS) EN SU EXTREMO N'-TERMINAL

La localización en el núcleo de las proteínas Rgf1-DEPΔ-GFP y Rgf1-FPTP-GFP nos llevó a realizar un análisis detallado de la secuencia de aminoácidos de la proteína Rgf1. Entonces vimos que Rgf1 portaba una secuencia de localización nuclear (NLS) en la región N'-terminal y dos posibles secuencias de exporte nuclear (NES) en el extremo C'-terminal (figura 32A).

Las NLS clásicas consisten en grupos de aminoácidos cargados positivamente (Xu et al., 2010). En el caso de Rgf1, la NLS -NKRRRRRI- se localiza entre los aminoácidos 406 y 412 y curiosamente se encuentra al lado del dominio DEP (aa 428-503) (figura 32A).

Para saber si esta secuencia actúa realmente como una NLS en el transporte de Rgf1, analizamos la localización subcelular de distintos fragmentos del extremo N'-terminal de Rgf1 fusionados a la GFP. Las construcciones realizadas y su

localización se muestran en las figuras 32B y 32C. Todas ellas fueron integradas en el genoma de una cepa *rgf1Δ* bajo el control de su propio promotor de la misma manera que en los mutantes de los dominios de Rgf1.

El fragmento que lleva los primeros 302 aminoácidos de Rgf1, Rgf1-N302-GFP, se localiza disperso por el citoplasma y aparece de forma tenue en uno de los dos polos como se muestra en las células señaladas con una flecha en la figura 32C. Sin embargo, el fragmento que consiste en los primeros 535 aminoácidos en los que se incluye la posible NLS y el dominio DEP, Rgf1-N535-GFP, marca intensamente el núcleo celular (figura 32C).

Para acotar la zona del extremo amino necesaria para transportar la GFP al núcleo, eliminamos los primeros 302 aa y nos quedamos con el fragmento comprendido entre los aminoácidos 302 y 535 que contiene la NLS y el dominio DEP marcado con GFP, Rgf1-N302-535-GFP. En este caso, igual que ocurre con el fragmento al Rgf1-N535-GFP, la GFP se localiza en el núcleo (figura 32C).

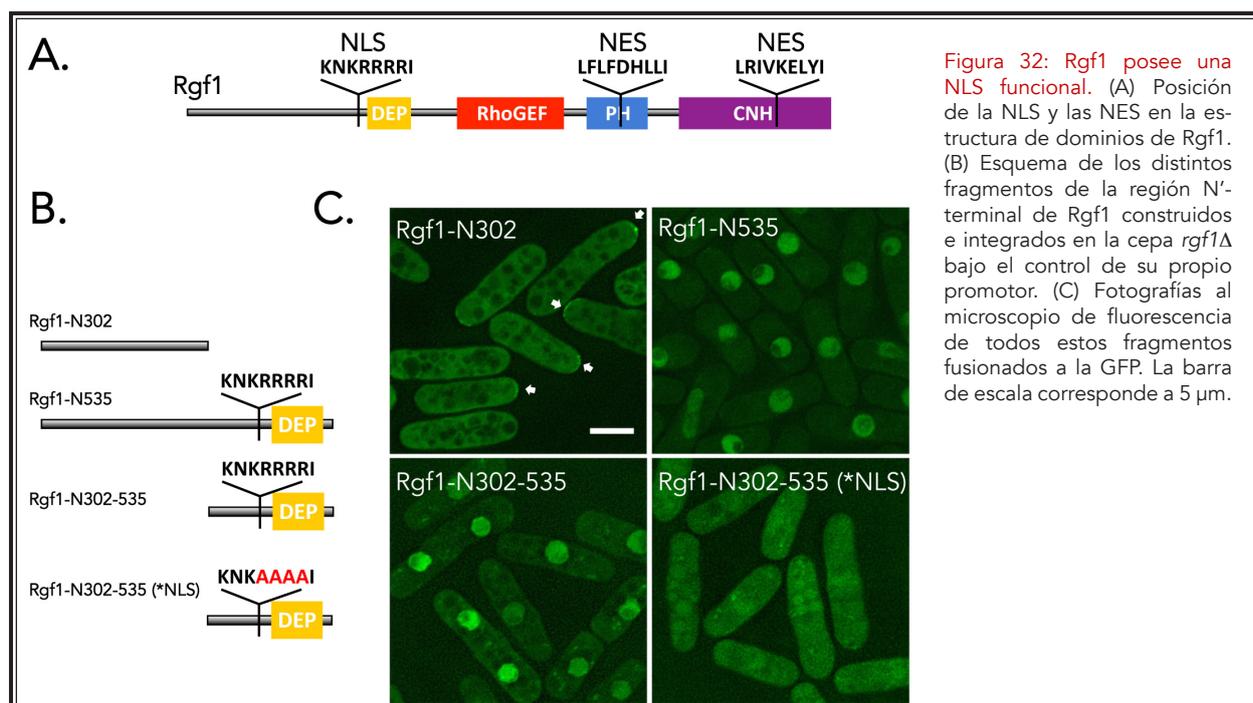


Figura 32: Rgf1 posee una NLS funcional. (A) Posición de la NLS y las NES en la estructura de dominios de Rgf1. (B) Esquema de los distintos fragmentos de la región N'-terminal de Rgf1 construidos e integrados en la cepa *rgf1Δ* bajo el control de su propio promotor. (C) Fotografías al microscopio de fluorescencia de todos estos fragmentos fusionados a la GFP. La barra de escala corresponde a 5 μm.

Para demostrar que la localización nuclear de este pequeño fragmento de la proteína Rgf1 se debe a la secuencia ⁴⁰⁶NKRRRRRI⁴¹², cambiamos las 4 argininas por 4 residuos de alanina (⁴⁰⁶NKA-AAAI⁴¹²) mediante mutagénesis dirigida. Como se observa en la **figura 32C**, la proteína que lleva NLS mutada, Rgf1-N302-535(*NLS)-GFP, pierde la localización nuclear.

Este experimento demuestra que la NLS que aparece en la secuencia de Rgf1 actúa como una verdadera NLS ya que por un lado, es suficiente para dirigir a una proteína “pasajera” al núcleo, como en el caso de Rgf1-N302-535-GFP y por otro lado, es necesaria para su localización, ya que este mismo fragmento sin la NLS, Rgf1-N302-535(*NLS)-GFP, no se localiza en el núcleo.

Debido a la proximidad del dominio DEP a la NLS, es posible que la localización nuclear de las proteínas truncadas Rgf1-DEPΔ-GFP y Rgf1-FPTP-GFP sea el resultado de un cambio de conformación de Rgf1 producido por la eliminación o la mutación del dominio DEP. Podría ocurrir que en estos mutantes se haya desenmascarado la NLS y esto precipite su entrada al núcleo. Para verificar esta hipótesis, construimos una cepa en la que el gen *rgf1*⁺, además de llevar la delección *rgf1-DEPΔ*,

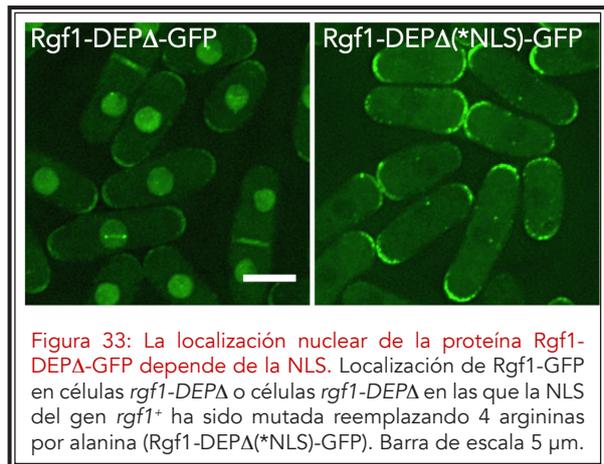


Figura 33: La localización nuclear de la proteína Rgf1-DEPΔ-GFP depende de la NLS. Localización de Rgf1-GFP en células *rgf1-DEPΔ* o células *rgf1-DEPΔ* en las que la NLS del gen *rgf1*⁺ ha sido mutada reemplazando 4 argininas por alanina (Rgf1-DEPΔ(*NLS)-GFP). Barra de escala 5 μm.

posee la NLS mutada de la misma manera que en el caso anterior (las 4 argininas fueron cambiadas por alaninas). Como se muestra en la **figura 33**, la proteína Rgf1 que porta las dos mutaciones, Rgf1-DEPΔ(*NLS)-GFP, se localiza en los polos, el septo y en el SPB pero, a diferencia de la proteína Rgf1-DEPΔ-GFP, se encuentra completamente excluida del núcleo. Este resultado sugiere que la localización nuclear de las proteínas mutantes Rgf1-DEPΔ-GFP y Rgf1-FPTP-GFP se debe en gran parte a una exposición anómala de la NLS.

2.2 Rgf1 SE LOCALIZA EN EL NÚCLEO CUANDO LA REPLICACIÓN ESTÁ BLOQUEADA POR LA PRESENCIA DE HIDROXIUREA (HU)

A pesar de que Rgf1 posee en su secuencia de aminoácidos una NLS funcional y de que muta-

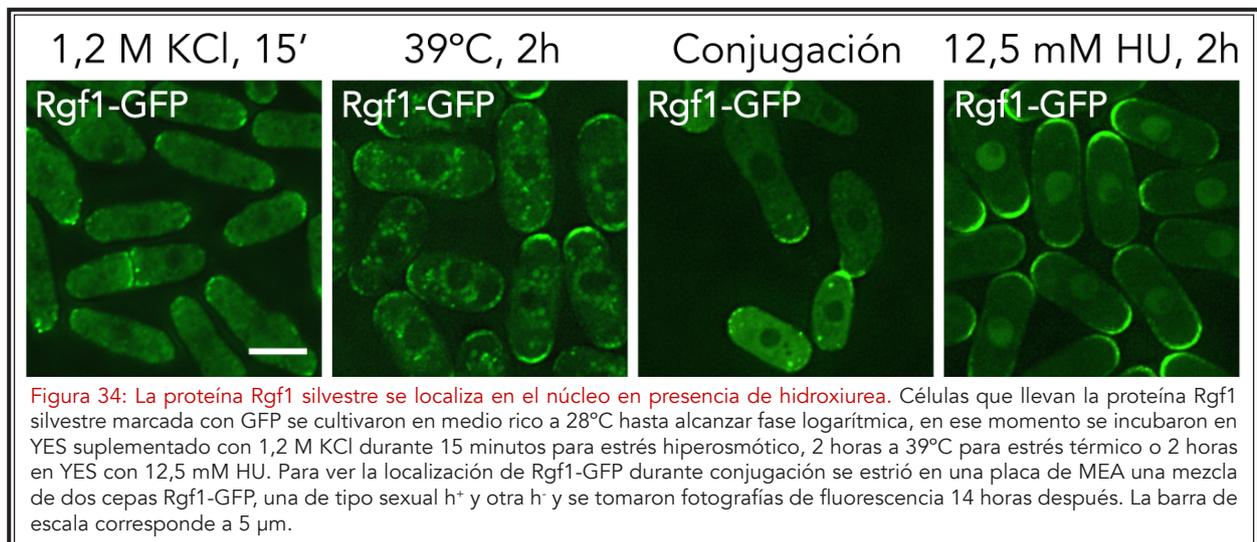


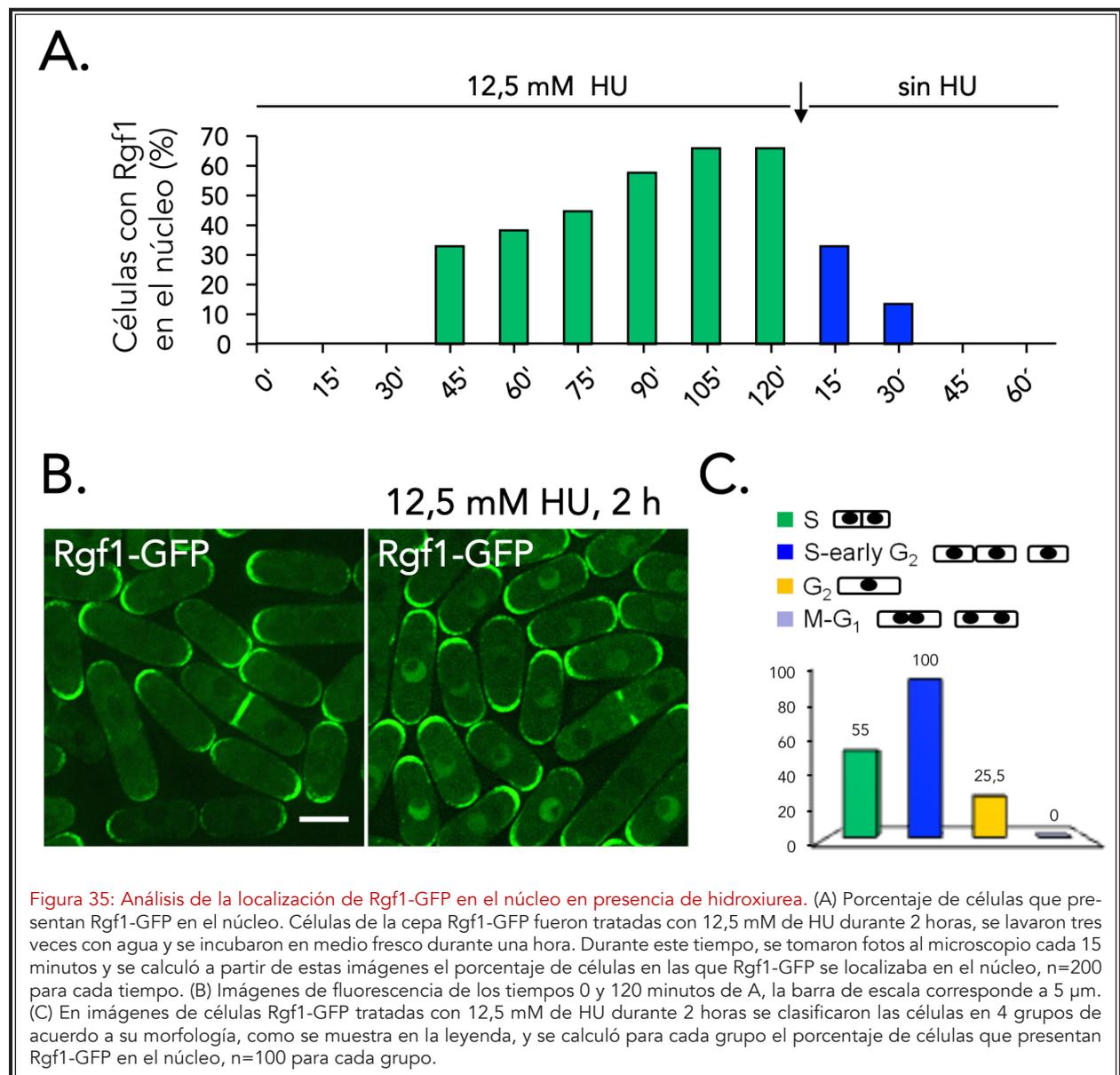
Figura 34: La proteína Rgf1 silvestre se localiza en el núcleo en presencia de hidroxurea. Células que llevan la proteína Rgf1 silvestre marcada con GFP se cultivaron en medio rico a 28°C hasta alcanzar fase logarítmica, en ese momento se incubaron en YES suplementado con 1,2 M KCl durante 15 minutos para estrés hiperosmótico, 2 horas a 39°C para estrés térmico o 2 horas en YES con 12,5 mM HU. Para ver la localización de Rgf1-GFP durante conjugación se estrió en una placa de MEA una mezcla de dos cepas Rgf1-GFP, una de tipo sexual *h*⁺ y otra *h*⁻ y se tomaron fotografías de fluorescencia 14 horas después. La barra de escala corresponde a 5 μm.

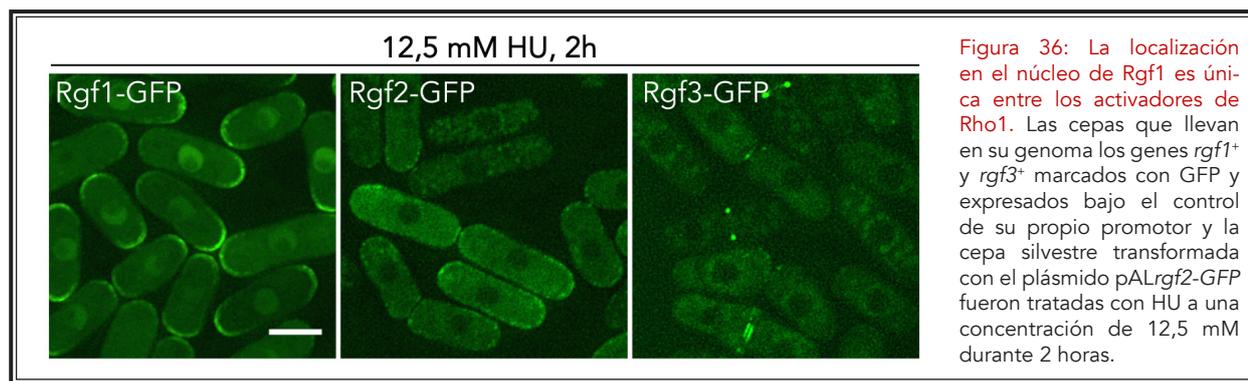
ciones en su dominio DEP conduzcan a la proteína al núcleo, la proteína Rgf1 silvestre se localiza en los sitios de crecimiento y no es detectable en el núcleo de las células en un cultivo asincrónico. De hecho, está excluida del núcleo en la mayor parte de las células tal y como se puede observar en las figuras 31 y 35B. Sin embargo, es posible que en condiciones normales la NLS se encuentre enmascarada por interacciones intra-moleculares mientras que en condiciones de estrés, sea expuesta favoreciendo la entrada de Rgf1 en el núcleo.

Para analizar este cambio de localización de Rgf1 en detalle, añadimos HU a una concentración de 12,5 mM a un cultivo en fase logarítmica de la

Con el objetivo de comprobar si éste es el caso, analizamos la localización de Rgf1 en el nú-

cleo en presencia de estrés osmótico, estrés térmico, estrés replicativo y durante la conjugación. Tal y como se muestra en la figura 34 Rgf1-GFP se acumula en el núcleo solamente después del tratamiento con hidroxiaurea (HU). Esta droga actúa inhibiendo la enzima ribonucleótido reductasa, que participa en la síntesis de dNTPs. Cuando disminuye la reserva de dNTPs en la célula, las horquillas de replicación se bloquean y se activa el *checkpoint* de replicación (Boddy y Russell, 2001).





cepa Rgf1-GFP y calculamos el porcentaje de células con Rgf1 dentro del núcleo en imágenes tomadas cada 15 minutos. Como se puede observar en la [figura 35A](#), el porcentaje de células con Rgf1 nuclear aumenta con el tiempo.

Las primeras células con Rgf1 en el núcleo aparecen aproximadamente después de 45 minutos de tratamiento y alcanzan un máximo del 65-70% del cultivo a las 2 horas de tratamiento. En este 70% no están representados por igual todos los estadios del ciclo celular. En la gráfica de la [figura 35C](#), se han dividido las células en cuatro grupos que corresponden a fases del ciclo celular de acuerdo a su morfología, y después de 2 horas de tratamiento con HU, se puede observar que Rgf1 se acumula principalmente en el núcleo de células que por su aspecto parecen estar en fase S o G₂ temprana, mientras que no se acumula en el núcleo en células en mitosis o en G₁.

La acumulación de Rgf1 en el núcleo en respuesta a HU es reversible ya que tan pronto como la droga es eliminada del cultivo, el porcentaje de células con Rgf1 en el núcleo disminuye rápidamente ([figura 35A](#)). Esto sugiere la existencia de un mecanismo molecular que relacione la acumulación de Rgf1-GFP en el núcleo y la activación del *checkpoint* de replicación. De acuerdo con esto, sabemos que no hay diferencias apreciables en la cantidad de proteína en presencia o en ausencia

de HU (datos no mostrados), lo que indicaría que la acumulación de Rgf1 en el núcleo en condiciones de estrés replicativo se debe a una redistribución de la proteína y no a un aumento de su cantidad.

Además, este cambio de localización es único para Rgf1 entre los activadores de Rho1 ya que ni Rgf2 ni Rgf3 se localizan en el núcleo en estas condiciones ([figura 36](#)).

2.3 EL EXTREMO N'-TERMINAL Y LA NLS DE Rgf1 SON NECESARIAS PARA SU ACUMULACIÓN NUCLEAR EN RESPUESTA A ESTRÉS REPLICATIVO

Para diferenciar qué partes de la proteína Rgf1 podrían ser importantes para su acumulación en el núcleo, analizamos la localización de las proteínas mutadas Rgf1-N1Δ-GFP, Rgf1-N2Δ-GFP, Rgf1-DEPΔ-GFP, Rgf1-FPTP-GFP, Rgf1-PHΔ-GFP, Rgf1-CNH1Δ-GFP y Rgf1-CNH2Δ-GFP en presencia de HU.

Todas las versiones mutadas de Rgf1 se acumulan en el núcleo en presencia de hidroxiurea de forma similar a la proteína Rgf1-GFP silvestre excepto Rgf1-N1Δ-GFP y Rgf1-N2Δ-GFP en cuyo caso la acumulación en el núcleo disminuye considerablemente pero no desaparece por completo ([figura 37](#)). Este resultado sugiere que el extremo N'-terminal de Rgf1 -en el que se incluye la NLS-

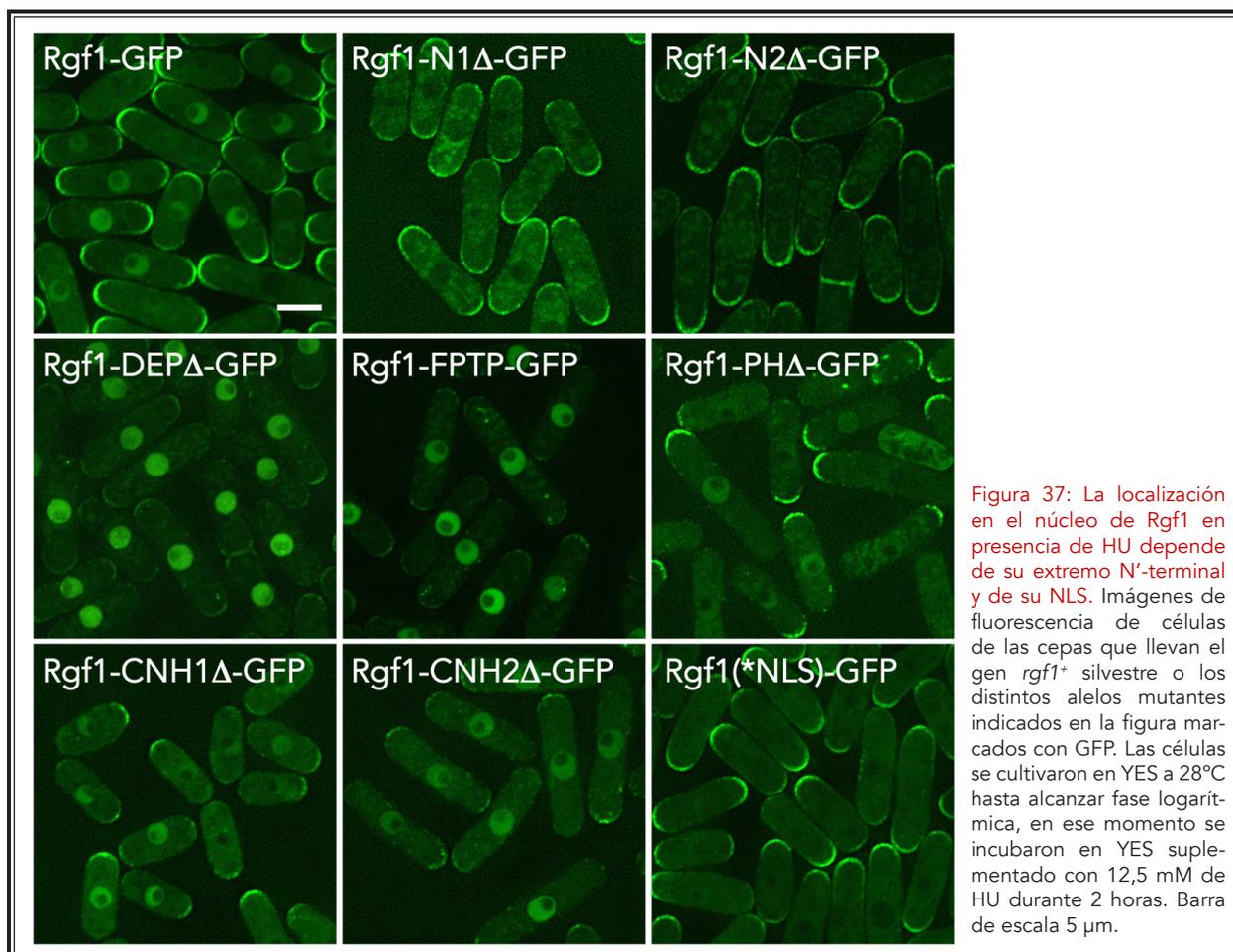


Figura 37: La localización en el núcleo de Rgf1 en presencia de HU depende de su extremo N'-terminal y de su NLS. Imágenes de fluorescencia de células de las cepas que llevan el gen *rgf1*⁺ silvestre o los distintos alelos mutantes indicados en la figura marcados con GFP. Las células se cultivaron en YES a 28°C hasta alcanzar fase logarítmica, en ese momento se incubaron en YES suplementado con 12,5 mM de HU durante 2 horas. Barra de escala 5 μm.

está directamente implicado en la regulación de su cambio de localización en presencia de HU.

Puesto que las mutaciones de la región N'-terminal realizadas son deleciones de 65 aa y 300 aa respectivamente, quisimos analizar de una manera más precisa si la NLS estaba implicada en la localización de Rgf1-GFP en el núcleo en condiciones de bloqueo en replicación. Para ello, cambiamos las 4 argininas de la secuencia ⁴⁰⁶NKRRRR⁴¹² por 4 residuos de alanina (⁴⁰⁶NKAAAA⁴¹²) en la secuencia del gen *rgf1*⁺ completo marcado con GFP. Rgf1(*NLS)-GFP fue integrada en el genoma de una cepa *rgf1Δ* y expresada bajo el control de su propio promotor. La mutación de la NLS supone una gran reducción en el número de células con Rgf1-GFP en el núcleo (el 8% del mutante Rgf1(*NLS)-GFP frente al 70% en el caso de Rgf1-GFP silvestre después de 2 horas en HU, figura 37).

Sin embargo, tal y como sucede con las proteínas con deleciones en el N'-terminal (Rgf1-N1Δ-GFP y Rgf1-N2Δ-GFP), Rgf1-GFP(*NLS)-GFP no está totalmente excluida del núcleo. No obstante, este resultado indica que la NLS es importante para la translocación de Rgf1 al núcleo en condiciones de estrés replicativo causado por HU.

2.4 Rgf1 TIENE DOS SECUENCIAS DE EXPORTE NUCLEAR (NES) QUE PARTICIPAN EN SU TRANSPORTE NÚCLEO-CITOPLASMA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO CON HU

Como ya se ha mencionado con anterioridad, Rgf1 presenta dos posibles NES en el extremo C'-terminal de su secuencia. Las NES son secuencias cortas ricas en leucina y las proteínas que contienen estas secuencias son reconocidas y transportadas fuera del núcleo por el receptor de

RESULTADOS

exporte nuclear tipo carioferina CRM1/Exportina 1 (Crm1 en *S. pombe*) (Xu *et al.*, 2010).

En el caso de Rgf1 nosotros identificamos y denominamos NES1 a un motivo rico en leucinas localizado entre los aminoácidos 857 y 867 (⁸⁵⁷LFLFDHLLI⁸⁶⁷) que presenta gran similitud con la secuencia NES consenso y NES2 a otro motivo de tipo NES presente en el extremo C'-terminal de la proteína (¹¹⁴²LRIVKELYI¹¹⁵¹).

Para estudiar el papel de estas secuencias en el tráfico de Rgf1 entre el núcleo y el citoplasma, decidimos mutarlas sobre el gen *rgf1*⁺ completo marcado con GFP. En el caso de NES1 se cambiaron las leucinas 865, 866 y 867 por alaninas (*NES1), y en el caso de NES2 se cambiaron la leucina 1149 y la isoleucina 1151 a residuos de alanina (*NES2). Ambas construcciones se integraron en el genoma de una cepa *rgf1Δ* y se expresaron bajo el control de su propio promotor (figura 38).

La versión de Rgf1-GFP que tiene el motivo NES1 mutado, Rgf1(*NES1)-GFP, se localiza en el interior del núcleo en aproximadamente el 50% de las células, incluso en ausencia de HU (figura 39A). Este dato sugiere no solo que NES1 funciona como un motivo NES convencional sino también, y aún más importante, que en ausencia de estrés Rgf1 podría entrar en el núcleo de forma transito-

ria y en una cantidad no detectable por microscopía. Sólo si se impide su salida del núcleo, por ejemplo mutando NES1, la proteína se acumula y se puede detectar en este compartimento.

Al contrario que Rgf1(*NES1)-GFP, la versión mutante de la proteína Rgf1 en la que la secuencia de exporte nuclear NES2 está mutada, Rgf1(*NES2)-GFP, no se acumula en el núcleo en ausencia de HU (figura 39A).

También analizamos el papel que podrían tener las NES de Rgf1, en la salida de Rgf1-GFP del núcleo después del tratamiento con HU. Para ello y tal y como se describió en la figura 35A, células de las cepas Rgf1-GFP, Rgf1(*NES1)-GFP y Rgf1(*NES2)-GFP fueron tratadas con 12,5 mM de HU durante 2 horas, se lavaron para eliminar la droga y se incubaron en medio fresco. A partir de este momento se calculó el porcentaje de células en las que Rgf1-GFP se localizaba en el núcleo cada 15 minutos.

Como se muestra en la figura 39B, después de eliminar la HU del medio de cultivo, el porcentaje de células con Rgf1 en el núcleo disminuye más despacio en las cepas que tienen las NES mutadas. En el caso de Rgf1(*NES1)-GFP el retraso es muy grande ya que una hora después de que ha cesado el estímulo, Rgf1-GFP todavía

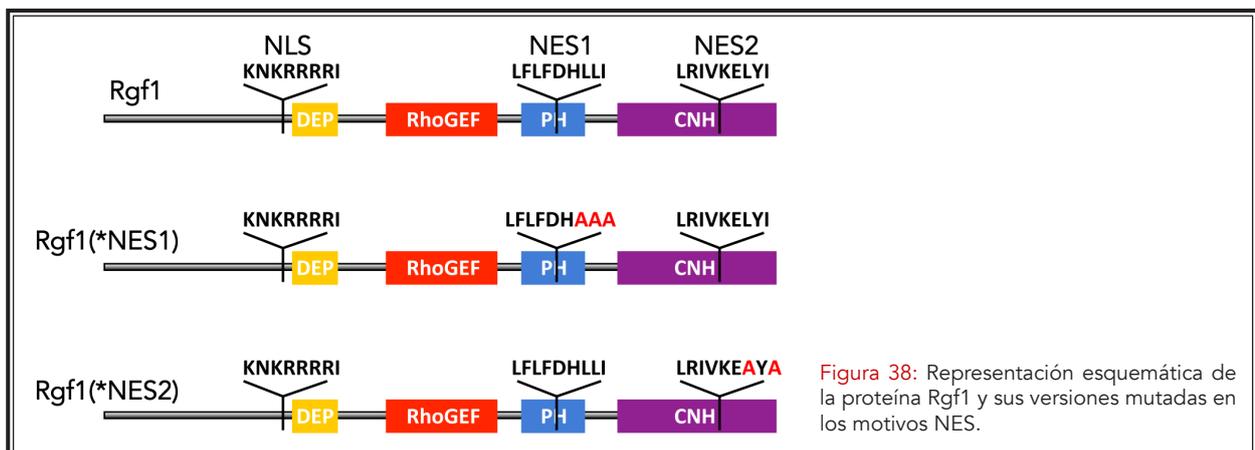
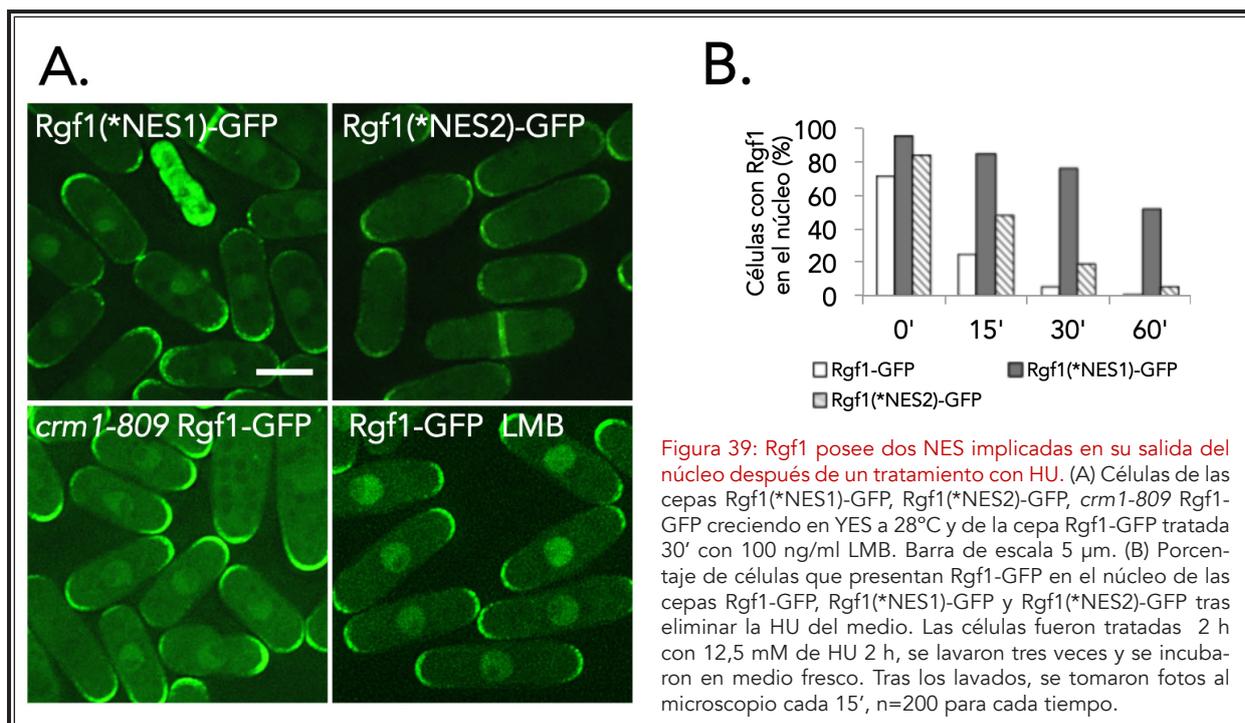


Figura 38: Representación esquemática de la proteína Rgf1 y sus versiones mutadas en los motivos NES.



es nuclear en un 50% de las células. En el mutante Rgf1(*NES2)-GFP también se observa, aunque de forma menos evidente que en el caso anterior, que la disminución del porcentaje de células con Rgf1 en el núcleo sucede más despacio que en la cepa silvestre (figura 39B).

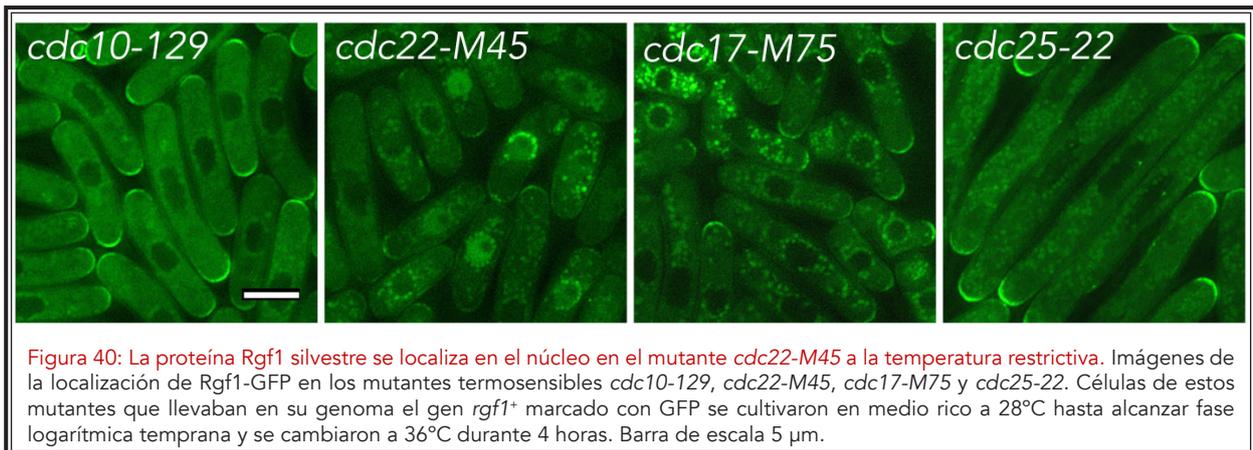
Este resultado indica que el motivo NES2 podría tener un papel secundario pero aún demostrable en el exporte de Rgf1. Curiosamente, en los mutantes Rgf1(*NES1)-GFP y Rgf1(*NES2)-GFP el porcentaje de células con Rgf1 en el núcleo en presencia de HU es superior al de la cepa silvestre, lo que podría indicar también un aumento de la retención.

A continuación y puesto que Rgf1(*NES1)-GFP no deja de ser una proteína mutante, decidimos comprobar si la proteína silvestre Rgf1-GFP también se quedaba retenida en el núcleo celular en ausencia de HU al bloquear su exporte nuclear. Para ello, en primer lugar, analizamos la localización de Rgf1-GFP en el mutante *crm1-809* (Adachi y Yanagida, 1989). Las células portadoras de este

alelo termosensible presentan un bloqueo en el exporte nuclear de proteínas que contienen motivos NES a la temperatura no permisiva (Fukuda et al., 1997).

Como se puede observar en la figura 39A, en ausencia de HU, e incluso a la temperatura permisiva (30°C), Rgf1-GFP está en el núcleo del 45% de las células del mutante *crm1-809*. Este porcentaje aumenta a un 95% si tratamos las células de la cepa silvestre con *rgf1+* marcado con GFP con Lep-tomicina B (LMB) (figura 39A). La LMB es un inhibidor potente y específico del exporte nuclear de proteínas con elementos NES, que actúa inhibiendo directamente a CRM1 mediante la alquilación de una cisteína en su dominio central (la cisteína 529 en el caso de Crm1 de *S. pombe*) (Fukuda et al., 1997; Kudo et al., 1999).

En resumen, estos resultados indican que después de un bloqueo replicativo, la salida de Rgf1 del núcleo se produce a través del receptor nuclear Crm1 que reconoce los motivos NES1 y NES2 de la propia proteína. Además, el hecho de



que Rgf1 se acumule en el núcleo en ausencia de estrés y en presencia de LMB, podría indicar que la proteína está constantemente entrando y saliendo del núcleo en un ciclo celular normal.

2.5 Rgf1 SE ACUMULA EN EL NÚCLEO EN MUTANTES QUE TIENEN UN BLOQUEO EN FASE S

Puesto que Rgf1 podría entrar en el núcleo de forma transitoria en algún momento del ciclo celular, intentamos averiguar cuál era ese momento. Para ello analizamos la localización de Rgf1-GFP en diferentes mutantes del ciclo celular a la temperatura restrictiva. Las células se bloquearon en G₁ utilizando el mutante *cdc10-129*, en fase S con el mutante *cdc22-M45* (un mutante termosensible de la ribonucleótido reductasa), en fase S tardía / G₂ temprana con el mutante *cdc17-M75* (un mutante de la DNA ligasa I) y en fase G₂ mediante el mutante *cdc25-22* (Wang et al., 1999).

Después de 4 horas a 36°C, pudimos observar que Rgf1 está excluida del núcleo en células bloqueadas al final de la fase S, G₂ y G₁ pero no está excluida del núcleo en el mutante *cdc22-M45* que se para en fase S (figura 40).

Esta diferencia podría indicar que Rgf1 entra transitoriamente en el núcleo en fase S. Sin

embargo, las células del mutante *cdc22-M45* a la temperatura restrictiva tienen activo el *checkpoint* de bloqueo en replicación (Lindsay et al., 1998), lo que hace imposible discernir si Rgf1 se acumula en este mutante porque las células están en fase S o en respuesta al *checkpoint* de bloqueo en replicación.

2.6 LA ACUMULACIÓN NUCLEAR DE Rgf1 DEPENDE DEL CHECKPOINT DE BLOQUEO EN REPLICACIÓN

Como se describió en la introducción, en *S. pombe* existen dos rutas de señalización distintas que responden a daño en el DNA, ambas rutas comparten una proteína sensora principal, la quinasa Rad3, que fosforila y activa a las quinasas efectoras Cds1 o Chk1 en función del tipo de daño que se produce o del momento del ciclo celular en que se produce. Rad3 activa a Cds1 cuando la célula detecta la presencia de horquillas de replicación atascadas o daño en el DNA durante fase S y a Chk1 cuando las roturas de doble cadena y otros daños en el DNA se producen en la fase G₂ del ciclo celular (Brondello et al., 1999; Lindsay et al., 1998; Murakami y Okayama, 1995; Walworth et al., 1993).

Puesto que la acumulación nuclear de Rgf1 se produce precisamente en condiciones en las

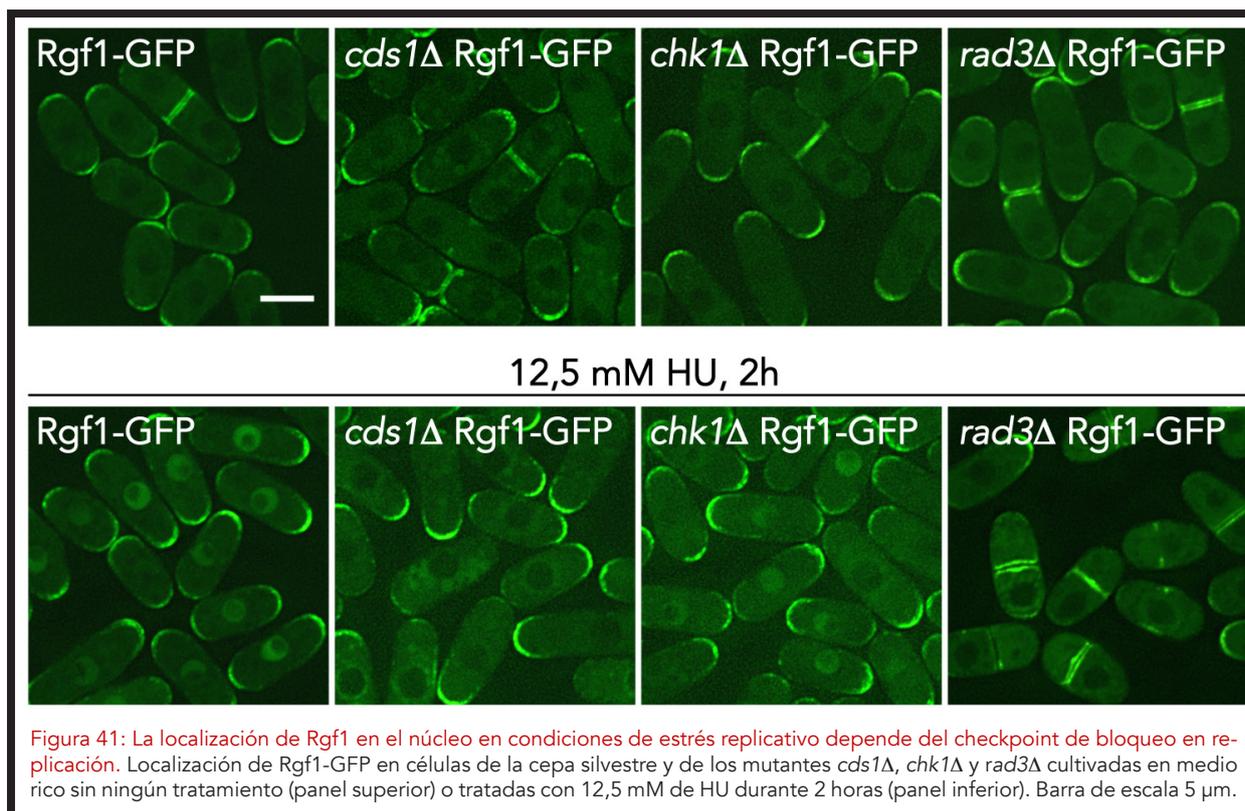


Figura 41: La localización de Rgf1 en el núcleo en condiciones de estrés replicativo depende del checkpoint de bloqueo en replicación. Localización de Rgf1-GFP en células de la cepa silvestre y de los mutantes *cds1Δ*, *chk1Δ* y *rad3Δ* cultivadas en medio rico sin ningún tratamiento (panel superior) o tratadas con 12,5 mM de HU durante 2 horas (panel inferior). Barra de escala 5 μ m.

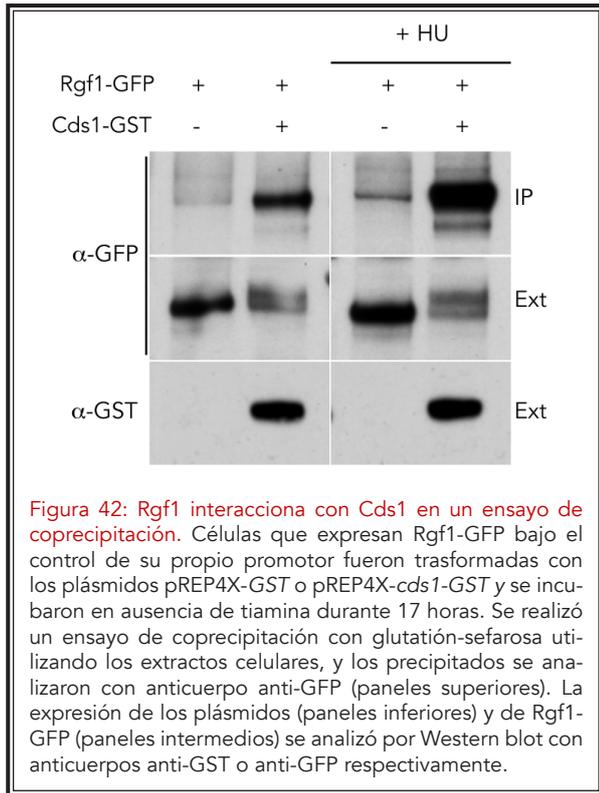
que la vía de Cds1 está activa, decidimos estudiar la localización de Rgf1 en presencia y ausencia de hidroximetiluracilo en los mutantes de delección *cds1Δ*, *chk1Δ* y *rad3Δ*. En células *cds1Δ rgf1-GFP* y *chk1Δ rgf1-GFP* sin tratar con HU, la localización de Rgf1-GFP es prácticamente igual a la de la cepa silvestre (figura 41). Sin embargo, después de 2 horas de tratamiento, en el mutante *cds1Δ* la proteína Rgf1-GFP se localiza exclusivamente en los polos y en el septo igual que en las células no tratadas, mientras que en mutante *chk1Δ* y en la cepa silvestre la proteína Rgf1-GFP se acumula en el núcleo (figura 41).

Curiosamente, en respuesta a HU, Rgf1-GFP también está excluida del núcleo en el mutante *rad3Δ* (figura 41), lo que confirma que su acumulación en el núcleo no sólo depende de Cds1 sino también de la actividad del checkpoint de bloqueo en replicación.

Mediante estudios de proteómica a gran escala se han identificado cientos de efectores de las

checkpoint-quinasas con funciones celulares variadas (Smolka et al., 2007), por lo que no sería extraño que Cds1 pudiese mediar en la acumulación de Rgf1-GFP en el núcleo de forma directa. Por este motivo, decidimos averiguar si Rgf1 y Cds1 podrían interactuar en un ensayo de coimmunoprecipitación.

La cepa con Rgf1-GFP endógena fue transformada con el plásmido pREP4X-*cds1-GST* (*cds1+* está bajo el control del promotor reprimible por tiamina *nmt* 4X) o con el plásmido pREP4X-GST como control. En los paneles superiores de la figura 42 se muestra que Rgf1-GFP coprecipita con Cds1-GST tanto en presencia como en ausencia de HU y que la cantidad que coprecipita en presencia de la droga es mayor que en su ausencia. Además, nos llamó la atención que al analizar la cantidad de Rgf1-GFP en los extractos de las células que sobreexpresaban *cds1-GST* (figura 42, paneles intermedios) aparecen 2 bandas de Rgf1-GFP, una de ellas migra más despacio y no aparece



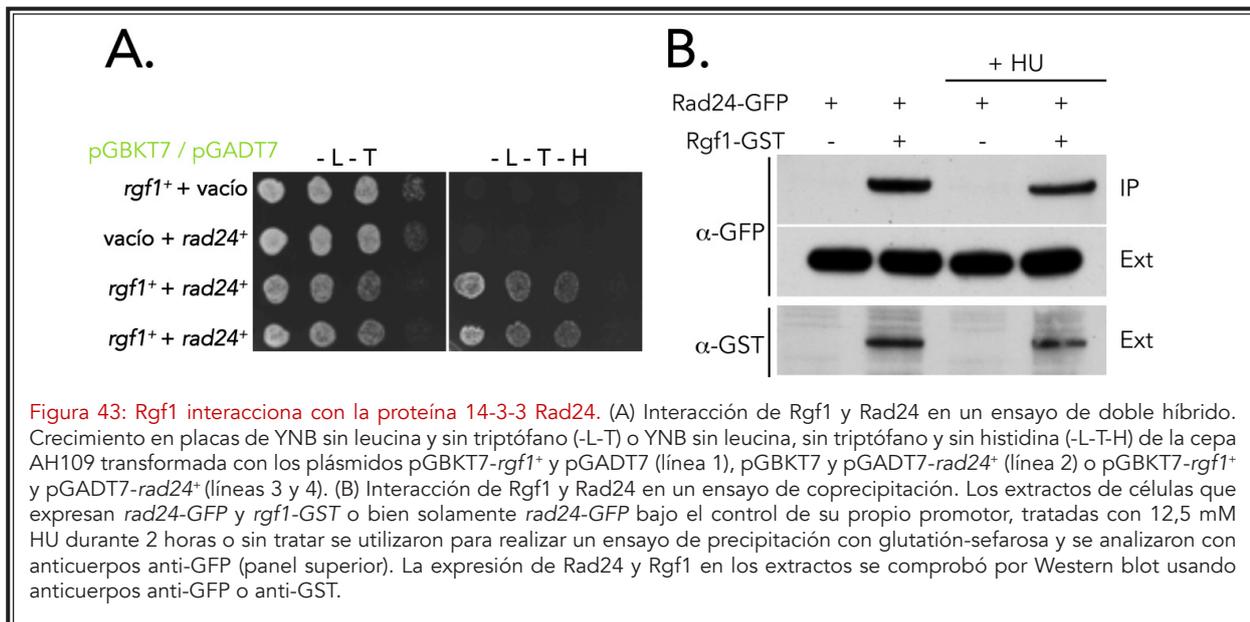
en los extractos de células transformadas con el plásmido pREP4X-GST.

Esta banda podría corresponder a un estado hiperfosforilado de la proteína Rgf1-GFP que solo aparece en condiciones de sobreexpresión de *cds1*⁺. Estos datos sugieren que Rgf1 interacciona con Cds1 y que podría ser fosforilada directamente por esta quinasa.

2.7 LA ACUMULACIÓN DE Rgf1 EN EL NÚCLEO EN RESPUESTA A ESTRÉS REPLICATIVO DEPENDE DE Rad24

En nuestro laboratorio se había realizado una búsqueda para identificar posibles interacciones entre Rgf1 y otras proteínas mediante un ensayo de dos híbridos (Durfee *et al.*, 1993; Fields y Song, 1989). Para ello la ORF de Rgf1 (desde el aa 1 al 1.134), el extremo N'-terminal (del aa 1 al 423) y el extremo C'-terminal (desde el aa 988 al 1.334) se fusionaron al dominio de unión a DNA de Gal4 en el plásmido pGBK7 y se usaron como cebo para buscar interacciones en una genoteca en la que los cDNAs de *S. pombe* están fusionados al dominio de activación de Gal4 en el plásmido pACT2, (esta genoteca fue un regalo de S. MacNeill y los experimentos fueron realizados por G. Ruiz de Garibay).

En este escrutinio, se identificaron 6 clones positivos que llevaban el gen *rad24*⁺ y que interaccionaron con la proteína Rgf1 completa. Tal y como se muestra en la **figura 43A, líneas 3 y 4**, las células de la cepa AH109 que co-expresan *rad24*⁺ fusionado al dominio activador (pGADT7-*rad24*⁺) y *rgf1*⁺ fusionado al dominio de unión a DNA del



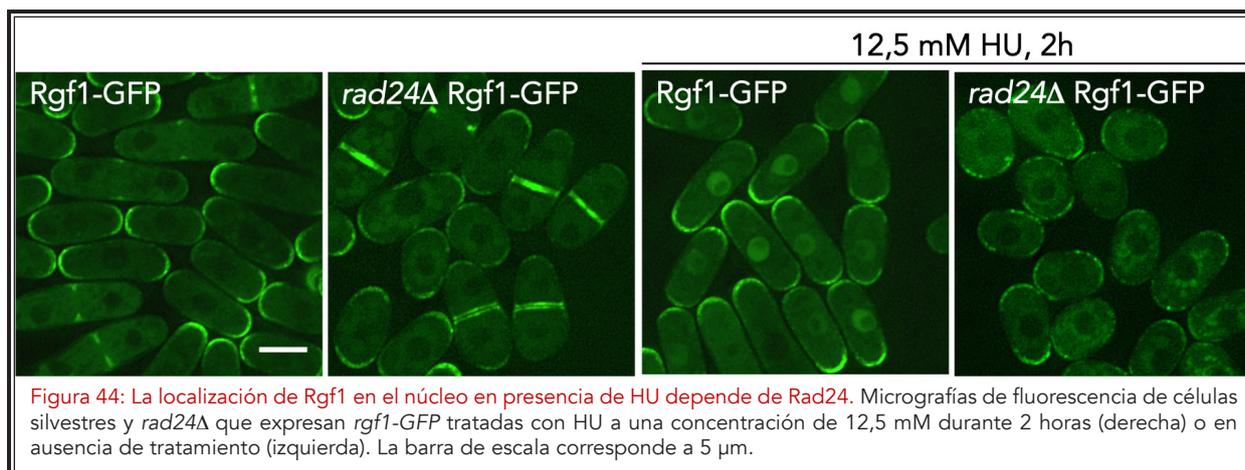


Figura 44: La localización de Rgf1 en el núcleo en presencia de HU depende de Rad24. Micrografías de fluorescencia de células silvestres y *rad24Δ* que expresan *rgf1-GFP* tratadas con HU a una concentración de 12,5 mM durante 2 horas (derecha) o en ausencia de tratamiento (izquierda). La barra de escala corresponde a 5 μ m.

gen *GAL4* (*pGBKT7-rgf1+*) crecen en medio sin histidina, lo que indica que existe interacción; pero no lo hacen las células co-transformadas con *pGBKT7-rgf1+* y el plásmido vacío *pGADT7* (figura 43A, línea 1) ni las transformadas con el plásmido *pGBKT7* vacío junto con *pGADT7-rad24+* (figura 43A, línea 2).

Para verificar esta interacción, realizamos un experimento de coprecipitación, construimos una cepa con la copia endógena de *rad24+* marcada con el epítipo GFP y la copia endógena de *rgf1+* marcada con GST. Como control del experimento utilizamos la cepa que expresaba únicamente Rad24-GFP. En la figura 43B podemos ver que Rgf1 y Rad24 interactúan tanto en presencia como en ausencia de HU y que la cantidad de Rad24-GFP que co-precipita junto con Rgf1-GST es similar en ambas condiciones.

Rad24 pertenece a la familia 14-3-3, una familia de proteínas muy conservadas presente en todos los organismos eucariotas estudiados. Normalmente forman dímeros con una estructura en forma de U y se unen a proteínas fosforiladas. Las consecuencias moleculares de esta unión son diversas: puede estabilizar la conformación activa o inactiva de la proteína a la que se unen o provocar un cambio conformacional que conlleve a su

activación o inhibición, su cambio de localización o la exposición/ocultación de sus sitios de unión (Reinhardt y Yaffe, 2013; van Heusden y Steensma, 2006).

En *S. pombe*, Rad24 media la acumulación nuclear de la proteína quinasa Chk1 en presencia de daño en el DNA (Dunaway et al., 2005) mientras que promueve el exporte nuclear de la fosfatasa Cdc25 en estas mismas condiciones (Lopez-Girona et al., 1999; Zeng y Piwnica-Worms, 1999). Ya que Rgf1 muestra un cambio de localización en respuesta a estrés replicativo, analizamos si Rad24 podría ser importante en la regulación de este cambio de localización.

Para ello, tratamos con HU células de la cepa silvestre y de un mutante *rad24Δ* que expresan Rgf1-GFP. En la figura 44 se observa que mientras que la señal de Rgf1-GFP es nuclear en las células de la cepa silvestre, la proteína está claramente excluida del núcleo en el caso de las células de la cepa *rad24Δ*.

Además, la cantidad de Rgf1-GFP analizada por Western blot no varía en la cepa *rad24Δ* con respecto a la cepa silvestre, ni en presencia ni en ausencia de la droga (no mostrado), y la proteína Rgf1-GFP se localiza en los polos de crecimiento

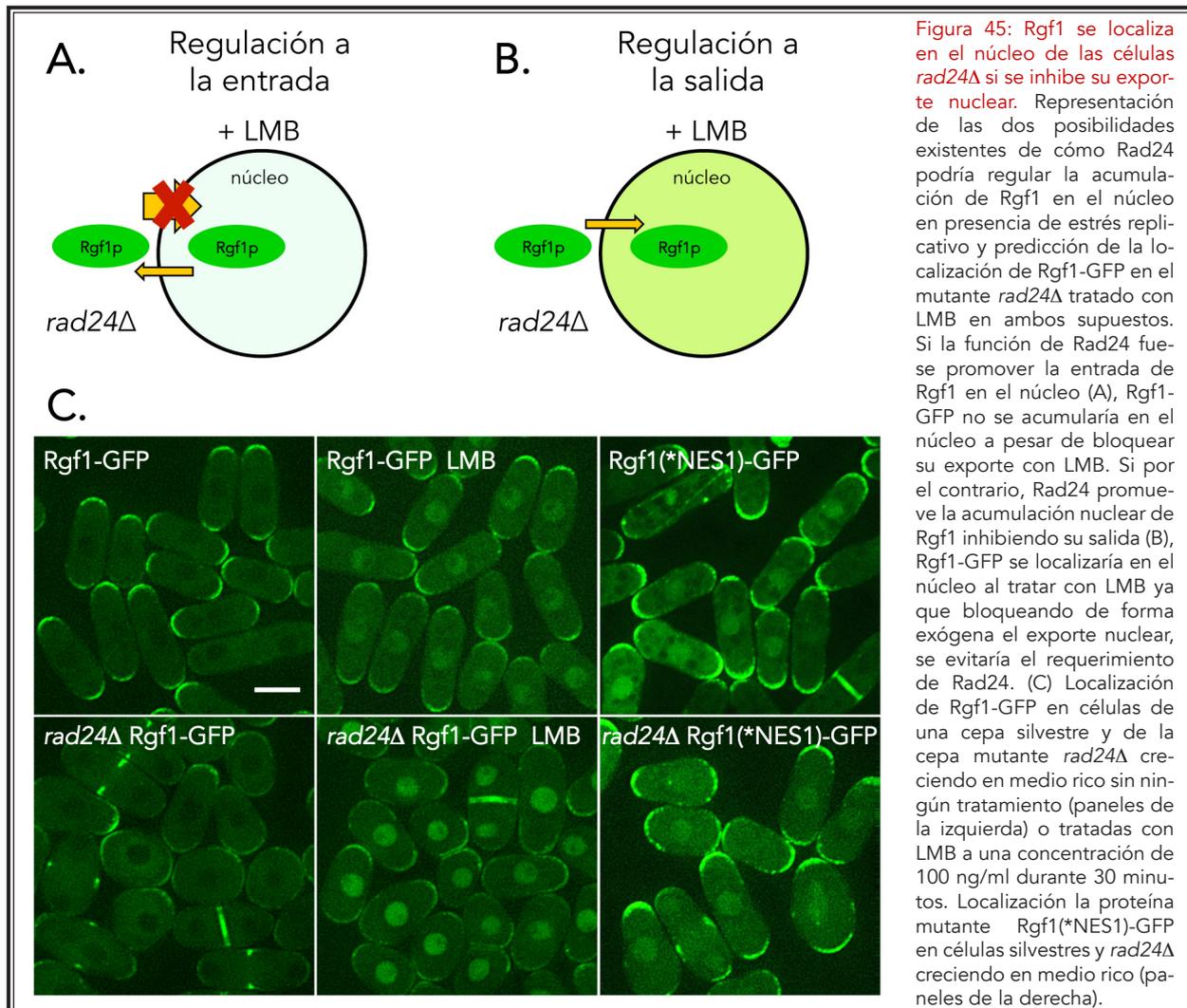
y en el septo de división en células no tratadas (figura 44). Estos resultados sugieren que la localización nuclear de Rgf1 en respuesta a estrés replicativo depende de Rad24.

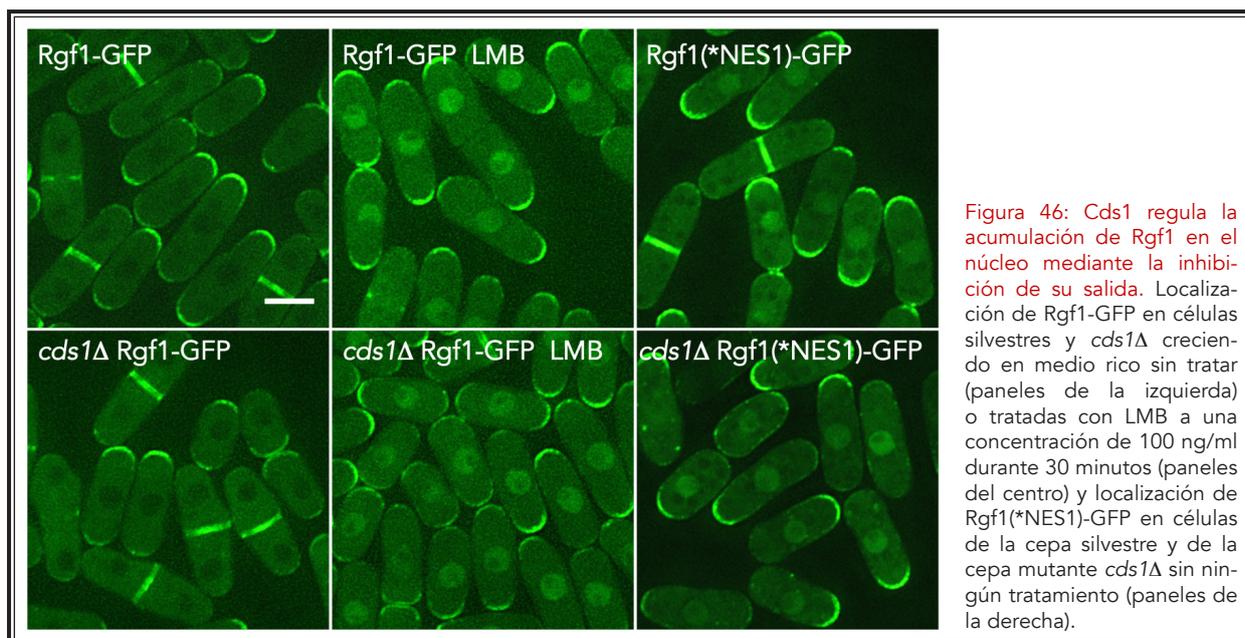
2.8 Rad24 y Cds1 REGULAN LA ACUMULACIÓN DE Rgf1 EN EL NÚCLEO EN RESPUESTA A ESTRÉS REPLICATIVO INHIBIENDO SU SALIDA DEL NÚCLEO

Los experimentos de localización nos indican que la proteína Rad24 participa en la acumulación de Rgf1 en el núcleo pero no cómo lo hace o en qué paso actúa. Existen dos posibilidades que se esquematizan en la figura 45: Rad24 podría facilitar la acumulación de Rgf1 en el núcleo promoviendo su entrada, por ejemplo abriendo

la conformación de Rgf1 para que se exponga su NLS o, alternativamente, podría actuar mediante la inhibición de su salida bloqueando el acceso de Crm1 a los motivos NES.

Para distinguir entre estas dos posibilidades, se analizó la localización de Rgf1-GFP en células de la cepa *rad24Δ* -que es deficiente en la acumulación de Rgf1 en el núcleo en presencia de HU- tratadas con leptomicina B para inhibir el transporte nuclear de forma exógena. El 95% de las células *rad24Δ* tratadas con LMB durante 30 minutos acumulan Rgf1-GFP en el núcleo y este porcentaje es prácticamente idéntico al de la cepa silvestre en las mismas condiciones (figura 45C). También obtuvimos un resultado muy parecido utilizando la mutación Rgf1(*NES1)-GFP en un fondo genéti-





co *rad24Δ*. Aquí, aproximadamente el 55% de las células *rad24Δ* mostraban Rgf1(*NES1)-GFP en el núcleo comparado con el 65% en la cepa silvestre (figura 45C).

Estos datos indican que la entrada de Rgf1-GFP al núcleo es independiente de Rad24 y por tanto sugieren que el mutante *rad24Δ* falla en inhibir el exporte nuclear de Rgf1 en condiciones de bloqueo en replicación.

Tal y como hemos visto para Rad24, intentamos averiguar si Cds1 regulaba la acumulación nuclear de Rgf1 promoviendo su entrada o bloqueando su salida del núcleo. Encontramos que un alto porcentaje de células *cds1Δ* mostraban Rgf1(*NES1)-GFP en el núcleo (figura 46).

Además, en la figura 46 se puede observar que tras un tratamiento con LMB, Rgf1-GFP se localiza en el núcleo en más del 95% de las células del mutante *cds1Δ*. Estos resultados indican que al igual que Rad24, Cds1 regula la acumulación de Rgf1 en el núcleo mediante la inhibición de su salida de este compartimento.

CAPÍTULO 3.

Rgf1 es necesario para la supervivencia en HU y esta función está regulada por fosforilación por Cds1 y posterior unión a Rad24

3.1 LA PRESENCIA DE Rgf1 EN EL NÚCLEO ES ESENCIAL PARA LA SUPERVIVENCIA EN HIDROXIUREA

Para saber si Rgf1 tiene algún papel en la supervivencia frente al estrés replicativo causado por el tratamiento con HU, examinamos la sensibilidad de *rgf1Δ* frente a diferentes concentraciones de HU en ensayos en placa. Como se muestra en la **figura 47**, las células del mutante *rgf1Δ* apenas crecen en placas suplementadas con HU a una concentración de 5 mM mientras que la cepa silvestre es viable.

Además, comparamos la sensibilidad del mutante *rgf1Δ* con los mutantes nulos de las *checkpoint* quinasas *chk1Δ* y *cds1Δ*. De acuerdo con lo descrito en la bibliografía, *cds1Δ* es extremadamente sensible a HU ya que no crece a ninguna de las concentraciones ensayadas mientras que el mutante *chk1Δ* sí es capaz de crecer a 2,5 mM. *rgf1Δ* es menos sensible a HU que *chk1Δ*, ya que crece a 2,5 mM (**figura 47**).

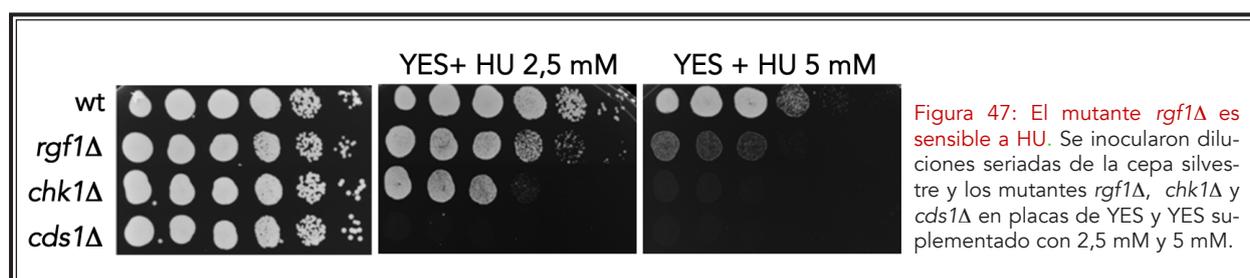
También nos preguntamos si las mutaciones en *rgf1⁺* que presentan un defecto en la acumulación de la proteína en el núcleo en respuesta a HU mostrarían sensibilidad a esta droga. En la **figura 48** se muestra la tolerancia a HU de las distintas cepas con el gen *rgf1⁺* mutado construidas a lo largo de este trabajo. Además se muestra su capacidad para crecer en presencia de caspofungina y las condiciones en las que la proteína mutante

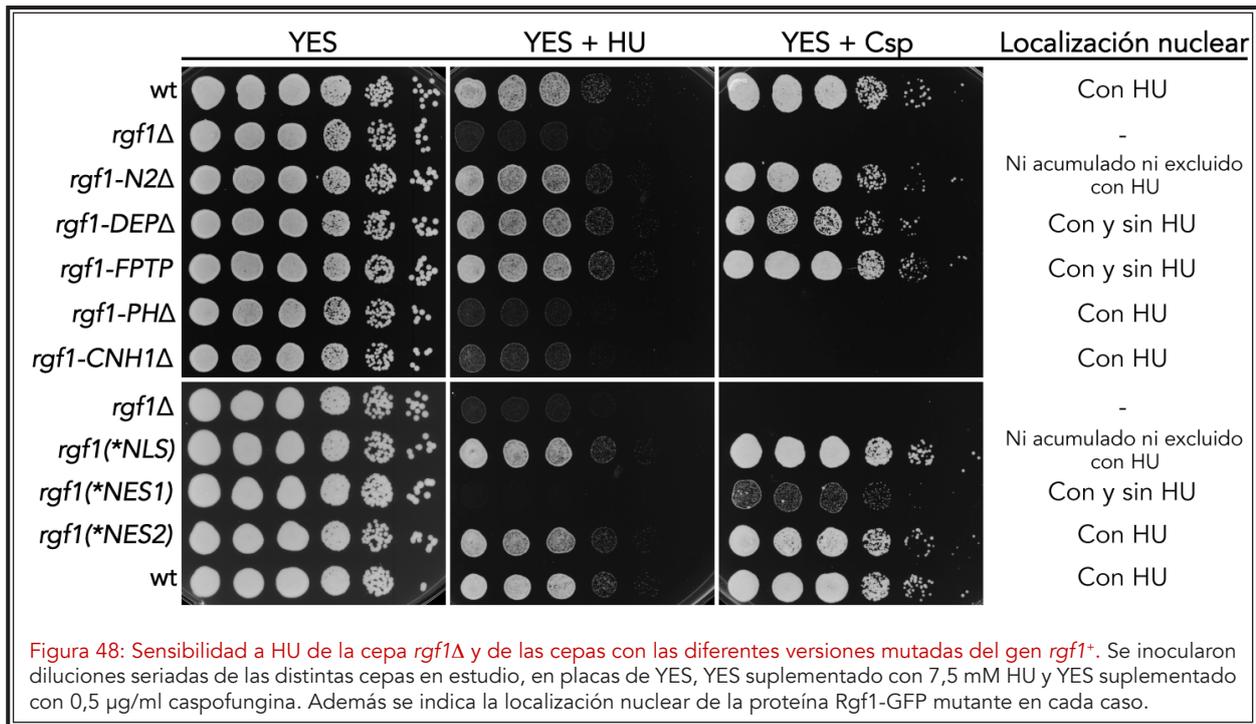
correspondiente (marcada con GFP) se localiza en el núcleo.

Los mutantes *rgf1-N2Δ* y *rgf1(*NLS)* -que mostraban una acumulación reducida de la proteína en el núcleo en presencia de HU- no son sensibles a la droga, mientras que los mutantes *rgf1-PHΔ* y *rgf1-CNH1Δ* -que se comportan como la cepa silvestre respecto a la acumulación nuclear de Rgf1-GFP- sí lo son. Por otro lado, los mutantes *rgf1-DEPΔ* y *rgf1-FPTP* -en los que la proteína se encontraba constitutivamente en el núcleo- no presentan sensibilidad a HU mientras que el mutante *rgf1(*NES1)* -en el que la proteína también se localizaba en el núcleo en ausencia de la droga- es sensible a HU (**figura 48**).

La falta de correlación entre la acumulación de la proteína mutada en el núcleo y la tolerancia a HU en estos mutantes se puede explicar tal y como se expone a continuación. En primer lugar, los mutantes *PHΔ*, *rgf1-CNH1Δ* y *rgf1(*NES1)* que presentan sensibilidad a HU, también presentan sensibilidad a caspofungina, lo que indica que Rgf1 puede tener afectada su actividad catalítica o intercambiadora de nucleótidos y no ser funcional aunque la proteína se localice correctamente en el núcleo. Además, tal y como veremos posteriormente, un mutante en el dominio catalítico también es sensible a HU.

En segundo lugar, en los mutantes *rgf1-N2Δ* y *rgf1(*NLS)*, aunque son deficientes en la acumu-

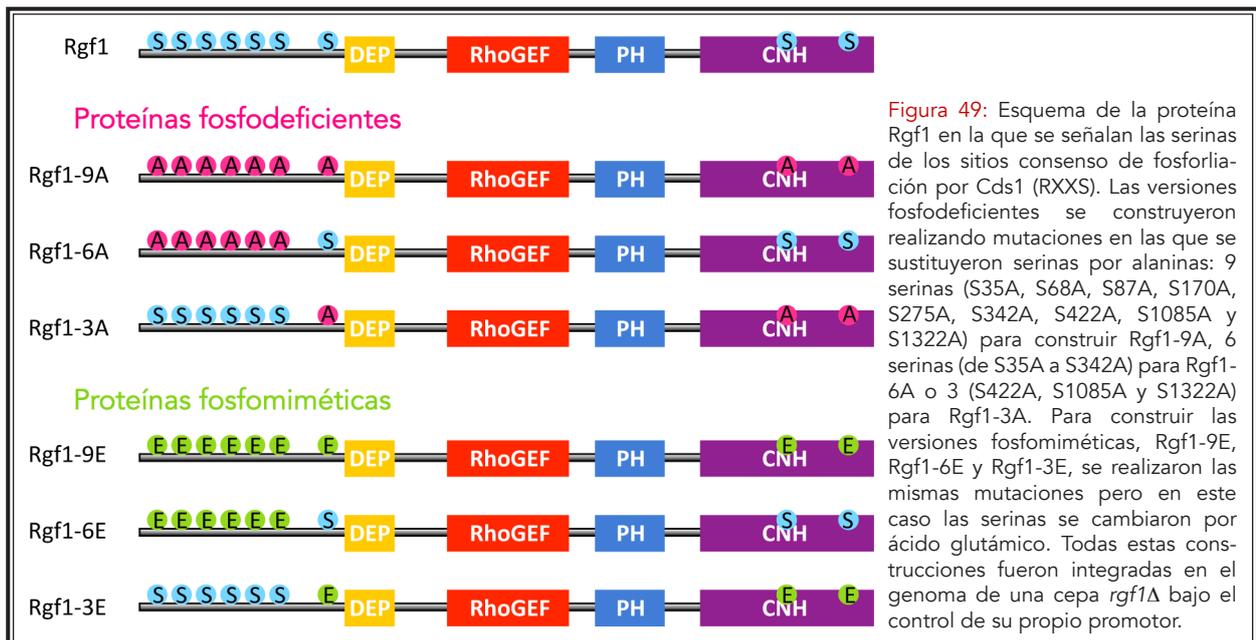




lación nuclear de Rgf1-GFP, la proteína no está completamente excluida del núcleo en presencia de HU. Esta pequeña cantidad de proteína presente en el núcleo -que es catalíticamente activa ya que estos mutantes no son sensibles a caspofungina- podría ser suficiente para conferir tolerancia a la droga. Aun así, la prueba más convincente en este sentido la obtuvimos con un mutante fosfo-deficiente, Rgf1-9A-GFP, cuyas características se describen en el apartado siguiente.

3.2 LA FOSFORILACIÓN DE Rgf1 ES NECESARIA PARA SU ACUMULACIÓN EN EL NÚCLEO EN PRESENCIA DE HU

Hemos demostrado que Rgf1 interacciona físicamente con la proteína Rad24 y también con la quinasa efectora del *checkpoint* de bloqueo en replicación Cds1 y que ambas proteínas regulan la acumulación de Rgf1 mediante la inhibición su exporte nuclear. Estas evidencias sugieren que Rgf1

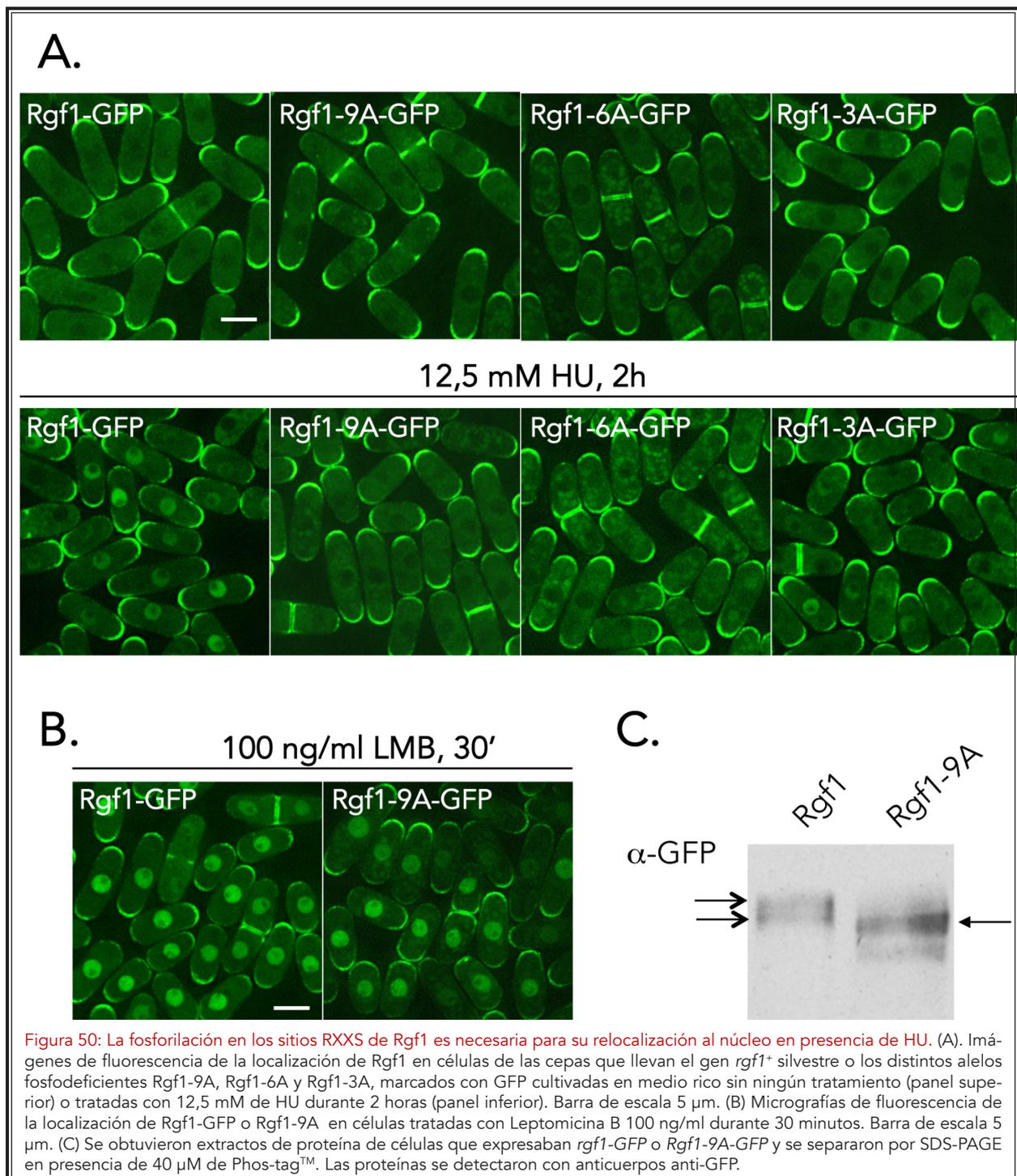


podría ser un efector de Cds1/Rad24.

Rgf1 contiene 9 motivos RXXS descritos como sitios consenso de fosforilación por Cds1 (dónde la S es fosforilada y X representa cualquier aminoácido) (Diaz-Cuervo y Bueno, 2008; O'Neill et al., 2002). Además, estos motivos en su forma fosforilada son reconocidos por las proteínas 14-3-3 (Reinhardt y Yaffe, 2013; Yaffe, 2002). Al menos 3

de estos sitios de Rgf1 están fosforilados *in vivo* ya que han sido identificados por espectrometría de masas (Gupta et al., 2013).

Para estudiar el papel que tienen estos posibles sitios de fosforilación en la localización de Rgf1 en el núcleo en condiciones de bloqueo en replicación, decidimos mutar los residuos de serina de estos motivos por alaninas para construir



RESULTADOS

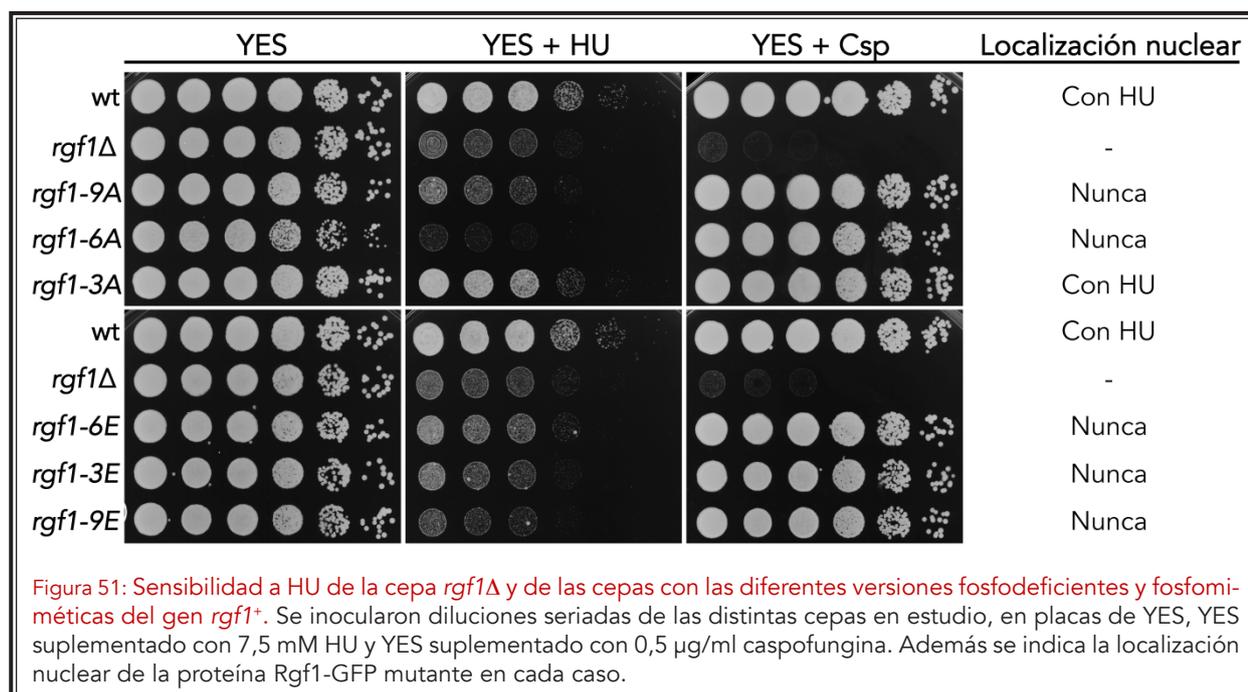
una proteína fosfodeficiente, Rgf1-9A-GFP, o por glutámico para obtener la versión fosfomimética de Rgf1-GFP, Rgf1-9E-GFP. En pasos intermedios de la construcción de los alelos *rgf1-9A-GFP* y *rgf1-9E-GFP* obtuvimos también otras cuatro versiones, 2 fosfodeficientes y 2 fosfomiméticas de Rgf1-GFP: Rgf1-6A-GFP, Rgf1-3A-GFP, Rgf1-6E-GFP y Rgf1-3E-GFP. Todas ellas están representadas en la [figura 49](#).

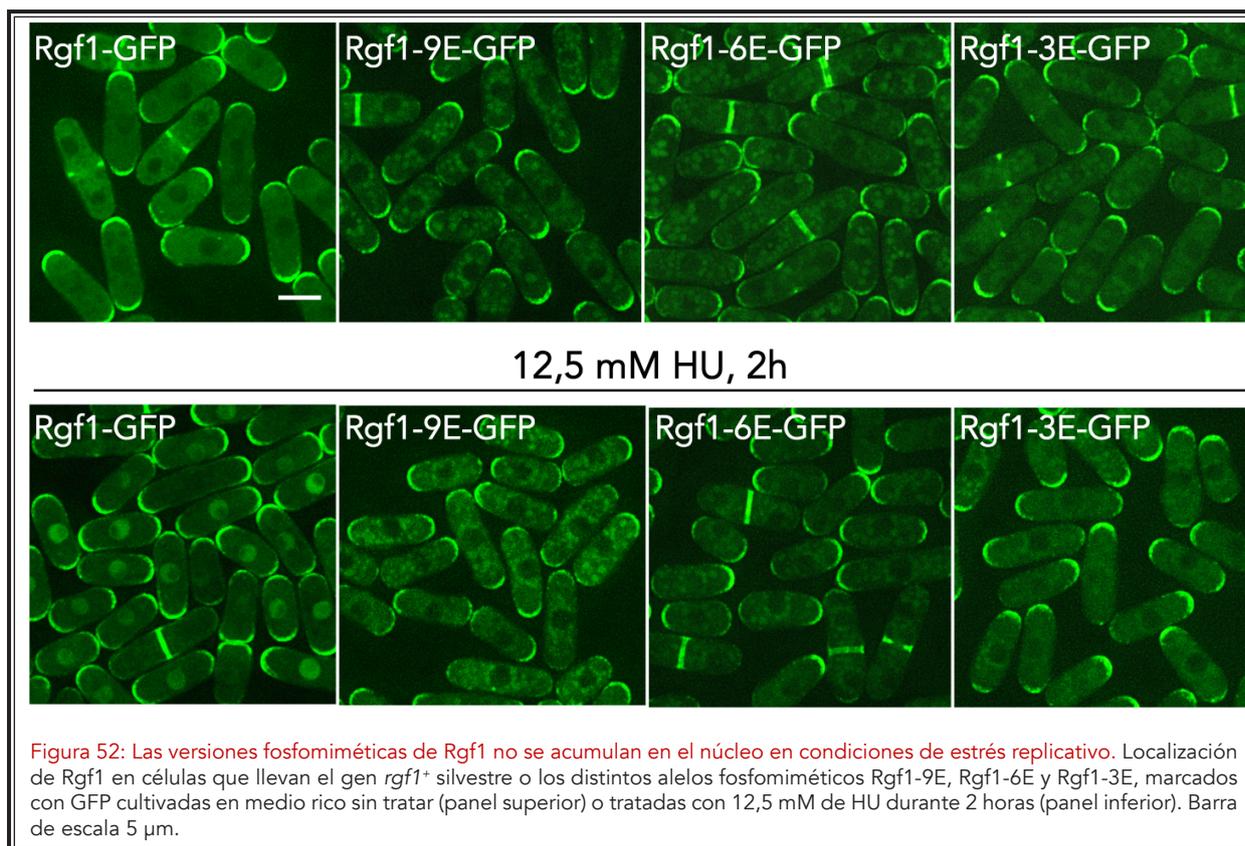
A continuación analizamos la migración de Rgf1-9A-GFP y Rgf1-GFP en geles con Phos-tag™, un compuesto con afinidad por moléculas con carga negativa que permite una mayor resolución de bandas de fosforilación en geles de poliacrilamida. Como se muestra en la [figura 50C](#), en este tipo de geles se resuelven especies de Rgf1-GFP con migración electroforética más lenta, lo que podría indicar que Rgf1 es una fosfoproteína. Estas especies de migración más lenta no se observan en la proteína mutante Rgf1-9A-GFP, lo que confirma que mutando los 9 sitios RXXS de Rgf1 se elimina gran parte de su fosforilación y por tanto que Rgf1-9A-GFP es ciertamente una proteína fosfodeficiente.

La proteína Rgf1-9A-GFP, a diferencia de la proteína Rgf1-GFP silvestre, no se acumula en el núcleo en presencia de HU ([figura 50A](#)). Solamente el tratamiento con LMB promueve la retención de Rgf1-9A-GFP en el núcleo ([figura 50B](#)), lo que sugiere que la fosforilación en los sitios consenso de fosforilación por Cds1 regula la acumulación nuclear de Rgf1 por inhibición de su salida del núcleo.

En esta regulación parecen ser más importantes los motivos RXXS de la región N'-terminal, ya que la proteína Rgf1-6A-GFP, en la que estos sitios de fosforilación no están presentes, no es retenida en el núcleo en presencia de estrés replicativo mientras que la versión mutante de Rgf1-GFP en la que se eliminan los 2 sitios RXXS de la región C'-terminal y el último sitio RXXS del extremo N'-terminal, Rgf1-3A-GFP, se localiza en el núcleo en estas condiciones al igual que lo hace la cepa silvestre ([figura 50A](#)).

Para estudiar el papel de estos sitios de fosforilación en la función de Rgf1, analizamos el comportamiento de los mutantes fosfodeficientes



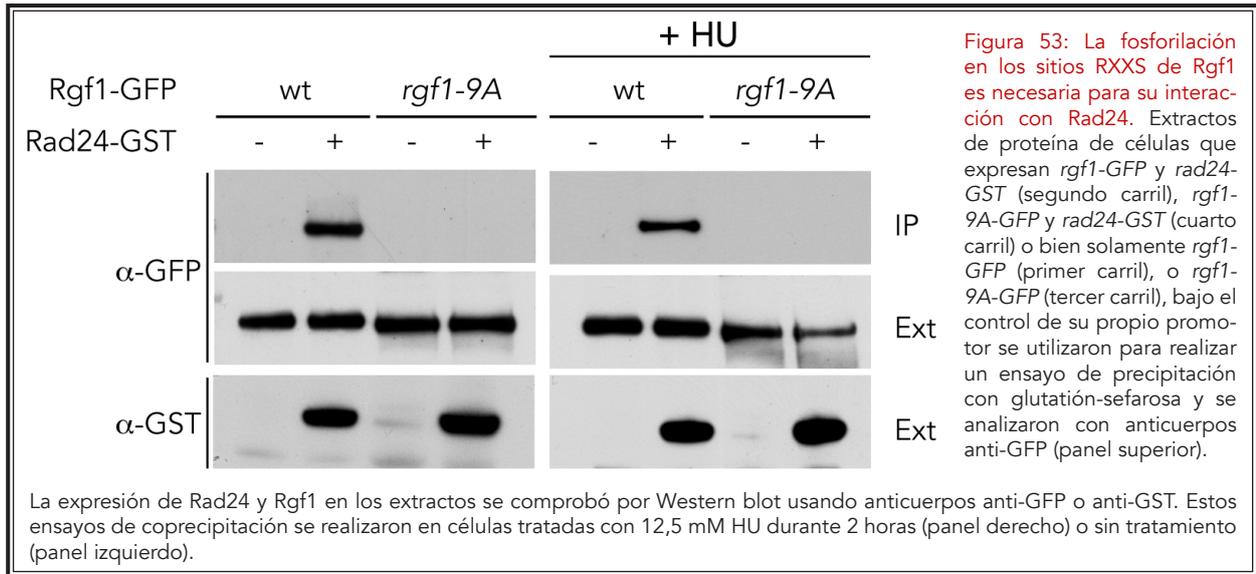


en placas de HU y de Csp. Los mutantes *rgf1-9A* y *rgf1-6A* son sensibles a HU pero se comportan como la cepa silvestre en placas suplementadas con Csp (figura 51). Además, observando las células de estos mutantes teñidas con calcoflúor, encontramos que se comportan de forma idéntica a las de la cepa silvestre con respecto al crecimiento bipolar, tanto en presencia como en ausencia de HU (no mostrado).

Estos resultados sugieren que un fallo en la regulación de la acumulación de Rgf1 en el núcleo mediante fosforilación (probablemente por parte de Cds1) causa un defecto grave en la supervivencia de las células en presencia de HU y que Rgf1 podría formar parte del mecanismo por el cual Cds1 promueve la supervivencia en condiciones de estrés replicativo. Sin embargo, parece que las funciones de Rgf1 en integridad celular y en polaridad son independientes de esta regulación por fosforilación.

Por su parte, todos los mutantes fosfomiméticos (*rgf1-9E*, *rgf1-6E* y *rgf1-3E*) son sensibles a HU y no lo son a Csp (figura 51) y al contrario de lo que esperábamos, ninguna de las proteínas fosfomiméticas se acumula en el núcleo en presencia de HU (figura 52). Podría ocurrir que el cambio de serina por glutámico no esté mimetizando una fosforilación sino que, por el contrario, lo que hace es impedir que la serina se fosforile y que, por tanto, Rgf1-9E-GFP, Rgf1-6E-GFP y Rgf1-3E-GFP se comporten también como proteínas fosfodeficientes.

En este sentido, también podría ocurrir que Rgf1 esté sometida a rondas de fosforilación y desfosforilación consecutivas y bloquear la dinámica de cualquiera de los dos procesos produzca un efecto similar.

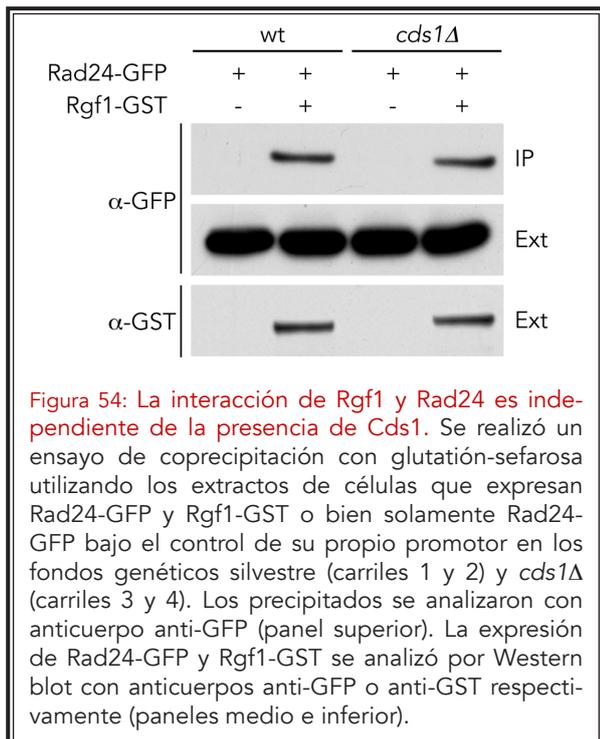


3.3 LA FOSFORILACIÓN DE Rgf1 ES NECESARIA PARA SU UNIÓN A Rad24

En base a los resultados obtenidos, nuestra hipótesis es que Cds1 en su estado activo podría fosforilar a Rgf1 y dicha fosforilación podría condicionar su interacción con Rad24 y su acumulación en el núcleo. Algo parecido se ha descrito para Cdc25, en este caso su fosforilación por Chk1 en respuesta a daño en el DNA crea sitios de unión a Rad24 favoreciendo su salida del núcleo (Lopez-

Girona et al., 1999; Zeng y Piwnica-Worms, 1999).

Para verificar esta hipótesis, analizamos la capacidad de la proteína Rgf1-9A-GFP endógena para unirse a Rad24-GFP expresada también bajo el control de su propio promotor en un ensayo de coprecipitación. La proteína mutada Rgf1-9A-GFP procedente tanto de células sin tratar como de células tratadas con HU no fue detectada en los precipitados con Rad24-GST, mientras que en condiciones idénticas Rgf1-GFP sí aparecía unida Rad24-GST (figura 53).



Este experimento sugiere que solamente una forma fosforilada de Rgf1 es capaz de unirse a Rad24 y que esta interacción es importante para la retención de la proteína en el núcleo en respuesta al *checkpoint* de bloqueo en replicación.

Sin embargo, no hemos encontrado diferencias de migración de Rgf1-GFP proveniente de extractos de células tratadas con HU o sin tratar, ni de células silvestres o *cds1Δ* en geles de Phos-tag™ (no mostrado). Además, la interacción de Rgf1 y Rad24 es independiente de la presencia de la proteína Cds1, ya que ambas proteínas coprecipitan en células con fondo genético silvestre o *cds1Δ* (fi-

gura 54). Estos datos indican que Rgf1 podría ser fosforilado en sus motivos RXXS por otras quinasas distintas de Cds1 en diferentes localizaciones celulares y momentos del ciclo celular activando sitios de unión a Rad24.

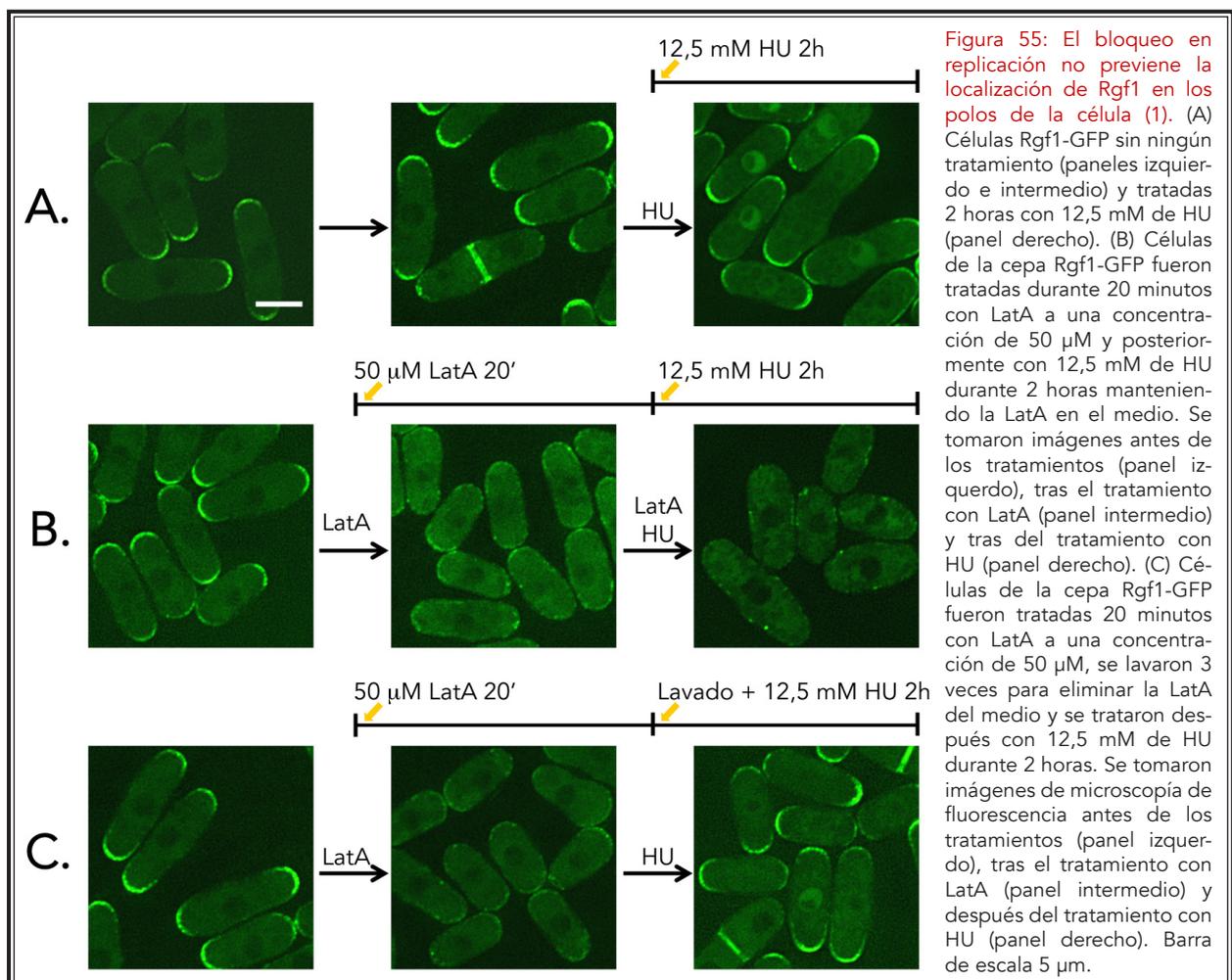
3.4 EL TRANSPORTE DE Rgf1 A LOS POLOS NO ESTÁ BLOQUEADO EN PRESENCIA DE ESTRÉS REPLICATIVO

La mayoría de los GEFs se localizan en el citoplasma o en la membrana plasmática y sólo unos pocos presentan una localización nuclear. En el caso de estos últimos, la localización en el núcleo en muchos casos parece servir como un reservorio dónde el GEF permanece inactivo y separado de la GTPasa, como es el caso de la proteína GEF Cdc24 en *S. cerevisiae*. Cdc24 perma-

nece secuestrada en el núcleo de forma basal para mantener a la GTPasa Cdc42 inactiva y es liberada al citoplasma durante el crecimiento apical de la yema y en respuesta a feromonas, situaciones que requieren la actividad de Cdc42 para la polarización del citoesqueleto de actina (Nern y Arkowitz, 2000; Shimada *et al.*, 2000).

Por este motivo, decidimos investigar si la localización de Rgf1 en el núcleo durante el bloqueo en replicación tendría el propósito de secuestrar a la proteína y disminuir su concentración en los polos, para evitar la activación Rho1 y por tanto ralentizar el crecimiento polarizado.

La localización de Rgf1 en los polos de la célula depende del citoesqueleto de actina (P. García, resultados no publicados); si se tratan las



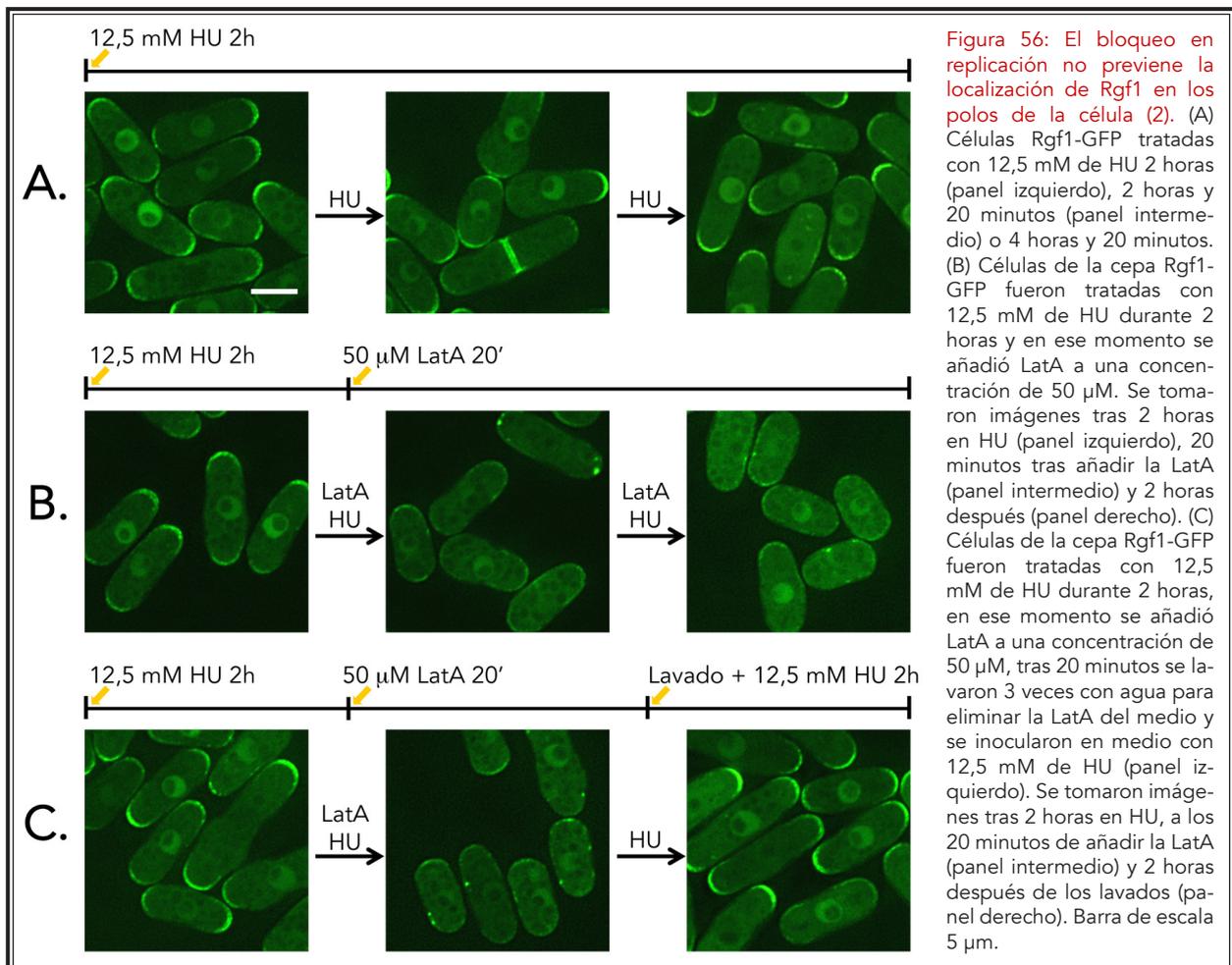
RESULTADOS

células con Latrunculina A (LatA), un agente que despolimeriza los filamentos de actina (Spector et al., 1989), Rgf1-GFP desaparece casi totalmente de los polos. Utilizando esta herramienta, decidimos analizar si Rgf1-GFP era o no transportado activamente a los polos en presencia de HU. En la [figura 55C](#) se muestra la localización de Rgf1-GFP después de eliminar la proteína de los polos mediante un tratamiento de 20 minutos con 50 μ M LatA. Si a continuación eliminamos la LatA del medio y tratamos estas células 2 horas con 12,5 mM HU, Rgf1-GFP se localiza de nuevo en los polos, lo que sugiere que el transporte de Rgf1-GFP a los extremos de la célula no está inhibido durante un bloqueo en replicación.

Sabemos que la acumulación de Rgf1 en el núcleo tras añadir HU requiere al menos 45 minutos desde la adición de la droga ([figura 35A](#)), y

es posible que sea durante este tiempo cuando Rgf1-GFP recupera su localización en los polos. Para descartar esta posibilidad, realizamos un ensayo similar pero en el que se mantiene la HU en el medio durante todo el experimento. Para ello, células que expresaban Rgf1-GFP fueron tratadas con 12,5 mM HU durante 2 horas y posteriormente tratadas con 50 μ M LatA durante 20 minutos para retirar la proteína Rgf1-GFP de los polos celulares ([figura 56C](#)). Una vez retirada la LatA del medio mediante lavados, se incubaron las células en medio fresco suplementado con 12,5 mM HU durante 2 horas más. Como se muestra en la [figura 56C](#), Rgf1-GFP se localiza en los polos en estas condiciones, lo que confirma que el tratamiento con HU no inhibe la localización cortical de Rgf1-GFP.

En estos experimentos también hemos descubierto que la localización de Rgf1-GFP en el

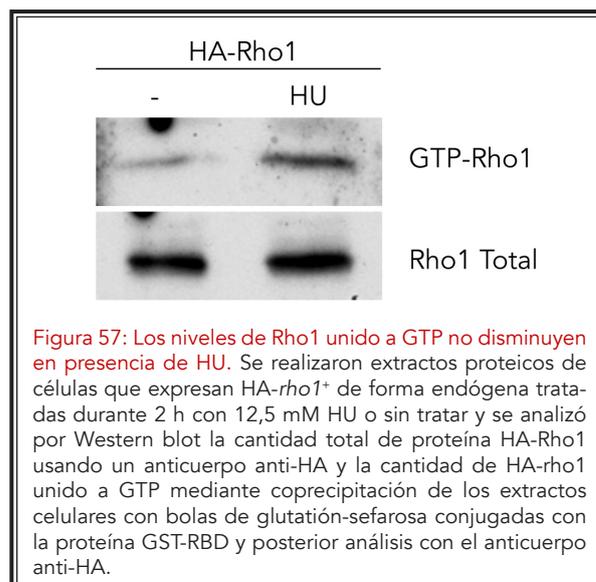


núcleo en respuesta a la HU requiere la presencia de actina polimerizada ya que, como se muestra en la **figura 55B**, si una vez eliminada la proteína de los polos con LatA, mantenemos la LatA a la vez que añadimos HU, Rgf1-GFP no es retenida en el núcleo ni se localiza en los polos. Sin embargo, si Rgf1 se encuentra en el núcleo (como consecuencia del tratamiento con HU) en el momento de despolimerizar la actina, mantiene esta localización nuclear incluso 2 horas después de haber añadido LatA y en presencia de HU (**figuras 56B**).

En conjunto, estos experimentos demuestran que la acumulación en el núcleo de Rgf1 en presencia de estrés replicativo aparentemente no tiene por objetivo impedir su transporte a los polos.

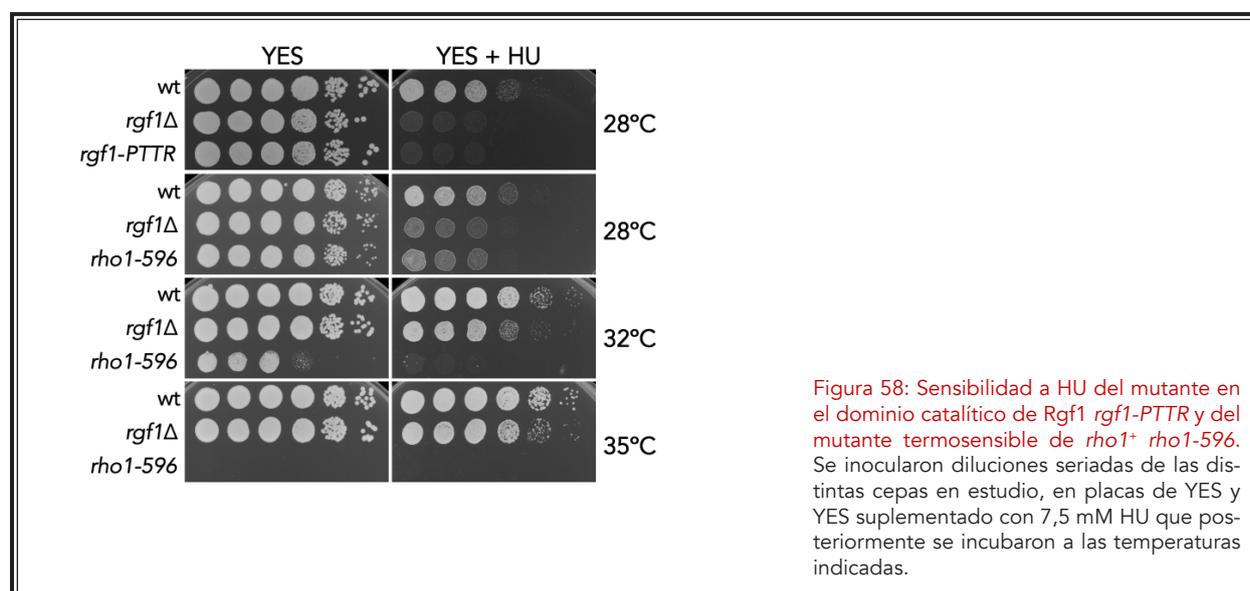
3.5 LA FUNCIÓN DE Rgf1 EN EL NÚCLEO DEPENDE DE SU ACTIVIDAD GEF.

Otra manera de comprobar si el propósito de la acumulación de Rgf1 en núcleo es evitar la activación de Rho1 en los polos, es analizar la cantidad de Rho1 activa en presencia de HU. Para ello, realizamos un experimento de precipitación de Rho1-GTP con bolitas de glutatión-sefarosa



unidas a GST-RBD (*RhoA Binding Domain*), el dominio de unión a RhoA de la proteína rhoteguina marcado con GST (Reid *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1996). Este péptido sólo se une a las proteínas Rho cuando se encuentran asociadas a GTP por lo que precipitando las bolas de sefarosa, precipitamos la fracción celular de Rho1 que está unida a GTP. Como se muestra en la **figura 57**, la cantidad de Rho1 activa es muy parecida en los extractos de células tratadas con HU y sin tratar, incluso parece que aumenta ligeramente.

También analizamos si la tolerancia a HU que confiere Rgf1 depende de su actividad GEF



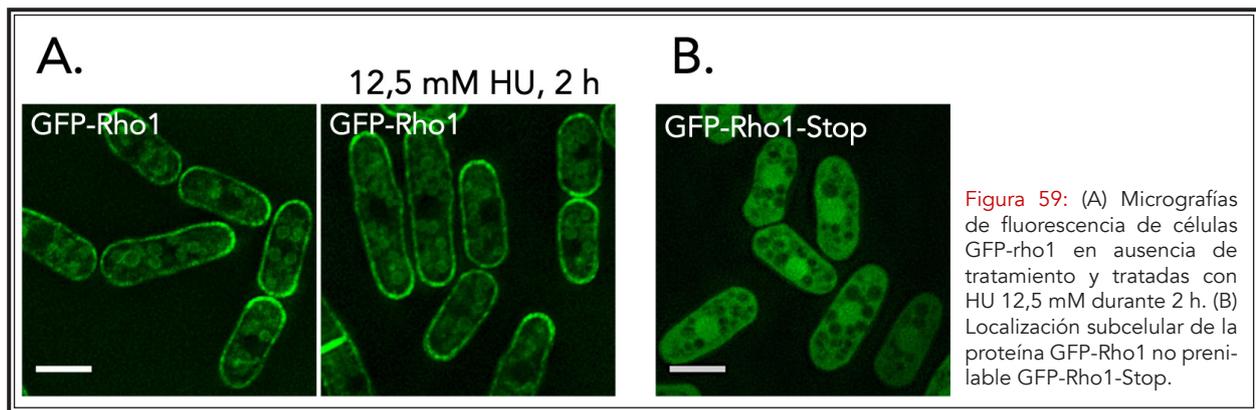


Figura 59: (A) Micrografías de fluorescencia de células GFP-rho1 en ausencia de tratamiento y tratadas con HU 12,5 mM durante 2 h. (B) Localización subcelular de la proteína GFP-Rho1 no prenilada GFP-Rho1-Stop.

hacia Rho1. El mutante *rgf1-PTTR*, con una delección de 4 aa en el dominio catalítico y con un defecto importante en la actividad GEF hacia Rho1 (García et al., 2009a), es sensible a HU (figura 58) y defectivo en la acumulación nuclear de la proteína en presencia de la droga (no mostrado). Además, la cepa *rho1-596* que porta un alelo hipomórfico de la GTPasa Rho1 y es termosensible (Viana et al., 2013), también es sensible a HU. Los resultados de este experimento se muestran en la figura 58, donde se puede observar que la cepa *rho1-596* crece en placas de YES a temperaturas permisivas (28°C y 32°C) pero no lo hace en las mismas condiciones en placas de YES suplementadas con HU.

En conjunto, todos estos datos demuestran que tanto Rgf1 como Rho1 juegan un papel activo en presencia de estrés replicativo.

Finalmente nos preguntamos si, como ocurre con Rgf1, Rho1 se acumula en el núcleo en condiciones de estrés replicativo. En la figura 59A se observa que la proteína Rho1 marcada con GFP e integrada en el genoma no se acumula en el núcleo tras un tratamiento de HU durante 2 horas, ni tampoco a tiempos mayores en presencia de la droga (no mostrado).

La proteína GFP-Rho1 que usamos no es totalmente funcional puesto que hay que integrarla en presencia de la copia silvestre de *rho1+* para

que la célula sea viable. Por esta razón, es posible que sea inestable durante el estrés replicativo o que la proteína sin marcar compita con la silvestre y por eso no la vemos acumulada en núcleo.

Las GTPasas de la familia Rho llevan un grupo isoprenoide en su extremo C'-terminal que les permite asociarse a las membranas celulares (Wennerberg et al., 2005). Nosotros eliminamos la posibilidad de que GFP-Rho1 sea prenilada introduciendo un codón de parada en el gen *rho1+* inmediatamente antes de su secuencia de prenilación ²⁰²CILL²⁰⁵ (GFP-Rho1-Stop). Mientras que GFP-Rho1 se localiza en la membrana plasmática y en las membranas internas (figura 59A), la proteína GFP-Rho1-Stop se localiza en el citoplasma y, de forma más intensa, en el núcleo (figura 59B). Este resultado nos permite señalar que existe la posibilidad de que una pequeña fracción de Rho1 que no sea prenilada se pueda localizar en el núcleo y ser activada por Rgf1 para promover tolerancia al estrés replicativo crónico.

CAPÍTULO 4.

Rgf1 es necesaria para la correcta recuperación tras un bloqueo en replicación

4.1 SENSIBILIDAD DEL MUTANTE *rgf1Δ* A OTROS AGENTES QUE CAUSAN DAÑO EN EL DNA Y PARADAS DEL CICLO CELULAR

Las células que carecen de Rgf1 son sensibles a HU, esta droga interfiere con la progresión de la fase S debido a una fuerte disminución de la cantidad de dNTPs. Nos preguntamos si Rgf1 podría estar implicada en promover la supervivencia celular tras el tratamiento con otros agentes causantes de lesiones en el DNA.

La radiación ultravioleta causa la formación de dímeros de ciclobutano en el DNA mientras que el metil metano sulfonato (MMS) provoca la alquilación de las bases nitrogenadas. Durante la replicación, estas modificaciones en el DNA constituyen obstáculos en la cadena molde para las helicasas y las DNA polimerasas. Por su parte, la camptotecina (Cpt) atrapa a la topoisomerasa I dejando una rotura de cadena simple en el DNA que causa el colapso de las horquillas de replicación cuando estas chocan con el complejo Cpt-topoisomerasa I. En la **figura 60** se muestra que las células *rgf1Δ* crecen de forma similar a la cepa silvestre en presencia de MMS y tras ser irradiadas con UV pero son muy sensibles a Cpt 7,5 μM.

También nos preguntamos si las células *rgf1Δ* son más sensibles a un bloqueo en la fase S del ciclo celular o muestran algún tipo de interacción con mutantes termosensibles bloqueados en otras fases del ciclo. Para ello analizamos el crecimiento a diferentes temperaturas de los mutantes dobles *cdc10-129 rgf1Δ*, *cdc22-M45 rgf1Δ*, *cdc17-M75 rgf1Δ* y *cdc25-22 rgf1Δ* comparados con los mutantes simples *cdc10-129*, *cdc22-M45*, *cdc17-M75* y *cdc25-22*.

En la **figura 61** se puede observar que la delección del gen *rgf1+* no tiene ningún efecto en células bloqueadas en G₁ o en G₂ ya que los mutantes *cdc10-129 rgf1Δ* y *cdc25-22 rgf1Δ* crecen en el mismo rango de temperaturas que los mutantes simples *cdc10-129* y *cdc25-22* respectivamente. Sin embargo, las células *cdc22-M45* crecen a 32°C mientras que las células *cdc22-M45 rgf1Δ* no crecen a esta temperatura, lo que indica de nuevo que Rgf1 es esencial cuando la replicación está bloqueada, pero en este caso por una mutación en el gen que codifica la enzima ribonucleótido reductasa.

La delección de *rgf1+* también presenta cierta interacción con el mutante *cdc17-M75*; esta diferencia podría reflejar un papel más importante de

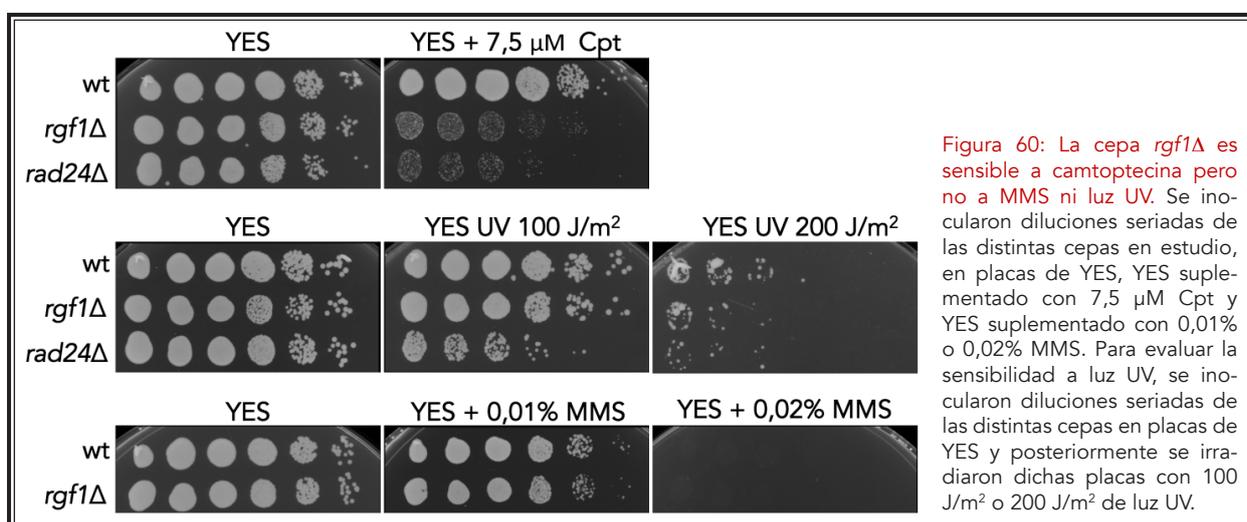
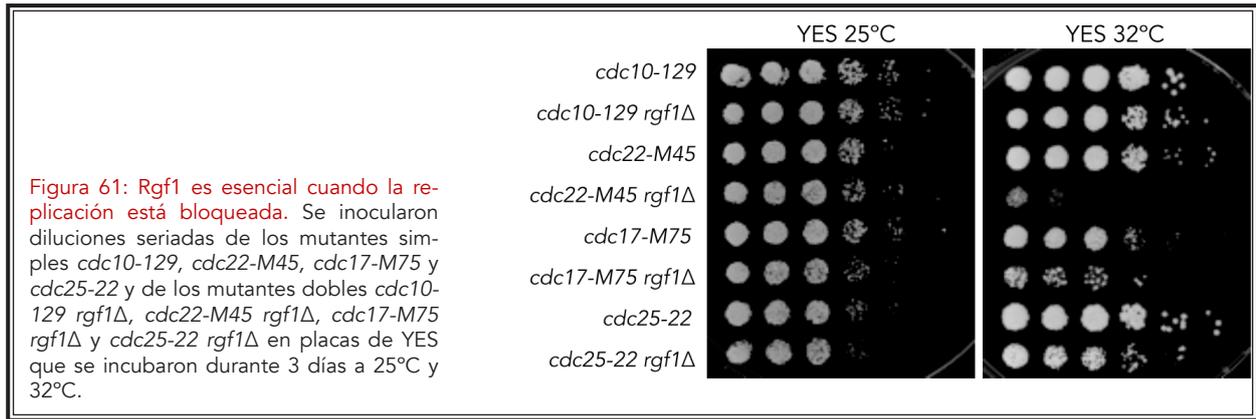


Figura 60: La cepa *rgf1Δ* es sensible a camptotecina pero no a MMS ni luz UV. Se inocularon diluciones seriadas de las distintas cepas en estudio, en placas de YES, YES suplementado con 7,5 μM Cpt y YES suplementado con 0,01% o 0,02% MMS. Para evaluar la sensibilidad a luz UV, se inocularon diluciones seriadas de las distintas cepas en placas de YES y posteriormente se irradiaron dichas placas con 100 J/m² o 200 J/m² de luz UV.



Rgf1 en fase S temprana que en fase S tardía.

4.2 LAS CÉLULAS DEL MUTANTE *rgf1Δ* MUESTRAN UN RETRASO EN LA RECUPERACIÓN TRAS UN BLOQUEO EN REPLICACIÓN

Como hemos visto anteriormente, las células *rgf1Δ* son sensibles al tratamiento con HU en placa (Figura 47). Nos preguntamos si Rgf1 tiene también un papel en la supervivencia a tiempos cortos y altas dosis de la droga, como es el caso de *cds1Δ*, que es muy sensible a HU en estas condiciones (Lindsay et al., 1998). Para ello tratamos células de la cepa silvestre y de los mutantes *rgf1Δ* y *cds1Δ* creciendo en fase logarítmica con 12,5 mM HU y, a diferentes tiempos (0, 2, 4, 6 y 8 horas) se inocularon en placas sin HU para analizar su viabilidad.

La supervivencia del mutante *rgf1Δ* es casi idéntica a la de la estirpe silvestre, mientras que las células *cds1Δ* pierden viabilidad rápidamente y no sobrevive más del 0,5% después de 6 horas de tratamiento (figura 62). Este resultado sugiere que la sensibilidad del mutante *rgf1Δ* a HU está relacionado con una exposición crónica a la droga, una situación donde las células tienen que pasar por varios ciclos de replicación en presencia de HU.

Para estudiar este proceso con más detalle,

a continuación analizamos la progresión del ciclo celular en presencia de la droga en el mutante *rgf1Δ* y en la cepa silvestre. Ambas cepas fueron tratadas con HU y se tomaron muestras cada 2 horas en las que se analizó el contenido en DNA mediante FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*), la morfología de las células y el porcentaje de células con septo durante un periodo de 8 horas. Las células de la cepa silvestre y del mutante *rgf1Δ* se alargan y se paran con un contenido de DNA de 1C tras 4 horas de tratamiento y aparentemente son capaces de completar la replicación después de 8 horas en HU (figuras 63A y 63C).

Sin embargo, vimos algunas diferencias entre ambas cepas. Por ejemplo, el índice de septación disminuye antes en la cepa *rgf1Δ* que en la cepa silvestre y permanece bajo incluso después de 6 horas de tratamiento con HU (figura 63D).

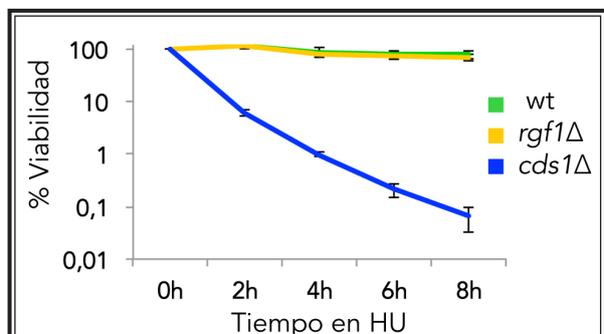
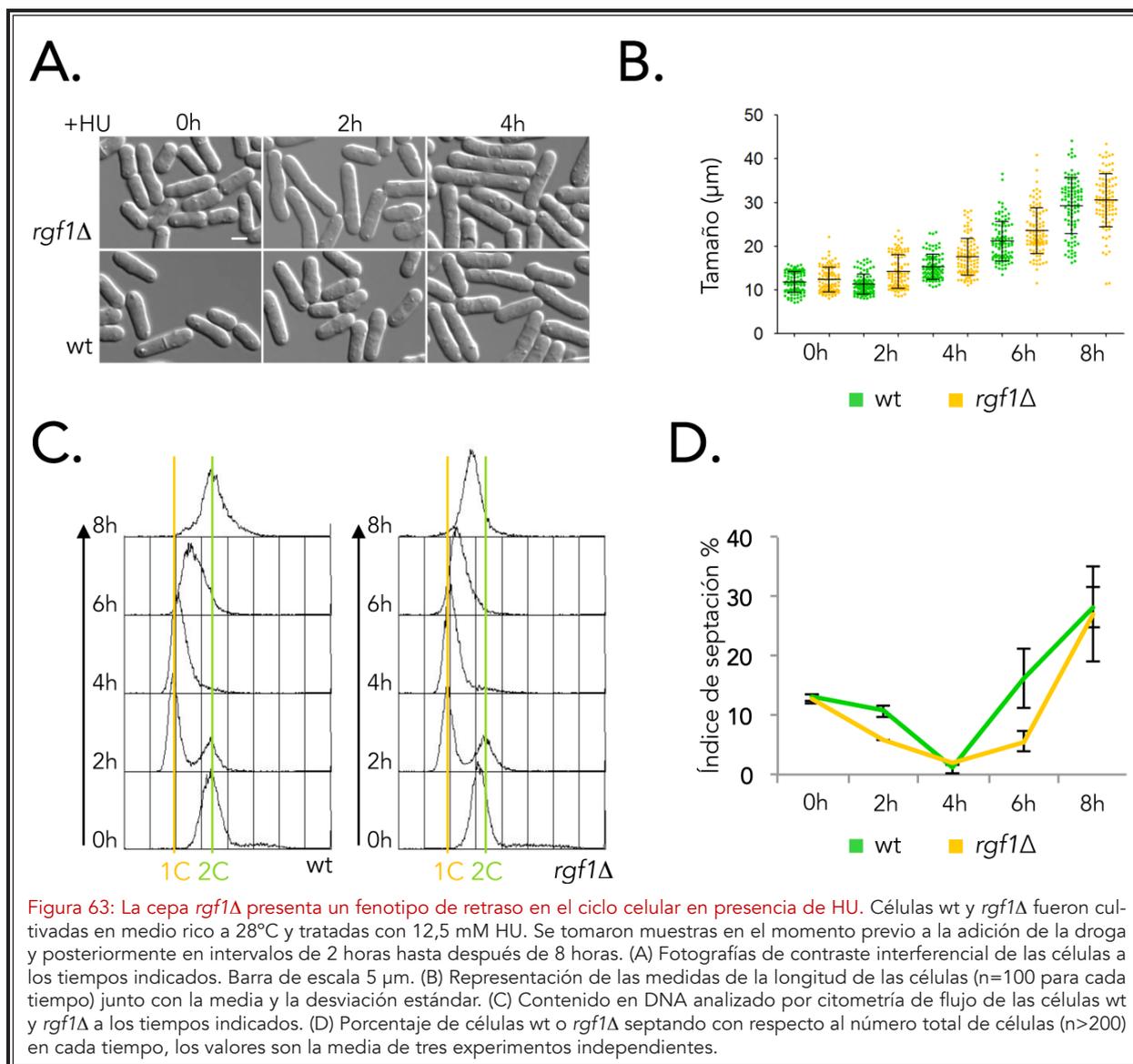


Figura 62: La cepa mutante *rgf1Δ* no pierde viabilidad tras un tratamiento con HU. Células de las cepas wt, *rgf1Δ* y *cds1Δ* cultivadas en medio rico a 28°C hasta alcanzar fase logarítmica fueron tratadas con 12,5 mM HU. Se determinó la viabilidad a los tiempos indicados mediante el análisis de la formación de colonias en placas de YES tras 3 días a 28°C. Los valores son la media de dos experimentos.



Además, las células *rgf1Δ* son más largas que las células de la cepa silvestre durante todo el tratamiento con HU como se muestra en las figuras 63A y 63B.

Estos resultados indican que las células del mutante *rgf1Δ* son competentes en la activación del *checkpoint* pero se recuperan de la parada en replicación de una forma más lenta que la cepa silvestre.

Si un retraso similar ocurriese cada ciclo celular durante un periodo de crecimiento de 3-4 días, las diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *rgf1Δ* aumentarían y podrían ser la causa del

fenotipo observado en la cepa *rgf1Δ* en placas con HU. En la figura 64 se muestra la morfología de las células *rgf1Δ* y wt *in vivo* después de 16 horas de crecimiento en placas de YES suplementadas con HU. Las células *rgf1Δ* son muy largas y hay pocas células con septo comparadas con las de la célula silvestre.

También analizamos la progresión del ciclo celular durante la recuperación tras una parada en la replicación. Para ello, las células del mutante *rgf1Δ* y de la cepa silvestre se bloquearon durante 3 horas con HU, se liberaron en medio fresco sin la droga y se tomaron muestras en los tiempos indicados en el esquema de la figura 65A. En las

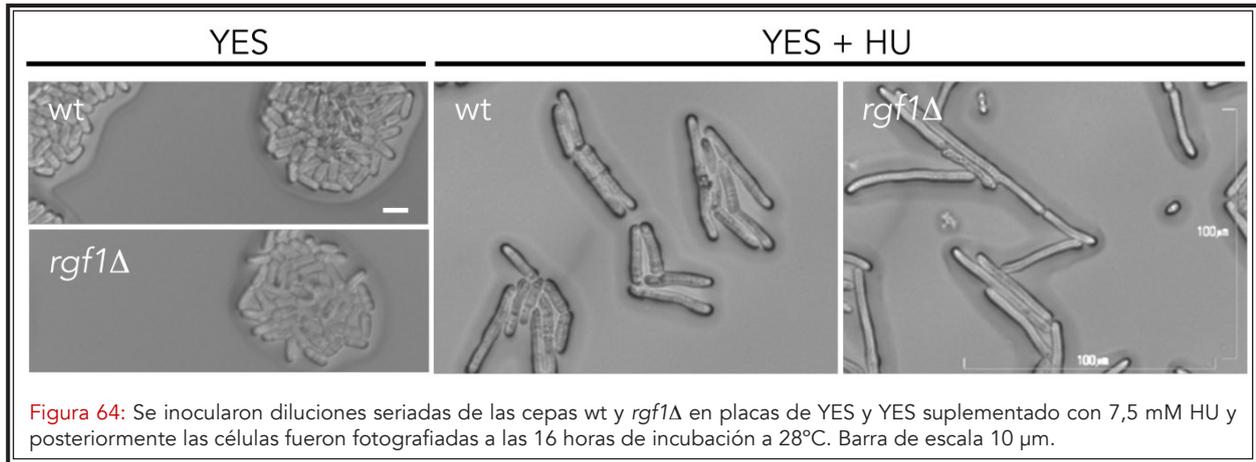


Figura 64: Se inocularon diluciones seriadas de las cepas wt y *rgf1Δ* en placas de YES y YES suplementado con 7,5 mM HU y posteriormente las células fueron fotografiadas a las 16 horas de incubación a 28°C. Barra de escala 10 μm.

muestras se analizó la morfología celular, el contenido en DNA y el índice de septación

Las células del mutante *rgf1Δ* muestran un retraso en el índice de septación (figura 65C). Mientras que en la cepa silvestre el primer pico de septación aparece una hora después de eliminar la HU (T3), este pico se retrasa hasta 3 horas después del bloqueo (T5) en el caso de *rgf1Δ*. Además, en el mutante, la proporción de células alargadas es muy alta (T3) (figura 65B). Estas células podrían estar paradas por la presencia de DNA dañado o no replicado correctamente (figura 65C).

4.3 LAS CÉLULAS DEL MUTANTE *rgf1Δ* PRESENTAN MÁS FOCOS DE DAÑO EN EL DNA QUE LAS DE LA CEPA SILVESTRE

Durante la replicación, las células son extremadamente vulnerables al daño en el DNA. Esta vulnerabilidad se debe no sólo a las propias lesiones en el DNA, sino también a que éstas pueden ser un impedimento para completar la replicación (Bass et al., 2012). Una forma generalizada de medir la presencia de daño en el DNA es mediante el análisis del número de focos de la proteína Rad22-YFP (Meister et al., 2003). Rad22 se concentra formando focos en los sitios de reparación de roturas de doble cadena (DSBs) (Kim et al., 2000)

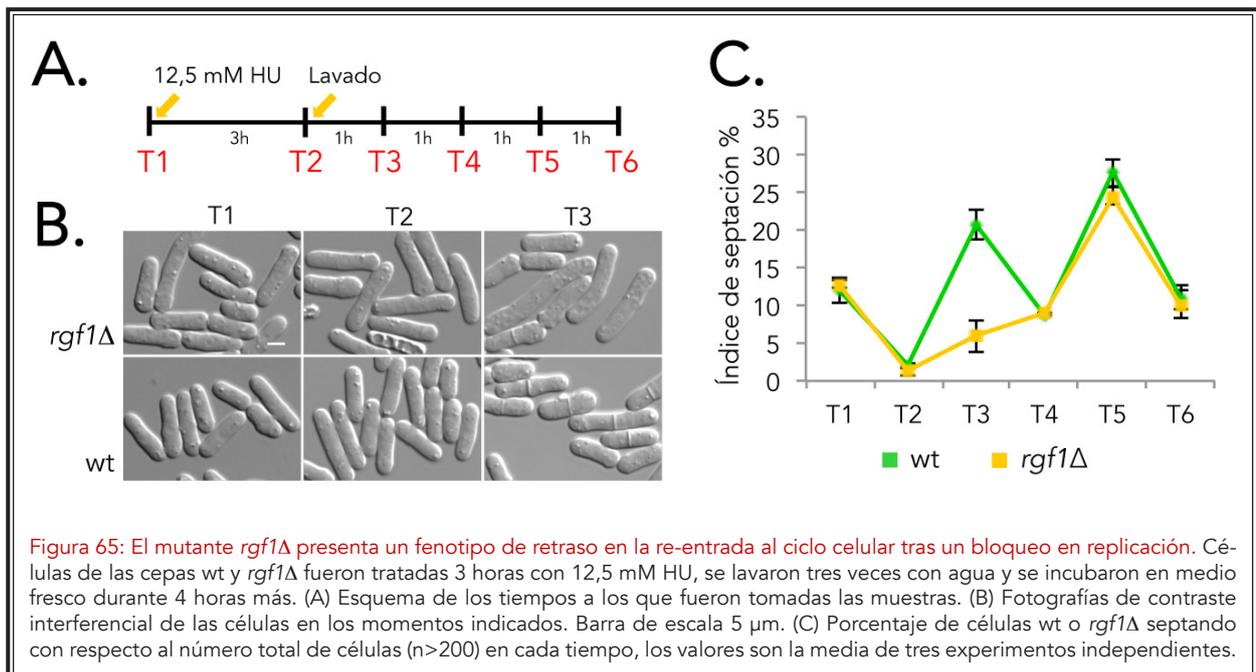
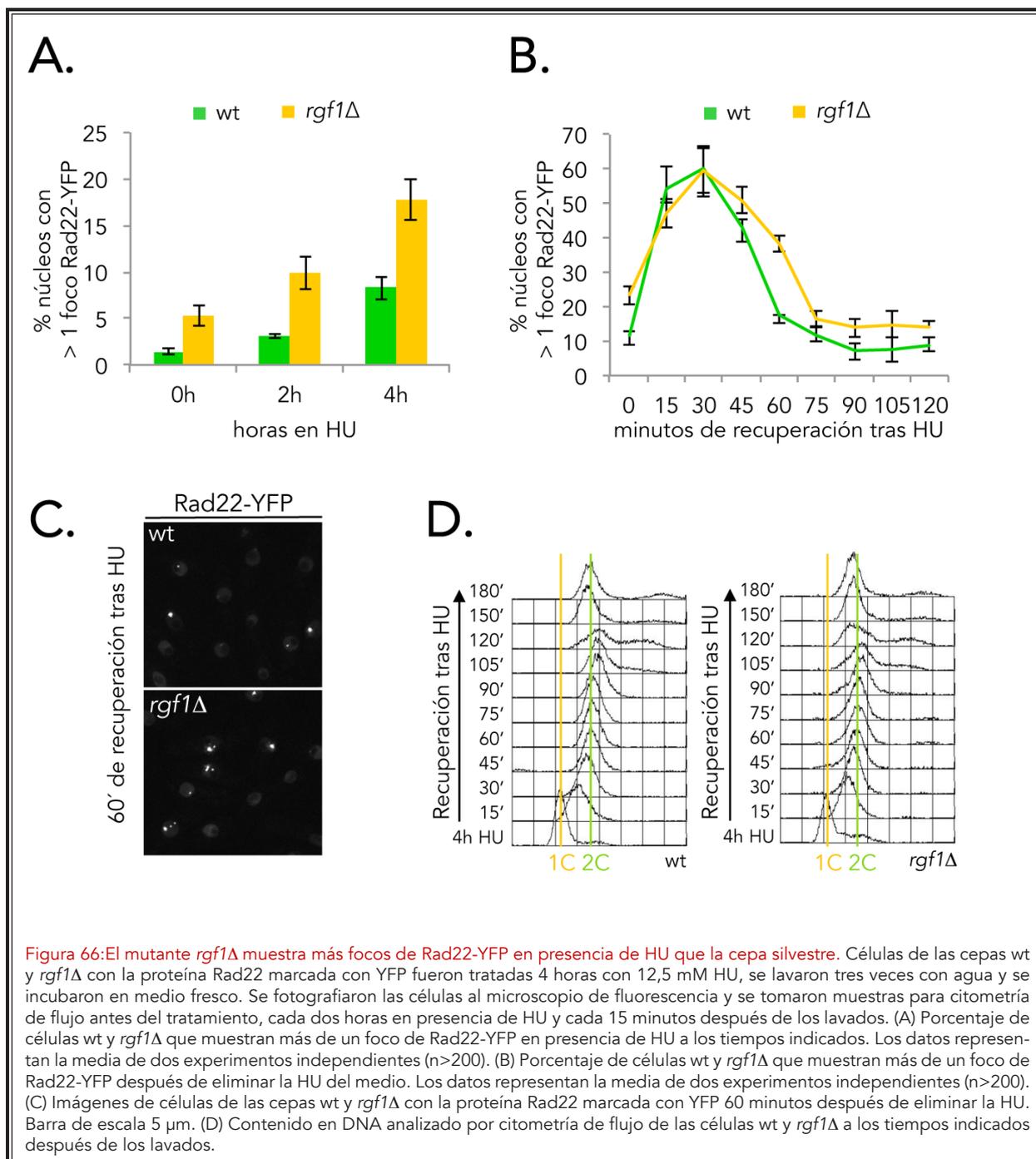


Figura 65: El mutante *rgf1Δ* presenta un fenotipo de retraso en la re-entrada al ciclo celular tras un bloqueo en replicación. Células de las cepas wt y *rgf1Δ* fueron tratadas 3 horas con 12,5 mM HU, se lavaron tres veces con agua y se incubaron en medio fresco durante 4 horas más. (A) Esquema de los tiempos a los que fueron tomadas las muestras. (B) Fotografías de contraste interferencial de las células en los momentos indicados. Barra de escala 5 μm. (C) Porcentaje de células wt o *rgf1Δ* septando con respecto al número total de células (n>200) en cada tiempo, los valores son la media de tres experimentos independientes.



y es esencial para la reparación de estas roturas mediante recombinación homóloga (HR).

Para determinar si el fenotipo de retraso en el ciclo celular que muestra el mutante *rgf1Δ* se debe a su incapacidad para reparar las roturas generadas durante la replicación en presencia de la droga o para prevenir que estas roturas ocurran, analizamos la cantidad de focos de Rad22-YFP en *rgf1Δ* y en la cepa silvestre tanto durante el blo-

queo con HU como durante la recuperación del mismo. En ausencia de HU un 11% de la población de células de la cepa silvestre muestran un único foco de Rad22-YFP que corresponde a sitios de reparación post-replicativa (Meister *et al.*, 2003). Solamente un 1% de estas células muestran más de 1 foco. Sin embargo, en la cepa *rgf1Δ* este porcentaje es cuatro veces mayor (4,24%, figura 66A) lo que sugiere que la ausencia de Rgf1 conlleva un aumento del daño generado en el DNA de forma

espontánea o una disminución en su reparación.

Cuando las células fueron tratadas con HU durante 2 horas, la proporción de células que presentan más de un foco de Rad22-YFP aumenta hasta un 3,08% y un 9,92% en la cepa silvestre y en el mutante *rgf1Δ* respectivamente (figura 66A).

En la liberación tras un tratamiento con HU, en el caso de la cepa silvestre, se produce un pico en la aparición de estos focos que alcanza su máximo a los 30 minutos y después desaparece rápidamente (figuras 66B y 66C). Este pico corresponde con el final de la replicación, que se completa entre los 30 y los 40 minutos, como se puede observar en el análisis de la cantidad de DNA mediante FACS (figura 66D). En las células *rgf1Δ* los focos de Rad22-YFP también aparecen a los 30 minutos pero tardan más tiempo en desaparecer (figuras 66B y 66C), lo que podría ralentizar la terminación de la replicación.

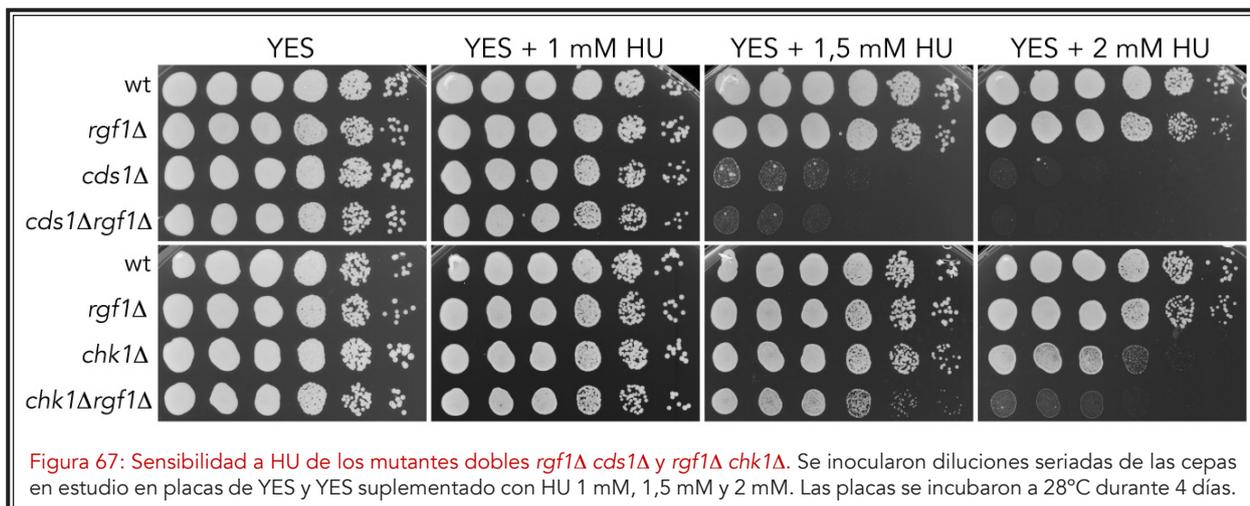
De todas estas observaciones concluimos que las células del mutante *rgf1Δ* se recuperan de forma ineficiente tras un bloqueo en replicación causando un retraso en el ciclo celular y quizás debido a este retraso, la mayoría de las células sobrevive a un tratamiento agudo con HU. Por otra parte, la sensibilidad del mutante *rgf1Δ* a una ex-

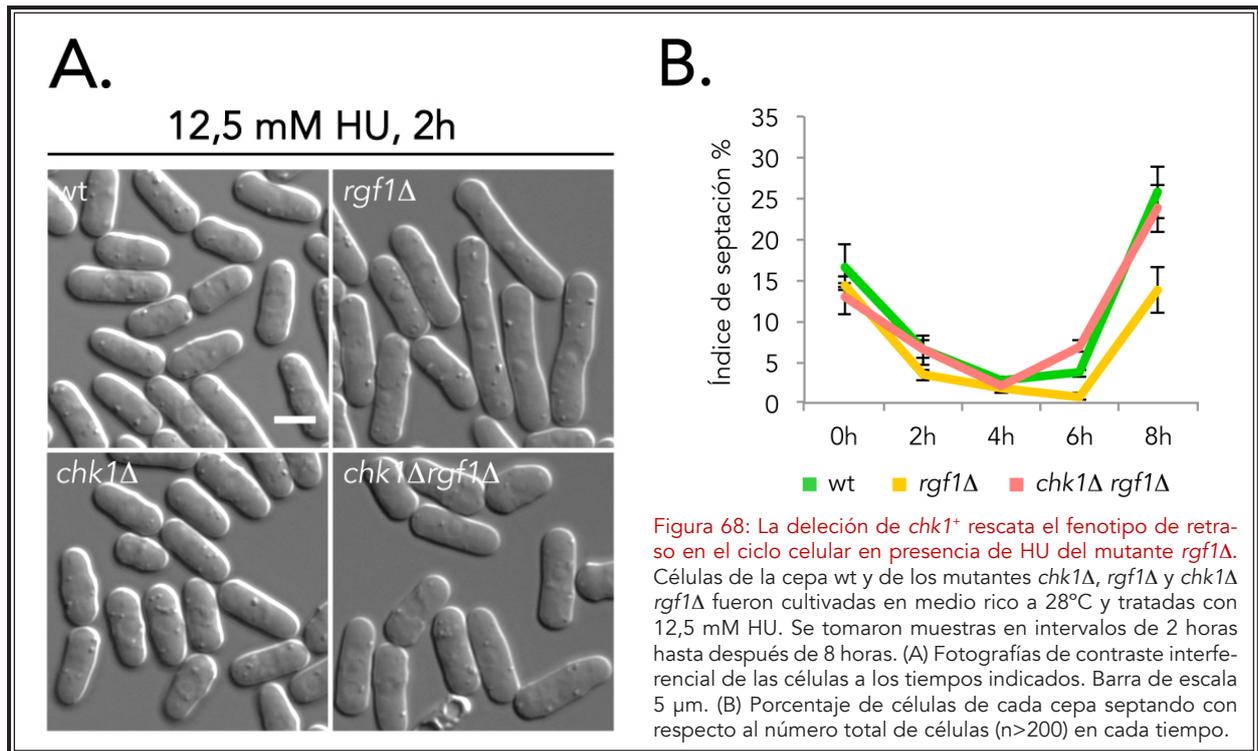
posición crónica a la droga podría ser el reflejo de muchos ciclos en los que la suma de los retrasos en cada ciclo se traduciría en una ralentización del crecimiento.

4.4 RELACIÓN DE LA FUNCIÓN DE Rgf1 EN CONDICIONES DE ESTRÉS REPLICATIVO CON LOS MECANISMOS DE CHECKPOINT

Ya que el mutante *rgf1Δ* presenta un fenotipo de retraso en el ciclo celular en presencia de HU y debido a la importancia de los mecanismos de *checkpoint* en estas condiciones, decidimos analizar la relación entre Rgf1 y las quinasas efectoras de la respuesta de *checkpoint*. Para ello, construimos los mutantes *cds1Δ rgf1Δ* y *chk1Δ rgf1Δ* y comparamos su crecimiento con el de los mutantes simples *cds1Δ*, *chk1Δ* y *rgf1Δ* en placas de YES suplementadas con HU.

Como se muestra en la figura 67, el mutante *cds1Δ rgf1Δ* se comporta de forma idéntica al mutante simple *cds1Δ*, lo que sugiere que ambas proteínas podrían formar parte de una misma ruta de señalización. Por el contrario, los genes *rgf1+* y *chk1+* sí interaccionan en presencia de HU ya que el mutante *chk1Δ rgf1Δ* no crece en placas con 2 mM HU mientras los mutantes individuales *chk1Δ* y *rgf1Δ* crecen perfectamente en las mismas con-

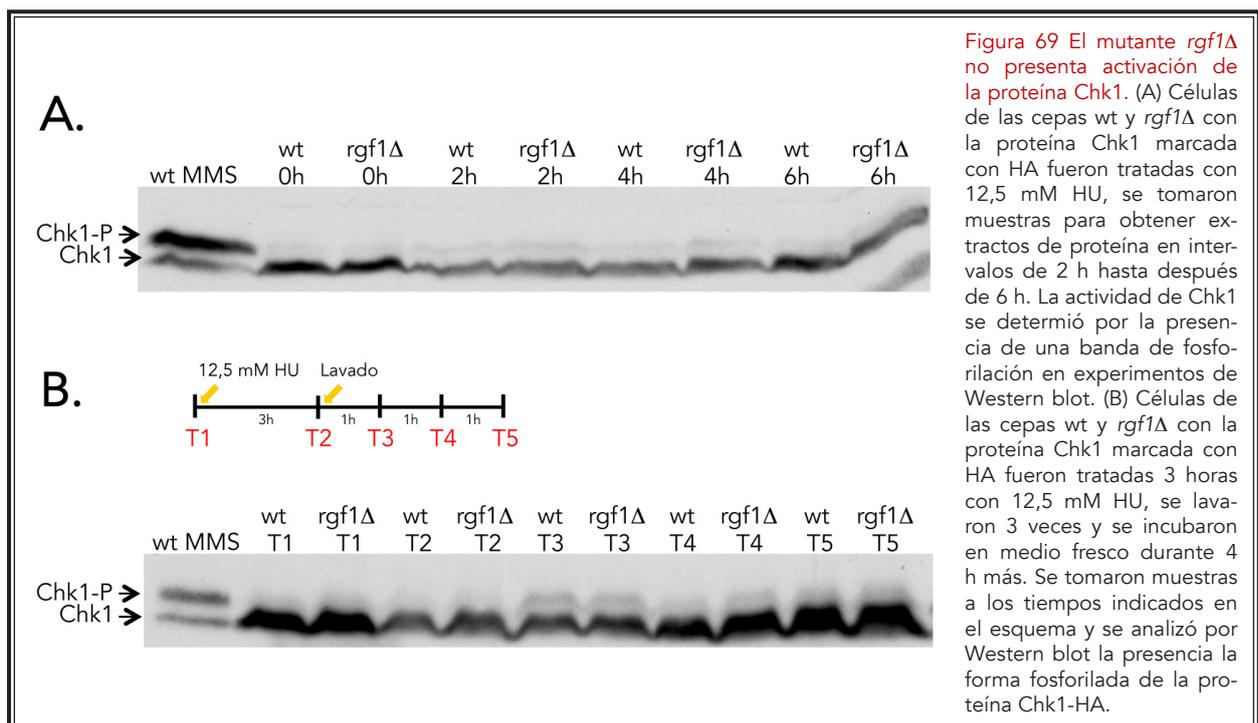


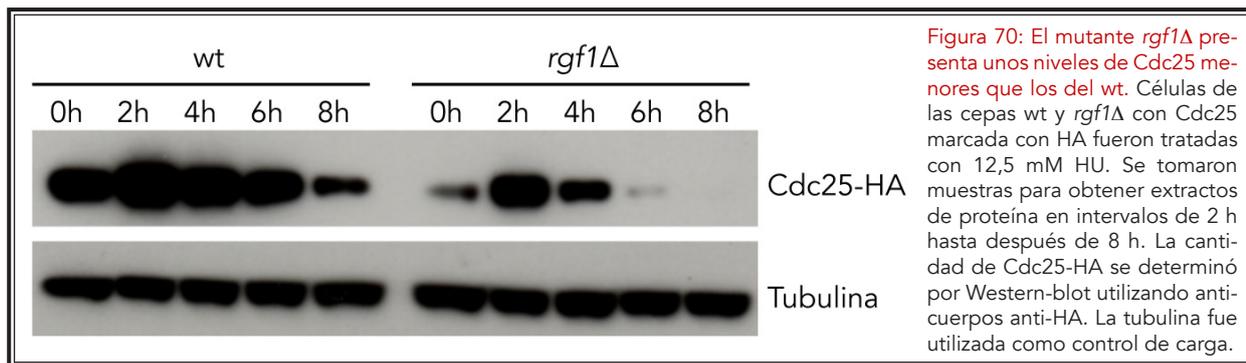


diciones.

Para determinar la naturaleza de esta interacción y saber si el retraso observado en el mutante *rgf1Δ* en presencia de HU se debía a la presencia de Chk1, analizamos la progresión del ciclo celular del mutante *chk1Δ rgf1Δ* en las mismas condiciones. La delección del gen *chk1⁺* rescata el

fenotipo de retraso en el ciclo celular y el alargamiento de las células *rgf1Δ* en presencia de HU (figura 68). Este resultado sugiere que Chk1 juega un papel en la parada de *checkpoint* en células *rgf1Δ* y que el retraso en el ciclo celular podría conferir tolerancia a la droga al mutante *rgf1Δ*, ya que el mutante *chk1Δ rgf1Δ* -cuyo ciclo celular progresa de forma similar a la cepa silvestre- es más sensible





a HU que el mutante *rgf1Δ*.

Sin embargo, cuando analizamos la activación de Chk1 por fosforilación, que se detecta por un cambio de movilidad de Chk1-HA en Western blot (Walworth y Bernards, 1996), no observamos diferencias entre la cepa silvestre y el mutante *rgf1Δ* (figura 69). En las células de la cepa silvestre, se observa claramente la banda que corresponde con Chk1 fosforilada al tratar las células con MMS pero no tras un tratamiento con HU (figura 69A). Sin embargo, sí se detecta una pequeña activación 1 hora después de eliminar la droga, pero esto ocurre tanto en la cepa silvestre como en el mutante *rgf1Δ* (T3, figura 69). Estos datos podrían indicar que la presencia de daño en el DNA en las células *rgf1Δ* no supera un umbral determinado para la activación de Chk1, o que la activación de Chk1 es pequeña y no es posible detectarla con la técnica utilizada.

Tanto Cds1 como Chk1 evitan la entrada en mitosis mediante una fosforilación inhibitoria de la fosfatasa Cdc25 (Furnari et al., 1999). Sin embargo, los niveles de la proteína Cdc25 aumentan drásticamente cuando el *checkpoint* de bloqueo en replicación está activo.

Es posible que esta acumulación tenga como objetivo asegurar que la entrada en mitosis sea rápida una vez que haya cesado la actividad del *checkpoint* (Kovelman y Russell, 1996). Ya que el mutante *rgf1Δ* muestra un retraso en esta entrada en mitosis después de un bloqueo en replicación, decidimos comparar los niveles de Cdc25-HA presentes en la cepa silvestre con los de la cepa *rgf1Δ* en presencia de HU.

La cantidad de Cdc25 es sensiblemente menor en las células *rgf1Δ* que en las de la cepa silvestre, no solo en presencia de HU sino también en ausencia de tratamiento (figura 70). Este hecho podría explicar el retraso en el ciclo celular en presencia de HU y tras la liberación del bloqueo que sufre el mutante. Sin embargo, está aún sin determinar el mecanismo por el cual sucede esta disminución de Cdc25 en *rgf1Δ* y si podría actuar evitando la entrada en mitosis mientras no se resuelva daño o no se corrija el retraso que se produce en este mutante en presencia de HU o incluso en ausencia de la droga.

CAPÍTULO 5.

Caracterización de un posible papel de Rgf1 durante la segregación cromosómica

5.1 Rgf1-GFP SE LOCALIZA EN EL SPINDLE POLE BODY

A lo largo de este trabajo hemos observado que algunas de las proteínas Rgf1-GFP mutadas se localizan en uno o dos puntos discretos adyacentes al núcleo que podrían ser el SPB y también a veces marcando el huso mitótico. Esto se ve claramente en los mutantes del dominio DEP, *rgf1-DEPΔ* y *rgf1-FPTP*, y en el mutante *rgf1(*NES1)* (figura 71A).

Este tipo de localización también aparece en algunos casos en la proteína silvestre Rgf1-GFP, pero es mucho más tenue que en los mutantes *rgf1-DEPΔ* y *rgf1(*NES1)*, y a veces difícil de detectar por lo que no es raro que haya pasado desapercibida (Figura 71B). En prometáfase/metáfase, Rgf1-GFP se localiza en dos puntos que parecen el SPB (célula 1). Después de la entrada en anafase, la proteína permanece asociada a esos dos puntos, que posteriormente se separaran, y al mismo

tiempo aparece en la zona de división celular (células 2 y 3). Por último, cuando termina la mitosis y empieza la citocinesis, Rgf1 prácticamente desaparece del SPB y se localiza de forma intensa en el septo de división (célula 4).

Para confirmar que Rgf1-GFP se localiza en el SPB, analizamos la localización de Rgf1-GFP junto con la proteína mCherry-Atb2 (α -tubulina 2) que marca los microtúbulos. La señal de fluorescencia de Rgf1-GFP en “lo que podría ser” el SPB es muy tenue, lo que hace imposible seguir su dinámica *in vivo* mediante experimentos de *time lapse*. Sin embargo, sí podemos afirmar que en aquellas células en las que Rgf1-GFP aparece como dos puntos cercanos al núcleo, estos dos puntos están siempre en los extremos del huso mitótico (figura 72A).

También hemos realizado experimentos de co-localización de Rgf1-GFP y Mis6-mCherry, una proteína que forma parte del cinetocoro interno

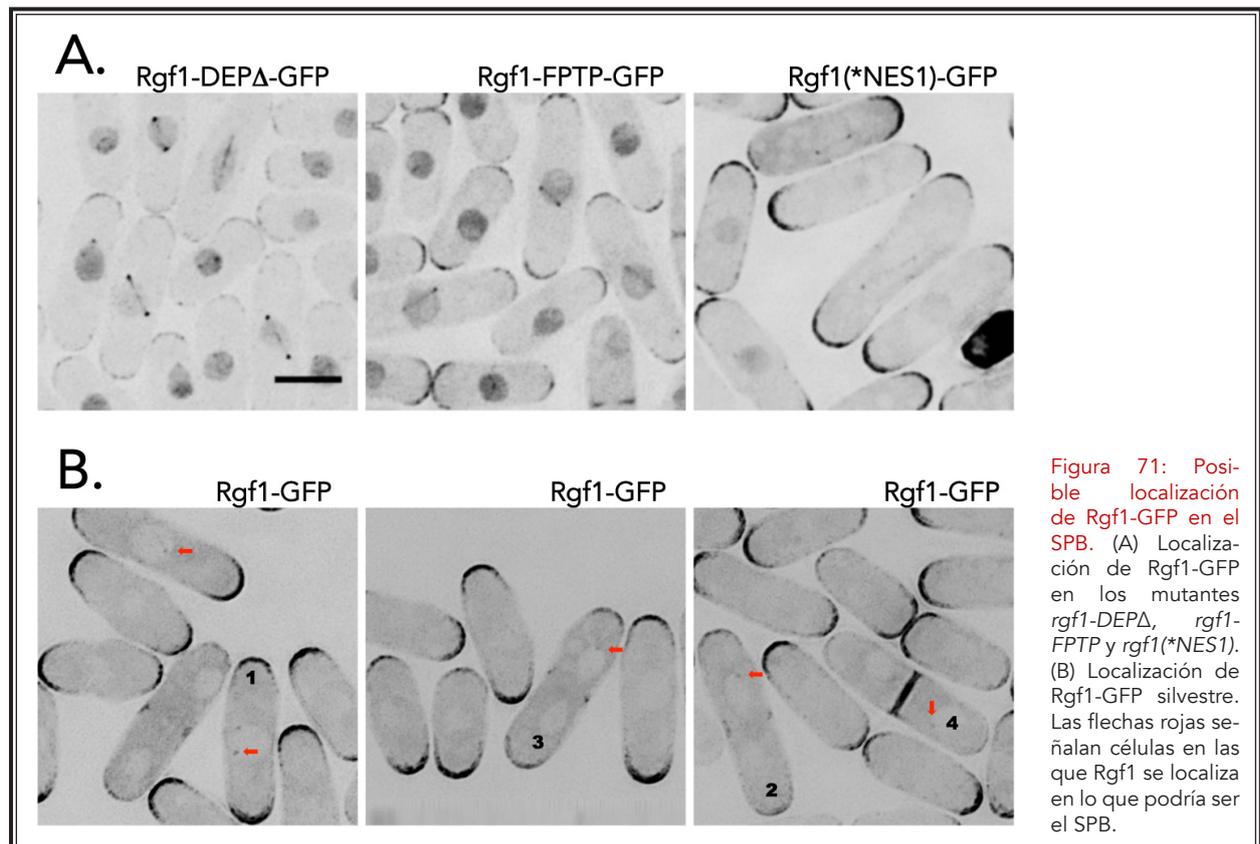
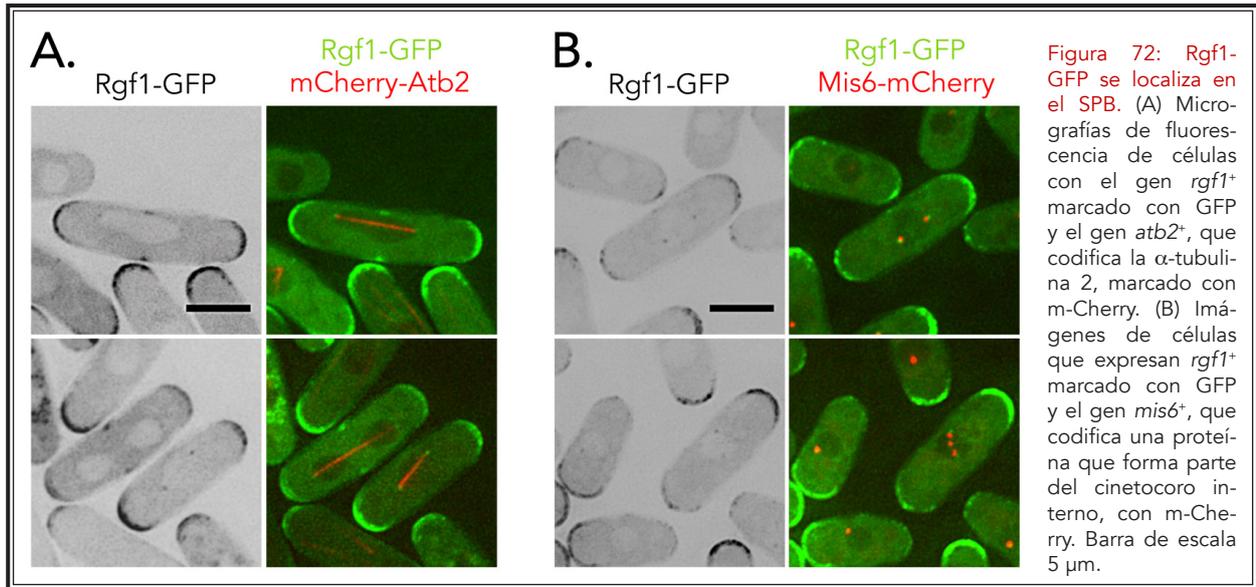


Figura 71: Posible localización de Rgf1-GFP en el SPB. (A) Localización de Rgf1-GFP en los mutantes *rgf1-DEPΔ*, *rgf1-FPTP* y *rgf1(*NES1)*. (B) Localización de Rgf1-GFP silvestre. Las flechas rojas señalan células en las que Rgf1 se localiza en lo que podría ser el SPB.



(figura 72B). En el panel superior se muestra una célula en anafase, y vemos que las dos señales de fluorescencia, verde y roja, no colocalizan sino que se encuentran adyacentes. Mis6-mCherry está en la parte más interna de la envuelta nuclear que correspondería con el cinetocoro y Rgf1-GFP en la parte externa que correspondería con el SPB. En el panel inferior se muestra una célula en metafase, donde Rgf1-GFP aparece claramente como dos puntos en zonas opuestas de la envuelta nuclear mientras que los cinetocoros se encuentran alineados en el interior del núcleo. En resumen, estos datos sugieren que Rgf1 se localiza en el SPB y no en el cinetocoro.

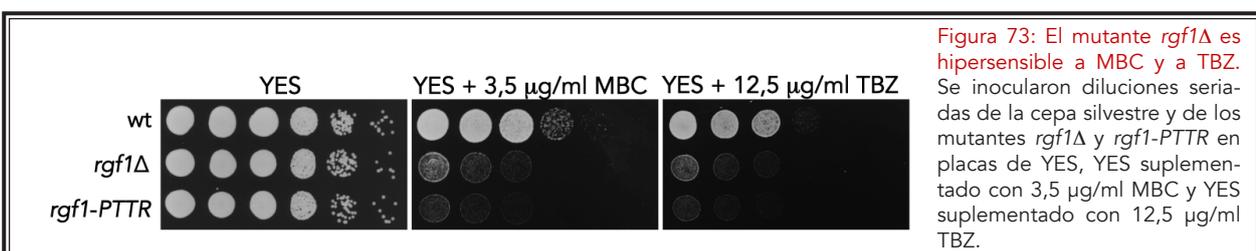
La siguiente pregunta es cuándo se localiza Rgf1 en el SPB, y para esto no tenemos una respuesta clara. Rgf1-GFP aparece en el SPB únicamente en células en mitosis, desde metafase hasta anafase tardía-telofase. Sin embargo, no podemos descartar que Rgf1-GFP se localice en el SPB tam-

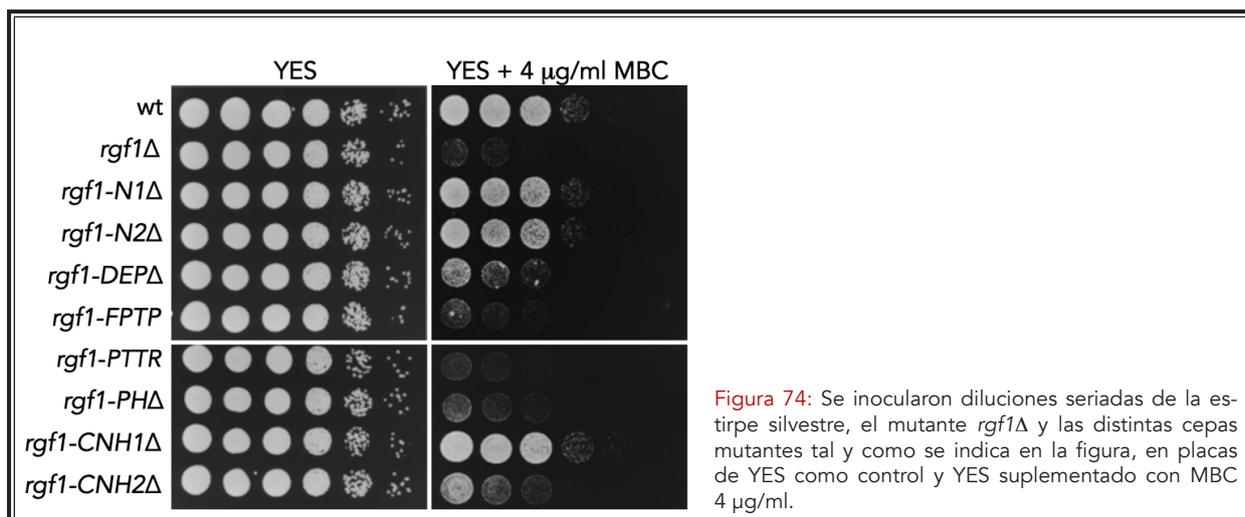
bién durante interfase en una cantidad no detectable por microscopía.

5.2 EL MUTANTE *rgf1* Δ PRESENTA DEFECTOS EN EL PROCESO DE SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA

Ya que Rgf1-GFP se localiza en el SPB en mitosis, decidimos investigar si Rgf1 podría tener algún papel durante la segregación cromosómica. Para ello, en primer lugar analizamos la sensibilidad del mutante *rgf1* Δ a agentes despolimerizantes de microtúbulos como el tiabendazol (TBZ) o el metilbenzimidazol-2-ilcarbamato (MBC). La sensibilidad a estos compuestos es una característica de los mutantes en componentes de la maquinaria responsable de la segregación de cromosomas.

Como se muestra en la figura 73, las células del mutante *rgf1* Δ no crecen en placa en presencia de MBC (3,5 μ g/ml) y TBZ (12,5 μ g/ml) mientras





que las células de la cepa silvestre crecen en estas condiciones. Además, la sensibilidad a MBC y TBZ depende de la actividad intercambiadora de nucleótidos de Rgf1 ya que el mutante en el dominio catalítico de la proteína, *rgf1-PTTR*, se comporta como el mutante de delección *rgf1Δ* (figura 73).

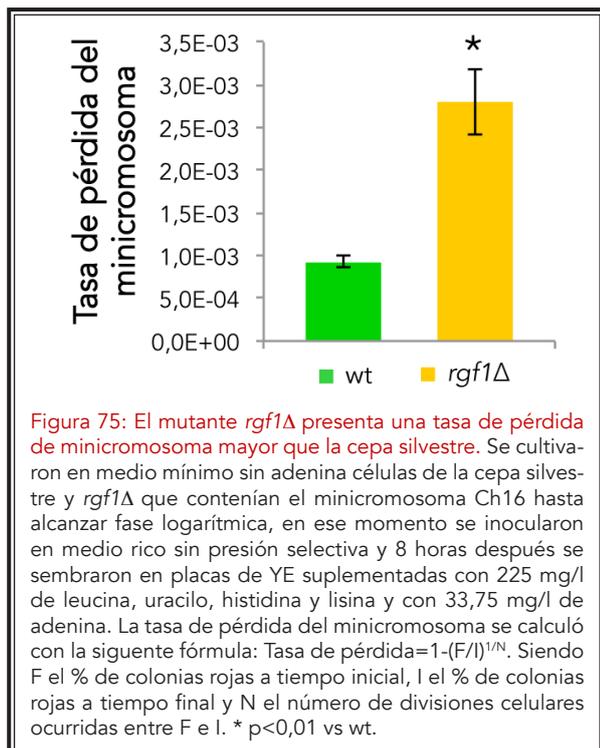
Por otro lado, *cds1Δ* no muestra sensibilidad a agentes despolimerizantes de microtúbulos (no mostrado), lo que podría indicar que la sensibilidad que presentan las células que carecen de Rgf1 a estos agentes es independiente de su relación con el *checkpoint* de replicación.

Curiosamente, cuando analizamos el crecimiento en placas de MBC de los mutantes *rgf1-N1Δ*, *rgf1-N2Δ*, *rgf1-DEPΔ*, *rgf1-FPTP*, *rgf1-PHΔ*, y los dos mutantes en el dominio CNH de Rgf1, vimos que los mutantes en el extremo amino y en el extremo carboxilo se comportan como la estirpe silvestre (figura 74), lo que supone una novedad, puesto que el extremo CNH es necesario para las funciones de Rgf1 en integridad y polaridad y también para la tolerancia a HU. Sin embargo, parece ser menos importante para el crecimiento en presencia de agentes despolimerizantes de microtúbulos. Por otra parte, los dominios DEP, DH y PH, es decir, la parte central de la proteína, son

necesarios para la supervivencia en placas de MBC y por lo tanto para la posible función de Rgf1 durante la segregación de cromosomas.

En *S. pombe* se pueden identificar mutantes con defectos en segregación cromosómica mediante un ensayo de pérdida del minicromosoma artificial Ch16 y para ello se utiliza una cepa que además de los 3 cromosomas regulares lleva este minicromosoma (Niwa et al., 1989). El minicromosoma Ch16 es un derivado del cromosoma III de 530 kb que porta el alelo *ade6-M216* que complementa al alelo *ade6-M210* presente en el genoma de la cepa que lo porta. Si el minicromosoma se pierde, se formarán colonias rojas en lugar de blancas en placas con baja concentración de adenina (Allshire et al., 1995).

Para realizar este ensayo en el mutante *rgf1Δ*, construimos una cepa *ade6-M210* que llevaba el minicromosoma Ch16 y la delección del gen *rgf1+* y comparamos la tasa de pérdida por división con la de la cepa silvestre. En la figura 75 se muestra que las células del mutante *rgf1Δ* pierden el minicromosoma con una frecuencia que es aproximadamente el triple que en el caso de las células de la cepa silvestre. Si bien este aumento no es tan grande como el de los mutantes en com-



ponentes de la maquinaria de segregación cromosómica como *mis6-302* (Takahashi et al., 1994) o *mal3-1* (Beinhauer et al., 1997), en los que la tasa de pérdida del minicromosoma aumenta en varios órdenes de magnitud, sí se trata de un aumento significativo, indicando que el defecto en segregación que presenta el mutante *rgf1Δ* no es muy severo.

5.3 EL MUTANTE *rgf1Δ* INTERACCIONA GENÉTICAMENTE CON MUTANTES EN GENES IMPLICADOS EN LA CONEXIÓN MICROTÚBULO-CINETOCORO

En el laboratorio se había realizado una búsqueda de interacciones genéticas entre el mutante *rgf1Δ* y la colección *Bioneer* de deleciones haploides de *S. pombe* (el escrutinio fue realizado por E. Manjón en colaboración con P. Pérez). Entre los numerosos mutantes cuya combinación con *rgf1Δ* producía defectos en el crecimiento que no aparecen en las cepas parentales, se encontraron algunos mutantes en genes que codifican proteínas relacionadas con la segregación de cromosomas y

con la dinámica de microtúbulos.

En primer lugar, repetimos los cruces de *rgf1Δ* con los mutantes identificados en el escrutinio uno por uno y además incluimos en el estudio nuevos mutantes de genes implicados en este proceso. A continuación, comparamos el fenotipo de todos los mutantes dobles construidos con el de los mutantes simples. Los resultados se recogen en la [tabla II](#), donde se describe el crecimiento de los mutantes dobles, tanto en medio rico a diferentes temperaturas como en medio rico suplementado con TBZ, comparado con el crecimiento del mutante simple que crece peor en cada condición.

Existe una interacción negativa fuerte entre *rgf1Δ* y el mutante *alp14Δ* y, aunque no de una forma tan severa, *rgf1Δ* también interacciona negativamente con los mutantes *dis1Δ*, *ndc80-21*, *dam1Δ* y otros genes que codifican proteínas del complejo DASH. En la [figura 76A](#) se muestra el crecimiento de las células de los mutantes dobles *alp14Δ rgf1Δ*, *dis1Δ rgf1Δ*, *ndc80-21 rgf1Δ* y *dam1Δ rgf1Δ* comparado con el crecimiento de las células de la cepa silvestre y de los mutantes simples en medio rico a diferentes temperaturas.

Todos estos genes con los que *rgf1+* interacciona negativamente codifican proteínas implicadas en la interacción física de los microtúbulos del huso con los cinetocoros. Alp14 y Dis1 pertenecen a la familia TOG/XMAP215 y actúan como polimerasas de microtúbulos en los extremos positivos acelerando su ensamblaje (Al-Bassam et al., 2012). Ndc80 pertenece a un complejo de 4 proteínas que se encuentran en el cinetocoro externo e interacciona directamente con los microtúbulos. En *S. pombe* Ndc80 interacciona con los microtúbulos a través de las MAPs Dis1 y Alp14 (Hsu y Toda, 2011; Tang et al., 2013) mientras que en *S. cere-*

		YES						YES + TBZ					
		5 µg/ml		10 µg/ml		22°	25°	28°	32°	35°	37°	25°	28°
		25°	28°	25°	28°								
Spindle Assembly Checkpoint	<i>rgf1Δ mad1Δ</i>	-	-	±	±	±	±	---	-	---	---	---	
	<i>rgf1Δ mad2Δ</i>	-	-	±	±	±	±	-	---	---	---	---	
	<i>rgf1Δ mad3Δ</i>	±	±	±	±	±	±	-	±	-	-	-	
	<i>rgf1Δ bub3Δ</i>	-	-	-	±	±	±	---	---	-	-	-	
Complejo DASH	<i>rgf1Δ dam1Δ</i>	---	---	---	-	±	±	---	---	-	---	---	
	<i>rgf1Δ duo1Δ</i>	---	---	-	-	-	-	---	-	---	---	---	
	<i>rgf1Δ dad1Δ</i>	-	-	-	±	±	±	---	-	±	±	±	
	<i>rgf1Δ dad2Δ</i>	-	±	±	±	±	-	±	±	±	-	-	
	<i>rgf1Δ dad3Δ</i>	---	---	-	-	-	-	---	-	---	---	---	
	<i>rgf1Δ dad5Δ</i>	-	-	±	±	±	-	-	-	---	---	---	
Complejo KMN	<i>rgf1Δ ndc80-21</i>	---	---	---	---	±	±	---	---	---	---	---	
MAPs	<i>rgf1Δ alp14Δ</i>	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	
	<i>rgf1Δ dis1Δ</i>	---	---	---	±	±	±	---	---	---	---	---	
Proteínas estructurales de microtúbulos	<i>rgf1Δ tub1Δ</i>	-	±	±	±	±	-	---	---	-	-	-	
	<i>rgf1Δ mto1Δ</i>	-	-	±	±	±	-	-	-	-	---	---	
	<i>rgf1Δ pby1Δ</i>	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-	
Kinesinas	<i>rgf1Δ klp5Δ</i>	±	±	±	±	±	±	-	-	±	±	±	
	<i>rgf1Δ klp6Δ</i>	±	±	±	±	±	±	-	-	±	±	±	
Quinasas y Fosfatasa	<i>rgf1Δ flp1Δ</i>	±	±	±	±	±	±	±	±	-	---	---	
	<i>rgf1Δ dis2Δ</i>	-	±	±	±	±	±	-	±	±	±	±	
	<i>rgf1Δ fin1Δ</i>	±	±	±	±	±	±	±	±	-	±	±	
Cromatina centrómero	<i>rgf1Δ sgo1Δ</i>	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	
	<i>rgf1Δ sgo2Δ</i>	±	±	±	±	±	±	±	±	-	-	-	
	<i>rgf1Δ swi6Δ</i>	±	±	±	±	±	±	-	-	-	-	-	

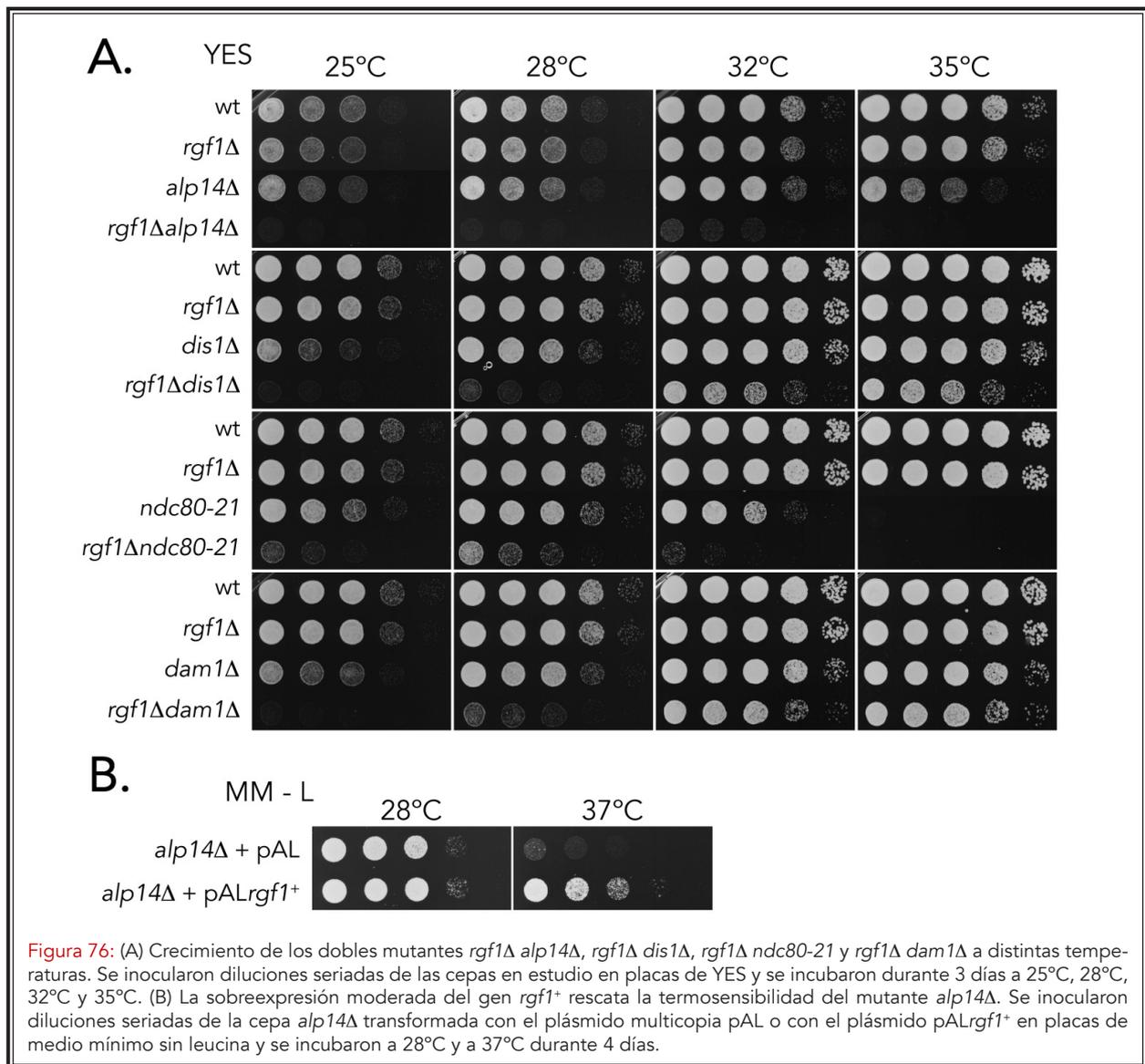
Tabla II: Mutantes dobles construidos y su crecimiento con respecto a los simples tanto en medio rico a diferentes temperaturas como en medio rico suplementado con TBZ. Los mutantes marcados en color azul son los identificados en el escrutinio. ± indica que no existe interacción, - indica interacción genética leve, --- indica interacción intermedia y --- indica interacción fuerte.

visiae se une al complejo DASH (Lampert et al., 2010; Lampert et al., 2013; Tien et al., 2010). En ambos casos se refuerza la unión entre los microtúbulos del huso y el cinetocoro y la precisión en la segregación de los cromosomas.

Ya que hemos encontrado relación entre el gen *rgf1+* y los genes *alp14+*, *dis1+*, *ndc80+* y *dam1+* nos preguntamos si la sobreexpresión de *rgf1+* podría rescatar el fenotipo termosensible de los mutantes *ndc80-21* y *alp14Δ* o el fenotipo de sensibi-

lidad a bajas temperaturas de los mutantes *dis1Δ* y *dam1Δ*. Para ello, transformamos estos mutantes con el plásmido multicopia pAL-*rgf1+* -en el que el gen se expresa bajo el control de su propio promotor- o con el plásmido pAL vacío y analizamos la capacidad de los transformantes de crecer en placas de medio mínimo sin leucina a diferentes temperaturas.

La sobreexpresión moderada de *rgf1+* suprime la termosensibilidad en el mutante *alp14Δ*

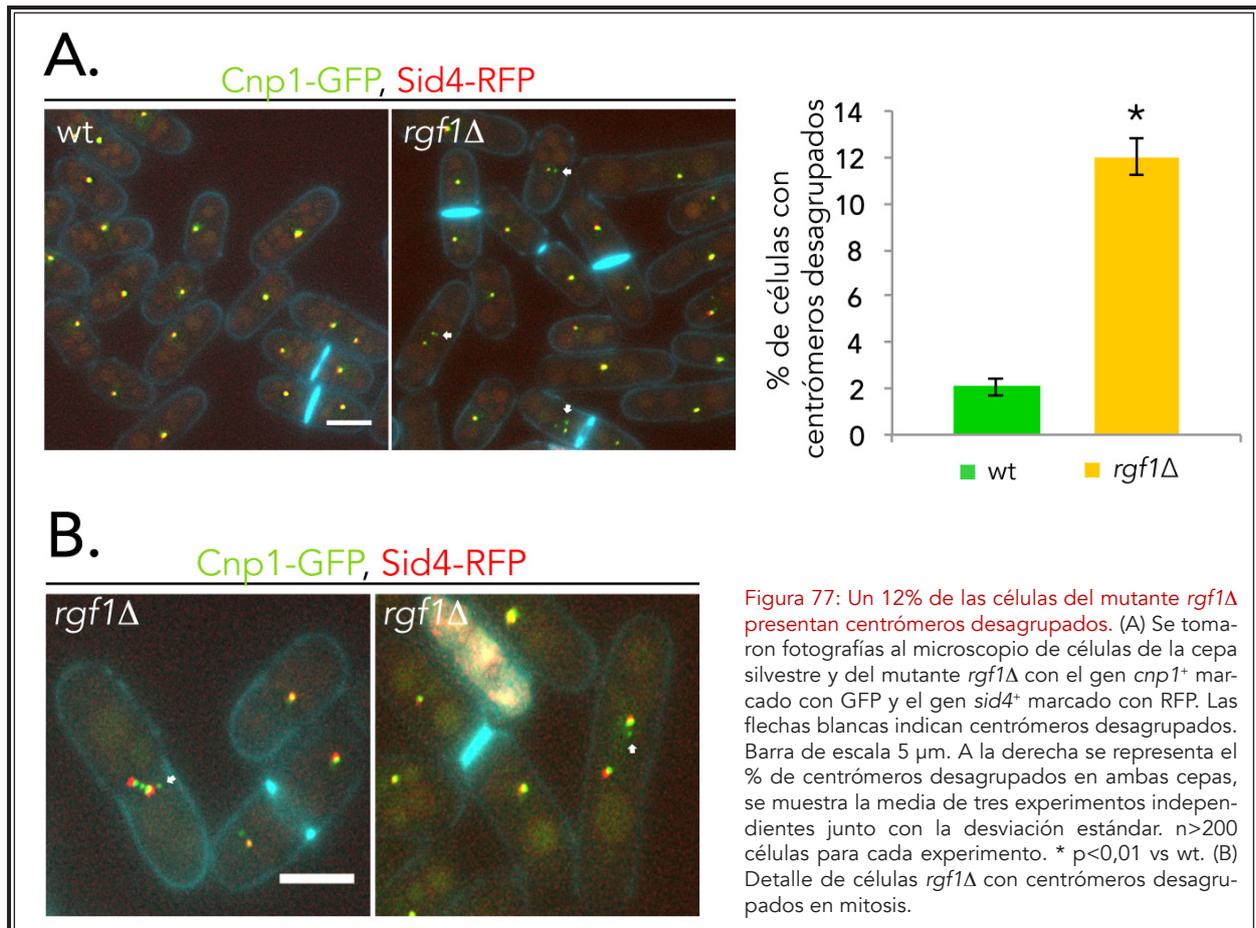


(figura 76B), mientras que en el resto de mutantes, las células transformadas con el plásmido pAL*rgf1*⁺ crecen de forma idéntica a las transformadas con el plásmido vacío en todas las temperaturas estudiadas (no mostrado). Estos resultados son muy recientes y en el futuro nos gustaría estudiar con más detalle estas interacciones, por ejemplo ver si se agrava y cómo se agrava el fenotipo de estos mutantes dobles *rgf1Δ alp14Δ*, *rgf1Δ dis1Δ*, *rgf1Δ ndc80-21* y *rgf1Δ dam1Δ* con respecto a los mutantes simples.

En conjunto, estos resultados sugieren una posible función de Rgf1 en la interacción cinetocoro-microtúbulo.

5.4 LA PROTEÍNA Rgf1 ES NECESARIA PARA EL CORRECTO AGRUPAMIENTO CENTROMÉRICO

En *S. pombe*, los centrómeros están agrupados cerca del SPB en interfase, lo que se conoce como configuración Rab1. Esta configuración facilita la eficiencia de la captura de los cinetocoros por parte de los microtúbulos así como el establecimiento de la bi-orientación de los cromosomas durante metafase (Franco *et al.*, 2007; Hou *et al.*, 2013). Para examinar la interacción cinetocoro-microtúbulo en el mutante *rgf1Δ*, obtuvimos cepas wt y *rgf1Δ*, con marcadores fluorescentes para poder seguir la dinámica de los centrómeros y el SPB



al mismo tiempo. Como marcador de centrómero utilizamos la variante de la histona H3 específica de centrómero, Cnp1, marcada con GFP (Takahashi et al., 2000) y para detectar el SPB utilizamos la proteína Sid4-RFP (Chang y Gould, 2000).

En la figura 77, en los paneles de la izquierda, vemos que en la cepa silvestre, Cnp1 y Sid4 colocalizan en un solo punto en las células en interfase. Sin embargo, en el caso de *rgf1Δ*, en algunas células aparecen varios puntos de Cnp1-GFP y uno solo de Sid4-RFP, lo que indicaría la presencia los centrómeros desagrupados en interfase. En la figura 77A (panel derecho) se ha cuantificado el porcentaje de células con los centrómeros desagrupados y los valores mostrados son la media de 3 experimentos en los que se contaron más de 200 células de cada estirpe. En el mutante *rgf1Δ* el 12% de las células presentan los centrómeros desagrupados en interfase mientras que en la cepa

silvestre solo hay un 2% de las células con este defecto (el 98% de las células mantiene la configuración Rabl).

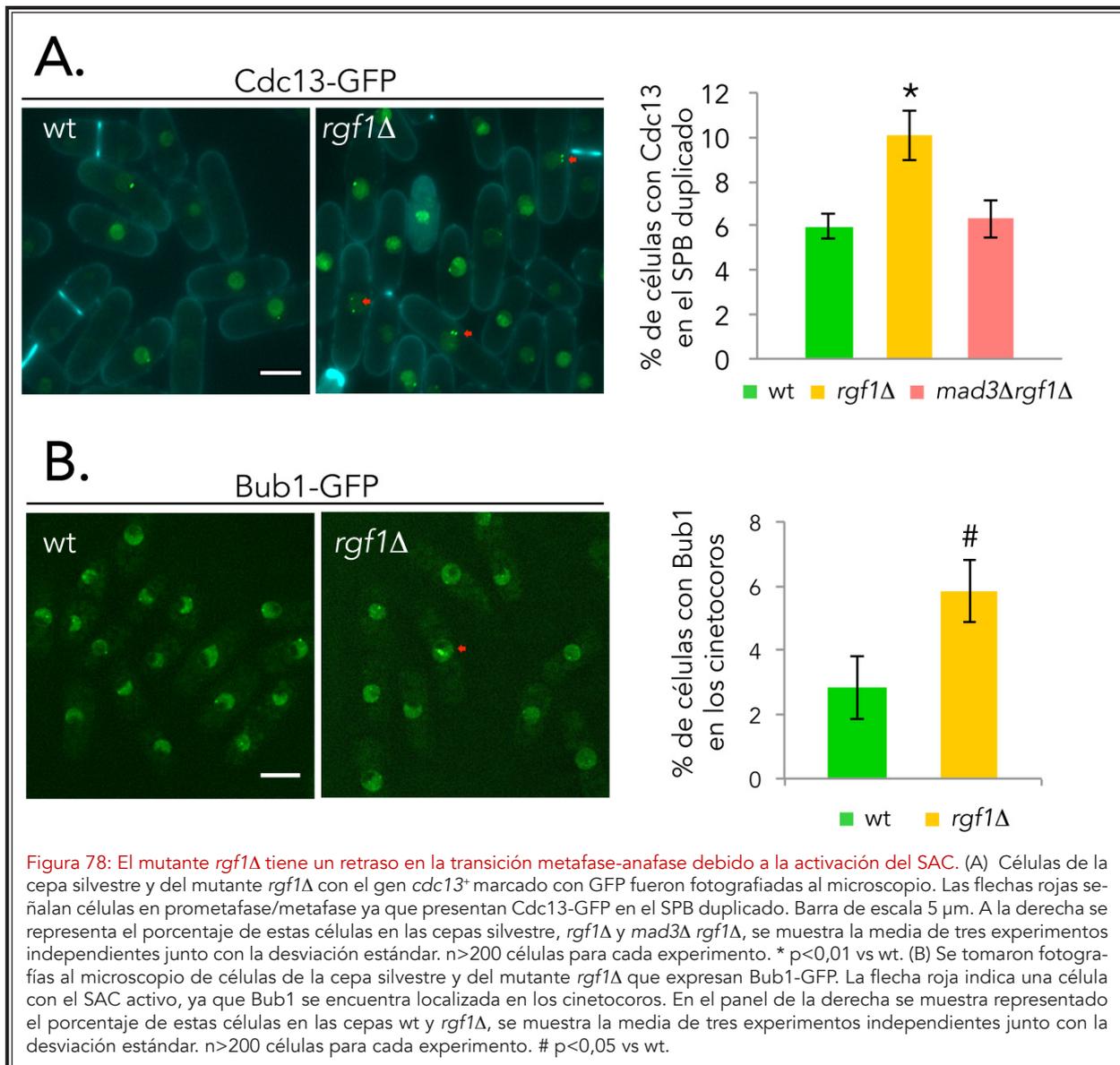
En células de mamífero se ha descrito que Ect2, un GEF de RhoA, está implicado en el mantenimiento de las moléculas de CENP-A (la variante de la hitona H3 homóloga a Cnp1) incorporadas *de novo* en la cromatina del centrómero (Lagana et al., 2010). Para descartar la posibilidad de que Cnp1-GFP no se uniera bien a la cromatina del centrómero en el mutante *rgf1Δ*, realizamos una inmunoprecipitación de cromatina (ChIP). Utilizamos un anticuerpo anti-GFP y realizamos PCR cuantitativa (qPCR) con oligonucleótidos que anillan en las regiones del centrómero *cnt* e *imr* para medir su asociación con Cnp1, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *rgf1Δ* (la ChIP se llevó a cabo en el laboratorio de P. Antequera con la ayuda de A. García). La cantidad de Cnp1-GFP en la región

cnt es similar en ambas cepas (no mostrado), lo que sugiere que la estructura del centrómero se mantiene íntegra en *rgf1Δ* y que los puntos adicionales de Cnp1-GFP que vemos por microscopía en nuestro mutante corresponden con centrómeros y no con localizaciones aberrantes de Cnp1.

5.5 EL SPINDLE ASSEMBLY CHECKPOINT RETRASADA EL INICIO DE LA ANAFASE EN AUSENCIA DE *rgf1*⁺

Los defectos en la unión cinetocoro-microtúbulo son reconocidos por el *spindle assembly checkpoint*. En su estado activo, el SAC retrasa el

comienzo de la anafase hasta que todos los cromosomas están bi-orientados correctamente y se puede asegurar la segregación del material genético (Musacchio y Salmon, 2007). Es posible analizar si una cepa mutante sufre un retraso en la entrada en anafase mediante el estudio de la localización de la ciclina Cdc13-GFP. El complejo Cdc2/Cdc13 (Cdk/ciclina B) se une a los SPB durante prometafase y metafase y es degradado por el complejo APC/C para dar comienzo a la anafase (Tatebe et al., 2001). Así, las células en las que Cdc13-GFP se localiza en ambos SPB se encuentran en prometafase/metafase y, por lo tanto, los mutantes con retraso en la entrada en anafase presentan un



número mayor de estas células (Sanchez-Perez *et al.*, 2005).

Para analizar la entrada en anafase en el mutante *rgf1Δ*, medimos el porcentaje de células que presentan Cdc13-GFP localizada en el SPB duplicado, tanto en la cepa silvestre como en el mutante *rgf1Δ*. El mutante *rgf1Δ* presenta un porcentaje mayor de células con Cdc13-GFP en ambos SPB que la cepa silvestre (10,07% con respecto a 5,94%), lo que indica que las células *rgf1Δ* tienen un retraso en el inicio de la anafase. Los valores se representan en la [figura 78A](#) y corresponden con la media de 3 experimentos en los que se contaron más de 200 células de cada estirpe.

Para evaluar si este retraso se debe a la activación del SAC, analizamos el porcentaje de células que presentan Cdc13-GFP localizada en ambos SPB en el mutante doble *mad3Δ rgf1Δ*. En ausencia de Mad3 no se forma el complejo Mad2-Mad3-Cdc20, responsable de la inhibición del APC/C, por lo que el que el SAC no es funcional (Millband y Hardwick, 2002). Como se muestra en la [figura 78A](#), la delección de *mad3*⁺ en el mutante *rgf1Δ* restablece los niveles de Cdc13-GFP localizada en ambos SPB a valores similares a los de la cepa silvestre, sugiriendo que el retraso en el inicio de la anafase que sufre el mutante *rgf1Δ* depende de la actividad del SAC.

La actividad del SAC también se puede medir determinando el porcentaje de células en las que la proteína Bub1-GFP se localiza en los cinetocoros en un cultivo asincrónico (Hou *et al.*, 2012). Nosotros hemos realizado este conteo en la cepa silvestre y en el mutante *rgf1Δ* y hemos visto que el mutante *rgf1Δ* presenta un 5,84% de células con Bub1 en los cinetocoros comparado con un 2,83% en el caso de la cepa silvestre ([figura 78B](#)). Estos valores son la media de 3 experimentos y la diferencia entre ambas cepas es estadísticamente significativa.

En conjunto, todos estos datos indican que las células del mutante *rgf1Δ* presentan un retraso en la entrada en anafase debido a la activación del SAC. Posiblemente, la activación prolongada del SAC en el mutante *rgf1Δ* esté causada por la captura ineficiente de los cinetocoros por parte de los microtúbulos durante la prometafase debida a la presencia de centrómeros desagrupados.

Otra posibilidad es que los posibles defectos en las interacciones cinetocoro-microtúbulo del mutante *rgf1Δ*, además de activar el SAC, sean el origen de la presencia de centrómeros desagrupados.



DISCUSIÓN

4

Rgf1 es el principal activador de Rho1 en la levadura *S. pombe* y desempeña una función esencial junto a Rgf2 durante el crecimiento vegetativo. La cepa *rgf1Δ rgf2Δ* es inviable (Mutoh *et al.*, 2005) y la sobreexpresión de *rgf2⁺* suprime totalmente el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *rgf1Δ* (García *et al.*, 2009b). Rho1 actúa como un núcleo central donde se integran diferentes señales, es una proteína esencial para la viabilidad celular y hasta hace muy poco no se habían descrito mutantes condicionales, necesarios para estudiar su papel en la señalización (Viana *et al.*, 2013). De hecho, la mayor parte de lo que sabemos sobre su función se debe al estudio de sus reguladores GEFs y GAPs.

Nuestro trabajo en *S. pombe* y el de muchos otros grupos, ha demostrado que cada GEF regula a la GTPasa en un momento determinado del ciclo y dependiendo del momento y del lugar, podría inducir una respuesta diferente. Por ejemplo en *S. cerevisiae* sabemos que los GEFs de Rho1, Rom2 y Tus1 no son intercambiables funcionalmente y activan diferentes rutas efectoras de Rho1 (Krause *et al.*, 2012). En células humanas hay 70 proteínas con un dominio Rho-GEF de las cuales 28 son activadores de RhoA, en *S. pombe* hay 8 proteínas con dominio Rho-GEF y 3 de ellas son activadores de Rho1 y en *S. cerevisiae* también se han descrito 3 Rho-GEFs como activadores de Rho1. Este exceso de activadores podría reflejar el papel específico de cada Rho-GEF para controlar los distintos mecanismos de señalización que contribuyen a la activación de la GTPasa.

En células humanas las Rho-GTPasas controlan la organización del citoesqueleto, que es un aspecto importante en la migración y en la proliferación celular, por lo que no es de extrañar que algunos Rho-GEFs se encuentren mutados o se

expresen de forma aberrante en diferentes tipos de cáncer (Cook *et al.*, 2013; Lazer y Katzav, 2011).

Las GTPasas de la familia Rho son proteínas conservadas, sabemos que RhoA de humanos y Rho1 de *S. pombe* suprimen el fenotipo termosensible de un mutante *rho1* de *S. cerevisiae*, esto nos anima a pensar que el conocimiento y la mecánica desarrollada en *S. pombe* puede ser extrapolable a organismos superiores.

1. CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS DE Rgf1

Nuestro objetivo es estudiar el papel de Rgf1 durante el crecimiento polarizado, específicamente en la transición de crecimiento monopolar a crecimiento bipolar conocida como NETO. Para ello, nos propusimos estudiar la relación de Rgf1 con quinasas y fosfatasa con una función conocida en NETO y también caracterizar motivos y dominios importantes en su localización subcelular y su función.

Los experimentos relacionados con el primer punto no han sido recogidos en la memoria. Nuestra estrategia consistió en sobreexpresar el gen *rgf1⁺* bajo el promotor *nmt 3X*, que es letal en un fondo genético silvestre, en mutantes de la quinasas *orb2-34*, *pom1Δ*, *kin1Δ*, *mkh1Δ* y *ssp1Δ*, todos ellos con defectos en NETO. Nosotros pensamos que si la función de Rgf1 dependiera de su fosforilación, la letalidad producida por la sobreexpresión de *rgf1⁺* en un plásmido podría ser suprimida, al menos parcialmente, en alguno de los mutantes de las quinasas mencionadas. También hicimos el mismo experimento en los mutantes de las fosfatasa Flp1, Dis2, Ppa1 y Ppa2, pero no obtuvimos ningún resultado concluyente ni en un caso ni en otro.

Los estudios de estructura-función recogidos en esta memoria indican que el extremo C'-terminal de Rgf1, que comprende los dominios PH y CNH, es esencial para la función de la proteína en la integridad y en la polaridad celular. Anteriormente habíamos demostrado que el dominio catalítico (Rho-GEF o DH) de Rgf1 también es esencial (García *et al.*, 2006a).

Los mutantes en el dominio PH presentan los mismos defectos que el mutante *rgf1Δ*, son monopolares, sensibles a caspofungina y presentan fenotipo *vic*. Este resultado no es extraño si tenemos en cuenta que el dominio PH puede tener un efecto alostérico o modulador sobre el dominio DH y que en muchos casos la actividad intercambiadora de nucleótidos de un GEF recae sobre el módulo DH-PH (Schmidt y Hall, 2002a; Viaud *et al.*, 2012). Curiosamente, la proteína que tiene una deleción en el dominio PH se localiza exclusivamente en el polo viejo. Estos resultados sugieren, 1) que los mecanismos de los que depende la localización de Rgf1 en cada uno de los polos son diferentes, y 2) que la presencia de Rgf1 en el polo viejo no depende de la contribución del dominio PH a la actividad catalítica de Rgf1 sobre Rho1 ni de su posible función como nexo de unión a los lípidos de la membrana.

Sabemos que el dominio CNH es esencial para la función de Rgf1 tanto desde el punto de vista de la integridad celular como de la polaridad pero no sabemos por qué. Este dominio fue descrito por primera vez en la proteína quinasa Citron, que es un efector de las GTPasas Rho y Rac (Madaule *et al.*, 1995) y está presente en el extremo carboxilo de algunas quinasas como NIK y TNIK que participan en la activación de la quinasa Jun (JNK) (Fu *et al.*, 1999; Su *et al.*, 1997). Este dominio podría regular la actividad quinasa y también

media la unión a las formas activas de Rho y Rac. En levaduras aparece en los GEFs de *S. cerevisiae* Rom1 y Rom2 (Bickle *et al.*, 1998; Ozaki *et al.*, 1996) y en Rgf1, Rgf2 y Rgf3 de *S. pombe* (García *et al.*, 2009b; García *et al.*, 2006a).

El dominio CNH forma parte de la superfamilia de propulsores-β o hélices-β que presentan estructuras en forma de disco, las cuales se ensamblan en torno a un canal central (Chen *et al.*, 2011). Esta característica les permite unirse a ligandos y reconocer superficies y también podrían actuar como "organizadores de complejos multimoleculares". Debido a estas propiedades, el dominio CNH de Rgf1 podría estar mediando su asociación a otras proteínas necesaria para su función o incluso su unión a la GTPasa Rho1.

Las proteínas Rgf1-CNH1Δ-GFP y Rgf1-CNH2Δ-GFP se localizan en el polo viejo, mientras que en el polo nuevo sólo hay una cantidad muy pequeña. Este patrón de localización podría explicar el crecimiento monopolar de las cepas mutantes pero, igual que en el caso del dominio PH, no sabemos si el defecto en la localización es debido a un defecto en la función o viceversa.

Quizás el resultado más importante de estos experimentos fue que la proteína Rgf1 mutada en el dominio DEP (*Dishevelled*, *Egl-10* and *Pleckstrin*) se acumulaba en el núcleo. Posteriormente vimos que este dominio se encuentra muy cerca de una NLS canónica y que esto no es un artefacto puesto que hemos demostrado que la proteína se acumula en el núcleo en respuesta a HU.

Los dominios DEP son dominios de aproximadamente 100 aa, constan de un núcleo de tres α-hélices y una horquilla de un número variable de hojas-β y están muy conservados tanto a nivel de

estructura como a nivel de secuencia. Sin embargo, a pesar de su similitud, los dominios DEP de diferentes proteínas muestran una interfaz diferente que les permite unirse con distintos ligandos, lípidos de membrana u otros dominios dentro de la misma proteína y, por tanto, desempeñar funciones variadas principalmente en la regulación de la transducción de señales (Consonni *et al.*, 2014).

Nosotros hemos analizado el efecto de la delección del dominio DEP o de una mutación puntual en la hélice $\alpha 1$ en la localización y en la función de Rgf1 y en ambos casos el resultado es casi idéntico. Es posible que la inserción de dos prolina -que son aminoácidos muy rígidos- en medio de una hélice- α desorganice la estructura de todo el dominio y por eso la mutación puntual en el dominio DEP (FPTP) se comporta de forma similar a su delección. La ausencia del dominio DEP de Rgf1 no produce ningún fenotipo aparente; sin embargo, estas mutaciones han desenmascarado nuevos puntos de regulación de la localización subcelular de la proteína y fueron la primera pista para comenzar a estudiar la relación entre Rgf1 y el estrés replicativo.

La delección del extremo N'-terminal de la proteína, tampoco tiene repercusiones graves en la función de Rgf1. Las células de los mutantes *rgf1-N1 Δ* y *rgf1-N2 Δ* no se lisan, no son sensibles a caspofungina y tampoco son monoplares. Sin embargo, tal y como ocurre en muchos GEFs, la región N'-terminal podría tener un papel regulador ya que contiene numerosos sitios de fosforilación consenso para varias quinasas y regiones ricas en prolina o PRMs que están descritas como ligandos para los dominios SH3 y median interacciones proteína-proteína (Ball *et al.*, 2005). El análisis de la localización de las proteínas Rgf1-N1 Δ -GFP y Rgf1-N2 Δ -GFP y del fragmento Rgf1-N302 indican

que esta región podría ser necesaria para que la proteína se mantenga anclada a los extremos de la célula, evitando que se disperse lateralmente por la membrana plasmática (figura 31). También puede tener un papel auto-inhibitorio ya que la sobreexpresión del gen *rgf1⁺* sin su extremo N'-terminal es más deletéreo que la sobreexpresión del gen silvestre (figura 29).

Varias líneas de evidencia sugieren que la región N'-terminal tiene un papel fundamental en la localización subcelular de Rgf1: 1) Una delección del dominio DEP o una mutación puntual que desorganiza su estructura induce la relocalización de la proteína en el núcleo; 2) Rgf1 lleva una secuencia NLS funcional muy cerca del dominio DEP que dirige el transporte del extremo N'-terminal al núcleo. La mutación de esta secuencia provoca que un fragmento del extremo N'-terminal de Rgf1 fusionado a la GFP, Rgf1-N302-535-GFP, pase de localizarse en el núcleo a hacerlo en el citoplasma; 3) La localización nuclear constitutiva de la proteína Rgf1-DEP Δ -GFP es abolida cuando mutamos la NLS.

2. Rgf1 SE ACUMULA EN EL NÚCLEO EN PRESENCIA DE HU

Estas observaciones sugieren que la delección del dominio DEP podría llevar a una desorganización de la estructura del extremo N'-terminal que dejara expuesta la NLS y nos llevaron a pensar que en condiciones normales la NLS de Rgf1 puede estar enmascarada y por eso la proteína está excluida del núcleo. Por ello analizamos la localización de la proteína silvestre Rgf1-GFP en presencia de distintos tipos de estrés y vimos que en presencia de HU la proteína se re-localiza en el núcleo, probablemente a través del mismo tipo de re-organización producida al manipular el dominio

DEP.

Este cambio en la localización es específico del estrés replicativo causado por la HU y del daño en el DNA producido por el agente alquilante MMS (no mostrado), pero no se produce en presencia de otros tipos de estrés como *heat-shock*, estrés osmótico o el estrés nutricional que desencadena la conjugación. Además, es característico de Rgf1 entre los GEFs descritos para Rho1 en *S. pombe* puesto que ni Rgf2-GFP ni Rgf3-GFP se acumulan en el núcleo en presencia de HU (figuras 34 y 36).

Los cambios en la localización de Rgf1 en respuesta a la activación del *checkpoint* de replicación no han sido descritos en ninguna de las proteínas Rho-GEF caracterizadas hasta la fecha. En *S. cerevisiae* Rom2 y Tus1 son los homólogos más cercanos a Rgf1 y activan selectivamente diferentes efectores a través de Rho1 (Kono et al., 2008; Krause et al., 2012; Yoshida et al., 2009). Rom2 se localiza en la superficie de la yema y en el cuello en citocinesis mientras que Tus1 únicamente se localiza en el cuello. Sería interesante saber si alguna de estas dos proteínas es retenida en el núcleo en presencia de estrés replicativo.

También nos preguntamos si la acumulación de Rgf1 en el núcleo durante el estrés replicativo tiene un propósito. Para responder a esta pregunta, analizamos la capacidad del mutante *rgf1Δ* para crecer en presencia de distintos tipos de agentes que causan daño en el DNA y vimos que las células del mutante nulo no crecen en HU y campotecina pero sí lo hacen en presencia de MMS y tras ser irradiadas con luz UV, mientras que la cepa silvestre crece en todas las condiciones ensayadas.

Además, la capacidad de Rgf1 para promover la tolerancia a HU depende de su actividad ca-

talítica y de sus dominios PH y CNH. Los mutantes *rgf1-PTTR*, *rgf1-PHA*, *rgf1-CNH1Δ* y *rgf1-CNH2Δ*, son sensibles a la droga mientras que los mutantes en extremo N'-terminal o en el dominio DEP crecen de forma similar a la cepa silvestre (figura 48). Este patrón es casi idéntico al obtenido cuando estudiábamos la contribución de los distintos dominios a las funciones de integridad y polaridad celular, por lo que es probable que la proteína funcione de forma parecida en el núcleo y en los polos celulares.

Rgf1 desaparece del núcleo en cuanto se elimina la droga del medio, lo que sugiere la existencia de un mecanismo "estímulo-respuesta" que relacione la acumulación de Rgf1-GFP en el núcleo y la presencia de HU. Después del tratamiento con HU, la salida del núcleo de Rgf1 está mediada por dos secuencias de exporte nuclear, NES1, NES2 y por la exportina Crm1, encargada del exporte de proteínas con elementos NES; la contribución de cada uno de estos motivos es muy desigual siendo mayoritaria la de NES1 aunque no podemos descartar que hay otras secuencias que también participen en este proceso.

En los mutantes *rgf1(*NES1)-GFP* y *crm1-809*, que tienen bloqueada la salida por diferente motivo, hay un alto porcentaje de células con Rgf1-GFP en el núcleo en ausencia de HU, esto junto con el hecho de que la proteína silvestre también se acumula en el núcleo en presencia de LMB, sugiere que Rgf1 podría entrar y salir del núcleo en ausencia de estrés pero sólo la podemos detectar cuando bloqueamos la salida de este compartimento. También es posible que Rgf1 pueda tener una función en el núcleo en ausencia de estrés y que esta función que en condiciones normales pasa desapercibida se convierte en esencial en condiciones de estrés replicativo.

3. ¿CÓMO SE REGULA EL TRANSPORTE NUCLEO-CITOPLÁSMICO DE Rgf1?

Además de los elementos en *cis* de la propia secuencia de Rgf1, su acumulación en el núcleo en respuesta a HU depende de Rad24, que pertenece a la familia de proteínas 14-3-3 y de Cds1, la quinasa efectora del *checkpoint* de bloqueo en replicación. Sabemos que en ausencia de Rad24 o Cds1, Rgf1-GFP no se acumula en el núcleo en respuesta a HU. Sin embargo, si bloqueamos el exporte nuclear de forma exógena utilizando LMB, la proteína se acumula en el núcleo en los mutantes *rad24Δ* y *cds1Δ*. Esto demuestra que su entrada es independiente de Rad24 y de Cds1 y que ambas proteínas probablemente actúan regulando la acumulación de Rgf1 en el núcleo mediante la inhibición de su salida de este compartimento.

Los miembros de la familia de proteínas 14-3-3 presentan funciones celulares muy variadas, pero casi siempre interactúan con proteínas fosforiladas, estabilizándolas, modificando su conformación o su localización (Reinhardt y Yaffe, 2013; van Heusden y Steensma, 2006). Existen varios ejemplos de Rho-GEFs regulados por proteínas 14-3-3 en células de mamífero. En algunos casos, la unión al adaptador 14-3-3 activa una ruta, por ejemplo, la localización de Tiam1 en los complejos integrina depende de 14-3-3ζ, donde media la activación de Rac1 e induce la motilidad (O'Toole *et al.*, 2011). En otros, tiene un efecto inhibitorio; por ejemplo, la unión a proteínas 14-3-3 inhibe la actividad GEF de Syx, un GEF de RhoA que se localiza en las uniones intercelulares y las estabiliza (Ngok *et al.*, 2013).

Nuestros resultados sugieren que Rad24 interactúa con Rgf1 y podría enmascarar sus motivos NES impidiendo su salida del núcleo. Se ha

descrito un mecanismo similar para la localización nuclear de Chk1 en respuesta a daño en el DNA. En este caso, la interacción entre Rad24 y Chk1 provoca una reducción de la asociación de Chk1 con Crm1 y en consecuencia su acumulación en el núcleo (Dunaway *et al.*, 2005).

La localización nuclear de Rgf1 en respuesta a HU depende de que el *checkpoint* de replicación esté activo. En primer lugar, existe un mecanismo "estímulo-respuesta", Rgf1 se acumula en el núcleo en presencia de la droga y desaparece al desaparecer el estímulo; En segundo lugar, este cambio de localización no se produce en mutantes de las quinasas sensora y efectora del *checkpoint*, *rad3Δ* y *cds1Δ*, respectivamente.

Entre los efectores del *checkpoint* se encuentran reguladores del ciclo celular y un gran número de enzimas encargadas de remodelar y reparar el DNA. Nuestros datos sugieren que Rgf1 podría ser uno de esos efectores. Es posible que Rgf1 sea sustrato de fosforilación de Cds1, puesto que la mutación de al menos 6 de los 9 posibles sitios de fosforilación por Cds1 (RXXS) de Rgf1 impide la acumulación de la proteína en el núcleo en presencia de HU.

La mutación de estos sitios no afecta a la actividad catalítica de la proteína -el mutante *rgf1-6A* no es sensible a Csp- y sin embargo sí afecta a su función nuclear -el mutante *rgf1-6A* es sensible a HU-. Además, como era de esperar y como ocurre en el mutante *cds1Δ*, el defecto en la acumulación de la proteína en el núcleo en los mutantes fosfodeficientes *rgf1-9A-GFP* y *rgf1-6A-GFP* se debe a un fallo en la inhibición de su exporte nuclear y no en la entrada al núcleo. Estos resultados relacionan directamente la presencia de Rgf1 en el núcleo con su función en este compartimento.

También hemos visto que Rgf1 interacciona con Cds1 en experimentos de co-precipitación y que la sobreexpresión del gen *cds1*⁺ bajo el control del promotor *nmt1*, produce una banda de Rgf1 que migra de forma retrasada en geles de poliacrilamida y que podría ser de fosforilación.

Estos datos sitúan a Rgf1 como un efector de Cds1, pero se trata de un caso especial porque en respuesta a estrés replicativo, Rgf1 parece desempeñar una función aparentemente diferente de su papel habitual en morfogénesis. En primer lugar, vimos que en los mutantes *rgf1-9A* y *rgf1-6A* el porcentaje de células monopolares es similar al del la cepa silvestre, tanto en presencia como en ausencia de HU (no mostrado). En segundo lugar, la actividad de Cds1 no es la causa del defecto en NETO del mutante *rgf1Δ* puesto que las células *cds1Δ rgf1Δ* muestran los mismos defectos en polaridad que el mutante simple *rgf1Δ* (no mostrado). En resumen, nuestros datos indican que Cds1 no actúa sobre Rgf1 para regular NETO como en el caso de la calcineurina (Kume *et al.*, 2011), aunque todavía se sabe muy poco de la relación entre Cds1 y NETO.

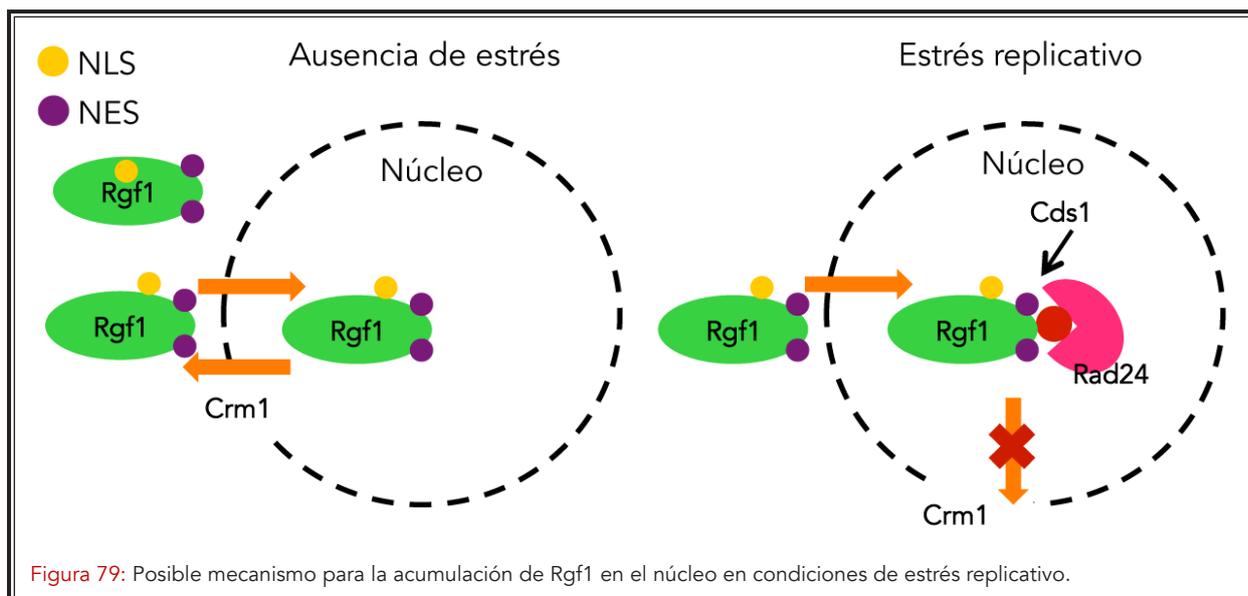
El sitio de unión consenso para las proteínas 14-3-3 es R-S-X-pS/pT o R-X-X-X-pS/pT (donde pS y pT son residuos de serina o treonina fosforilados y X cualquier aminoácido) (Reinhardt y Yaffe, 2013; Yaffe *et al.*, 1997). En el caso de Rgf1, la mutación de los 9 sitios RXXS a RXXA elimina por completo su interacción con Rad24 lo que sugiere que la fosforilación de Cds1 en alguno de los sitios RXXS podría activar un sitio de unión para Rad24.

Sin embargo, nosotros hemos visto que Rgf1 y Rad24 interaccionan independientemente de la presencia o ausencia de Cds1 y también lo hacen tanto en presencia como en ausencia de es-

trés replicativo. Esto indica que la regulación de Rgf1 a través de Rad24 no se limita únicamente a condiciones de estrés replicativo y en segundo lugar que debe existir otra/s quinasa/s diferente/s de Cds1 responsable de la fosforilación de los sitios RXXS de Rgf1 para activar sitios de unión a Rad24. La presencia de otra posible quinasa que fosforile a Rgf1 en otras condiciones diferentes también podría explicar por qué no hemos encontrado diferencias en la migración de la proteína Rgf1-GFP proveniente de extractos de células tratadas con HU o sin tratar, ni de los obtenidos de células con un fondo genético silvestre o *cds1Δ* incluso en geles de Phos-Tag™.

Los motivos RXXS también son sitios consenso de fosforilación para las NDR quinastas (Mah *et al.*, 2005), como las quinastas efectoras de las rutas SIN y MOR de *S. pombe*, Sid2 y Orb6 respectivamente. Por ejemplo, Sid2, mantiene a la fosfatasa Flp1 en el citoplasma al final de la mitosis fosforilando a Flp1 directamente en los sitios RXXS y creando sitios de unión a la proteína Rad24 (Chen *et al.*, 2008). En relación con este trabajo, en experimentos de espectrometría de masas a gran escala, se purificaron complejos precipitados con Rad24-TAP en células con la ruta SIN constitutivamente activa y en células con la ruta SIN constitutivamente inactiva y se seleccionaron fosfopéptidos que únicamente aparecían unidos a Rad24-TAP cuando la ruta estaba activa. Entre estos fosfopéptidos se identificaron tres de los nueve sitios RXXS de Rgf1 (Gupta *et al.*, 2013), por lo que Rgf1 podría ser un buen candidato para la regulación por Sid2/Rad24.

En este sentido, sabemos que Rgf1 desaparece de los polos en células que sobreexpresan *rad24*⁺ y su localización pasa a ser mayoritariamente citoplasmática (no mostrado), esto sugiere que



Rad24 podría estar participando en la extracción de Rgf1 de la membrana plasmática en colaboración con alguna de estas quinasas.

Con los datos obtenidos, hemos propuesto un modelo que se muestra en la [figura 79](#). En condiciones normales, Rgf1 entra en el núcleo transitoriamente, y una vez dentro, los motivos NES quedarían expuestos y serían reconocidos por Crm1 facilitando su salida. Sin embargo, cuando la replicación está bloqueada y el *checkpoint* de replicación activo, la fosforilación de Rgf1 por Cds1 en alguno de los sitios RXXS crearía sitios de unión para Rad24. La unión de Rad24 a Rgf1 escondería los motivos NES, que en estas condiciones ya no podrían ser reconocidos por Crm1 manteniendo la proteína en el núcleo. Cuando el *checkpoint* se desactiva la proteína ya no es retenida por Cds1/Rad24 y sale del núcleo.

4. ¿CUÁL ES LA FUNCIÓN DE Rgf1 EN EL NÚCLEO CUANDO SE ACTIVA EL CHECKPOINT DE REPLICACIÓN?

Como muchos de los mutantes en genes que participan en el *checkpoint*, las células del mutante *rgf1Δ* son sensibles a HU. Sin embargo, a

diferencia de estos mutantes, -que no responden y, por lo tanto, no paran el ciclo- las células del mutante *rgf1Δ* ralentizan el ciclo celular en presencia de la droga. Nos preguntamos entonces qué podría causar la sensibilidad a HU en el mutante nulo y nuestras reflexiones y especulaciones se resumen a continuación.

Las células *rgf1Δ* muestran un retraso en la re-entrada al ciclo celular tanto en presencia de HU como tras retirar la droga del medio. Donde mejor se observa este retraso es en la primera ronda de septación tras la liberación del bloqueo con HU ([figura 65C](#)). La sensibilidad del mutante *rgf1Δ* frente a un tratamiento crónico con HU podría ser la consecuencia de múltiples rondas de re-entrada ineficiente. Además, este fenotipo también explica por qué después de un tratamiento agudo con la droga no vemos pérdida de viabilidad de las células. En este caso la única diferencia entre el silvestre y el mutante nulo está en la recuperación después de una única ronda de replicación lo que apenas contabiliza después de múltiples generaciones en ausencia de la droga, que es como se determina la viabilidad.

Sin embargo, seguimos sin saber cual es la

causa de la “poco” eficiente recuperación tras un bloqueo en la replicación en el mutante *rgf1*. Una posibilidad es que la presencia de focos de daño en el DNA (Rad22-YFP) en el mutante *rgf1Δ* podría activar la rama del checkpoint de Chk1. El porcentaje de células con más de un foco de Rad22-YFP es mayor en el mutante *rgf1Δ* que en la cepa silvestre tanto en presencia como en ausencia de HU y los focos de Rad22 persisten durante más tiempo tras la liberación de un bloqueo con HU (figura 66).

Rad22 (scRad52) es una proteína que participa en la reparación de DSBs por recombinación homóloga (HR) promoviendo el intercambio de RPA por Rhp51(scRad51) en los extremos protuberantes de ssDNA generados tras la resección de los DSBs para generar un filamento nucleoproteico que invadirá el dsDNA de la cromátida hermana para formar la estructura conocida como “D-loop” (Kim et al., 2000). La presencia de proteínas de la maquinaria de recombinación durante la replicación se debe a la reparación de horquillas que se han roto o colapsado por no estar correctamente estabilizadas (Noguchi et al., 2003). Así, la presencia de un mayor número de células con más de un foco de Rad22-YFP en el mutante *rgf1Δ* podría deberse bien a un defecto en la estabilización de las horquillas de replicación durante el tratamiento con HU, o bien a defectos en la reparación de horquillas colapsadas que causarían una acumulación de intermediarios de recombinación no resueltos marcados con Rad22-YFP.

A favor de esta hipótesis está el hecho de que la delección de *chk1⁺* en el mutante *rgf1Δ* suprime su retraso en el ciclo celular en presencia de HU y que el mutante doble *chk1Δ rgf1Δ* es más sensible a HU que el mutante *rgf1Δ*. Sin embargo, no hemos sido capaces de detectar activación de Chk1 en el mutante *rgf1Δ*, ni en presencia de HU

ni tras la liberación del bloqueo en replicación. Por otro lado, recientemente se ha descrito en diferentes organismos que la maquinaria de HR tiene un papel en la estabilización de las horquillas y en el reinicio de la replicación tras un bloqueo en zonas “difíciles de replicar” como las barreras de replicación o las zonas con alta tasa de transcripción. Curiosamente, en estos casos, la presencia de roturas en el DNA no es un requisito para que la maquinaria de HR se localice en las horquillas de replicación (Carr y Lambert, 2013; Lambert et al., 2010). Esto indica que no en todos los casos Rad22-YFP está marcando sitios de daño en el DNA y por lo tanto, no siempre la presencia de la maquinaria de HR está acompañada de una activación del checkpoint (Bass et al., 2012).

Sin embargo, si el mutante *rgf1Δ* no muestra activación de Chk1 tras la liberación del bloqueo en replicación, el retraso en el ciclo celular que observamos tendría que explicarse de otra manera diferente. Una posibilidad sería la regulación de los niveles de Cdc25, que como hemos visto son más bajos en *rgf1Δ* (figura 70).

5. ¿CUÁL ES LA RELACIÓN ENTRE LA FUNCIÓN DE *Rgf1* EN EL NÚCLEO Y *Rho1*?

Se han descrito pocos Rho-GEFs que se localicen en el núcleo de la célula, y en la mayoría de los casos, esta localización se interpretó como una forma de mantener el GEF alejado de su GTPasa correspondiente para mantenerla inactiva. En células de mamífero, al menos dos GEFs específicos de RhoA (la proteína homóloga de Rho1 de *S. pombe*), Net1 y Ect2, se localizan en el núcleo durante la mayor parte del ciclo celular. En el caso de Net1, la relocalización de la proteína desde el núcleo al citoplasma mediante delección de su NLS lleva a la activación de RhoA y a la formación de

fibras de estrés (Schmidt y Hall, 2002b). Ect2 se localiza en el núcleo en células en interfase, pero tras la ruptura de la envuelta nuclear durante la mitosis es liberada al citoplasma para activar la contracción del anillo de actomiosina a través de RhoA (Chalamalasetty *et al.*, 2006; Wolfe *et al.*, 2009).

Sin embargo, recientemente se ha propuesto un papel activo en el núcleo tanto para Net1 como para Ect2. Net1 activa a RhoA en el núcleo en respuesta a radiación ionizante (Dubash *et al.*, 2011) mientras que Ect2 regula el mantenimiento epigenético del centrómero mediante la estabilización de la histona CENP-A incorporada *de novo* (Lagana *et al.*, 2010).

En el caso de Rgf1, nosotros hemos demostrado que su acumulación en el núcleo en presencia de HU no impide su transporte a los polos. Además, la cantidad de Rho1 activo no disminuye en presencia de estrés replicativo, lo que sugiere que Rgf1 juega un papel activo en el núcleo en estas condiciones y que su acumulación en este compartimento no es un mecanismo para inhibir a Rho1 en los polos de la célula. Al contrario, parece que la función nuclear de Rgf1 está relacionada con la activación de Rho1 ya que tanto el mutante en el dominio DH de Rgf1 que tiene un defecto importante en la actividad GEF hacia Rho1, *rgf1-PTTR*, como una cepa termosensible que porta un alelo hipomórfico de la GTPasa Rho1, *rho1-596*, son sensibles a HU. En este sentido, hemos visto que una versión de la proteína Rho1 no prenilable, GFP-Rho1-Stop, se localiza en el núcleo (figura 59).

Varios estudios en células de mamífero han descrito la presencia en el núcleo tanto de las GTPasas de la familia Rho como de sus efectores, como es el caso de RhoA y sus dianas mejor conocidas, las quinasas ROCK I y ROCK II (Bhowmick

et al., 2003; Dubash *et al.*, 2011; Rajakyla y Vartiainen, 2014; Tanaka *et al.*, 2006). También se han encontrado en el núcleo numerosas proteínas de unión a actina que son efectores conocidos de las GTPasas de la familia Rho (Rajakyla y Vartiainen, 2014).

En los últimos años se ha descubierto que la actina nuclear juega un papel muy importante en la regulación de la transcripción así como en el remodelamiento de la cromatina y en la reparación de DSBs (Andrin *et al.*, 2012; Treisman, 2013). Sin embargo se desconoce cómo está regulada la actina en el núcleo y no sería raro que las GTPasas de la familia Rho regulasen la polimerización de actina en el núcleo al igual que lo hacen en el citoplasma (Rajakyla y Vartiainen, 2014).

Recientemente se ha descrito que el estrés replicativo causado por HU induce el incremento de los niveles de actina nuclear en células de mamífero (Johnson *et al.*, 2013), este dato sugiere una posible función para la actina nuclear durante el estrés replicativo y nos lleva a pensar que en nuestro sistema, Rgf1 y Rho1 podrían promover la tolerancia al estrés replicativo mediante la regulación de la actina nuclear. También sería interesante estudiar si Rgf1/Rho1 tienen otras dianas desconocidas en el núcleo, por ejemplo proteínas implicadas en la estabilidad de las horquillas, la progresión de la replicación, el remodelamiento de la cromatina o la reparación de horquillas colapsadas.

6. PAPEL DE Rgf1 EN LA SEGREGACIÓN CROMOSÓMICA

Gracias al estudio de las versiones mutadas de Rgf1 también hemos descubierto que la proteína se localiza en el cuerpo polar del huso (SPB). En el SPB de *S. pombe* se localizan proteínas con

funciones muy variadas como la organización del citoesqueleto de microtúbulos, el control de la entrada en mitosis o la regulación de la contracción del anillo de actomiosina (Johnson *et al.*, 2012; Meadows y Millar, 2013; Sawin y Tran, 2006).

Hemos recopilado una serie de datos que indican que el mutante *rgf1Δ* presenta defectos en el mecanismo de segregación cromosómica: 1) las células *rgf1Δ* son hipersensibles a agentes despolimerizantes de microtúbulos, una característica muy habitual en los mutantes en genes implicados en este proceso; 2) el mutante *rgf1Δ* muestra una tasa de pérdida del minicromosoma artificial Ch16 por división significativamente mayor que la de la cepa silvestre; 3) hemos detectado en nuestro mutante un defecto en la disposición de los centrómeros junto al SPB durante la interfase y 4) hemos demostrado que las células del mutante *rgf1Δ* presentan un retraso en la entrada en anafase debido a la activación del SAC.

Estos fallos durante la segregación cromosómica del mutante *rgf1Δ* podrían estar causados por la ausencia de Rgf1 en el núcleo; por ejemplo, si su función en el núcleo estuviese relacionada con la topología del DNA o con el silenciamiento de la cromatina, o si las células *rgf1Δ* llegasen a mitosis con el DNA dañado o mal replicado. Sin embargo, la presencia de la proteína en el SPB y no en el centrómero y, sobre todo, las fuertes interacciones genéticas de *rgf1Δ* con mutantes en genes que codifican proteínas implicadas en la interacción física cinetocoro-microtúbulo y muy relacionadas con los microtúbulos (como Alp14, Dis1 y las proteínas del complejo DASH) nos inclinan a pensar que Rgf1 participa de alguna manera en esta interacción cinetocoro-microtúbulo y/o en el control del citoesqueleto de microtúbulos.

Curiosamente, la participación de los dife-

rentes dominios de Rgf1 en la supervivencia en presencia de agentes despolimerizantes de microtúbulos presenta un patrón diferente al de la aportación de los dominios a la integridad celular y la polaridad o a la función nuclear de Rgf1. Los mutantes en los dominios DEP, DH y PH, es decir, la parte central de la proteína presentan sensibilidad a MBC, mientras que los mutantes en los extremos de la proteína, tanto en el N'-terminal como en el dominio CNH, crecen de forma parecida a la cepa silvestre.

En este sentido, en la zona central de la proteína Rgf1 hemos encontrado un motivo SXIP (dónde S es serina, I isoleucina P prolina y X cualquier aminoácido). Este motivo es específicamente reconocido por el dominio EBH (*EB Homology*) de las proteínas EB, como Mal3 en el caso de *S. pombe*, y está presente en muchas proteínas asociadas al extremo (+) de los microtúbulos (Buey *et al.*, 2012). Sería interesante mutar este motivo en el gen *rgf1+* y determinar si tiene algún papel en el crecimiento en MBC. También sería interesante ver si Rgf1 se asocia a los microtúbulos a través de este motivo, como lo hace la proteína GEF Rho-GEF2 de *Drosophila melanogaster* (Rogers *et al.*, 2004). Aunque en este momento es muy especulativo, si Rgf1 fuera una nueva proteína +TIP, esto podría explicar las interacciones genéticas que hemos encontrado con *alp14+*.

El gen *ROM2*, homólogo de *rgf1+* en *S. cerevisiae*, fue aislado en un escrutinio de supresores multicopia del mutante *cik1Δ* y también suprime el crecimiento termosensible del mutante *kar3Δ* (Manning *et al.*, 1997). La kinesina Kar3 y su pareja de interacción Cik1 están implicadas en la interacción entre los cinetocoros y los microtúbulos (Jin *et al.*, 2012), y el mutante *rom2Δ* es sensible a benomilo, un agente despolimerizante de microtúbulos

(Manning *et al.*, 1997). Estos datos sugieren que el papel de Rgf1 en el control de los microtúbulos y/o la segregación de los cromosomas están conservados en su homólogo Rom2 de *S. cerevisiae*.

En el caso de células de mamífero, se ha descrito la implicación de varios factores Rho-GEF en el proceso de la segregación cromosómica. Por ejemplo, Ect2 controla la actividad de Cdc42 durante prometáfase para regular el anclaje cinetocoro-microtúbulo (Oceguera-Yanez *et al.*, 2005), GEF-H1/Lfc afecta el ensamblaje del cinetocoro mediante la regulación de RhoA en algunos tipos celulares (Bakal *et al.*, 2005) y ARHGEF10 controla la duplicación del centrosoma activando a RhoA (Aoki *et al.*, 2009).

Recientemente, se ha descrito que el homólogo de Rgf1 en células de mamífero, Net1, es necesario para el alineamiento de los cromosomas durante metafase y para la generación de uniones cinetocoro-microtúbulo estables, por lo que la inhibición de la expresión de Net1 resulta en la activación del SAC. Sin embargo, estas funciones de Net1 son independientes de su actividad intercambiadora de nucleótidos (Menon *et al.*, 2013).

Nuestros datos indican que la función de Net1 en la generación de uniones cinetocoro-microtúbulo estables podría estar conservada en Rgf1 pero, en este caso, la actividad intercambiadora de nucleótidos sí es importante para su función, lo que hace muy interesante estudiar la participación de Rho1 en este proceso.

El objetivo inicial al comienzo de este trabajo era comprender los mecanismos por los que Rgf1 regulaba la transición de crecimiento monopolar a crecimiento bipolar conocida como NETO. Esta transición tiene lugar mediante la acción coordinada de los citoesqueletos de microtúbulos y de actina. Quizás nos encontramos de nuevo en el punto de partida y solo conociendo la naturaleza de la interacción de Rgf1 con los microtúbulos seremos capaces de explicar el defecto en NETO que muestran las células del mutante *rgf1Δ*.



CONCLUSIONES

5

- 1) Hemos descrito una nueva función de Rgf1 en el núcleo de la levadura *S. pombe*. Rgf1 entra transitoriamente en el núcleo de la célula en un ciclo normal y se acumula en el núcleo en condiciones de estrés replicativo causado por HU.
- 2) Rgf1 participa en la tolerancia a HU y es necesaria para la recuperación tras un bloqueo en replicación.
- 3) La regulación del transporte nucleo-citoplásmico de Rgf1 depende de una secuencia de localización nuclear en el extremo amino-terminal y dos secuencias de exporte nuclear en el extremo carboxilo-terminal.
- 4) El extremo C'-terminal de la proteína Rgf1, que comprende los dominios PH y CNH, es esencial para la función de la proteína en la integridad celular, en la polaridad y en la tolerancia estrés replicativo y también participa en el anclaje de la proteína en el polo nuevo. El extremo N'-terminal de Rgf1 tiene una función reguladora.
- 5) La acumulación en el núcleo de Rgf1 en presencia de estrés replicativo está regulada por el *checkpoint* de bloqueo en replicación y por la proteína 14-3-3 Rad24. Cds1 y Rad24 promueven la acumulación de Rgf1 en el núcleo mediante la inhibición de su exporte nuclear, posiblemente mediado por la fosforilación de Rgf1 y su unión posterior a Rad24.
- 6) Rgf1 se localiza en el SPB y su ausencia provoca defectos en el proceso de segregación cromosómica posiblemente relacionados con la interacción cinetocoro-microtúbulo que activan el *Spindle Assembly Checkpoint*.



**MATERIALES Y
MÉTODOS**

6

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

El presente trabajo se ha realizado principalmente con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Para la realización de los experimentos de doble híbrido se ha utilizado la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* AH109. Tanto las cepas de *S. pombe* como las cepas de *S. cerevisiae* se conservan en glicerol al 15% a -78°C . Para los trabajos de clonación molecular se utilizaron las estirpes DH5 α y CJ236 de *Escherichia coli*. Las cepas de *E. coli* se conservan a -78°C en glicerol al 50%. Todas las cepas utilizadas se recogen en la [Tabla III](#) (Anexo I), donde se detalla su procedencia y su genotipo.

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1 Medios de Cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* son los descritos por (Moreno *et al.*, 1991): Medio rico (YES), medio mínimo (EMM o MM) y medio de esporulación (MEA), la composición de estos medios se describe en el Anexo II.

Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2%. Todos los medios fueron preparados con agua destilada (Milli-Rho) y esterilizados en el autoclave.

La selección de cepas resistentes a antibióticos se realizó añadiendo a los medios de cultivo sulfato de geneticina (G-418) a una concentración final de 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$, clonNat a una concentración 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ o higromicina B a una concentración de 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a partir de soluciones stock esterilizadas por filtración que se detallan en la [Tabla V](#) (Anexo II), después de la esterilización en el autoclave.

Para el cultivo de cepas auxótrofas, se añadieron al medio mínimo los suplementos necesarios (adenina, leucina, uracilo, histidina y/o lisina) a partir de soluciones concentradas y esterilizadas previamente en el autoclave y para la selección y/o cultivo de estirpes transformadas con plásmidos, se eliminó del medio el/los suplementos correspondientes.

La represión de los genes controlados por el promotor *nmt* se realizó añadiendo tiamina al MM a una concentración final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para inducir la expresión de los genes regulados por este promotor las células se lavaron 3 veces con agua estéril y se

resuspendieron en medio fresco sin tiamina.

Cuando fue necesario, los medios empleados para el crecimiento de *S. pombe* se suplementaron con diversos compuestos como caspofungina, FK506, MgCl_2 , hidroxíurea, leptomicina B, camptotecina, MMS, latrunculina A, MBC y TBZ. Todos ellos se añadieron al medio a la concentración final indicada para cada experimento a partir de soluciones más concentradas esterilizadas por filtración. Estas soluciones se describen en la [Tabla V](#) (Anexo II). En el caso del KCl, ya que no es soluble en YES a una concentración de 1,2 M; se preparó medio YES 2x y se mezcló con una solución de KCl 2,4M en una proporción 1:1 tras su esterilización en el autoclave.

2.2 Medios de Cultivo para *S. cerevisiae*

Los medios utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. cerevisiae* son: medio rico (YEPD) y medio selectivo (YNB), la composición de estos medios se describe en el Anexo II.

Para mantener la presión selectiva en las

cepas transformadas con plásmidos, se empleó una mezcla de aminoácidos sin el suplemento correspondiente. Para preparar los medios sólidos se añadió agar al 2%.

2.3 Medios de Cultivo para *E. coli*

Los medios utilizados para el crecimiento de *E. coli* son el medio LB y el 2xYT que se describen en el Anexo II.

Para seleccionar clones bacterianos resistentes a antibióticos, los medios de *E. coli* se suplementaron con ampicilina (100 µg/ml) o kanamicina (30 µg/ml). Los medios sólidos se prepararon con agar al 2%.

3. CONDICIONES Y ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO

3.1 Condiciones de cultivo para *S. pombe* y *S. cerevisiae*

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de *S. pombe* o *S. cerevisiae*. Para conseguir cultivos de *S. pombe* o *S. cerevisiae* en crecimiento exponencial, se seleccionaron colonias aisladas, cuyas características genéticas se habían comprobado anteriormente, y con ellas se inocularon de 3 a 5 ml del medio correspondiente. El cultivo se incubaba a la temperatura apropiada hasta que las células entraban en fase estacionaria temprana. A continuación, se inoculaba con este cultivo otro mayor, teniendo en cuenta el tiempo de generación de la levadura en cada medio de cultivo.

Todas las placas y matraces se incubaron a la temperatura requerida por el experimento concreto, normalmente 25°C, 28°C, 32°C o 36°C. Para

que la aireación sea la adecuada, los cultivos líquidos se mantuvieron con una agitación de 200-250 rpm y el volumen del cultivo nunca superó 1/5 del volumen del matraz. El crecimiento de la levadura en medio líquido se controló midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro Hitachi U-2001 y recurriendo a tablas de calibración obtenidas previamente. Según estas tablas, una densidad óptica (DO_{600}) de 1 se corresponde aproximadamente con 10^7 células/ml. Cuando fue necesario se determinó el número de células mediante recuento directo con cámara Thoma.

El mantenimiento de las cepas se realizó por resiembras en placas de medio sólido.

3.2 Condiciones de cultivo para *E. coli*

Las células de *E. coli* se incubaron en medio líquido con agitación orbital de 200-250 rpm a una temperatura de 37°C. Para el crecimiento en medios sólidos las células se incubaron en estufas a 37°C.

4. MÉTODOS GENÉTICOS

Para la construcción de dobles mutantes, o la introducción en determinadas cepas de proteínas integradas en el genoma y marcadas con algún epítipo o proteína fluorescente, se realizaron cruces genéticos entre las cepas parentales correspondientes.

Finalmente se analizaron las colonias resultantes y se seleccionaron los clones que portaban las mutaciones de interés, los marcadores, epítipos, así como las auxotrofías y el tipo sexual adecuado.

4.1 Conjugación

Los experimentos de conjugación se realizaron utilizando estirpes heterotáticas de distinto sexo (h^+ y h^-). Para poner los cruces las cepas se sembraban en placas de YES hasta alcanzar la fase estacionaria (48 horas). Aproximadamente, se recogía el mismo número de células de la estirpe h^+ y h^- y se mezclaba en un pequeño volumen de agua estéril (20 μ l). A continuación la mezcla se extendía en una placa de MEA. Los zigotos se forman al cabo de 12 a 20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 1-2 días de incubación a 28°C.

4.2 Aislamiento de ascosporas azar o técnica "random spores"

Para obtener esporas, se hicieron suspensiones en agua estéril de las mezclas de conjugación incubadas durante 2 días a 28°C en placas de MEA, y se trataron con 2 μ l de β -glucuronidasa arilsulfatasa -EC 3.2.1.31; EC 3.1.6.1- (Roche) durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Este tratamiento destruye las paredes celulares de las células vegetativas, sin afectar a las ascosporas, que poseen una pared más resistente. Se recogieron las esporas por centrifugación a 3000 rpm durante 1 minuto. La mezcla de esporas fue lavada 4 veces con agua estéril y con la ayuda de una cámara Thoma se estimó el número de esporas por mililitro. Se realizaron las diluciones apropiadas para obtener entre 100 y 1000 esporas por placa y se extendieron en placas de YES. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C-28°C. Mediante réplica en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado.

5. TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLCULAR

5.1 Obtención de DNA

La extracción de DNA plasmídico a partir de bacterias se realizó usando el método de la lisis alcalina, (Zhou *et al.*, 1990), en el que las células se rompen en presencia de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). El DNA es precipitado posteriormente con etanol. Cuando se necesitó DNA de mayor pureza o concentración, se utilizaron los "Kit" Wizard® Plus SV Minipreps DNA purification System o Wizard® Plus Midipreps DNA purification System de Promega, en función de la cantidad de DNA que fuese necesaria.

Para la obtención de DNA plasmídico y genómico de *S. pombe* se siguieron los protocolos descritos por (Moreno *et al.*, 1991).

5.2 Tratamientos enzimáticos del DNA

Todos los protocolos usados para manipular el DNA se recogen en publicaciones de (Ausubel *et al.*, 1995; Sambrock y Russell, 2001), teniendo en cuenta las recomendaciones de los diferentes proveedores. Los principales tratamientos enzimáticos realizados fueron los siguientes:

- 1) Digestiones con endonucleasas de restricción.
- 2) Ligación mediante la enzima DNA ligasa del fago T4.
- 3) Fosforilación del extremo 3' de oligonucleótidos con la polinucleótido quinasa del fago T4.
- 4) Creación de extremos romos utilizando: el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* o la DNA polimerasa del fago T4.

5.3 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

El análisis de los fragmentos de DNA obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o amplificación por PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (agarosa D-1, *Pronadisa*) preparados a una concentración variable entre 0,8% y 1,5% según el tamaño esperado de las bandas. Los geles se prepararon con tampón 1x TAE (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5-7,8) y se añadió el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 g/ml para poder ver los fragmentos de DNA bajo luz ultravioleta.

Para el aislamiento y purificación de los fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit suministrado por *GE Healthcare*.

5.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de DNA mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio Rad Gene Cyclor™.

Dependiendo de la temperatura de fusión (T_m) de los cebadores empleados y del tamaño del producto esperado, se realizaron modificaciones sobre el siguiente protocolo estándar de reacción:

- Desnaturalización inicial: 10 minutos a 90°C
- 30 ciclos de :
 - Desnaturalización del DNA 1 minuto a 90°C
 - Anillamiento 1 minuto a 55°C
 - Extensión de 1 a 3 minutos a 72°C
 - Extensión final 10 minutos a 72°C

Las mezclas de reacción contenían DNA

molde en cantidad variable según fuese DNA plasmídico o genómico, además de: mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, cada uno a una concentración final de 200 μ M), los dos oligonucleótidos cebadores (1 μ M cada uno), $MgCl_2$ 1,5 mM, Taq polimerasa (BIOTAQ™, *ecogen*) 0,25 unidades y el tampón de reacción suministrado con la enzima.

En las reacciones de amplificación se utilizaron temperaturas de anillamiento entre 3 y 5 grados por debajo de la del cebador que tuviese una T_m más baja.

Los fragmentos de DNA obtenidos por PCR que se emplearon posteriormente para clonación molecular, se ligaron en el plásmido pGEM®-T.

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron suministrados por *Thermo*, *Sigma* o *Eurofins* y sus secuencias y utilidad se describen en la *Tabla IV* (Anexo I).

5.5 Secuenciación de ácidos nucleicos

La técnica usada se basa en la descrita por (Sanger *et al.*, 1977), pero en este caso se emplearon didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos y un láser capaz de reconocer los distintos colores (longitud de onda de emisión) de los fluorocromos que corresponden a cada una de las bases del DNA. Se utilizó un secuenciador ABI 377 (*Applied Biosystems*). Las secuencias se importaron mediante el programa Chromas, que muestra el cromatograma de la reacción y la secuencia de DNA correspondiente.

El fundamento de este sistema es una reacción de PCR en la cual la extensión enzimática de una cadena de DNA a partir de un oligonucleótido iniciador, empleando DNA bicatenario como mol-

de, es interrumpida por la incorporación de didesoxinucleótidos.

5.6 Mutagénesis dirigida

Se utilizó el sistema Muta-Gene® Phagemid de *Bio Rad*, que se basa en el método descrito por (Kunkel, 1985). Para la mutagénesis empleamos la cepa CJ236 de *E. coli* que cuenta con:

1) El episoma F', que le permite ser infectada por el fago auxiliar M13K07.

2) La mutación *dut*, que inactiva la enzima dUTPasa. Al aparecer elevados niveles intracelulares de dUTP, las moléculas de DNA sintetizadas portan uracilo en los lugares donde debería aparecer timina.

3) La mutación *ung*, que inactiva la uracilo N-glicosilasa, así el uracilo incorporado al DNA no puede ser eliminado.

Para llevar a cabo las reacciones de mutagénesis, se emplearon los oligonucleótidos cebadores recogidos en la [Tabla IV](#) y se siguieron los siguientes pasos:

1) La estirpe CJ236 se transformó con el DNA bicatenario que se pretende mutagenizar y se inoculó medio 2xYT líquido.

2) Se infectaron las colonias resultantes con el fago M13K07.

3) Se recuperaron las moléculas de DNA de cadena sencilla contenidas en los fagos.

4) Estas cadenas ricas en uracilo se usaron como molde para sintetizar *in vitro* las hebras complementarias. El cebador empleado fue el oligonucleótido que contenía la mutación que queríamos introducir.

5) Se transformó la cepa DH5α con el DNA bicatenario. DH5α no porta la mutación *ung*, por

lo que inactiva la hebra rica en uracilo del DNA, replicando sólo la hebra sin uracilo, que es la portadora de la mutación.

5.7 Transformación de *E. coli*

La transformación de cepas de *E. coli* con plásmidos o mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado por (Kushner, 1978) basado en el choque térmico.

En algunos casos, la transformación con plásmidos purificados se realizó por un método simplificado conocido como "transformación del minuto" descrito por (Golub, 1988).

5.8 Transformación de *S. pombe* y *S. cerevisiae*

La transformación de *S. pombe* y *S. cerevisiae* se realizó por el método del LiSorb (acetato de litio-sorbitol). El cual se detalla a continuación:

1) Se recogieron 50 ml de células en fase logarítmica por centrifugación durante 5 minutos a 3000 rpm.

2) Las células se lavaron con agua estéril y se centrifugaron de nuevo.

3) A continuación se resuspendieron en 5 ml de LiSorb (Acetato de Litio 100 mM, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1 mM, Sorbitol 1 M) y se incubaron durante 20 minutos en agitación a 28°C.

4) Las células se recogieron por centrifugación a 4°C y se resuspendieron en 50 µl de LiSorb. A partir de este punto se mantuvieron siempre en hielo.

5) Para cada reacción de transformación se mezclaron 15 µl de células, 250-500 ng de DNA plasmídico y 15 µl de DNA carrier en tampón LiSorb (una parte de DNA de esperma de salmón 20

mg/ml hervido anteriormente por cuatro partes de LiSorb). La mezcla se incubó durante 10 minutos a 28°C sin agitación.

6) A continuación se añadieron 450 µl de polietilenglicol 3350 (PEG) al 40% en 100 mM LiAc/TE a cada mezcla de transformación y se incubó 30 minutos a 28°C sin agitación.

7) Seguidamente las células fueron sometidas a un choque térmico de 7 minutos a 42°C.

8) Se centrifugaron 5 minutos a 2500 rpm y se resuspendió el precipitado en 150 µl de agua y finalmente se sembró esta suspensión de células en placas de medio selectivo.

9) Las colonias fueron visibles después de 4-5 días de incubación a 28°C.

5.9 Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo y delección de genes mediante cassettes obtenidos por PCR

Para marcar la proteína Rad24 con los epítopos GFP y GST y las proteínas Cds1 y Cnp1 con GFP en el extremo carboxilo, se utilizó el método descrito (Bähler *et al.*, 1998), que permite la fusión de estos epítopos en fase con la ORF del gen de interés. Como molde, se utilizaron los plásmidos que contienen las secuencias de los epítopos deseados con el marcador de selección adecuado. Como cebadores, se usaron oligonucleótidos que poseen una región en su extremo 3' complementaria a los plásmidos moldes. Uno de los oligonucleótidos presenta en su extremo 5' una región de 90-100 nucleótidos idéntica a la región 3' de la ORF del gen (excluido el codón de parada). El otro oligonucleótido incluye en su extremo 5' una región idéntica a 90-100 nucleótidos de la región 3' no codificante del gen que se encuentra a una distancia de entorno a 200 pb del codón de parada. Con el producto de PCR se transformó la cepa adecuada y los transformantes se seleccionaron

dependiendo del marcador utilizado.

Este mismo método fue utilizado para la delección del gen *cds1+* con el marcador de selección higromicina B, para la PCR se usó como molde un plásmido que contenía la secuencia del gen que confiere resistencia a higromicina B (*hph*) (Sato *et al.*, 2005) y como cebadores un oligonucleótido que presenta en su extremo 5' una región de 80-90 nucleótidos idéntica a la región 5' no codificante de la ORF del gen y otro oligonucleótido que incluye en su extremo 5' una región idéntica a 80-90 nucleótidos de la región 3' no codificante del gen. Con el producto de PCR se transformó la cepa adecuada y los transformantes se seleccionaron por su capacidad de crecimiento en higromicina B y por PCR.

6. VECTORES EMPLEADOS

6.1 Vectores de *E. coli*

pBluescript II KS+ y SK+ (Stratagene): Son plásmidos autorreplicativos de 2,9 kb que llevan el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación *colE1* y un fragmento del operón de lactosa de *E. coli* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa (*LacZ'*). Su sitio de clonación múltiple posee 21 sitios de restricción reconocidos por endonucleasas específicas, insertados en la fase de lectura del péptido α sin alterarla. Los dos vectores se diferencian por la orientación del sitio de clonación múltiple y los promotores de las RNA-polimerasas T3 y T7 que los flanquean y que sirven para la síntesis *in vitro* del RNA. Llevan un fragmento de la región intergénica del fago f1 que permite la obtención de DNA monocatenario tras infección de las células portadoras del plásmido con el fago auxiliar M13K07.

pGEM[®]-I (*Promega*): Es un vector de 3 kb que contiene 13 sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción y se comercializa linealizado con una timidina adicional en sus extremos, lo que facilita la inserción de fragmentos generados por PCR. Contiene el gen de resistencia a ampicilina (amp^{R}) y el promotor T7. Al igual que el vector pBluescript II SK+ permite la selección de clones recombinantes por α -complementación (azul-blanco).

6.2 Vectores de *S. pombe*

PAL-KS+: Este vector tiene 6,3 kb y fue obtenido por el Dr. J. Ishiguro (Konan University, Japón) a partir del plásmido pBuescript II KS+ al que se le han añadido un fragmento de DNA que incluye sitios de reconocimiento para 11 endonucleasas de restricción en la región estructural del gen que codifica el péptido α de la β -galactosidasa, el origen de replicación de *S. pombe*, ars1^+ , que contribuye a aumentar la frecuencia de transformación y a reducir el número de copias del plásmido por célula y el gen *LEU2* de *S. cerevisiae* capaz de complementar la mutación *leu1* de *S. pombe*, aunque las estirpes presentan crecimiento lento en los casos en que este marcador se halla en una sola copia.

pJK-148: Es un vector de 5,3 kb que lleva el gen leu1^+ de *S. pombe* como marcador de selección y carece de secuencias ars1^+ , por lo que no se replica de manera autónoma. Se utiliza para la integración de secuencias de DNA en el genoma de *S. pombe*.

La integración se realiza normalmente digiriendo el plásmido con una enzima que corta dentro del gen leu1^+ . El plásmido linealizado se introduce en una cepa con la mutación *leu1-32* de modo que en el genoma de *S. pombe* se re-

constituyen dos genes leu1^+ , uno mutado y el otro silvestre, y se recupera así la capacidad para crecer en medio sin leucina. Este plásmido descrito por (Keeney y Boeke, 1994), posee además un fragmento de DNA que incluye sitios de reconocimiento para 19 endonucleasas de restricción, el marcador de selección amp^{R} , un fragmento de la región intergénica del fago f1 que codifica las funciones requeridas para la obtención de DNA monocatenario, el origen de replicación en bacterias y el gen de la β -galactosidasa para la selección de clones por blanco-azul.

pREP: Construido a partir del vector de *E. coli* pUC119. Poseen el origen de replicación y el marcador de selección amp^{R} de *E. coli*, así como el origen de replicación del fago f1 y la secuencia ars1^+ de *S. pombe*.

La utilidad de esta familia de vectores reside en que cuentan con la secuencia del promotor del gen nmt1^+ (*no message in thiamine*) seguida de un sitio de clonación múltiple, que permite sobreexpresar los insertos clonados en los plásmidos pREP si las células crecen en un medio sin tiamina, o reprimir su expresión añadiendo tiamina a los medios.

Los vectores denominados con número impar (pREP3X, pREP41X y pREP81X) llevan el gen *LEU2* como marcador de selección. Los de número par (pREP4X, pREP42X y pREP82X) llevan el gen *URA4* como marcador de selección.

El promotor *nmt* original se modificó de forma que produce un nivel de expresión alto (pREP3X y pREP4X), medio (pREP41X y pREP42X), o bajo (pREP81X y pREP82X) (Basi *et al.*, 1993) (Maudrell, 1993).

6.3 Vectores de *S. cerevisiae*

pGADT7 y pGBKT7 (Matchmaker™ Two-Hybrid System, Clontech BD): Estos vectores de expresión de *S. cerevisiae* son mejoras de los vectores pACT2 y pAS2 y se emplean para el ensayo de doble híbrido. Ambos vectores contienen el origen de replicación de *E. coli*, el origen de replicación del fago f1 y el origen de replicación 2μ de *S. cerevisiae*.

El vector pGADT7 tiene el marcador de selección *kan^R* de *E. coli* y el marcador de selección *LEU2* de *S. cerevisiae* además de la secuencia que codifica el dominio de activación de la transcripción del factor de transcripción GAL4 bajo el control del promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*.

El vector pGBKT7 tiene el marcador de selección *amp^R* de *E. coli* y el marcador de selección *TRP1* de *S. cerevisiae* además de la secuencia que codifica el dominio de unión a DNA del factor de transcripción GAL4 bajo el control del promotor constitutivo de la alcohol deshidrogenasa de *S. cerevisiae*.

Detrás de la secuencia codificante de los dominios de activación de la transcripción y de unión a DNA del factor de transcripción GAL4, ambos plásmidos llevan un sitio de clonación múltiple donde se pueden insertar en fase los fragmentos de DNA para la producción de proteínas híbridas (Durfee *et al.*, 1993) (Fields y Song, 1989). Además, en fase con estos dominios presentan diferentes epítomos, HA y myc, para la comprobación directa mediante coimmunoprecipitación de los clones positivos.

6.4 Vectores construidos en este trabajo

pAL-*rgf1-N1Δ* (pRZ80): pAL-*rgf1⁺* (pGR41 colección YSM) en el que por mutagénesis dirigida se introdujeron dos sitios de restricción *Bgl*III, uno justo después del ATG y otro a 200 pb *downstream*, con los oligonucleótidos Rgf1-NΔ-A y Rgf1-NΔ-B, posteriormente se cortó con *Bgl*III y se religó, eliminando así 200 pb del extremo N' terminal de gen *rgf1⁺*.

pAL-*rgf1-N1Δ-GFP* (pRZ78): pAL-*rgf1-GFP* (pGR45 colección YSM) en el que por mutagénesis dirigida se introdujeron dos sitios de restricción *Bgl*III, uno justo después del ATG y otro a 200 pb *downstream*, con los oligonucleótidos Rgf1-NΔ-A y Rgf1-NΔ-B, posteriormente se cortó con *Bgl*III y se religó, eliminando así 200 pb del extremo N' terminal de gen *rgf1⁺*.

pAL-*rgf1-N2Δ* (pRZ83): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida se introdujeron dos sitios *Bgl*III, uno justo después del ATG y otro a 900 pb *downstream*, con los oligonucleótidos Rgf1-NΔ-A y Rgf1-NΔ-C, posteriormente se cortó con *Bgl*III y se religó, eliminando así 900 pb del extremo N' terminal de gen *rgf1⁺*.

pAL-*rgf1-N2Δ-GFP* (pRZ84): pAL-*rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida se introdujeron dos sitios *Bgl*III, uno justo después del ATG y otro a 900 pb *downstream*, con los oligonucleótidos Rgf1-NΔ-A y Rgf1-NΔ-C, posteriormente se cortó con *Bgl*III y se religó, eliminando así 900 pb del extremo N' terminal de gen *rgf1⁺*.

pAL-*rgf1-DEPΔ* (pRZ69): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-loop-DEP se eliminaron 80 pb del dominio DEP mediante la formación de un *loop*.

pAL-*rgf1-DEPΔ-GFP* (pRZ67): pAL-*rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-loop-DEP se eliminaron 80 pb del dominio DEP mediante la formación de un *loop*.

pAL-*rgf1-FPTP* (pRZ71): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-DEP-FPTP se cambiaron una fenilalanina y una tirosina del dominio DEP por residuos de prolinina.

pAL-*rgf1-FPTP-GFP* (pRZ73): pAL-*rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-DEP-FPTP se cambiaron una fenilalanina y una tirosina del dominio DEP por residuos de prolinina.

pAL-*rgf1-PHΔ* (pRZ45): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-loop-PH se eliminan 200 pb del dominio PH mediante la formación de un *loop*.

pAL-*rgf1-PHΔ-GFP* (pRZ44): pAL-*rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-loop-PH se eliminan 200 pb del dominio PH mediante la formación de un *loop*.

pAL-*rgf1-CNH1Δ* (pRZ55): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-Not-CNH1 se introdujo un sitio *NotI* 1000 pb *upstream* del codón de parada, posteriormente se cortó con *NotI* y se religó eliminando así los 1000 pb del extremo C' terminal del gen *rgf1⁺* existentes entre el sitio *NotI* introducido y el sitio *NotI* preexistente justo antes del codón de parada.

pAL-*rgf1-CNH1Δ-GFP* (pRZ57): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-Not-CNH1 se introdujo un sitio *NotI* 1000 pb *upstream* del codón de parada, posterior-

mente se cortó con *NotI* para eliminar así los 1000 pb del extremo C' terminal del gen *rgf1⁺* existentes entre el sitio *NotI* introducido y el sitio *NotI* preexistente justo antes del codón de parada, y además se le introdujo la secuencia que codifica para la GFP en fase ese mismo sitio *NotI*.

pAL-*rgf1-CNH2Δ* (pRZ56): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-Not-CNH2 se introdujo un sitio *NotI* 500 pb *upstream* del codón de parada, posteriormente se cortó con *NotI* y se religó eliminando así los 500 pb del extremo C' terminal del gen *rgf1⁺* existentes entre el sitio *NotI* introducido y el sitio *NotI* preexistente justo antes del codón de parada.

pAL-*rgf1-CNH2Δ-GFP* (pRZ58): pAL-*rgf1⁺* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-Not-CNH2 se introdujo un sitio *NotI* 500 pb *upstream* del codón de parada, posteriormente se cortó con *NotI* para eliminar así los 500 pb del extremo C' terminal del gen *rgf1⁺* existentes entre el sitio *NotI* introducido y el sitio *NotI* preexistente justo antes del codón de parada, y además se le introdujo la secuencia que codifica para la GFP en fase ese mismo sitio *NotI*.

pJK148-*rgf1-N1Δ* (pRZ88): la mutación *rgf1-N1Δ* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-N1Δ* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-N1Δ-GFP* (pRZ89): la mutación *rgf1-N1Δ-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-N1Δ-GFP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-N2Δ* (pRZ91): la mutación *rgf1-N2Δ* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-N2Δ* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-N2Δ-GFP* (pRZ92): la mutación *rgf1-N2Δ-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-N2Δ-GFP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-DEPΔ* (pRZ74): la mutación *rgf1-DEPΔ* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-DEPΔ* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-DEPΔ-GFP* (pRZ75): la mutación *rgf1-DEPΔ-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-DEPΔ-GFP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-FPTP* (pRZ85): la mutación *rgf1-FPTP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-FPTP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-FPTP-GFP* (pRZ86): la mutación *rgf1-FPTP-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-FPTP-GFP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-PHΔ* (pRZ53): la mutación *rgf1-PHΔ* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-PHΔ* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio

de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-PHΔ-GFP* (pRZ46): la mutación *rgf1-PHΔ-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-PHΔ-GFP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-CNH1Δ* (pRZ61): la mutación *rgf1-CNH1Δ* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-CNH1Δ* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-CNH1Δ-GFP* (pRZ62): la mutación *rgf1-CNH1Δ-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-CNH1Δ-GFP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-CNH2Δ* (pRZ64): la mutación *rgf1-CNH2Δ* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-CNH2Δ* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

pJK148-*rgf1-CNH2Δ-GFP* (pRZ65): la mutación *rgf1-CNH2Δ-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-CNH2Δ-GFP* con *EcoRI* y posterior ligación en el sitio de corte para *EcoRI* del pJK148.

4X-*rgf1-N2Δ* (pSM43): Partiendo de un plásmido pAL-*rgf1*⁺ al que se le habían introducido por mutagénesis dirigida un sitio *XhoI* en el ATG y un sitio *SmaI* justo antes del codón de parada (pGR30 colección YSM), se introdujeron dos sitios *BglII* por mutagénesis dirigida; uno en el ATG con el oligo-

nucleótido Rgf1-Xho-BglII y otro 900 pb *downstream* con el oligonucleótido Rgf1-NΔ-C (pSM35). Posteriormente se cortó con BglII y se religó, eliminando así 900 pb del extremo N' terminal de gen *rgf1*⁺ (pSM36) y por último se cortó con XhoI y SmaI y se introdujo en el vector pREP4X en estos mismos sitios de restricción.

pAL-*rgf1-N302-GFP* (pSM12): pAL-*rgf1*⁺ en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-N302 se introdujo un sitio NotI 910 pb después del ATG, posteriormente se cortó con NotI para eliminar así 3135 pb del extremo C' terminal del gen *rgf1*⁺ existentes entre el sitio NotI introducido y el sitio NotI preexistente justo antes del codón de parada, y además se le introdujo la secuencia que codifica para la GFP en fase ese mismo sitio NotI.

pAL-*rgf1-N535-GFP* (pSM14): pAL-*rgf1*⁺ en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-N535 se introdujo un sitio NotI 1583 pb después del ATG, posteriormente se cortó con NotI para eliminar así 2490 pb del extremo C' terminal del gen *rgf1*⁺ existentes entre el sitio NotI introducido y el sitio NotI preexistente justo antes del codón de parada, y además se le introdujo la secuencia que codifica para la GFP en fase ese mismo sitio NotI.

pJK148-*rgf1-N305-GFP* (pSM21): la mutación *rgf1-N305-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-N305-GFP* con EcoRI y posterior ligación en el sitio de corte para EcoRI del pJK148.

pJK148-*rgf1-N535-GFP* (pSM22): la mutación *rgf1-N535-GFP* fue trasladada del vector pAL al vector pJK148 mediante la digestión del plásmido pAL-*rgf1-N535-GFP* con EcoRI y posterior

ligación en el sitio de corte para EcoRI del pJK148.

pJK148-*rgf1-N305-535-GFP* (pEM13): pJK148-*rgf1-N535-GFP* en el que por mutagénesis dirigida se introdujeron dos sitios BglII, uno justo después del ATG y otro a 900 pb *downstream*, con los oligos Rgf1-NΔ-A y Rgf1-NΔ-C, posteriormente se cortó con BglII y se religó, eliminando así 900 pb del extremo N' terminal de gen *rgf1*⁺.

pJK148-*rgf1-N305-535(*NLS)-GFP* (pSM105): pJK148-*rgf1-N305-535-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-NLS se cambió la secuencia que codifica para los aminoácidos ⁴⁰⁶NKRRRRRI⁴¹² por una secuencia que codifica para ⁴⁰⁶NKAAAAI⁴¹².

pJK148-*rgf1-DEPΔ(*NLS)-GFP* (pSM133): pJK148-*rgf1-DEPΔ-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-NLS se cambió la secuencia que codifica para los aminoácidos ⁴⁰⁶NKRRRRRI⁴¹² por una secuencia que codifica para ⁴⁰⁶NKAAAAI⁴¹².

pJK148-*rgf1(*NLS)-GFP* (pSM106): pJK148-*rgf1-GFP* (pGR49 colección YSM) en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-NLS se cambió la secuencia que codifica para los aminoácidos ⁴⁰⁶NKRRRRRI⁴¹² por una secuencia que codifica para ⁴⁰⁶NKAAAAI⁴¹².

pJK148-*rgf1(*NES1)-GFP* (pEM22): pJK148-*rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rgf1-NES1 se cambió la secuencia que codifica para los aminoácidos ⁸⁵⁷LFLFDHLLI⁸⁶⁷ por una secuencia que codifica para ⁸⁵⁷LFLFDHAAA⁸⁶⁷.

pJK148-*rgf1(*NES2)-GFP* (pEM11): pJK148-*rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con

el oligonucleótido Rgf1-NES2 se cambió la secuencia que codifica para los aminoácidos ¹¹⁴²LRI-VKELYI¹¹⁵¹ por una secuencia que codifica para ¹¹⁴²LRIVKEAYA¹¹⁵¹.

4X-cds1-GST (pSM115): Se cortó el plásmido 3X-cds1-GST procedente del laboratorio de A. Carr (Lindsay et al., 1998) con las enzimas de restricción *Pst*I-SacI y se introdujo en el vector pRE-P4X.

pGBKT7-rgf1⁺ (pRZ97): La ORF del gen *rgf1⁺* sin intrón procedente de un plásmido *SK-rgf1⁺* al que se le habían introducido por mutagénesis dirigida un sitio *Nde*I en el ATG y un sitio *Sma*I justo antes del codón de parada (pRZ28 colección YSM), se introdujo en un vector pGBKT7 entre los sitios *Nde*I y *Sma*I.

pGADT7-rad24⁺ (pEM9): Se introdujo en el vector pGADT7 cortado con las enzimas *Nco*I-*Sma*I la ORF del gen *rad24⁺* obtenida por PCR con los oligonucleótidos *Rad24-ATG* y *Rad24-END* a partir de cDNA.

SK-rgf1-GST-ura4[±] (pEB9): Cassette para marcar el gen *rgf1⁺* con GST en el extremo C'-terminal. Se introdujeron por mutagénesis dirigida un sitio *Nde*I inmediatamente antes del codón de parada y otro sitio *Sma*I inmediatamente después con los oligonucleótidos *Rgf1-Nde-END* y *Rgf1-SmaI-2* respectivamente (pSM41), a partir del plásmido resultante se obtuvo un fragmento de restricción *Sal*I-*Pst*I que contenía 1000 pb del extremo C'-terminal del gen *rgf1⁺* y 1700 pb de la región 3' UTR que fue introducido en el vector SK (pEB1). Posteriormente se introdujo el gen *ura4[±]* cortado con *Hin*clI-*Sma*I en el sitio *Sma*I (pEB7) y la secuencia del epítipo GST en el sitio *Nde*I.

pJK148-rgf1-6A-GFP (pSM145): *pJK148-rgf1-GFP* al que se le cambió la región N'-terminal del gen *rgf1⁺*, que contiene los 6 primeros motivos RXXS, flanqueada por sitios de restricción *Sac*I por una secuencia sintética similar pero que codifica para RXXA en lugar de para RXXS (Eurofins™).

pJK148-rgf1-9A-GFP (pSM146): *pJK148-rgf1-6A-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos *Rgf1-Fos8*, *Rgf1-Fos9* y *Rgf1Fos-10* se cambiaron las secuencias que codifican para las serinas 422, 1085 y 1322 por secuencias que codifican para alanina.

pJK148-rgf1-3A-GFP (pSM135): *pJK148-rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos *Rgf1-Fos8*, *Rgf1-Fos9* y *Rgf1Fos-10* se cambiaron las secuencias que codifican para las serinas 422, 1085 y 1322 por secuencias que codifican para alanina.

pJK148-rgf1-6E-GFP (pSM151): *pJK148-rgf1-GFP* al que se le cambió la región N'-terminal del gen *rgf1⁺*, que contiene los 6 primeros motivos RXXS, flanqueada por sitios de restricción *Sac*I por una secuencia sintética similar pero que codifica para RXXE en lugar de para RXXS (Eurofins™).

pJK148-rgf1-9E-GFP (pSM152): *pJK148-rgf1-6E-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos *Rgf1-Fos8E*, *Rgf1-Fos9E* y *Rgf1Fos-10E* se cambiaron las secuencias que codifican para las serinas 422, 1085 y 1322 por secuencias que codifican para ácido glutámico.

pJK148-rgf1-3E-GFP (pSM150): *pJK148-rgf1-GFP* en el que por mutagénesis dirigida con los oligonucleótidos *Rgf1-Fos8E*, *Rgf1-Fos9E* y *Rgf1-Fos10E* se cambiaron las secuencias que codifican para las serinas 422, 1085 y 1322 por se-

cuencias que codifican para ácido glutámico.

pJK148-*GFP-rho1-stop* (pSM154): pJK148-*GFP-rho1* (pGR colección YSM) en el que por mutagénesis dirigida con el oligonucleótido Rho1-stop se introdujo un codón de parada inmediatamente antes de la secuencia que codifica para la secuencia proteica de prenilación CILL.

7. VALORACIÓN DE LA CANTIDAD DE DNA MEDIANTE FACS

La cantidad de DNA presente en las células de *S. pombe* se valoró usando un citómetro de flujo FACScalibur™ (*BD Biosciences*) controlado por el Software CellQuest™ (*BD Biosciences*).

Se recogieron muestras de 10^7 células (1 ml de DO_{600} 1) centrifugando 5 minutos a 2000 rpm y se resuspendieron en 1 ml de etanol frío al 70%. Las muestras así fijadas se pueden conservar durante largos períodos de tiempo a 4°C.

300 μ l de estas células se procesaron para citometría de flujo según (Sazer y Sherwood, 1990). Para ello, las células se lavaron con 0,5 ml de citrato sódico 50 mM y se resuspendieron en 0,5 ml de citrato sódico 50 mM con 0,1 mg/ml de RNAasa A y se incubaron 2 horas a 37°C. Finalmente se tiñeron con yoduro de propidio mediante la adición de 0,5 ml de citrato sódico 50 mM con 8 μ g/ml de IP y se incubaron durante toda la noche a 4°C y en oscuridad. Posteriormente, las células se sonicaron 20 segundos a una amplitud del 40% en un sonicador Labsonic M (*Sartorius Stedim Biotech*). Finalmente se midieron el tamaño y la fluorescencia de las células en un citómetro de flujo FACScalibur™ (*BD Biosciences*). Para el análisis de los datos se utilizó el programa CellQuest™ (*BD Biosciences*).

8. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

8.1 Obtención de extractos celulares

Cantidades idénticas de células de los cultivos correspondientes (ajustadas mediante la medición de la densidad óptica de los cultivos) se recogieron por centrifugación, se lavaron con 1 ml de agua fría y se congelaron en N_2 líquido junto con bolitas de vidrio (G8772, *SIGMA*), posteriormente se añadió tampón de extracción (65 mM Tris-HCl pH 6,8; SDS al 3%, glicerol al 10%, β -mercaptoetanol al 5%, 50 mM NaF y 100 mM β -glicerol fosfato con inhibidores de proteasas 1 mM PMSF y 2 μ g/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina) y se rompieron en una Fast-Prep FP120 (*Bio 101 Savant*) durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6 y a 4°C. El extracto celular obtenido se hirvió durante 5 minutos, se centrifugó 2 minutos a 13000 rpm y se congeló el sobrenadante a -20°C.

8.2 Precipitación con GST

Se recogieron 50 ml de los cultivo en fase logarítmica (DO_{600} 0,6) de cada cepa de interés por centrifugación, se lavaron con 1 ml de agua fría y se resuspendieron en 200 μ l de tampón de extracción (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl, 2 mM EDTA y NP-40 al 0,5% con inhibidores de proteasas 1 mM PMSF y 2 μ g/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina). Las células se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, *SIGMA*), en una Fast-Prep FP120 (*Bio 101 Savant*) durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 3000 rpm durante 1,5 minutos. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico.

métrico descrito por (Bradford, 1976).

En cada precipitación se incubó durante 2 horas a 4°C, 1 mg de proteína junto con 20 µl de bolitas de glutatión-sefarosa (Glutathione Sepharose 4B, *GE Healthcare*) en un volumen final de 600 µl de tampón de inmunoprecipitación (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 200 mM NaCl, 2 mM EDTA y Triton X-100 al 2% con inhibidores de proteasas 1 mM PMSF y 2 µg/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina). Posteriormente, los complejos unidos a la matriz de sefarosa se sedimentaron por centrifugación y se lavaron veces con 700 µl de tampón de inmunoprecipitación y una vez con 700 µl de tampón de inmunoprecipitación con 500 mM NaCl. Finalmente, los complejos con las bolitas de glutatión-sefarosa se resuspendieron en 20 µl de tampón de carga 2X (SDS al 4%, glicerol al 20%, 100 mM DTT y trazas de azul de bromofenol) para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

8.3 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Las muestras de extracto total o de los precipitados se desnaturalizaron durante 10 minutos a 70°C y se centrifugaron a 13000 rpm durante otros 2 minutos. Las proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de distinto porcentaje de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como describe (Laemmli, 1970) y a una intensidad de 100-120 V. En el caso de los geles de Phos-tag™ utilizados para resolver formas fosforiladas de Rgf1-GFP, se añadió a una mezcla de poliacrilamida del 6% el ligando Phos-tag™ (*NARD Institute*) a una concentración de 40 mM y MnCl₂ a una concentración de 80 mM. Para resolver la forma fosforilada de la proteína Chk1-HA se utilizaron geles

de poliacrilamida del 10% en los que la relación acrilamida:bisacrilamida era 99:1. El tampón de carrera utilizado fue Tris/Glicina (24,8 mM/192 mM) y SDS al 0,1 % pH 8,3.

En otras ocasiones las muestras se cargaron en geles de gradiente de poliacrilamida comerciales (3-8% NuPAGE® Tris-Acetate Gels o 4-12% NuPAGE® SDS-PAGE Gels, *Life Technologies*) y se empleó el sistema de electroforesis Novex® Mini-Cell de *Life Technologies* siguiendo las recomendaciones de la casa suministradora. La electroforesis de los geles se realizó empleando los tampones de carrera comerciales Novex® Tris-Acetate SDS Running Buffer o Novex® MES SDS Running Buffer, empleando un voltaje de 150 V durante un período de aproximadamente 1,5 horas. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon™-P, *Millipore*) utilizando el sistema Mini-Trans-Blot® de *BioRad*, usando como tampón Tris/Glicina (24,8 mM/192 mM) y metanol al 10% pH 8,3; durante 90 minutos a 100 V.

8.4 Inmunodetección de proteínas

En primer lugar, las membranas se bloquearon en TBS-T (20 mM Tris-HCl pH 7,6; 137 mM NaCl y Tween 20 de *SIGMA* al 0,3%) con seroalbúmina bovina al 3% o con leche desnatada al 5%, durante toda la noche a 4°C o 45 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Se lavaron 3 veces durante 5-10 minutos con abundante TBS-T y se incubaron después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa (*HRP, horseradish peroxidase*) durante 45 minutos a temperatu-

ra ambiente. Las membranas se volvieron a lavar 3 veces con TBS-T y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia.

Se empleó el "kit" ECL de *Amersham*. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron usando películas X Ray Film 100NIF (*Fujifilm*). Los anticuerpos utilizados fueron:

1) Anticuerpo monoclonal frente a la proteína GFP, JL-8 (*Living Colours™, Clontech*), a una dilución 1:2000.

2) Anticuerpo policlonal frente al epítipo GST unido a peroxidasa de rábano (*Amersham*), a una dilución 1:15000.

3) Anticuerpo monoclonal frente al epítipo HA, 12CA5 (*Boehringer*), a una dilución 1:5000.

4) Anticuerpo monoclonal frente a tubulina (*SIGMA*) a una dilución de 1:10000.

5) Anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano (*Amersham*), a una dilución 1:5000.

8.5 Valoración de GTP-Rho1

8.5.1 Producción de GST-C21RBD

La cantidad de Rho1 activa se determinó mediante el ensayo de precipitación con GST-C21RBD. Este dominio sólo se asocia a Rho1 cuando está unida a GTP. La proteína recombinante GST-C21RBD se obtuvo en una cepa DH5 α de *E. coli* transformada con el plásmido pGEX-C21RBD. El plásmido pGEX-C21RBD lleva el fragmento de DNA que codifica el péptido C21 que contiene el dominio de unión a RhoA (*RBD, Rho Binding Domain*) de la proteína rhotestina fusionado a la secuencia que codifica la proteína GST (Reid et al., 1996). Las bacterias transformadas con el plásmi-

do pGEX-C21RBD se incubaron a 28°C en 400 ml de medio LB con ampicilina (50 μ g/ml) hasta que alcanzaron una DO₆₀₀ de 0,6. En este momento, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión del gen que codifica la proteína de fusión correspondiente y se incubaron 3 horas más a 28°C.

Se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm y se resuspendieron en 20 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino: 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂HPO₄, 137 mM NaCl y 2,7 mM KCl) frío al que se añadieron previamente inhibidores de proteasas (1 mM PMSF y 2 μ g/ml de aprotinina, leupeptina y pepstatina) y lisozima (2 mg/ml). Tras 30 minutos de incubación en hielo, las células se sonicaron 4 veces a una potencia de 14 μ m de amplitud de onda durante 1 minuto. Se añadió Tritón TX-100 a una concentración final del 1% y se centrifugaron las células lisadas a 10000 rpm durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se añadieron 300 μ l de bolitas de glutatión-sefaro-sa previamente equilibradas con PBS y se incubó durante 2 horas a 4°C. A continuación, las bolas de glutatión-sefaro-sa con la proteína de fusión GST-C21RBD unida, se lavaron 3 veces con 40 ml de PBS, recogién-dose por centrifugación a 3000 rpm. Por último, se resuspendieron al 50% en solución de lisis B: 50 mM Tris-HCl pH 7,6; 20 mM NaCl, glicerol al 10%, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT y NP-40 al 0,5%, con inhibidores de proteasas a la misma concentración que la descrita anteriormente.

La cantidad de proteína se cuantificó por electroforesis en gel de poli-acrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie Brilliant Blue R-250, comparándola con diferentes cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

8.5.2 Ensayo de unión

Se obtuvieron extractos celulares de la cepa silvestre que producía la proteína Rho1 fusionadas al epítipo HA en su extremo N-terminal tratada durante 2 horas con 12,5 mM HU o sin tratar, utilizando tampón de lisis B (50 mM Tris-HCl pH 7,6; 20 mM NaCl, glicerol al 10 %, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT y NP-40 al 0.5 %). Los extractos (2 mg de proteína total) se llevaron a 500 µl con tampón de lisis B y se añadieron 10 µg de GST-C21RBD asociado a bolas de glutatión-sefarosa. Se incubaron 2-4 horas a 4°C y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis B. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2x, y se sometieron a SDS-PAGE en un gel del 12% que luego se transfirió a una membrana de PVDF, y se incubó con anticuerpos monoclonales anti-HA 12CA5, para detectar la fracción de la proteína HA-Rho1p unida a GTP, que había precipitado al unirse al dominio C21RBD.

9. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS

Para llevar a cabo estas técnicas se emplearon un microscopio Leica DM RXA, equipado con sistema de iluminación halógena y equipo de fotografía digital. Además se utilizó el equipo Personal Deltavision Microscope (*Applied Precision*), que consta de un microscopio invertido Olympus IX-70.

9.1 Microscopía de contraste de fases y contraste interferencial (Nomarski)

Las muestras se tomaron directamente de los cultivos incubados en medio líquido o en placas y se observaron en un microscopio Leica DM RXA equipado con un sistema de iluminación halógena, filtros para microscopía de contraste in-

terferencial (DIC) y contraste de fases, objetivos de inmersión en aceite y una cámara fotográfica digital Leica DFC350FX acoplada al microscopio. Asimismo, el microscopio estaba acoplado a un ordenador con el programa MetaMorf®.

9.2 Microscopía de fluorescencia

Para muestras fluorescentes se usaron los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Las imágenes obtenidas de esta manera se procesaron con el programa Adobe Photoshop CS5.1 (*Adobe System, Inc*), Image J (*Nacional Institutes of Health, USA*) y el programa softWoRx® Resolve 3D (*Applied Precision*) del microscopio Deltavision.

9.2.1 Fluorescencia directa con GFP

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria* que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz ultravioleta de longitud de onda de 395 nm.

La GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariotas. Por ello suele usarse como sistema de detección de la expresión y localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para ello, basta con fusionar la secuencia de DNA que codifica esta proteína con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la expresión de la proteína híbrida al microscopio de fluorescencia.

Existe además la proteína roja fluorescente (DsRFP) que emite luz de 586 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 556 nm. Se han

realizado modificaciones de la proteína RFP, como la mCherry, cuya luz de emisión es más brillante y estable, que emite luz de 610 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 587 nm. El marcaje de parejas de proteínas con diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes permiten la realización de experimentos de colocalización (Shaner *et al.*, 2005).

La observación de proteínas marcadas se realizó en el equipo Personal Deltavision (*Applied Precision, LLC*) controlado mediante el software softWoRx® Resolve 3D. Las imágenes fueron capturadas con una cámara CoolSNAP HQ2 (*PHOTOMETRICS*) acoplada al microscopio. Las imágenes de proteínas marcadas mostradas en esta memoria corresponden a proyecciones máximas de 7 planos en z.

9.2.2 Tinción con calcoflúor

El calcoflúor se une a los polímeros β -(1,3) y β -(1,4)-glucano de la pared celular de las levaduras y la desorganiza, por lo que se usa tanto para detectar anomalías en la pared como para determinar los lugares de crecimiento de la célula dependiendo de su concentración y tiempo de tratamiento (Nicholas *et al.*, 1994) (Streiblova, 1984). El calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul.

El calcoflúor (Blancophor BBH, *Bayer Corporation*), se preparó en agua a una concentración de 10 mg/ml. Para conseguir su total disolución se añadieron unas gotas de KOH 10 N. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

La tinción con calcoflúor se realizó partiendo de cultivos líquidos creciendo en fase logarítmica. Las células se recogieron por centrifugación (5 mi-

nutos a 3000 rpm), se resuspendieron en una solución de agua con calcoflúor a una concentración final de 300 g/ml y se incubaron de 1 a 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron y concentraron para observar su fluorescencia en un microscopio Leica DM RXA.

10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS

Para el análisis informático de las secuencias de DNA y de proteínas, alineamiento de secuencias y mapas de restricción, se utilizaron los programas DNASTar, DNASTrider y ClustalW.

Las secuencias de genes y proteínas se obtuvieron de la base de datos de *S. pombe*, The Wellcome Trust Sanger Institute *Schizosaccharomyces pombe* Gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>), actualmente (<http://www.pombase.org>).

El análisis de los dominios de las proteínas se realizó utilizando la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Las búsquedas bibliográficas se realizaron en la base de datos de MedLine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>

ANEXO I

Tabla III: Estirpes utilizadas en este trabajo

Nombre	Genotipo	Origen
<i>S. pombe</i>		
YS64	<i>h, leu1-32, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
VT14	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
PG40	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM146	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N1Δ:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM59	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N1Δ-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM63	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N2Δ:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM48	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N2Δ-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM55	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-DEPΔ:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM52	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-DEPΔ-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM57	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-FPTP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM50	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-FPTP-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM65	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-PHΔ:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM15	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-PHΔ-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM128	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-CNH1Δ:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM17	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-CNH1Δ-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM69	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-CNH2Δ:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM19	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-CNH2Δ-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
PG52	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-PTTR:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM99	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N302-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM101	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N535-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
EM56	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N302-535-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM322	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-N302-535(*NLS)-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM491	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-DEPΔ(*NLS)-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
VT128	<i>h, leu1-32::GFP-rgf3:leu1+, his3D1, ura4D-18, ade6M210</i>	Colección YSM
SM321	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1(*NLS)-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM302	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1(*NES1)-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
EM50	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1(*NES2)-GFP:leu1+, his3D1, ura4D18, ade6M210</i>	Este trabajo
SM335	<i>rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, crm1-809</i>	Este trabajo
PG142	<i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, cdc10-129</i>	Colección YSM
SM447	<i>rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, cdc22-M45</i>	Este trabajo
SM444	<i>rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, cdc17-M75</i>	Este trabajo
PG135	<i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, cdc25-22</i>	Colección YSM
SM319	<i>rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, cds1::ura4+</i>	Este trabajo
SM339	<i>rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, chk1::ura4+</i>	Este trabajo
SM317	<i>rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, rad3::ura4+</i>	Este trabajo
SM330	<i>h, rad24-GFP:kanMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM382	<i>h, rad24-GFP:kanMX6, rgf1-GST: ura4+, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM211	<i>rgf1::his3+, leu1-32::rgf1-GFP:leu1+, rad24::ura4+</i>	Este trabajo
SM370	<i>h, cds1-GFP:kanMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM384	<i>h, rad24-GFP:kanMX6, rgf1-GST: ura4+, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM394	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1(*NES1)-GFP:leu1+, rad24::ura4+</i>	Este trabajo
SM374	<i>h, rgf1::his3+, leu1-32::rgf1(*NES1)-GFP:leu1+, cds1::ura4+</i>	Este trabajo
SM616	<i>h, rgf1::natMX6, leu1-32::rgf1-9A-GFP:leu1+, ura4D18</i>	Este trabajo
SM671	<i>h, rgf1::natMX6, leu1-32::rgf1-6A-GFP:leu1+, ura4D18</i>	Este trabajo
SM533	<i>h, rgf1::natMX6, leu1-32::rgf1-3A-GFP:leu1+, ura4D18</i>	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

SM622	<i>h</i> , <i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32::rgf1-9E-GFP:leu1+</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM624	<i>h</i> , <i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32::rgf1-6E-GFP:leu1+</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM620	<i>h</i> , <i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32::rgf1-3E-GFP:leu1+</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM680	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>rad24-GST:kanMX6</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM682	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32::rgf1-9A-GFP:leu1+</i> , <i>rad24-GST:kanMX6</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM449	<i>h</i> , <i>rad24-GFP:kanMX6</i> , <i>rgf1-GST:ura4+</i> , <i>cds1::hphMX6</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
PG91	<i>h</i> , <i>cdc10-129</i> , <i>leu1-32</i>	Colección YSM
PG93	<i>h</i> , <i>cdc10-129</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>leu1-32</i>	Colección YSM
SM421	<i>h</i> , <i>cdc22-M45</i>	P. Sunnerhagen
SM431	<i>h</i> , <i>cdc22-M45</i> , <i>rgf1::natMX6</i>	Este trabajo
SM420	<i>h</i> , <i>cdc17-M75</i>	P. Sunnerhagen
SM430	<i>h</i> , <i>cdc17-M75</i> , <i>rgf1::natMX6</i>	Este trabajo
NG69	<i>h</i> , <i>cdc25-22</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Colección YSM
PG43	<i>h</i> , <i>cdc25-22</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i> , <i>his3D1</i>	Colección YSM
SM184	<i>h</i> , <i>rad24::ura4+</i> , <i>ura4D18</i>	A. Bueno
VT96	<i>h+</i> , <i>HA-rho1::rho1</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i> , <i>ade6</i>	P. Pérez
SM720	<i>h</i> , <i>rho1C17R::natMX6</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	P. Pérez
PG172	<i>h</i> , <i>leu1-32::GFP-rho1:leu1+</i> , <i>his3D1</i> , <i>ura4D18</i> , <i>ade6M210</i>	Colección YSM
SM653	<i>h</i> , <i>leu1-32::GFP-rho1-stop:leu1+</i> , <i>ura4D18</i> ,	Este trabajo
SM305	<i>h</i> , <i>cds1::ura4+</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	A. Bueno
SM308	<i>h</i> , <i>rad22-YFP:kanMX6</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	A. Bueno
SM325	<i>h</i> , <i>cds1::ura4+</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
SM304	<i>h</i> , <i>chk1::ura4+</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	A. Bueno
SM331	<i>h</i> , <i>chk1::ura4+</i> , <i>rgf1::his3+</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
SM429	<i>h</i> , <i>chk1-HA</i> , <i>ade6M216</i> , <i>leu1-32</i>	P. Sunnerhagen
SM435	<i>h</i> , <i>chk1-HA</i> , <i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
SM426	<i>h+</i> , <i>cdc25-HA:ura4+</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	P. Sunnerhagen
SM422	<i>cdc25-HA:ura4+</i> , <i>rgf1::natMX6</i> , <i>ura4D18</i> , <i>leu1-32</i>	Este trabajo
SM442	<i>rgf1::kanMX6</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>aur:mCherry-atb2</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM585	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32::rgf1-GFP:leu1+</i> , <i>mis6-mCherry:hphMX6</i>	Este trabajo
YS2544	<i>h</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i> , <i>ade6M210</i> , <i>Ch16</i> (truncación del cromosoma III con <i>ade6M216</i>)	S. Moreno
SM437	<i>h</i> , <i>rgf1::natMX6</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i> , <i>ade6M210</i> , <i>Ch16</i>	Este trabajo
SM474	<i>h+</i> , <i>mad1::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	P. Pérez
SM497	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>mad1::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
YS2600	<i>h+</i> , <i>mad2::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	S. Moreno
SM499	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>mad2::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM479	<i>h+</i> , <i>mad3::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	S. Moreno
SM501	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>mad3::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM481	<i>h+</i> , <i>bub3::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	P. Pérez
SM507	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>bub3::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM550	<i>dam1::kan</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	T. Toda
SM586	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>dam1::kan</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM482	<i>h+</i> , <i>duo1::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	P. Pérez
SM505	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>duo1::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo
SM490	<i>h+</i> , <i>dad1::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	P. Pérez
SM543	<i>rgf1::natMX6</i> , <i>dad1::kanMX4</i> , <i>leu1-32</i> , <i>ura4D18</i>	Este trabajo

SM601	<i>h⁺, dad2::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM626	<i>rgf1::natMX6, dad2::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM484	<i>h⁺, dad3::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM503	<i>rgf1::natMX6, dad3::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM602	<i>h⁺, dad5::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM628	<i>rgf1::natMX6, dad5::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM558	<i>ndc80-21:kan, leu1-32, ura4D18</i>	T. Toda
SM588	<i>rgf1::natMX6, ndc80-21:kan, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM483	<i>h⁺, alp14::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM513	<i>rgf1::natMX6, alp14::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM548	<i>dis1::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	T. Toda
SM590	<i>rgf1::natMX6, dis1::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM596	<i>h⁺, tub1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM630	<i>rgf1::natMX6, tub1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM597	<i>h⁺, mto1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM632	<i>rgf1::natMX6, mto1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM598	<i>h⁺, pby1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM636	<i>rgf1::natMX6, pby1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM495	<i>h⁺, klp5::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	S. Moreno
SM539	<i>rgf1::natMX6, klp5::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM496	<i>h⁺, klp6::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	S. Moreno
SM541	<i>rgf1::natMX6, klp6::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM201	<i>flp1::kanMX6, leu1-32, ura4D18</i>	A. Bueno
SM515	<i>rgf1::natMX6, flp1::kanMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM203	<i>dis2::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	A. Bueno
SM517	<i>rgf1::natMX6, dis2::ura4⁺, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM476	<i>h⁺, sgo1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM509	<i>rgf1::natMX6, sgo1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM488	<i>h⁺, sgo2::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM527	<i>rgf1::natMX6, sgo2::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM475	<i>h⁺, swi6::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM511	<i>rgf1::natMX6, swi6::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM599	<i>h⁺, sfi3::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM634	<i>rgf1::natMX6, sfi3::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM600	<i>h⁺, fin1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	P. Pérez
SM638	<i>rgf1::natMX6, fin1::kanMX4, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM642	<i>cnp1-GFP:kanMX6, sid4-RFP:kan</i>	Este trabajo
SM675	<i>cnp1-GFP:kanMX6, sid4-RFP:kan, rgf1::natMX6</i>	Este trabajo
SM486	<i>h⁺, cdc13-GFP:leu1⁺, leu1-32, ura4D18</i>	J. Millar
SM525	<i>cdc13-GFP:leu1⁺, rgf1::natMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM592	<i>cdc13-GFP:leu1⁺, mad3::kanMX4, rgf1::natMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo
SM651	<i>bub1-GFP:kan, leu1-32, ura4D18</i>	S. Moreno
SM673	<i>bub1-GFP:kan, rgf1::natMX6, leu1-32, ura4D18</i>	Este trabajo

S. cerevisiae

AH109	<i>MATa, trp1-901, leu2-3, -112, ura3-52, his3-200, gal4Δ, gal80Δ, LYS2::GAL1_{UAS}-GAL1_{TATA}-HIS, GAL2_{UAS}-GAL2_{TATA}-ADE2, URA3::MEL1_{UAS}-MEL1_{TATA}-lacZ</i>	Clontech
-------	---	----------

MATERIALES Y MÉTODOS

E. Coli

DH5 α	F- ϕ 80dlacZ Δ M 15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r_k^- , m_k^+), phoA, supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies
CJ236	F', cat(=pCJ105 ; M13 ^S Cm ^R)/dut, ung1, thi-1, relA1, spoT1, mcrA	Bio Rad

Tabla IV: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia	Utilidad
Rgf1-N Δ -A	5'- CATTGGATGCCGGTAATCAGATCTCATTGCTACTATAAA AA-3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -N1 Δ , pAL- <i>rgf1</i> -N1 Δ -GFP, pAL- <i>rgf1</i> -N2 Δ y pAL- <i>rgf1</i> -N2 Δ -GFP.
Rgf1-N Δ -B	5'- CCAAAAACGGAAGGAAAAGATCTACTGTGCTCAATATT TTC-3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -N1 Δ y pAL- <i>rgf1</i> -N1 Δ -GFP.
Rgf1-N Δ -C	5'- CTTATGGCTGCTAGCAGATCTTATGCTTAAATGAAGATC- 3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -N2 Δ , pAL- <i>rgf1</i> -N2 Δ -GFP, 4X-N2 Δ y pJK148- <i>rgf1</i> -N302-535-GFP.
Rgf1-loop-DEP	5'- GTAAAGCGAGATTTCTATCGGATCCACCGTCTTTCGTGAT AT-3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -DEP Δ y pAL- <i>rgf1</i> -DEP Δ -GFP.
Rgf1-DEP-FPTP	5'- GGTGACTGCATGATCGCCCGGGGGGCATTAGAATAAA TTAAAC-3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -FPTP y pAL- <i>rgf1</i> -FPTP-GFP.
Rgf1-loop-PH	5'- ACCCAAAAGTTGTAAGCTAAATGGACCACCACCTTTGG TTTTACTATCAACAAAGC-3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -PH Δ y pAL- <i>rgf1</i> -PH Δ -GFP.
Rgf1-Not-CNH1	5'- CCCATATAAAAGTCGACGGCGCCGCCATCATAAACGC CTATCGC-3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -CNH1 Δ y pAL- <i>rgf1</i> -CNH1 Δ -GFP.
Rgf1-Not-CNH2	5'- CGTGGGTATATAAAGCTCGCGCCGCCAATCCTCAATG GGTCTG-3'	Construcción de pAL- <i>rgf1</i> -CNH2 Δ y pAL- <i>rgf1</i> -CNH2 Δ -GFP.
Rgf1-XhoI-BgIII	5'- CATTGGATGCCGGTAATCAGATCTCATTGCTCGAGTAA AAA-3'	Construcción de 4X-N2 Δ y pJK148- <i>rgf1</i> -N302-535-GFP.
Rgf1-N302	5'- GCCTGCTAGCAGAAGCTATGCGGCCGCCTAAATGAAGA TCCGCGGG-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -N302-GFP.
Rgf1-N535	5'- CGGTGAGATTCGAGTGCCGCGCCGCCCTCATTGTCCT CCAATTCC-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -N535-GFP.
Rgf1-NLS	5'- GAAAGTAAGGCAGCATATATAGCAGCTGCAGCAGCATTT TTATGAACAGGCGAG-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -N302-535(*NLS)-GFP, pJK148- <i>rgf1</i> -DEP Δ (*NLS)-GFP y pJK148- <i>rgf1</i> (*NLS)-GFP.
Rgf1-NES1	5'- GTTTCTCTTTGACCATGCTGCGGCCGCAGTAAACCAAA GACTATT-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> (*NES1)-GFP.
Rgf1-NES2	5'- CCATTGAGGATTGTCAAAGAGGCATATGCACCCACGGA ATCAACTTCG-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> (*NES2)-GFP.

Rad24-ATG	5'-CTCGAGCCATGGCTACTACTTCTCGTGAAGATGC-3'	Construcción de pGADT7- <i>rad24</i> ⁺ .
Rad24-END	5'-CCCAGGGCTATCTATGCGTCCGCCTTGGGCTC-3'	Construcción de pGADT7- <i>rad24</i> ⁺ .
Rgf1-Nde-END	5'- TCAAAAAAACCAAAATTACATATGCTGTCTACATGCTGC TC-3'	Construcción de SK- <i>rgf1</i> -GST- <i>ura4</i> ⁺ .
Rgf1-SmaI-2	5'- ACCAATATCCAATTAACCCGGGCCGTTATAAATAAACG- 3'	Construcción de pGBKT7- <i>rgf1</i> ⁺ y SK- <i>rgf1</i> -GST- <i>ura4</i> ⁺ .
Rad24-Tag-FW	5'- GCTGCTGGTGGTAACACCCGAGGGAGCTCAAGAAAACGC TCCTTCCAATGCTCCAGAAGGCGAAGCTGAGCCCAAGG CGGACGCACGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	Marcaje del gen <i>rad24</i> ⁺ con los epítomos GFP y GST en su extremo C'-terminal.
Rad24-Tag-RV	5'- CAAGATCTAAACGAAAAAGAACTCTTAGACAAATAAATTT TTTAAAATTGGTTCATAGTAGTGAAAGTATGGCATCAATC ATGAGCAACGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Marcaje del gen <i>rad24</i> ⁺ con los epítomos GFP y GST en su extremo C'-terminal.
Cds1-Tag-FW	5'- GGTTTTACTGTGAGCACACACGAACATCGTACTCCAC CATCATCGTCTGAACATGAGGCCACCGAACAGCTCAATT CTTCGAGTCGGATCCCCGGGTTAATTAA-3'	Marcaje del gen <i>cds1</i> ⁺ con GFP en su extremo C'-terminal.
Cds1-Tag-RV	5'- CAAGCGATTCTGTAAGTGAAGCACACATGGCAAAGATCG CGTCGAGACGTCCAAAGGGATAGTAGCTGGACAGA GTGGGAATTCGAGCTCGTTTAAAC-3'	Marcaje del gen <i>cds1</i> ⁺ con GFP en su extremo C'-terminal.
Cds1-Del-FW	5'- GCCCTCGTCTGACATGATAACTGCTTCTTTGGTAAAAGCT TGATCACTCATTGACGTTTATTGCGGATCCCCGGGTT AATTAA-3'	Deleción del gen <i>cds1</i> ⁺ .
Rgf1-Fos8	5'- GCCTTACTTTCTCGTGTTGCAGCTGAATTGTTAGATAGAC TACAG-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -3A-GFP y pJK148- <i>rgf1</i> -9A-GFP.
Rgf1-Fos9	5'- GCCCCTAAAAAGCAAGGAAAGTTGCTGGCCATACT TTCTTTGCGTA-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -3A-GFP y pJK148- <i>rgf1</i> -9A-GFP.
Rgf1-Fos10	5'- GTTTGTTCCCTTCGATTGACGGCAGCTGCTGCCACGCC AAAGAG-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -3A-GFP y pJK148- <i>rgf1</i> -9A-GFP.
Rgf1-Fos8E	5'- GCCTTACTTTCTCGTGTTGCAGAAGAATTGTTAGATAGAC TACAG-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -3E-GFP y pJK148- <i>rgf1</i> -9E-GFP.
Rgf1-Fos9E	5'- GCCCCTAAAAAGCAAGGAAAGTTGAAGGCCATACT TTCTTTGCGTA-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -3E-GFP y pJK148- <i>rgf1</i> -9E-GFP.
Rgf1-Fos10E	5'- GTTTGTTCCCTTCGATTGACGGAAGCTGCTGCCACGCC AAAGAG-3'	Construcción de pJK148- <i>rgf1</i> -3E-GFP y pJK148- <i>rgf1</i> -9E-GFP.
Rho1-Stop	5'- GGAACATAAGAAGAAGCGTTGACTGCAGATCTTGTG TAAACAGCTTGTTC-3'	Construcción de pJK148-GFP- <i>rho1</i> -Stop.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cnp1-Tag-FW	5'- GATACGAATTTATGTGCTATTCATGCTAAACGAGTGACG ATTATGCAACGAGACATGCAATTAGCCAGGAGGATTCGT GGTGCTCGGATCCCCGGGTTAATTA -3'	Marcaje del gen <i>cnp1</i> ⁺ con GFP en su extremo C'-terminal.
Cnp1-Tag-RV	5'- GCATGCTTAGAGTCTTATAATGAGTAGCTAAAGATCTGTC TCAAAATCACCTGATATCAATTAATACTGATCATACTTAG CAATCCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC -3'	Marcaje del gen <i>cnp1</i> ⁺ con GFP en su extremo C'-terminal.

ANEXO II

MEDIOS DE CULTIVO UTILIZADOS EN ESTE TRABAJO**Medio YES (Yeast Extract Supplemented)**

Glucosa	30 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
Suplementos: adenina, histidina, leucina, lisina y uracilo	225 mg/l

Se usa para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Inhibe la conjugación y la esporulación.

Medio MEA (Malt Extract Agar)

Extracto de Malta	30 g/l
Suplementos: adenina, histidina, leucina y uracilo	225 mg/l

Se usa para inducir la conjugación y la esporulación de *S. pombe*.

Medio Mínimo EMM (Edimburg Minimal Media)

Potasio hidrógeno ftalato	3 g/l
Na ₂ HPO ₄	2,2 g/l
NH ₄ Cl	5 g/l
Glucosa	20 g/l
Sales	20 ml/l
Vitaminas	1 ml/l
Minerales	0,1 ml/l
Suplementos	225 mg/l

Se usa para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*.

Solución de Sales (50x):

MgCl ₂ ·6H ₂ O	53,5 g/l
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,74 g/l
KCl	50 g/l
Na ₂ SO ₄	2 g/l

Solución de vitaminas (1000x):

Pantotenato sódico	1 g/l
Ácido nicotínico	10 g/l

MATERIALES Y MÉTODOS

Inositol	10 g/l
Biotina	10 mg/l

Solución de minerales (10000x):

H ₃ BO ₃	5 g/l
MnSO ₄	4 g/l
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4 g/l
FeCl ₃ ·6H ₂ O	2 g/l
H ₂ MoO ₄ ·H ₂ O	0,4 g/l
KI	1 g/l
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,4 g/l
Ácido cítrico	10 g/l

Medio YEPD (*Yeast Extract Peptone and Dextrose*)

Extracto de levadura	10 g/l
Glucosa	20 g/l
Peptona	20 g/l

Se usa para el crecimiento vegetativo de *S. Cerevisiae*.

Medio YNB (*Yeast Nitrogen Base*)

Base nitrogenada sin aa	7 g/l
Glucosa	20 g/l

Mezcla de aa comercial a la concentración indicada por el fabricante.

Se usa para el crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*.

Medio LB (*Luria-Bertani medium*)

Bactotripton	10 g/l
Extracto de levadura	5 g/l
NaCl	10 g/l

Se usa para el crecimiento de *E. coli*.

Medio 2xYT

Bactotripton	16 g/l
Extracto de levadura	10 g/l
NaCl	10 g/l

Tabla V: Tabla Soluciones stock de los compuestos añadidos a los medios de cultivo en este trabajo.

Producto	Solución stock	Origen
Geneticina G-418	50 mg/ml en agua	SIGMA
ClonNat	100 mg/ml en agua	Werner BioAgents
Higromicina B	100 mg/ml en agua	InvivoGen
Ampicilina	50 mg/ml en agua	Roche
Kanamicina	75 mg/ml en agua	SIGMA
Caspofungina	2.5 mg/ml en agua	SIGMA
FK506	1 mg/ml en DMSO	Calbiochem
MgCl ₂	1 M en agua	Fisher Chemical
Hidroxiurea	1 M en agua	SIGMA
KCl	2.4 M en agua	Fisher Chemical
Leptomicina B	≥95% en metanol:agua 7:3	SIGMA
Camptotecina	10 mM en DMSO	SIGMA
MMS	≥99% (líquido)	SIGMA
Latrunculina A	5 mM en DMSO	SIGMA
MBC	5 mg/ml en DMSO	SIGMA
TBZ	20 mg/ml en DMSO	SIGMA
Tiamina	20 mg/ml en agua	SIGMA



BIBLIOGRAFÍA

7

- Abruzzo, G.K., C.J. Gill, A.M. Flattery, L. Kong, C. Leighton, J.G. Smith, V.B. Pikounis, K. Bartizal, and H. Rosen. 2000. Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 44:2310-2318.
- Adachi, Y., and M. Yanagida. 1989. Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. *The Journal of cell biology.* 108:1195-1207.
- Al-Bassam, J., H. Kim, I. Flor-Parra, N. Lal, H. Velji, and F. Chang. 2012. Fission yeast Alp14 is a dose-dependent plus end-tracking microtubule polymerase. *Molecular biology of the cell.* 23:2878-2890.
- al-Khodairy, F., E. Fotou, K.S. Sheldrick, D.J. Griffiths, A.R. Lehmann, and A.M. Carr. 1994. Identification and characterization of new elements involved in checkpoint and feedback controls in fission yeast. *Molecular biology of the cell.* 5:147-160.
- Alcaide-Gavilan, M., A. Lahoz, R.R. Daga, and J. Jimenez. 2014. Feedback Regulation of SIN by Etd1 and Rho1 in Fission Yeast. *Genetics.* 196:455-470.
- Alfa, C.E., R. Booher, D. Beach, and J.S. Hyams. 1989. Fission yeast cyclin: subcellular localisation and cell cycle regulation. *J Cell Sci Suppl.* 12:9-19.
- Alfa, C.E., B. Ducommun, D. Beach, and J.S. Hyams. 1990. Distinct nuclear and spindle pole body population of cyclin-cdc2 in fission yeast. *Nature.* 347:680-682.
- Allshire, R.C., E.R. Nimmo, K. Ekwall, J.P. Javerzat, and G. Cranston. 1995. Mutations derepressing silent centromeric domains in fission yeast disrupt chromosome segregation. *Genes & development.* 9:218-233.
- Alvarez-Tabarés, I., A. Grallert, J.M. Ortiz, and I.M. Hagan. 2007. *Schizosaccharomyces pombe* protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *J. Cell Sci.* 120:3589-3601.
- Amon, A., S. Irniger, and K. Nasmyth. 1994. Closing the cell cycle circle in yeast: G2 cyclin proteolysis initiated at mitosis persists until the activation of G1 cyclins in the next cycle. *Cell.* 77:1037-1050.
- Anders, A., P.C. Lourenco, and K.E. Sawin. 2006. Noncore components of the fission yeast gamma-tubulin complex. *Molecular biology of the cell.* 17:5075-5093.
- Andrin, C., D. McDonald, K.M. Attwood, A. Rodrigue, S. Ghosh, R. Mirzayans, J.Y. Masson, G. Dellaire, and M.J. Hendzel. 2012. A requirement for polymerized actin in DNA double-strand break repair. *Nucleus.* 3:384-395.
- Ansbach, A.B., C. Noguchi, I.W. Klansek, M. Heidlebaugh, T.M. Nakamura, and E. Noguchi. 2008. RFCt18 and the Swi1-Swi3 complex function in separate and redundant pathways required for the stabilization of replication forks to facilitate sister chromatid cohesion in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell.* 19:595-607.
- Aoki, T., S. Ueda, T. Kataoka, and T. Satoh. 2009. Regulation of mitotic spindle formation by the RhoA guanine nucleotide exchange factor ARHGEF10. *BMC Cell Biol.* 10:56.
- Arcangioli, B., T.D. Copeland, and A.J. Klar. 1994. Sap1, a protein that binds to sequences required for mating-type switching, is essential for viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology.* 14:2058-2065.
- Arellano, M., P.M. Coll, and P. Pérez. 1999a. Rho GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. *Microsc. Res. Tech.* 47:51-60.
- Arellano, M., A. Duran, and P. Perez. 1997. Localization of the *Schizosaccharomyces pombe* Rho1 GTPase and its involvement in the organization of the actin cytoskeleton. *J. Cell. Sci.* 110:2547-2555.
- Arellano, M., A. Durán, and P. Pérez. 1996. Rho1 GTPase activates the (1-3) β -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J.* 15:4584-4591.
- Arellano, M., T. Niccoli, and P. Nurse. 2002. Tea3p is a cell end marker activating polarized growth in

- Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol.* 12:751-756.
- Arellano, M., M.H. Valdivieso, T.M. Calonge, P.M. Coll, A. Durán, and P. Pérez. 1999b. *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, Pck1p and Pck2p, are targets of Rho1p and Rho2p and differentially regulate cell integrity. *J. Cell Sci.* 112:3569-3578.
- Armstrong, J., N. Bone, J. Dodgson, and T. Beck. 2007. The role and aims of the FYSSION project. *Brief. Funct. Genomic Proteomic.* 6:3-7.
- Asakawa, K., M. Toya, M. Sato, M. Kanai, K. Kume, T. Goshima, M.A. Garcia, D. Hirata, and T. Toda. 2005. Mal3, the fission yeast EB1 homologue, cooperates with Bub1 spindle checkpoint to prevent monopolar attachment. *EMBO reports.* 6:1194-1200.
- Ausubel, F.M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith, and K. Struhl. 1995. Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley and Sons, New York.*
- Bähler, J., and J.R. Pringle. 1998. Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev.* 12:1356-1370.
- Bähler, J., J.-Q. Wu, M.S. Longtine, N.G. Shah, A. McKenzie III, A.B. Steever, A. Wach, P. Philippsen, and J.R. Pringle. 1998. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast.* 14:943-951.
- Bailis, J.M., D.D. Luche, T. Hunter, and S.L. Forsburg. 2008. Minichromosome maintenance proteins interact with checkpoint and recombination proteins to promote s-phase genome stability. *Molecular and cellular biology.* 28:1724-1738.
- Bakal, C.J., D. Finan, J. LaRose, C.D. Wells, G. Gish, S. Kulkarni, P. DeSepulveda, A. Wilde, and R. Rottapel. 2005. The Rho GTP exchange factor Lfc promotes spindle assembly in early mitosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:9529-9534.
- Balasubramanian, M., E. Bi, and M. Glotzer. 2004. Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr. Biol.* 14:806-818.
- Balkovec, J.M., D.L. Hughes, P.S. Masurekar, C.A. Sable, R.E. Schwartz, and S.B. Singh. 2014. Discovery and development of first in class antifungal caspofungin (CANCIDAS(R))--a case study. *Nat Prod Rep.* 31:15-34.
- Ball, L.J., R. Kuhne, J. Schneider-Mergener, and H. Oshkinat. 2005. Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angewandte Chemie.* 44:2852-2869.
- Barba, G., Soto, T., M. Madrid, A. Núñez, J. Vicente, M. Gacto, and J. Cansado. 2008. Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal.* 20:748-757.
- Basi, G., E. Schmid, and K. Maundrell. 1993. TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promoter affect transcription efficiently but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene.* 123:131-136.
- Bass, K.L., J.M. Murray, and M.J. O'Connell. 2012. Brc1-dependent recovery from replication stress. *Journal of cell science.* 125:2753-2764.
- Behrens, R., Nurse, P. 2002. roles of fission yeast tea1p in the localization of polarity factors and in organizing the microtubular cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 157:783-793.
- Beinhauer, J.D., I.M. Hagan, J.H. Hegemann, and U. Fleig. 1997. Mal3, the fission yeast homologue of the human APC-interacting protein EB-1 is required for microtubule integrity and the maintenance of cell form. *The Journal of cell biology.* 139:717-728.
- Bhatia, P., O. Hachet, M. Hersch, S.A. Rincon, M. Berthelot-Grosjean, S. Dalessi, L. Basterra, S. Bergmann, A. Paoletti, and S.G. Martin. 2014. Distinct levels in Pom1 gradients limit Cdr2 activity and localization to time and position division. *Cell cycle.* 13:538-552.
- Bhowmick, N.A., M. Ghiassi, M. Aakre, K. Brown, V. Singh, and H.L. Moses. 2003. TGF-beta-induced RhoA and p160ROCK activation is involved in the inhibition of Cdc25A with resultant cell-cycle

- arrest. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 100:15548-15553.
- Bickle, M., P.A. Delley, A. Schmidt, and M.N. Hall. 1998. Cell wall integrity modulates Rho1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J*. 17: 2235-2245.
- Bjerling, P., and K. Ekwall. 2002. Centromere domain organization and histone modifications. *Braz J Med Biol Res*. 35:499-507.
- Blanco, M.A., A. Sanchez-Diaz, J.M. de Prada, and S. Moreno. 2000. APC(ste9/srw1) promotes degradation of mitotic cyclins in G(1) and is inhibited by cdc2 phosphorylation. *The EMBO journal*. 19:3945-3955.
- Boddy, M.N., B. Furnari, O. Mondesert, and P. Russell. 1998. Replication checkpoint enforced by kinases Cds1 and Chk1. *Science*. 280:909-912.
- Boddy, M.N., and P. Russell. 2001. DNA replication checkpoint. *Curr Biol*. . 11:R953-956.
- Bos, J.L., H. Rehmann, and A. Wittinghofer. 2007. GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell*. 129:865-877.
- Bourne, H.R., D.A. Sanders, and M. F. 1991. The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*. 349:117-127.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-254.
- Branzei, D., and M. Foiani. 2009. The checkpoint response to replication stress. *DNA repair*. 8:1038-1046.
- Braun, M., D.R. Drummond, R.A. Cross, and A.D. McAinsh. 2009. The kinesin-14 Klp2 organizes microtubules into parallel bundles by an ATP-dependent sorting mechanism. *Nature cell biology*. 11:724-730.
- Bridge, A.J., M. Morphew, R. Bartlett, and I.M. Hagan. 1998. The fission yeast SPB component Cut12 links bipolar spindle formation to mitotic control. *Genes & development*. 12:927-942.
- Broadus, M.R., and K.L. Gould. 2012. Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Molecular biology of the cell*. 23:4118-4128.
- Brondello, J.-M., M.N. Boddy, B. Furnari, and P. Russell. 1999. Basis for the Checkpoint Signal Specificity That Regulates Chk1 and Cds1 Protein Kinases. *Mol. Cell Biol*. 19:4262-4269.
- Browning, H., D.D. Hackney, and P. Nurse. 2003. Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nature cell biology*. 5:812-818.
- Buchsbaum, R.J. 2007. Rho activation at a glance. *Journal of cell science*. 120:1149-1152.
- Buey, R.M., I. Sen, O. Kortt, R. Mohan, D. Gfeller, D. Vepintsev, I. Kretzschmar, J. Scheuermann, D. Neri, V. Zoete, O. Michielin, J.M. de Pereda, A. Akhmanova, R. Volkmer, and M.O. Steinmetz. 2012. Sequence determinants of a microtubule tip localization signal (MtLS). *The Journal of biological chemistry*. 287:28227-28242.
- Buscaino, A., E. Lejeune, P. Audergon, G. Hamilton, A. Pidoux, and R.C. Allshire. 2013. Distinct roles for Sir2 and RNAi in centromeric heterochromatin nucleation, spreading and maintenance. *The EMBO journal*. 32:1250-1264.
- Busch, K.E., and D. Brunner. 2004. The microtubule plus end-tracking proteins mal3p and tip1p cooperate for cell-end targeting of interphase microtubules. *Current biology : CB*. 14:548-559.
- Bustelo, X.R., V. Sauzeau, and I.M. Berenjano. 2007. GTP binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and function in vivo. *Bioessays*. 29:356-370.
- Buttrick, G.J., and J.B. Millar. 2011. Ringing the changes: emerging roles for DASH at the kinetochore-microtubule Interface. *Chromosome Res*. 19:393-407.
- Calonge, T.M., M. Arellano, P.M. Coll, and P. Perez. 2003. Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol*. 47:507-518.

- Carnero, E., J.C. Ribas, B. Garcia, A. Duran, and Y. Sanchez. 2000. *Schizosaccharomyces pombe* Ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol Gen Genet.* 264:173-183.
- Carr, A.M., and S. Lambert. 2013. Replication stress-induced genome instability: the dark side of replication maintenance by homologous recombination. *Journal of molecular biology.* 425:4733-4744.
- Chalamalasetty, R.B., S. Hummer, E.A. Nigg, and H.H. Sillje. 2006. Influence of human Ect2 depletion and overexpression on cleavage furrow formation and abscission. *Journal of cell science.* 119:3008-3019.
- Chang, F., and S.G. Martin. 2009. Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:a001347.
- Chang, L., and K.L. Gould. 2000. Sid4p is required to localize components of the septation initiation pathway to the spindle pole body in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 97:5249-5254.
- Chen, C.K., N.L. Chan, and A.H. Wang. 2011. The many blades of the beta-propeller proteins: conserved but versatile. *Trends in biochemical sciences.* 36:553-561.
- Chen, C.T., A. Feoktistova, J.S. Chen, Y.S. Shim, D.M. Clifford, K.L. Gould, and D. McCollum. 2008. The SIN kinase Sid2 regulates cytoplasmic retention of the *S. pombe* Cdc14-like phosphatase Clp1. *Current biology : CB.* 18:1594-1599.
- Cherfils, J.Z., M. 2013. Regulation of small GTPases by GEFs, GAPs, and GDIs. *American Physiological Society.* 93:269-309.
- Chu, Z., M. Eshaghi, S.Y. Poon, and J. Liu. 2009. A Cds1-mediated checkpoint protects the MBF activator Rep2 from ubiquitination by anaphase-promoting complex/cyclosome-Ste9 at S-phase arrest in fission yeast. *Molecular and cellular biology.* 29:4959-4970.
- Ciccia, A., and S.J. Elledge. 2010. The DNA damage response: making it safe to play with knives. *Mol Cell.* 40:179-204.
- Consonni, S.V., M.M. Maurice, and J.L. Bos. 2014. DEP domains: structurally similar but functionally different. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 15:357-362.
- Cook, D.R., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2013. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene. In press.*
- Correa-Bordes, J., M.P. Gulli, and P. Nurse. 1997. p25rum1 promotes proteolysis of the mitotic B-cyclin p56cdc13 during G1 of the fission yeast cell cycle. *The EMBO journal.* 16:4657-4664.
- Correa-Bordes, J., and P. Nurse. 1995. p25rum1 orders S phase and mitosis by acting as an inhibitor of the p34cdc2 mitotic kinase. *Cell.* 83:1001-1009.
- Creanor, J., and J.M. Mitchison. 1996. The kinetics of the B cyclin p56cdc13 and the phosphatase p80cdc25 during the cell cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science.* 109:1647-1653.
- Cruz, S., S. Munoz, E. Manjon, P. Garcia, and Y. Sanchez. 2013. The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen.* 2:778-794.
- Daga, R.R., and F. Chang. 2005. Dynamic positioning of the fission yeast cell division plane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 102:8228-8232.
- Daga, R.R., and J. Jimenez. 1999. Translational control of the cdc25 cell cycle phosphatase: a molecular mechanism coupling mitosis to cell growth. *Journal of cell science.* 18:3137-3146.
- Daga, R.R., A. Lahoz, M.J. Munoz, S. Moreno, and J. Jimenez. 2005. Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *The EMBO journal.* 24:2436-2446.
- Daga, R.R., and P. Nurse. 2008. Interphase microtubule bundles use global cell shape to guide spindle alignment in fission yeast. *Journal of cell science.* 121:1973-1980.

- Das, M., T. Drake, D.J. Wiley, P. Buchwald, D. Vavylonis, and F. Verde. 2012. Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science*. 337:239-243.
- Das, M., D.J. Wiley, X. Chen, K. Shah, and F. Verde. 2009. The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol.* . 19:1314-1319.
- Das, M., D.J. Wiley, S. Medina, H.A. Vincent, M. Larrea, A. Oriolo, and F. Verde. 2007. Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Mol Biol. Cell*. 18:2090-2101.
- De Antoni, A., C.G. Pearson, D. Cimini, J.C. Canman, V. Sala, L. Nezi, M. Mapelli, L. Sironi, M. Faretta, E.D. Salmon, and A. Musacchio. 2005. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Current biology : CB*. 15:214-225.
- De Bondt, H.L., J. Rosenblatt, J. Jancarik, H.D. Jones, D.O. Morgan, and S.H. Kim. 1993. Crystal structure of cyclin-dependent kinase 2. *Nature*. 363:595-602.
- de Bruin, R.A., T.I. Kalashnikova, A. Aslanian, J. Wohlschlegel, C. Chahwan, J.R. Yates, 3rd, P. Russell, and C. Wittenberg. 2008. DNA replication checkpoint promotes G1-S transcription by inactivating the MBF repressor Nrm1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 105:11230-11235.
- DerMardirossian, C., and G.M. Bokoch. 2005. GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in cell biology*. 15:356-363.
- Desai, A., and T.J. Mitchison. 1997. Microtubule polymerization dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13:83-117.
- Diaz-Cuervo, H., and A. Bueno. 2008. Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Fip1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 19:2488-2499.
- Dore, A.S., M.L. Kilkeny, N.J. Rzechorzek, and L.H. Pearl. 2009. Crystal structure of the rad9-rad1-hus1 DNA damage checkpoint complex--implications for clamp loading and regulation. *Mol Cell*. 34:735-745.
- Douglas, C., J.A. Marrinan, W. Li, and M.B. Kurtz. 1994. A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3-b-D-glucan synthase. *J. Bacteriol*. 176:5686-5696.
- Dubash, A.D., C. Guilluy, M.C. Srougi, E. Boulter, K. Burridge, and R. Garcia-Mata. 2011. The small GTPase RhoA localizes to the nucleus and is activated by Net1 and DNA damage signals. *PLoS one*. 6:e17380.
- Ducommun, B., G. Draetta, P. Young, and D. Beach. 1990. Fission yeast cdc25 is a cell-cycle regulated protein. *Biochem Biophys Res Commun*. 167:301-309.
- Duellberg, C., F.J. Fourniol, S.P. Maurer, J. Roostal, and T. Surrey. 2013. End-binding proteins and Ase1/PRC1 define local functionality of structurally distinct parts of the microtubule cytoskeleton. *Trends in cell biology*. 23:54-63.
- Dunaway, S., H.-Y. Liu, and N.C. Walworth. 2005. Interaction of 14-3-3 protein with Chk1 affects localization and checkpoint function. *J Cell Sci*. 118:39-50.
- Dunleavy, E.M., A.L. Pidoux, M. Monet, C. Bonilla, W. Richardson, G.L. Hamilton, K. Ekwall, P.J. McLaughlin, and R.C. Allshire. 2007. A NASP (N1/N2)-related protein, Sim3, binds CENP-A and is required for its deposition at fission yeast centromeres. *Mol Cell*. 28:1029-1044.
- Durfee, T., K. Becherer, P.-L. Chen, S.-H. Yeh, Y. Yang, A.E. Kilburn, W.-H. Lee, and S.J. Elledge. 1993. The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev*. 7:555-569.
- Durocher, D., I.A. Taylor, D. Sarbassova, L.F. Haire, S.L. Westcott, S.P. Jackson, S.J. Smerdon, and M.B. Yaffe. 2000. The molecular basis of FHA domain:phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms. *Mol Cell*. 6:1169-1182.
- Dutta, C., P.K. Patel, A. Rosebrock, A. Oliva, J. Leatherwood, and N. Rhind. 2008. The DNA

- replication checkpoint directly regulates MBF-dependent G1/S transcription. *Molecular and cellular biology*. 28:5977-5985.
- Egel, R. 1994. Regulation of meiosis and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In *The Mycota I*. Wessels-Meinhardt, editor. Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg. 251-265.
- Egel, R., D.H. Beach, and A.J. Klar. 1984. Genes required for initiation and resolution steps of mating-type switching in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 81:3481-3485.
- Erent, M., D.R. Drummond, and R.A. Cross. 2012. *S. pombe* kinesins-8 promote both nucleation and catastrophe of microtubules. *PLoS one*. 7:e30738.
- Esteban, V., M. Blanco, N. Cueille, V. Simanis, S. Moreno, and A. Bueno. 2004. A role for the Cdc14-family phosphatase Flp1p at the end of the cell cycle in controlling the rapid degradation of the mitotic inducer Cdc25p in fission yeast. *Journal of cell science*. 117:2461-2468.
- Eva, A., G. Vecchio, C.D. Rao, S.R. Tronick, and S.A. Aaronson. 1988. The predicted DBL oncogene product defines a distinct class of transforming proteins. *Proc Natl Acad. Sci. USA*. 85:2061-2065.
- Feierbach, B., and F. Chang. 2001. Roles of the fission yeast formin For3 in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr. Biol*. 11:1656-1665.
- Feierbach, B., Verde F., and F. Chang. 2004. Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol*. 165.
- Fields, S., and O. Song. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature*. 340:245-246.
- Fisher, D., L. Krasinska, D. Coudreuse, and B. Novak. 2012. Phosphorylation network dynamics in the control of cell cycle transitions. *Journal of cell science*. 125:4703-4711.
- Fisher, D.L., and P. Nurse. 1996. A single fission yeast mitotic cyclin B p34cdc2 kinase promotes both S-phase and mitosis in the absence of G1 cyclins. *The EMBO journal*. 15:850-860.
- Forsburg, S.L. 2008. The MCM helicase: linking checkpoints to the replication fork. *Biochemical Society transactions*. 36:114-119.
- Franco, A., J.C. Meadows, and J.B. Millar. 2007. The Dam1/DASH complex is required for the retrieval of unclustered kinetochores in fission yeast. *Journal of cell science*. 120:3345-3351.
- Froget, B., J. Blaisonneau, S. Lambert, and G. Baldacci. 2008. Cleavage of stalled forks by fission yeast Mus81/Eme1 in absence of DNA replication checkpoint. *Molecular biology of the cell*. 19:445-456.
- Fu, C., J.J. Ward, I. Loiodice, G. Velve-Casquillas, F.J. Nedelec, and P.T. Tran. 2009. Phospho-regulated interaction between kinesin-6 Klp9p and microtubule bundler Ase1p promotes spindle elongation. *Developmental cell*. 17:257-267.
- Fu, C.A., M. Shen, B.C. Huang, J. Lasaga, D.G. Payan, and Y. Luo. 1999. TNIK, a novel member of the germinal center kinase family that activates the c-Jun N-terminal kinase pathway and regulates the cytoskeleton. *The Journal of biological chemistry*. 274:30729-30737.
- Fukuda, M., S. Asano, T. Nakamura, M. Adachi, M. Yoshida, M. Yanagida, and E. Nishida. 1997. CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*. 390:308-311.
- Fuller, B.G., and P.T. Stukenberg. 2009. Cell division: righting the check. *Current biology : CB*. 19:R550-553.
- Funabiki, H., K. Kumada, and M. Yanagida. 1996. Fission yeast Cut1 and Cut2 are essential for sister chromatid separation, concentrate along the metaphase spindle and form large complexes. *The EMBO journal*. 15:6617-6628.
- Furnari, B., A. Blasina, M.N. Boddy, C.H. McGowan, and P. Russell. 1999. Cdc25 inhibited in vivo and in vitro by checkpoint kinases Cds1 and Chk1. *Molecular biology of the cell*. 10:833-845.
- Furnari, B., N. Rhind, and P. Russell. 1997. Cdc25 mitotic inducer targeted by chk1 DNA damage checkpoint kinase. *Science*. 277:1495-1497.

- Furuya, K., M. Poitelea, L. Guo, T. Caspari, and A.M. Carr. 2004. Chk1 activation requires Rad9 S/TQ-site phosphorylation to promote association with C-terminal BRCT domains of Rad4TOPBP1. *Genes & development*. 18:1154-1164.
- Gachet, Y., and J.S. Hyams. 2005. Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *Journal of cell science*. 118:4231-4242.
- García, M.A., N. Koonrugsa, and T. Toda. 2002. Two kinesin-like Kin I family proteins in fission yeast regulate the establishment of metaphase and the onset of anaphase A. *Current biology : CB*. 12:610-621.
- García, P., I. García, F. Marcos, G. Ruiz de Garibay, and Y. Sánchez. 2009b. Fission yeast Rgf2p is a Rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of Rgf1p. *Genetics*. 181:1321-1334.
- García, P., V. Tajadura, I. García, and Y. Sánchez. 2006a. Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 17:1620-1631.
- García, P., V. Tajadura, I. García, and Y. Sánchez. 2006b. Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast*.
- García, P., V. Tajadura, and Y. Sanchez. 2009a. The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell*. . 20:721-731.
- García-Cortes, J.C., and D. McCollum. 2009. Proper timing of cytokinesis is regulated by *Schizosaccharomyces pombe* Etd1. *The Journal of cell biology*. 186:739-753.
- Golub, E.I. 1988. "One-minute" transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucl. Acids Res*. 16:1641.
- Gomez-Escoda, B., T. Ivanova, I.A. Calvo, I. Alves-Rodrigues, E. Hidalgo, and J. Ayte. 2011. Yox1 links MBF-dependent transcription to completion of DNA synthesis. *EMBO reports*. 12:84-89.
- Gould, K.L., and P. Nurse. 1989. Tyrosine phosphorylation of the fission yeast cdc2+ protein kinase regulates entry into mitosis. *Nature*. 342:39-45.
- Grallert, A., K.Y. Chan, M.L. Alonso-Nunez, M. Madrid, A. Biswas, I. Alvarez-Tabares, Y. Connolly, K. Tanaka, A. Robertson, J.M. Ortiz, D.L. Smith, and I.M. Hagan. 2013b. Removal of centrosomal PP1 by NIMA kinase unlocks the MPF feedback loop to promote mitotic commitment in *S. pombe*. *Current biology : CB*. 23:213-222.
- Grallert, A., Y. Connolly, D.L. Smith, V. Simanis, and I.M. Hagan. 2012. The *S. pombe* cytokinesis NDR kinase Sid2 activates Fin1 NIMA kinase to control mitotic commitment through Pom1/Wee1. *Nature cell biology*. 14:738-745.
- Grallert, A., A. Patel, V.A. Tallada, K.Y. Chan, S. Bagley, A. Krapp, V. Simanis, and I.M. Hagan. 2013a. Centrosomal MPF triggers the mitotic and morphogenetic switches of fission yeast. *Nature cell biology*. 15:88-95.
- Grissom, P.M., T. Fiedler, E.L. Grishchuk, D. Nicastro, R.R. West, and J.R. McIntosh. 2009. Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement. *Molecular biology of the cell*. 20:963-972.
- Gupta, S., S. Mana-Capelli, J.R. McLean, C.T. Chen, S. Ray, K.L. Gould, and D. McCollum. 2013. Identification of SIN pathway targets reveals mechanisms of crosstalk between NDR kinase pathways. *Current biology : CB*. 23:333-338.
- Guzman-Vendrell, M., S. Baldissard, M. Almonacid, A. Mayeux, A. Paoletti, and J.B. Moseley. 2013. Blt1 and Mid1 provide overlapping membrane anchors to position the division plane in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. 33:418-428.
- Hagan, I.M. 2004. The Mitotic Spindle and Genome Segregation. In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. Genetics, genomics and beyond. R. Egel, editor.
- Hagan, I.M., and J.S. Hyams. 1988. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast

- Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* 89:343-357.
- Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions.* 40:1378-1382.
- Harris, S., C. Kemplen, T. Caspari, C. Chan, H.D. Lindsay, M. Poitelea, A.M. Carr, and C. Price. 2003. Delineating the position of rad4+/cut5+ within the DNA-structure checkpoint pathways in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science.* 116:3519-3529.
- Hayashi, T., Y. Fujita, O. Iwasaki, Y. Adachi, K. Takahashi, and M. Yanagida. 2004. Mis16 and Mis18 are required for CENP-A loading and histone deacetylation at centromeres. *Cell.* 118:715-729.
- Hayles, J., and P. Nurse. 2001. A journey into space. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 2:647-656.
- Heinrich, S., H. Windecker, N. Hustedt, and S. Hauf. 2012. Mph1 kinetochore localization is crucial and upstream in the hierarchy of spindle assembly checkpoint protein recruitment to kinetochores. *Journal of cell science.* 125:4720-4727.
- Hiraoka, Y., D.Q. Ding, A. Yamamoto, C. Tsutsumi, and Y. Chikashige. 2000. Characterization of fission yeast meiotic mutants based on live observation of meiotic prophase nuclear movement. *Chromosoma.* 109:103-109.
- Hirata, D., H. Masuda, M. Eddison, and T. Toda. 1998. Essential role of tubulin-folding cofactor D in microtubule assembly and its association with microtubules in fission yeast. *The EMBO journal.* 17:658-666.
- Hou, H., S.P. Kallgren, and S. Jia. 2013. Csi1 illuminates the mechanism and function of Rab1 configuration. *Nucleus.* 4:176-181.
- Hou, H., Z. Zhou, Y. Wang, J. Wang, S.P. Kallgren, T. Kurchuk, E.A. Miller, F. Chang, and S. Jia. 2012. Csi1 links centromeres to the nuclear envelope for centromere clustering. *The Journal of cell biology.* 199:735-744.
- Hsu, K.S., and T. Toda. 2011. Ndc80 internal loop interacts with Dis1/TOG to ensure proper kinetochore-spindle attachment in fission yeast. *Current biology : CB.* 21:214-220.
- Hu, J., L. Sun, F. Shen, Y. Chen, Y. Hua, Y. Liu, M. Zhang, Y. Hu, Q. Wang, W. Xu, F. Sun, J. Ji, J.M. Murray, A.M. Carr, and D. Kong. 2012. The intra-S phase checkpoint targets Dna2 to prevent stalled replication forks from reversing. *Cell.* 149:1221-1232.
- Ivanova, T., I. Alves-Rodrigues, B. Gomez-Escoda, C. Dutta, J.A. DeCaprio, N. Rhind, E. Hidalgo, and J. Ayte. 2013. The DNA damage and the DNA replication checkpoints converge at the MBF transcription factor. *Molecular biology of the cell.* 24:3350-3357.
- Jaffe, A.B., and A. Hall. 2005. Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Ann. Rev. Cell Dev. Biol.* 21:247-269.
- Jin, F., H. Liu, P. Li, H.G. Yu, and Y. Wang. 2012. Loss of function of the Cik1/Kar3 motor complex results in chromosomes with syntelic attachment that are sensed by the tension checkpoint. *PLoS Genet.* 8:e1002492.
- Johnson, A.E., D. McCollum, and K.L. Gould. 2012. Polar opposites: Fine-tuning cytokinesis through SIN asymmetry. *Cytoskeleton (Hoboken).* 69:686-699.
- Johnson, M.A., M. Sharma, M.T. Mok, and B.R. Henderson. 2013. Stimulation of in vivo nuclear transport dynamics of actin and its co-factors IQGAP1 and Rac1 in response to DNA replication stress. *Biochim Biophys Acta.* 1833:2334-2347.
- Jossen, R., and R. Bermejo. 2013. The DNA damage checkpoint response to replication stress: A Game of Forks. *Front Genet.* 4:26.
- Kai, M., M.N. Boddy, P. Russell, and T.S. Wang. 2005. Replication checkpoint kinase Cds1 regulates Mus81 to preserve genome integrity during replication stress. *Genes & development.* 19:919-932.
- Kamasaki, T., R. Arai, M. Osumi, and I. Mabuchi. 2005. Directionality of F-actin cables changes during fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol.* 7:916-917.
- Kawashima, S.A., T. Tsukahara, M. Langedegger, S. Hauf, T.S. Kitajima, and Y. Watanabe. 2007. Shugoshin enables tension-generating attachment of

- kinetochores by loading Aurora to centromeres. *Genes & development*. 21:420-435.
- Kawashima, S.A., Y. Yamagishi, T. Honda, K. Ishiguro, and Y. Watanabe. 2010. Phosphorylation of H2A by Bub1 prevents chromosomal instability through localizing shugoshin. *Science*. 327:172-177.
- Keeney, J.B., and J.D. Boeke. 1994. Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 136:849-856.
- Kellogg, D.R. 2003. Wee1-dependent mechanisms required for coordination of cell growth and cell division. *Journal of cell science*. 116:4883-4890.
- Kim, W.J., S. Lee, M.S. Park, Y.K. Jang, J.B. Kim, and S.D. Park. 2000. Rad22 protein, a rad52 homologue in *Schizosaccharomyces pombe*, binds to DNA double-strand breaks. *The Journal of biological chemistry*. 275:35607-35611.
- King, E.M., N. Rachidi, N. Morrice, K.G. Hardwick, and M.J. Stark. 2007. Ipl1p-dependent phosphorylation of Mad3p is required for the spindle checkpoint response to lack of tension at kinetochores. *Genes & development*. 21:1163-1168.
- Kitamura, K., H. Maekawa, and C. Shimoda. 1998. Fission yeast Ste9, a homolog of Hct1/Cdh1 and Fizzy-related, is a novel negative regulator of cell cycle progression during G1-phase. *Molecular biology of the cell*. 9:1065-1080.
- Kokkoris, K., D.G. Castro, and S.G. Martin. 2014. Tea4-phosphatase I landmark promotes local growth by dual Cdc42 GEF recruitment and GAP exclusion. *Journal of cell science*.
- Kono, K., S. Nogami, M. Abe, Nishizawa. M., Morishita. S., D. Pellman, and Y. Ohya. 2008. G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 19:1763-1771.
- Kovar, D.R., V. Sirotkin, and M. Lord. 2011. Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends in cell biology*. 21:177-187.
- Kovelman, R., and P. Russell. 1996. Stockpiling of Cdc25 during a DNA replication checkpoint arrest in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*. 16:86-93.
- Krause, S.A., M.J. Cundell, P.P. Poon, J. McGhie, G.C. Johnston, C. Price, and J.V. Gray. 2012. Functional specialisation of yeast Rho1 GTP exchange factors. *Journal of cell science*. 125:2721-2731.
- Kudo, N., N. Matsumori, H. Taoka, D. Fujiwara, E.P. Schreiner, B. Wolff, M. Yoshida, and S. Horinouchi. 1999. Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96:9112-9117.
- Kumada, K., T. Nakamura, K. Nagao, H. Funabiki, T. Nakagawa, and M. Yanagida. 1998. Cut1 is loaded onto the spindle by binding to Cut2 and promotes anaphase spindle movement upon Cut2 proteolysis. *Current biology : CB*. 8:633-641.
- Kumar, S., and J.A. Huberman. 2004. On the slowing of S phase in response to DNA damage in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*. 279:43574-43580.
- Kume, K., T. Koyano, M. Kanai, T. Toda, and D. Hirata. 2011. Calcineurin ensures a link between the DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth. *Nature cell biology*. 13:234-242.
- Kunkel, T.A. 1985. Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 82:488-492.
- Kushner, R.S. 1978. An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. *Boyer, H.W. and Nicosia, S. (ed.) Genetic Engineering. Elsevier, Amsterdam.:17-24.*
- Labib, K., and G. De Piccoli. 2011. Surviving chromosome replication: the many roles of the S-phase checkpoint pathway. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 366:3554-3561.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680-685.

- Lagana, A., J.F. Dorn, V. De Rop, A.M. Ladouceur, A.S. Maddox, and P.S. Maddox. 2010. A small GTPase molecular switch regulates epigenetic centromere maintenance by stabilizing newly incorporated CENP-A. *Nature cell biology*. 12:1186-1193.
- Lambert, S., and A.M. Carr. 2013. Replication stress and genome rearrangements: lessons from yeast models. *Curr Opin Genet Dev*. 23:132-139.
- Lambert, S., K. Mizuno, J. Blaisonneau, S. Martineau, R. Chanet, K. Freon, J.M. Murray, A.M. Carr, and G. Baldacci. 2010. Homologous recombination restarts blocked replication forks at the expense of genome rearrangements by template exchange. *Mol Cell*. 39:346-359.
- Lampert, F., P. Hornung, and S. Westermann. 2010. The Dam1 complex confers microtubule plus end-tracking activity to the Ndc80 kinetochore complex. *The Journal of cell biology*. 189:641-649.
- Lampert, F., C. Mieck, G.M. Alushin, E. Nogales, and S. Westermann. 2013. Molecular requirements for the formation of a kinetochore-microtubule interface by Dam1 and Ndc80 complexes. *The Journal of cell biology*. 200:21-30.
- Langerak, P., E. Mejia-Ramirez, O. Limbo, and P. Russell. 2011. Release of Ku and MRN from DNA ends by Mre11 nuclease activity and Ctp1 is required for homologous recombination repair of double-strand breaks. *PLoS Genet*. 7:e1002271.
- Lara-Gonzalez, P., F.G. Westhorpe, and S.S. Taylor. 2012. The spindle assembly checkpoint. *Current biology* : CB. 22:R966-980.
- Lazer, G., and S. Katzav. 2011. Guanine nucleotide exchange factors for RhoGTPases: Good therapeutic targets for cancer therapy? . *Cell Signal*. 23:969-979.
- Lee, S.Y., S. Rozenzhak, and P. Russell. 2013. gammaH2A-binding protein Brc1 affects centromere function in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. 33:1410-1416.
- Lee, W.L., M. Bezanilla, and T.D. Pollard. 2000. Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *The Journal of cell biology*. 151:789-800.
- Leman, A.R., and E. Noguchi. 2012. Local and global functions of Timeless and Tipin in replication fork protection. *Cell cycle*. 11:3945-3955.
- Leupold, U. 1950. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol*. 24:381-480.
- Limbo, O., M.E. Porter-Goff, N. Rhind, and P. Russell. 2011. Mre11 nuclease activity and Ctp1 regulate Chk1 activation by Rad3ATR and Tel1ATM checkpoint kinases at double-strand breaks. *Molecular and cellular biology*. 31:573-583.
- Lindsay, H.D., D.J. Griffiths, R.J. Edwards, P.U. Christensen, J.M. Murray, F. Osman, N. Walworth, and A.M. Carr. 1998. S-phase-specific activation of Cds1 kinase defines a subpathway of the checkpoint response in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev*. . 12:382-395.
- Liu, D., G. Vader, M.J. Vromans, M.A. Lampson, and S.M. Lens. 2009. Sensing chromosome bi-orientation by spatial separation of aurora B kinase from kinetochore substrates. *Science*. 323:1350-1353.
- Liu, X., I. McLeod, S. Anderson, J.R. Yates, 3rd, and X. He. 2005. Molecular analysis of kinetochore architecture in fission yeast. *The EMBO journal*. 24:2919-2930.
- Liu, X., H. Wang, M. Eberstadt, A. Schnuchel, E.T. Olejniczak, R. Meadows, and S.W. Fesik. 1998. NMR structure and mutagenesis of the N-terminal Dbl homology domain of the nucleotide exchange factor Trio. *Cell*. 95:269-277.
- Loewith, R., A. Hubberstey, and D. Young. 2000. Skh1, the MEK component of the Mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci*. 113:153-160.
- Loiodice, I., J. Staub, T.G. Setty, N.P. Nguyen, A. Paoletti, and P.T. Tran. 2005. Ase1p organizes antiparallel microtubule arrays during interphase and mitosis in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 16:1756-1768.
- Lopez-Girona, A., B. Furnari, O. Mondesert, and P. Russell. 1999. Nuclear localization of Cdc25 is regulated by DNA damage and a 14-3-3 protein. *Nature*. 397:172-175.

- Lundgren, K., N. Walworth, R. Booher, M. Dembski, M. Kirschner, and D. Beach. 1991. mik1 and wee1 cooperate in the inhibitory tyrosine phosphorylation of cdc2. *Cell*. 64:1111-1122.
- Ma, Y., T. Kuno, A. Kita, Y. Asayama, and R. Sugiura. 2006. Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 17:5028-5037.
- Madaule, P., T. Furuyashiki, T. Reid, T. Ishizaki, G. Watanabe, N. Morii, and S. Narumiya. 1995. A novel partner for the GTP-bound forms of rho and rac. *FEBS letters*. 377:243-248.
- Mah, A.S., A.E. Elia, G. Devgan, J. Ptacek, M. Schutkowski, M. Snyder, M.B. Yaffe, and R.J. Deshaies. 2005. Substrate specificity analysis of protein kinase complex Dbf2-Mob1 by peptide library and proteome array screening. *BMC Biochem*. 6:22.
- Majka, J., S.K. Binz, M.S. Wold, and P.M. Burgers. 2006. Replication protein A directs loading of the DNA damage checkpoint clamp to 5'-DNA junctions. *The Journal of biological chemistry*. 281:27855-27861.
- Manning, B.D., R. Padmanabha, and M. Snyder. 1997. The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*. 8:1829-1844.
- Marks, J., and J.S. Hyams. 1985. Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol*. 39:27-32.
- Martin, S.G., and M. Berthelot-Grosjean. 2009. Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature*. 459:852-856.
- Martin, S.G., W.H. McDonald, J. Yates III, and F. Chang. 2005. Tea4p links microtubule plus ends with the formin For3p in the establishment of cell polarity. *Develop. Cell*. 8:479-491.
- Martin, S.G., S.A. Rincón, R. Basu, P. Pérez, and F. Chang. 2007. Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Molecular biology of the cell*. 18:4155-4167.
- Martin-Castellanos, C., M.A. Blanco, J.M. de Prada, and S. Moreno. 2000. The puc1 cyclin regulates the G1 phase of the fission yeast cell cycle in response to cell size. *Molecular biology of the cell*. 11:543-554.
- Martin-Castellanos, C., K. Labib, and S. Moreno. 1996. B-type cyclins regulate G1 progression in fission yeast in opposition to the p25rum1 cdk inhibitor. *The EMBO journal*. 15:839-849.
- Martinho, R.G., H.D. Lindsay, G. Flaggs, A.J. DeMaggio, M.F. Hoekstra, A.M. Carr, and N.J. Bentley. 1998. Analysis of Rad3 and Chk1 protein kinases defines different checkpoint responses. *The EMBO journal*. 17:7239-7249.
- Mata, J., and P. Nurse. 1997. tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast. *Cell*. 89:939-950.
- Matsumoto, S., M. Shimmoto, N. Kakusho, M. Yokoyama, Y. Kanoh, M. Hayano, P. Russell, and H. Masai. 2010. Hsk1 kinase and Cdc45 regulate replication stress-induced checkpoint responses in fission yeast. *Cell cycle*. 9:4627-4637.
- Maundrell, K. 1993. Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene*. 123:127-130.
- Meadows, J.C. 2013. Interplay between mitotic kinesins and the Aurora kinase-PP1 (protein phosphatase 1) axis. *Biochemical Society transactions*. 41:1761-1765.
- Meadows, J.C., and J.B. Millar. 2013. Cell biology: polar expeditions for PP1. *Current biology : CB*. 23:R120-122.
- Meadows, J.C., L.A. Shepperd, V. Vanoosthuysse, T.C. Lancaster, A.M. Sochaj, G.J. Buttrick, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2011. Spindle checkpoint silencing requires association of PP1 to both Spc7 and kinesin-8 motors. *Developmental cell*. 20:739-750.
- Meister, P., M. Poidevin, S. Francesconi, I. Tratner, P. Zarzov, and G. Baldacci. 2003. Nuclear factories for signalling and repairing DNA double strand

- breaks in living fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 31:5064-5073.
- Mejia-Ramirez, E., A. Sanchez-Gorostiaga, D.B. Krimer, J.B. Schwartzman, and P. Hernandez. 2005. The mating type switch-activating protein Sap1 is required for replication fork arrest at the rRNA genes of fission yeast. *Molecular and cellular biology.* 25:8755-8761.
- Melo, J.A., J. Cohen, and D.P. Toczyski. 2001. Two checkpoint complexes are independently recruited to sites of DNA damage in vivo. *Genes & development.* 15:2809-2821.
- Menon, S., W. Oh, H.S. Carr, and J.A. Frost. 2013. Rho GTPase-independent regulation of mitotic progression by the RhoGEF Net1. *Molecular biology of the cell.* 24:2655-2667.
- Militello, R., and M.I. Colombo. 2013. Small GTPases as regulators of cell division. *Commun Integr Biol.* 6:e25460.
- Millband, D.N., and K.G. Hardwick. 2002. Fission yeast Mad3p is required for Mad2p to inhibit the anaphase-promoting complex and localizes to kinetochores in a Bub1p-, Bub3p-, and Mph1p-dependent manner. *Molecular and cellular biology.* 22:2728-2742.
- Mitchison, J.M., and P. Nurse. 1985. Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell. Sci.* 75:357-376.
- Mitchison, T., and M. Kirschner. 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature.* 312:237-242.
- Miyabe, I., T. Morishita, H. Shinagawa, and A.M. Carr. 2009. *Schizosaccharomyces pombe* Cds1Chk2 regulates homologous recombination at stalled replication forks through the phosphorylation of recombination protein Rad60. *Journal of cell science.* 122:3638-3643.
- Mondesert, G., and S.I. Reed. 1996. BED1, a gene encoding a galactosyltransferase homologue, is required for polarized growth and efficient bud emergence in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology.* 132:137-151.
- Moreno, S., A. Klar, and P. Nurse. 1991. Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth. Enzymol.* 194:795-823.
- Moreno, S., and P. Nurse. 1994. Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1⁺* gene. *Nature.* 367: 236-242.
- Moreno, S., P. Nurse, and P. Russell. 1990. Regulation of mitosis by cyclic accumulation of p80cdc25 mitotic inducer in fission yeast. *Nature.* 344:549-552.
- Morrell-Falvey, J.L., L. Ren, A. Feoktistova, G.D. Haese, and K.L. Gould. 2005. Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J. Cell Sci.* 118:5563-5573.
- Moseley, J.B., A. Mayeux, A. Paoletti, and P. Nurse. 2009. A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature.* 459:857-860.
- Motegi, F., R. Arai, and I. Mabuchi. 2001. Identification of two type V Myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol. Biol. Cell.* 12:1367-1380.
- Mulvihill, D.P., J. Petersen, H. Ohkura, D.M. Glover, and I.M. Hagan. 1999. Plo1 kinase recruitment to the spindle pole body and its role in cell division in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell.* 10:2771-2785.
- Murakami, H., and H. Okayama. 1995. A kinase from fission yeast responsible for blocking mitosis in S phase. *Nature.* 374:817-819.
- Musacchio, A., and E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology.* 8:379-393.
- Mutoh, T., K. Nakano, and I. Mabuchi. 2005. Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 re involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells.* 10:1189-1202.
- Nakamura, T.M., B.A. Moser, and P. Russell. 2002. Telomere binding of checkpoint sensor and DNA repair proteins contributes to maintenance of functional fission yeast telomeres. *Genetics.* 161:1437-1452.
- Nakano, K., T. Mutoh, R. Arai, and I. Mabuchi. 2003. The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell

- morphology and septation in fission yeast. *Genes to Cells*. 8:357-370.
- Nakano, K., T. Mutoh, and I. Mabuchi. 2001. Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells*. 6:1031-1042.
- Nern, A., and R.A. Arkowitz. 2000. Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J. Cell Biol.* 148:1115-1122.
- Ngok, S.P., R. Geyer, A. Kourtidis, P. Storz, and P.Z. Anastasiadis. 2013. Phosphorylation-mediated 14-3-3 protein binding regulates the function of the rho-specific guanine nucleotide exchange factor (RhoGEF) Syx. *The Journal of biological chemistry*. 288:6640-6650.
- Nicholas, R.O., D.W. Williams, and P.A. and Hunter. 1994. Investigation of the value of b-glucan-specific fluorochromes for predicting the b-glucans content of the cell wall of zoopathogenic fungi. *Mycol. Res.* 98:694-698.
- Nitani, N., K. Nakamura, C. Nakagawa, H. Masukata, and T. Nakagawa. 2006. Regulation of DNA replication machinery by Mrc1 in fission yeast. *Genetics*. 174:155-165.
- Niwa, O., T. Matsumoto, Y. Chikashige, and M. Yanagida. 1989. Characterization of *Schizosaccharomyces pombe* minichromosome deletion derivatives and a functional allocation of their centromere. *The EMBO journal*. 8:3045-3052.
- Noguchi, C., and E. Noguchi. 2007. Sap1 promotes the association of the replication fork protection complex with chromatin and is involved in the replication checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 175:553-566.
- Noguchi, E., C. Noguchi, L.L. Du, and P. Russell. 2003. Swi1 prevents replication fork collapse and controls checkpoint kinase Cds1. *Molecular and cellular biology*. 23:7861-7874.
- Noguchi, E., C. Noguchi, W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, and P. Russell. 2004. Swi1 and Swi3 are components of a replication fork protection complex in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. 24:8342-8355.
- O'Neill, T., L. Giarratani, P. Chen, L. Iyer, C.H. Lee, M. Bobiak, F. Kanai, B.B. Zhou, J.H. Chung, and G.A. Rathbun. 2002. Determination of substrate motifs for human Chk1 and hCds1/Chk2 by the oriented peptide library approach. *The Journal of biological chemistry*. 277:16102-16115.
- O'Toole, T.E., K. Bialkowska, X. Li, and J.E. Fox. 2011. Tiam1 is recruited to beta1-integrin complexes by 14-3-3zeta where it mediates integrin-induced Rac1 activation and motility. *J Cell Physiol*. 226:2965-2978.
- Oceguera-Yanez, F., K. Kimura, S. Yasuda, C. Higashida, T. Kitamura, Y. Hiraoka, T. Haraguchi, and S. Narumiya. 2005. Ect2 and MgcRacGAP regulate the activation and function of Cdc42 in mitosis. *The Journal of cell biology*. 168:221-232.
- Ozaki, K., K. Tanaka, H. Imamura, T. Hihara, T. Kameyama, H. Nonaka, H. Hirano, Y. Matsuura, and Y. Takai. 1996. Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J*. 15:2196-2207.
- Papadaki, P., V. Pizon, B. Onken, and E. Chang. 2002. Two ras pathways in fission yeast are differentially regulated by two ras guanine nucleotide exchange factors. *Mol. Cell Biol*. 22:4598-4606.
- Pardo, M., and P. Nurse. 2003. Equatorial retention of the contractile actin ring by microtubules during cytokinesis. *Science*. 300:1569-1574.
- Pelham, R.J.J., and F. Chang. 2001. Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Cell Biol*. 3:235-244.
- Perez, P., and J. Cansado. 2010. Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci*. 11:680-692.
- Perez, P., and S.A. Rincón. 2010. Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J*. 426:243-253.
- Petersen, J., and I.M. Hagan. 2003. S. pombe aurora kinase/survivin is required for chromosome condensation and the spindle checkpoint attachment response. *Current biology : CB*. 13:590-597.

- Pidoux, A.L., E.S. Choi, J.K. Abbott, X. Liu, A. Kagansky, A.G. Castillo, G.L. Hamilton, W. Richardson, J. Rappsilber, X. He, and R.C. Allshire. 2009. Fission yeast Scm3: A CENP-A receptor required for integrity of subkinetochore chromatin. *Mol Cell*. 33:299-311.
- Pinar, M., P.M. Coll, S.A. Rincon, and P. Perez. 2008. Schizosaccharomyces pombe Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Molecular biology of the cell*. 19:1727-1738.
- Qu, M., M. Rappas, C.P. Wardlaw, V. Garcia, J.Y. Ren, M. Day, A.M. Carr, A.W. Oliver, L.L. Du, and L.H. Pearl. 2013. Phosphorylation-dependent assembly and coordination of the DNA damage checkpoint apparatus by Rad4(TopBP(1)). *Mol Cell*. 51:723-736.
- Qu, M., B. Yang, L. Tao, J.R. Yates, 3rd, P. Russell, M.Q. Dong, and L.L. Du. 2012. Phosphorylation-dependent interactions between Crb2 and Chk1 are essential for DNA damage checkpoint. *PLoS Genet*. 8:e1002817.
- Radcliffe, P., D. Hirata, D. Childs, L. Vardy, and T. Toda. 1998. Identification of novel temperature-sensitive lethal alleles in essential beta-tubulin and nonessential alpha 2-tubulin genes as fission yeast polarity mutants. *Molecular biology of the cell*. 9:1757-1771.
- Rajakyla, E.K., and M.K. Vartiainen. 2014. Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases*. 5.
- Rapp, J.B., C. Noguchi, M.M. Das, L.K. Wong, A.B. Ansbach, A.M. Holmes, B. Arcangioli, and E. Noguchi. 2010. Checkpoint-dependent and -independent roles of Swi3 in replication fork recovery and sister chromatid cohesion in fission yeast. *PloS one*. 5:e13379.
- Reid, T., T. Furiyashiki, T. Ishizaki, G. Watanabe, N. Watanabe, K. Fujisawa, N. Morii, P. Madaule, and S. Nayumira. 1996. Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J. Biol. Chem*. 271:13556-13560.
- Reinhardt, H.C., and M.B. Yaffe. 2013. Phospho-Ser/Thr-binding domains: navigating the cell cycle and DNA damage response. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:563-580.
- Ren, X.-D., G.M. Bokoch, A. Traynor-Kaplan, G.H. Jenkins, R.A. Anderson, and M.A. Schwartz. 1996. Physical association of the small GTPase Rho with a 68-kDa phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase in Swiss 3T3 Cells. *Mol. Biol. Cell*. 7:435-442.
- Rhind, N., B. Furnari, and P. Russell. 1997. Cdc2 tyrosine phosphorylation is required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Genes & development*. 11:504-511.
- Rhind, N., and P. Russell. 2001. Roles of the mitotic inhibitors Wee1 and Mik1 in the G(2) DNA damage and replication checkpoints. *Molecular and cellular biology*. 21:1499-1508.
- Rincón, S.A., Y. Ye, M.A. Villar-Tajadura, B. Santos, S.G. Martin, and P. Pérez. 2009. Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell*. 20:4390-4399.
- Rogers, S.L., U. Wiedemann, U. Hacker, C. Turck, and R.D. Vale. 2004. Drosophila RhoGEF2 associates with microtubule plus ends in an EB1-dependent manner. *Current biology : CB*. 14:1827-1833.
- Rossman, K.L., J.D. Channing, and J. Sondek. 2005a. GEF means go: turning on Rho GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 6:167-180.
- Rotty, J.D., C. Wu, and J.E. Bear. 2013. New insights into the regulation and cellular functions of the ARP2/3 complex. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 14:7-12.
- Rupes, I. 2002. Checking cell size in yeast. *Trends Genet*. 18:479-485.
- Russell, P., and P. Nurse. 1986. cdc25+ functions as an inducer in the mitotic control of fission yeast. *Cell*. 45:145-153.
- Russell, P., and P. Nurse. 1987. Negative regulation of mitosis by wee1+, a gene encoding a protein kinase homolog. *Cell*. 49:559-567.

- Sabatinos, S.A., M.D. Green, and S.L. Forsburg. 2012. Continued DNA synthesis in replication checkpoint mutants leads to fork collapse. *Molecular and cellular biology*. 32:4986-4997.
- Saka, Y., F. Esashi, T. Matsusaka, S. Mochida, and M. Yanagida. 1997. Damage and replication checkpoint control in fission yeast is ensured by interactions of Crb2, a protein with BRCT motif, with Cut5 and Chk1. *Genes & development*. 11:3387-3400.
- Sambrock, J., and D.W. Russell. 2001. "Molecular cloning, a laboratory manual". *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York*.
- Samejima, I., P.C. Lourenco, H.A. Snaith, and K.E. Sawin. 2005. Fission yeast mto2p regulates microtubule nucleation by the centrosomin-related protein mto1p. *Molecular biology of the cell*. 16:3040-3051.
- Sanchez-Mir, L., T. Soto, A. Franco, M. Madrid, R.A. Viana, J. Vicente, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2014. Rho1 GTPase and PKC Ortholog Pck1 Are Upstream Activators of the Cell Integrity MAPK Pathway in Fission Yeast. *PLoS one*. 9:e88020.
- Sanchez-Perez, I., S.J. Renwick, K. Crawley, I. Karig, V. Buck, J.C. Meadows, A. Franco-Sanchez, U. Fleig, T. Toda, and J.B. Millar. 2005. The DASH complex and Klp5/Klp6 kinesin coordinate bipolar chromosome attachment in fission yeast. *The EMBO journal*. 24:2931-2943.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 74:5463-5467.
- Santaguida, S., C. Vernieri, F. Villa, A. Ciliberto, and A. Musacchio. 2011. Evidence that Aurora B is implicated in spindle checkpoint signalling independently of error correction. *The EMBO journal*. 30:1508-1519.
- Sato, M., S. Dhut, and T. Toda. 2005. New drug-resistant cassettes for gene disruption and epitope tagging in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*. 22:583-591.
- Sawin, K.E., P.C. Lourenco, and H.A. Snaith. 2004. Microtubule nucleation at non-spindle pole body microtubule-organizing centers requires fission yeast centrosomin-related protein mod20p. *Current biology : CB*. 14:763-775.
- Sawin, K.E., and P.T. Tran. 2006. Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast*. 23:1001-1014.
- Sayers, L.G., S. Katayama, K. Nakano, H. Mellor, I. Mabuchi, T. Toda, and P.J. Parker. 2000. Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells*. 5:17-27.
- Sazer, S., and S.W. Sherwood. 1990. Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *J. Cell Sci*. 97:509-516.
- Schmidt, A., and A. Hall. 2002a. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev*. 16:1587-1609.
- Schmidt, A., and A. Hall. 2002b. The Rho exchange factor Net1 is regulated by nuclear sequestration. *The Journal of biological chemistry*. 277:14581-14588.
- Sengar, A.S., N.A. Markley, N.J. Marini, and D. Young. 1997. Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*. 17:3508-3519.
- Shaner, N.C., P.A. Steinbach, and R.Y. Tsien. 2005. A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2 905 - 909
- Shepperd, L.A., J.C. Meadows, A.M. Sochaj, T.C. Lancaster, J. Zou, G.J. Buttrick, J. Rappsilber, K.G. Hardwick, and J.B. Millar. 2012. Phosphodependent recruitment of Bub1 and Bub3 to Spc7/KNL1 by Mph1 kinase maintains the spindle checkpoint. *Current biology : CB*. 22:891-899.
- Shimada, Y., M.P. Gulli, and M. Peter. 2000. Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nature cell biology*. 2:117-124.
- Shimmoto, M., S. Matsumoto, Y. Odagiri, E. Noguchi, P. Russell, and H. Masai. 2009. Interactions between Swi1-Swi3, Mrc1 and S phase kinase, Hsk1 may

- regulate cellular responses to stalled replication forks in fission yeast. *Genes Cells*. 14:669-682.
- Sirotkin, V., J. Berro, K. Macmillan, L. Zhao, and T.D. Pollard. 2010. Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 21:2894-2904.
- Smolka, M.B., C.P. Albuquerque, S.H. Chen, and H. Zhou. 2007. Proteome-wide identification of in vivo targets of DNA damage checkpoint kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104:10364-10369.
- Snaith, H., and K.E. Sawin. 2003. Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1 at the cell tips. *Nature*. 423:647-651.
- Snaith, H.A., G.W. Brown, and S.L. Forsburg. 2000. Schizosaccharomyces pombe Hsk1p is a potential cds1p target required for genome integrity. *Molecular and cellular biology*. 20:7922-7932.
- Snaith, H.A., I. Samejima, and K.E. Sawin. 2005. Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J.* . 24:3690-3699.
- Sogo, J.M., M. Lopes, and M. Foiani. 2002. Fork reversal and ssDNA accumulation at stalled replication forks owing to checkpoint defects. *Science*. 297:599-602.
- Soisson, S.M., A.S. Nimnual, M. Uy, D. Bar-Sagi, and J. Kuriyan. 1998. Crystal structure of the Dbl and pleckstrin homology domains from the human son of sevenless protein. *Cell*. 95:259-268.
- Spector, I., N.R. Shochet, D. Blasberger, and Y. Kashman. 1989. Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell. Motil. Cytoskeleton*. 13(3):127-144.
- Streiblova, E. 1984. The yeast cell wall- A marker system for cell cycle controls. *The microbial cell cycle* (ed. P. Nurse and E. Streiblova). CRC Press. Boca Raton. Florida.:89-107.
- Su, Y.-C., J. Han, S. Xu, M. Cobb, and E. Skolnik. 1997. NIK is a new Ste20-related kinase that binds NCK and MEKK1 and activates the SAPK/JNK cascade via a conserved regulatory domain. *EMBO J*. 16:1279-1290.
- Sugiura, R., T. T., S. Dhut, H. Shuntoh, and T. Kuno. 1999. The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*. 399:479-483.
- Sun, J., and D. Kong. 2010. DNA replication origins, ORC/DNA interaction, and assembly of pre-replication complex in eukaryotes. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 42:433-439.
- Syrovatkina, V., C. Fu, and P.T. Tran. 2013. Antagonistic spindle motors and MAPs regulate metaphase spindle length and chromosome segregation. *Current biology : CB*. 23:2423-2429.
- Tada, K., H. Susumu, T. Sakuno, and Y. Watanabe. 2011. Condensin association with histone H2A shapes mitotic chromosomes. *Nature*. 474:477-483.
- Tajadura, V., B. Garcia, I. Garcia, P. Garcia, and Y. Sanchez. 2004. Schizosaccharomyces pombe Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall b-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J. Cell Sci*. 117:6163-6174.
- Takahashi, K., E.S. Chen, and M. Yanagida. 2000. Requirement of Mis6 centromere connector for localizing a CENP-A-like protein in fission yeast. *Science*. 288:2215-2219.
- Takahashi, K., Y. Takayama, F. Masuda, Y. Kobayashi, and S. Saitoh. 2005. Two distinct pathways responsible for the loading of CENP-A to centromeres in the fission yeast cell cycle. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 360:595-606; discussion 606-597.
- Takahashi, K., H. Yamada, and M. Yanagida. 1994. Fission yeast minichromosome loss mutants mis cause lethal aneuploidy and replication abnormality. *Molecular biology of the cell*. 5:1145-1158.
- Takahashi, K., Yanagida, M. 2004. Chromosome Cohesion and Segregation. In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. Genetics, genomics and beyond. R. Egel, editor. Springer.
- Takeda, T., K. Ogino, K. Tatebayashi, H. Ikeda, K. Arai, and H. Masai. 2001. Regulation of initiation of S phase, replication checkpoint signaling, and

- maintenance of mitotic chromosome structures during S phase by Hsk1 kinase in the fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 12:1257-1274.
- Tanaka, K., H.L. Chang, A. Kagami, and Y. Watanabe. 2009. CENP-C functions as a scaffold for effectors with essential kinetochore functions in mitosis and meiosis. *Developmental cell*. 17:334-343.
- Tanaka, K., Z. Hao, M. Kai, and H. Okayama. 2001. Establishment and maintenance of sister chromatid cohesion in fission yeast by a unique mechanism. *The EMBO journal*. 20:5779-5790.
- Tanaka, K., and P. Russell. 2001. Mrc1 channels the DNA replication arrest signal to checkpoint kinase Cds1. *Nature cell biology*. 3:966-972.
- Tanaka, K., and P. Russell. 2004. Cds1 phosphorylation by Rad3-Rad26 kinase is mediated by forkhead-associated domain interaction with Mrc1. *The Journal of biological chemistry*. 279:32079-32086.
- Tanaka, T., D. Nishimura, R.C. Wu, M. Amano, T. Iso, L. Kedes, H. Nishida, K. Kaibuchi, and Y. Hamamori. 2006. Nuclear Rho kinase, ROCK2, targets p300 acetyltransferase. *The Journal of biological chemistry*. 281:15320-15329.
- Tanaka, T., M. Yokoyama, S. Matsumoto, R. Fukatsu, Z. You, and H. Masai. 2010. Fission yeast Swi1-Swi3 complex facilitates DNA binding of Mrc1. *The Journal of biological chemistry*. 285:39609-39622.
- Tang, N.H., H. Takada, K.S. Hsu, and T. Toda. 2013. The internal loop of fission yeast Ndc80 binds Alp7/TACC-Alp14/TOG and ensures proper chromosome attachment. *Molecular biology of the cell*. 24:1122-1133.
- Tang, Z., H. Shu, D. Oncel, S. Chen, and H. Yu. 2004. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Mol Cell*. 16:387-397.
- Tapia-Alvear, C., E.A. Outwin, N. Trepolec, D. Dziadkowiec, J.M. Murray, and M.J. O'Connell. 2010. SMC complexes and topoisomerase II work together so that sister chromatids can work apart. *Cell cycle*. 9:2065-2070.
- Taricani, L., and T.S. Wang. 2006. Rad4TopBP1, a scaffold protein, plays separate roles in DNA damage and replication checkpoints and DNA replication. *Molecular biology of the cell*. 17:3456-3468.
- Tatebe, H., G. Goshima, K. Takeda, T. Nakagawa, K. Kinoshita, and M. Yanagida. 2001. Fission yeast living mitosis visualized by GFP-tagged gene products. *Micron*. 32:67-74.
- Tatebe, H., K. Nakano, R. Maximo, and K. Shiozaki. 2008. Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Current biology : CB*. 18:322-330.
- Tatebe, H., K. Shimada, S. Uzawa, S. Morigasaki, and K. Shiozaki. 2005. Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr Biol*. 15:1006-1015.
- Tatebe, H., and M. Yanagida. 2000. Cut8, essential for anaphase, controls localization of 26S proteasome, facilitating destruction of cyclin and Cut2. *Current biology : CB*. 10:1329-1338.
- Tien, J.F., N.T. Umbreit, D.R. Gestaut, A.D. Franck, J. Cooper, L. Wordeman, T. Gonen, C.L. Asbury, and T.N. Davis. 2010. Cooperation of the Dam1 and Ndc80 kinetochore complexes enhances microtubule coupling and is regulated by aurora B. *The Journal of cell biology*. 189:713-723.
- Toda, T., S. Dhut, G. Superti-Furga, Y. Gotoh, E. Nishida, R. Sugiura, and T. Kuno. 1996b. The fission yeast *pmk1+* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the Protein Kinase C pathway. *Mol. Cell. Biol*. 16:6752-6764.
- Tomita, K., A. Matsuura, T. Caspari, A.M. Carr, Y. Akamatsu, H. Iwasaki, K. Mizuno, K. Ohta, M. Uritani, T. Ushimaru, K. Yoshinaga, and M. Ueno. 2003. Competition between the Rad50 complex and the Ku heterodimer reveals a role for Exo1 in processing double-strand breaks but not telomeres. *Molecular and cellular biology*. 23:5186-5197.
- Tomonaga, T., K. Nagao, Y. Kawasaki, K. Furuya, A. Murakami, J. Morishita, T. Yuasa, T. Sutani, S.E. Kearsey, F. Uhlmann, K. Nasmyth, and M.

- Yanagida. 2000. Characterization of fission yeast cohesin: essential anaphase proteolysis of Rad21 phosphorylated in the S phase. *Genes & development*. 14:2757-2770.
- Toyoda, Y., K. Furuya, G. Goshima, K. Nagao, K. Takahashi, and M. Yanagida. 2002. Requirement of chromatid cohesion proteins rad21/scc1 and mis4/scc2 for normal spindle-kinetochore interaction in fission yeast. *Current biology : CB*. 12:347-358.
- Treisman, R. 2013. Shedding light on nuclear actin dynamics and function. *Trends in biochemical sciences*. 38:376-377.
- Tsukahara, T., Y. Tanno, and Y. Watanabe. 2010. Phosphorylation of the CPC by Cdk1 promotes chromosome bi-orientation. *Nature*. 467:719-723.
- Tyson, J.J., and B. Novak. 2011. Cell cycle: who turns the crank? *Current biology : CB*. 21:R185-187.
- Umesono, K., T. Toda, S. Hayashi, and M. Yanagida. 1983. Cell division cycle genes *nda2* and *nda3* of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* control microtubular organization and sensitivity to anti-mitotic benzimidazole compounds. *Journal of molecular biology*. 168:271-284.
- van Heusden, G.P., and H.Y. Steensma. 2006. Yeast 14-3-3 proteins. *Yeast*. 23:159-171.
- Vanoosthuyse, V., and K.G. Hardwick. 2009. A novel protein phosphatase 1-dependent spindle checkpoint silencing mechanism. *Current biology : CB*. 19:1176-1181.
- Vanoosthuyse, V., S. Prykhodzhiy, and K.G. Hardwick. 2007. Shugoshin 2 regulates localization of the chromosomal passenger proteins in fission yeast mitosis. *Molecular biology of the cell*. 18:1657-1669.
- Vaur, S., A. Feytout, S. Vazquez, and J.P. Javerzat. 2012. Pds5 promotes cohesin acetylation and stable cohesin-chromosome interaction. *EMBO reports*. 13:645-652.
- Venclovas, C., and M.P. Thelen. 2000. Structure-based predictions of Rad1, Rad9, Hus1 and Rad17 participation in sliding clamp and clamp-loading complexes. *Nucleic Acids Res*. 28:2481-2493.
- Viana, R.A., M. Pinar, T. Soto, P.M. Coll, J. Cansado, and P. Perez. 2013. Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics*. 195:421-432.
- Viaud, J., F. Gaits-lacovoni, and B. Payrastre. 2012. Regulation of the DH-PH tandem of guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases by phosphoinositides. *Adv Biol Regul*. 52:303-314.
- Walworth, N., S. Davey, and D. Beach. 1993. Fission yeast *chk1* protein kinase links the rad checkpoint pathway to *cdc2*. *Nature*. 363:368-371.
- Walworth, N.C., and R. Bernards. 1996. rad-dependent response of the *chk1*-encoded protein kinase at the DNA damage checkpoint. *Science*. 271:353-356.
- Wan, S., H. Capasso, and N.C. Walworth. 1999. The topoisomerase I poison camptothecin generates a Chk1-dependent DNA damage checkpoint signal in fission yeast. *Yeast*. 15:821-828.
- Wang, S.W., C. Norbury, A.L. Harris, and T. Toda. 1999. Caffeine can override the S-M checkpoint in fission yeast. *Journal of cell science*. 112 (Pt 6):927-937.
- Wennerberg, K., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2005. The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science*. 118:843-846.
- Williams, J.S., T. Hayashi, M. Yanagida, and P. Russell. 2009. Fission yeast *Scm3* mediates stable assembly of Cnp1/CENP-A into centromeric chromatin. *Mol Cell*. 33:287-298.
- Williamson, M.P. 1994. The structure and function of proline-rich regions in proteins. *The Biochemical journal*. 297 (Pt 2):249-260.
- Willis, N., and N. Rhind. 2009. Mus81, Rhp51(Rad51), and Rqh1 form an epistatic pathway required for the S-phase DNA damage checkpoint. *Molecular biology of the cell*. 20:819-833.
- Wolfe, B.A., and K.L. Gould. 2004. Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *The EMBO journal*. 23:919-929.

- Wolfe, B.A., T. Takaki, M. Petronczki, and M. Glotzer. 2009. Polo-like kinase 1 directs assembly of the HsCdk-4 RhoGAP/Ect2 RhoGEF complex to initiate cleavage furrow formation. *PLoS Biol.* 7:e1000110.
- Wood, E., and P. Nurse. 2013. Pom1 and cell size homeostasis in fission yeast. *Cell cycle.* 12:3228-3236.
- Wood, V., R. Gwilliam, M.A. Rajandream, M. Lyne, R. Lyne, A. Stewart, J. Sgouros, N. Peat, J. Hayles, S. Baker, D. Basham, S. Bowman, K. Brooks, D. Brown, S. Brown, T. Chillingworth, C. Churcher, M. Collins, R. Connor, A. Cronin, P. Davis, T. Feltwell, A. Fraser, S. Gentles, A. Goble, N. Hamlin, D. Harris, J. Hidalgo, G. Hodgson, S. Holroyd, T. Hornsby, S. Howarth, E.J. Huckle, S. Hunt, K. Jagels, K. James, L. Jones, M. Jones, S. Leather, S. McDonald, J. McLean, P. Mooney, S. Moule, K. Mungall, L. Murphy, D. Niblett, C. Odell, K. Oliver, S. O'Neil, D. Pearson, M.A. Quail, E. Rabinowitsch, K. Rutherford, S. Rutter, D. Saunders, K. Seeger, S. Sharp, J. Skelton, M. Simmonds, R. Squares, S. Squares, K. Stevens, K. Taylor, R.G. Taylor, A. Tivey, S. Walsh, T. Warren, S. Whitehead, J. Woodward, G. Volckaert, R. Aert, J. Robben, B. Grymonprez, I. Weltjens, E. Vanstreels, M. Rieger, M. Schafer, S. Muller-Auer, C. Gabel, M. Fuchs, C. Fritz, E. Holzer, D. Moestl, H. Hilbert, K. Borzym, I. Langer, A. Beck, H. Lehrach, R. Reinhardt, T.M. Pohl, P. Eger, W. Zimmermann, H. Wedler, R. Wambutt, B. Purnelle, A. Goffeau, E. Cadieu, S. Dreano, S. Gloux, V. Lelaure, et al. 2002. The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature.* 415:871-880.
- Worthylake, D.K., K.L. Rossman, and J. Sodek. 2000. Crystal structure of Rac1 in complex with the guanine nucleotide exchange region of Tiam1. *Nature.* 408:682-688.
- Xu, D., A. Farmer, and Y.M. Chook. 2010. Recognition of nuclear targeting signals by Karyopherin-beta proteins. *Curr Opin Struct Biol.* 20:782-790.
- Xu, Y.J., M. Davenport, and T.J. Kelly. 2006. Two-stage mechanism for activation of the DNA replication checkpoint kinase Cds1 in fission yeast. *Genes & development.* 20:990-1003.
- Yaffe, M.B. 2002. How do 14-3-3 proteins work?-- Gatekeeper phosphorylation and the molecular anvil hypothesis. *FEBS letters.* 513:53-57.
- Yaffe, M.B., K. Rittinger, S. Volinia, P.R. Caron, A. Aitken, H. Leffers, S.J. Gamblin, S.J. Smerdon, and L.C. Cantley. 1997. The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell.* 91:961-971.
- Yamagishi, Y., C.H. Yang, Y. Tanno, and Y. Watanabe. 2012. MPS1/Mph1 phosphorylates the kinetochore protein KNL1/Spc7 to recruit SAC components. *Nature cell biology.* 14:746-752.
- Yanagida, M. 2005. Basic mechanism of eukaryotic chromosome segregation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 360:609-621.
- Yang, P., Y. Qyang, G. Bartholomeusz, Z. Zhou, and S. Marcus. 2003. The novel Rho1 GTPase-activating protein family, Rga8, provides a potential link between cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 278:48821-48830.
- Yasuhira, S., T. Saito, C. Maesawa, and T. Masuda. 2012. Sensor and effector kinases in DNA damage checkpoint regulate capacity for homologous recombination repair of fission yeast in G2 phase. *DNA repair.* 11:666-675.
- Ye, Y., I.J. Lee, K.W. Runge, and J.Q. Wu. 2012. Roles of putative Rho-GEF Gef2 in division-site positioning and contractile-ring function in fission yeast cytokinesis. *Molecular biology of the cell.* 23:1181-1195.
- Yonetani, A., and F. Chang. 2010. Regulation of cytokinesis by the formin cdc12p. *Current biology : CB.* 20:561-566.
- Yoshida, S., S. Bartolini, and D. Pellman. 2009. Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev.* 23:810-823.
- Yue, M., A. Singh, Z. Wang, and Y.J. Xu. 2011. The phosphorylation network for efficient activation of the DNA replication checkpoint in fission yeast. *J Biol Chem.* 286:22864-22874.
- Zaitsevskaya-Carter, T., and J.A. Cooper. 1997. Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates

BIBLIOGRAFÍA

- morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO Journal*. 16:1318-1331.
- Zeng, Y., and H. Piwnica-Worms. 1999. DNA damage and replication checkpoints in fission yeast require nuclear exclusion of the Cdc25 phosphatase via 14-3-3 binding. *Molecular and cellular biology*. 19:7410-7419.
- Zhao, H., K. Tanaka, E. Nogochi, C. Nogochi, and P. Russell. 2003. Replication checkpoint protein Mrc1 is regulated by Rad3 and Tel1 in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. 23:8395-8403.
- Zhou, C., Y. Yang, and Y.J. Ambrose. 1990. Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques*. 8:712-713.
- Zhu, Y.H., Y. Ye, Z. Wu, and J.Q. Wu. 2013. Cooperation between Rho-GEF Gef2 and its binding partner Nod1 in the regulation of fission yeast cytokinesis. *Molecular biology of the cell*. 24:3187-3204.
- Zich, J., A.M. Sochaj, H.M. Syred, L. Milne, A.G. Cook, H. Ohkura, J. Rappsilber, and K.G. Hardwick. 2012. Kinase activity of fission yeast Mph1 is required for Mad2 and Mad3 to stably bind the anaphase promoting complex. *Current biology : CB*. 22:296-301.
- Zimmerman, S., P.T. Tran, R.R. Daga, O. Niwa, and F. Chang. 2004. Rsp1p, a J domain protein required for disassembly and assembly of microtubule organizing centers during the fission yeast cell cycle. *Developmental cell*. 6:497-509.
- Zou, L., and S.J. Elledge. 2003. Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*. 300:1542-1548.