

**Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica
(USAL / CSIC)**



**Interacciones de la GTPasa Rho1 con la ruta
de MAPKs de integridad celular y la fosfatasa
calcineurina en la levadura de fisión
*Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada por **Raúl Alonso Viana** para
optar al Grado de Doctor en Bioquímica

Salamanca, 2014

EL **Dr. LUIS ROMÁN FERNÁNDEZ LAGO**, PROFESOR TITULAR Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Interacciones de la GTPasa Rho1 con la ruta de MAPKs de integridad celular y la fosfatasa calcineurina en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe***”, presentada por el licenciado **Raúl Alonso Viana** para optar al grado de **Doctor en Bioquímica**, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. M^a del Pilar Pérez González y Pedro Miguel Coll Fresno, 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. Luis Román Fernández Lago

LA **Dra. M^a del PILAR PÉREZ GONZÁLEZ**, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC Y EL **Dr. PEDRO MIGUEL COLL FRESNO**, PROFESOR CONTRATADO DOCTOR PERMANENTE DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA.

CERTIFICAN:

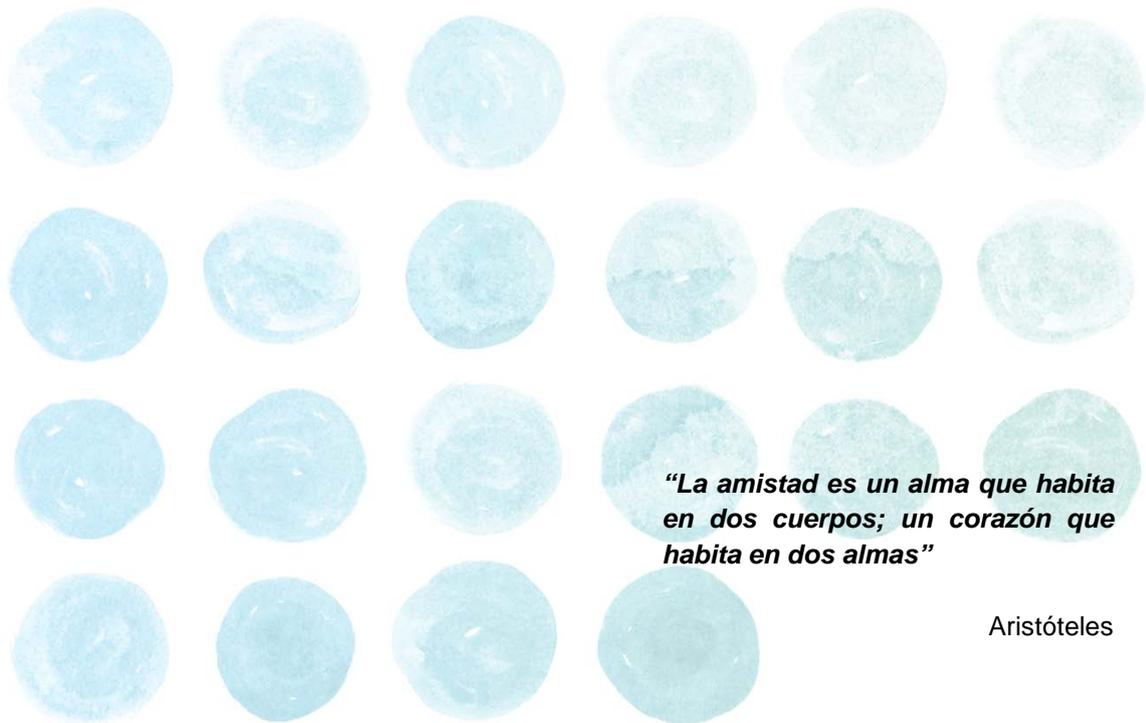
Que el licenciado **Raúl Alonso Viana** ha realizado el trabajo titulado “**Interacciones de la GTPasa Rho1 con la ruta de MAPKs de integridad celular y la fosfatasa calcineurina en la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe***” bajo su dirección, en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC) / Departamento de Microbiología y Genética (USAL).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos el presente certificado en Salamanca a ____ de _____ de 2014.

Fdo. Dra. M^a del Pilar Pérez González

Fdo. Dr. Pedro Miguel Coll Fresno

Agradecimientos



***“La amistad es un alma que habita
en dos cuerpos; un corazón que
habita en dos almas”***

Aristóteles

Hacer los agradecimientos de una tesis sería lo mismo que ir dando las gracias a cada persona que te haya escuchado, apoyado o simplemente dedicado una sonrisa durante casi seis años. Por ello voy a intentar acordarme de todos lo que pueda y ponerlos en esta sección. Primero empezaré por lo fácil:

Quiero agradecerle a la Dra. M^a del Pilar Pérez González la oportunidad de haber podido realizar esta tesis en su laboratorio, por participar en él con numerosas ideas y aportaciones y por ayudarme con mi formación científica y personal. En segundo lugar me gustaría agradecer al Dr. Pedro Miguel Coll Fresno su constante supervisión y ayuda en el proyecto, así como la paciencia mostrada a la hora de enseñarme las diversas técnicas aplicadas en la tesis.

De lo que sí estoy seguro, es que hubiera sido imposible haber acabado esta carrera de fondo, sin contar con el apoyo de ese maravilloso e inigualable grupo que son los PPGs. La verdad es que me es imposible imaginarme este momento sin la ayuda de mis compañeros, los viejos y los nuevos. Primero de todo quiero darle las gracias a Pedro, a pesar de nuestro constante “teatro”, jamás hubiera podido acabar sin esa persona fiel, amable y constante que eres, sin tu apoyo muy probablemente me hubiera bajado de este trabajoso tren que es la tesis, ¡Muchas Gracias Pedro!. También quiero darle las gracias a Sergi por su siempre buen humor y por sus numerosas conversaciones sobre videojuegos; a mi querida Toñi por sus consejos, excursiones y por instruirme en la vida del pollito; a mi Maestro Jedi Mario, al que debo tan buenos momentos y enseñanzas en el laboratorio; a mi hermano de tesis Miguel, por su visión tan distinta a la mía de la vida, que me ha hecho ver todo con nuevas perspectivas; a Antonio, nuestra pequeña (pero de gran corazón) mutación puntual (PPG→PPM); a mi Miguelito, tu ayuda en muchos momentos no puede ser olvidada, no sabes la de cosas que he aprendido, enseñándote; a Nuri, por su constante templanza y visión optimista de las cosas; a Rebequita, jamás he conocido a nadie que le fascine tanto ver nuevas cepas por el microscopio!! Muchas gracias por tu ayuda y por el apoyo que me has dado desde que apareciste por nuestras vidas; a Maite por su carácter indomable y por sus palabras de apoyo en mis peores momentos, (Joe, cuantos son...); a mi Tali y a Laura, que bien saben cuanto os aprecio a las dos y de que aunque os digáis independientes, sois unas PPGeras más; a Elvira, nuestra técnico, que tan bien se ha portado conmigo y por supuesto a Bea por su ayuda desinteresada y buenos consejos.

Lo que más es de agradecer en este nuevo super centro de investigación que es el IBFG, es la colaboración siempre constante de la unidad 1 o “grupo de pared”. Los consejos que obtenemos de todos los miembros en los seminarios internos, siempre son

AGRADECIMIENTOS

bienvenidos. Me gustaría darles las gracias por crear este gran ambiente a los jefes de grupo, Juan Carlos, Cesar, Paco, Belén, Carlos y en especial a las Dras. Yolanda Sánchez y Henar Valdivieso, por estar siempre ahí cuando se necesitaba una idea, un protocolo o una buen “chascarrillo”. Por supuesto no puedo olvidarme de todos los becarios y amigos de este grupo, el buen funcionamiento de la planta 1 se les debe a ellos. A Nagore, por su constante fuerza y buenas recomendaciones; a mi querida Sofi, que siempre ha actuado más como una hermana que como una compañera; a Martuca, por ser siempre una gran amiga y por defenderme, incluso de mi mismo; a Charly, por ser constantemente un amigo y un buen consejero; y además todos los que forman esa gran familia del café: Mari, Sandra, Fran (¡vamos primo!), Elvira, Carlo di Carlo (el chico de oro), Irene, Sara, Mariona, Junior; y Lorena y Alberto, fundadores del club de los fanáticos y seguidores incondicionales de la “madre de Charo”.

También me gustaría agradecerles su compañía y buen humor a la gente de la comida: Julia, Rosana (me encanta tu visión positiva), Cami, Sara, Esther (muchas gracias por tu apoyo), Ali (sabes muy bien que como compi de piso no hay quien te iguale, pero gracias también por esas terapias de grupo a la hora de la cena), Alvaro (nuestro soriano loco favorito) y a los niños del master. No puedo olvidarme de mis compis de biblio, que haríamos sin esos momentos desestresantes: A Nacho que me ha aguantado como mi compi de mesa, a nuestro neurocientífico visitante Maru, a Rebeca, a Ana y ese gran descubrimiento que ha sido Vero (muchas gracias por la ayuda con las fotos).

Por supuesto no puedo olvidarme de agradecerle todo su trabajo al equipo técnico del instituto. A Encarna que prepara unas comiditas excepcionales para nuestras células; a Alegría y Paco Soriano, que los problemas burocráticos son menos con vosotros de por medio; a Javier, “el informático”, por su ayuda con esos problemillas con los ordenadores; a nuestra excepcional técnico de microscopia la Dra. Carmen Castro, ojalá todos fuéramos más como tú y por supuesto nuestro dos superhéroes favoritos Paco Alonso y Javier, que sería de nuestras vidas si vosotros no pudieras arreglarlas, jejeje.

Indudablemente le tengo que agradecer al Dr. José Cansado su colaboración en este trabajo y su interés por el proyecto.

No me puedo olvidar de dar las gracias a mis amigos de siempre: Abe, mi cordura y lo poco que queda de mi buen humor te lo debo a ti, ya sabes que me tienes para lo que quieras. Ana y Pi sois grandes personas de las que sólo se puede aprender. Pepin, nuestro chico de un corazón tan grande como él. Pilar mi gran consejera. Carmén, la que con su buen humor nos hace sonreír a todos. Rocío esa gran profesora que te hace

pensar. Y por supuesto mis amigos Cacereños, Mario, José, María y Fajardo, no sé que habría hecho sin la tranquilidad que me da vuestra ciudad y sin vuestras conversaciones distendidas y frikis. Tampoco me quiero olvidar de mis amigos de Logroño, Carol, Germantxu (el gran artífice de esta portada), Sara, Germán, Diego y Ana.

Y por último, me gustaría agradecerles todo lo que han hecho a mi familia. A mis padres, mi hermana (esa Gran Doctora (mira que me cuesta decirlo....);P), mis abuelos, primos y tíos. Sin vuestro apoyo incondicional, nada de esto hubiera sido posible. Me habéis hecho crecer y mejorar como persona desde siempre. Os debo todo lo que soy y seré.

Gracias a todos!!

**A mi familia
y amigos**

ABREVIATURAS

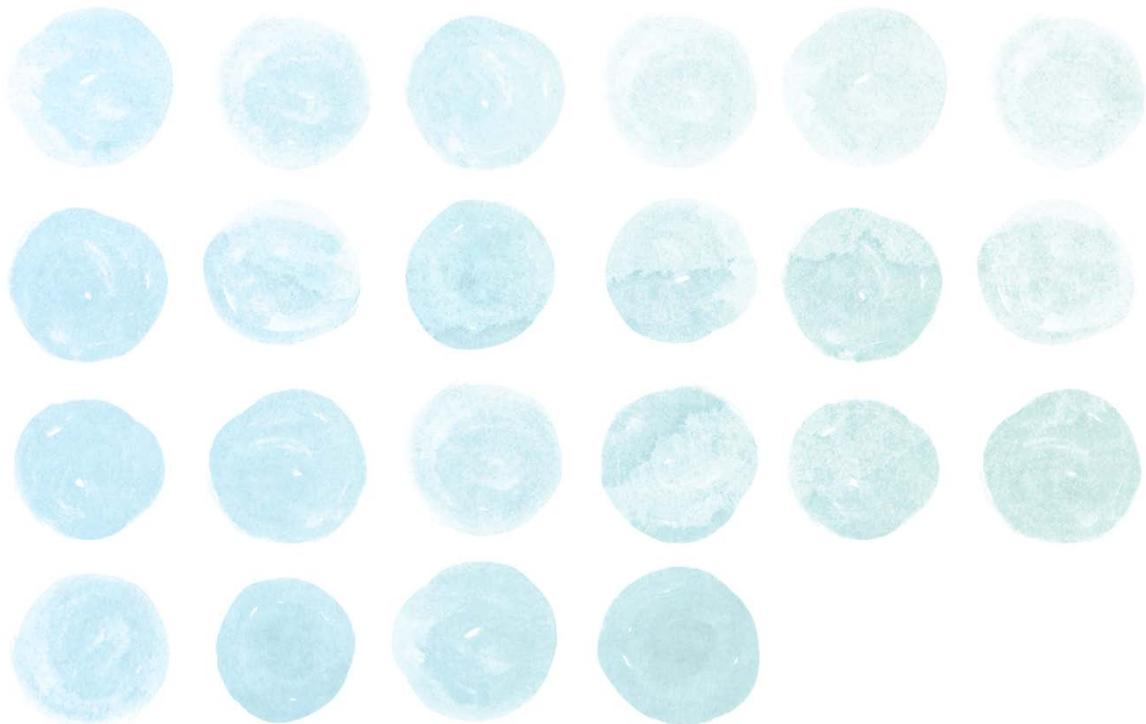
ADN	Ácido <u>d</u> esoxirribonucleico
AP-3	Proteína adaptadora-3 (<i>Adaptor Protein-3</i>)
ARN	Ácido <u>r</u> ibonucleico
ARNm	Ácido <u>r</u> ibonucleico <u>m</u> ensajero
ATP	<u>A</u> denosina 5'- <u>t</u> ri <u>f</u> osfato
βGS	<u>β</u> -glucán <u>s</u> intasa
CDCFDA	Diacetato de 5, 6-carboxi-2', 7'-diclorofluoresceína
CDRE	Elementos de respuesta a calcineurina (<i>Calcineurin-Dependent Response Element</i>)
CPY*	Carboxipeptidasa Y de <i>S. cerevisiae</i> con la mutación puntual G255R
dATP	<u>D</u> esoxi <u>a</u> denosina <u>t</u> ri <u>f</u> osfato
dCTP	<u>D</u> esoxi <u>c</u> itidina <u>t</u> ri <u>f</u> osfato
dGTP	<u>D</u> esoxi <u>g</u> uanosina <u>t</u> ri <u>f</u> osfato
DIC	Contraste interdiferencial (<i>Differential Interphase Contrast</i>)
DMSO	<u>D</u> imetil <u>S</u> ulfó <u>x</u> ido
D.O.	<u>D</u> ensidad óptica
DTT	<u>D</u> iti <u>o</u> tr <u>e</u> itol
dTTP	<u>D</u> esoxi <u>t</u> imidina <u>t</u> ri <u>f</u> osfato
EDTA	Ácido <u>e</u> tilén <u>d</u> iamino <u>t</u> etra- <u>a</u> cético
EGTA	Ácido <u>e</u> tilén glicol bis <u>t</u> etra- <u>a</u> cético
EMM	Medio mínimo para <i>S. pombe</i> (<i>Edinburgh Minimal Media</i>)
ERAD	Degradación asociada al retículo endoplásmico (<i>Endoplasmic Reticulum Associated Degradation</i>)
ERK	Quinasa regulada por señales extracelulares (<i>Extracellular signal-Regulated Kinase</i>)
FDA	Diacetato de Fluoresceína
FK506	Tacrólimus
FM4-64	<i>N</i> -(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPásica (<i>GTPase Activating Protein</i>)
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP (<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>)
GDP	<u>G</u> uanosina 5'- <u>d</u> ifostato

ABREVIATURAS

GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<u>G</u> uanine <u>N</u> ucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actor)
GFP	Proteína verde fluorescente (<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein)
GPI	Glicosil fosfatidil inositol (<u>G</u> lycosyl <u>p</u> hosphatidyl <u>i</u> nositol)
GST	<u>G</u> lutation <u>S</u> transferasa
GTP	<u>G</u> uanosina 5'-trifosfato
h	<u>H</u> oras
HA	Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe
HRP	Peroxidasa de rábano (<u>H</u> orse <u>r</u> adish <u>P</u> eroxidase)
iMTOC	Centro organizador de microtúbulos de interfase (<u>I</u> nterphase <u>M</u> icro <u>t</u> ubule <u>O</u> rganizer <u>C</u> entre)
IPTG	Isopropil-β-D- <u>t</u> iogalactopiranosido
JNK	Quinasa c-Jun N-terminal (<u>c</u> - <u>J</u> un <u>N</u> -terminal <u>K</u> inase)
kDa	<u>K</u> ilodalton
kb	<u>K</u> ilobase
LB	Medio <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani para <i>E. coli</i>
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno (<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase)
MAPKK	Quinasa de la MAPK (<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>K</u> inase)
MAPKKK	Quinasa de la MAPKK (<u>M</u> itogen- <u>A</u> ctivated <u>P</u> rotein <u>K</u> inase <u>K</u> inase <u>K</u> inase)
Mb	<u>M</u> egabase
MEA	Medio agar extracto de malta (<u>M</u> alt <u>E</u> xtract <u>A</u> gar)
MES	Ácido 2-(N- <u>M</u> orfolino) etanosulfónico
min	<u>M</u> inutos
NETO	Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo (<u>N</u> ew <u>E</u> nd <u>T</u> ake <u>O</u> ff)
nmt	Promotor inhibido por tiamina (<u>N</u> o <u>M</u> essenger with <u>T</u> hiamine)
NP-40	Nonidet P-40
OETO	Comienzo del crecimiento por el polo celular antiguo (<u>O</u> ld <u>E</u> nd <u>T</u> ake <u>O</u> ff)
ORF	Fase de lectura abierta (<u>O</u> pen <u>R</u> eading <u>F</u> rame)
pb	<u>P</u> ares de <u>b</u> ases
PBS	Tampón fosfato salino (<u>P</u> hosphate- <u>B</u> uffered <u>S</u> aline)
PKC	<u>P</u> roteína <u>q</u> uinasa <u>C</u>
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)

PEM	Tampón <u>P</u> IPES con <u>E</u> GTA y <u>M</u> g ₂ SO ₄
PIPES	Piperazina bis (ácido 2-etanosulfónico)
PMSF	Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
RBD	Dominio de unión a RhoA (<i>RhoA Binding Domain</i>)
RFP	Proteína roja fluorescente (<i>Red Fluorescent Protein</i>)
rpm	<u>R</u> evoluciones <u>p</u> or <u>m</u> inuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SNARE	<i>Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor</i>
SPA	Medio agar de esporulación (<i>Sporulation Agar</i>)
SPB	Cuerpo polar del huso (<i>Spindle Pole Body</i>)
TAE	Tampón <u>T</u> ris- <u>A</u> cético <u>E</u> DTA
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20 (<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
+TIP	<i>plus end tracking proteins</i>
TM	<u>T</u> unicamicina
Tris-HCl	Tris-(hidroximetilamino)-metano equilibrado con ácido clorhídrico
UDP	<u>U</u> ridina 5'- <u>d</u> ifosfato
UPR	Respuesta a proteínas mal plegadas (<i>Unfolded Protein Response</i>)
UV	<u>U</u> ltravioleta
v/v	<u>v</u> olumen- <u>v</u> olumen
wt	Estirpe silvestre (<i>Wild Type</i>)
YES	Medio rico para <i>S. pombe</i> (<i>Yeast Extract + Supplements</i>)
2XYT	Medio rico para <i>E. coli</i> (<i>Yeast Extract Tryptone</i>)
6His	Seis histidinas

Índice



INTRODUCCIÓN.....	1
1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : un modelo eucariota para el estudio de la morfogénesis celular.....	3
1.1 Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	4
2. Morfogénesis y control de la polaridad en <i>S. pombe</i>	5
2.1 Ciclo celular y morfogénético en <i>S. pombe</i>	6
2.2 El citoesqueleto de actina en <i>S. pombe</i>	8
3. Biosíntesis y composición de la pared celular de <i>S. pombe</i>	9
3.1 Composición de la pared celular.....	10
3.2 Biosíntesis y regulación de los componentes de la pared celular.....	12
3.2.1 β -glucano.....	12
3.2.2 α -glucano.....	12
3.2.3 Galactomanano.....	13
4. Las GTPasas de la familia Rho.....	13
4.1 Modificaciones postraduccionales de las proteínas Rho.....	14
4.2 Regulación de las proteínas Rho.....	15
4.2.1 Las proteínas GEF (<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>).....	15
4.2.2 Las proteínas GAP (<i>GTPase Activating Protein</i>).....	16
4.2.3 Las proteínas GDI (<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>).....	17
4.3 Las GTPasas de la familia Rho en levaduras.....	17
4.3.1 Rho1.....	17
Rho1 en <i>S. cerevisiae</i>	18
Rho1 en <i>S. pombe</i>	20
4.3.2 Rho2.....	23
4.3.3 Rho3.....	24
4.3.4 Rho4.....	25
4.3.5 Rho5.....	25
4.3.6 Cdc42.....	26
5. Las rutas de MAPKs.....	28
5.1 La ruta de MAPK de respuesta a feromonas en <i>S. pombe</i>	30
5.2 La ruta de MAPKs de respuesta a estrés en <i>S. pombe</i>	31
5.3 La ruta de MAPKs de integridad celular.....	33

5.3.1 La ruta de MAPKs de integridad celular en <i>S. cerevisiae</i>	33
5.3.2 La ruta de MAPKs de integridad celular en <i>S. pombe</i>	35
6. La fosfatasa calcineurina.....	38
OBJETIVOS	43
RESULTADOS	47
1. Construcción y caracterización de la cepa mutante termosensible <i>rho1-C17R</i>	49
1.1 Obtención de la cepa mutante termosensible <i>rho1-C17R</i>	49
1.2 Crecimiento y morfología de la cepa mutante termosensible <i>rho1-C17R</i>	50
1.3 Organización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos en las células <i>rho1-C17R</i>	52
1.4 Estudio de la localización de Rho1.....	54
1.5 Niveles de Rho1 total y activa en la cepa <i>rho1-C17R</i>	56
1.6 La cepa <i>rho1-C17R</i> presenta alteraciones en la estructura de la pared celular.....	57
1.7 Supresión del fenotipo de termosensibilidad de la cepa <i>rho1-C17R</i> por sobreexpresión de <i>rho1</i> ⁺ o de genes relacionados con esta GTPasa.....	59
2. La ruta MAPK de integridad celular ejerce una función antagónica respecto a la GTPasa Rho1 en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	63
2.1 Búsqueda de supresores de la cepa mutante <i>rho1-C17R</i>	63
2.2 <i>pmp1</i> ⁺ es un supresor multicopia de la termosensibilidad presente en las células <i>rho1-C17R</i>	64
2.3 La MAPK de integridad celular, Pmk1, realiza una función antagónica con Rho1.....	66
2.4 La mejora en el crecimiento de las células <i>rho1-C17R</i> por la ausencia de la actividad de Pmk1 es independiente de la biosíntesis de pared celular.....	70
2.5 La fosforilación basal de Pmk1 está aumentada en la cepa mutante <i>rho1-C17R</i>	72
3. Interacción de la GTPasa Rho1 con la fosfatasa calcineurina	75
3.1 La viabilidad de las células <i>rho1-C17R</i> es dependiente de la actividad de la calcineurina (Ppb1).....	75
3.2 Una baja actividad de Rho1 provoca que se necesite y se active la fosfatasa calcineurina.....	77

3.3 La interacción funcional de Rho1 y Ppb1 no es dependiente del factor de transcripción Prz1.....	79
3.4 Rho1 y Ppb1 interaccionan.....	80
3.5 La entrada de Ca ²⁺ al interior celular es necesaria cuando la función de Rho1 está comprometida.....	81
3.6 Presencia de estrés de retículo endoplásmico en respuesta a una baja actividad de la GTPasa Rho1.....	82
3.7 Las células <i>rho1-C17R</i> no presentan una ERAD defectuosa.....	84
4. Búsqueda de interacciones entre la GTPasa Rho1 y el sistema intracelular de membranas.....	86
4.1 Las células <i>rho1-C17R</i> presentan una interacción génica negativa con el complejo adaptador AP-3.....	86
4.2 Una baja actividad de Rho1 provoca defectos en el procesamiento de la carboxipeptidasa Y (Cpy1).....	88
4.3 La cepa mutante <i>rho1-C17R</i> no muestra defectos en la ruta endocítica ni en la dinámica de vacuolas.....	89
4.4 Las células <i>rho1-C17R</i> presentan fragmentación del aparato de Golgi.....	93
DISCUSIÓN.....	97
1. La cepa mutante <i>rho1-C17R</i>	99
2. Relación antagónica entre Rho1 y la ruta MAPK de integridad celular.....	102
3. Colaboración entre la GTPasa Rho1 y la fosfatasa calcineurina.....	105
4. Rho1 y el tráfico de membranas.....	109
CONCLUSIONES.....	113
MATERIALES Y MÉTODOS.....	117
1. Microorganismos utilizados.....	119
2. Medios de cultivo.....	121
2.1 Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	121
2.2 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	123
3. Condiciones y estimación del crecimiento.....	123
3.1 Condiciones de crecimiento para <i>S. pombe</i>	123
3.2 Condiciones de crecimiento para <i>E. coli</i>	124
3.3 Ensayos de crecimiento en gota.....	124
4. Métodos genéticos.....	124

4.1 Conjugación.....	124
4.2 Aislamiento de ascosporas al azar.....	125
4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: análisis de tétradas.....	125
5. Procedimientos generales de biología molecular.....	126
5.1 Vectores utilizados.....	126
5.1.1 Vectores de <i>E. coli</i>	126
5.1.2 Vectores de <i>S. pombe</i>	126
5.2 Obtención de ADN.....	128
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	128
5.4 Diseño de la PCR degenerada.....	130
5.5 Secuenciación de ADN.....	131
5.6 Manipulación de ADN.....	131
5.7 Transformación de <i>E. coli</i>	131
5.8 Transformación de <i>S. pombe</i>	132
5.9 Construcción del módulo de integración de <i>rho1</i> ⁺	132
5.10 Clonación de genes (<i>pmp1</i> ⁺ y <i>ppb1</i> ⁺).....	133
5.11 Clonación del gen <i>ppb1</i> ΔCt.....	133
5.12 Plásmido de expresión NMT1-V5-6His-CPY*.....	133
5.13 Obtención de cepas <i>GFP-rho1:leu1</i> y <i>GFP-rho1-C17R:leu1</i>	134
5.14 Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo.....	134
6. Búsqueda de supresores en una genoteca de <i>S. pombe</i> de ADN genómico.....	135
7. Búsqueda de interacciones génicas mediante cruce con una colección de cepas de <i>S. pombe</i> con delección de un gen.....	136
8. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular.....	137
9. Valoración de la actividad enzimática β-(1,3)-D-glucán sintasa.....	138
10. Análisis de proteínas.....	140
10.1 Obtención de extractos celulares.....	140
10.2 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	141
10.3 Inmunodetección de proteínas.....	141
10.4 Inmunoprecipitación.....	142
10.5 Análisis de los niveles de GTP-Rho1.....	143
10.5.1 Producción de GST-RBD.....	143

10.5.2 Ensayo de unión.....	144
10.6 Ensayo de <i>immunoblot</i> de colonias.....	144
10.7 Ensayo de determinación de la actividad de Pmk1.....	145
10.8 Valoración de la estabilidad de la proteína CPY*.....	145
11. Técnicas microscópicas y tinciones.....	146
11.1 Microscopía de campo claro: contraste de fases y contraste diferencial (Nomarski).....	146
11.1.1 Tinción con azul de metileno.....	147
11.2 Microscopía de fluorescencia.....	147
11.2.1 Fluorescencia directa con GFP.....	147
11.2.2 Tinción de calcoflúor.....	148
11.2.3 Tinción de actina.....	148
11.2.4 Tinción con FM4-64.....	149
11.2.5 Tinción con CDCFDA.....	149
11.3 Microscopía a tiempo real.....	150
12. Análisis bioinformático de los datos.....	150
APÉNDICES.....	153
Apéndice I: Ensayos de crecimiento de la cepa <i>rho1-C17R</i> y otras cepas relacionadas en medio YES a 28°C en presencia de distintos compuestos.....	155
Apéndice II: Resultados de la búsqueda de interacciones genéticas de la cepa mutante <i>rho1-C17R</i> con la colección de deleciones viables de <i>S. pombe</i>	161
BIBLIOGRAFÍA.....	165

Introducción



“Toda la ciencia no es más que un refinamiento del pensamiento cotidiano”

Albert Einstein

1. *Schizosaccharomyces pombe*: UN MODELO EUCARIOTA PARA EL ESTUDIO DE LA MORFOGÉNESIS CELULAR

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* fue descrita por primera vez en 1.893 por P. Lindner, quien la aisló de una cerveza de mijo del este de África, de hecho su

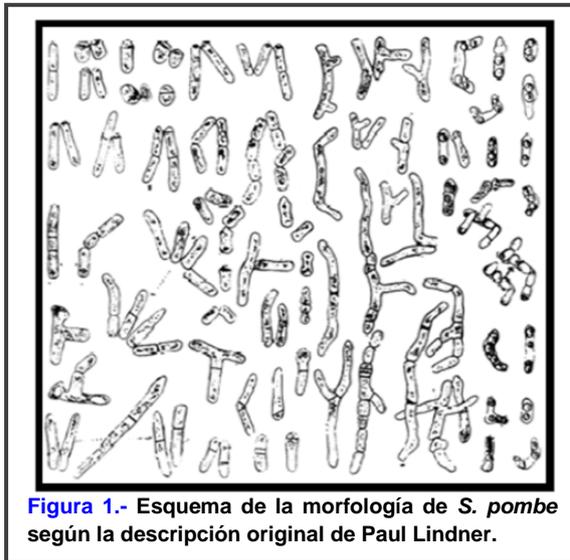


Figura 1.- Esquema de la morfología de *S. pombe* según la descripción original de Paul Lindner.

epítipo específico “pombe” significa cerveza en Swahili (Figura 1). Posteriormente se denominó “levadura de fisión” debido a que su división sucede por fisión transversal. La mayoría de cepas usadas hoy en día en el laboratorio derivan de una estirpe homotática h^{90} aislada por Ostewalder en Francia en 1921 a partir de jugo de uva, de la que se obtuvieron cepas heterotáticas con los dos tipos sexuales opuestos, h^+ y h^- (Leupold, 1950). Este género está clasificado dentro de los

Ascomycota, al igual que *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, se estima que la separación evolutiva entre estas dos levaduras tuvo lugar hace 1.144 millones de años y la separación evolutiva entre *S. pombe* y plantas o metazoos hace 1.600 (Heckman, et al., 2001) (Figura 2).

S. pombe es un organismo eucariota unicelular que forma colonias de células libres inmóviles. Dicho organismo constituye un excelente modelo

DOMINIO:	Eukarya
REINO:	Hongos
SUBREINO:	Dikarya
FILO:	Ascomycota
SUBFILO:	Taphrimycotina
CLASE:	Schizosaccharomycetes
SUBLCLASE:	Schizosaccharomycetidae
ORDEN:	Schizosaccharomycetales
FAMILIA:	Schizosaccharomycetaceae
GÉNERO:	<i>Schizosaccharomyces</i>
ESPECIE:	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Figura 2.- Clasificación taxonómica de *S. pombe*. Adaptado de <http://indexfungorum.org/> y (James, et al., 2006).

de estudio en muchos campos de la biología celular por varias razones: es fácil de manejar en condiciones de laboratorio, no es patógeno, presenta un ciclo de vida rápido y fundamentalmente haploide así como un ciclo sexual de corta duración, producido por conjugación, que permite combinar mutaciones, crear estirpes con proteínas marcadas con distintos epítipos o condicionar la expresión de genes de una manera sencilla.

Además, *S. pombe* es susceptible de análisis genético clásico y molecular ya que la secuenciación de su genoma fue completada en 2.002 (Wood, *et al.*, 2002).

Como organismo que presenta un ciclo celular eucariótico convencional, *S. pombe* es muy similar citológicamente a las células eucariotas superiores, especialmente si nos referimos al modo de división celular por fisión transversal. A diferencia de la mayoría de levaduras que se dividen por gemación, esta levadura forma el anillo contráctil de actomiosina en el plano medio de la célula. *S. pombe*, como todos los hongos, presenta una pared celular que le proporciona protección mecánica, forma y estabilidad osmótica. Lo que también permite que este organismo sea un buen modelo para el análisis de la biosíntesis y degradación de esta estructura.

1.1 Ciclo de vida de *S. pombe*

S. pombe es un organismo con un ciclo de vida haplodiplobionte, con una fase haploide y una diploide. Durante la fase haploide, que es la predominante en este organismo, las células tienen forma cilíndrica con un tamaño aproximado, al comienzo de su ciclo de vida, de 3-4 μm de diámetro y 7-8 μm de longitud, crecen de manera polarizada por extensión de sus extremos hasta los 12-15 μm , momento en el que se dividen por fisión transversal. Para ello, se forma un septo o pared perpendicular al eje mayor de la célula que, tras la citoquinesis, se digiere parcialmente dando lugar a dos células hijas de idéntico tamaño (**Figura 3**).

Cuando las células de tipos sexuales complementarios se encuentran en un medio pobre en nutrientes comienzan a producir feromonas y sus receptores (Kelly, *et al.*, 1988). Las células h^- secretan factor M y producen receptores para el factor P y las células h^+ secretan factor P y producen receptores para el factor M. La unión de las feromonas a sus receptores desencadena el proceso de conjugación. Éste empieza con la formación de una proyección denominada *shmoo* en un extremo de cada célula, hasta que ambas se ponen en contacto y se fusionan, formando un cigoto diploide que a continuación, sufre meiosis y esporulación dando lugar a un asca zigótica con cuatro esporas haploides. Las ascosporas permanecen latentes hasta que las condiciones del medio sean favorables, entonces germinan reiniciando el ciclo (**Figura 3**). En el laboratorio y bajo determinadas condiciones, pueden mantenerse células diploides en cultivo a partir de cigotos si estos se transfieren a un medio de crecimiento rico inmediatamente después de la conjugación y antes de la meiosis. (Egel y Egel-Mitani, 1974). Las células diploides de *S. pombe*, de 11-14 μm de longitud al comienzo de su

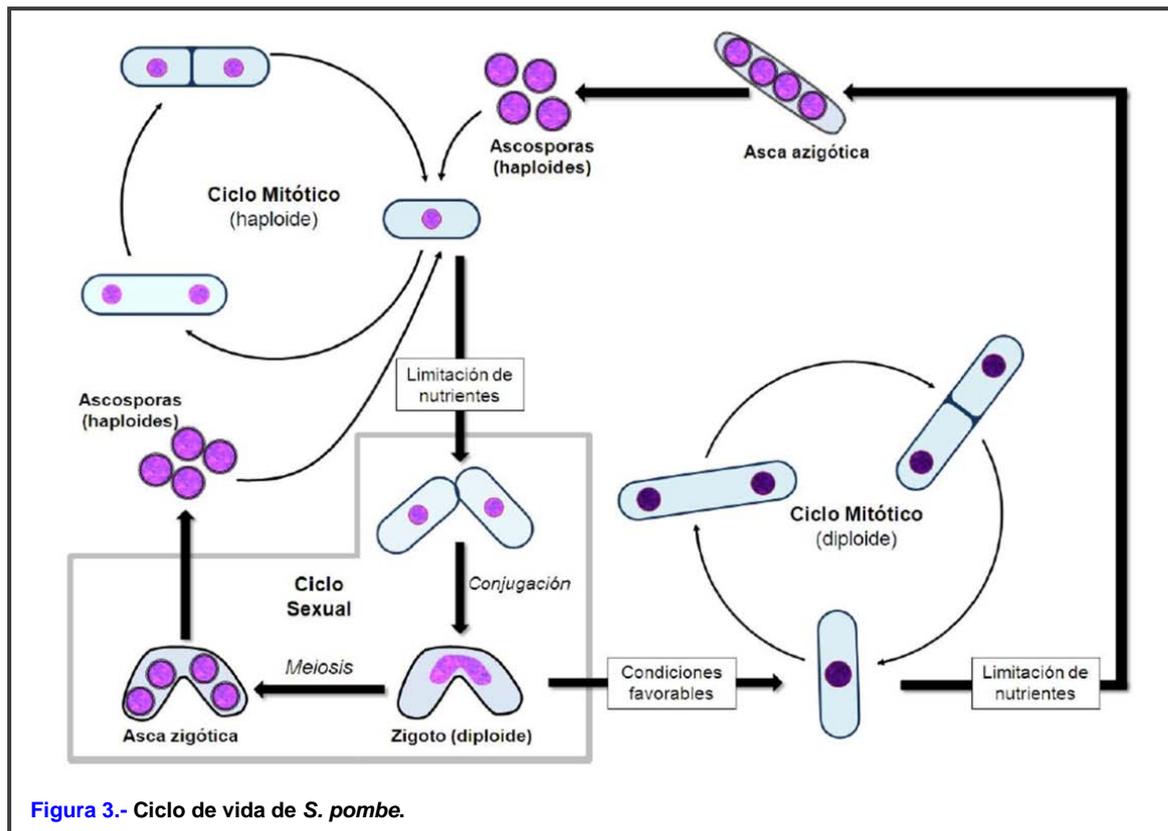


Figura 3.- Ciclo de vida de *S. pombe*.

ciclo de vida y 20-25 μm antes de la división, son muy inestables y tienden a esporular rápidamente si entran en fase estacionaria o si escasean los nutrientes en el medio, formándose un asca azigótica con cuatro ascoporas haploides (Figura 3).

2. MORFOGÉNESIS Y CONTROL DE LA POLARIDAD EN *S. pombe*

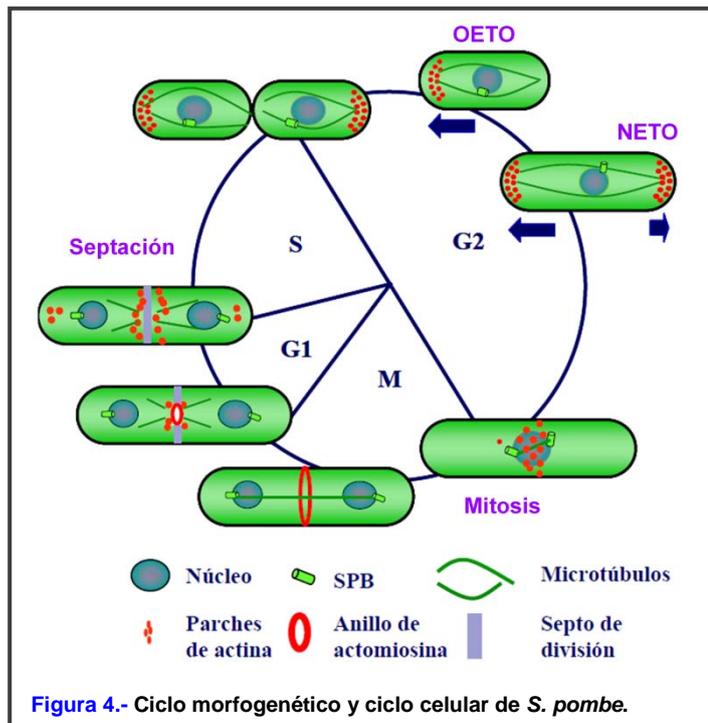
La generación de polaridad celular es de suma importancia para la función de prácticamente, todos los tipos de células y es la base de procesos tan diversos como la división, diferenciación, migración celular, señalización célula-célula o fertilización.

S. pombe es utilizado para el estudio de la regulación de la forma celular ya que sus células crecen por los extremos de forma polarizada manteniendo una forma cilíndrica. Se han podido identificar diferentes fases en el crecimiento polarizado de este organismo mediante el estudio de cepas mutantes, (Chang y Peter, 2003; Chang y Verde, 2004): como son los mutantes *tea*, con células ramificadas o torcidas que crecen de forma polarizada pero fallan al establecer el sitio de crecimiento; mutantes *orb*, incapaces de mantener un crecimiento polarizado, por lo que adquieren forma redondeada; mutantes monopolares, que crecen de forma polarizada pero no activan el crecimiento en

uno de los extremos celulares y mutantes defectivos en el posicionamiento del septo de división, que originan células hijas de diferente tamaño. Todos estos resultados han llevado a establecer que inicialmente es necesario definir los lugares de crecimiento en la célula mediante la actividad de proteínas marcadoras, éstas se encargan de reclutar y activar proteínas de cascadas de señalización, que a su vez regulan la morfogénesis organizando el citoesqueleto de actina y reclutando las enzimas necesarias para el crecimiento celular.

2.1 Ciclo celular y morfogénico en *S. pombe*

S. pombe, como todos los organismos eucariotas, presenta cuatro fases durante su ciclo celular: G1, S, G2 y M (Mitchison, 1970). Después de la mitosis, las células activan el crecimiento únicamente en el polo heredado de la célula madre o polo antiguo (**OETO**: *Old End Take Off*). Tras alcanzar una masa y/o tamaño determinados. Durante la fase G2, se activa el crecimiento del polo originado como consecuencia de la división celular anterior (polo nuevo), en el proceso denominado **NETO** (*New End Take Off*) y, como consecuencia de ello, las células adquieren un patrón de crecimiento bipolar (Mitchison y Nurse, 1985). Cuando la masa



y/o el tamaño celular alcanza unos valores determinados, la célula entra en mitosis (fase M). En este momento se detiene el crecimiento de los polos y toda la maquinaria biosintética se dirige al centro de la célula, donde se ensambla un anillo de actomiosina. Al final de la mitosis se produce la contracción del anillo de actomiosina y la septación de forma simultánea y las células inician el crecimiento en los polos viejos, que se mantiene durante G1 y S, antes de separarse en dos células hijas. (**Figura 4**) (MacNeill y Fantes, 1997).

El citoesqueleto de microtúbulos es imprescindible para el establecimiento de la polaridad y para el control de la posición del núcleo (Chang, 2001; Hayles y Nurse, 2001; Verde, 1998). En interfase los microtúbulos están organizados como haces paralelos al eje de la célula mientras que en mitosis forman el huso mitótico (Marks, *et al.*, 1986). Los haces presentan dos extremos: el positivo (+) y el negativo (-) y están formados por 4 ó 5 microtúbulos dispuestos de forma antiparalela, con sus extremos (-) solapando en los centros organizadores de microtúbulos de interfase o iMTOCs, localizados en el centro de la célula cercanos al núcleo, mientras que los extremos (+) se sitúan orientado hacia los polos (Hoog, *et al.*, 2007; Huisman y Brunner, 2011; Janson, *et al.*, 2007). En cada haz de microtúbulos, los extremos (+) crecen hasta alcanzar los polos para despolimerizarse rápidamente, en un proceso conocido como catástrofe (Brunner y Nurse, 2000). En el extremo (+) de los microtúbulos se acumula un grupo de proteínas estructural y funcionalmente diverso que forman el complejo +TIP (*plus-end tracking proteins*). Estas proteínas controlan la dinámica de los microtúbulos permitiendo tanto el control espacial como temporal de la catástrofe. En *S. pombe* el papel principal de estas proteínas es permitir a los microtúbulos crecer lo suficiente como para alcanzar los polos de la célula. Los principales componentes de +TIP son Mal3, una proteína de la familia EB1; la kinesina Tea2; y Tip1, una proteína de la familia CLIP-170 (Bieling, *et al.*, 2007; Brunner y Nurse, 2000; Busch, *et al.*, 2004). Las proteínas Tea1 y Tea4 son transportadas en el extremo (+) de los microtúbulos hacia los polos celulares, donde son depositadas como “puntos” discretos en la membrana celular (Chang y Martin, 2009). Tea1, con similitud a las proteínas Kelch de *Drosophila* y Ezrina de mamíferos, es fundamental para marcar los sitios de crecimiento (Mata y Nurse, 1997) y Tea4 es una proteína adaptadora que posee un dominio SH3 (Martin, *et al.*, 2005). Su anclaje a los polos se produce mediante la interacción de Tea1 con las proteínas Mod5 y Tea3 (Snaith, *et al.*, 2005; Snaith y Sawin, 2003) (**Figura 5**). Una diana muy importante del complejo Tea1-Tea4 es la formina For3, encargada de la formación de cables de actina, a la cual se unen a través de la proteína Tea4. La quinasa Pom1 se localiza en los polos de forma dependiente de Tea4 y se ha

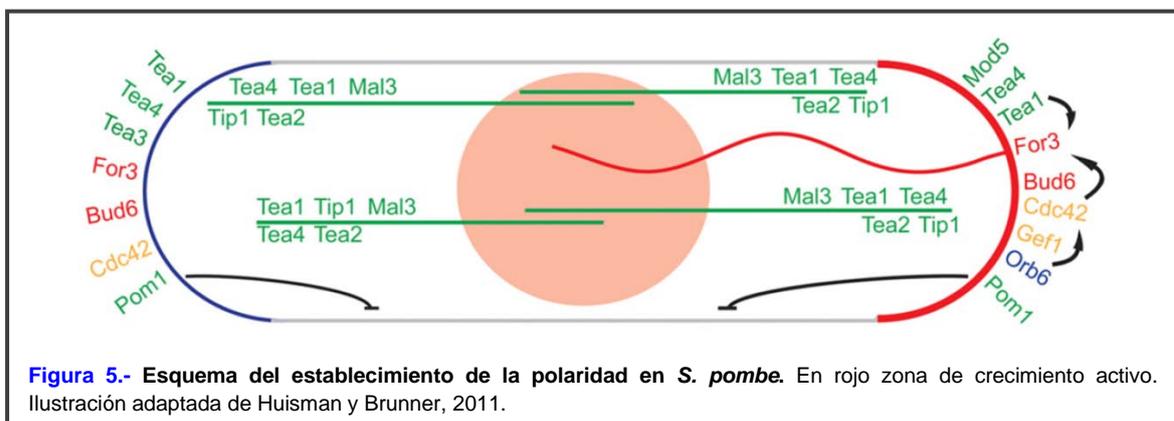


Figura 5.- Esquema del establecimiento de la polaridad en *S. pombe*. En rojo zona de crecimiento activo. Ilustración adaptada de Huisman y Brunner, 2011.

sugerido que puede actuar por debajo de Tea1 conectando la señalización de microtúbulos y actina para asegurar la posición del crecimiento. Pom1 se une directamente a fosfolípidos de la membrana plasmática cargados negativamente a través de un dominio cargado positivamente. 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-Tabares, *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, y se disocia gradualmente de la membrana produciendo un gradiente de Pom1 desde los polos hacia el centro de la célula (Hachet, *et al.*, 2011). Otras proteínas son reclutadas a los polos para promover el crecimiento celular, en particular la GTPasa Cdc42, reguladora central del crecimiento en todos los organismos eucariotas. Sin embargo, su reclutamiento no depende de los microtúbulos y el mecanismo por el que se activa en los polos aún no está claro. También es reclutada Pob1, proteína efectora de Cdc42 que permite su interacción con For3 y la activación de esta formina (Kokkoris, *et al.*, 2014; Martin, *et al.*, 2007; Rincon, *et al.*, 2009).

2.2 El citoesqueleto de actina en *S. pombe*

En esta levadura el citoesqueleto de actina participa en distintos e importantes procesos celulares tales como el crecimiento polarizado, la secreción dirigida, la endocitosis y la citoquinesis (Chhabra y Higgs, 2007; Subramanian, *et al.*, 2013). La actina es una pequeña proteína globular (~42 kDa) y una de las más conservadas en eucariotas. En las células, la actina aparece tanto en su forma monomérica o G-actina como en su forma filamentosa o F-actina (Subramanian, *et al.*, 2013). En *S. pombe*, está presente en diferentes estructuras que conforman el citoesqueleto: parches, que contienen filamentos de actina ramificada, cables compuestos por filamentos lineales de actina sin ramificar y el anillo de citoquinesis (Subramanian, *et al.*, 2013) (**Figura 6**).

Los parches de actina son cerca de 150 filamentos cortos y ramificados que alcanzan un tamaño de 100-200 nm de longitud (Berro, *et al.*, 2010; Kovar, *et al.*, 2011; Sirotkin, *et al.*, 2010). Los parches de actina son necesarios en el proceso de endocitosis (Aghamohammadzadeh y Ayscough, 2009). Su ensamblaje está localizado en lugares en los que se produce este proceso, bien acompañando el crecimiento polarizado en los polos de las células en interfase o en la zona media en células dividiéndose (Arellano, *et al.*, 1997; Balasubramanian, *et al.*, 1998; Gachet y Hyams, 2005; Kovar, *et al.*, 2011)

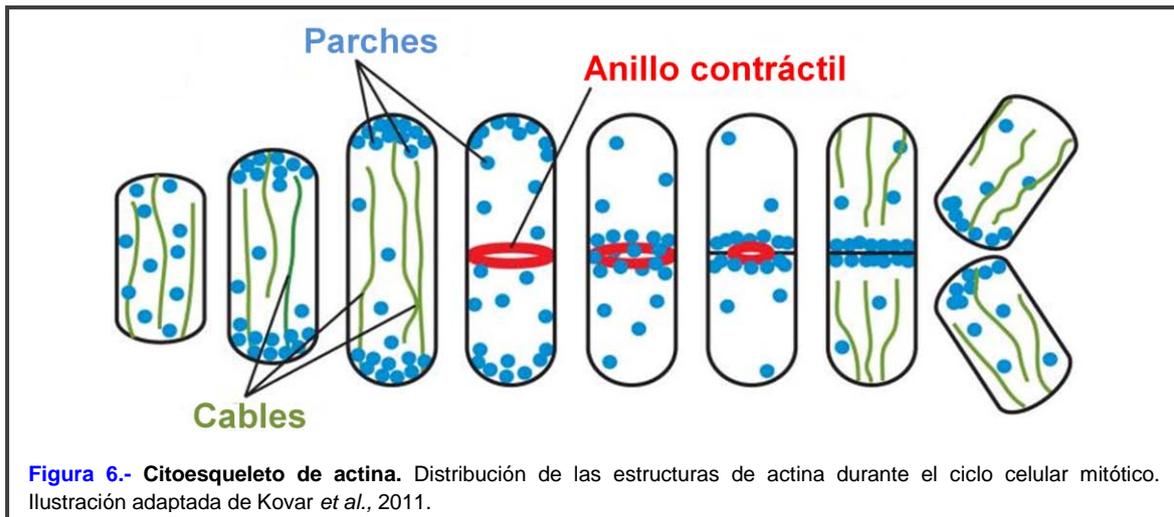


Figura 6.- Citoesqueleto de actina. Distribución de las estructuras de actina durante el ciclo celular mitótico. Ilustración adaptada de Kovar *et al.*, 2011.

(Figura 6). Esto sugiere que la función endocítica de los parches de actina acompaña la remodelación y síntesis de la pared celular.

Los cables de actina son los encargados de proporcionar una vía polarizada para las vesículas de secreción que son transportadas por la miosina de tipo V (Motegi, *et al.*, 2001) y también participan en el movimiento de los parches de actina (Martin y Chang, 2006; Pelham y Chang, 2001). Los cables están compuestos de haces paralelos de filamentos cortos de actina, que son ensamblados por la forma de nucleación y elongación de actina For3 (Feierbach y Chang, 2001; Kamasaki, *et al.*, 2005; Kovar, *et al.*, 2011; Nakano, *et al.*, 2002). For3 es localizada y activada por Cdc42 y la proteína adaptadora Pob1 en los extremos celulares (Martin, *et al.*, 2007; Rincon, *et al.*, 2009).

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). Se ensambla en la región media de la célula y su contracción se produce de forma coordinada con el depósito de nueva membrana y de material de pared celular.

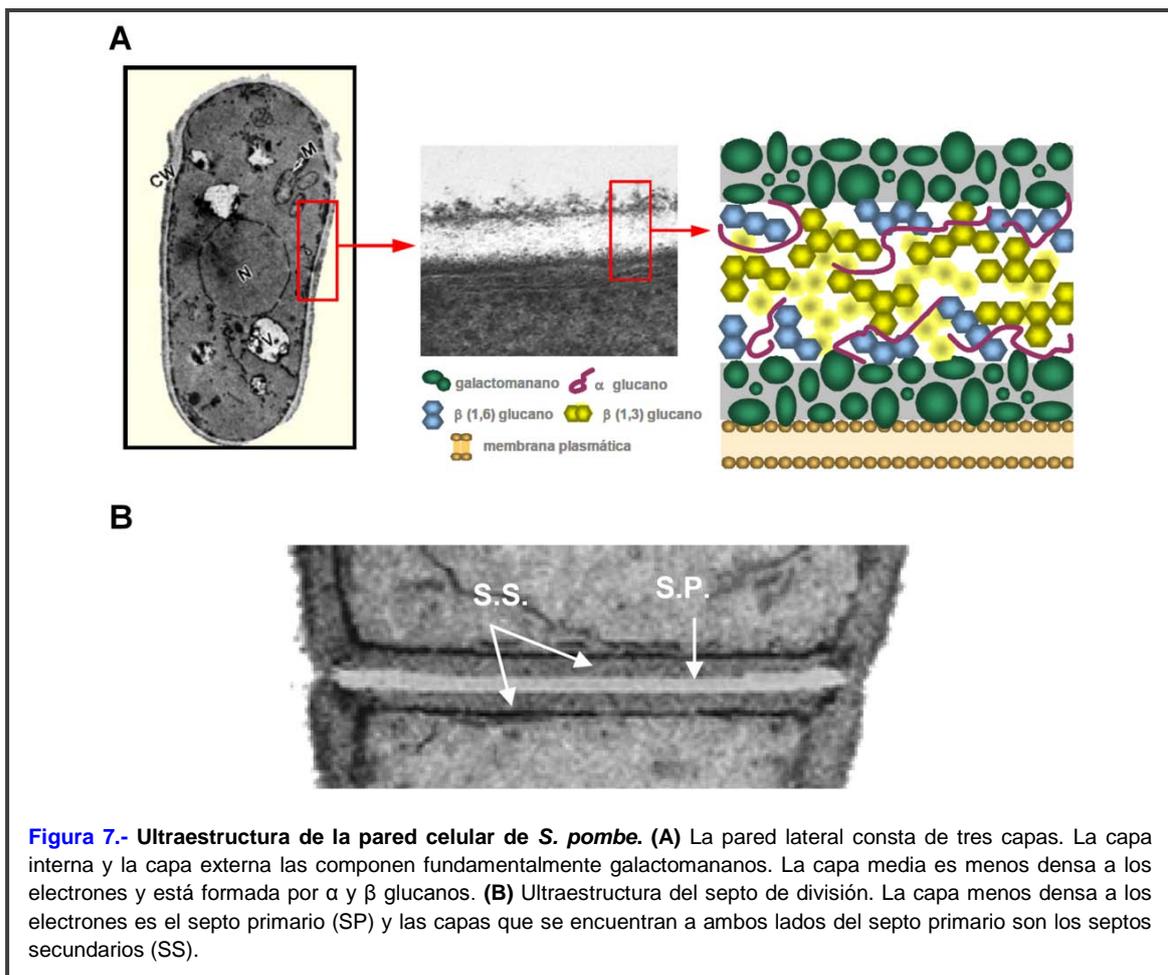
3. BIOSÍNTESIS Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE *S. pombe*

La pared celular es una estructura externa a la membrana plasmática compuesta fundamentalmente por polímeros de glucosa de estructura fibrilar. Permite soportar la presión osmótica originada por la elevada concentración de sustancias disueltas en el interior celular y actúa de barrera protectora ante daños producidos por el medio externo (Duran y Perez, 2004; Osumi, 1998a).

La pared celular es también importante para el mantenimiento de la polaridad celular y la morfogénesis. Es una estructura muy dinámica y sufre numerosos cambios de composición y estructura durante el crecimiento. Para que se puedan llevar a cabo las modificaciones de la pared, manteniendo la integridad celular, es necesaria una estrecha coordinación entre el ciclo celular, el crecimiento y la biosíntesis/degradación de la pared celular.

3.1 Composición de la pared celular

La pared celular de *S. pombe* se observa, en el microscopio electrónico de transmisión, como una estructura trilaminar, con dos capas externas densas a los electrones y una capa interna menos densa compuesta principalmente por α y β -glucanos (Humbel, *et al.*, 2001; Osumi, 1998b) (**Figura 7A**). El septo de división está muy organizado y presenta una capa interna menos densa denominada septo primario y a ambos lados se sitúan los dos septos secundarios que luego formarán la pared (Humbel, *et al.*, 2001; Sugawara, *et al.*, 2003) (**Figura 7B**).



S. pombe presenta dentro de los glucanos cuatro tipos esenciales, que constituyen el 85% del total de la pared:

- A. β -(1,3)-glucano lineal:** Lo componen monómeros de D-glucosa unidos mediante enlaces β -(1,3) (Humbel, *et al.*, 2001). Está presente principalmente en el septo primario y en menor cantidad en la pared celular. Este polímero es minoritario pero tiene mucha mayor afinidad que el resto por el colorante calcoflúor que tiñe el septo primario y las zonas de crecimiento (Cortes, *et al.*, 2007).
- B. β -(1,3)-glucano con ramificaciones β -(1,6):** Es el componente más abundante de la pared (aproximadamente 50%) y consta de cadenas lineales con residuos de glucosa unidos por enlace β -(1,3) y ramificaciones laterales con glucosas unidas mediante enlaces β -(1,6).
- C. β -(1,6)-glucano muy ramificado:** Está constituido por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β -(1,6) que contienen frecuentes ramificaciones en β -(1,3) (Manners y Meyer, 1977). Es un componente minoritario en la pared celular (3-6%) y se ha denominado también diglucano (Magnelli, *et al.*, 2005).
- D. α -glucano:** es un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,3) con una pequeña proporción de enlaces α -(1,4) (Manners y Meyer, 1977). En *S. pombe* constituye casi un tercio de la pared (28%) (Magnelli, *et al.*, 2005) y es un polímero importante en la morfogénesis celular ya que existen mutantes con menor contenido de α -glucano que adquieren forma redonda (Grun, *et al.*, 2005).

El resto de los polisacáridos (10-15%) está formado por los azúcares de las galactomanoproteínas presentes en la pared (Humbel, *et al.*, 2001). Una característica propia de *S. pombe* es que no presenta quitina en su pared, lo que permite el estudio de la regulación de la síntesis de glucano sin la interferencia de los mecanismos compensatorios que se producen en otros hongos cuando la síntesis de glucano es defectuosa (de Leon, *et al.*, 2013; Garcia-Rodriguez, *et al.*, 2000; Perez y Ribas, 2004).

3.2 Biosíntesis y regulación de los componentes de la pared celular

3.2.1 β -glucano

El término β -glucano engloba a los polisacáridos formados por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β -(1,3) o β -(1,6). En esta levadura representa un 50-54% del contenido total de la pared, siendo el principal componente de la misma y el responsable de la fuerza mecánica y del mantenimiento morfológico de la célula (Cortes, *et al.*, 2002).

La enzima responsable de la biosíntesis del β -(1,3)-glucano de la pared celular es la denominada β -(1,3)-glucán sintasa (UDP-glucosa: β -(1,3)-D-glucano-3- β -D-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.34). Está formada por una subunidad catalítica y una reguladora. En *S. pombe* se han identificado cuatro genes que podrían codificar isoformas de las subunidades catalíticas del complejo β -glucán sintasa: *bgs1⁺*, *bgs2⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺* (*β -glucan synthase*). Todos ellos son esenciales en distintos momentos del ciclo de vida de la levadura de fisión (Cortes, *et al.*, 2005; Cortes, *et al.*, 2002; Cortes, *et al.*, 2012; Free, 2013; Liu, *et al.*, 2000; Liu, *et al.*, 1999; Martin, *et al.*, 2003; Martin, *et al.*, 2000; Muñoz, *et al.*, 2013). Las proteínas Bgs son proteínas transmembranales de elevado peso molecular (aproximadamente 200 kDa) y presentan similitud con Fks1 y Fks2, las subunidades de β -glucán sintasa descritas en *S. cerevisiae* (Mazur, *et al.*, 1995). Tanto Bgs1 como Bgs3 y Bgs4 se localizan en el septo, en los polos de crecimiento y en los lugares de síntesis de pared celular durante la diferenciación sexual y en la germinación de las esporas (Cortes, *et al.*, 2012; Free, 2013). Mientras que Bgs2 es la subunidad catalítica de la β -(1,3)-glucán sintasa durante el proceso de esporulación, siendo imprescindible para la correcta maduración de las esporas (Liu, *et al.*, 2000; Martin, *et al.*, 2000).

La subunidad reguladora de la β -(1,3)-glucán sintasa está constituida por la GTPasa Rho1 (Arellano, *et al.*, 1996).

3.2.2 α -glucano

La principal enzima responsable de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular se denomina α -glucán sintasa o Mok1 (Ags1). Ésta es una proteína integral de membrana de 272 kDa que se localiza en las zonas de división y crecimiento de una forma dependiente de actina (Hochstenbach, *et al.*, 1998; Katayama, *et al.*, 1999; Konomi, *et al.*,

2003). El α -glucano sintetizado por Mok1 es esencial para la integridad de la pared celular durante el crecimiento. Durante la septación interviene en la síntesis del septo secundario y la correcta formación del septo primario, confiriéndole la rigidez necesaria para soportar la presión de turgencia durante la separación celular (Cortes, *et al.*, 2012).

3.2.3 Galactomanano

En *S. pombe* el galactomanano constituye el componente glucídico de las glicoproteínas de la pared y representa del 9 al 14% del total de los azúcares en esta estructura. Está formado por un núcleo central de residuos de manosa unidos mediante enlaces α -(1,6) y por cadenas laterales de manosa con enlaces α -(1,2) terminadas en un resto de galactosa en los extremos no reductores (Bush, *et al.*, 1974; Horisberger, *et al.*, 1978; Magnelli, *et al.*, 2005). También se ha encontrado una pequeña cantidad de galactosa situada en posición no terminal (Horisberger y Vonlanthen, 1977). La glicosilación de las proteínas de la pared celular se produce en el retículo endoplásmico y en el aparato de Golgi. Posteriormente, las glicoproteínas de la pared son secretadas, permaneciendo unidas a la membrana mediante grupos GPI o formando enlaces con la matriz de glucanos de la pared celular (Gemmill y Trimble, 2004).

4. LAS GTPasas DE LA FAMILIA Rho

La superfamilia de GTPasas pequeñas o proteínas G pequeñas son proteínas de unión a GTP de 20 a 40 kDa de masa molecular. Están presentes en todos los organismos eucariotas y tienen similitud de función con la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas (Hughes, 1983; Wennerberg, *et al.*, 2005). Estas GTPasas están implicadas en la transducción de señales y regulan una gran diversidad de funciones celulares como el control de la proliferación y diferenciación celular, la regulación del citoesqueleto de actina, el tráfico de membranas y el transporte nuclear (Militello y Colombo, 2013). Los miembros de esta superfamilia están clasificados estructuralmente y funcionalmente en al menos 5 grupos (Ras, Rho/Rac, Rab, Arf y Ran).

La familia Rho fue descubierta en 1985 como una familia de proteínas relacionada con Ras (*Ras homology*) en *Aplysia*. Posteriormente fueron identificados en el genoma humano 18 genes pertenecientes a esta familia convirtiéndose en uno de los tipos proteicos mejor caracterizados (Hall, 1998; Hall, 2012; Madaule y Axel, 1985). Al igual que el resto de los miembros de su superfamilia y que las proteínas G heterotriméricas,

Las GTPasas Rho cambian de conformación molecular dependiendo del nucleótido al que estén unidas (Bishop y Hall, 2000; Wennerberg, *et al.*, 2005). Presentan su forma activa solo cuando están unidas a GTP, en esta forma interactúan con sus proteínas diana y pueden transmitir la señal. Mientras que están inactivas cuando están unidas a GDP. Ésta es la razón por la cual las proteínas de esta superfamilia son llamadas interruptores moleculares, puesto que fluctúan entre los estados activo e inactivo (Perez y Rincon, 2010; Vetter y Wittinghofer, 2001) (**Figura 8**).

4.1 Modificaciones postraduccionales de las proteínas Rho

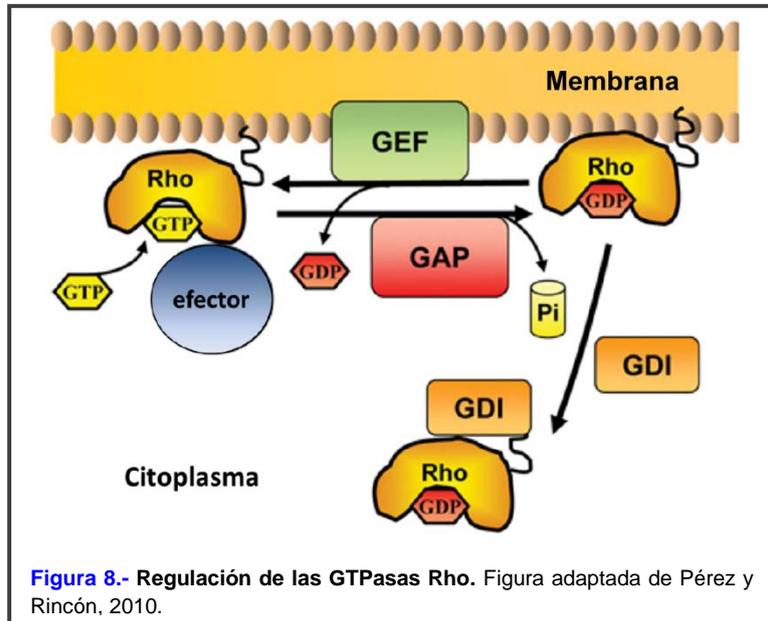
Las proteínas G de pequeño tamaño molecular necesitan determinados cambios postraduccionales para dirigirse y anclarse a las estructuras membranosas donde van a desempeñar sus funciones. En general estos cambios tienen lugar en su extremo C-terminal y consisten en la incorporación de grupos isoprenoides seguida de una proteólisis. Esto da lugar a un incremento de la lipofilia de estas proteínas y permite una mejor asociación con las membranas de la célula. Estos cambios estructurales varían dependiendo de la secuencia de aminoácidos del extremo C-terminal de cada proteína G:

- Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-X, siendo A un aminoácido alifático y X un aminoácido cualquiera, se produce la incorporación de un grupo farnesilo en la cisteína por la enzima farnesiltransferasa I, posteriormente se produce la proteólisis del grupo A-A-X y la carboximetilación de la cisteína (Wennerberg, *et al.*, 2005).
- Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-Leu, la cisteína es geranilgeranilada por la geranilgeraniltransferasa I y posteriormente carboximetilada tras la proteólisis de los tres últimos aminoácidos (Wennerberg, *et al.*, 2005).

En general un grupo lipídico terminal no basta para anclar las proteínas a la membrana. Por ello, algunas proteínas Rho son modificadas con un grupo palmitoilo o miristoilo (Casey, 1994). En otros casos presentan una serie de aminoácidos básicos en el extremo C-terminal que facilitan su anclaje a la membrana.

4.2 Regulación de las proteínas Rho

Las GTPasas Rho presentan una gran afinidad tanto por GDP como por GTP. Sin embargo, solo cuando están unidas a GTP son capaces de interactuar con sus proteínas diana y llevar a cabo sus funciones moleculares (Bishop y Hall, 2000; Perez y Rincon, 2010). Por otro lado, estas proteínas presentan una actividad GTPásica intrínseca que, aunque poco eficiente, causa la hidrólisis del GTP a GDP inactivando a la proteína. Por todo ello, y para que las GTPasas realicen sus funciones de manera adecuada, es



necesaria la presencia de un gran número de proteínas que regulen el ciclo GDP/GTP (Wennerberg, *et al.*, 2005). Existen tres clases de proteínas reguladoras de las proteínas Rho denominadas: GEFs, GAPs y GDIs (**Figura 8**).

4.2.1 Las proteínas GEF (Guanine Nucleotide Exchange Factor)

Estas proteínas reconocen la forma unida a GDP de la GTPasa y provocan la disociación del nucleótido que, posteriormente, es sustituido por GTP (Vetter y Wittinghofer, 2001) (**Figura 8**). El sitio de unión de nucleótidos de guanina se sitúa entre las regiones denominadas *switch I* y *switch II* de las proteínas Rho. Estas regiones, junto con el *P-loop* (región de unión al fosfato), interaccionan con los fosfatos y con el ión magnesio, que son moléculas imprescindibles para que la unión entre el nucleótido y la GTPasa sea de alta afinidad (Vetter y Wittinghofer, 2001). La unión del GEF a la GTPasa Rho induce cambios conformacionales en las regiones *switch* y en el *P-loop* que bloquean el sitio de unión al magnesio. Esto hace que la interacción con los fosfatos se debilite y facilita que se libere el nucleótido, permitiendo la entrada de otro nucleótido nuevo. En general, las proteínas Rho presentan una afinidad similar por el GDP y el GTP, y las proteínas GEFs no favorecen la unión de uno o de otro. La unión del GTP se

produce porque la concentración de este nucleótido en la célula es superior a la de GDP. Las proteínas GEFs desplazan al nucleótido unido y posteriormente el nuevo nucleótido desplaza a las proteínas GEFs (Bos, *et al.*, 2007).

4.2.2 Las proteínas GAP (GTPase Activating Protein)

Son proteínas activadoras de la actividad GTPásica intrínseca de la proteína G. Favorecen la hidrólisis del GTP a GDP haciéndola más eficiente y promoviendo que la GTPasa se encuentre en estado inactivo (**Figura 8**).

Las GAPs de las GTPasas Rho se definen por la presencia del dominio RhoGAP altamente conservado. Este dominio consta de unos 150 aminoácidos y es diferente al módulo GAP de otros reguladores negativos para las GTPasas Ras, Ran o ARF (Moon y Zheng, 2003). Consiste en nueve α -hélices y un residuo de arginina conservado en todos los RhoGAPs, que interaccionan con el sitio de unión de GTP formado por los *switch I* y *II* y el *P-loop* de las proteínas Rho (Moon y Zheng, 2003). Ahí promueven la hidrólisis del GTP gracias a la correcta orientación de la molécula de agua necesaria para este proceso y a que estabilizan el estado de transición de dicha reacción (Bos, *et al.*, 2007; Perez y Rincon, 2010).

En general, el número de RhoGEFs y RhoGAPs es mucho mayor que el de las proteínas Rho (Bos, *et al.*, 2007). Esto quiere decir que una única GTPasa Rho puede ser regulada por más de un RhoGEF o RhoGAP (Tcherkezian y Lamarche-Vane, 2007). Por otro lado, también se ha observado que una misma proteína, GEF o GAP, puede regular a más de una proteína Rho. Esta promiscuidad permite que cada proteína Rho pueda ser regulada por distintos RhoGEFs y RhoGAPs según el proceso en el que intervenga (Bos, *et al.*, 2007).

Otra característica común entre RhoGEFs y RhoGAPs es que son proteínas multidominio con capacidad para unirse a otras proteínas y membranas además de a las GTPasas Rho. Permiten, por tanto, la localización determinada o la formación de complejos proteicos que contribuyen a la regulación espacial y temporal de las GTPasas Rho (Perez y Rincon, 2010).

4.2.3 Las proteínas GDI (GDP Dissociation Inhibitor)

Las proteínas Rho también están reguladas por los RhoGDIs. Estas proteínas actúan a tres niveles como reguladores negativos de las Rho GTPasas:

- Inhiben la disociación del nucleótido GDP de las proteínas Rho.
- Bloquean la actividad GTPasa intrínseca estimulada por las proteínas GAPs.
- Enmascaran el grupo isoprenoide de las GTPasas Rho, extrayendo a las mismas de la membrana y evitando así su activación por RhoGEFs (DerMardirossian y Bokoch, 2005; Garcia-Mata, *et al.*, 2011) (**Figura 8**).

Estos reguladores negativos solo actúan sobre proteínas de la familia Rho y Rab.

4.3 Las GTPasas de la familia Rho en levaduras

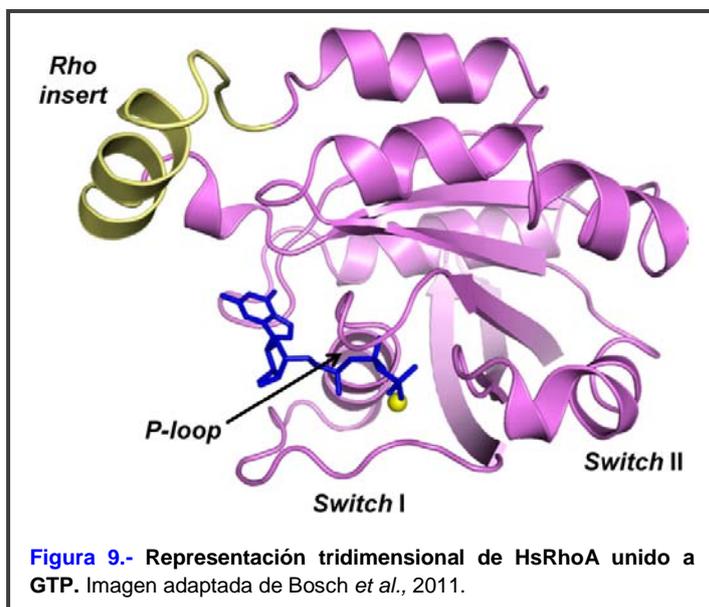
Muchos de los procesos morfogénicos que tienen lugar en el ciclo de vida de *S. pombe* están regulados por las GTPasas de la familia Rho. La publicación del genoma de *S. pombe* desveló la existencia de 6 GTPasas Rho en este organismo, llamadas Rho1 a Rho5 y Cdc42, que muestran entre un 59% y un 91% de similitud entre ellas. Tan solo Rho1 y Cdc42 son esenciales, tal y como ocurre con sus homólogos en *S. cerevisiae*.

4.3.1 Rho1

En eucariotas superiores existen diferentes isoformas de Rho de las que la isoforma RhoA, en células animales, es homóloga de Rho1 en levaduras (O'Connor y Chen, 2013). El estudio de la estructura cristalográfica de la proteína RhoA humana ha permitido definir sus dominios funcionales, ayudando a entender el funcionamiento de las interacciones de RhoA, y en consecuencia de Rho1, con sus múltiples reguladores y efectores (Ihara, *et al.*, 1998).

Los cuatro dominios que caracterizan la estructura tridimensional de RhoA son el dominio *phosphate-binding loop* (*P-loop*), el dominio *switch I*, el dominio *switch II* y el dominio *Rho insert* (*Insert helix*) (Ihara, *et al.*, 1998) (**Figura 9**). Aparte de estos cuatro dominios, existe una región denominada: dominio de localización a membrana. Este dominio, presente en la región C-terminal de la proteína, posee una zona de prenilación,

la caja CAAX, y una región polibásica, que incrementan la lipofilia de estas proteínas, permitiendo una mejor asociación con las membranas de la célula (Bosch, *et al.*, 2011).



El dominio *P-loop* está implicado en la unión del GTP a la proteína junto con parte de los dominios *switch I*, *switch II* y cuatro residuos de reconocimiento de motivos básicos. Cabe destacar que la mayoría de los aminoácidos del *P-loop* que interaccionan con el GTP lo hacen a través de sus cadenas principales, especialmente a través de sus grupos amino (Ihara, *et al.*,

1998). El dominio *switch I* participa en la activación de la GTPasa puesto que está implicado en el mecanismo de acción de los GEFs sobre las proteínas de la familia Rho (Wei, *et al.*, 1997). Además, en este dominio se encuentra la treonina 37, que es esencial para catalizar el cambio de nucleótido en RhoA (Ihara, *et al.*, 1998; Wei, *et al.*, 1997). La región *switch II*, que adopta en general una conformación helicoidal, pudiera estar implicada en la actividad GTPásica de esta proteína (Ihara, *et al.*, 1998; Wei, *et al.*, 1997). Por último, el dominio *Rho insert* diferencia a las GTPasas de la familia Rho del resto de GTPasas de la superfamilia Ras. Consta de 13 aminoácidos que forman una hélice de tres vueltas y se ha propuesto que está implicado en la asociación de RhoA a la membrana (probablemente a través de su cara con carga positiva) y a algunos de sus efectores (Wei, *et al.*, 1997).

Rho1 en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, Rho1 es una proteína esencial que activa a las β -(1,3)-glucán sintasas (Fks1 y Fks2), controla la ruta MAPK de integridad de pared celular mediante la activación de la quinasa Pkc1 (*protein kinase C*) y desempeña un papel importante en la organización del citoesqueleto de actina y la secreción polarizada (Cabib, *et al.*, 1998; Levin, 2005; Levin, 2011). Esta GTPasa se localiza en las áreas de crecimiento polarizado de manera independiente del citoesqueleto de actina (Ayscough, *et al.*, 1999; Perez y Rincon, 2010; Qadota, *et al.*, 1996; Yamochi, *et al.*, 1994).

Rho1 activa es capaz de interactuar con seis proteínas efectoras: los componentes de la β -(1,3)-glucán sintasa, Fks1 y Fks2; la quinasa Pkc1; la formina Bni1; el factor de transcripción Skn7; y la subunidad Sec3 del exocisto. Todas estas proteínas participan en la biosíntesis de la pared celular, en la polarización del citoesqueleto de actina y en la exocitosis (Bi y Park, 2012; Levin, 2005; Perez y Rincon, 2010).

La GTPasa Rho1 es activada por los GEFs Rom1, Rom2 y Tus1 (Bi y Park, 2012; Ozaki, *et al.*, 1996; Schmelzle, *et al.*, 2002). Rom1 y Rom2 tienen funciones redundantes en la regulación de Rho1 y regulan también a la GTPasa Rho2. La cepa carente de ambos GEFs es letal (Schmelzle, *et al.*, 2002). Tus1 es necesaria para la ruta de integridad de la pared celular y su fosforilación por la ciclina2-Cdc28 es requerida para una activación eficiente de Rho1 en el paso de fase G1 a fase S (Kono, *et al.*, 2008; Perez y Rincon, 2010; Schmelzle, *et al.*, 2002). Tus1 y Rom2 están implicadas, además, en la localización y activación de Rho1 necesarias para la citoquinesis. La regulación de ambas proteínas GEF se ejerce mediante su fosforilación por la quinasa Cdc5/Polo (Yoshida, *et al.*, 2009; Yoshida, *et al.*, 2006).

Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1 son las proteínas con actividad GAP descritas para la GTPasa Rho1 en *S. cerevisiae* (Bi y Park, 2012; Cid, *et al.*, 1998). Bem2 y Sac7 son las encargadas de regular negativamente a la ruta de integridad celular MAPK, a través de Rho1 (Martin, *et al.*, 2000; Schmidt y Hall, 2002). Sac7 y Bag7 presentan funciones redundantes sobre la regulación de Rho1 en la organización de actina (Schmidt y Hall, 2002). Por último, Lrg1 es la proteína encargada de regular negativamente a Rho1 en la biosíntesis del β -(1,3)-glucano (Watanabe, *et al.*, 2001). Esta GAP está implicada en procesos de fusión celular durante la conjugación y en la separación de la célula madre y la célula hija (Fitch, *et al.*, 2004; Svarovsky y Palecek, 2005).

Además de GEFs y GAPs, existe un RhoGDI denominado Rdi1 (Bi y Park, 2012; Masuda, *et al.*, 1994). Esta proteína se asocia a Rho1, Cdc42 y Rho4 de *S. cerevisiae*. Rdi1 extrae a Rho1 y a Cdc42 de las membranas y forma complejos solubles con estas proteínas en el citoplasma (Tiedje, *et al.*, 2008). Por otro lado, la regulación que Rdi1 ejerce sobre Rho4 es distinta puesto que extrae a esta GTPasa de la membrana para degradarla por las vías del proteosoma y proteasas vacuolares (Tiedje, *et al.*, 2008).

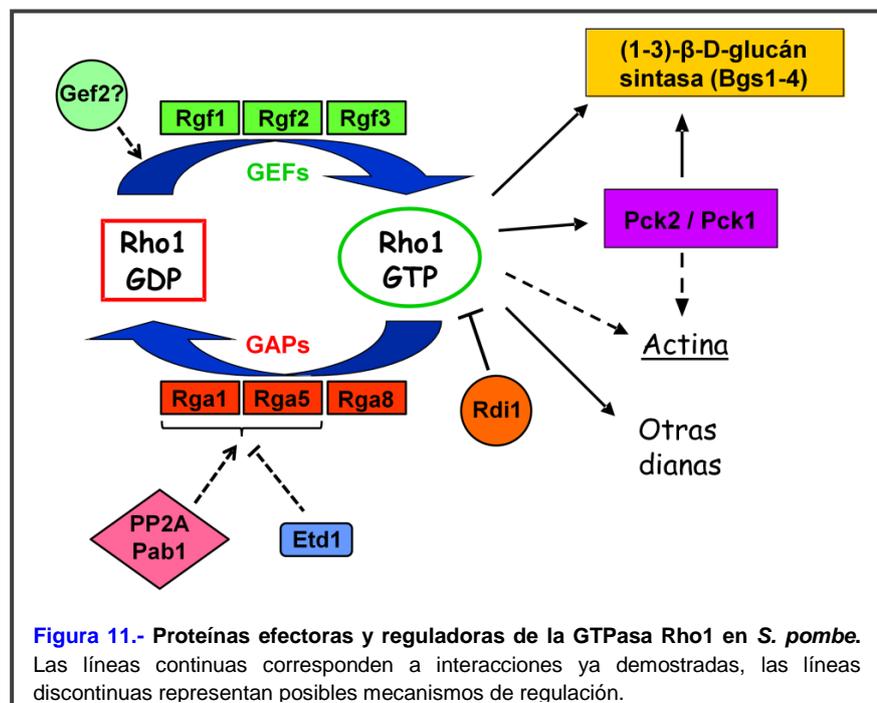
proteína denominada Pxl1, que tiene un papel en la formación y contracción del anillo de actomiosina y es capaz de modular la actividad de Rho1 (Pinar, *et al.*, 2008).

En *S. pombe* Rho1 está también implicado en el control de otros procesos morfológicos ya que su sobreexpresión produce una pérdida completa de la polaridad de la actina (Arellano, *et al.*, 1997). La sobreexpresión del alelo *rho1-G15V*, que codifica para una proteína constitutivamente activa, causa la aparición de acúmulos de actina mientras que la eliminación de la expresión de *rho1⁺* hace que se desorganice la misma, indicando que esta GTPasa es necesaria para la polimerización de actina y, por tanto, debe actuar a través de otras proteínas efectoras además de la β -(1,3)-glucán sintasa (Arellano, *et al.*, 1997).

Se han descrito otras dos proteínas dianas de Rho1 en *S. pombe*, Pck1 y Pck2, homólogas a Pck1 de *S. cerevisiae* (Figura 11). La delección de cualquiera de los genes *pck1⁺* o *pck2⁺* no es letal, pero sí lo es la doble delección. Esto indica que comparten una función esencial (Toda, *et al.*, 1993). Rho1 en su forma activa (unido a GTP), al igual que la GTPasa Rho2, es capaz de interactuar con estas quinasas incrementando la estabilidad de las mismas (Arellano, *et al.*, 1999b; Villar-Tajadura, *et al.*, 2008) e inducir indirectamente la síntesis de pared celular a través de ellas. La disminución de la expresión de Pck1 o de Pck2 en ausencia de la otra provoca una reducción del 40-50% de la actividad β -(1,3)-glucan sintasa (Arellano, *et al.*, 1999b). Pck2 es, además, el principal activador de

la ruta MAPK de integridad celular por debajo de Rho2 (Ma, *et al.*, 2006), mientras que Pck1 pudiera realizar un efecto de activación de la ruta solo a través de Rho1, de una manera mucho más débil (Sanchez-Mir, *et al.*, 2014).

Se han identificado tres



proteínas GEF de Rho1, denominadas Rgf1, Rgf2 y Rgf3 (Cruz, *et al.*, 2013; Garcia, *et*

al., 2009a; Garcia, *et al.*, 2006; Garcia, *et al.*, 2009b; Morrell-Falvey, *et al.*, 2005; Mutoh, *et al.*, 2005; Perez y Rincon, 2010; Tajadura, *et al.*, 2004) (**Figura 11**). Rgf1 es el principal GEF de Rho1, implicado en activar a esta proteína en el complejo β -(1,3)-glucán sintasa necesario en la biosíntesis de la pared celular. Rgf1 también es requerido para la reorganización de la actina en las células, durante el cambio de crecimiento monopolar a crecimiento bipolar en NETO (Garcia, *et al.*, 2006). Además, esta proteína GEF actúa por encima del módulo de MAPKs en la ruta de integridad celular (Cruz, *et al.*, 2013; Garcia, *et al.*, 2009b) y se ha demostrado recientemente que se acumula en el núcleo de forma dependiente del *checkpoint* de replicación de ADN y es importante para la tolerancia al estrés replicativo (Munoz, *et al.*, 2014).

La proteína Rgf2 realiza una función esencial durante el proceso de esporulación y coopera con Rgf1 en el crecimiento polarizado y en la regulación de la biosíntesis de la pared durante el crecimiento vegetativo (Cruz, *et al.*, 2013; Garcia, *et al.*, 2009a).

Rgf3 es esencial para la integridad celular y específicamente regula la síntesis de β -(1,3)-glucano del septo de división, a través de Rho1 (Cruz, *et al.*, 2013; Morrell-Falvey, *et al.*, 2005; Tajadura, *et al.*, 2004).

Existe otra proteína RhoGEF, Gef2, que se localiza en los nodos corticales y coordina junto a la Polo quinasa Plo1 la selección del sitio de división (Guzman-Vendrell, *et al.*, 2013; Moseley, *et al.*, 2009; Ye, *et al.*, 2012; Zhu, *et al.*, 2013). Se ha propuesto que podría interactuar con las GTPasas Rho4 y Rho5 (Zhu, *et al.*, 2013) y en nuestro laboratorio hemos visto que podría ser GEF de Rho1 (datos no publicados). Recientemente, también se ha descrito que Etd1, elemento clave de la cascada SIN (*Septation Initiation Network*) (Daga, *et al.*, 2005), y la fosfatasa PP2A-Pab1 funcionan regulando a Rho1 de forma positiva y negativa, respectivamente, para, mantener la integridad celular, controlar la septación y la síntesis de pared celular durante el crecimiento vegetativo (Alcaide-Gavilan, *et al.*, 2014) (**Figura 11**).

En *S. cerevisiae*, las proteínas transmembrana de la familia WSC (Slg1/Wsc1, Wsc2 y Wsc3) y la pareja Mid2-Mtl1 (Jendretzki, *et al.*, 2011; Rodicio y Heinisch, 2010), actúan como mecanosensores activando a Rho1 frente a diferentes estímulos (Green, *et al.*, 2003; Philip y Levin, 2001; Vay, *et al.*, 2004). Sin embargo, en *S. pombe*, los mecanismos de señalización desde la superficie celular a las GTPasas Rho son poco conocidos. Recientemente se ha descrito que las proteínas homólogas a Wsc1 y Mid2 en *S. pombe* (Wsc1 y Mtl2) son necesarias para el mantenimiento de los niveles activos de Rho1 bajo estrés crónico de pared celular (Cruz, *et al.*, 2013).

Hasta el momento se han identificado tres GAPs de Rho1, Rga1, Rga5 y Rga8 (Calonge, *et al.*, 2003; Nakano, *et al.*, 2001; Yang, *et al.*, 2003) y una proteína GDI, Rdi1, la única descrita en *S. pombe*, que también se une a Rho4 y Cdc42, aunque se desconoce el proceso celular en el que participa (Nakano, *et al.*, 2003) (**Figura 11**).

Rga1 tiene un papel importante en el crecimiento celular y la morfogénesis, ya que las células carentes de esta proteína son aberrantes, los parches de actina están deslocalizados y la pared celular presenta un extraordinario engrosamiento. Además cuando se sobreexpresa *rga1*⁺ se inhibe el crecimiento y las células tienen muchos defectos morfológicos. Esta proteína co-localiza con Rho1 en las áreas de crecimiento activo y septo (Nakano, *et al.*, 2001).

Rga5 es una reguladora negativa específica de Rho1 en funciones de integridad celular y en la citoquinesis. Es una proteína asociada a la membrana que se localiza en las zonas de crecimiento activo y en el septo. Regula negativamente la actividad β -(1,3)-glucán sintasa y la interacción de la GTPasa Rho1 con Pck1 (Calonge, *et al.*, 2003).

Rga8 tiene actividad GAP *in vivo* frente a Rho1 pero su papel regulador de esta GTPasa es una incógnita. No obstante, se ha demostrado que Rga8 está regulada por Shk1, quinasa efectora de Cdc42, por lo que esta GAP podría participar en la comunicación entre las dos GTPasas de la familia Rho esenciales en *S. pombe*, Rho1 y Cdc42 (Yang, *et al.*, 2003).

4.3.2 Rho2

En *S. pombe* el gen *rho2*⁺ fue identificado en un *screening* de genes cuya sobreexpresión causaba morfología aberrante. La sobreexpresión de *rho2*⁺ es letal, causa alteraciones morfológicas, despolarización de actina y un incremento en la biosíntesis del α -glucano (Calonge, *et al.*, 2000; Hirata, *et al.*, 1998). Rho2 es una proteína asociada a la membrana y se concentra en las áreas de crecimiento activo y en el septo (Hirata, *et al.*, 1998). Esta GTPasa en estado activo interacciona con Pck1 y con Pck2 (Arellano, *et al.*, 1999b). Sin embargo, solo Pck2 se ha descrito como proteína transmisora de la señal de Rho2 ya que todos los efectos causados por la sobreexpresión de *rho2*⁺ se suprimen en ausencia de Pck2 (Calonge, *et al.*, 2000). La delección de *rho2*⁺ no es letal, pero presenta defectos en la integridad de la pared celular (Hirata, *et al.*, 1998). Las células carentes de *rho2*⁺ tienen defectos similares a los descritos en la cepa *pck2* Δ , una pared ~~án~~ delgada que las células silvestres y mayor sensibilidad al

tratamiento con β -glucanasas y con compuestos inhibidores de la síntesis de pared (aculeacina A y papulacandina B) (Calonge, *et al.*, 2000).

Rho2 está involucrada en la regulación de Mok1 (Ags1), la posible α -glucán sintasa, a través de la quinasa Pck2. *rho2* Δ y *pck2* Δ son sintéticos letales con la cepa mutante hipoactiva *mok1-664* y ambas proteínas son necesarias para localizar a la posible α -glucán sintasa en las áreas de crecimiento activo (Calonge, *et al.*, 2000). Se ha propuesto que aunque las funciones en la integridad de pared celular de Rho1 y Rho2 son diferentes, debe existir un solapamiento parcial ya que, si bien la sobreexpresión de *rho2*⁺ no rescata la letalidad de la delección de *rho1*⁺, la sobreexpresión de *rho1*⁺ rescata parcialmente la sensibilidad de la cepa *rho2* Δ a la aculeacina A (Hirata, *et al.*, 1998).

Además de su papel en la biosíntesis de pared, Rho2, también a través de Pck2, activa la ruta MAPK de integridad celular formada por el módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 (Cruz, *et al.*, 2013; Loewith, *et al.*, 2000; Ma, *et al.*, 2006; Sengar, *et al.*, 1997; Sugiura, *et al.*, 1999; Toda, *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). La sobreexpresión de *rho2*⁺ deja de ser letal cuando se elimina Mkh1, Pek1 o Pmk1 de la célula, al igual que ocurre con la sobreexpresión de *pck2*⁺, lo cual sitúa a Rho2 y Pck2 por encima del módulo de MAPKs en la ruta de integridad celular. Además, la sobreexpresión de *rho2*⁺ o *pck2*⁺ incrementa en gran medida los niveles de fosforilación de Pmk1 (Ma, *et al.*, 2006). Pck2 interacciona físicamente con Mkh1, indicando que esta quinasa puede activar directamente a la MAPKKK y así transmitir la señal (Barba, *et al.*, 2008).

Aún no se ha descrito ninguna proteína GEF para Rho2. Sin embargo, se conocen al menos tres proteínas GAP para esta GTPasa: Rga2, Rga4 y Rga7 (Soto, *et al.*, 2010; Villar-Tajadura, *et al.*, 2008).

4.3.3 Rho3

La GTPasa Rho3 no es esencial a temperatura ambiente, pero a 37°C las células de *S. pombe* carentes de Rho3 mueren presentando los parches de actina deslocalizados, morfología aberrante y, en algunos casos, células multitabicadas. Rho3 se localiza en la membrana y está concentrada en las regiones de crecimiento y de división (Nakano, *et al.*, 2002).

Rho3 se aisló como supresor multicopia de la estirpe mutante termosensible del exocisto *sec8-1* (Wang, *et al.*, 2003) y existe interacción genética de *rho3* Δ con las cepas mutantes *sec8-1* y *exo70* Δ . Además, la cepa *rho3* Δ acumula vesículas a 37°C y muestra

una secreción de fosfatasa ácida reducida (Wang, *et al.*, 2003). Por ello, se ha propuesto que Rho3 es un modulador de la función del exocisto. Se ha descrito que las versiones constitutivamente activas de Rho3 y de Cdc42 se unen a la formina For3 (Nakano, *et al.*, 2002) aunque, hasta ahora, no se ha demostrado que Rho3 participe en su activación. Además, se ha sugerido que Rho3 podría regular a la miosina de tipo V, Myo52 (Nakano, *et al.*, 2002). También se ha descrito que Rho3 participa en la regulación del tráfico del aparato de Golgi a endosomas, donde esta GTPasa coordinaría el tráfico de membranas interaccionando con la clatrina del complejo adaptador AP-1 (Kita, *et al.*, 2011).

4.3.4 Rho4

Rho4 es la única GTPasa de la familia Rho en *S. pombe* que se localiza exclusivamente en la región de división. Su delección produce defectos de separación celular a alta temperatura (Nakano, *et al.*, 2003; Santos, *et al.*, 2003). Se ha sugerido que Rho4 actúa sobre el citoesqueleto de actina y de microtúbulos ya que la falta de ésta produce una deslocalización parcial de los parches de actina y la incorrecta polarización de los haces de microtúbulos (Nakano, *et al.*, 2003). La sobreexpresión de Rho4 causa lisis, probablemente debido a defectos en la pared ya que la lisis es suprimida por la presencia de un estabilizador osmótico. En este sentido, cabe destacar la función antagónica de Rho4 y Rho1 en la biogénesis de la pared celular. Rho1 activa a las enzimas biosintéticas y Rho4 regula la secreción y localización de las enzimas que participan en la degradación de la pared, Agn1 y Eng1 (Santos, *et al.*, 2005), aunque su relación con el complejo del exocisto está por establecer.

Recientemente se ha descrito que Gef2 actúa a través de Rho4 regulando la citoquinesis tardía y que, junto con Nod1, esta proteína está implicada en la localización de Rho4 en la región de división (Zhu, *et al.*, 2013). También se ha sugerido que la GAP Rga7 podría estar regulando a Rho4 durante la citoquinesis (Perez y Rincon, 2010).

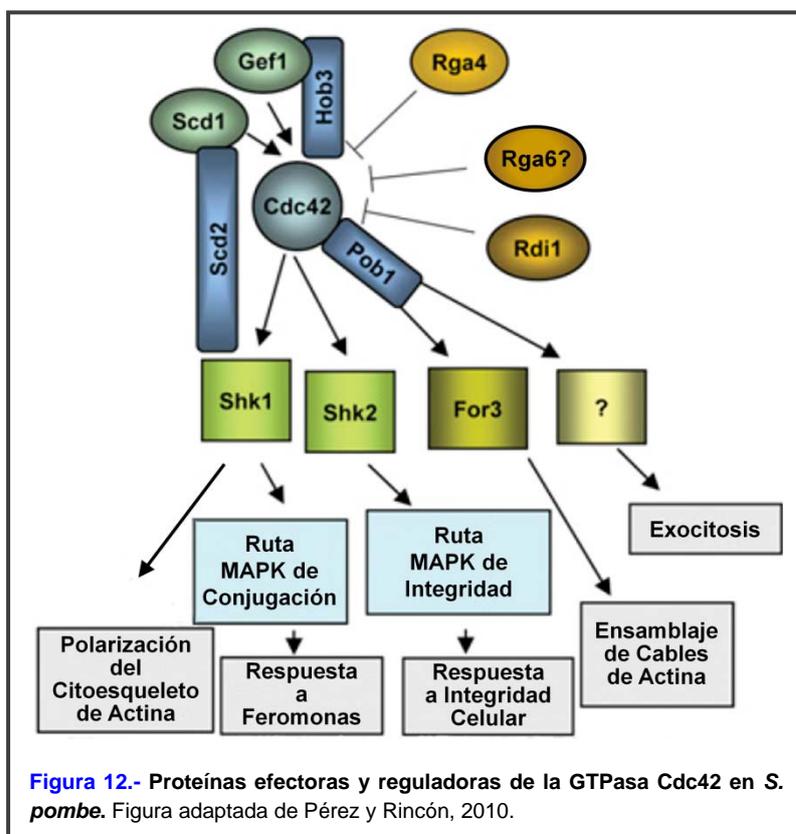
4.3.5 Rho5

En *S. pombe* Rho5 es una proteína muy similar a Rho1 (86% de identidad). Esta GTPasa no es esencial pero su sobreexpresión rescata la letalidad de la delección de Rho1. Esto indica que Rho5 puede realizar las funciones de Rho1 aunque de forma menos eficiente (Nakano, *et al.*, 2005; Rincon, *et al.*, 2006). Se ha demostrado que Rho5 se expresa en fase estacionaria, en condiciones de falta de nutrientes y en los procesos

de conjugación celular (Rincon, *et al.*, 2006). De hecho, la expresión de alelos de Rho5 constitutivamente activos o inactivos, produce esporas con morfología aberrante y con poca o ninguna viabilidad, lo que implica a Rho5 en el proceso de esporulación (Rincon, *et al.*, 2006). Aunque no se ha descrito ningún regulador específico para esta GTPasa, recientemente se ha demostrado que Gef2 interacciona con Rho5, pudiendo estar implicada en su regulación (Zhu, *et al.*, 2013).

4.3.6 Cdc42

La GTPasa Cdc42 es esencial, participa en el control del crecimiento celular polarizado y en el proceso de morfogénesis en *S. pombe* (Miller y Johnson, 1994). Cdc42 se localiza en las membranas internas y en la membrana plasmática, estando más concentrada en los polos de crecimiento y en el septo (Merla y Johnson, 2000). Cdc42 interacciona en su forma activa con las quinasas Shk1 (Marcus, *et al.*, 1995; Otilie, *et al.*, 1995) y Shk2 (Sells, *et al.*, 1998; Yang, *et al.*, 1998), con la formina For3 (Martin, *et al.*, 2007; Nakano, *et al.*, 2002) y con Pob1 (Rincon, *et al.*, 2009) (**Figura 12**).



Shk1 es una quinasa esencial de la familia PAK necesaria para el crecimiento polarizado, el control del ciclo celular y la citoquinesis (Kim, *et al.*, 2003; Marcus, *et al.*, 1995; Otilie, *et al.*, 1995; Verde, *et al.*, 1995). Shk2 no es esencial y sus funciones son parcialmente redundantes con las de Shk1 (Sells, *et al.*, 1998; Yang, *et al.*, 1998). Se ha descrito como función específica de Shk2 la activación de la ruta

MAPK de integridad celular (Merla y Johnson, 2001). Sin embargo, en estudios posteriores se observó que la activación de Pmk1 en respuesta a diferentes tipos de estrés es independiente de Shk2 (Madrid, *et al.*, 2006).

Cdc42 juega un papel esencial en la regulación del crecimiento polarizado a través del ensamblaje de cables de actina, ya que es necesaria para activar y localizar a la formina For3 (Feierbach y Chang, 2001; Nakano, *et al.*, 2003; Sawin, 2002) (Martin, *et al.*, 2007) (Kokkoris, *et al.*, 2014), y a través de la localización del complejo del exocisto (Bendezu y Martin, 2011; Estravis, *et al.*, 2011; Rincon, *et al.*, 2014). La interacción de Cdc42 activa con For3 es facilitada por la proteína Pob1 (Martin, *et al.*, 2007; Rincon, *et al.*, 2009). Pob1 es esencial y está implicada en el crecimiento polarizado y en la septación (Toya, *et al.*, 1999). Esta proteína además de servir como proteína de andamiaje para Cdc42 y For3 está implicada en la localización del exocisto dependiente de Cdc42 (Estravis, *et al.*, 2011; Nakano, *et al.*, 2011), por lo que el complejo Cdc42-Pob1 podría regular dos rutas paralelas, necesarias para un correcto crecimiento polarizado (Bendezu y Martin, 2011) (Rincon, *et al.*, 2014). Cdc42 podría, además, participar en el tráfico endosoma-vacuola, en la integridad vacuolar así como contribuir en la fusión de las vesículas a la membrana plasmática (Estravis, *et al.*, 2012; Estravis, *et al.*, 2011; Rincon, *et al.*, 2014).

La GTPasa Cdc42 en *S. pombe* está regulada por dos GEFs, Ral1/Scd1 y Gef1, y una GAP, Rga4 (Coll, *et al.*, 2003; Chang, *et al.*, 1994; Das, *et al.*, 2007; Fukui y Yamamoto, 1988; Hirota, *et al.*, 2003; Rincon, *et al.*, 2014; Tatebe, *et al.*, 2008) (**Figura 12**). Scd1 está implicada en la regulación del crecimiento apical y es necesaria para la respuesta sexual, pues *scd1* Δ es incapaz de conjugarse (Chang, *et al.*, 1994) y tiene defectos en endocitosis (Murray y Johnson, 2001). Scd1 pone en contacto a las GTPasas Ras1 y Cdc42, formando un complejo macromolecular que incluye, además, a la proteína adaptadora Scd2 y a la quinasa de la familia PAK Shk1, para regular la morfología celular y el proceso de conjugación mediante el control de la ruta MAPK de respuesta a feromonas (Chang, *et al.*, 1999; Chang, *et al.*, 1994; Fukui y Yamamoto, 1988; Tu, *et al.*, 1997). Gef1 participa en el proceso de citoquinesis y en la transición de crecimiento monopolar a bipolar. Se localiza fundamentalmente en la región de división aunque también puede detectarse en los polos de crecimiento (Coll, *et al.*, 2003). Rga4 es la única proteína descrita con actividad GAP sobre Cdc42 y participa en el control del diámetro celular (Das, *et al.*, 2007; Tatebe, *et al.*, 2008). Rga4 se localiza en la membrana lateral de la célula, excluida de las zonas de crecimiento.

Las proteínas reguladoras de la GTPasa Cdc42: Scd1, Scd2 y Rga4 participan en el control espacial de la activación de Cdc42 determinando la superficie de crecimiento polarizado. Se ha propuesto un modelo de fluctuación de la actividad de Cdc42 entre los polos de *S. pombe*, que permitiría alcanzar de una forma más rápida y eficaz el crecimiento bipolar (Das, *et al.*, 2012; Rincon, *et al.*, 2014). También se ha propuesto recientemente que la fosfatasa Dis2 unida a Tea4 regula el crecimiento localizado promoviendo la localización de Gef1 y la exclusión de Rga4 de las zonas de crecimiento (Kokkoris, *et al.*, 2014). En nuestro laboratorio hemos identificado a la proteína Rga6 como otro GAP de Cdc42 que se localiza en las zonas de no-crecimiento celular y, junto con Rga4, regula el mantenimiento del diámetro y el crecimiento polarizado en *S. pombe* (Rincon, *et al.*, 2014) (**Figura 12**).

5. LAS RUTAS DE MAPKs

Todos los organismos han desarrollado una respuesta de supervivencia rápida, cuando están expuestos a condiciones medioambientales adversas (Estruch, 2000; Hohmann, 2002). Las células presentan sensores que detectan cambios moleculares y un mecanismo de transmisión de la señal, que produce una respuesta específica frente a estas condiciones, tales como inhibición de la traducción, cambios en la expresión génica, bloqueo del ciclo celular, etc. Todo ello garantiza la supervivencia en las nuevas condiciones de crecimiento (Perez y Cansado, 2010).

Numerosos estudios han destacado la importancia de las rutas de señalización mediadas por las proteínas quinasas activadas por mitógenos, MAPKs, en la respuesta de las células eucariotas frente a distintos estímulos ambientales y situaciones de estrés. Tales rutas, que se encuentran altamente conservadas a lo largo de la evolución, presentan una organización básica que abarca: 1) Mecanismos sensores para la detección de la señal, que serán distintos dependiendo del estímulo, como receptores transmembranales acoplados a proteínas G, sistemas de regulación de dos componentes, proteínas integrales de membrana, etc.; 2) un módulo de transmisión que incluye tres quinasas altamente conservadas: la MAP quinasa quinasa quinasa (MAPKKK), la MAP quinasa quinasa (MAPKK) y la MAP quinasa (MAPK), que procederán a transmitir la señal por fosforilación secuencial (Bardwell, 2006; Qi y Elion, 2005); 3) proteínas fosforiladas por la MAPK, principalmente factores de transcripción, así como proteínas reguladoras del ciclo celular, proteínas de unión al ARN (Dean, *et al.*, 2004) y una amplia variedad de sustratos citoplasmáticos (Perez y Cansado, 2010).

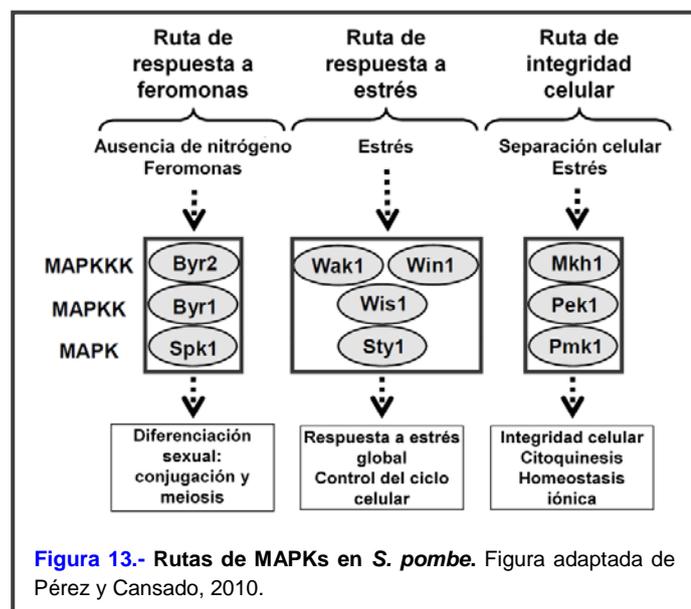
En respuesta a distintos estímulos, la MAPKKK es activada por otras quinasas o por GTPasas de la familia Ras o Rho. Esta MAPKKK activada se encargará de fosforilar en residuos de serina o treonina a la MAPKK. La MAPKK, también llamada MEK, es una quinasa de especificidad dual que reconoce y fosforila los residuos de treonina y tirosina en la secuencia T-X-Y (X=prolina, ácido glutámico o glicina) del motivo de activación de la MAPK, que es el último componente del módulo. Una vez activada, la MAPK puede fosforilar las proteínas efectoras (Perez y Cansado, 2010).

Cuando las células se adaptan a las nuevas condiciones ambientales, las cascadas de MAPKs deben ser desactivadas por reguladores negativos, que modulan la duración e intensidad de la señal transmitida (Karin y Hunter, 1995). Entre estos inhibidores se encuentran las fosfatasas de MAPKs, que controlan el nivel de activación, adaptación y recuperación de cada ruta, y que se agrupan en fosfatasas de especificidad dual, fosfatasas de tirosina y fosfatasas de treonina/serina (Karin y Hunter, 1995).

En las células de mamíferos existen varias rutas MAPKs con distintas funciones y se agrupan en tres familias: ERK, p38 y JNK. Los grupos ERK y p38 presentan homólogos en levaduras y tienen los motivos de fosforilación dual Thr-Glu-Tyr y Thr-Gly-Tyr, respectivamente. Mientras que el grupo JNK, solamente ha sido descrito en mamíferos y se fosforilan en el motivo Thr-Pro-Tyr (Davis, 2000). Las rutas ERK1 y ERK2 están principalmente implicadas en la proliferación y diferenciación celular, mientras que las rutas JNK y p38 participan en la respuesta a estrés y por ello son llamadas también SAPKs (*Stress Activated Protein Kinases*) (Kyriakis y Avruch, 2001; Perez y Cansado, 2010).

En *S. cerevisiae* se han caracterizado cinco rutas de MAPKs. Cuatro de ellas están presentes en células vegetativas: Fus3, Kss1, Hog1 y Slt2/Mpk1, que regulan la respuesta a feromonas y conjugación, la filamentación e

invasividad, crecimiento en condiciones de osmolaridad elevada y la integridad celular, respectivamente. La quinta ruta de MAPKs, Smk1, está implicada en la regulación de la síntesis de la pared de las ascosporas (Krisak, *et al.*, 1994).



Sin embargo, *S. pombe* sólo tiene tres rutas de MAPKs: la ruta de respuesta a feromonas, que presenta a Spk1 como elemento central (Shiozaki y Russell, 1995); la ruta de respuesta a estrés con Sty1/Spc1 como MAPK (Toda, *et al.*, 1991); y la ruta de integridad celular con Pmk1/Spm1 como núcleo central (Loewith, *et al.*, 2000; Sengar, *et al.*, 1997; Sugiura, *et al.*, 1999; Toda, *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997) (**Figura 13**). Mientras que las rutas de estrés de *S. pombe* y HOG de *S. cerevisiae* son homólogas a las rutas de estrés JNK y p38 de mamíferos, la ruta de integridad celular de *S. pombe* presenta un alto grado de conservación con las quinasas ERK1/2 de mamíferos y la ruta Slit2/Mpk1 de *S. cerevisiae*.

5.1 La ruta de MAPK de respuesta a feromonas en *S. pombe*

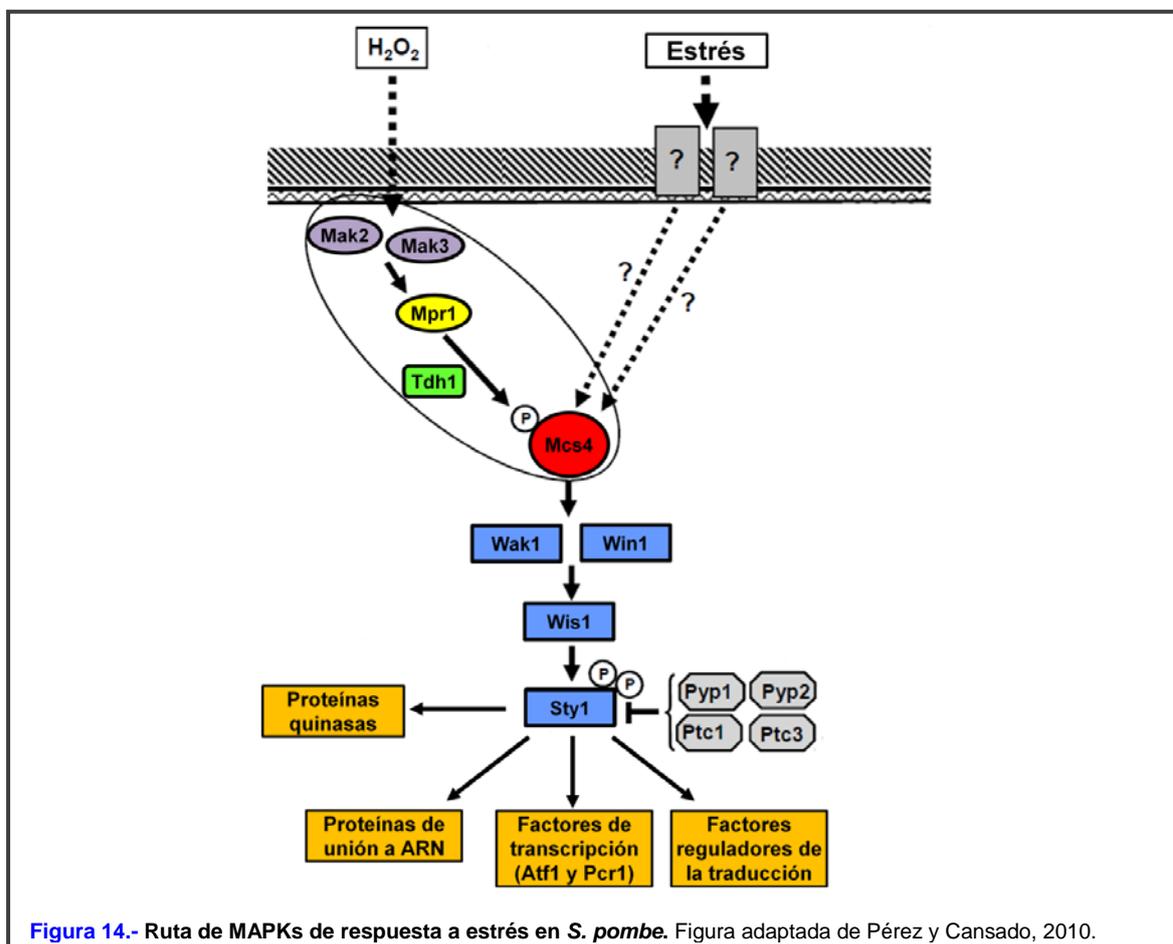
Las células de *S. pombe* en ausencia de nutrientes, pueden llevar a cabo la reproducción sexual. Para ello se tiene que dar inicialmente la diferenciación sexual, lo que implica la regulación de manera ordenada de muchos genes.

En condiciones de ausencia de nitrógeno, Ste11, factor de transcripción que regula un gran número de genes necesarios para la conjugación y la meiosis (Mata y Bahler, 2006; Sugimoto, *et al.*, 1991), activa la transcripción de *mat1-Pc* en las células h^+ y de *mat1-Mc* en las células h^- . Los productos de estos genes inducen la expresión de los genes específicos de cada tipo sexual (Davey, 1992; Imai y Yamamoto, 1994; Kitamura y Shimoda, 1991; Kjaerulff, *et al.*, 1994; Tanaka, *et al.*, 1993). De este modo, en las células h^+ se secreta el factor P y en las células h^- se secreta el factor M (Davey, 1992; Imai y Yamamoto, 1994). Tras la unión de las feromonas, el correspondiente receptor de cada tipo sexual se acopla a Gpa1, subunidad $G\alpha$ de una proteína G trimérica, y la activa. Gpa1, a su vez, activa la cascada de MAPKs que comprende Byr2 (MAPKKK), Byr1 (MAPKK) y Spk1 (MAPK) (Gotoh, *et al.*, 1993; Nadin-Davis y Nasim, 1988; Neiman, *et al.*, 1993; Wang, *et al.*, 1991). En respuesta a las feromonas, la cascada Byr2-Byr1-Spk1 aumenta la expresión de *ste11^+* y de genes adicionales necesarios para la conjugación y la meiosis (Aono, *et al.*, 1994; Kjaerulff, *et al.*, 2005; Ozoe, *et al.*, 2002; Xue-Franzen, *et al.*, 2006).

5.2 La ruta de MAPKs de respuesta a estrés en *S. pombe*

La ruta MAPK de respuesta a estrés realiza una función crítica en el control de la respuesta celular al estrés en *S. pombe*. Las cepas mutantes carentes de algunos de sus principales componentes muestran ciertos fenotipos, como pueden ser una morfología celular alargada a causa de un defecto en la transición de fase G2 a M, una baja viabilidad celular en fase estacionaria, sensibilidad a estrés causado por metales pesados, al choque térmico y al frío entre otros agentes. Además presentan defectos en la iniciación de la meiosis tras la privación de nitrógeno, y no reinician de forma apropiada el ciclo celular después de un estrés (Millar, *et al.*, 1995; Perez y Cansado, 2010; Shiozaki y Russell, 1995b; Shiozaki y Russell, 1996; Soto, *et al.*, 2002; Warbrick y Fantes, 1991; Wilkinson, *et al.*, 1996).

El módulo de MAPKs de la ruta de respuesta a estrés posee dos MAPKKK: Wak1/Wis4/Wik1 (Samejima, *et al.*, 1997; Shieh, *et al.*, 1997; Shiozaki, *et al.*, 1997) y Win1 poseyendo entre ellas un 60% de identidad (Samejima, *et al.*, 1998; Shiozaki y Russell, 1997). Los sensores y moduladores de la ruta son capaces de activar ambas quinasas, las cuales serán capaces de fosforilar y activar a la MAPKK Wis1 (Samejima, *et al.*, 1997; Shieh, *et al.*, 1997) (**Figura 14**). Esta proteína es esencial para la viabilidad



celular en múltiples condiciones adversas. Se fosforila de manera dual en los residuos Ser469 y Thr473 presentes en el extremo C-terminal, por cualquiera de las dos MAPKKK (Samejima, *et al.*, 1997; Samejima, *et al.*, 1998; Shieh, *et al.*, 1997). Wis1 se encargará de activar a la MAPK Sty1, en casi todos los estímulos ambientales capaces de inducir la ruta de respuesta al estrés, por medio de las proteínas Wak1 y Win1 (Shiozaki, *et al.*, 1998).

La MAPK Sty1/Spc1/Phh1 (Kato, *et al.*, 1996; Millar, *et al.*, 1995; Shiozaki y Russell, 1995b) es un miembro de la familia de MAPKs activadas por estrés, que incluye también a Hog1 de *S. cerevisiae* y a las quinasas de células eucariotas superiores p38 y JNK. *S. pombe* integra la respuesta frente a múltiples condiciones de estrés por medio de la activación de Sty1, un rasgo que comparte con células eucariotas superiores, que activan a p38 y JNK en condiciones similares (Tibbles y Woodgett, 1999) (**Figura 14**). En condiciones basales Sty1 se localiza principalmente en el citoplasma, pero una vez fosforilada y unida a Wis1, como respuesta a un estrés, es transportada al núcleo, donde interacciona con sus diferentes proteínas diana (Gaits, *et al.*, 1998; Perez y Cansado, 2010).

Se conoce muy poco sobre la detección específica de los diferentes tipos de estrés y cómo se transmiten hacia la cascada de MAPKs. En el caso del estrés oxidativo inducido por H₂O₂ la señal es captada por dos histidina quinasas sensoras, Mak2 y Mak3, que junto con la fosfotransferasa Mpr1/Spy1 activan a la proteína reguladora de la respuesta, Mcs4, encargada de iniciar la cascada MAPK (Aoyama, *et al.*, 2001; Aoyama, *et al.*, 2000; Nguyen, *et al.*, 2000; Quinn, *et al.*, 2002; Shieh, *et al.*, 1997; Shiozaki, *et al.*, 1997) (**Figura 14**). También se ha observado que la enzima glicolítica gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Tdh1) tiene una función esencial en este mecanismo sensor (Morigasaki, *et al.*, 2008; Perez y Cansado, 2010).

Existen diversas proteínas transmisoras de la señal de Sty1, como son los factores de transcripción Pcr1 y Atf1 (**Figura 14**). Estos dos factores forman heterodímeros e inducen la expresión de genes cuyos productos se encuentran implicados en la respuesta adaptativa de *S. pombe* frente a diferentes tipos de estrés y en la regulación de la entrada en meiosis (Paredes, *et al.*, 2004; Paredes, *et al.*, 2003; Shiozaki y Russell, 1996; Wilkinson, *et al.*, 1996). Algunos de los genes regulados son: *pyp2*⁺ (fosfatasa de tirosina), *ste11*⁺ y el propio *atf1*⁺.

Otras dianas de Sty1 son las proteínas de unión a ARN Csx1, Cip1 y Cip2 (Martin, *et al.*, 2006; Rodriguez-Gabriel, *et al.*, 2003), las proteínas quinasas Cmk2, Srk1 y Plo1 (Lopez-Aviles, *et al.*, 2008; Petersen y Hagan, 2005; Sanchez-Piris, *et al.*, 2002; Smith, *et*

al., 2002) y factores reguladores de la traducción como eIF2 y eIF3a (Asp, *et al.*, 2008; Perez y Cansado, 2010) (**Figura 14**).

La regulación negativa de la ruta de respuesta a estrés es realizada por las fosfatasas de las MAPKs que, gracias a su capacidad para desfosforilar residuos de treonina, de tirosina o de ambos aminoácidos, inactivan a estas proteínas. En *S. pombe* las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2, así como las fosfatasas de serina/treonina Ptc1 y Ptc3 se encargan de inhibir a la MAPK Sty1 (Perez y Cansado, 2010) (**Figura 14**). Pyp1 es la principal fosfatasa de Sty1 en condiciones basales (Degols, *et al.*, 1996; Samejima, *et al.*, 1997) y, junto con Pyp2, se localiza en el citoplasma tanto en condiciones normales como de estrés (Gaits y Russell, 1999). Pyp1 y Pyp2 desfosforilan a Sty1 en la tirosina 173 (Degols, *et al.*, 1996; Millar, *et al.*, 1995) mientras que Ptc1 y Ptc3 desfosforilan el residuo de treonina 171 de esta MAPK (Nguyen y Shiozaki, 1999) La expresión basal del gen *pyp1*⁺ así como la inducción por estrés de *pyp1*⁺, *pyp2*⁺ y *ptc1*⁺, están controladas por la ruta Sty1-Atf1, estableciéndose de esta manera un mecanismo de retroalimentación negativa (Degols, *et al.*, 1996; Gaits, *et al.*, 1998; Shiozaki y Russell, 1996; Wilkinson, *et al.*, 1996).

5.3 La ruta de MAPKs de integridad celular

5.3.1 La ruta de MAPKs de integridad celular en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* se ha descrito que esta ruta es necesaria para la síntesis de pared regulada por el ciclo celular y que también está implicada en la respuesta de las células a diferentes estímulos como son variaciones en la osmolaridad externa, la temperatura, presencia de feromonas de conjugación y cambios en el ciclo celular. Las proteínas que componen esta cascada de MAPKs son: la GTPasa Rho1, su GEF Rom2, la proteína homóloga de la quinasa C Pkc1 y el módulo de MAPKs, formado por la MAPKKK Bck1, la MAPKK Mkk1/2 y la MAPK Slt2/Mpk1. Bck1 activa a las MAPKKs Mkk1/2, que fosforilan en residuos de tirosina y treonina a Slt2. Bck1 y Mkk1/2 así como Slt2, se localizan en el citoplasma en condiciones basales y Slt2 se desplaza al núcleo en respuesta a estrés (Levin, 2005).

Los defectos en la pared celular son detectados por distintos sensores que activan a la ruta MAPK de integridad celular. Estos receptores de membrana son las proteínas Wsc1-4 y Mid2-Mlt1 (Levin, 2005), cuyos respectivos genes presentan distintos patrones de expresión, lo que indicaría que median la señal en distintas condiciones (Lesage y

Bussey, 2006). Mid2 está implicada en el mantenimiento de la integridad de la pared celular durante la formación de proyecciones en el proceso de conjugación y junto con Wsc1 está involucrada en el remodelamiento de la pared celular necesario para el crecimiento vegetativo. Wsc1 y Mid2 son capaces de unirse y activar, a través del GEF Rom2, a la GTPasa Rho1, que activará a su vez a Pkc1, encargada de transmitir la señal al módulo de MAPKs (Levin, 2011; Philip y Levin, 2001).

Se han descrito otras dos proteínas que participan en la ruta de integridad activando a la quinasa Pkc1. Una de ellas es la fosfatidilinositol-4-quinasa, Stt4, que es capaz de unirse a la membrana plasmática donde promueve la síntesis de pared celular, la organización del citoesqueleto de actina y la activación de esta ruta a través de Rho1/Pkc1 (Audhya y Emr, 2002; Strahl y Thorner, 2007; York, 2006). La segunda proteína es Tor2, una fosfatidilinositol quinasa esencial, implicada en la coordinación entre la señal nutricional y el crecimiento celular, y que también regula la organización de la actina activando a Rom2 y a Pkc1 (Facchinetti, *et al.*, 2008; Levin, 2005; Pujol, *et al.*, 2009).

Una vez localizada y estabilizada por Rho1 en las áreas de crecimiento, Pkc1 es activada por las quinasas dependientes de fosfoinosítidos, Pkh1 o Pkh2, activando a la cascada de MAPKs de la ruta de integridad. Slt2 activa al factor de transcripción Rlm1, que regula la expresión de al menos 25 genes implicados en la biosíntesis de la pared celular, incluidos los genes que codifican las β -(1,3)-D-glucán sintetas Fks1 y Fks2 (Levin, 2005). Otros de los factores de transcripción con los que interacciona la MAPK Slt2 es el complejo Swi4/Swi6 que activa genes de síntesis de pared celular específicos de las fases G1/S (Perez y Rincon, 2010).

La actividad de la MAPK Slt2, y por consiguiente de la ruta de integridad celular, es inhibida por las fosfatasas específicas de tirosina Sdp1 y Msg5 (Collister, *et al.*, 2002; Flandez, *et al.*, 2004; Hahn y Thiele, 2002) y recientemente se ha observado que se unen a Slt2 a través de su dominio IYT ($1^{102}Y^{103}T^{104}$) (Palacios, *et al.*, 2011; Sacristan-Reviriego, *et al.*, 2014). Msg5 y Slt2 se regulan recíprocamente. Msg5 desfosforila a Slt2 y reduce su actividad. A su vez, Slt2 fosforila a Msg5 y disminuye su afinidad de unión a Slt2 y, por tanto, su capacidad de inhibirla (Flandez, *et al.*, 2004).

5.3.2 La ruta de MAPKs de integridad celular en *S. pombe*

En la levadura de fisión, la ruta de integridad celular participa en la regulación de la síntesis de la pared celular, la citoquinesis, la morfogénesis, la fusión de las vacuolas durante el estrés hipotónico y la homeostasis iónica (Bone, *et al.*, 1998; Loewith, *et al.*, 2000; Sugiura, *et al.*, 1999; Toda, *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). La ausencia del elemento central de esta ruta, la MAPK Pmk1/Spm1 provoca sensibilidad osmótica en presencia de elevadas concentraciones de potasio, cambios evidentes en la morfología celular, multiseptación (especialmente en situaciones de estrés térmico u osmótico), e hipersensibilidad a β -glucanasas (Loewith, *et al.*, 2000; Sengar, *et al.*, 1997; Sugiura, *et al.*, 1999; Toda, *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). En *S. pombe*, la ruta de integridad celular posee una única MAPKKK, Mkh1 (Sengar, *et al.*, 1997) (Figura 15), responsable de la transmisión de la señal de activación al resto de componentes del módulo, que interaccionan entre ellos formando un complejo ternario

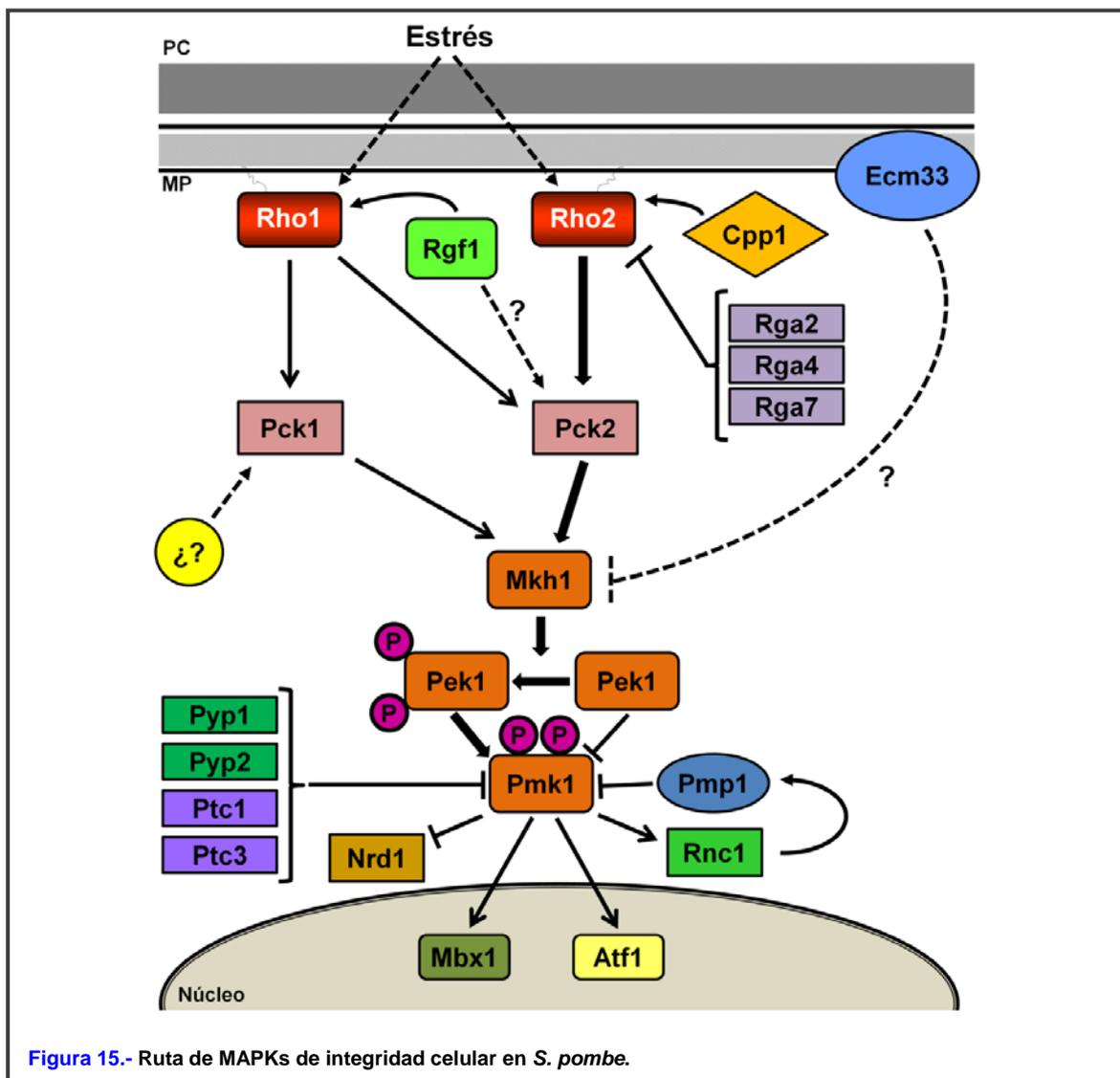


Figura 15.- Ruta de MAPKs de integridad celular en *S. pombe*.

(Loewith, *et al.*, 2000). Mkh1 se encuentra en el citoplasma y en el septo de división (Madrid, *et al.*, 2006).

En respuesta a un estímulo activador de la ruta, la MAPKK Pek1 es fosforilada y activada por Mkh1 (**Figura 15**), transfiriendo posteriormente la señal a la MAPK (Sugiura, *et al.*, 1999). Al igual que Mkh1, Pek1 es una proteína presente en el septo y el citoplasma (Madrid, *et al.*, 2006). Curiosamente Pek1, en ausencia de estímulos externos, es capaz de unirse en su forma inactiva (desfosforilada) a la MAPK de la ruta Pmk1, actuando como un potente inhibidor de la misma (Sugiura, *et al.*, 1999).

La MAPK Pmk1/Spm1 constituye el elemento central de la ruta de integridad celular (Sengar, *et al.*, 1997; Toda, *et al.*, 1996) (**Figura 15**). Pmk1 es una proteína de 48 kDa que puede ser fosforilada por Pek1 en dos residuos conservados de treonina y tirosina en las posiciones 186 y 188 respectivamente (Sugiura, *et al.*, 1999). La MAPK está localizada en el núcleo y citoplasma, así como en el huso mitótico, el cuerpo polar del huso (SPB) y el septo durante la división celular. Tanto su forma activa como inactiva son capaces de atravesar la envuelta nuclear (Madrid, *et al.*, 2006). El transporte núcleo-citoplasma de Pmk1 activa no parece ser importante para su actividad biológica pero sí para su regulación negativa llevada a cabo por fosfatasaes específicas en la región nuclear (Sanchez-Mir, *et al.*, 2012).

Diversas condiciones de estrés son capaces de activar a Pmk1, tales como: el estrés hipo e hiper-osmótico, la ausencia de glucosa, el daño en la pared celular y el estrés oxidativo (Madrid, *et al.*, 2006; Perez y Cansado, 2010). Aún no está clara la identidad de los posibles sensores implicados en la detección y activación de esta ruta. Las proteínas Wsc1 y Mtl2, similares a las proteínas sensoras de *S. cerevisiae*, activan a la GTPasa Rho1 pero no parecen afectar la señalización de la MAPK de integridad (Cruz, *et al.*, 2013).

La GTPasa Rho2 es la principal activadora, a través de Pck2, de la transmisión de la señal hacia el módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 (Ma, *et al.*, 2006) (**Figura 15**) pero no se sabe nada de cómo se activa Rho2 ni de qué proteínas pueden ser GEF de esta GTPasa. Sí se sabe que las GAPs de Rho2: Rga2, Rga4 y Rga7, son capaces de modular negativamente la función de Pmk1 al actuar como reguladores negativos de la actividad de esta GTPasa (Soto, *et al.*, 2010; Villar-Tajadura, *et al.*, 2008). Rho2 actúa por encima de Pck2, que a su vez interacciona y activa a Mkh1, la MAPKKK del módulo, en respuesta a distintos estreses (Barba, *et al.*, 2008; Ma, *et al.*, 2006). Así, la activación de Pmk1 inducida por estrés hipo- o hipertónico depende totalmente de la señalización mediada por Rho2-Pck2, mientras que la activación durante la separación celular o el

tratamiento con peróxido de hidrógeno son completamente independientes de ambas proteínas. Otros estreses, como la privación de glucosa o el daño en la pared celular se canalizan tanto a través de Pck2 como por medio de rutas alternativas (Madrid, *et al.*, 2013). Estudios recientes han demostrado que, en determinadas condiciones de estrés de pared celular, Rho1 y Pck1 pueden activar también la ruta MAPK de integridad celular aunque en mucha menor medida que Rho2 y Pck2 (Sanchez-Mir, *et al.*, 2014).

Entre las escasas dianas celulares conocidas de Pmk1 se encuentran Rnc1 y Nrd1, dos proteínas de unión a ARNm (**Figura 15**). Rnc1, una vez fosforilada por Pmk1, se une y estabiliza al ARN mensajero de Pmp1, una fosfatasa de especificidad dual que desfosforila la forma activada de Pmk1 (Sugiura, *et al.*, 2003; Sugiura, *et al.*, 1998). Sin embargo, la fosforilación de Nrd1 por esta MAPK, evita que se una y estabilice a sus ARNm dianas (como el del gen *cdc4⁺*, que codifica la cadena ligera de la miosina II), regulando negativamente su actividad (Satoh, *et al.*, 2009). Se ha descrito que en condiciones de daño en la pared celular, Pmk1 es capaz de fosforilar y activar a Atf1 (Takada, *et al.*, 2007) (**Figura 15**), el factor de transcripción clave en la ruta MAPK de respuesta al estrés en *S. pombe* (Wilkinson, *et al.*, 1996). De esta forma, se propone que la ruta de integridad y la ruta de estrés convergen en Atf1, para activar genes necesarios en la reparación de daños celulares (Takada, *et al.*, 2007). Otro factor de transcripción que parece interactuar con Pmk1 es Mbx1, implicado, junto con Atf1, en transcribir el gen *ecm33⁺* que codifica una proteína de pared con motivo GPI (glicosil-fosfatidil-inositol). Esta proteína regula negativamente la señalización de Pmk1 (Takada, *et al.*, 2010).

La fosfatasa Pmp1 es la principal reguladora negativa de Pmk1 (Sugiura, *et al.*, 1998) (**Figura 15**). Se trata de una fosfatasa de especificidad dual que interactúa, a través de su dominio IYT (I¹⁰²Y¹⁰³T¹⁰⁴) con Pmk1, inactivándola al desfosforilar los residuos de Tyr¹⁸⁶ y Thr¹⁸⁸ de la MAPK (Sacristan-Reviriego, *et al.*, 2014; Sugiura, *et al.*, 1998). La estabilidad del ARNm de *pmp1⁺* depende de la función de la proteína de unión a ARN Rnc1, cuya actividad es regulada positivamente por la fosforilación producida por Pmk1, estableciéndose así una retroalimentación negativa (Perez y Cansado, 2010; Sugiura, *et al.*, 2003).

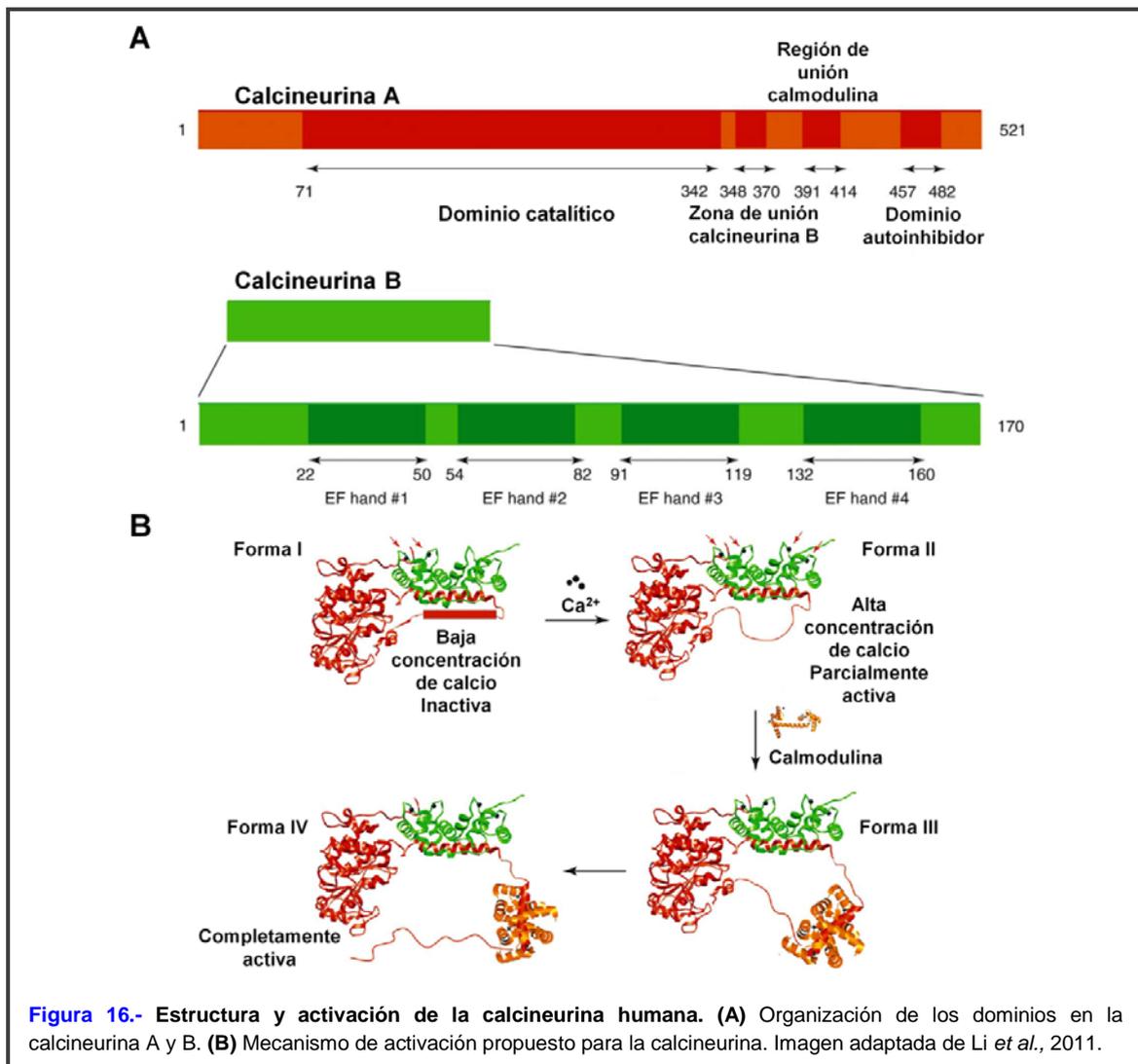
Las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2, y las fosfatasas de serina/treonina Ptc1 y Ptc3, mencionadas anteriormente como reguladores negativos de la MAPK Sty1 (Degols, *et al.*, 1996; Gaits, *et al.*, 1998; Shiozaki y Russell, 1996; Wilkinson, *et al.*, 1996), son también capaces de asociarse y desfosforilar a Pmk1 (Madrid, *et al.*, 2007; Takada, *et al.*, 2007) (**Figura 15**). Pyp1 y Ptc1 controlan los niveles de activación basal de Pmk1, mientras que Pyp1, Pyp2 y Ptc1 limitan la hiperactivación de esta MAPK durante el estrés

osmótico (Madrid, *et al.*, 2007). Los niveles de transcripción de estas cuatro fosfatasa están determinados por la función de Sty1-Atf1, lo que pone de manifiesto una interrelación entre las rutas de MAPKs de Pmk1 y Sty1. Así, las actividades de Sty1 y Atf1 son necesarias para una correcta desactivación de la MAPK Pmk1 en células sometidas a estrés osmótico (Madrid, *et al.*, 2007; Madrid, *et al.*, 2006; Perez y Cansado, 2010).

6. LA FOSFATASA CALCINEURINA

La calcineurina es una fosfatasa de tipo 2B dependiente de Ca^{2+} /calmodulina y uno de los cuatro tipos principales de fosfatasa específicas de serina/treonina presentes en las células eucariotas (Cohen, 1989). Aunque originariamente fue descubierta en el tejido neuronal (Klee y Krinks, 1978; Wang y Desai, 1977), la calcineurina está distribuida ampliamente en todas las células y muy conservada desde las levaduras al hombre. Esta fosfatasa es un heterodímero formado por una subunidad catalítica y una subunidad reguladora (Klee, *et al.*, 1979; Sugiura, *et al.*, 2002).

En mamíferos, la calcineurina regula una amplia variedad de procesos fisiológicos como son: la activación de las células T, el desarrollo del músculo cardíaco, la apoptosis, el aprendizaje y la memoria, la plasticidad neuronal y el estrés oxidativo (Steinbach, *et al.*, 2007). Está formada por la subunidad catalítica (Calcineurina A) de unos 60 kDa y por la subunidad reguladora (Calcineurina B) de aproximadamente 19 kDa. La calcineurina A tiene un dominio catalítico N-terminal, una zona helicoidal de unión a calcineurina B, una región de unión a calmodulina y un dominio autoinhibidor (**Figura 16A**). Estas tres últimas zonas conforman la región reguladora de la calcineurina A y en su activación están implicadas la calcineurina B y la calmodulina (Li, *et al.*, 2011). La calcineurina B presenta 4 zonas de unión a iones de Ca^{2+} (*EF-hands*) (**Figura 16A**), dos de ellas con alta afinidad por este ion e implicadas en estabilizar la estructura heterodimérica de la calcineurina y las otras dos con baja afinidad por el Ca^{2+} y relacionadas con la detección de este ion y la regulación de la subunidad B (Klee, *et al.*, 1998; Stemmer y Klee, 1994; Yang y Klee, 2000a). En mamíferos, la completa activación de la calcineurina requiere un cambio conformacional, iniciado por la unión de iones de Ca^{2+} a las zonas de baja afinidad de la calcineurina B (Formas I y II de la **figura 16B**), tras lo cual se une la calmodulina (Forma III, **figura 16B**) y se desplaza el dominio autoinhibidor del centro activo de la calcineurina (Forma IV, **figura 16B**) completándose así su activación (Kissinger, *et al.*, 1995; Li, *et al.*, 2011; Shen, *et al.*, 2008; Wang, *et al.*, 2008).



En *S. cerevisiae*, la actividad de la calcineurina es esencial para el mantenimiento de la viabilidad celular en condiciones de estrés tales como: elevada temperatura, estrés de retículo, pH alcalino, problemas en la pared celular, etc., aunque no es necesaria para el crecimiento vegetativo en condiciones normales (Deng, *et al.*, 2006). Esta levadura presenta dos isoformas de la subunidad catalítica, Cmp2 y Cna1, y una de la subunidad reguladora, Cnb1. En *S. cerevisiae*, la calcineurina colabora junto con la ruta MAPK de integridad celular en la respuesta a daños en la pared. Ante este tipo de estrés, la calcineurina activa el factor de transcripción Crz1, que migra al núcleo e induce la expresión del gen de la glucán sintasa *FKS2* (Deng, *et al.*, 2006; Matheos, *et al.*, 1997; Mendizabal, *et al.*, 1998; Stathopoulos-Gerontides, *et al.*, 1999; Stathopoulos y Cyert, 1997; Zhao, *et al.*, 1998). La ruta de integridad mantiene los altos niveles de expresión del gen *FKS2* mientras dure el estrés de pared (Jung y Levin, 1999; Zhao, *et al.*, 1998). Otros dos sustratos descritos para la calcineurina en *S. cerevisiae* son Slm1 y Slm2, dos proteínas de unión a PI4,5P que son dianas del complejo TORC2. Están implicadas en la

endocitosis de la permeasa de uracilo en respuesta a estrés de calor (Bultynck, *et al.*, 2006; Ma, *et al.*, 2011a).

La levadura de fisión *S. pombe* tiene un único gen que codifica la subunidad catalítica de la calcineurina, Ppb1 (Yoshida, *et al.*, 1994) y otro gen que codifica la subunidad reguladora, Cnb1 (Sio, *et al.*, 2005). En esta levadura, se ha descrito que la calcineurina está implicada en la citoquinesis, en el tráfico de membranas, en la homeostasis del cloro, en la polaridad celular, en la conjugación, en la posición del SPB y en el crecimiento bipolar (Fang, *et al.*, 2008; Fujita, *et al.*, 2002; He, *et al.*, 2006; Jung y Levin, 1999; Kume, *et al.*, 2011; Lu, *et al.*, 2002; Ma, *et al.*, 2011a; Ma, *et al.*, 2006a; Sugiura, *et al.*, 2002; Sugiura, *et al.*, 1998; Zhao, *et al.*, 1998). La calcineurina activa al menos dos rutas distintas de señalización, una dependiente del factor de transcripción Prz1 (homólogo al factor de transcripción Crz1 en *S. cerevisiae*) y otra ruta independiente de Prz1 (Hirayama, *et al.*, 2003). Se ha demostrado que esta última ruta funciona de forma antagónica con la ruta de la MAPK Pmk1, tanto en la regulación de la homeostasis del ion cloro como en la entrada de Ca^{2+} mediada por el canal Cch1-Yam8 (Hirayama, *et al.*, 2003; Ma, *et al.*, 2011).

La calcineurina es capaz de interaccionar con Cds1, la quinasa efectora del *checkpoint* de replicación de ADN. Esta quinasa es capaz de detener el ciclo celular y el crecimiento polarizado en respuesta a un estrés replicativo. Cds1 activa por fosforilación a Ppb1, que a su vez desfosforila a Tip1 produciendo un retraso en el establecimiento del crecimiento por el polo nuevo (NETO) (Kume, *et al.*, 2011). También se ha observado que la calcineurina puede regular el ensamblaje dependiente de fosforilación del anillo de actomiosina maduro (Cadou, *et al.*, 2013; Fujita, *et al.*, 2002).

Objetivos



*“La inteligencia sin ambición
es un pájaro sin alas”*

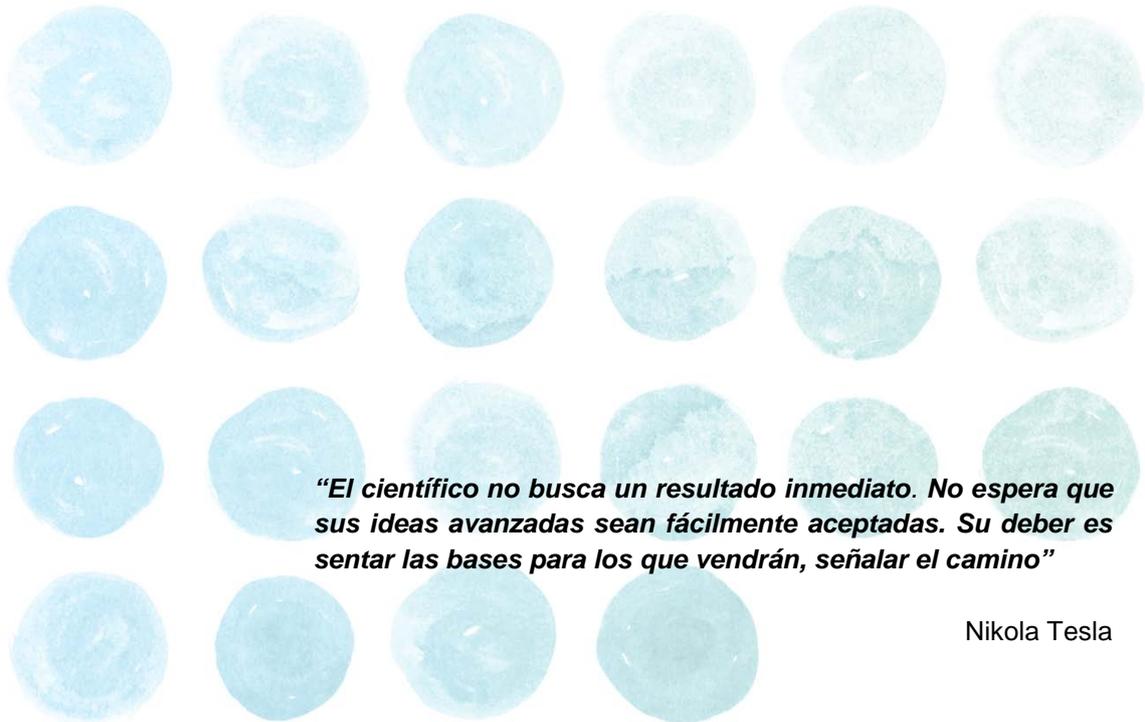
Salvador Dalí

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue la identificación de nuevas proteínas transmisoras de la señal o reguladoras de Rho1. Para llevar a cabo este objetivo nos propusimos:

1. Obtener cepas termosensibles, portadoras de mutaciones puntuales en la ORF de *rho1*.
2. Estudiar detalladamente el fenotipo originado por los nuevos alelos de *rho1*, relacionándolo con los procesos en lo que interviene esta GTPasa.
3. Identificar genes relacionados funcionalmente con *rho1*:
 - Genes que en sobreexpresión corrijan la termosensibilidad de estas cepas mutantes.
 - Genes cuya eliminación sea letal o agrave la termosensibilidad de estas cepas mutantes.
4. Caracterizar la interacción génica y funcional entre estos genes y *rho1*.

Resultados



“El científico no busca un resultado inmediato. No espera que sus ideas avanzadas sean fácilmente aceptadas. Su deber es sentar las bases para los que vendrán, señalar el camino”

Nikola Tesla

1. CONSTRUCCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA CEPA MUTANTE TERMOSENSIBLE *rho1-C17R*

1.1 Obtención de la cepa mutante termosensible *rho1-C17R*

Rho1 es una GTPasa esencial implicada en la biosíntesis de la pared celular y en la organización del citoesqueleto de actina en *S. pombe* (Arellano, *et al.*, 1996; Arellano, *et al.*, 1997). Con el objetivo de encontrar nuevas proteínas efectoras o reguladoras no descritas para dicha GTPasa, se obtuvieron cepas mutantes termosensibles de *rho1*⁺, con la intención de realizar un posterior *screening* de genes que suprimieran este fenotipo de termosensibilidad.

En primer lugar se generó una genoteca de alelos mutantes puntuales de *rho1*⁺ realizándose una PCR de la secuencia codificante (ORF) de este gen en condiciones subóptimas. En la reacción se utilizó una mezcla no equitativa de nucleótidos que contenía mayor proporción de bases pirimidínicas (citosina y timina) que de bases púricas (adenina y guanina) (Martin, *et al.*, 2007). Como producto se obtuvo una población de moléculas de la ORF de *rho1*⁺ mutadas al azar. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores para dicha PCR generaron en los extremos de las ORFs dos sitios nuevos de restricción, *NdeI* y *BamHI*, que se utilizaron para introducir la población de moléculas en un módulo de integración tal y como se muestra en la **figura 17**. Dicho módulo presenta de su extremo 5' al 3' los siguientes componentes: 650 pares de bases de la región promotora de *rho1*⁺, la ORF mutada, el terminador del gen *adh*, el gen de resistencia a geneticina (KanMX6) y 500 pares de bases del terminador de *rho1*⁺. Una vez obtenida la

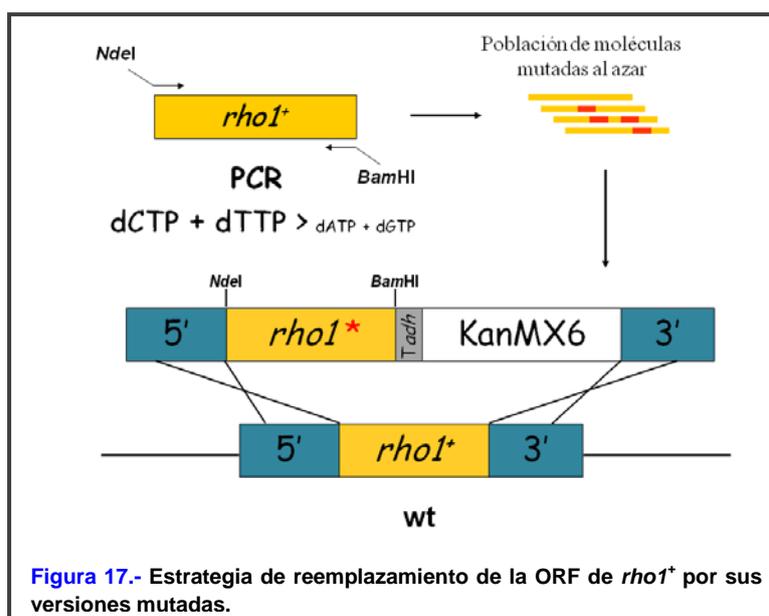


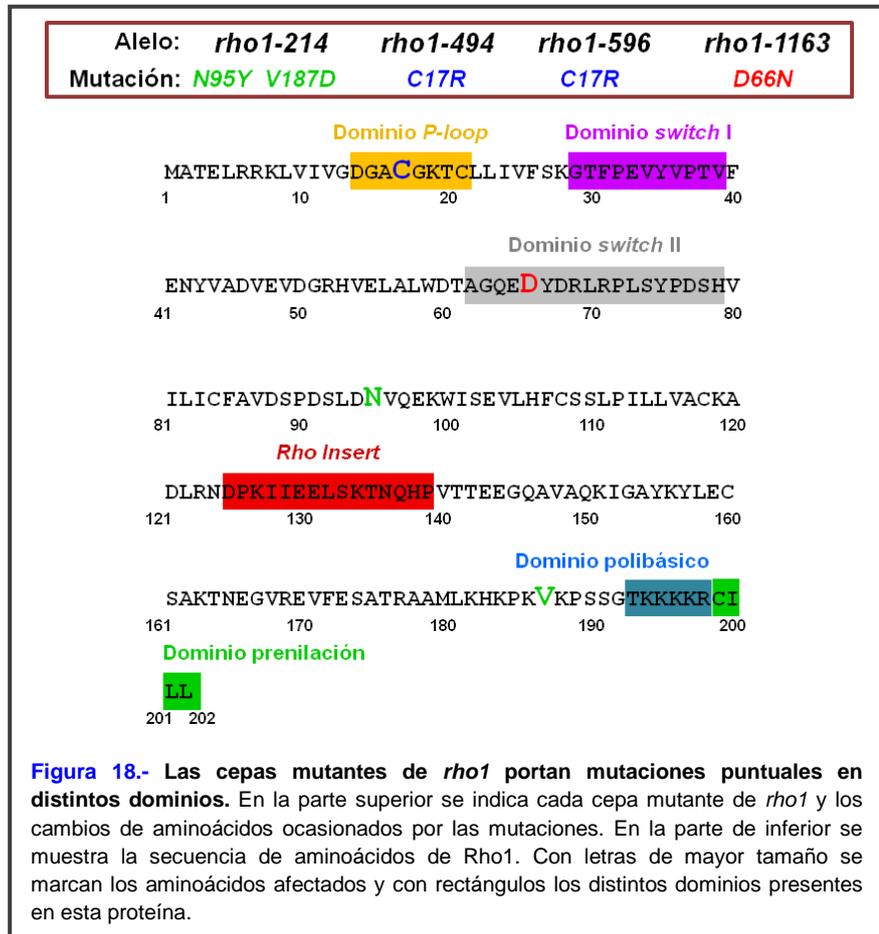
Figura 17.- Estrategia de reemplazamiento de la ORF de *rho1*⁺ por sus versiones mutadas.

población de módulos de integración, se procedió a reemplazar el gen *rho1*⁺ endógeno por las diferentes ORFs mutadas mediante la transformación de la cepa de *S. pombe leu1-32 ura4-D18* con dichos módulos (**Figura 17**).

En total se obtuvieron alrededor de 1.200 clones resistentes a

geneticina, de los cuales únicamente 4 fueron capaces de crecer a 25°C y no a 37°C. Se nombraron los mutantes en función del número del clon al que correspondían: *rho1-214*, *rho1-494*, *rho1-596* y *rho1-1163* y se procedió a secuenciar los *loci* de dichos clones para identificar las mutaciones causantes del fenotipo, (**Figura 18**).

Las cepas mutantes *rho1-596* y *rho1-494* presentan la misma mutación puntual que causa la sustitución del aminoácido cisteína en la posición 17 por una arginina (C17R). Este residuo se encuentra en el dominio denominado *P-loop*, implicado en la unión a GTP de *rho1*⁺. La cepa mutante *rho1-1163* porta una mutación que causa la



sustitución D66N en el dominio *switch II* y las células *rho1-214* presentan dos sustituciones: N95Y y V187D (**Figura 18**). Nuestro estudio se ha centrado en la caracterización de la cepa mutante *rho1-596*, a partir de ahora llamada *rho1-C17R*.

1.2 Crecimiento y morfología de la cepa mutante termosensible *rho1-C17R*

Inicialmente se confirmó la característica de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*. Para lo cual se realizó un ensayo de gota, comparando el crecimiento de esta cepa mutante con una cepa silvestre a distintas temperaturas (**Figura 19A**). Las células que portaban el alelo *rho1-C17R* presentaron un defecto en el crecimiento a temperaturas

superiores a 32°C y fueron incapaces de crecer a partir de 34°C. A continuación, se quiso comprobar si la adición de un estabilizador osmótico tenía algún efecto en el crecimiento. La presencia de sorbitol a una concentración de 1,2 M era capaz de corregir el fenotipo de termosensibilidad parcialmente (**Figura 19B**) ya que las células mutantes crecieron a

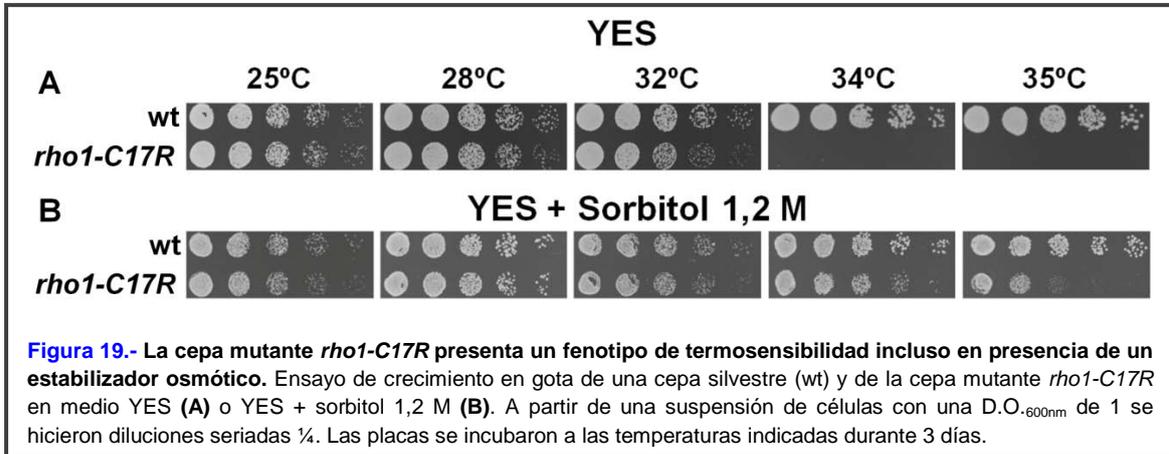


Figura 19.- La cepa mutante *rho1-C17R* presenta un fenotipo de termosensibilidad incluso en presencia de un estabilizador osmótico. Ensayo de crecimiento en gota de una cepa silvestre (wt) y de la cepa mutante *rho1-C17R* en medio YES (A) o YES + sorbitol 1,2 M (B). A partir de una suspensión de células con una D.O._{600nm} de 1 se hicieron diluciones seriadas ¼. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 3 días.

35°C pero menos que un silvestre.

En el análisis microscópico de la cepa mutante *rho1-C17R* se observó que presentaba una morfología silvestre a temperaturas permisivas pero que tras una o dos

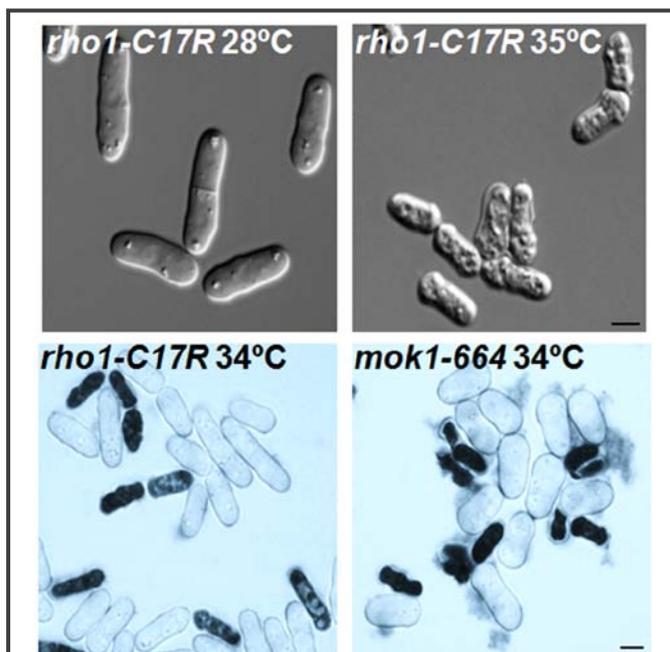
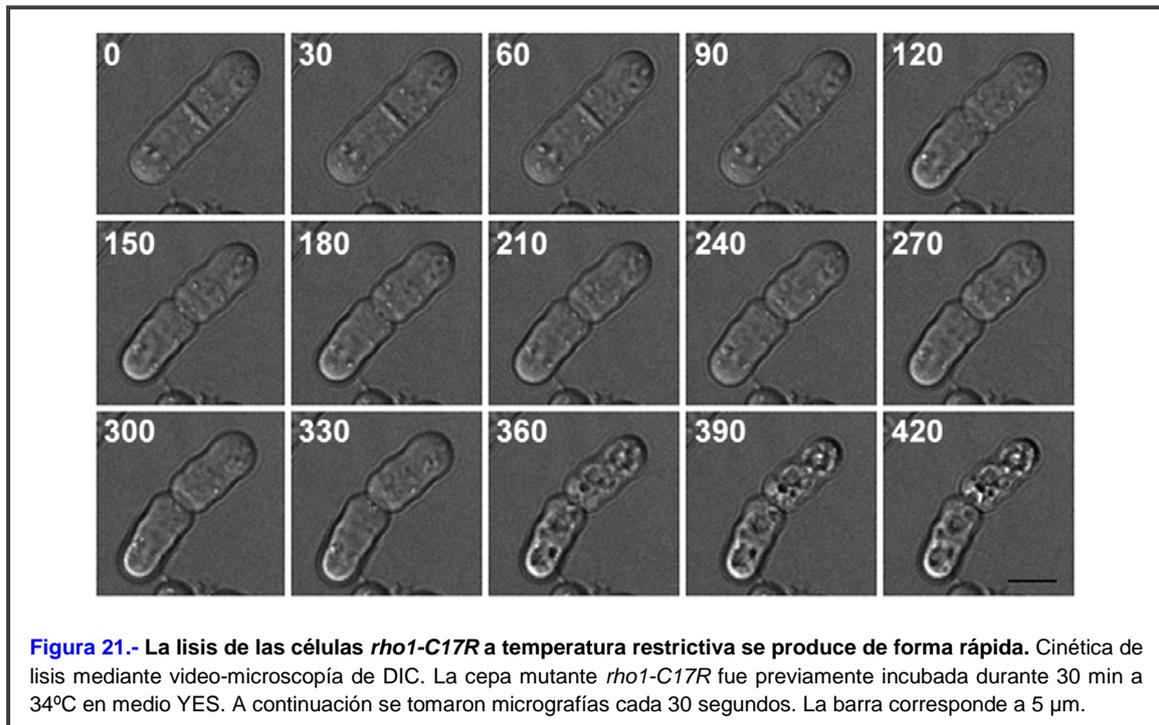


Figura 20.- El fenotipo de lisis de la cepa mutante *rho1-C17R* a temperatura restrictiva es distinto al de otras cepas mutantes de pared celular. Parte superior, fotografías de contraste interdifereencial (DIC) de las células *rho1-C17R* incubadas a 28°C o 35°C en medio YES. Parte inferior, fotografías de campo claro de las células *rho1-C17R* y *mok1-664* incubadas en medio YES a 34°C durante 3h y teñidas con azul de metileno. Las barras corresponden a 5 µm.

horas de incubación a temperaturas superiores a 32°C las células aparecían lisadas, mostrando un fenotipo parecido al de la represión de *rho1*⁺ o al de la sobreexpresión del alelo constitutivamente inactivo de *rho1*⁺ (*rho1-T20N*) (Arellano, *et al.*, 1997) (**Figura 20**). Esta forma de lisis es distinta a la que presentan otras cepas mutantes con defectos en la pared celular, como puede ser *mok1-664* que tienen la enzima α-glucán sintasa termosensible y defectuosa a 34°C, donde la lisis conlleva la liberación del citoplasma al medio (Katayama, *et al.*, 1999) (**Figura 20**). Aunque las células *rho1-C17R* llegan a ser

permeables a la tinción de azul de metileno, no pierden su contenido intracelular como sucede en las células *mok1-664*.

Para caracterizar más en detalle cómo se produce la lisis, se diseñó un experimento de microscopía a tiempo real (*time lapse*) de células cultivadas a 25°C y posteriormente incubadas a 34°C. Como se puede observar en la **figura 21** (entre los 330-360 segundos), la muerte de la cepa mutante *rho1-C17R* es muy rápida, lo que lleva a pensar que el defecto de Rho1 en estas células provoca un problema fatal para la supervivencia.



1.3 Organización del citoesqueleto de actina y de microtúbulos en las células *rho1-C17R*

En *S. pombe*, los polímeros de actina, se organizan de tres modos diferentes: en forma de cables, que recorren la célula de un modo longitudinal; en forma de parches, que se disponen en las regiones de la corteza celular donde se produce el crecimiento activo; y en forma de anillo, en la región ecuatorial de las células en división (Marks y Hyams, 1985). Rho1 es un factor clave en la organización del citoesqueleto de actina en *S. pombe* (Arellano, *et al.*, 1997). Por ello, se analizó si la cepa mutante *rho1-C17R* pudiera tener un defecto en la organización de este citoesqueleto mediante tinción de las células con faloidina, que se une a las estructuras que forma la actina, unida a

AlexaFluor-488. Las células se incubaron a temperatura permisiva (25°C) y no permisiva (90 min a 34°C).

Tanto en la cepa silvestre como en la cepa *rho1-C17R*, los parches de actina aparecen correctamente concentrados en los polos de crecimiento. Sin embargo los cables de actina en las células *rho1-C17R* sometidas a la temperatura restrictiva de 34°C muestran diferencias: se observan células con menos cables o menor intensidad de fluorescencia como sucede en la represión de *rho1*⁺ (Arellano, *et al.*, 1997) (Figura 22).

Estos resultados sugieren que la proteína mutada Rho1-C17R presenta una menor actividad que su correspondiente silvestre.

Para analizar la morfología de los microtúbulos, la cepa mutante *rho1-C17R* se cruzó con una cepa que expresa la proteína de fusión mCherry-Atb2. Atb2 es uno de los dos polipéptidos que

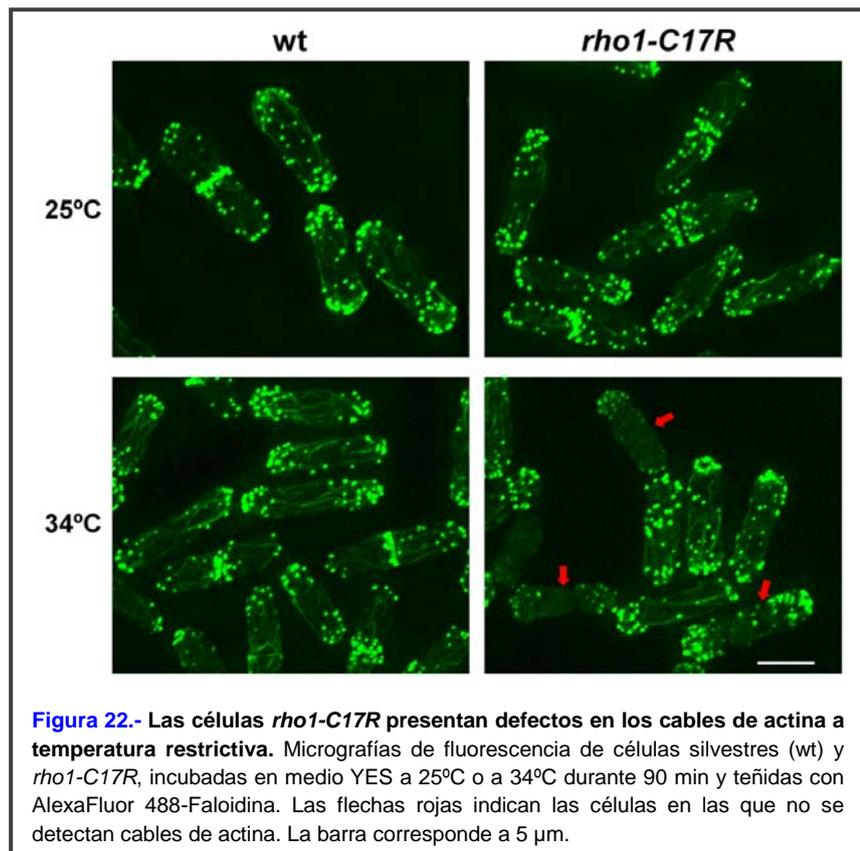
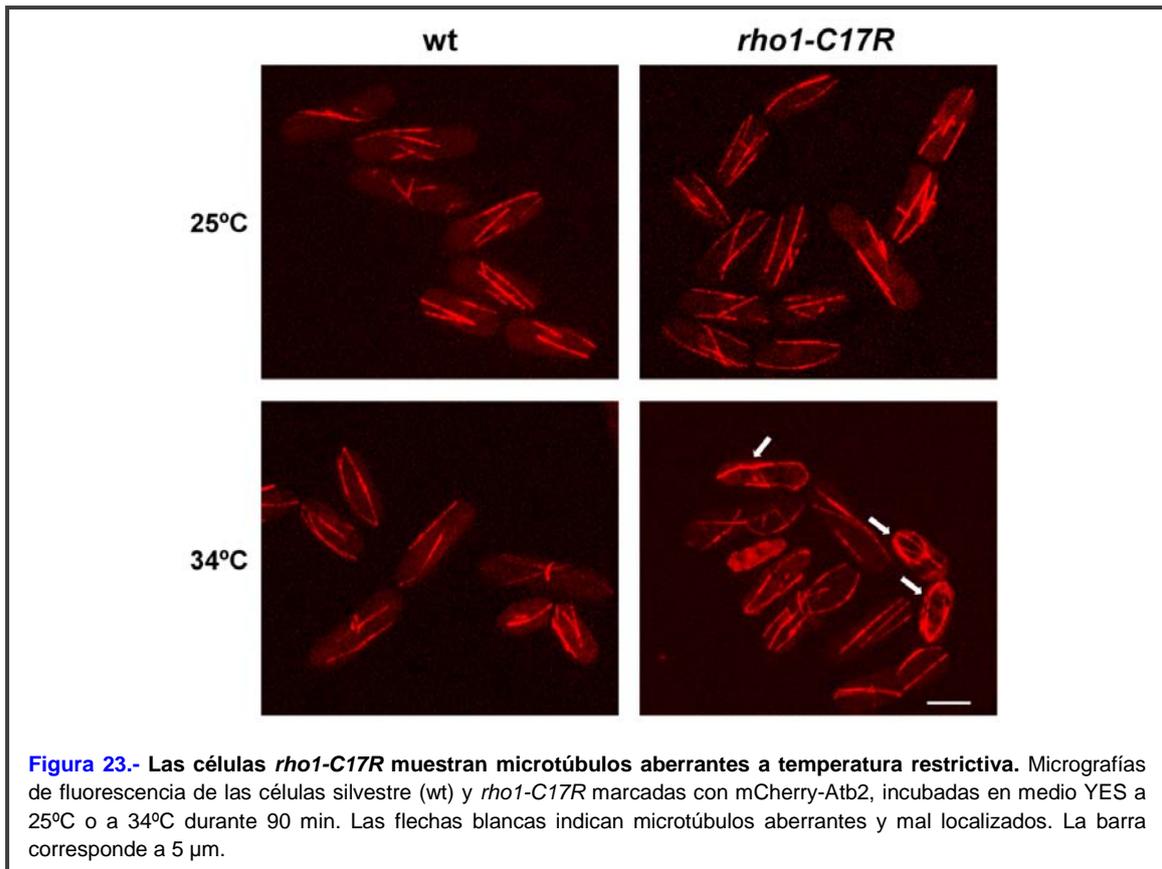


Figura 22.- Las células *rho1-C17R* presentan defectos en los cables de actina a temperatura restrictiva. Micrografías de fluorescencia de células silvestres (wt) y *rho1-C17R*, incubadas en medio YES a 25°C o a 34°C durante 90 min y teñidas con AlexaFluor 488-Faloidina. Las flechas rojas indican las células en las que no se detectan cables de actina. La barra corresponde a 5 μ m.

conforman la tubulina. Como se puede observar en la **figura 23** no existen diferencias significativas entre las cepas silvestre y mutante *rho1-C17R* a temperatura permisiva, pero sí se aprecian diferencias a temperatura no permisiva (34°C). Es habitual observar la presencia de microtúbulos aberrantes y mal localizados en la cepa mutante: el extremo del microtúbulo no se detiene en el polo de la célula sino que sigue creciendo y la rodea. Esto indica que la catástrofe de microtúbulos no se está produciendo correctamente en los polos.

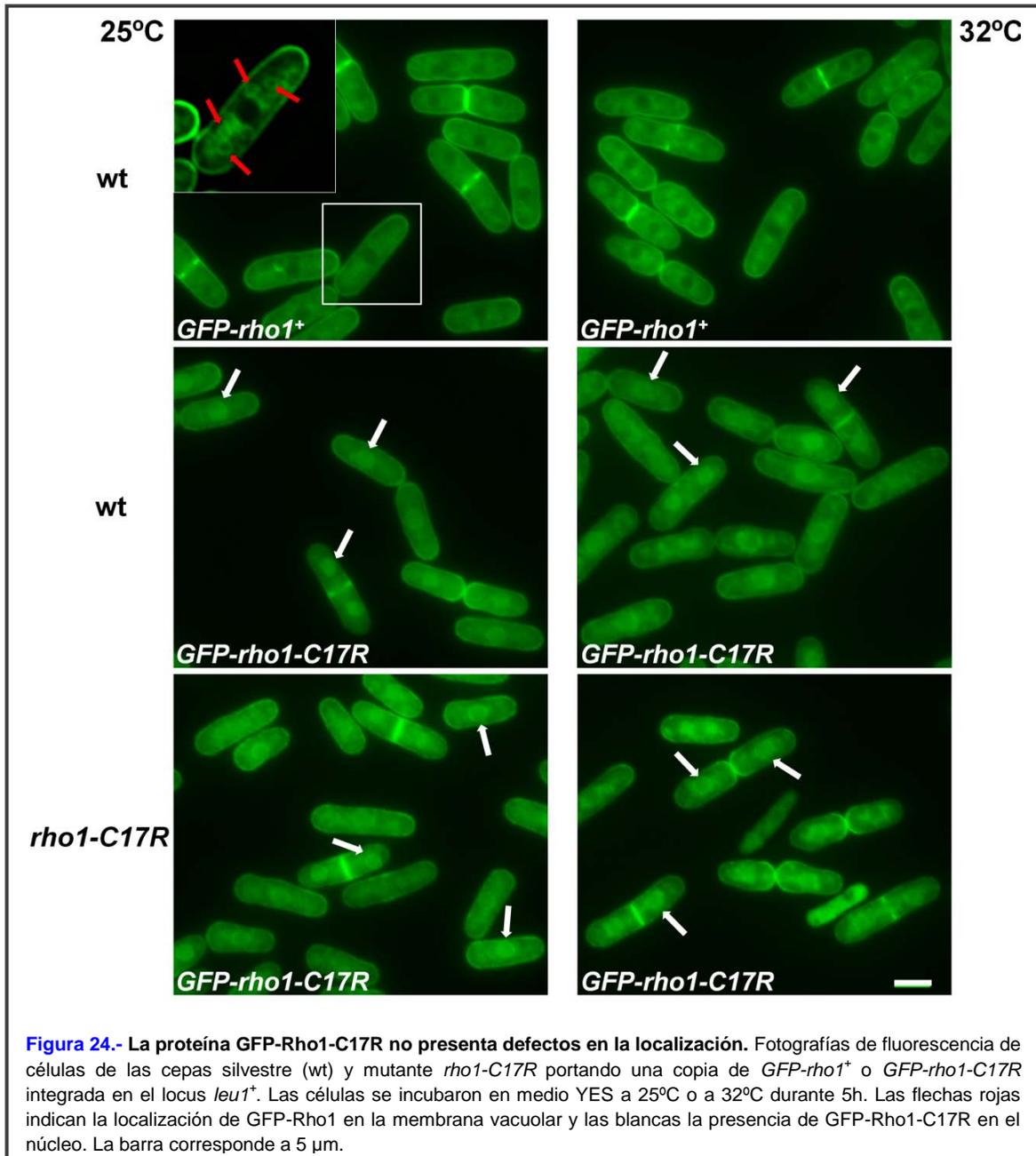


1.4 Estudio de la localización de Rho1

Mediante inmunofluorescencia, Rho1 se ha observado en los lugares de crecimiento celular, polos y septo, donde está activa la síntesis de pared celular (Arellano, *et al.*, 1997; Nakano, *et al.*, 1997). La fusión de GFP en el extremo N-terminal de Rho1 disminuye la funcionalidad de la proteína (Coll, *et al.*, 2007) pero permite observar su localización en células vivas. Para determinar si la localización de la proteína Rho1-C17R pudiese estar alterada, se integró una copia de *GFP-rho1* o de *GFP-rho1C17R* bajo el control de su propio promotor, en el locus *leu1*⁺ de una cepa silvestre y de la cepa *rho1-C17R*. Por tanto, estas cepas portan dos copias de *rho1*, una sin marcar en su locus y otra marcada con GFP en el locus *leu1*⁺. En la cepa silvestre, GFP-Rho1 se localiza a lo largo de toda la membrana plasmática, aunque se observa con mayor intensidad en los polos y septo. También está presente en las membranas vacuolares en el interior de la célula (**Figura 24**). En la cepa silvestre en la que se integró *GFP-rho1-C17R*, se observa una localización similar a la de GFP-Rho1, con la diferencia de que esta proteína también aparece en el núcleo de la célula, del cual está totalmente excluida GFP-Rho1 (**Figura 24**).

En el caso de la integración de *GFP-rho1-C17R* en la cepa *rho1-C17R*, la localización era idéntica a la que presentaba esta proteína en una cepa silvestre (**Figura 24**).

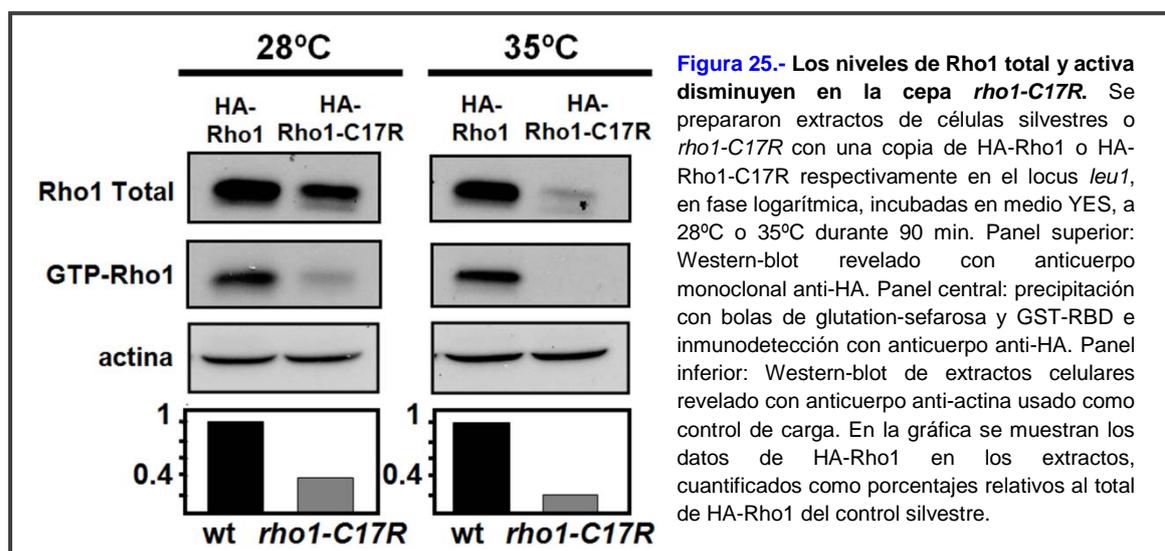
En conjunto, estos datos sugieren que la mutación C17R no impide que Rho1 se localice correctamente pero su aparición en el núcleo indica que esta proteína podría ser enviada al nucleosoma para su degradación.



1.5 Niveles de Rho1 total y activa en la cepa *rho1-C17R*

La falta de viabilidad de la cepa mutante *rho1-C17R* a temperaturas superiores a 32°C se podrían deber bien a una menor estabilidad o bien a una menor actividad de la versión mutada de Rho1 a esta temperatura. Por ello se decidió comprobar los niveles de Rho1 total y activa mediante ensayos de coprecipitación (*pull-down*) de Rho1 con la proteína glutation S-transferasa fusionada al dominio de unión a RhoA (RBD) de la proteína rotequina de mamíferos producida en *E. coli* (Reid, *et al.*, 1996), tal y como se describe en el apartado 10.5 de Materiales y Métodos. La proteína GST-RBD se precipita mediante asociación a bolas de glutacion-sefarosa y en ese precipitado se detecta la presencia de HA-Rho1 unida a GTP ya que solo la proteína activa es capaz de unirse al dominio RBD.

En primer lugar fue necesario marcar el alelo *rho1-C17R* con el epítipo HA en el extremo N-terminal. A pesar de repetidos intentos, fue imposible reemplazar *rho1*⁺ por el módulo de integración *HA-rho1-C17R* en su locus. Por ello, decidimos transformar una cepa silvestre o la cepa mutante *rho1-C17R* con el plásmido integrativo pJK-148 que portaba *HA-rho1*⁺ o *HA-rho1-C17R* respectivamente, bajo el control de su propio promotor. Por tanto estas cepas llevan dos copias de *rho1* (silvestre o mutado): una sin marcar en su locus y otra en el locus *leu1*⁺, marcada con HA. A continuación se analizaron mediante Western-blot los niveles totales de HA-Rho1 o HA-Rho1-C17R en extractos de células en fase logarítmica incubadas a 28°C o a 35°C durante 90 minutos. Los resultados muestran una bajada considerable de los niveles totales de Rho1-C17R con respecto al Rho1 silvestre en las células crecidas a 28°C, acentuándose esta diferencia después de incubarlas durante 90 minutos a 35°C (**Figura 25**). Los niveles de la GTPasa activa, unida a GTP, se determinaron mediante coprecipitación con GST-RBD



de los mismos extractos celulares. También es posible apreciar mucho menos Rho1-C17R unido a GTP que Rho1 silvestre activo en ambas temperaturas (**Figura 25**). Según estos resultados podemos concluir que *rho1-C17R* es un alelo hipomórfico y termosensible con bajos niveles de actividad de Rho1 incluso a temperaturas permisivas.

1.6 La cepa *rho1-C17R* presenta alteraciones en la estructura de la pared celular

Una de las funciones de Rho1 en *S. pombe* es regular la formación de la pared celular, principalmente activando la biosíntesis de β -glucano (Arellano, *et al.*, 1999a). Por ello, se analizó si la disminución en los niveles de Rho1 activa en la cepa *rho1-C17R* daba lugar a alteraciones en la composición de su pared celular. Se llevó a cabo una cuantificación de los polímeros mayoritarios de esta estructura en las cepas silvestre y *rho1-C17R* a la temperatura de 25°C, tal y como se describe en Materiales y Métodos. Como se muestra en la **figura 26** hay una leve, pero significativa, bajada en la cantidad de ^{14}C -glucosa incorporada en la pared celular de *rho1-C17R*. Este descenso fue debido principalmente a una bajada en el β -D-glucano (de un 22,6% en la pared de la cepa silvestre a un 17,2%) que era compensado, parcialmente, por un incremento en la cantidad de galactomanano. Estos datos indican que el descenso de Rho1 activa afecta a las funciones de esta GTPasa relacionadas con la regulación de la síntesis de pared celular.

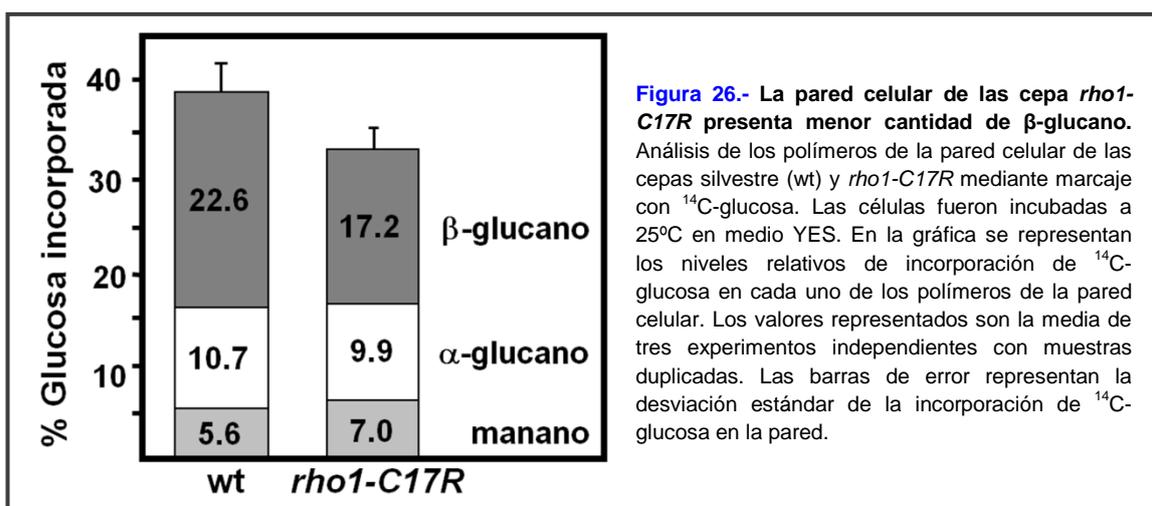
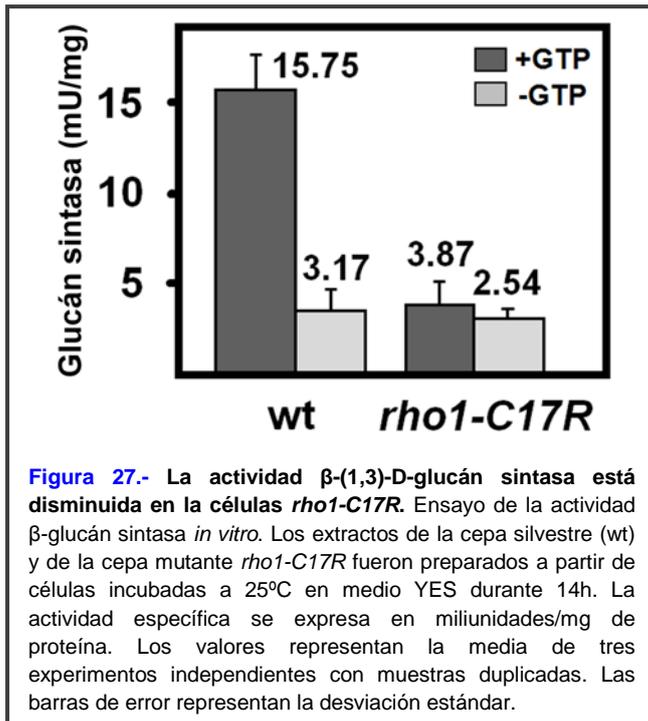


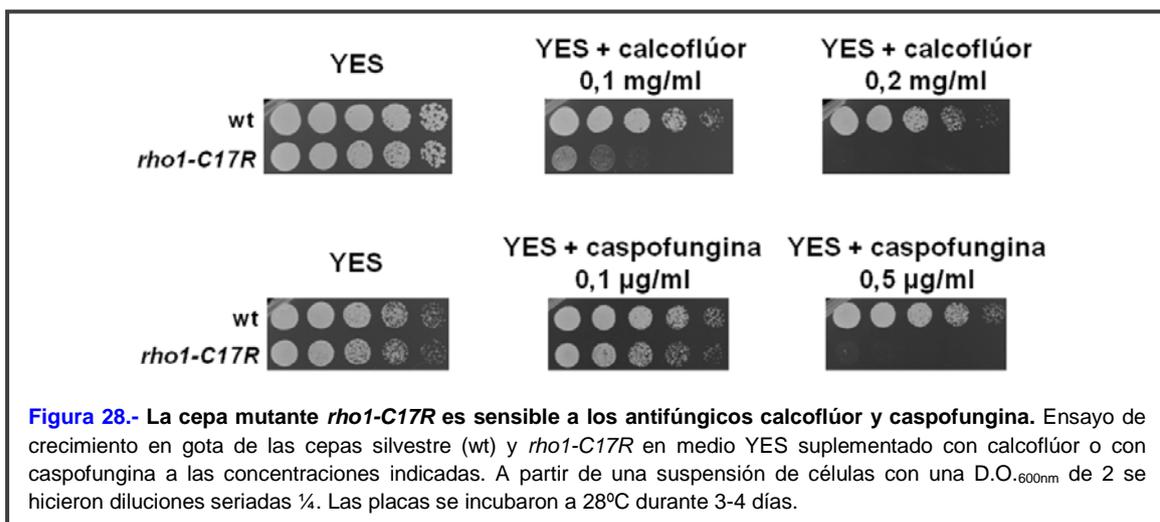
Figura 26.- La pared celular de las cepa *rho1-C17R* presenta menor cantidad de β -glucano. Análisis de los polímeros de la pared celular de las cepas silvestre (wt) y *rho1-C17R* mediante marcaje con ^{14}C -glucosa. Las células fueron incubadas a 25°C en medio YES. En la gráfica se representan los niveles relativos de incorporación de ^{14}C -glucosa en cada uno de los polímeros de la pared celular. Los valores representados son la media de tres experimentos independientes con muestras duplicadas. Las barras de error representan la desviación estándar de la incorporación de ^{14}C -glucosa en la pared.

En relación con estos últimos resultados, se determinó también la actividad *in vitro* de la enzima β -(1,3)-D-glucán sintasa a partir de extractos celulares de las cepas silvestre y *rho1-C17R* a 25°C. Esta enzima está regulada por Rho1 unido a GTP y su actividad



está directamente relacionada con los niveles de Rho1 activa (Arellano, *et al.*, 1996). Se observó un descenso en la actividad glucán sintasa de la cepa *rho1-C17R* comparada con una cepa silvestre (Figura 27). Esta diferencia era mayor cuando se incorporaba GTP a la reacción *in vitro*. Se concluyó que incluso a la temperatura permisiva de 25°C la actividad β -(1,3)-D-glucán sintasa estaba disminuida en la cepa mutante.

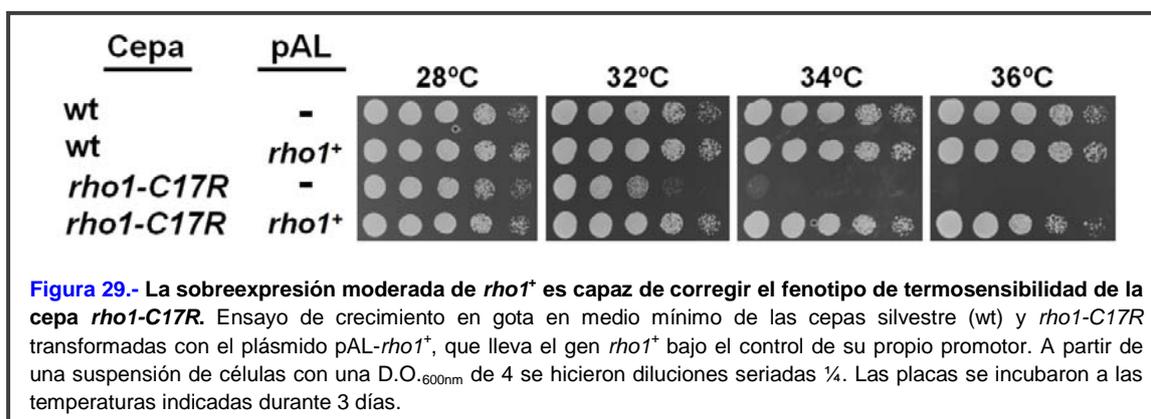
Los defectos en la biosíntesis de la pared celular de la cepa *rho1-C17R* se analizaron también mediante estudios de sensibilidad a los antifúngicos calcoflúor y caspofungina a 28°C. El calcoflúor interacciona con polímeros lineales de enlace β -(1,4) como quitina y/o celulosa y también con β -(1,3)-glucano lineal. Esta interacción desorganiza el ensamblaje de los polímeros de la pared celular (Nicholas, *et al.*, 1994). La caspofungina es un antibiótico lipopeptídico de origen natural que inhibe específicamente la síntesis del β -(1,3)-glucano tanto *in vitro* (Douglas, *et al.*, 1994) como *in vivo* (Abruzzo, *et al.*, 2000). Como se aprecia en la figura 28, la cepa *rho1-C17R* mostró sensibilidad a 0,1 mg/ml de calcoflúor y a 0,5 μ g/ml de caspofungina en medio sólido, mientras que la estirpe silvestre fue capaz de crecer perfectamente a estas concentraciones. Esta hipersensibilidad sugiere que la pared celular de la cepa mutante



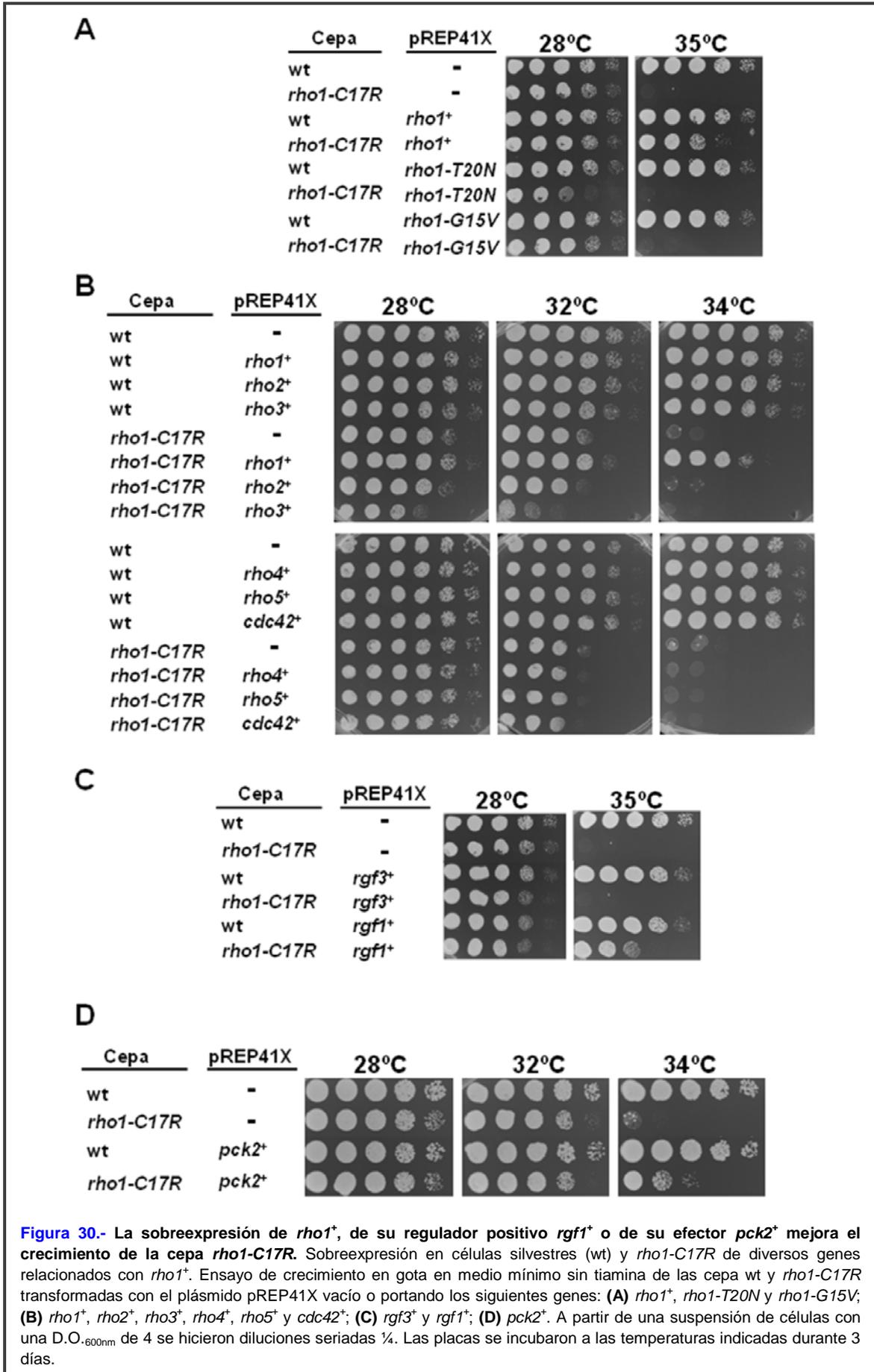
rho1-C17R es defectuosa y no puede soportar las alteraciones adicionales provocadas por la presencia de los compuestos antifúngicos, por lo que no es capaz de crecer a concentraciones en las que una cepa silvestre es perfectamente viable. Por tanto, la disminución de GTPasa activa en las células con la mutación *rho1-C17R* provoca alteraciones en la estructura de su pared celular.

1.7 Supresión del fenotipo de termosensibilidad de la cepa *rho1-C17R* por sobreexpresión de *rho1⁺* o de genes relacionados con esta GTPasa

Analizamos si era posible rescatar la termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R* mediante la sobreexpresión de *rho1⁺*, de otras GTPasas de la familia Rho o de proteínas reguladoras y efectoras de Rho1. Observamos que el crecimiento de esta cepa mutante a temperaturas restrictivas era completamente rescatado por la expresión de *rho1⁺* bajo su promotor en un plásmido multicopia (pAL) (**Figura 29; Tabla I**). También la



expresión de *rho1⁺* en pREP41X, plásmido de sobreexpresión media que porta un promotor reprimible por tiamina (Forsburg, 1993), suprime el crecimiento termosensible de la cepa *rho1-C17R*, aunque no completamente (**Figura 30A, Tabla I**). El alelo dominante negativo *rho1-T20N* expresado en un pREP41X no elimina el fenotipo de termosensibilidad sino que lo empeora, (**Figura 30A, Tabla I**). Sorprendentemente, la sobreexpresión del alelo constitutivamente activo, *rho1-G15V*, no fue capaz de mejorar el crecimiento de la cepa mutante *rho1-C17R* (**Figura 30A, Tabla I**). Este resultado sugiere que el intercambio de GTP-GDP es requerido para que se produzca la supresión.



Las sobreexpresiones de *rho4*⁺, *rho5*⁺ o *cdc42*⁺ en el plásmido pREP41X no provocan ningún efecto en la termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*. Mientras que la de *rho2*⁺ y, principalmente, la de *rho3*⁺, agravan este fenotipo como se puede observar en la placa incubada a 32°C de la **figura 30B (Tabla I)**. Por lo tanto, solo la sobreexpresión de *rho1*⁺ es capaz de corregir la termosensibilidad de la cepa *rho1-C17R*.

Se comprobó también si un incremento de los reguladores positivos o Rho1-GEFs (Rgf1 y Rgf3) podría suprimir el defecto de las células *rho1-C17R*. La sobreexpresión de *rgf1*⁺, principal GEF de Rho1 (Garcia, *et al.*, 2006), fue capaz de rescatar el crecimiento de la cepa *rho1-C17R* a 35°C. Por el contrario, la sobreexpresión de *rgf3*⁺, que codifica para un Rho1-GEF de citoquinesis, no suprimió la termosensibilidad de la cepa mutante. (Morrell-Falvey, *et al.*, 2005; Mutoh, *et al.*, 2005; Tajadura, *et al.*, 2004), (**Figura 30C, Tabla I**). Estos resultados sugieren que los defectos de crecimiento observados en las células *rho1-C17R* no son específicos de citoquinesis. A continuación se analizó el efecto de la sobreexpresión de reguladores negativos, GAPs, de Rho1 (*rga1*⁺, *rga5*⁺, *rga8*⁺) comprobando que no alteraban la termosensibilidad de la cepa mutante (**Tabla I**).

Finalmente, se analizó si alguno de los efectores de Rho1 era capaz de actuar como supresor de la mutación *rho1-C17R*. Se sobreexpresaron las quinasas *pck1*⁺ o *pck2*⁺, proteínas diana de Rho1 en *S. pombe* (Arellano, *et al.*, 1999b). El incremento en la expresión de *pck1*⁺ no varió el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante (**Tabla I**). Sin embargo, la sobreexpresión de *pck2*⁺ corregía ligeramente el crecimiento de las células *rho1-C17R*, lo que puede ser debido a la implicación de esta proteína en la biosíntesis de pared celular (Arellano, *et al.*, 1999b; Calonge, *et al.*, 2000) (**Figura 30D, Tabla I**).

En conjunto todos estos resultados sugieren que: a) Para que Rho1 realice su función es necesario que se produzca el intercambio GTP-GDP; b) Otras proteínas de la familia Rho no pueden reemplazar a Rho1 en todas sus funciones; c) El incremento en la síntesis de pared celular originado por la sobreexpresión de otras proteínas reguladoras o efectoras de Rho1, corrige parcialmente el fenotipo de termosensibilidad.

RESULTADOS

Tabla I.- Efecto de la sobreexpresión de distintos genes en el crecimiento de la cepa *rho1-C17R* en medio mínimo sin tiamina, a distintas temperaturas.

	Gen	Nivel de expresión	Efecto
Alelos de <i>rho1</i>⁺	<i>rho1</i> ⁺	pAL	+++
	<i>rho1</i> ⁺	pREP41X	++
	<i>rho1-T20N</i>	pREP41X	--
	<i>rho1-G15V</i>	pREP41X	±
GTPasas de la familia Rho	<i>rho2</i> ⁺	pREP41X	-
	<i>rho3</i> ⁺	pREP41X	--
	<i>rho4</i> ⁺	pREP41X	±
	<i>rho5</i> ⁺	pREP41X	±
	<i>cdc42</i> ⁺	pREP41X	±
Reguladores de Rho1	<i>rgf3</i> ⁺	pREP41X	±
	<i>rgf1</i> ⁺	pREP41X	++
	<i>rga1</i> ⁺	pREP81X	±
	<i>rga5</i> ⁺	pREP41X	±
	<i>rga8</i> ⁺	pREP3X	±
Efectores de Rho1	<i>pck1</i> ⁺	pREP41X	±
	<i>pck2</i> ⁺	pREP41X	+

+++ Buen crecimiento a 36°C ++ Crecimiento moderado a 36°C + Crecimiento moderado a 34°C

± Ningún efecto

- Menor crecimiento a 32°C

-- Menor crecimiento a 28°C

2. LA RUTA MAPK DE INTEGRIDAD CELULAR EJERCE UNA FUNCIÓN ANTAGÓNICA RESPECTO A LA GTPasa RHO1 EN *Schizosaccharomyces pombe*

2.1 Búsqueda de supresores de la cepa mutante *rho1-C17R*

Con el objeto de identificar nuevos efectores de Rho1, se realizó una búsqueda de supresores del fenotipo de termosensibilidad de la cepa *rho1-C17R*. Para ello, se transformó esta cepa con la genoteca de ADN genómico pURSP1 (ver apartado 6 de Materiales y Métodos). Se obtuvieron alrededor de 9.370 clones transformantes, número suficiente para cubrir prácticamente todo el genoma de *S. pombe*. Se necesitarían alrededor de 10.000 clones para tener un 99% de probabilidad de encontrar una secuencia determinada del genoma en uno de ellos, según se describe en Materiales y Métodos (Seed, *et al.*, 1982).

De los 9.370 clones que crecieron a 28°C, tan sólo 10 fueron capaces de crecer a 35°C. En primer lugar, se comprobó que todos los transformantes perdían la capacidad de crecer a 35°C al inducir la pérdida del plásmido en un medio no selectivo, por lo que no son revertientes espontáneos de la mutación. Tras recuperar el plásmido de estas colonias, se secuenciaron los extremos de los insertos que portaban y se comprobó que en el conjunto de estos 10 clones solamente había tres insertos diferentes que contenían los genes enumerados en la **tabla II**.

De entre todos los insertos de ADN obtenidos, el más interesante fue el contenido en el plásmido del transformante número 1. Este fragmento del cromosoma II, de 6.019 pb (fragmento comprendido entre las coordenadas 495.566 y 501.585), presenta 4 ORFs completas: *pmp1*⁺, SPNCRNA.565, *rps1202*⁺ y *sec11*⁺. Además, contiene 2 ORFs parciales, correspondientes a *mto2*⁺ en un extremo del inserto y a *vma9*⁺ en el otro. Mto2 es una proteína implicada en la organización de los microtúbulos (Samejima, *et al.*, 2005); Pmp1 es una fosfatasa de especificidad dual, que regula negativamente la MAPK de la ruta de integridad celular, Pmk1 (Sugiura, *et al.*, 1998); la secuencia huérfana SPNCRNA.565 podría tratarse, según la base de datos de PomBase, de un ARN antisentido; Rps1202, Sec11 y Vma9, cuyas funciones se han inferido por homología con otros organismos según la base de datos de PomBase, son la posible proteína ribosómica S12 (rpS12-02) de la subunidad 40S del ribosoma, la subunidad Sec11 de la peptidasa señal y la subunidad V0 de la ATPasa de tipo V respectivamente (**Tabla II**).

Tabla II.- Insertos obtenidos en el *screening* de supresores de la termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*.

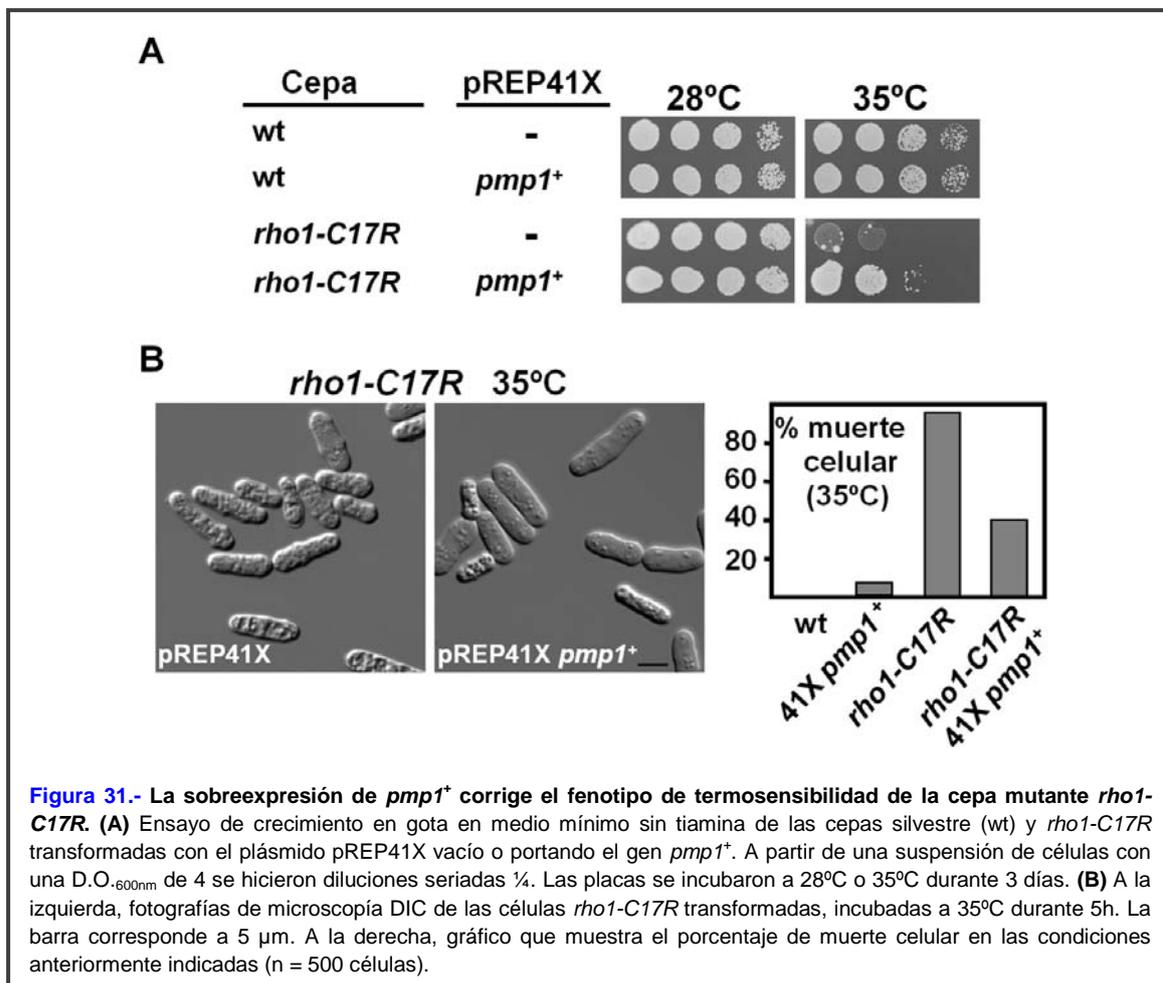
Inserto	Genes Contenidos	Frecuencia de Aparición
Inserto #1 (6.019 pb)	<i>mto2</i> ⁺ Organización de los microtúbulos <i>pmp1</i> ⁺ Fosfatasa de la ruta de integridad celular SPNCRNA.565 Posible ARN antisentido <i>rps1202</i> ⁺ Posible proteína ribosómica S12 <i>sec11</i> ⁺ Posible subunidad Sec11 de la peptidasa señal <i>vma9</i> ⁺ Posible subunidad V0 de la ATPasa de tipo V	1 clon
Inserto #2	<i>snoR61</i> ⁺ <i>small nucleolar</i> RNA snR61	4 clones
Inserto #3	Genoma mitocondrial	5 clones

mto2⁺ y *pmp1*⁺ fueron los mejores candidatos de todos los genes que portaba el inserto de ADN del transformante número 1: *mto2*⁺ porque participa en la organización de microtúbulos y la cepa *rho1-C17R* presenta defectos de este citoesqueleto; y *pmp1*⁺ porque está relacionado con la ruta de integridad celular y en *S. cerevisiae* se ha demostrado que hay una relación directa entre su ruta de integridad y la GTPasa Rho1 (Levin, 2011). Inicialmente, se descartó *mto2*⁺ ya que el inserto del plásmido supresor solo incluía unos 800 pb del extremo carboxilo y se decidió centrar el estudio en el gen *pmp1*⁺.

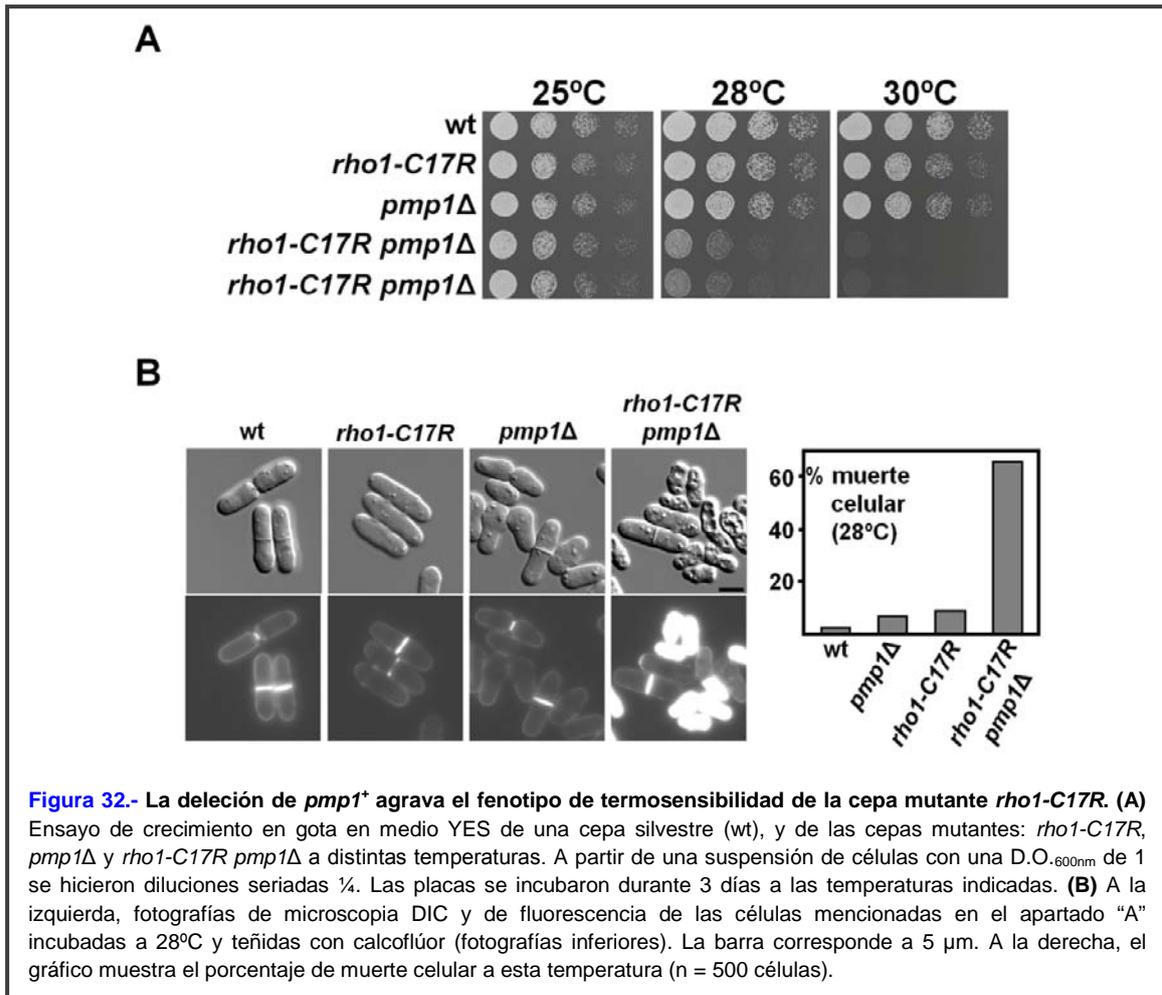
2.2 *pmp1*⁺ es un supresor multicopia de la termosensibilidad presente en las células *rho1-C17R*

El gen *pmp1*⁺ codifica una fosfatasa encargada de inhibir a la MAPK Pmk1 del módulo de MAPKs implicado en la integridad celular (Sugiura, *et al.*, 1998). Para comprobar si dicho gen por sí solo era el responsable de la supresión del fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante, se clonó en un plásmido de sobreexpresión pREP41X. Con este nuevo plásmido se transformó la cepa *rho1-C17R*, confirmándose que la sobreexpresión de este gen suprimía parcialmente la termosensibilidad de las células *rho1-C17R* (**Figura 31A**). También se observó que la muerte celular a la

temperatura restrictiva de 35°C, se reducía del 95% en la cepa control (*rho1-C17R* + pREP41X) a un 40% en la cepa *rho1-C17R* + pREP41X *pmp1*⁺ (Figura 31B).

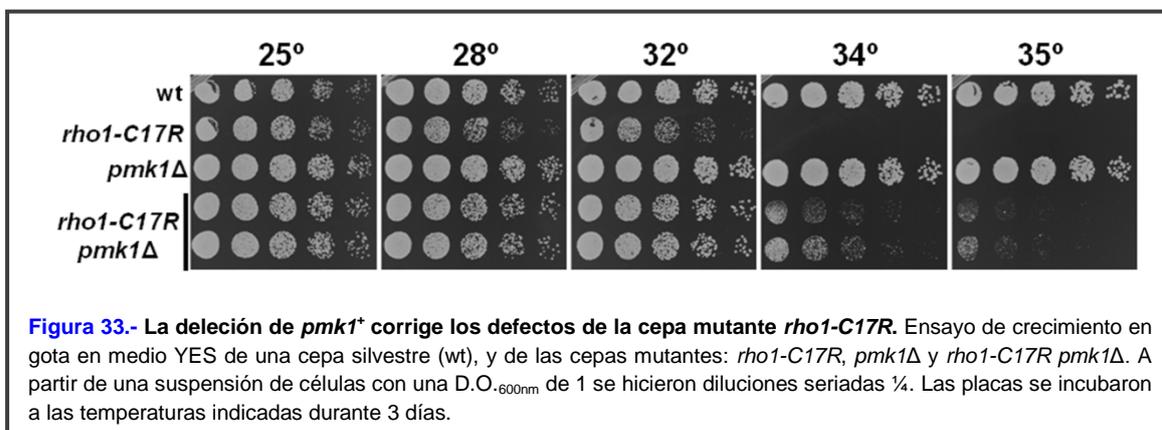


Con el objetivo de corroborar la interacción génica entre *rho1*⁺ y *pmp1*⁺, se comprobó el efecto que tenía la delección de *pmp1*⁺ en la cepa *rho1-C17R*. Para ello se cruzó dicha cepa con la que portaba la delección de esta fosfatasa. La cepa mutante *pmp1*Δ no es termosensible, mientras que la cepa mutante doble *rho1-C17R pmp1*Δ es incapaz de crecer a temperaturas superiores a 28°C (Figura 32A). Las células de esta cepa muestran un 60% de lisis a diferencia de las células *rho1-C17R* que solo presentan un 8% a 28°C (Figura 32B). Por lo tanto, la ausencia de *pmp1*⁺ ocasiona un agravamiento del fenotipo de *rho1-C17R*, mientras que su sobreexpresión lo mejora. Estos datos confirman la existencia de una relación funcional entre Pmp1 y Rho1, y sugieren que la función de esta fosfatasa es necesaria cuando la actividad de Rho1 está comprometida.

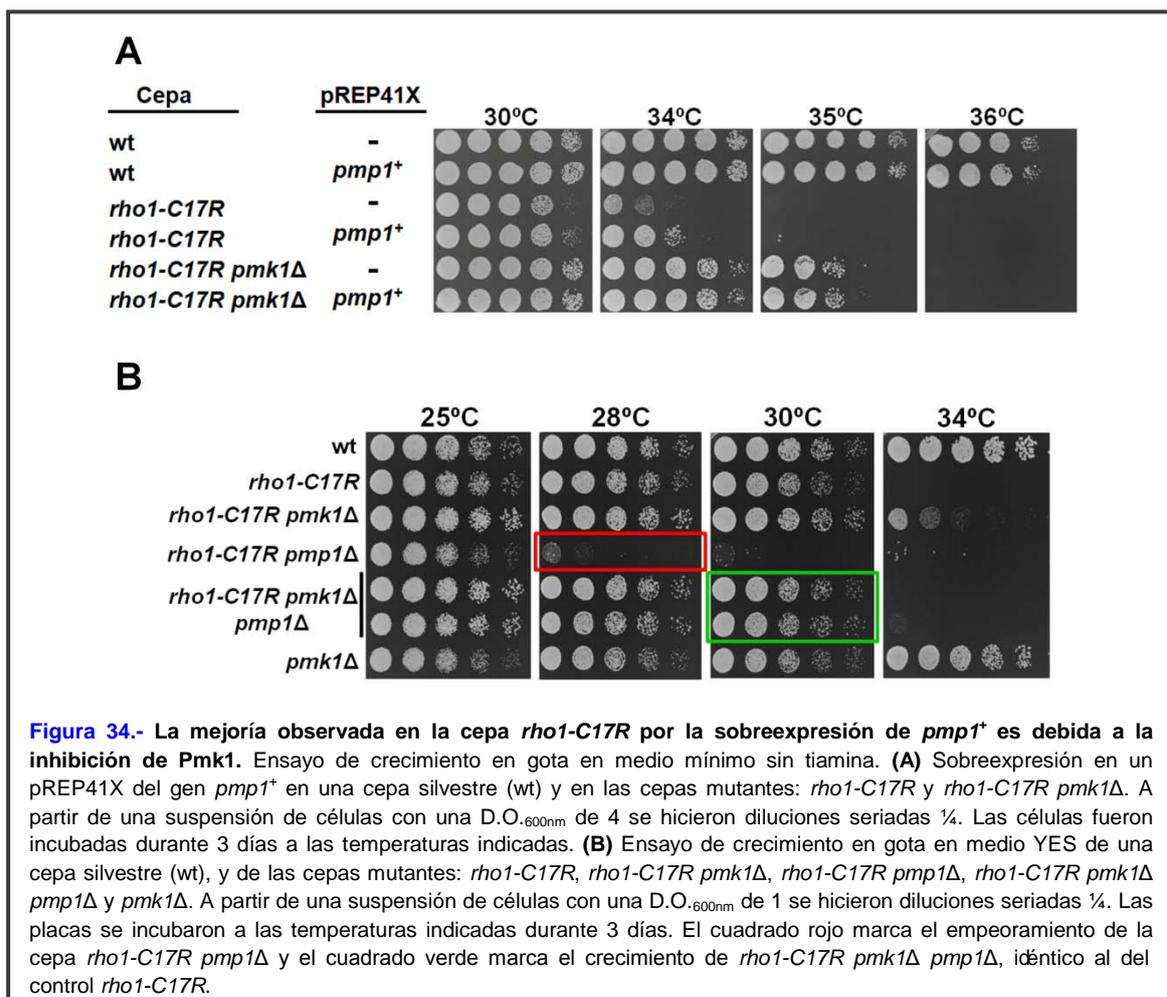


2.3 La MAPK de integridad celular, Pmk1, realiza una función antagonica con Rho1

La MAPK Pmk1 es la única diana conocida de la fosfatasa Pmp1 (Sugiura, *et al.*, 1998). Por ello, se estudió si el efecto positivo en las células *rho1-C17R* causado por la

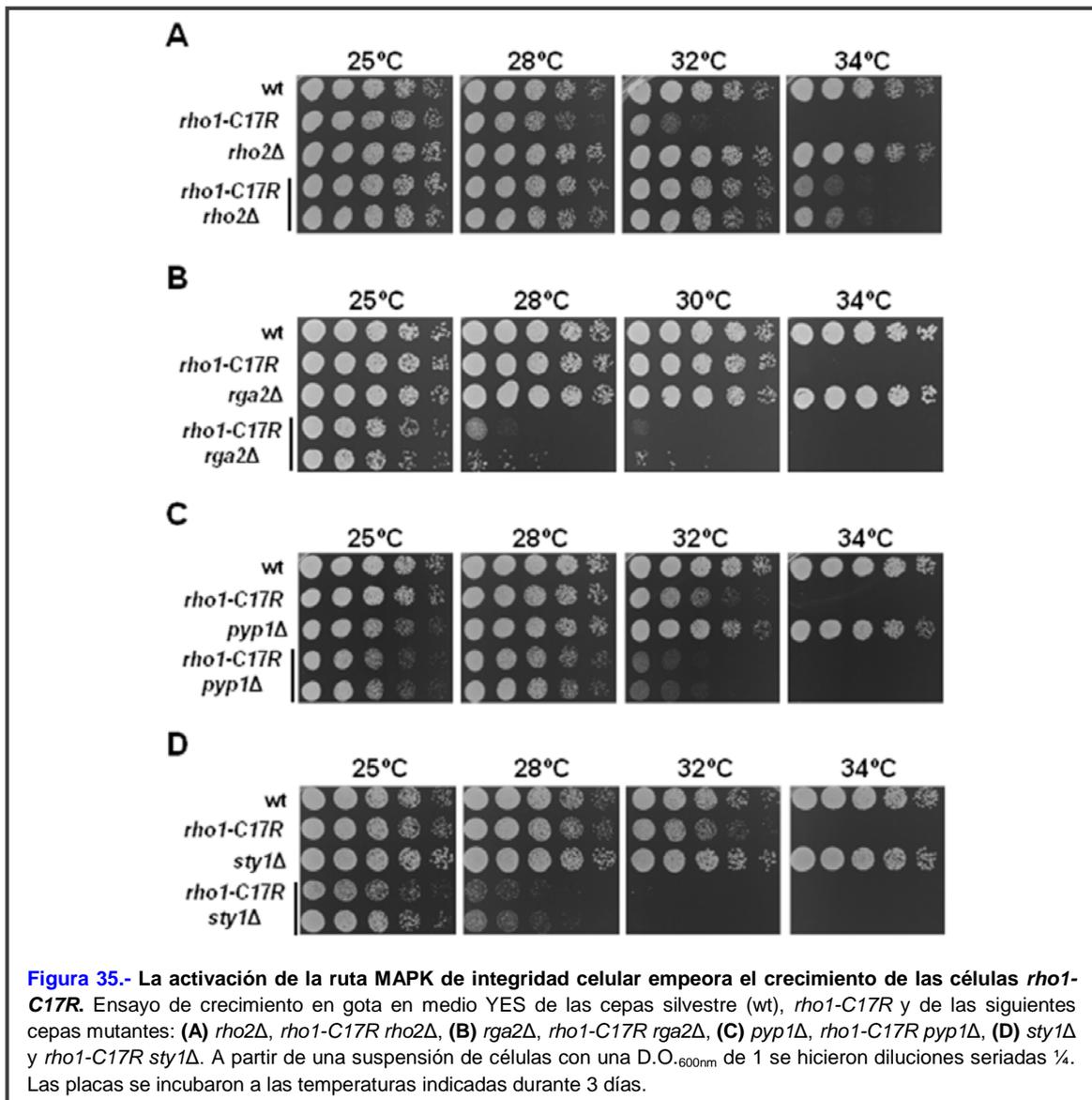


sobreexpresión de *pmp1*⁺ era debido a la inactivación de Pmk1 o era causado por otra diana desconocida de Pmp1. Inicialmente se construyó la cepa mutante doble *rho1-C17R pmk1Δ*. Esta cepa fue capaz de crecer incluso a la temperatura restrictiva de 34°C, lo que implica que la falta de Pmk1 mejora la supervivencia de las células *rho1-C17R* (**Figura 33** y **tabla III**). Con la intención de excluir la posibilidad de que la fosfatasa Pmp1 pudiera estar realizando otros efectos además de la inhibición de Pmk1, se sobreexpresó el gen *pmp1*⁺ en la cepa mutante doble *rho1-C17R pmk1Δ*. Como se puede apreciar en la **figura 34A** la supresión parcial de la termosensibilidad causada por el aumento en cantidad de Pmp1 no fue aditiva con la delección de Pmk1, lo que sugiere que la mejoría producida por Pmp1 es causada por la inhibición de la quinasa. Adicionalmente, se obtuvo la cepa mutante triple *rho1-C17R pmk1Δ pmp1Δ* y se confirmó que la eliminación de la fosfatasa en ausencia de Pmk1 no empeoraba el crecimiento de las células *rho1-C17R* (**Figura 34B**). Todos estos resultados sugieren que la actividad de la MAPK Pmk1 es perjudicial para la cepa *rho1-C17R*.



RESULTADOS

Para corroborar esta conclusión, se realizaron diversos experimentos genéticos. Inicialmente se obtuvo la cepa mutante doble *rho1-C17R rho2Δ*. La GTPasa Rho2 es la principal activadora de la ruta de señalización de la MAPK Pmk1 (Ma, *et al.*, 2006) y también regula la biosíntesis de α -glucano de la pared celular (Calonge, *et al.*, 2000). La ausencia de Rho2 mejoró el crecimiento de la cepa *rho1-C17R* tanto a 32°C como a 34°C (**Figura 35A** y **tabla III**). Estos resultados indican que la bajada en la actividad de Pmk1,



causada por la falta de Rho2, mejora el crecimiento del mutante hipomórfico de *rho1* incluso cuando la biosíntesis de pared celular está afectada. Por otro lado, la delección de otros miembros de la familia de GTPasas Rho tales como Rho3, Rho4, no presentaban un efecto significativo en las células *rho1-C17R*, a excepción de Rho5 cuya ausencia era más perjudicial (**Tabla III**). Para confirmar los resultados relacionados con la falta de Rho2 se realizaron experimentos adicionales. Si la bajada de actividad de la ruta de integridad, por la ausencia de alguno de sus componentes, era capaz de mejorar el

fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*, se esperaría que sucediera lo opuesto cuando se hiperactivara la ruta por la delección de alguno de sus inhibidores. Primero se construyó la cepa mutante doble *rho1-C17R rga2Δ*. La proteína GAP Rga2 es un regulador negativo de Rho2 y de su interacción con Pck2 (Villar-Tajadura, *et al.*, 2008). En su ausencia, por tanto, se incrementan los niveles de Rho2 activa, unida a GTP. Como era de esperar, la cepa mutante doble *rho1-C17R rga2Δ* apenas creció a 28°C (**Figura 35B** y **tabla III**). También se obtuvo la delección de *pyp1⁺* en las células *rho1-C17R*. Pyp1 es una fosfatasa de tirosina que regula negativamente tanto a la MAPK Pmk1 de la ruta de integridad celular, como a la MAPK Sty1 de la ruta de estrés celular (Madrid, *et al.*, 2007). Como se puede ver en la **figura 35C** (y **tabla III**) la cepa mutante doble *rho1-C17R pyp1Δ* no pudo crecer a 32°C. Para descartar que el efecto causado por la eliminación de Pyp1 fuese debido a la activación de Sty1, se realizó la delección de *sty1⁺* en la cepa mutante *rho1-C17R*. En este caso, no se produjo una mejoría en el fenotipo de termosensibilidad como en la delección de *pmk1⁺*, sino que las células *rho1-C17R sty1Δ* crecen pobremente incluso a 28°C (**Figura 35D** y **tabla III**). Estos resultados

Tabla III.- Efecto de la temperatura en el crecimiento en medio YES de diversas cepas dobles mutantes, tomando como referencia a la cepa mutante simple *rho1-C17R*.

		Temperatura (°C)	
		28	32
GTPasas de la familia Rho	<i>rho1-C17R rho2Δ</i>	±	++
	<i>rho1-C17R rho3Δ</i>	±	+
	<i>rho1-C17R rho4Δ</i>	±	±
	<i>rho1-C17R rho5Δ</i>	-	--
Ruta de Integridad Celular	<i>rho1-C17R rga2Δ</i>	--	---
	<i>rho1-C17R rga4Δ</i>	-	-
	<i>rho1-C17R pck2Δ</i>	-	---
	<i>rho1-C17R rgf1Δ</i>	-	--
	<i>rho1-C17R pek1Δ</i>	-	-
	<i>rho1-C17R pmk1Δ</i>	±	++
	<i>rho1-C17R pmp1Δ</i>	--	---
	<i>rho1-C17R atf1Δ</i>	-	--
Ruta de Estrés Celular	<i>rho1-C17R sty1Δ</i>	--	---
	<i>rho1-C17R pyp1Δ</i>	-	--

++ Mejora

+ Mejora moderada

± Similar a *rho1-C17R*

- Empeoramiento leve

-- Empeoramiento grave

--- No crecimiento

indican que la actividad de la MAPK de integridad celular es perjudicial cuando la función de Rho1 está disminuida mientras que la de Sty1 es beneficiosa.

2.4 La mejora en el crecimiento de las células *rho1-C17R* por la ausencia de la actividad de Pmk1 es independiente de la biosíntesis de pared celular

Para intentar comprender mejor la relación funcional entre las proteínas Rho1 y Pmk1, se analizó si el efecto causado por la MAPK estaba relacionado con los defectos de pared presentes en las células *rho1-C17R*. Teniendo en cuenta los resultados anteriores, en los que la presencia del estabilizador osmótico sorbitol a una concentración de 1,2 M, o la delección de *pmk1*⁺ eran capaces de suprimir, parcialmente, el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R* (Figuras 19B y 33), se decidió comprobar su efecto conjunto. Para ello se observó el crecimiento de la cepa mutante doble *rho1-C17R pmk1Δ* en presencia de 1,2 M de sorbitol. Estas células fueron capaces de crecer a 37°C, tal y como hace una cepa silvestre (Figura 36). Este resultado pone de manifiesto que la supresión parcial causada por la delección de *pmk1*⁺ es aditiva con la supresión causada por el sorbitol, sugiriendo que ambas supresiones actúan por

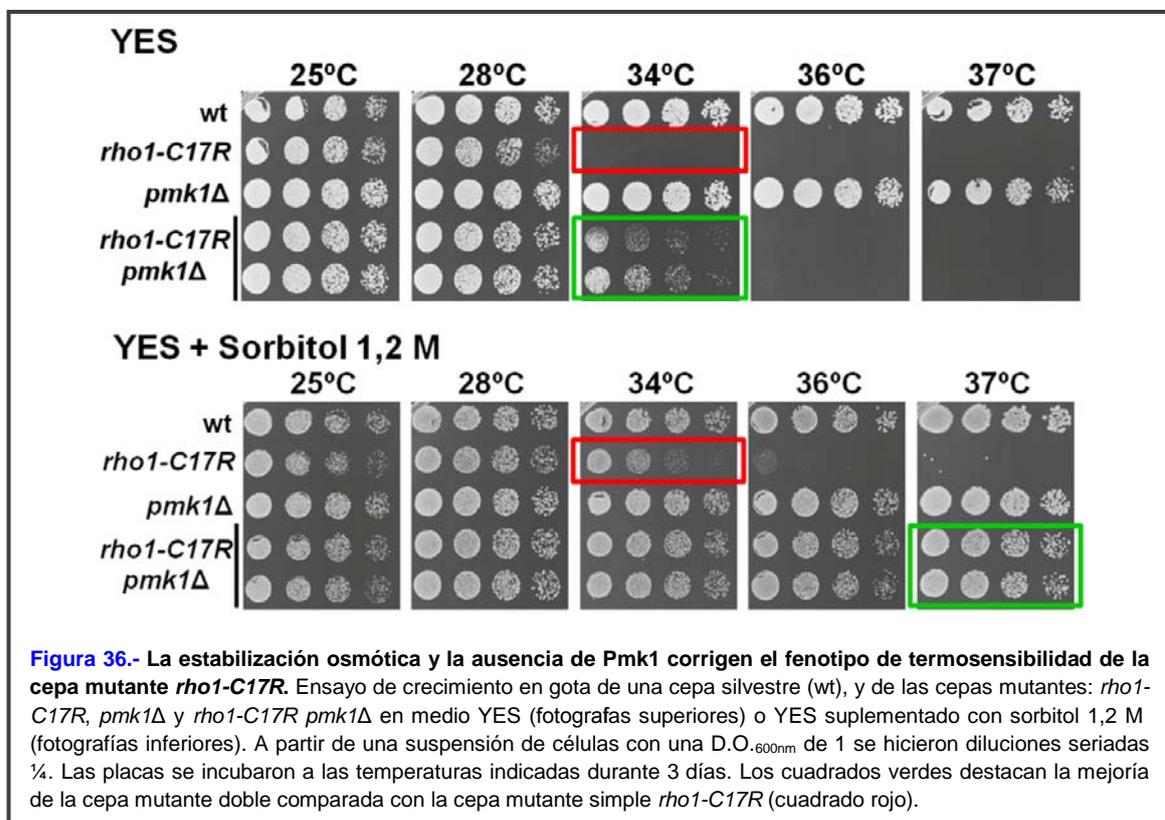
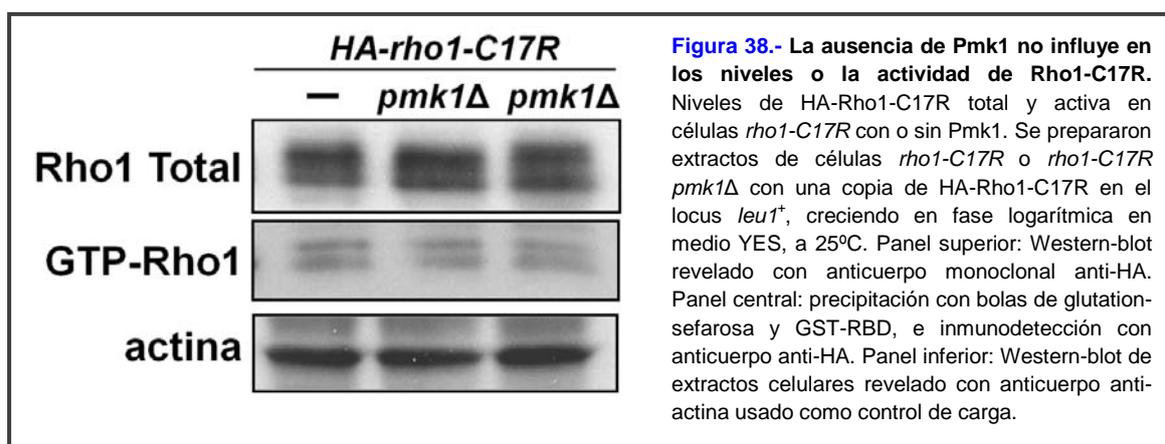
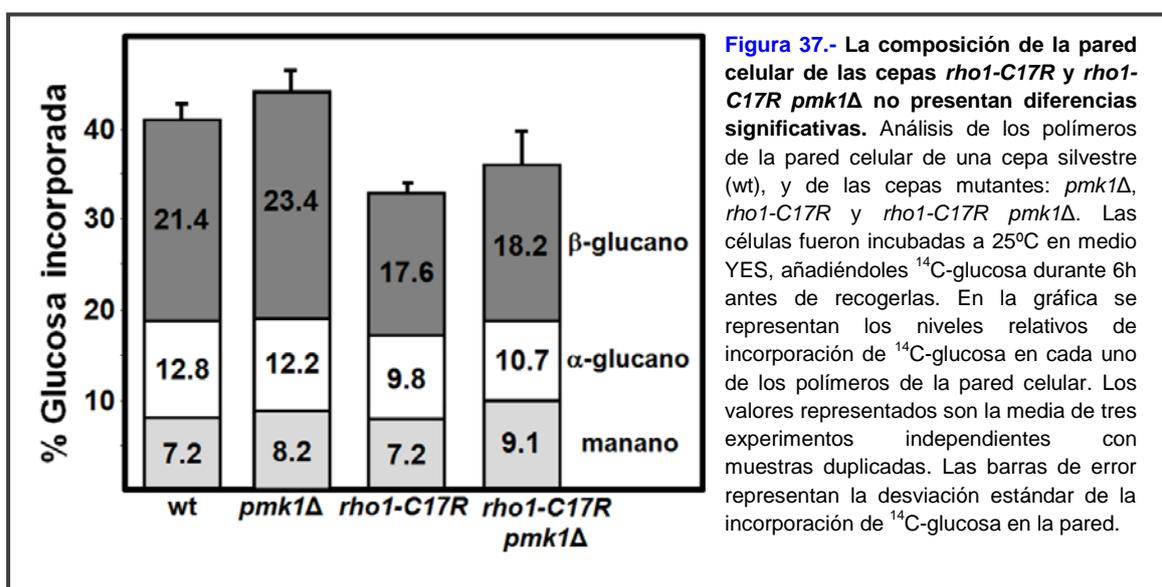


Figura 36.- La estabilización osmótica y la ausencia de Pmk1 corrigen el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*. Ensayo de crecimiento en gota de una cepa silvestre (wt), y de las cepas mutantes: *rho1-C17R*, *pmk1Δ* y *rho1-C17R pmk1Δ* en medio YES (fotografías superiores) o YES suplementado con sorbitol 1,2 M (fotografías inferiores). A partir de una suspensión de células con una D.O._{600nm} de 1 se hicieron diluciones seriadas 1/4. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 3 días. Los cuadrados verdes destacan la mejoría de la cepa mutante doble comparada con la cepa mutante simple *rho1-C17R* (cuadrado rojo).

mecanismos independientes.

Por otra parte, se analizó la composición de los polisacáridos de la pared de las células *rho1-C17R pmk1Δ*. Como se puede ver en la **figura 37** no existen diferencias significativas entre la composición de la pared de estas células y la de la cepa mutante *rho1-C17R*. Estos resultados indican que la supresión del fenotipo de las células *rho1-C17R* causada por la falta de Pmk1 no es debida a un incremento en la biosíntesis de la pared celular. También se midieron los niveles de Rho1-C17R total y activa (unida a GTP) en células con o sin Pmk1 y no se observó ninguna diferencia significativa entre ellas (**Figura 38**). Por lo tanto, la actividad de Rho1-C17R no parece estar afectada por los niveles de Pmk1.

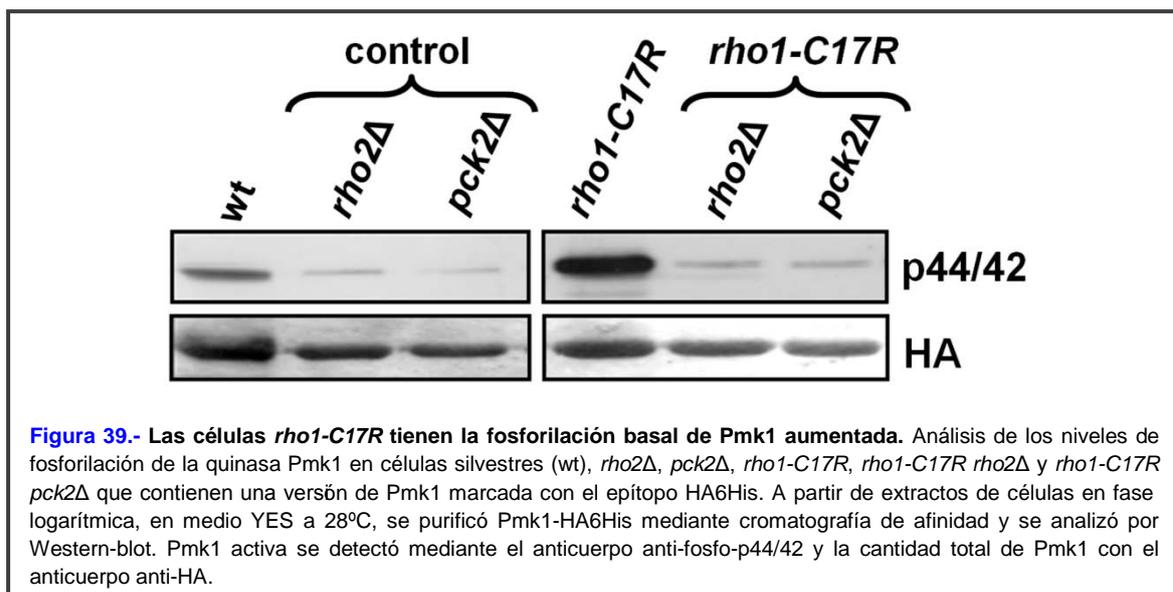


En conjunto, estos tres experimentos demuestran que la supresión del fenotipo de termosensibilidad de *rho1-C17R* producida por la eliminación de Pmk1 no es debida a la

corrección de los daños de la pared celular o al incremento de actividad de Rho1 y, probablemente, se deba a un mecanismo independiente y aún desconocido.

2.5 La fosforilación basal de Pmk1 está aumentada en la cepa mutante *rho1-C17R*

Como se describió anteriormente, la sobreexpresión de *pmp1⁺* era capaz de suprimir parcialmente el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*, al provocar esta fosfatasa un descenso en la actividad de Pmk1 (**Figura 31A**). Esto podría indicar que la ruta MAPK de integridad celular está más activa en la cepa *rho1-C17R*. Para determinarlo, se analizaron los niveles basales de fosforilación de la quinasa Pmk1 en las células *rho1-C17R*, usando un anticuerpo policlonal contra ERK1/2 (p44/42) fosforiladas que es capaz de reconocer la fosforilación doble de Pmk1, y por lo tanto su grado de activación (Sugiura, *et al.*, 1999). Los resultados revelaron que las células *rho1-C17R* presentaban un incremento en la fosforilación basal de Pmk1, en comparación con la cepa silvestre, bajo condiciones normales. Además, este incremento desapareció casi totalmente en las células *rho1-C17R rho2Δ* o *rho1-C17R pck2Δ* (**Figura 39**). Estos datos sugieren que la cepa mutante *rho1-C17R* tiene una activación basal de la ruta de integridad celular, que podría deberse al defecto en la pared celular presente en esta cepa, y que dicha activación está principalmente regulada por Rho2 y Pck2 (Barba, *et al.*, 2008). Otra interpretación podría ser que Rho1 fuera una reguladora negativa de la actividad de Pmk1, y que los niveles bajos de actividad de Rho1 estimulasen la ruta.



Con la intención de discernir cuál de las dos posibles hipótesis pudiera ser la correcta, se realizó un estudio de la cinética de activación y desactivación de la quinasa Pmk1 en diversas condiciones de estrés. Si Rho1 regulase negativamente la ruta MAPK de integridad celular, la activación de Pmk1 en respuesta a distintos estímulos debería prolongarse en el tiempo en las células *rho1-C17R* respecto a las silvestres. Se analizaron los niveles de fosforilación de Pmk1 en células silvestres y *rho1-C17R* sometidas a distintos tipos de estrés como son: estrés hipotónico, estrés hipertónico (KCl 0,6M), y estrés oxidativo (H_2O_2 1 mM). No se vieron diferencias significativas en la cinética de activación de Pmk1 de células silvestres y *rho1-C17R* en respuesta a los estrés mencionados (**Figura 40**). Por tanto, se puede concluir que Rho1 no es un regulador negativo de la ruta MAPK.

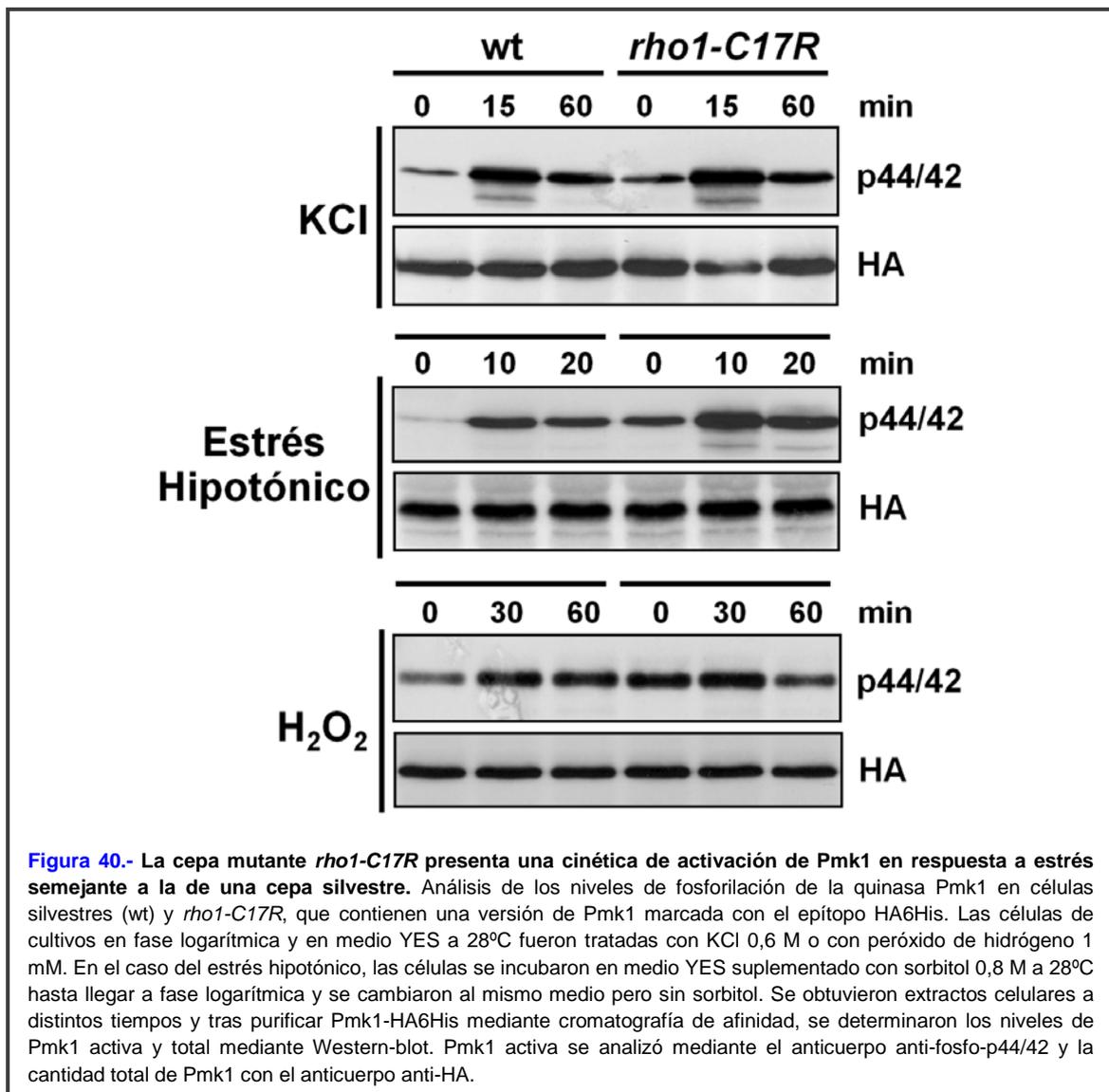
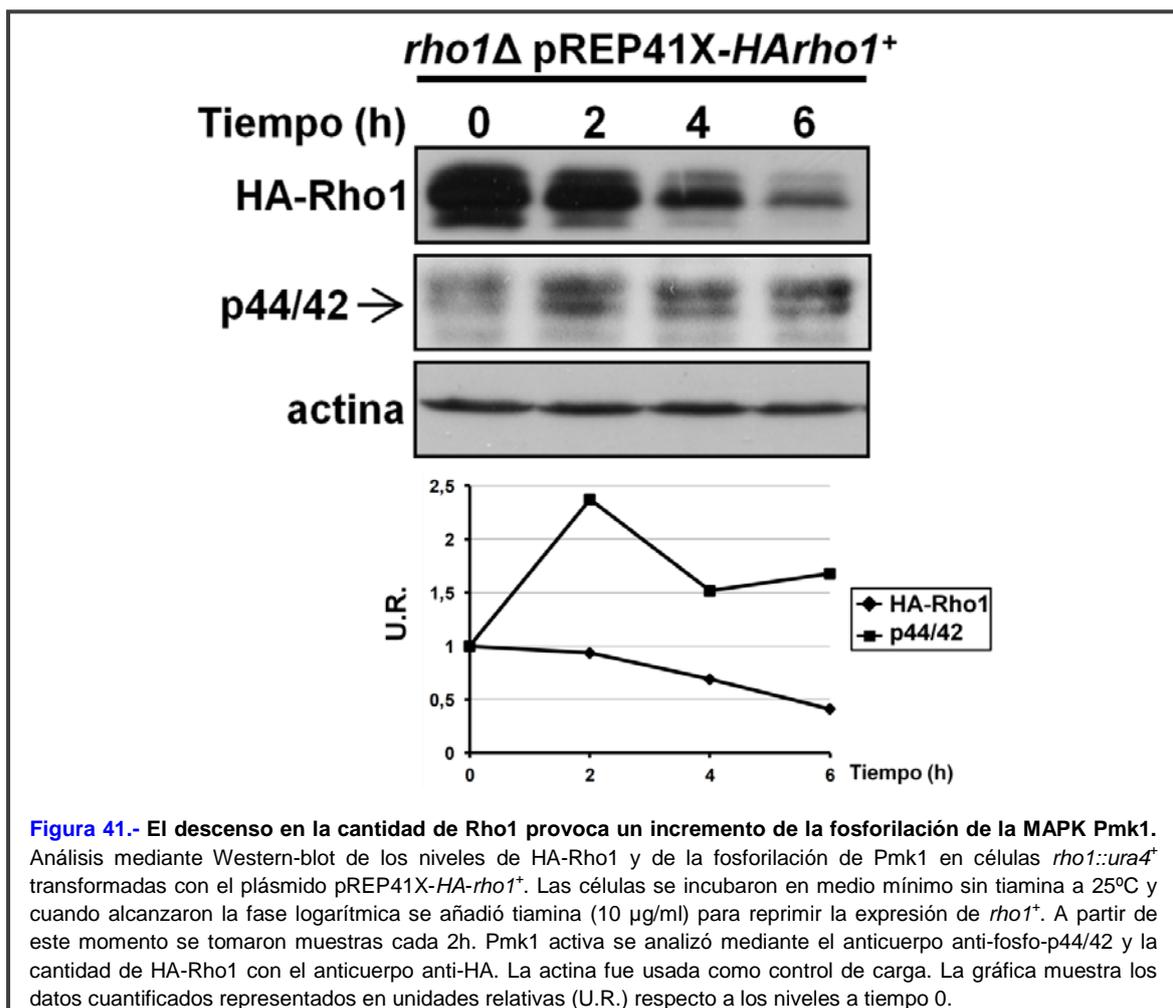


Figura 40.- La cepa mutante *rho1-C17R* presenta una cinética de activación de Pmk1 en respuesta a estrés semejante a la de una cepa silvestre. Análisis de los niveles de fosforilación de la quinasa Pmk1 en células silvestres (wt) y *rho1-C17R*, que contienen una versión de Pmk1 marcada con el epítipo HA6His. Las células de cultivos en fase logarítmica y en medio YES a 28°C fueron tratadas con KCl 0,6 M o con peróxido de hidrógeno 1 mM. En el caso del estrés hipotónico, las células se incubaron en medio YES suplementado con sorbitol 0,8 M a 28°C hasta llegar a fase logarítmica y se cambiaron al mismo medio pero sin sorbitol. Se obtuvieron extractos celulares a distintos tiempos y tras purificar Pmk1-HA6His mediante cromatografía de afinidad, se determinaron los niveles de Pmk1 activa y total mediante Western-blot. Pmk1 activa se analizó mediante el anticuerpo anti-fosfo-p44/42 y la cantidad total de Pmk1 con el anticuerpo anti-HA.

RESULTADOS

Para confirmar que el descenso en la actividad de Rho1 es el causante del aumento de la actividad de Pmk1 observado en la cepa mutante *rho1-C17R* y que no es un efecto exclusivo de este alelo mutante, se analizó si la pérdida de Rho1 pudiera causar un incremento en la fosforilación de Pmk1. Para ello, se utilizó una cepa que portaba el plásmido reprimible por tiamina *pREP41X-HArho1* y en la que el *rho1*⁺ endógeno había sido delecionado (Rincon, *et al.*, 2006), y se cuantificaron los niveles de fosforilación de Pmk1 a medida que disminuía la cantidad de HA-Rho1 (**Figura 41**). Al reprimir la expresión de *HA-rho1* por la adicción de tiamina, se produjo un incremento de la fosforilación de Pmk1, que se detectó desde las 2 horas de represión. La lisis causada por la eliminación de Rho1 en estas células no empieza a ser visible hasta pasadas las 8 horas a 25°C (**Figura 41**).

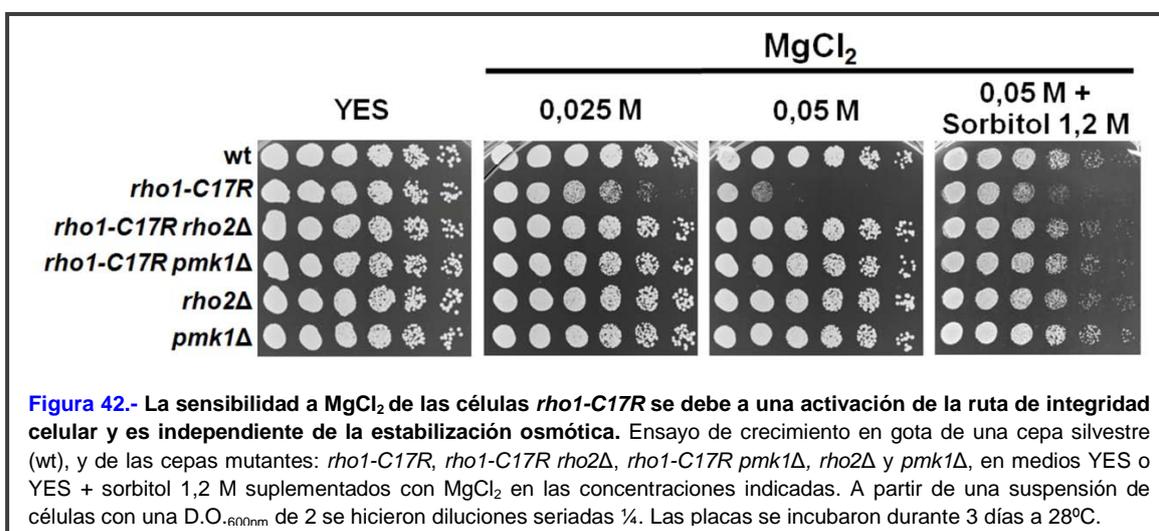
Con estos resultados, se puede concluir que hay un aumento en la fosforilación de Pmk1 al producirse un descenso de Rho1. Este aumento es, probablemente, debido a los daños en la pared celular presentes en las células *rho1-C17R* y no porque Rho1 sea un inhibidor negativo de la ruta de integridad.



3. INTERACCIÓN DE LA GTPasa RHO1 CON LA FOSFATASA CALCINEURINA

3.1 La viabilidad de las células *rho1-C17R* es dependiente de la actividad de la calcineurina (Ppb1)

Con el fin de caracterizar los efectos de la mutación *rho1-C17R*, se realizaron diversos ensayos para establecer la sensibilidad de estas células a distintas sales (resultados resumidos en **Apéndice I**). En estos ensayos se comprobó que la cepa *rho1-C17R* era considerablemente más sensible a $MgCl_2$ que la cepa silvestre. Este fenotipo de hipersensibilidad es típico de la activación de la MAPK Pmk1 que, como ya se demostró, tiene un nivel de activación basal más alto en la cepa mutante. Cuando se analizó la sensibilidad a $MgCl_2$ de las células *rho1-C17R* en presencia del estabilizador osmótico sorbitol, a una concentración 1,2 M, se comprobó que las células seguían siéndolo (**Figura 42**). Sin embargo, si se eliminaba la señalización de la ruta MAPK delecionando componentes activadores como *rho2⁺* o *pmk1⁺* en estas células, se suprimía la sensibilidad a $MgCl_2$ en medio con o sin sorbitol.



Otra característica típica de las células que presentan activación de Pmk1 es la hipersensibilidad al fármaco inmunosupresor tacrólimus (FK506), el cual provoca la inactivación de la fosfatasa calcineurina (Sugiura, *et al.*, 2002; Sugiura, *et al.*, 1998). Para comprobar el efecto de este compuesto en la cepa mutante *rho1-C17R* se cuantificó el porcentaje de lisis y se realizó un ensayo de crecimiento con y sin sorbitol a 28°C en presencia de distintas concentraciones de FK506. Como era de esperar, las células *rho1-C17R* también presentaron una gran sensibilidad a este compuesto en comparación con las células silvestres en ambos medios (**Figura 43A**). Además, el porcentaje de lisis

RESULTADOS

celular aumentó considerablemente a partir de las 3 h en presencia de FK506 0,5 μM , superando el 38%, mientras que en ausencia de FK506 la lisis no alcanzó el 10% (**Figura 43B**).

Previamente se había demostrado que la MAPK Pmk1, juega un papel antagónico en la homeostasis del cloro con respecto a la calcineurina (Sugiura, *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta este dato y que la cepa mutante *rho1-C17R* es altamente sensible a FK506, se analizó el efecto de este compuesto en las células *rho1-C17R* cuando se eliminaba la señalización de la ruta MAPK de integridad celular al deletar los genes *rho2⁺* o *pmk1⁺*. Sorprendentemente, se observó que la hipersensibilidad a FK506 de la cepa *rho1-C17R* era corregida al eliminar la ruta MAPK de integridad (**Figura 43A**). Lo

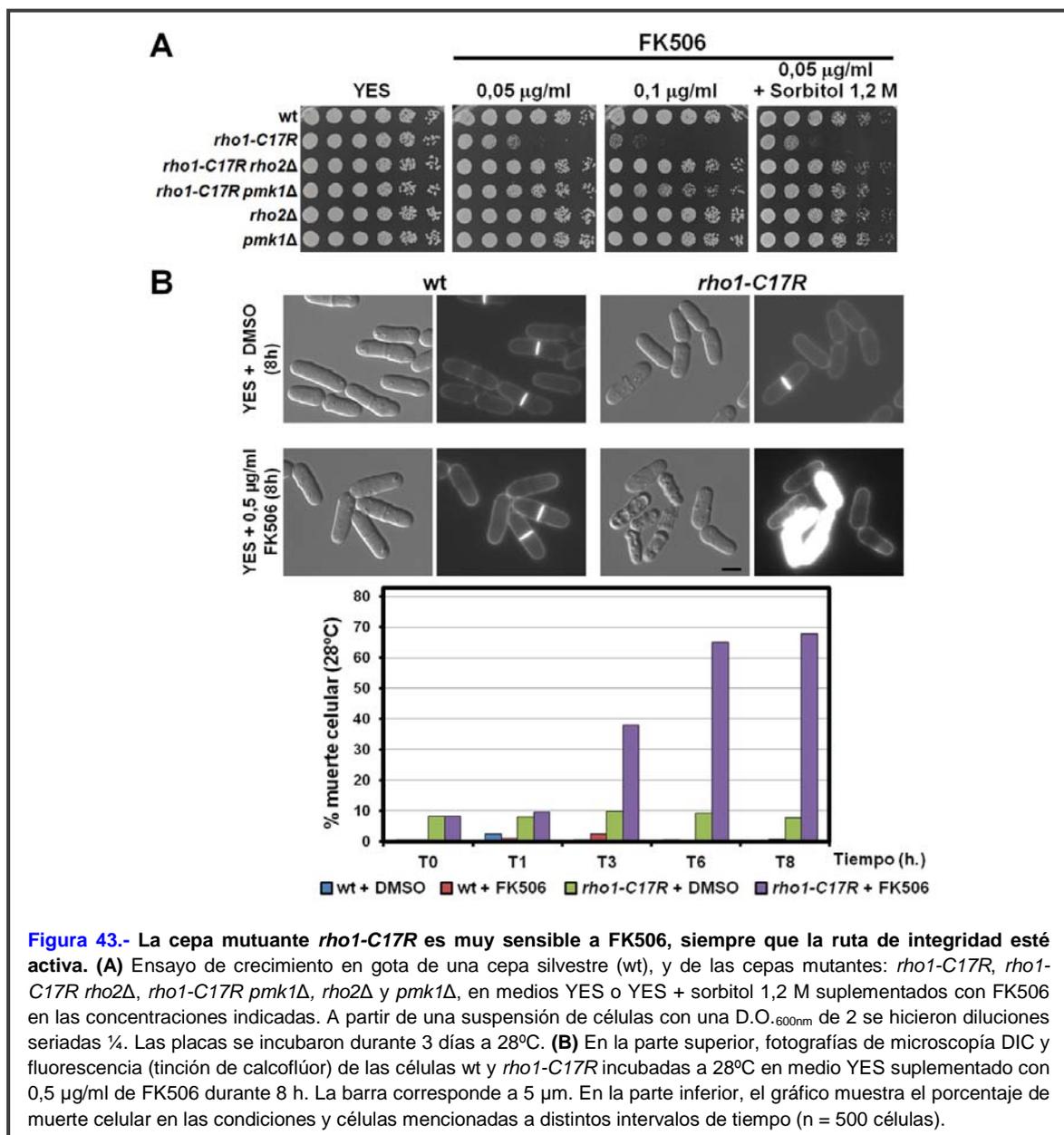


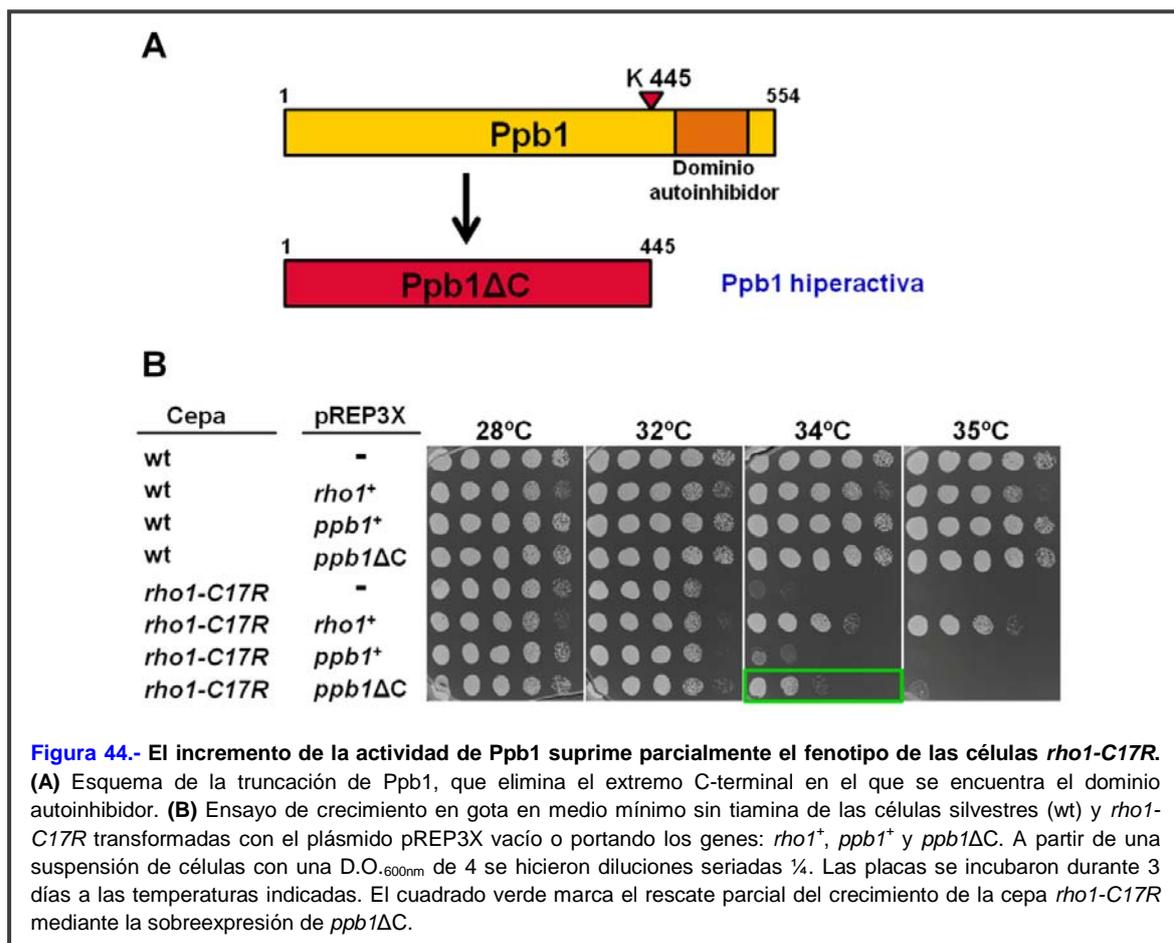
Figura 43.- La cepa mutante *rho1-C17R* es muy sensible a FK506, siempre que la ruta de integridad esté activa. **(A)** Ensayo de crecimiento en gota de una cepa silvestre (wt), y de las cepas mutantes: *rho1-C17R*, *rho1-C17R rho2 Δ* , *rho1-C17R pmk1 Δ* , *rho2 Δ* y *pmk1 Δ* , en medios YES o YES + sorbitol 1,2 M suplementados con FK506 en las concentraciones indicadas. A partir de una suspensión de células con una D.O._{600nm} de 2 se hicieron diluciones seriadas 1/4. Las placas se incubaron durante 3 días a 28°C. **(B)** En la parte superior, fotografías de microscopía DIC y fluorescencia (tinción de calcofluor) de las células wt y *rho1-C17R* incubadas a 28°C en medio YES suplementado con 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de FK506 durante 8 h. La barra corresponde a 5 μm . En la parte inferior, el gráfico muestra el porcentaje de muerte celular en las condiciones y células mencionadas a distintos intervalos de tiempo (n = 500 células).

que llevó a considerar la hipótesis de que Rho1 pudiera tener una función junto con la calcineurina de la cual es antagonista la actividad de la MAPK Pmk1.

Para demostrar esta hipótesis se intentó obtener la cepa mutante doble de *rho1-C17R* con la delección de los genes *ppb1⁺* o *cnb1⁺*, que codifican la subunidad catalítica y reguladora de la calcineurina respectivamente (Sio, *et al.*, 2005). Sin embargo, las cepas mutantes dobles no eran viables, ni siquiera en presencia de un estabilizador osmótico (datos no mostrados). Tampoco fue viable la cepa mutante triple *rho1-C17R pmk1Δ ppb1Δ* por lo que es muy probable que la calcineurina juegue un papel esencial en la viabilidad celular, cuando la actividad de Rho1 esté disminuida.

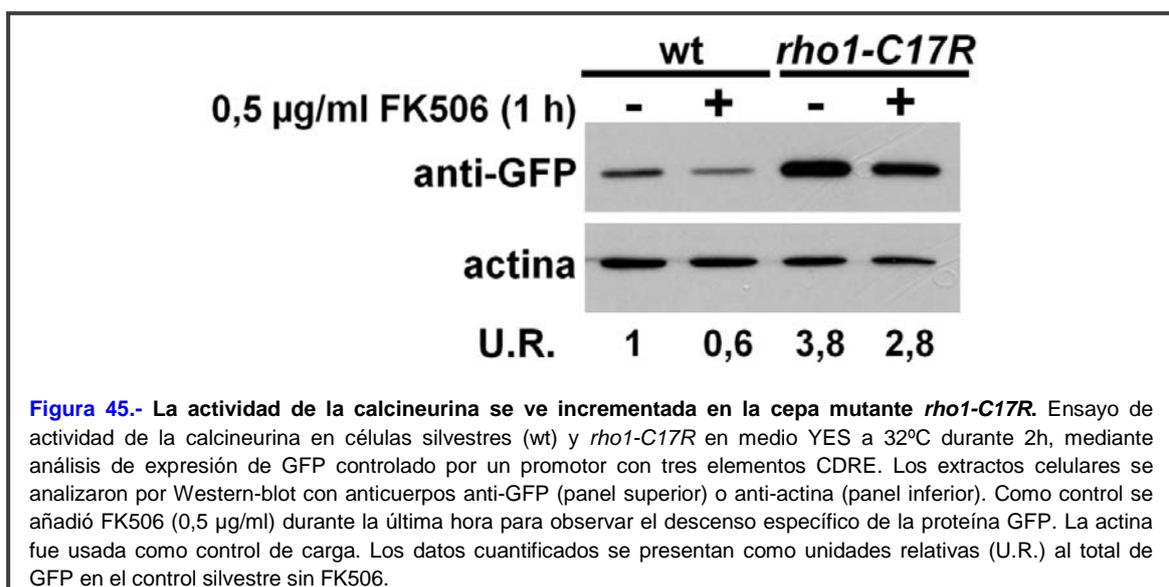
3.2 Una baja actividad de Rho1 provoca que se necesite y se active la fosfatasa calcineurina

Teniendo en cuenta que la delección de cualquiera de las subunidades de la calcineurina es letal en la cepa mutante *rho1-C17R* y que esta cepa es muy sensible a la

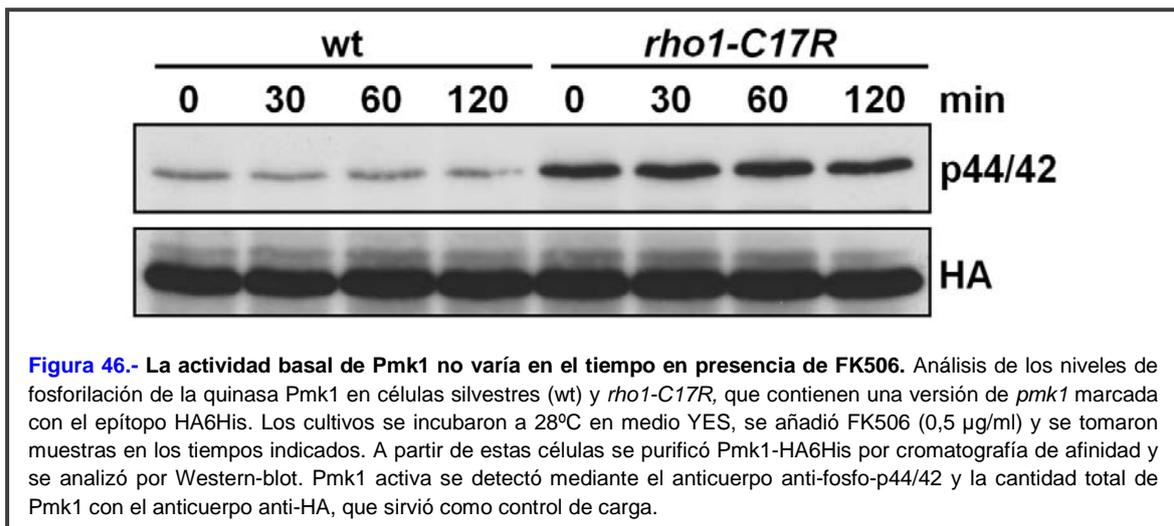


inhibición de la fosfatasa mediante el uso del compuesto FK506, se analizó si un incremento en la actividad de la calcineurina pudiera compensar los defectos de Rho1 en las células *rho1-C17R*. Para lo cual, se transformaron estas células con un plásmido de sobreexpresión (pREP3X) que portaba una versión de la subunidad catalítica sin su extremo C-terminal. Se ha descrito que esta versión truncada genera una fosfatasa independiente del complejo Ca^{2+} /Calmodulina para su activación, y por lo tanto, se mantiene constitutivamente activa (Sugiura, *et al.*, 1998) (**Figura 44A**). Como cabía esperar, un incremento ectópico en la actividad de la calcineurina fue capaz de compensar parcialmente el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R* ya que permitió un crecimiento parcial a 34°C (**Figura 44B**).

Puesto que el aumento en la actividad de la calcineurina podía corregir parcialmente a las células *rho1-C17R*, se examinó el estado de esta fosfatasa *in vivo* mediante un ensayo que mide la activación de la vía de señalización de la calcineurina. Para ello se utilizó una cepa que portaba una copia integrada del gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) controlado por un promotor con tres elementos de respuesta a la calcineurina (CDRE) (Kume, *et al.*, 2011). De tal forma que la expresión de este gen es proporcional a la activación de la calcineurina. Cuanto más activa esté la calcineurina, mayor será la activación de su factor de transcripción, Prz1, que reconoce a estos CDREs y por tanto, mayor será la producción de GFP. Así, mediante ensayos de Western-blot utilizando extractos de células silvestres y *rho1-C17R* se comprobó que se producía un incremento de, al menos, 3,8 veces de la actividad de la calcineurina en células *rho1-C17R* con respecto a las células silvestres (**Figura 45**). Este incremento de la proteína *reporter* era específico ya que en presencia de FK506 se producía una bajada del mismo.



Tras este resultado, se consideró la posibilidad de que la calcineurina pudiera estar más activa con objeto de inhibir la activación de la MAPK de la ruta de integridad, Pmk1. Por lo que se analizó si la actividad de esta quinasa se incrementaba con el tiempo al exponer las células al inhibidor FK506. Sin embargo, no se observó ningún aumento en la fosforilación basal de Pmk1, lo que significa que la calcineurina no regula de forma directa o indirecta la actividad de esta quinasa (**Figura 46**).



En conjunto, estos resultados sugieren que la señalización de la calcineurina es activada y requerida para la supervivencia, cuando la actividad de Rho1 está comprometida.

3.3 La interacción funcional de Rho1 y Ppb1 no es dependiente del factor de transcripción Prz1

El factor de transcripción Prz1 media alguna de las señales de la calcineurina. Su homólogo en *S. cerevisiae*, el factor de transcripción de respuesta a calcineurina, Crz1 (Stathopoulos y Cyert, 1997), es el encargado de intervenir en la mayor parte de la señalización celular producida por esta fosfatasa. Por ejemplo, como consecuencia de un daño en la pared celular, Crz1 induce la expresión del gen *FKS2*, que codifica una de las subunidades catalíticas de la glucán sintasa (Zhao, *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta este dato, que la cepa mutante *rho1-C17R* tiene graves problemas en la pared celular y que la delección de la calcineurina es letal en esta cepa, se investigó si la función esencial de Ppb1 en la cepa mutante *rho1-C17R* pudiera ser mediada por Prz1. De ser así, la falta de este factor de transcripción tendría un efecto similar a la ausencia o la inhibición de Ppb1. Para ello se realizó la delección del gen *prz1*⁺ en la cepa mutante *rho1-C17R* y se analizó

su crecimiento a distintas temperaturas. Como se puede ver en la **figura 47**, la ausencia de este factor de transcripción no afectó significativamente al crecimiento de la cepa *rho1-C17R*. Por lo tanto, este resultado indica que la interacción funcional que se describe en esta memoria entre Rho1 y la fosfatasa calcineurina, no es dependiente de la activación de la transcripción por parte de Prz1.

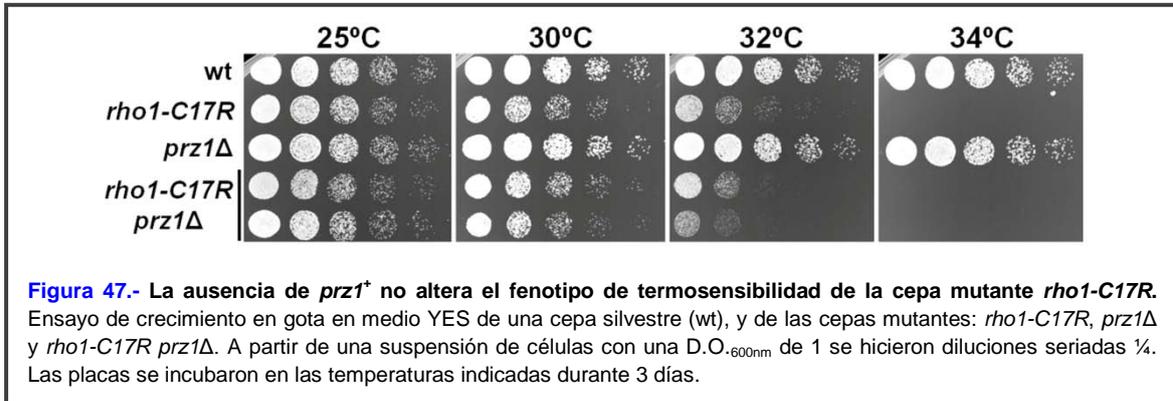


Figura 47.- La ausencia de *prz1*⁺ no altera el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*. Ensayo de crecimiento en gota en medio YES de una cepa silvestre (wt), y de las cepas mutantes: *rho1-C17R*, *prz1Δ* y *rho1-C17R prz1Δ*. A partir de una suspensión de células con una D.O._{600nm} de 1 se hicieron diluciones seriadas 1/4. Las placas se incubaron en las temperaturas indicadas durante 3 días.

3.4 Rho1 y Ppb1 interaccionan

Teniendo en cuenta que la relación funcional que presentan Rho1 y Ppb1 no dependía del factor de transcripción, se consideró la posibilidad de que existiese

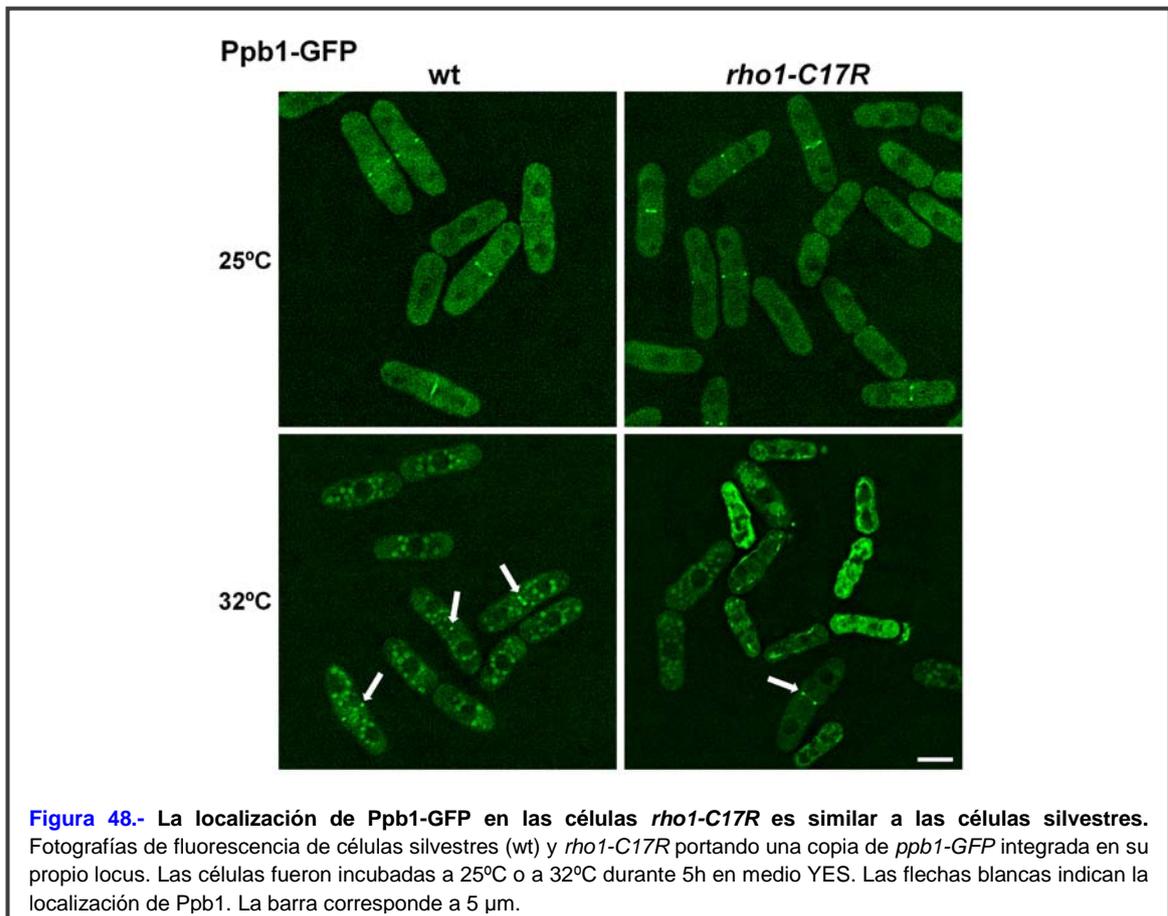
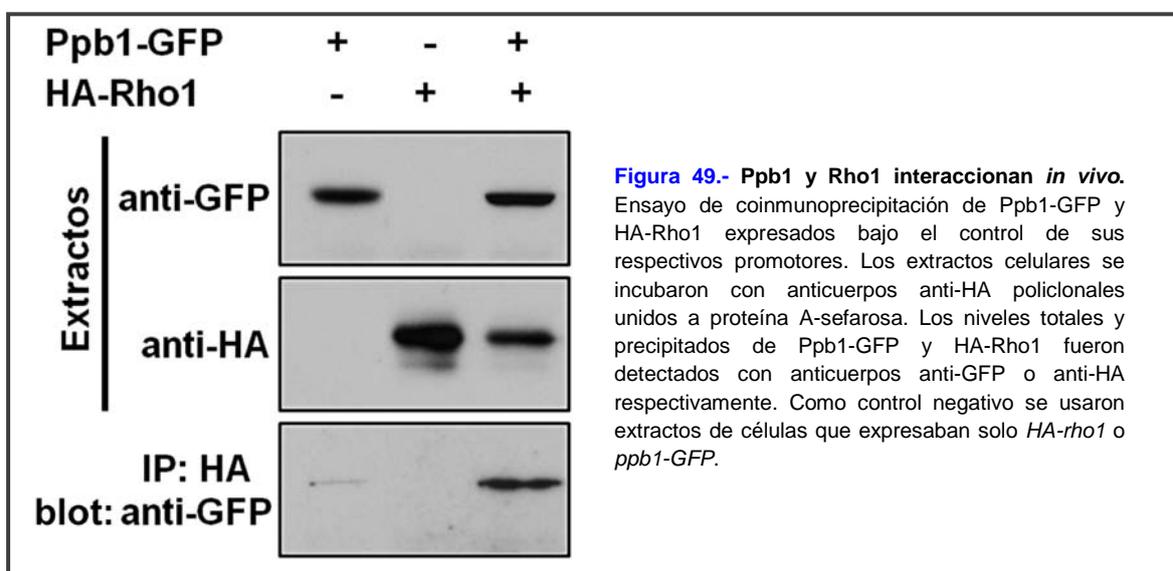


Figura 48.- La localización de Ppb1-GFP en las células *rho1-C17R* es similar a las células silvestres. Fotografías de fluorescencia de células silvestres (wt) y *rho1-C17R* portando una copia de *ppb1-GFP* integrada en su propio locus. Las células fueron incubadas a 25°C o a 32°C durante 5h en medio YES. Las flechas blancas indican la localización de Ppb1. La barra corresponde a 5 μm.

interacción directa entre ambas proteínas. En primer lugar se construyó una cepa que expresaba de forma endógena Ppb1 fusionada a GFP en su extremo carboxilo. Mediante microscopia de fluorescencia, se comprobó que Ppb1-GFP se localizaba en el citoplasma y en la zona media de la célula formando un anillo durante la citoquinesis (**Figura 48**). Dicha localización se mantuvo en las células *rho1-C17R*, con baja actividad de Rho1, a 25°C y a 32°C por lo que no parece depender de esta GTPasa (**Figura 48**).

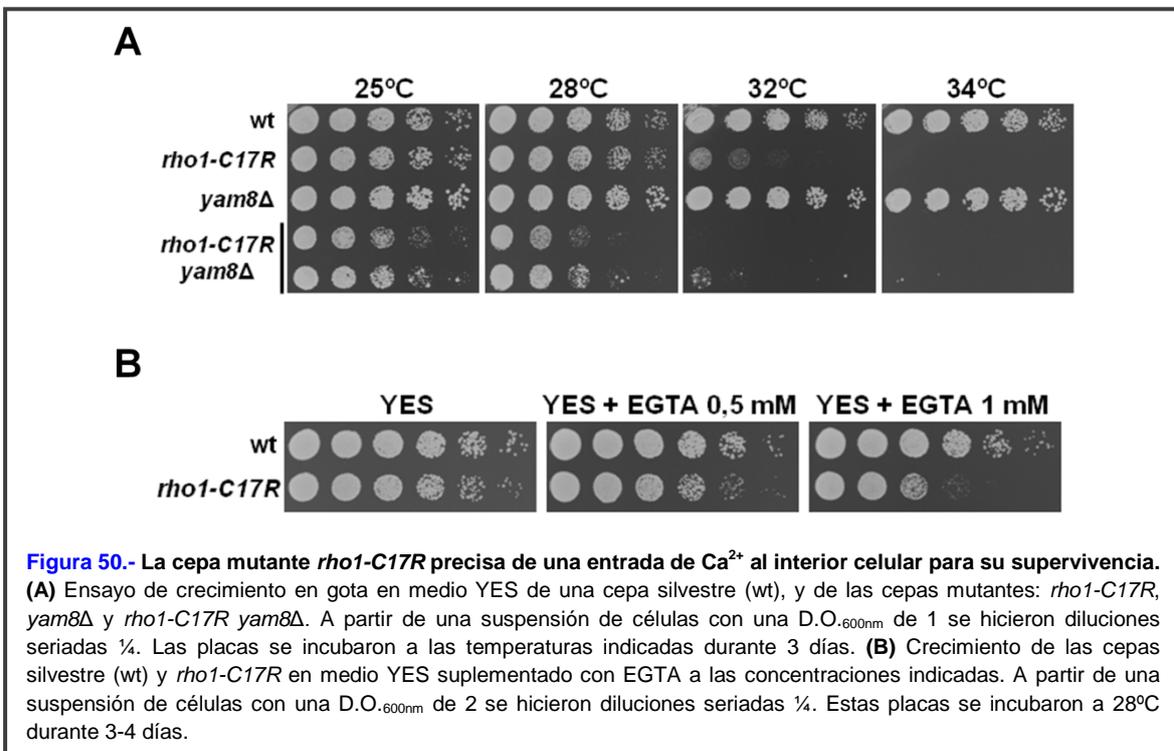
A continuación, se realizó un ensayo de coimmunoprecipitación entre HA-Rho1 y Ppb1-GFP, ambas expresadas en niveles endógenos, y se observó que sí existía interacción entre ambas proteínas (**Figura 49**). Es posible, por tanto, que Rho1 sea una diana de la calcineurina, o que ambas proteínas ejerzan su acción conjuntamente sobre una tercera proteína (Palmer, *et al.*, 2005).



3.5 La entrada de Ca²⁺ al interior celular es necesaria cuando la función de Rho1 está comprometida

Se ha descrito que una de las funciones antagónicas realizadas por la quinasa Pmk1 y por la fosfatasa calcineurina es la activación e inactivación, respectivamente, del canal formado por Ehs1/Yam8 y Cch1 (Ma, *et al.*, 2011). Este canal permite el transporte del Ca²⁺ desde el exterior al interior celular en *S. pombe* (Carnero, *et al.*, 2000). Los altos niveles de Ca²⁺ intracelular pueden causar la muerte y la cepa mutante *rho1-C17R* presenta una mayor actividad basal de la ruta de integridad celular y, por lo tanto, un mayor flujo al citosol de este ion. Por ello, se quiso comprobar si se podía apreciar una mejoría en las células *rho1-C17R* en ausencia del canal de Ca²⁺. Se construyó la cepa

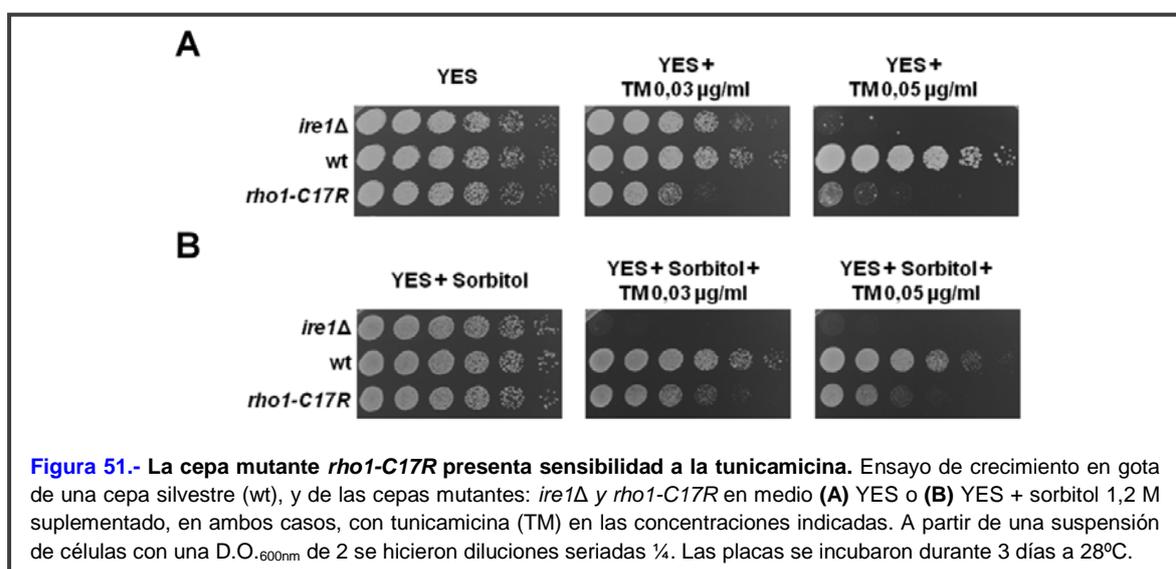
mutante doble *rho1-C17R yam8Δ* y se llevó a cabo un ensayo de crecimiento a diversas temperaturas. Sorprendentemente, se observó un empeoramiento marcado en el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante doble *rho1-C17R yam8Δ* respecto a *rho1-C17R* y, por tanto, una interacción génica negativa entre estos dos genes (**Figura 50A**). Una posible interpretación es que al no disponer las células del Ca^{2+} suficiente, se produzca la inactivación de la proteína calcineurina (fosfatasa dependiente de Ca^{2+}) que, como ya se ha demostrado, es esencial para la viabilidad celular cuando hay una baja actividad de Rho1. Corroborando esta hipótesis, se comprobó que si se limita la disponibilidad de Ca^{2+} extracelular mediante la adición de un agente quelante al medio de cultivo (EGTA 1mM) también se dificulta el crecimiento de las células *rho1-C17R* (**Figura 50B**). Por lo tanto, la cepa mutante *rho1-C17R* necesita la entrada de Ca^{2+} al interior celular para poder sobrevivir.



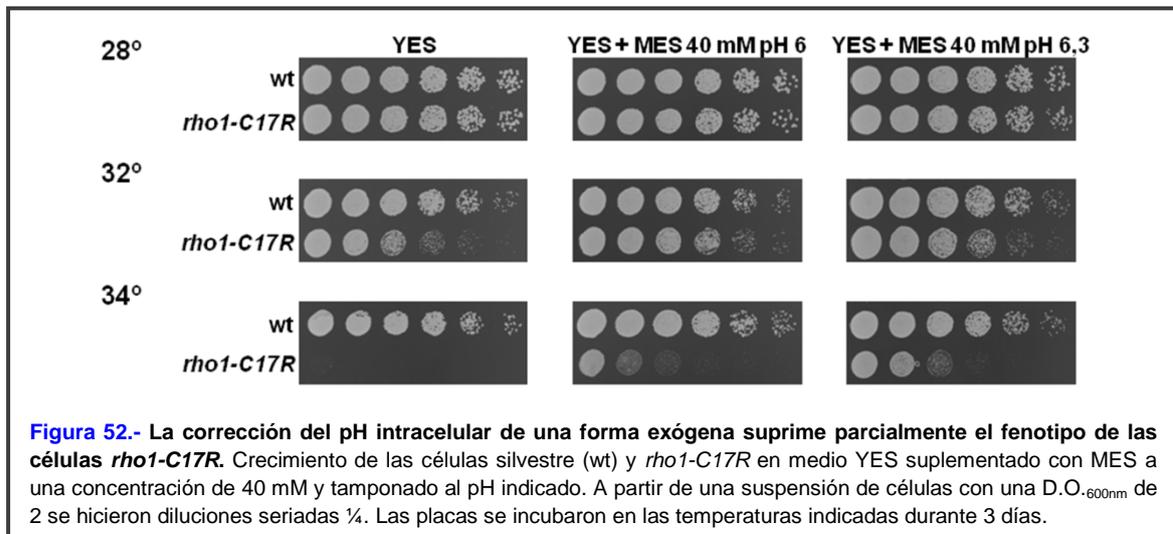
3.6 Presencia de estrés de retículo endoplásmico en respuesta a una baja actividad de la GTPasa Rho1

El estrés de retículo endoplásmico provoca una respuesta a proteínas mal plegadas (UPR), muy bien caracterizada, que incrementa la transcripción de diferentes genes que codifican chaperonas y enzimas implicadas en el plegamiento proteico. En *S. cerevisiae* el estrés de retículo, mediante la intervención de la ruta MAPK de integridad

celular, también provoca una entrada de Ca^{2+} al citosol, así como la activación de la calcineurina (Bonilla y Cunningham, 2003; Bonilla, *et al.*, 2002; Deng, *et al.*, 2006). Esta activación es necesaria para la supervivencia de diferentes especies de levadura en respuesta al estrés de retículo (Bonilla, *et al.*, 2002; Kim, *et al.*, 2012; Lustoza, *et al.*, 2011). Se ha descrito también, que los problemas en la pared celular pueden activar componentes de la respuesta a estrés de retículo (Bonilla y Cunningham, 2003; Scrimale, *et al.*, 2009). Teniendo en cuenta que la cepa mutante *rho1-C17R* necesita calcineurina activa para su supervivencia y que presenta graves defectos en la pared celular, se consideró la posibilidad de que el alelo *rho1-C17R* pudiera estar causando estrés de retículo endoplasmático en las células. Para comprobar esta hipótesis, se analizó la sensibilidad de las células mutantes a estrés de retículo inducido por ditioneitol (DTT) o por tunicamicina (TM). El DTT inhibe la formación de los puentes disulfuro y la TM la N-glicosilación, lo que provoca en ambos casos la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo y por tanto, la activación de la UPR. Como control positivo, sensible a estrés de retículo, se utilizó la delección de la quinasa/nucleasa Ire1, requerida para iniciar la UPR (Ron y Walter, 2007). Las células mutantes *rho1-C17R* mostraron un ligero aumento de sensibilidad a DTT (**Apéndice I**) pero la hipersensibilidad a TM fue mucho más marcada (**Figura 51A**). Esta sensibilidad, aunque más leve, se mantuvo incluso en presencia del estabilizador osmótico sorbitol 1,2 M (**Figura 51B**). Estos datos sugieren la necesidad de una correcta función de Rho1 para poder hacer frente a una acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático. También podrían indicar la existencia de un estrés de retículo basal en las células con baja actividad de Rho1, de forma que un aumento de dicho estrés provocado por la tunicamicina sería letal. Si esta hipótesis fuese correcta, se explicaría la necesidad de Ca^{2+} y de calcineurina para la supervivencia de las células *rho1-C17R*.



Se ha propuesto que la muerte producida por estrés de retículo es causada por un aumento de la permeabilidad vacuolar que provoca la acidificación celular (Kim, *et al.*, 2012). Si esto ocurriese en las células *rho1-C17R*, el aumento de pH externo mejoraría el crecimiento celular ya que *S. pombe* es muy sensible al pH del medio. Como se muestra en la **figura 52**, la utilización de medio YES tamponado con MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) a pH 6,0 o 6,3 suprimió parcialmente la termosensibilidad de las células *rho1-C17R*.



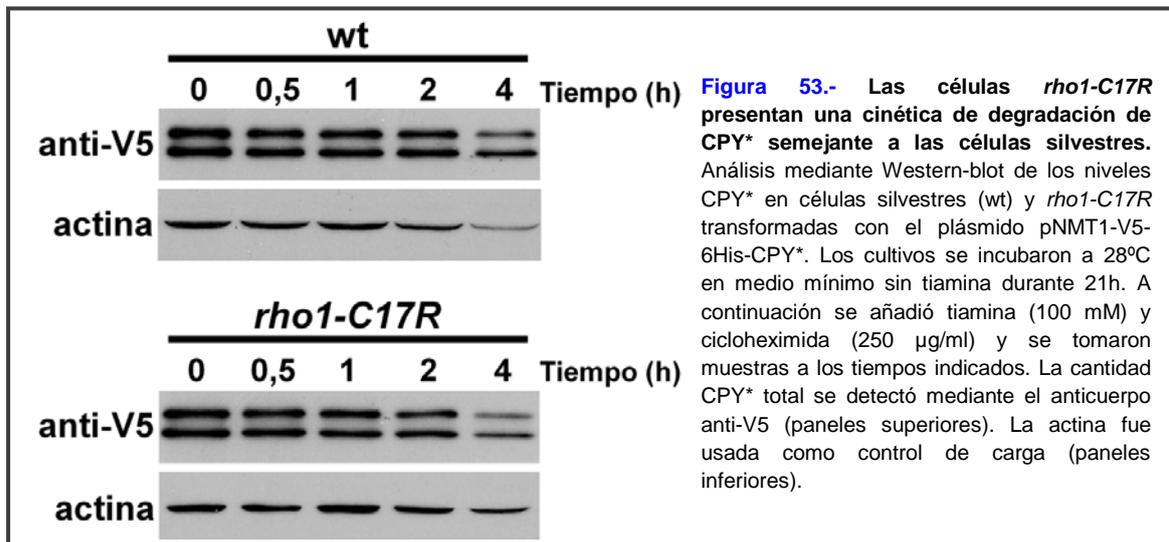
3.7 Las células *rho1-C17R* no presentan una ERAD defectuosa

El retículo endoplasmático es el lugar donde las proteínas de membrana y las que se secretan son plegadas correctamente, por lo que este orgánulo está equipado con una gran cantidad de sistemas que controlan la síntesis y plegamiento de las proteínas (Hoseki, *et al.*, 2010). Estos sistemas de control de calidad del retículo son capaces de discernir entre proteínas correctamente e incorrectamente plegadas, reteniendo a estas últimas e intentando que adquieran una conformación adecuada antes de salir del retículo (Ellgaard y Helenius, 2003; Hoseki, *et al.*, 2010). Adicionalmente, aquellas proteínas que no pueden ser plegadas correctamente son selectivamente transportadas desde el retículo al citosol, ubiquitinadas y degradadas por el proteosoma. A este proceso se le denomina “Degradación asociada al retículo endoplasmático” o ERAD (Hoseki, *et al.*, 2010; Vembar y Brodsky, 2008).

Para comprobar si la cepa mutante *rho1-C17R* pudiera presentar un mal funcionamiento de esta degradación asociada a retículo que provocase estrés y activase la UPR, se realizó un ensayo de cinética de degradación de la carboxipeptidasa Y con

una mutación que impide su plegamiento (CPY*) y, por lo tanto, es sustrato de la ERAD (Hartmann-Petersen, *et al.*, 2004). Las células con una ERAD defectuosa no son capaces de degradar eficientemente esta proteína mutada y la mantienen durante más tiempo en el interior celular (Hartmann-Petersen, *et al.*, 2004; Otero, *et al.*, 2010). Se utilizó un plásmido que permite expresar la proteína CPY* bajo el control del promotor reprimible por tiamina *nmt1*. Además, la proteína CPY* está marcada en su extremo amino con el epítipo V5 y seis histidinas (pNMT1-V5-6His-CPY*) (Hartmann-Petersen, *et al.*, 2004). Se transformaron tanto la cepa mutante *rho1-C17R* como la cepa silvestre con el plásmido que portaba la CPY* y se comprobó la vida media de esta proteína a 28°C después de haber reprimido el promotor del plásmido con tiamina y haber añadido cicloheximida para inhibir la síntesis de proteínas. Como se muestra en la **figura 53**, la vida media de esta proteína fue muy semejante en las células *rho1-C17R* y en las células silvestres, por lo que se puede concluir que la cepa mutante no muestra defectos en la degradación asociada al retículo endoplásmico.

En conjunto, de estos resultados se deduce que la cepa mutante *rho1-C17R* presenta problemas que podrían estar causados por un estrés de retículo endoplásmico aunque la respuesta ERAD no está afectada.



4. BÚSQUEDA DE INTERACCIONES ENTRE LA GTPasa RHO1 Y EL SISTEMA INTRACELULAR DE MEMBRANAS

4.1 Las células *rho1-C17R* presentan una interacción génica negativa con el complejo adaptador AP-3

Con el fin de encontrar nuevas vías de señalización de *rho1*⁺, realizamos un *screening* global buscando genes que al ser eliminados agravasen la termosensibilidad o provocasen letalidad en una cepa con baja actividad de Rho1 como es *rho1-C17R*. Se cruzó esta cepa con la colección de deleciones viables de *S. pombe*, tal y como se explica en el apartado 7 de Materiales y Métodos, y se analizó el crecimiento de los dobles mutantes generados. Los datos del *screening* se pueden consultar en el **Apéndice II** de esta memoria.

Se obtuvieron diversos genes implicados en distintas funciones. Entre ellos destacan genes implicados en el establecimiento de la polaridad celular y la regulación de los microtúbulos, como *tea1*⁺, *tea2*⁺, *tea4*⁺ y *tip1*⁺. Posteriormente se confirmó que estas interacciones eran correctas mediante cruce clásico, comprobándose que las dobles mutaciones mostraban defectos en el crecimiento a partir de la temperatura de 28°C. Este resultado indica que es necesario un Rho1 totalmente funcional cuando el

establecimiento de la polaridad y/o el citoesqueleto de microtúbulos están afectados.

Otra de las interacciones negativas más interesantes que se identificaron en este *screening*, fue la que presentaba la cepa mutante *rho1-C17R* con todos los componentes del complejo adaptador AP-3 (**Apéndice II**). La ruta del complejo AP-3

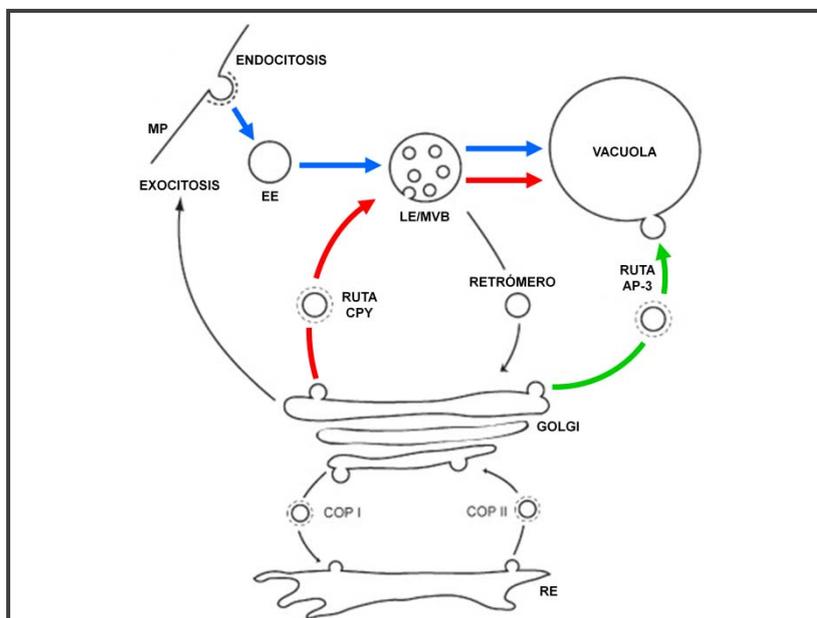
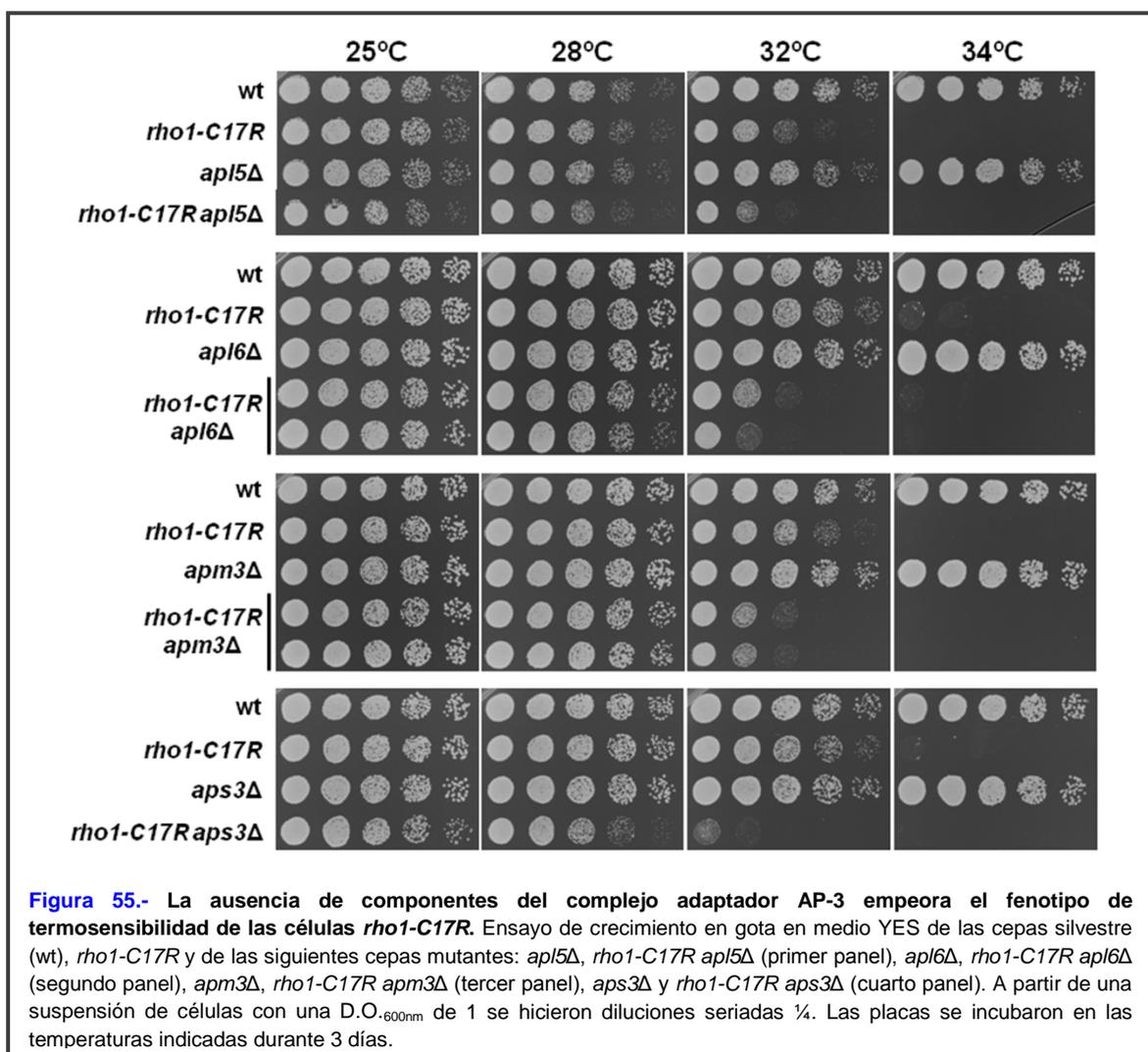


Figura 54.- Resumen del sistema de endomembranas. El transporte vesicular entre el retículo endoplasmático (RE) y el aparato de Golgi necesita los complejos COP I y COP II. El transporte hacia la vacuola ocurre bien por la ruta de la carboxipeptidasa Y (CPY), en color rojo, o bien por la vía del complejo adaptador AP-3, en verde. Se destaca en color azul la ruta endocítica hacia la vacuola. EE, endosoma temprano; LE, endosoma tardío; MVB, cuerpo multivesicular; MP, membrana plasmática. Ilustración adaptada de Epp *et al.*, 2011.

está muy conservada a lo largo de la evolución y en levaduras está implicada en el transporte vesicular desde la región *trans*-Golgi a la vacuola directamente (Cabrera, *et al.*, 2010; Cowles, *et al.*, 1997) (**Figura 54**), de una forma independiente de clatrina (Anand, *et al.*, 2009). Este complejo está formado por cuatro subunidades: δ (Apl5), $\beta 3$ (Apl6), $\mu 3$ (Apm3) y $\sigma 3$ (Aps3) (Boehm y Bonifacino, 2001). Para confirmar estas interacciones génicas negativas se construyeron de nuevo las cepas mutantes dobles mediante cruces individuales y analizamos su crecimiento a distintas temperaturas. Como se puede apreciar en la **figura 55** y **tabla IV**, las células *rho1-C17R* a las que se les ha deletado cualquiera de los componentes del complejo AP-3, presentan un claro aumento en el fenotipo de termosensibilidad. Como se puede observar en las placas de 32°C, el



crecimiento de las cepas mutantes dobles fue mucho menor que el de la cepa *rho1-C17R*. Esto llevó a proponer la necesidad del correcto funcionamiento del complejo AP-3 para la supervivencia celular cuando la función de Rho1 está comprometida.

Tabla IV.- Efecto de la ausencia de componentes del complejo AP-3 en el crecimiento de las células *rho1-C17R* en medio YES a distintas temperaturas.

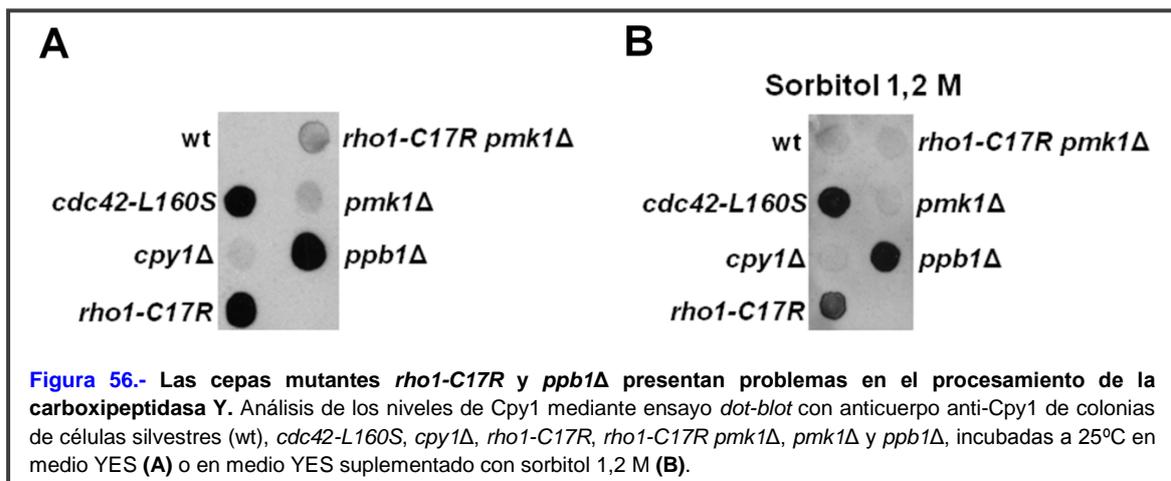
		Temperatura (°C)			
		25	28	32	34
Componentes del complejo adaptador AP-3	Cepa Mutante				
	<i>rho1-C17R</i>	±	±	±	NC
	<i>rho1-C17R apl5Δ</i>	±	-	--	NC
	<i>rho1-C17R apl6Δ</i>	±	±	--	NC
	<i>rho1-C17R apm3Δ</i>	±	±	--	NC
	<i>rho1-C17R aps3Δ</i>	±	-	---	NC

± Similar a *rho1-C17R* - Empeoramiento leve -- Empeoramiento Moderado
 --- Empeoramiento Grave NC No crecimiento

4.2 Una baja actividad de Rho1 provoca defectos en el procesamiento de la carboxipeptidasa Y (Cpy1)

Hasta la fecha se conocen dos rutas de transporte vesicular desde el aparato de Golgi a la vacuola en levaduras. Una vía directa (región *trans*-Golgi → vacuola) de la que se encarga el complejo AP-3 (Cowles, *et al.*, 1997) y otra vía en la que el transporte pasa a través de los endosomas (Tabuchi, *et al.*, 1997) (**Figura 54**). Esta última ruta, conservada evolutivamente en levaduras, lleva específicamente a la proteína cargo: carboxipeptidasa Y (Cpy1). Esta enzima vacuolar es inicialmente sintetizada como un pro-precursor en el retículo endoplasmático y transportada a través de los endosomas a la vacuola donde es finalmente procesada y transformada en su forma madura (Mukaiyama, *et al.*, 2011; Tabuchi, *et al.*, 1997). Cualquier defecto en el transporte, vía endosomal, desde la región *trans*-Golgi hasta las vacuolas o bien problemas en la formación de estos orgánulos, impiden la localización de la carboxipeptidasa en la vacuola y se produce una secreción de la misma al exterior celular (Iwaki, *et al.*, 2006; Miyatake, *et al.*, 2007). Por esto, Cpy1 se utiliza como proteína marcadora de un correcto transporte desde el retículo endoplasmático a la vacuola. Considerando que en las células *rho1-C17R* es necesario el correcto funcionamiento del complejo AP-3, se propuso que tal vez esta necesidad era debida a que el transporte vía endosomal, desde la región *trans*-Golgi hasta las vacuolas era defectuoso. Para comprobarlo, se analizó si en las células *rho1-C17R* se producía secreción de CPY mediante *immunoblot* de colonias incubadas a 25°C con un anticuerpo monoclonal anti-carboxipeptidasa desarrollado para *S. cerevisiae* y capaz de reconocer también a la proteína Cpy1 de *S. pombe*. Como

control negativo para el ensayo se utilizó la cepa mutante *cpy1Δ* y como control positivo la cepa mutante de *cdc42*, *cdc42-L160S* con un defecto en el transporte de esta proteína (Estravis, *et al.*, 2011). Tal y como se muestra en la **figura 56A**, la señal de la colonia de *rho1-C17R* fue muy similar a la de *cdc42-L160S*, lo que indica que estas células secretan Cpy1 de manera anormal. Sorprendentemente este efecto fue casi totalmente corregido al delecionar la MAPK, *Pmk1*. También se observó que la delección de *Ppb1* presenta una ruta de la carboxipeptidasa Y defectuosa. El hecho de detectar la proteína Cpy1 fuera de las células de la cepa mutante *rho1-C17R*, podría deberse a la lisis provocada por los defectos en pared celular propios de estas células, por lo que se repitió el ensayo con células incubadas en presencia del estabilizador osmótico sorbitol a una concentración 1,2 M. Nuevamente, la cepa mutante *rho1-C17R* presentó un elevado índice de secreción de la carboxipeptidasa Y, lo que indica que la presencia extracelular de esta proteína no se debe a la lisis de las células. Esta secreción anómala fue totalmente corregida al apagar la ruta de integridad celular (**Figura 56B**). La cepa *ppb1Δ* presentó un comportamiento similar en presencia de sorbitol. Estos resultados indican que *Rho1* y *Ppb1* son necesarias para que Cpy1 llegue a la vacuola.

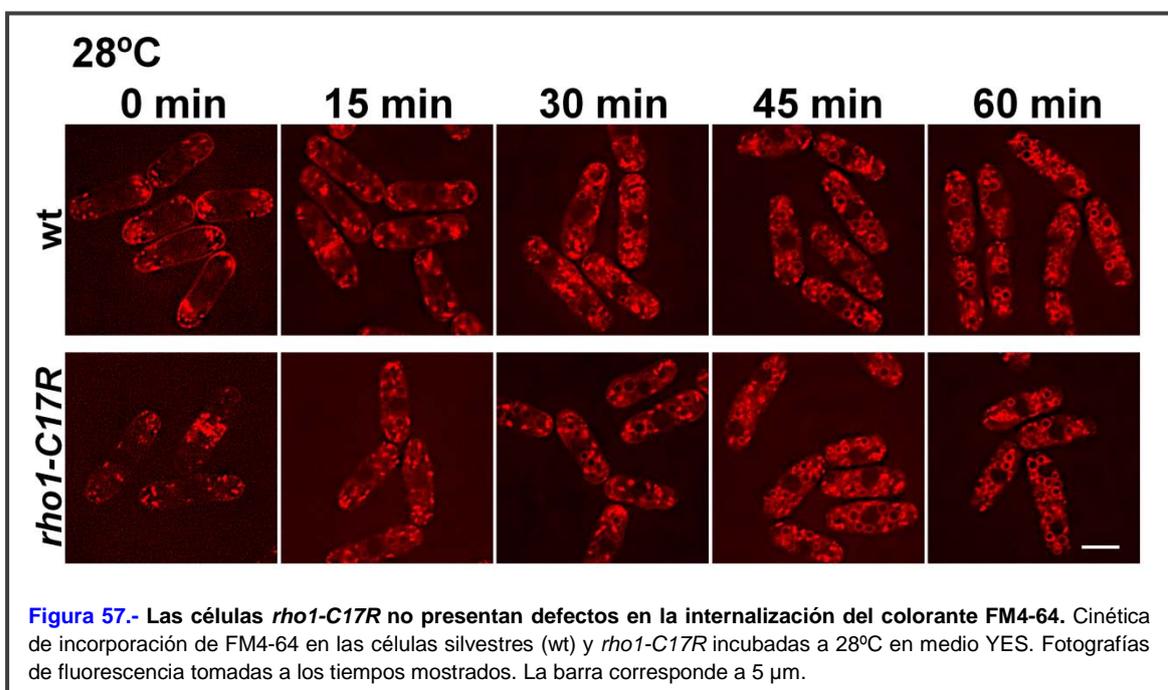


4.3 La cepa mutante *rho1-C17R* no muestra defectos en la ruta endocítica ni en la dinámica de vacuolas

Puesto que la cepa mutante *rho1-C17R* muestra defectos en la ruta de transporte vesicular de la zona *trans*-Golgi a la vacuola a través de endosomas, se quiso analizar si estas células también podrían presentar defectos en el transporte endocítico a la vacuola. La ruta endocítica está implicada en la internalización de componentes extracelulares y fluidos así como de proteínas asociadas a membrana y lípidos (Brodsky, 2012; Lim y

Gleeson, 2011). En algunas ocasiones, las vesículas formadas por la endocitosis son capaces de fusionarse con los endosomas tempranos, donde tienen lugar principalmente los procesos de reciclaje de muchas proteínas que vuelven a la membrana plasmática (Stoorvogel, *et al.*, 1996; Tooze y Hollinshead, 1991). Estos endosomas tempranos maduran hacia endosomas tardíos o cuerpos multivesiculares cambiando de tamaño y morfología, localizándose en zonas cercanas al núcleo celular (Solinger y Spang, 2013). Finalmente los endosomas tardíos se fusionan con las vacuolas donde se produce la degradación de las proteínas (**Figura 54**).

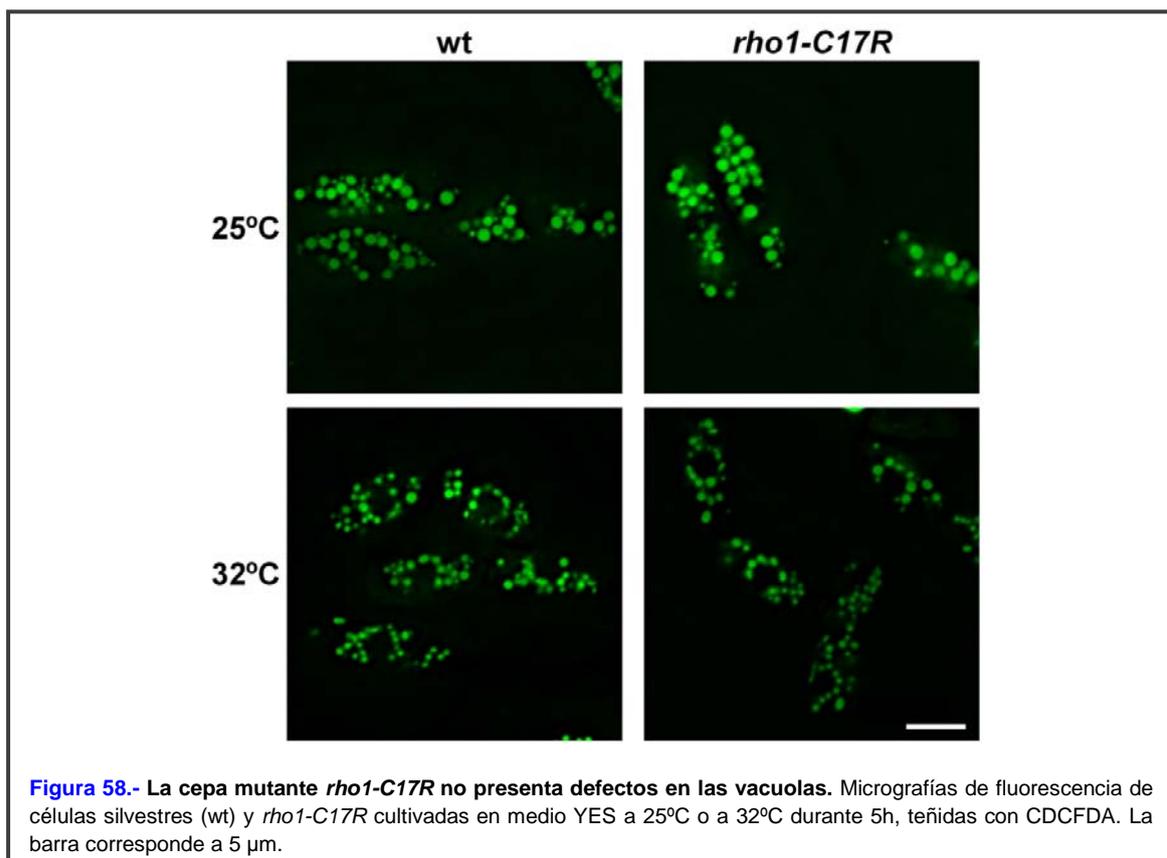
El colorante de estirilo FM4-64 es un compuesto orgánico lipofílico con propiedades fluorescentes que se internaliza desde la membrana plasmática y se utiliza como marcador *in vivo* de la ruta endocítica y de las vacuolas (Betz, *et al.*, 1992; Betz, *et al.*, 1996). En *S. pombe*, la internalización del colorante FM4-64 ocurre en las zonas de crecimiento (Gachet y Hyams, 2005). Para ver si las células de la cepa mutante *rho1-C17R* tenían defectos en la endocitosis, se realizó un estudio comparativo con la cepa silvestre del transporte de FM4-64 a las vacuolas a 28°C. La incorporación de este colorante desde la membrana a las vacuolas fue similar (entre los 30 y 60 minutos) en ambas cepas (**Figura 57**). Este ensayo cinético indica que Rho1 no tiene defectos generales de endocitosis o de tráfico desde la membrana citoplásmica a las vacuolas.



Una fracción de GFP-Rho1 se localiza en la membrana de las vacuolas (**Figura 24**). Esto sugiere que Rho1 podría participar en el proceso de la fusión de membranas de endosomas a vacuolas en *S. pombe* tal y como ocurre en *S. cerevisiae* (Logan, *et al.*,

2010). Las vacuolas representan el principal orgánulo encargado de la degradación en levaduras. Este compartimento celular es el destino final de numerosas rutas de transporte entre las que se incluyen: la ruta AP-3, la ruta endocítica, el transporte citosol-vacuola, la autofagia, etc. (Markgraf, *et al.*, 2009). Las vacuolas también intervienen en el reciclado de proteínas, en el mantenimiento de los compartimentos subcelulares, en la regulación de la osmolaridad, en la homeostasis de iones y como reservorio de aminoácidos, iones y polifosfatos.

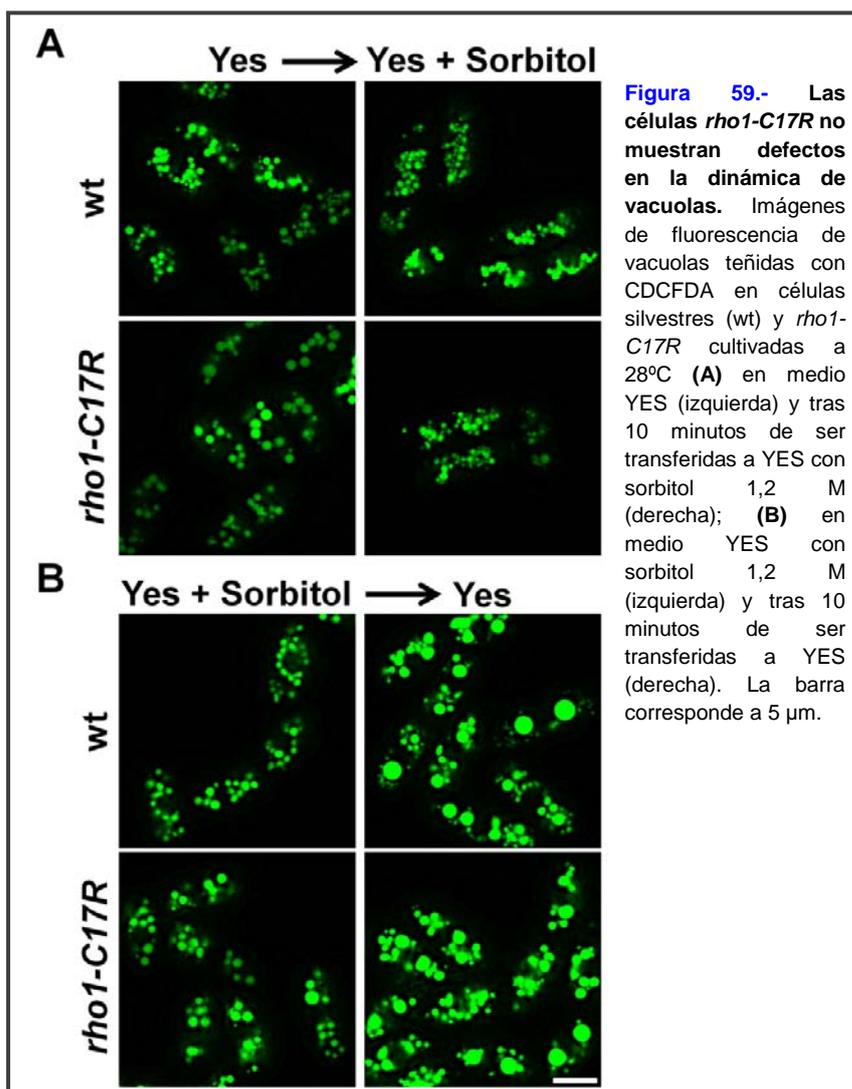
Para visualizar las vacuolas en las células *rho1-C17R*, se utilizó el colorante CDCFDA (5,6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato) que es un compuesto derivado del diacetato de fluoresceína (FDA) que se hidroliza a pH ácido. En la vacuola, por tanto, se libera la fluoresceína y esto permite el marcaje específico de las mismas (Pringle, *et al.*, 1989). La tinción con CDCFDA mostró que la cepa mutante *rho1-C17R* no presentaba ningún defecto ni en número ni en tamaño de las vacuolas en comparación con la cepa silvestre a ninguna de las temperaturas ensayadas (25°C y 32°C) (**Figura 58**).



Las levaduras, y en particular *S. pombe*, utilizan la fusión y la fisión de las vacuolas como mecanismo regulador que les permite adaptarse a diversas situaciones de estrés osmótico (Bone, *et al.*, 1998). *S. pombe* contiene entre 40 a 80 vacuolas de pequeño tamaño dispersas por toda la célula. De la misma manera que en *S. cerevisiae*,

la morfología de las vacuolas cambia rápidamente en respuesta a cambios osmóticos en el medio. Así, la exposición a medios hipotónicos produce la rápida fusión de las vacuolas, mientras que los gradientes hipertónicos del medio causan su fragmentación (Brett y Merz, 2008). Para ver si existía algún defecto en la dinámica vacuolar de la cepa mutante *rho1-C17R* se analizó la respuesta de estas células a situaciones de estrés hiper o hipo-osmótico. En el caso del estrés hiper-osmótico se realizó una tinción con CDCFDA de células silvestres y *rho1-C17R* cultivadas en medio YES a 28°C que se transfirieron a medio YES con sorbitol 1,2 M. Tras 10 minutos, tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante de *rho1*, se pudo observar que las vacuolas se habían dividido, de forma similar en ambos tipos de células, originando numerosas vacuolas de pequeño tamaño (Figura 59A). Para conseguir condiciones de estrés hipo-osmótico se realizó el experimento contrario, es decir, se incubaron las células en medio YES con sorbitol 1,2 M y se transfirieron a medio YES sin sorbitol, todo ello a temperatura de 28°C. Tras 10 minutos, se pudo observar en ambas cepas que las vacuolas se habían fusionado para

formar pocas vacuolas de gran tamaño (Figura 59B). Estos datos sugieren que la cepa mutante *rho1-C17R* no presenta defectos ni en la fisión ni en la fusión de vacuolas, a pesar de la baja funcionalidad de Rho1.



4.4 Las células *rho1-C17R* presentan fragmentación del aparato de Golgi

Teniendo en cuenta que las células *rho1-C17R* mostraban una ruta Cpy1 defectuosa, se analizó si presentaban algún defecto en los diferentes orgánulos membranosos subcelulares que participan en el procesamiento de Cpy1. Para ello se utilizaron proteínas de fusión con proteínas fluorescentes que marcaban estos orgánulos: vesículas secretoras/endosomas, retículo endoplasmático y aparato de Golgi.

Las vesículas secretoras se anclan a la membrana plasmática mediante el complejo del exocisto y posteriormente se fusionan con ella en un proceso que implica la acción de las proteínas SNARE (Jahn y Scheller, 2006). La v-SNARE de este complejo de fusión a la membrana plasmática en *S. pombe* es Syb1, de la familia sinaptobrevina/VAMP. Esta proteína es esencial y se localiza en estructuras citoplasmáticas de tipo vesicular de varios tamaños entre las que se incluyen los endosomas (Edamatsu y Toyoshima, 2003). Estas vesículas se concentran en la zona media y en los polos, donde GFP-Syb1 también se observa en la membrana plasmática. En las células de la cepa mutante *rho1-C17R* incubadas a 32°C durante cinco horas, se observó una mayor acumulación de vesículas marcadas con GFP-Syb1 en los polos comparadas con las células silvestres en estas condiciones (**Figura 60**), lo que podría indicar un ligero defecto en secreción o en el reciclaje de los endosomas.

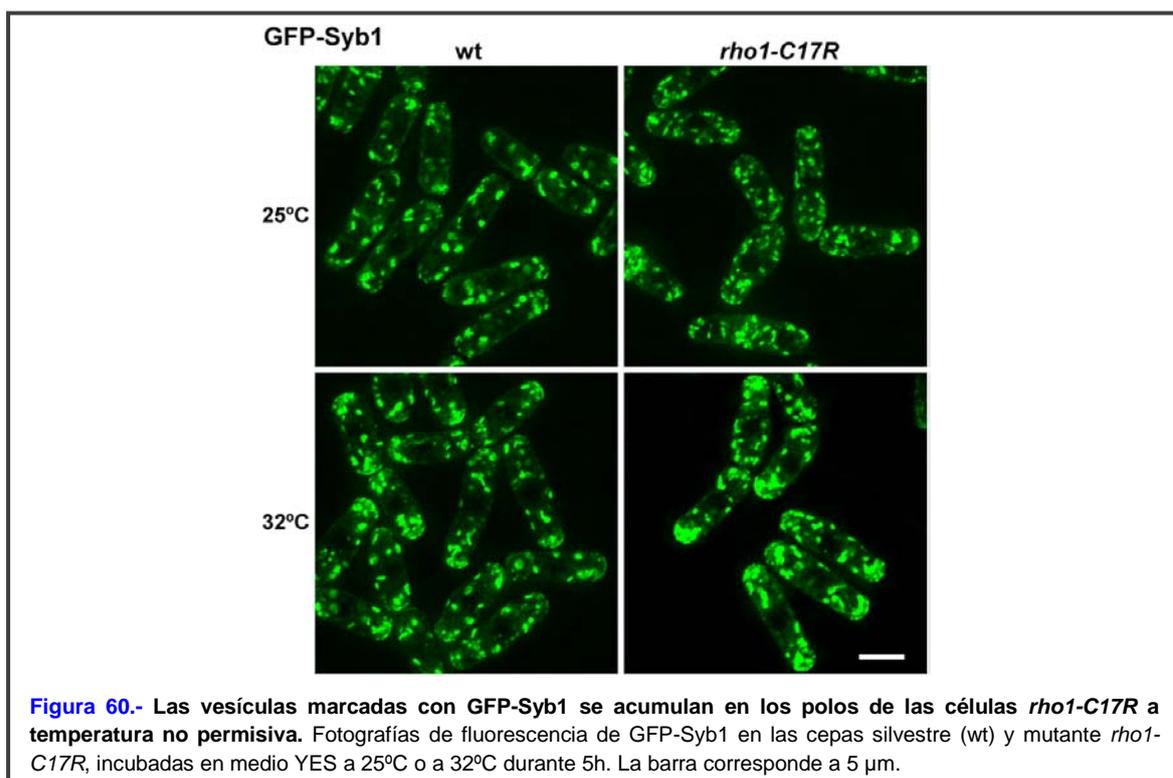
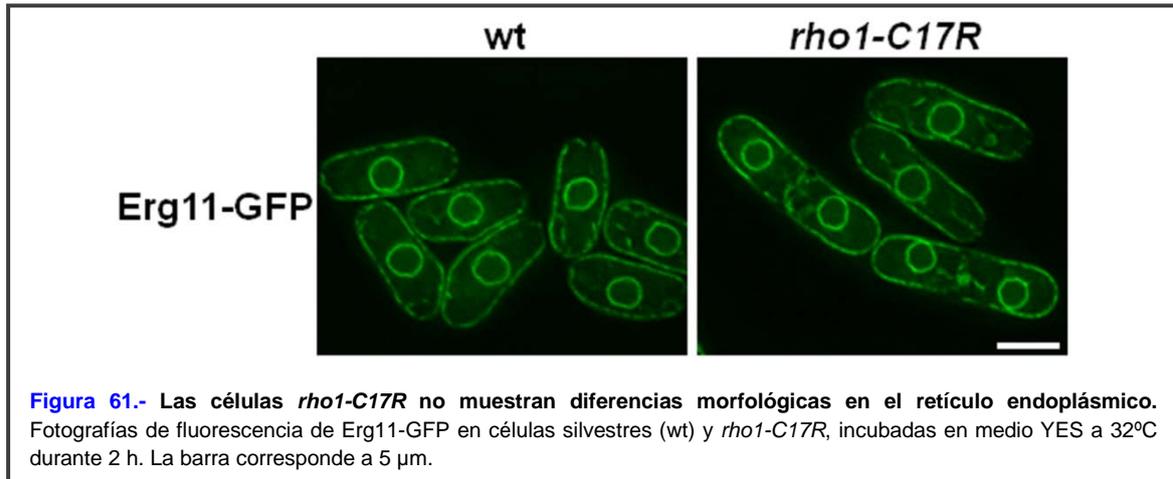


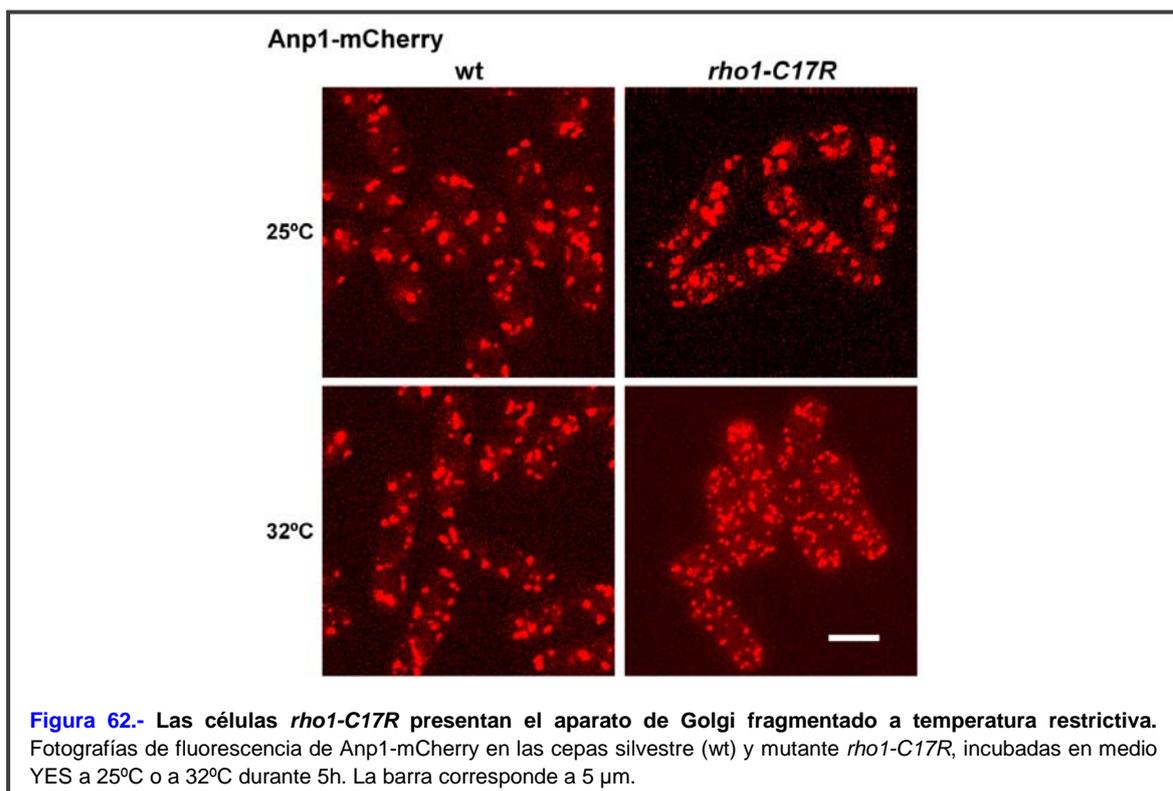
Figura 60.- Las vesículas marcadas con GFP-Syb1 se acumulan en los polos de las células *rho1-C17R* a temperatura no permisiva. Fotografías de fluorescencia de GFP-Syb1 en las cepas silvestre (wt) y mutante *rho1-C17R*, incubadas en medio YES a 25°C o a 32°C durante 5h. La barra corresponde a 5 μ m.

RESULTADOS

El gen *erg11⁺* codifica una proteína (Erg11) localizada en el retículo endoplasmático, implicada en la síntesis de ergosterol que es un componente principal de la membrana plasmática fúngica (Craven, *et al.*, 2007; Hughes, *et al.*, 2007). Por ello, la proteína Erg11-GFP es utilizada como marcador de este orgánulo. La localización de Erg11-GFP en el retículo de las células *rho1-C17R* incubadas a 32°C durante dos horas, no presentó diferencias apreciables en comparación con células silvestres cultivadas en las mismas condiciones (**Figura 61**).

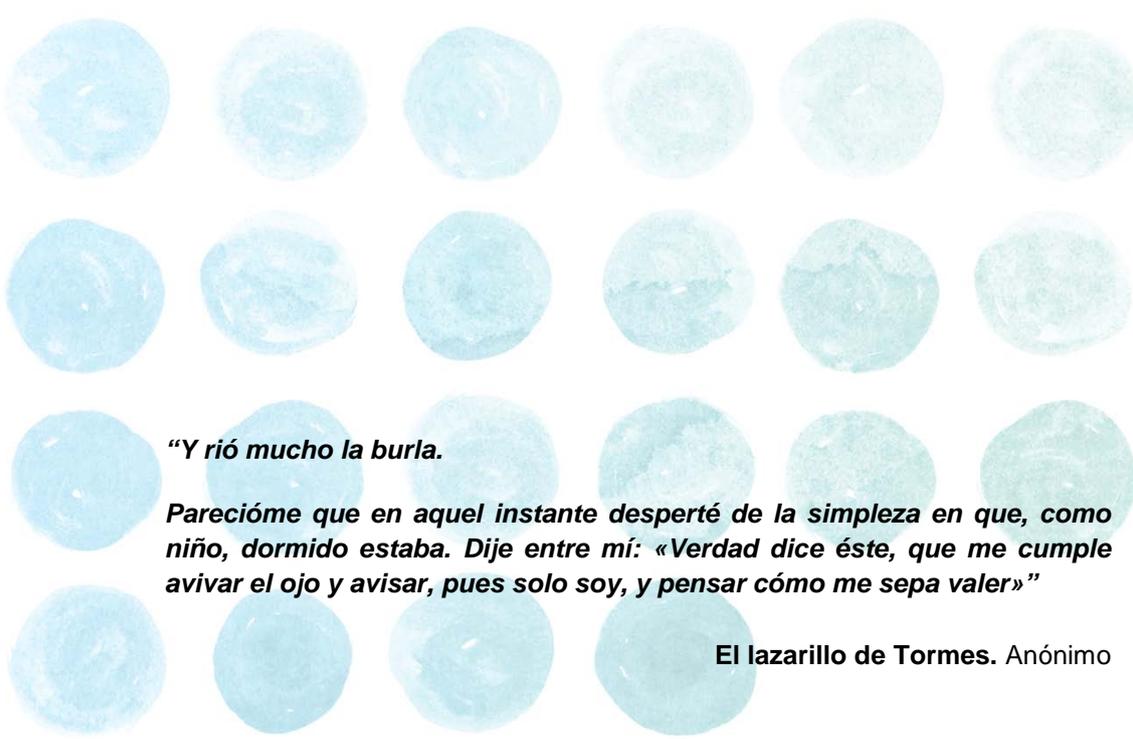


En *S. pombe*, la proteína Anp1 es utilizada como marcador de las membranas del complejo de Golgi. Esta proteína está implicada en la sensibilidad a amino-nitrofenol-propanodiol y al ortovanadato de sodio, en el crecimiento polarizado, en la secreción y en



la N-glicosilación proteica, así como en el buen funcionamiento del aparato de Golgi, donde principalmente se localiza (Chapman y Munro, 1994; Sekiya-Kawasaki, *et al.*, 1998; Sipos, *et al.*, 1995). En una cepa silvestre se puede observar Anp1-mCherry localizada como puntos discretos por todo el citoplasma. En la cepa mutante *rho1-C17R*, tras ser incubada a 32°C durante 5 horas, estos puntos son mucho más numerosos y de menor tamaño, sugiriendo que el complejo de Golgi se ha fragmentado (**Figura 62**). Estos resultados llevan a considerar la posibilidad de un mal funcionamiento del aparato de Golgi cuando Rho1 no es totalmente funcional.

Discusión



“Y rió mucho la burla.

Parecióme que en aquel instante desperté de la simpleza en que, como niño, dormido estaba. Dije entre mí: «Verdad dice éste, que me cumple avivar el ojo y avisar, pues solo soy, y pensar cómo me sepa valer»”

El lazarillo de Tormes. Anónimo

1. LA CEPA MUTANTE *rho1-C17R*

En *S. pombe*, la GTPasa Rho1 es una proteína esencial implicada en la regulación de la biosíntesis de la pared celular y en la organización del citoesqueleto de actina. En este trabajo se obtiene y se describe por primera vez una cepa mutante de *rho1* con pérdida de función en *S. pombe*. Esta cepa lleva una mutación puntual en el gen de *rho1*⁺ que provoca la sustitución de la cisteína en la posición 17 por una arginina (C17R). El residuo se localiza en el dominio *P-loop*, implicado en la unión del GTP a la proteína y está ampliamente conservado en las GTPasas Rho (Ihara, *et al.*, 1998; Saraste, *et al.*, 1990). De hecho, esta cisteína está presente en las GTPasas Rho2, Rho4 y Rho5 de *S. pombe*, así como en la proteína Rho1 de *S. cerevisiae* y RhoA de mamíferos. Por el contrario, está ausente en Rho3 y Cdc42 de nuestra levadura de estudio. Se ha descrito que la cisteína 16 de RhoA (homóloga de la cisteína 17 de Rho1 en *S. pombe*) es propia de esta proteína y no se encuentra en otras GTPasas de su misma familia como Rac1 (Boulter, *et al.*, 2012; Heo, *et al.*, 2006). Además se ha observado que esta cisteína junto con la localizada en la posición 20 (conservada también en *S. pombe* y *S. cerevisiae*) está implicada en la regulación de la actividad de RhoA (Boulter, *et al.*, 2012; Heo, *et al.*, 2006).

En *S. pombe*, las células con el alelo *rho1-C17R* presentaron un severo defecto en el crecimiento a temperaturas superiores a 32°C. Al determinar los niveles de GTPasa Rho1 mutada, total y activada, se observó que las células *rho1-C17R* presentaban una menor cantidad total y una amplia bajada de los niveles de activación a temperaturas permisivas para el crecimiento; y que la proteína prácticamente desaparecía cuando las células se sometían a temperaturas no permisivas, que provocan la muerte celular. Una conclusión de estos datos es que Rho1-C17R es una proteína termosensible y poco activa que se degrada a medida que sube la temperatura. La sustitución del aminoácido cisteína, con características hidrofóbicas, por una arginina, aminoácido hidrofílico con carga positiva, supone un gran cambio en la estructura del dominio *P-loop*, el cual muy probablemente sufrirá cambios conformacionales que podrían provocar una interacción defectuosa entre el nucleótido GTP y la proteína Rho1. Esta circunstancia, como es de esperar, provoca severos defectos en la actividad β -(1,3)-D-glucán sintasa que se traducen en un descenso en el contenido de β -D-glucano de la pared celular (Arellano, *et al.*, 1996). Sin embargo, estos graves defectos en la pared de la levadura no son los únicos problemas provocados por la GTPasa Rho1-C17R, ya que la estabilización osmótica del medio celular mediante sorbitol solo corrige parcialmente la termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*.

Al observar mediante video-microscopía el fenotipo de lisis de la cepa mutante *rho1-C17R* a una temperatura no permisiva, se determinó que estas células morían en escasos 60 segundos de una forma rápida y violenta, lo que llevó a pensar que el defecto que presentan provoca un problema fatal para la supervivencia. De hecho, la muerte de las células *rho1-C17R* se asemeja a la producida por un descenso de la cantidad de Rho1 en una represión de su gen (Arellano, *et al.*, 1997) o por la reducción de la actividad de Rho1 provocada por la sobreexpresión del alelo dominante negativo *rho1-T20N* (Arellano, *et al.*, 1997). Cuando se observó con más detenimiento la lisis celular, se pudo determinar que las células *rho1-C17R* no se morían por la pérdida de su contenido intracelular, a diferencia de lo que sucede en otros mutantes con defectos en los componentes de la pared celular, como *mok1-664*, (Cortes, *et al.*, 2005; Cortes, *et al.*, 2012) o con problemas en la organización de la misma (de Medina-Redondo, *et al.*, 2010), sino que las células de la cepa *rho1-C17R* se hacían permeables al colorante azul de metileno sin perder su integridad.

La mutación C17R no parece influir en la localización correcta de la GTPasa Rho1, que se sigue localizando en los lugares de crecimiento celular, polos y septo, donde está activa la síntesis de pared celular (Arellano, *et al.*, 1997; Nakano, *et al.*, 1997). Sin embargo, esta proteína mutante también se observa en el núcleo, lo que podría indicar que es enviada al proteasoma para su degradación. La inestabilidad de Rho1-C17R apoya esta hipótesis. Sin embargo, no hemos hecho experimentos adicionales para demostrarla.

Rho1 es un factor clave en la organización del citoesqueleto de actina (Arellano, *et al.*, 1997). Sin embargo, la cepa mutante *rho1-C17R* no parece presentar problemas en la localización ni en la organización de los polímeros de actina a temperatura permisiva. Sí se observa que cuando las células son sometidas a una temperatura restrictiva (34°C), pierden sus cables de actina como sucedía en la represión del gen *rho1*⁺ (Arellano, *et al.*, 1997). Esto confirma el hecho de que es necesaria una proteína Rho1 funcional para el mantenimiento de los cables de actina.

Al observar la morfología de los microtúbulos, las células *rho1-C17R* no parecen presentar ningún tipo de problema en esta estructura a una temperatura permisiva. Sin embargo, al someter las células a una temperatura restrictiva, los haces de microtúbulos aparecen mal localizados y no acaban en los polos. Este hecho puede explicarse simplemente porque al producirse la muerte celular a esta temperatura, todos los componentes intracelulares se ven afectados. Sin embargo, las células no han perdido su integridad y también podría deberse a que es necesaria la función de Rho1 para la

homeostasis correcta de los haces de microtúbulos, como sucede en *S. cerevisiae*, con la proteína Rom2 (homóloga de Rgf1, principal GEF de Rho1) o las proteínas Rho (Manning, *et al.*, 1997). La observación de una interacción genética negativa entre *rho1-C17R* y *tea1Δ* apoya esta hipótesis ya que en las células *tea1Δ* tampoco se produce la despolimerización de los microtúbulos al alcanzar el córtex apical (Mata y Nurse, 1997).

La expresión de *rho1⁺* en un plásmido multicopia bajo su propio promotor fue capaz de suprimir totalmente el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*, ya que se corrigieron todos los defectos provocados por esta mutación. La sobreexpresión en plásmidos pREP41, de expresión media, del alelo *rho1⁺* también corregía el fenotipo de la cepa mutante, no así la sobreexpresión de otros alelos de este gen. El alelo constitutivamente inactivo o *rho1-T20N*, perjudicaba en gran medida a las células *rho1-C17R* al bajar la actividad de Rho1 en una cepa que ya la tiene disminuida de por sí. Contrariamente a lo que se pudiera pensar, la sobreexpresión del alelo constitutivamente activo *rho1-G15V* no fue capaz de suprimir la termosensibilidad de las células *rho1-C17R*, sugiriendo que es necesario que Rho1 cicle entre los estados activo e inactivo para poder realizar su función. La sobreexpresión de otras GTPasas de la familia Rho no pudo rescatar a la cepa mutante sino que en algunos casos, como en *rho2⁺* y *rho3⁺* se produjo un agravamiento del fenotipo, lo que sugiere que estas dos GTPasas realizan funciones distintas y, quizás, opuestas a las de Rho1. Esto no es el caso en *S. cerevisiae*, donde Rho2 comparte algunas funciones con Rho1 (Schmelzle, *et al.*, 2002).

El aumento en la actividad de Rho1 producido por la sobreexpresión de su principal proteína GEF, Rgf1, fue capaz de rescatar el crecimiento de la cepa mutante *rho1-C17R* a temperatura restrictiva, no así la sobreexpresión del GEF implicado en citoquinesis Rgf3, lo que sugiere que los defectos presentes en las células *rho1-C17R* no son específicos del proceso de citoquinesis. Se podría esperar que un aumento de las proteínas GAP, inductoras de la actividad GTPásica, pudiera agravar el fenotipo de la cepa mutante de *rho1*, curiosamente, la sobreexpresión de cualquiera de las GAPs de Rho1 no acentuó la termosensibilidad de las células *rho1-C17R*. Este hecho podría deberse a que el cambio de conformación sufrido por la proteína al producirse la sustitución de aminoácidos, impidiese a Rho1-C17R interactuar correctamente con sus proteínas GAPs o bien a que no fuese funcional la actividad GTPásica de esta proteína mutante.

La sobreexpresión de las proteínas efectoras de Rho1, Pck1 y Pck2, reveló que únicamente Pck2 era capaz de suprimir ligeramente el fenotipo de termosensibilidad de la

cepa *rho1-C17R*, lo que puede ser debido a la implicación de esta proteína en la biosíntesis de la pared celular (Arellano, *et al.*, 1999b; Calonge, *et al.*, 2000).

2. RELACIÓN ANTAGÓNICA ENTRE RHO1 Y LA RUTA MAPK DE INTEGRIDAD CELULAR

En el *screening* de genes supresores en multicopia del fenotipo termosensible de *rho1-C17R* realizado con la genoteca de ADN genómico pURSP1 no se obtuvo ningún clon que contuviese en el inserto a *rho1⁺* o a *rgf1⁺* que, como se ha visto, son genes capaces de suprimir el fenotipo de la cepa *rho1-C17R*. Se puede considerar, por tanto, que no fue saturante a pesar de que se obtuvieron alrededor de 9.370 clones transformantes, número suficiente para cubrir prácticamente todo el genoma de *S. pombe*. Sin embargo, entre los genes obtenidos como supresores encontramos la ORF que codifica para la fosfatasa de especificidad dual Pmp1 y nos pareció oportuno confirmar este resultado. Como era de esperar, la sobreexpresión en plásmidos pREPs de Pmp1 fue capaz de corregir parcialmente el fenotipo de termosensibilidad de las células *rho1-C17R* y, además, la delección de *pmp1⁺* lo agravaba, lo que revela que la función de Pmp1 es necesaria cuando la actividad de Rho1 está comprometida. Hasta la fecha, la única diana conocida de esta fosfatasa es la MAPK de la ruta de integridad celular Pmk1, a la que regula de forma negativa (Sugiura, *et al.*, 1998). La delección de esta quinasa mejoró el crecimiento de la cepa mutante *rho1-C17R* incluso en ausencia de Pmp1, lo que indica que el efecto positivo causado por la sobreexpresión de esta fosfatasa es producido por la inactivación de Pmk1. Estos resultados sugieren también que la actividad de la denominada ruta de integridad celular podría ser dañina para las células *rho1-C17R*. Esta hipótesis fue confirmada mediante la construcción de varios dobles mutantes entre la cepa *rho1-C17R* y diversos componentes de la ruta de integridad. La eliminación de componentes inactivadores de esta ruta, como son Rga2, Rga4, Pmp1 y Pyp1 agravó el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante de *rho1* y la delección de activadores de esta ruta como Rho2 y Pmk1 mejoró el crecimiento de esta cepa. No obstante, se observó que la ausencia de algunos activadores de Pmk1 como Pck2, Rgf1 y Pek1, empeoraba el fenotipo de termosensibilidad. La quinasa Pck2 además de intervenir en la ruta de integridad está implicada en la síntesis de pared celular (Arellano, *et al.*, 1999b), por lo que la eliminación de esta quinasa podría agravar el problema de pared de la cepa *rho1-C17R*. Por su parte, Rgf1, aunque active a Pmk1, es el principal GEF de Rho1 (Cruz, *et al.*, 2013; Garcia, *et al.*, 2006; Perez y Rincon, 2010), y es capaz de corregir el defecto de crecimiento de las células *rho1-C17R*. En el

caso de Pek1, esta MAPKK es capaz de unirse en su forma inactiva (desfosforilada) a la MAPK de la ruta Pmk1, actuando como un potente inhibidor de la misma (Sugiura, *et al.*, 1999), por lo que es necesaria para la inactivación basal de la ruta que, como se ha demostrado en este trabajo, está aumentada en la cepa mutante *rho1-C17R*.

En la sección de Resultados (**Tabla III**), se ha indicado que la eliminación del factor de transcripción Atf1, descrito por debajo de Pmk1 (Zhou, *et al.*, 2012), no mejoró sino que empeoró el crecimiento de las células *rho1-C17R*. Esto puede deberse a que Atf1 está también implicado en la transcripción, mediada por Sty1, de diversas fosfatasa, como es Pyp1, que participan en la desfosforilación de Pmk1 y, por tanto, la función de este factor es necesaria para una correcta desactivación de la MAPK Pmk1 (Madrid, *et al.*, 2007; Madrid, *et al.*, 2006; Perez y Cansado, 2010). Este último dato fue confirmado al eliminar la MAPK de estrés celular Sty1 en las células *rho1-C17R*, que agravaba considerablemente su fenotipo de termosensibilidad. El efecto causado por la eliminación de Sty1 en las células *rho1-C17R* es más fuerte que el causado por la eliminación de la fosfatasa Pyp1, lo que sugiere que la función de Sty1 es necesaria cuando la actividad de Rho1 está comprometida. De hecho, en las células *rho1-C17R* hay un aumento de Sty1 activa en condiciones basales (datos no presentados). Será interesante en un futuro realizar los experimentos necesarios para definir la causa de esta activación.

El hecho de que la actividad de Pmk1 sea perjudicial cuando la actividad de Rho1 está comprometida, es bastante inesperado puesto que los ortólogos de la MAPK Pmk1 en *S. cerevisiae* y otros hongos forman parte de la ruta de señalización necesaria para el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Bi y Park, 2012; Levin, 2005; Levin, 2011). Cuando las células de *S. cerevisiae* se ven expuestas a una serie de estrés que alteran la pared celular, Rho1 activa a Pkc1 y a la MAPK Slt2, lo que provoca una despolarización de la actina y un remodelamiento de la pared celular. Además, cualquier disrupción en la ruta de la MAPK Slt2 puede comprometer la integridad de la pared (Bi y Park, 2012; Levin, 2011). Por el contrario, la inactivación de la ruta MAPK de integridad celular de *S. pombe*, en las células *rho1-C17R* que presentan un grave defecto de pared, mejora el fenotipo de termosensibilidad y, además, esta mejoría es aditiva con la presencia en el medio de un estabilizador osmótico, lo que sugiere que los efectos causados por la inactivación de Pmk1 y la supresión causada por el sorbitol son producidos por mecanismos distintos. Esto se corroboró analizando la composición de la pared en la cepa mutante doble *rho1-C17R pmk1Δ*, la cual no presentaba diferencias significativas con respecto a las células *rho1-C17R*, sugiriendo que la corrección del fenotipo causada por la eliminación de Pmk1 no se debe a un aumento en los polisacáridos de la pared. Además, se comprobó que la actividad de Rho1 no se ve

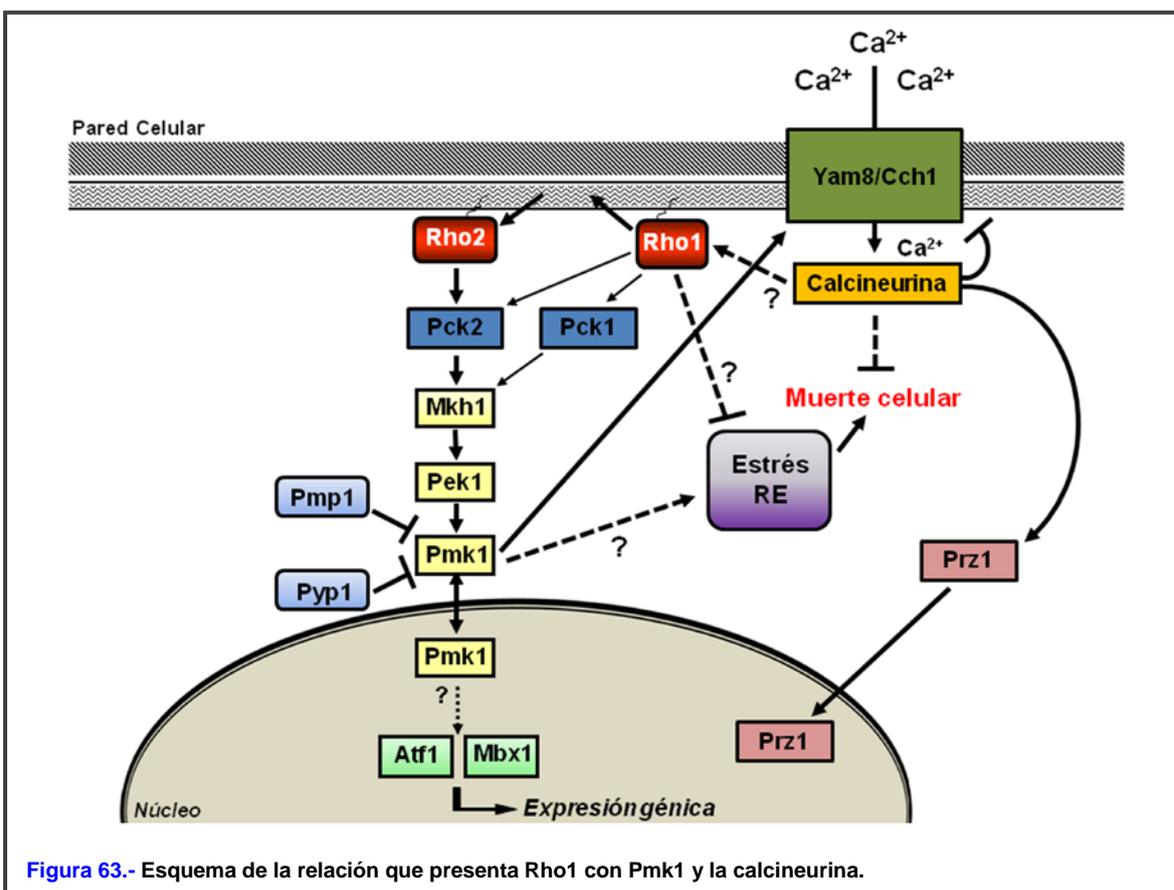
afectada por la función de Pmk1; por tanto, el efecto supresor de la delección de Pmk1 en la cepa *rho1-C17R* no es causado por un aumento en la actividad de Rho1.

Aunque sorprendente, el efecto antagónico encontrado entre Rho1 y la MAPK de integridad celular no es la única diferencia descrita entre *S. pombe* y *S. cerevisiae*. En diversos *screenings* en busca de interacciones génicas de *S. pombe*, se han encontrado genes que presentan interacciones y funciones distintas o adicionales respecto a sus ortólogos en *S. cerevisiae* (Frost, *et al.*, 2012; Koch, *et al.*, 2012). Es muy probable que las diferencias encontradas entre la ruta de integridad de estas dos especies sea debida a que las MAPKs realizan funciones celulares distintas. De hecho, la ruta Slt2 en *S. cerevisiae* solo es activada por estrés en la pared celular (fundamentalmente estrés hiposmótico), mientras que en *S. pombe*, Pmk1 puede ser activada por múltiples situaciones de estrés y durante la separación celular (Barba, *et al.*, 2008). Además, se ha observado que la ruta Slt2 regula la biosíntesis de varios polímeros de la pared celular así como su correcta localización en los lugares donde se esté produciendo remodelamiento de la misma (Bi y Park, 2012; Levin, 2011). Esta función no ha sido nunca observada en Pmk1. Otra diferencia entre la ruta de MAPKs de estas dos levaduras es que mientras Slt2 coopera con la fosfatasa calcineurina en la expresión de la glucán sintasa Fks2 (Deng, *et al.*, 2006; Jung y Levin, 1999; Stathopoulos-Gerontides, *et al.*, 1999; Zhao, *et al.*, 1998), no se ha demostrado que la calcineurina y Pmk1 en *S. pombe* regulen la expresión de las enzimas Bgs, ortólogas de las Fks. Además, calcineurina y Pmk1 presentan papeles antagónicos en la regulación de la homeostasis del Cl⁻ y en la ruta de transducción del Ca²⁺ (Ma, *et al.*, 2011; Sugiura, *et al.*, 2002; Sugiura, *et al.*, 1998). Por último, la principal GTPasa encargada de activar la cascada de MAPK de integridad celular en *S. pombe* es Rho2 (Ma, *et al.*, 2006) y no Rho1, a pesar de que esta última también active a Pmk1 en algunas circunstancias (García, *et al.*, 2009b; Sanchez-Mir, *et al.*, 2014).

Las células *rho1-C17R* presentaron un incremento basal de la fosforilación de Pmk1 en comparación con la cepa silvestre. Dicho incremento desapareció casi totalmente cuando se deleccionaron *rho2*⁺ o *pck2*⁺, lo que parecía colocar a Rho1 por encima de estas dos proteínas en la ruta de integridad. Estos datos podrían indicar que la GTPasa Rho1 es un regulador negativo de la ruta de integridad ya que una bajada en su función aumentó la actividad de la cascada de MAPKs. Esta hipótesis contradice los datos descritos en la bibliografía, en los que se ha demostrado que la sobreexpresión del alelo constitutivamente activo de *rho1* (*rho1-G15V*) incrementa el nivel de fosforilación de Pmk1 (García, *et al.*, 2009b) y que la sobreexpresión del GEF específico de Rho1, Rgf1, activa la ruta de integridad (García, *et al.*, 2009b). Además se ha descrito recientemente que la proteína Rho1 es, junto con Rho2, un activador de la cascada de integridad en

condiciones de estrés de pared (Sanchez-Mir, *et al.*, 2014). Para comprobar si Rho1 era o no un regulador negativo de la ruta se realizó un estudio cinético de la actividad de Pmk1. Si Rho1 fuese un regulador negativo cabría esperar que Pmk1 se mantuviera más tiempo activada en las células *rho1-C17R*, cuando éstas fueran sometidas a distintos tipos de estrés. Sin embargo, los datos mostraron que no existen diferencias entre la cepa mutante *rho1-C17R* y la cepa silvestre en cuanto a la duración de la activación de Pmk1, lo que indica que Rho1 no es un regulador negativo de la ruta.

La hiperactivación basal de la cascada también puede ser explicada como una respuesta al daño en la pared celular que sufre la cepa *rho1-C17R* y esta señal llegaría a la cascada a través de las proteínas Rho2 y Pck2 (Barba, *et al.*, 2008) (**Figura 63**). Este sería también el caso de las células en que se reprime la expresión de *rho1*⁺.



3. COLABORACIÓN ENTRE LA GTPasa RHO1 Y LA FOSFATASA CALCINEURINA

Una característica de las células que tienen activada la MAPK Pmk1 es la hipersensibilidad a MgCl₂, especialmente en presencia del compuesto FK506, inhibidor

específico de la calcineurina (Sugiura, *et al.*, 1998). También se ha descrito que las células que carecen de la fosfatasa calcineurina son hipersensibles al $MgCl_2$ (Sugiura, *et al.*, 2002). La calcineurina es una fosfatasa de tipo 2B dependiente de Ca^{2+} /calmodulina, que en *S. pombe* funciona de forma antagónica con la ruta MAPK de Pmk1, tanto en la regulación de la homeostasis del ion cloro como en la entrada de Ca^{2+} mediada por el canal Cch1-Yam8 (Hirayama, *et al.*, 2003; Ma, *et al.*, 2011; Sugiura, *et al.*, 2002). La calcineurina participa en una gran cantidad de procesos fisiológicos. De hecho en un reciente *screening* se han identificado 72 deleciones viables en *S. pombe*, de distintas categorías de genes, que son hipersensibles al inmunosupresor FK506 (Ma, *et al.*, 2011a). De estas deleciones, 15 de ellas son también sensibles a micafungina, un inhibidor de la β -(1,3)-D-glucán sintasa. Teniendo presente estos datos, se observó que la cepa mutante *rho1-C17R* era muy sensible a $MgCl_2$ y a FK506 y que la eliminación de la señal de la ruta de integridad eliminaba estos fenotipos. En esta misma línea, y teniendo en cuenta las funciones opuestas que realizan la calcineurina y la ruta de Pmk1, se comprobó que la sobreexpresión de la subunidad catalítica Ppb1 constitutivamente activa, en un estado independiente de la regulación Ca^{2+} /calmodulina (Sugiura, *et al.*, 1998), era capaz de corregir el fenotipo de termosensibilidad de las células *rho1-C17R*. Estos resultados indujeron a pensar la hipótesis de que Rho1 pudiera tener una función común con la calcineurina que es antagónica con la ruta de integridad. Se consideró también la posibilidad de que la cepa mutante *rho1-C17R* presentara una actividad más baja de la fosfatasa calcineurina como consecuencia del incremento en la actividad basal de Pmk1. Por el contrario, se observó un aumento en el nivel de actividad de esta fosfatasa en las células *rho1-C17R*. Con la intención de profundizar más en la posible relación de la calcineurina con la GTPasa Rho1, se intentó la delección de los genes que codifican la subunidad catalítica (*ppb1⁺*) y la subunidad reguladora (*cnb1⁺*) en las células *rho1-C17R*. En ambos casos la cepa mutante doble fue inviable, poniendo de manifiesto otra vez la función esencial que realiza la fosfatasa cuando la actividad de Rho1 está disminuida. Por otro lado, la localización de esta fosfatasa no viene determinada por la actividad de Rho1 a pesar de que ambas formen parte del mismo complejo, lo que podría indicar que Rho1 es una diana de la calcineurina, o que ambas proteínas ejercen su acción conjuntamente sobre una tercera (Palmer, *et al.*, 2005) (**Figura 63**).

En *S. cerevisiae* el factor de transcripción implicado en regular muchas de las respuestas celulares dependientes de calcineurina es Crz1 (Stathopoulos y Cyert, 1997). Este factor está implicado en la expresión de la subunidad catalítica de la glucán sintasa *FKS2* en respuesta a daño en la pared celular (Zhao, *et al.*, 1998). Sin embargo, no se ha descrito ninguna de estas funciones para su ortólogo en *S. pombe* Prz1. La fosfatasa

calcineurina participa al menos en dos rutas distintas de señalización: una dependiente del factor de transcripción Prz1, implicada en regular la expresión de la bomba de Ca^{2+} Pmc1 y en promover la tolerancia a este ion (Hamasaki-Katagiri y Ames, 2010; Hirayama, *et al.*, 2003); y otra ruta independiente de Prz1, que funciona de forma antagónica con la ruta MAPK de Pmk1 tanto en la regulación de la homeostasis del ion cloro como en la entrada de Ca^{2+} mediada por el canal Cch1-Yam8 (Hirayama, *et al.*, 2003; Ma, *et al.*, 2011). Según esta información y teniendo en cuenta la relación antagónica entre Rho1 y la ruta de integridad, descrita en este trabajo, era esperable que la señalización común de Rho1 y la calcineurina no dependiera de Prz1, como demostró el hecho de que la delección de este factor de transcripción no empeorase el crecimiento de las células *rho1-C17R*.

La muerte celular observada en la cepa mutante *rho1-C17R* a la temperatura restrictiva podría ser debida a un incremento en el Ca^{2+} citoplasmático que, como se ha descrito, puede ser producido por un aumento en la actividad de la ruta de integridad (Ma, *et al.*, 2011). La cascada de MAPKs de Pmk1 es capaz de activar el canal de calcio formado por el complejo Cch1-Yam8/Ehs1. Esto nos llevó a pensar que la ausencia del canal de calcio Yam8/Ehs1 podría mejorar el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*. Curiosamente, tanto la delección de este canal como la presencia en el medio del compuesto EGTA, quelante de Ca^{2+} , empeoraron el fenotipo de termosensibilidad de las células *rho1-C17R*. Este hecho sugiere que las células con baja actividad de Rho1 necesitan una entrada mayor de Ca^{2+} extracelular que se produce a través del canal Cch1-Yam8/Ehs1. Las variaciones en los niveles de calcio citoplasmático pueden alterar la activación de proteínas como la calmodulina y la calcineurina (Hamasaki-Katagiri y Ames, 2010; Ma, *et al.*, 2011). Si disminuyen los niveles de calcio citosólico (Lustoza, *et al.*, 2011) se inactivan estas proteínas y esto provocará un empeoramiento en la cepa mutante *rho1-C17R*. Se ha observado el mismo efecto cuando se delecionó la proteína Pmr1, implicada en el transporte de ATP y calcio hacia el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi (Cortes, *et al.*, 2004; Hamasaki-Katagiri y Ames, 2010; Lustoza, *et al.*, 2011) (datos no mostrados).

En *S. cerevisiae* se ha descrito que cuando se produce un estrés en la pared celular, la cascada de integridad celular es capaz de activar la ruta de respuesta a proteínas mal plegadas UPR (*Unfolded Protein Response*) de forma similar al estrés de retículo (Scrimale, *et al.*, 2009). Además, se ha descrito que un estrés de retículo prolongado, mediante la intervención de la ruta MAPK de integridad celular, provoca una elevación del Ca^{2+} citosólico, así como la activación de la calcineurina (Bonilla y Cunningham, 2003; Bonilla, *et al.*, 2002; Deng, *et al.*, 2006). Dicha activación es

necesaria para la supervivencia de diferentes especies de levadura en respuesta a este tipo de estrés (Bonilla, *et al.*, 2002; Kim, *et al.*, 2012; Lustoza, *et al.*, 2011). La activación de la ruta de integridad en *S. cerevisiae* incrementa la biosíntesis de proteínas de la pared que están muy glicosiladas y contienen motivos glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (Scrimale, *et al.*, 2009). Este incremento puede contribuir a provocar el estrés de retículo que activa la UPR. En *S. pombe*, Pmk1 regula también la expresión de diversas proteínas de la pared como Ecm33 que contiene un motivo GPI (Takada, *et al.*, 2010). Conociendo los daños presentes en la pared celular de la cepa *rho1-C17R* y la hiperactivación de la ruta de integridad y de la fosfatasa calcineurina en estas células, no fue extraño encontrar que la cepa mutante de *rho1* sea hipersensible al estrés de retículo provocado por un agente inhibidor de la N-glicosilación de las proteínas como es la tunicamicina. La existencia de un estrés de retículo basal en las células con baja actividad de Rho1, podría hacer que un aumento de dicho estrés provocado por la tunicamicina fuese letal, y explicaría también la necesidad de Ca^{2+} y de calcineurina para la supervivencia de las células *rho1-C17R*. En esta misma línea, se ha propuesto que la muerte producida por estrés de retículo es causada por un aumento de la permeabilidad vacuolar que provoca la acidificación celular (Kim, *et al.*, 2012). La supresión parcial de la termosensibilidad observada en la cepa mutante *rho1-C17R* al incrementar el pH extracelular para corregir el pH intracelular de una forma exógena, soporta esta hipótesis. Una explicación alternativa a estos resultados es que Rho1 participe en la respuesta necesaria para hacer frente a la acumulación de proteínas mal plegadas en el retículo endoplasmático causada por la tunicamicina. Habitualmente, la UPR conlleva una activación de la ruta ERAD que degrada selectivamente las proteínas mal plegadas. Sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre las células silvestres y *rho1-C17R* en los experimentos realizados con la carboxipeptidasa mutada, CPY*, para determinar la respuesta ERAD de estas cepas. No parece, por tanto, que Rho1 participe en el control de este sistema de degradación.

Con estos datos se puede proponer que, cuando la función de Rho1 es defectuosa, es necesario un aumento de la actividad de la calcineurina para que realice una serie de efectos, de una forma independiente de Prz1, como evitar un aumento letal del calcio intracelular (Lustoza, *et al.*, 2011) para que se mantenga la viabilidad celular.

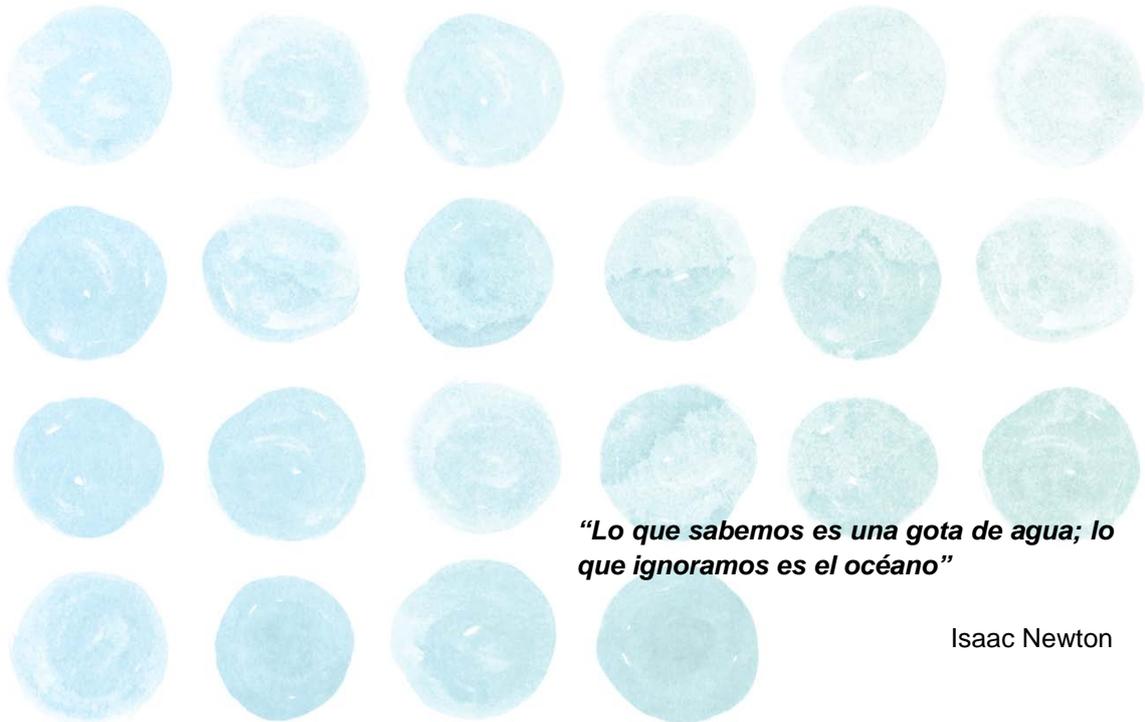
4. RHO1 Y EL TRÁFICO DE MEMBRANAS

En el *screening* que se realizó utilizando la colección de cepas con deleciones viables de *S. pombe* para identificar nuevas funciones de Rho1, se observó que la cepa mutante *rho1-C17R* presentaba interacciones negativas con todos los genes de los componentes del complejo adaptador AP-3. Este complejo está muy conservado a lo largo de la evolución y en levaduras se ha implicado en el transporte vesicular desde la región *trans*-Golgi a la vacuola directamente (Cabrera, *et al.*, 2010; Cowles, *et al.*, 1997). Por lo tanto, la ruta del complejo AP-3 es necesaria para la supervivencia celular cuando la función de Rho1 está comprometida. Esto determinó que se comprobara mediante microscopía la disposición de los principales componentes del sistema de endomembranas y el transporte endocítico. Estudios previos han descrito que Rho1 juega un papel en la endocitosis de *S. cerevisiae* a través del complejo TORC2-Rom2 y Fks1 (deHart, *et al.*, 2003). Además, Rho1 y RhoA se han implicado directamente en el transporte endocítico independiente de clatrina de *S. cerevisiae* y de células animales respectivamente (Prosser, *et al.*, 2011; Prosser y Wendland, 2012). Sin embargo, no se aprecia ningún defecto en el proceso de endocitosis de FM4-64 de las células *rho1-C17R* y el aspecto del retículo endoplásmico o de las vacuolas no mostró grandes diferencias con respecto a la cepa silvestre. Tampoco se observó que la cepa mutante de *rho1* presentara algún efecto en la fisión o en la fusión de vacuolas, a pesar de la baja funcionalidad de Rho1. Por otro lado, sí se observó en las células *rho1-C17R* un aumento en la fluorescencia de GFP-Syb1 que se utilizó como marcador de los endosomas. Quizás la activación de la biosíntesis de diversas proteínas de la pared, como Ecm33 (Takada, *et al.*, 2010), provoque un aumento en las vesículas secretoras y/o endosomas transportadores de estas proteínas.

También se determinó que el aparato de Golgi, marcado con Anp1-mCherry implicada en el buen funcionamiento de este orgánulo (Chapman y Munro, 1994; Sekiya-Kawasaki, *et al.*, 1998; Sipos, *et al.*, 1995), se encontraba en puntos discretos mucho más numerosos y de menor tamaño en la cepa mutante *rho1-C17R* en comparación con la cepa silvestre. Esta fragmentación del Golgi es indicativa de mal funcionamiento y se produce en enfermedades neurodegenerativas precediendo a la muerte neuronal (Nakagomi, *et al.*, 2008). Por tanto, este orgánulo es defectuoso cuando Rho1 no es totalmente funcional. Este resultado es acorde con el hecho de que la deleción de cualquier componente del complejo AP-3 en las células *rho1-C17R* aumente su fenotipo de termosensibilidad, lo que revela que la ruta de transporte desde el Golgi a las vacuolas a través de los endosomas (Tabuchi, *et al.*, 1997), pudiera ser defectuosa en la cepa

mutante de *rho1*. En el estudio de esta ruta se analiza la secreción de la Cpy1 vacuolar. En las células *rho1-C17R* la secreción al medio de la Cpy1 vacuolar, no era corregida por la presencia de un estabilizador osmótico, lo que demuestra que esta ruta de transporte es también defectuosa en la cepa mutante. Curiosamente, la delección de *pmk1⁺* (gen de la MAPK de integridad celular) en las células *rho1-C17R* disminuyó la secreción defectuosa de Cpy1. Es posible pensar que la activación de la ruta de MAPKs provoca un aumento de biosíntesis de glicoproteínas de la pared causante del estrés de retículo y de los problemas observados en el aparato de Golgi y en la ruta de transporte de Cpy1. Otro dato importante, aunque preliminar, obtenido en el estudio de la secreción de esta carboxipeptidasa es que la falta de la calcineurina también provoca defectos en la ruta de transporte de la Cpy1. En resumen, se puede proponer que los daños presentes en la pared celular de la cepa mutante *rho1-C17R*, provocados por la baja actividad de Rho1 de estas células son los causantes de una hiperactivación de la MAPK Pmk1 y que esta activación, como en *S. cerevisiae* (Scrimale, *et al.*, 2009), produce un estrés de retículo endoplasmático que hace esencial la actividad de la calcineurina para evitar la respuesta letal al mismo (Lustoza, *et al.*, 2011). (**Figura 63**). Sin embargo, son necesarios más experimentos para confirmar esta hipótesis y para ahondar en el mecanismo por el que Rho1 y la calcineurina regulan el transporte intracelular.

Conclusiones



“Lo que sabemos es una gota de agua; lo que ignoramos es el océano”

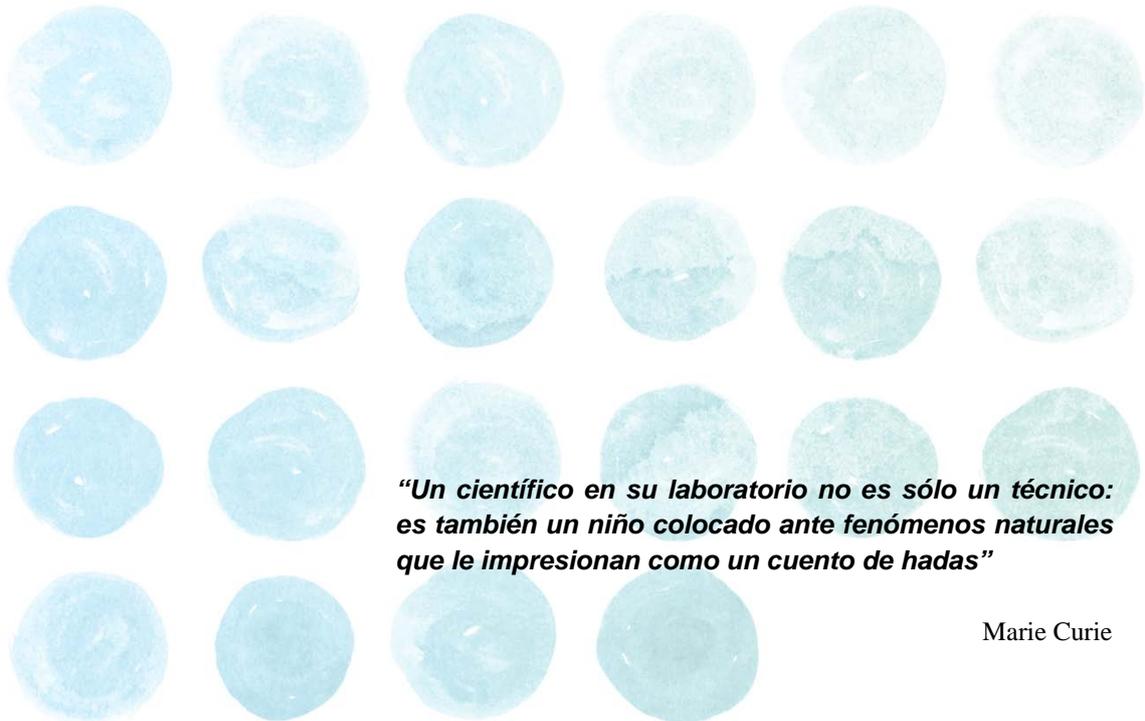
Isaac Newton

CONCLUSIONES

1. *rho1-C17R* es un alelo hipomorfo y termosensible que causa pérdida de función de Rho1. Las células *rho1-C17R* tienen una cantidad menor de Rho1 total y una proporción menor de Rho1 activada. Como consecuencia, presentan un descenso de la actividad β -glucán sintasa y del β -glucano en la pared celular.
2. La MAPK Pmk1 presenta un aumento de la actividad basal en la cepa mutante *rho1-C17R* que depende de Rho2 y Pck2. Este aumento es, probablemente, debido a los defectos en su pared celular.
3. El aumento en la actividad de la ruta de integridad celular es perjudicial cuando la función de Rho1 está disminuida.
4. La actividad de la fosfatasa calcineurina está incrementada cuando la actividad de Rho1 está comprometida y su función es necesaria para la supervivencia celular. Sin embargo, la función del factor de transcripción Prz1 es dispensable.
5. La GTPasa Rho1 y la fosfatasa calcineurina forman parte de un mismo complejo y participan en una función esencial de la cual es antagónica la actividad de la MAPK Pmk1.
6. Las células *rho1-C17R* son más sensibles al estrés de retículo endoplásmico. Sin embargo la respuesta ERAD de estas células es correcta.
7. La función de Rho1 es necesaria para el transporte intracelular de Golgi a vacuolas.

Materiales y

Métodos



***“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

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

El presente trabajo se ha realizado principalmente con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Para realizar los trabajos de clonación molecular se utilizó la estirpe DH5 α de *Escherichia coli*. Todas las cepas se recogen en la **tabla V**, donde se detalla su procedencia y su genotipo.

Todas las cepas se conservaron a -80°C. Las cepas de *S. pombe* en glicerol al 25 % y la de *E. coli* en glicerol al 50%.

Tabla V.- Cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

ESTIRPE GENOTIPO		ORIGEN
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
PPG0371	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18</i>	Colección laboratorio
PPG4035	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG6840	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6</i>	Este trabajo
PPG3909	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 mok1-664</i>	Colección laboratorio
PPG8038	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 aur-mcherry-atb2</i>	T. Toda
PPG8044	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 aur-mcherry-atb2</i>	Este trabajo
PPG10669	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 GFP-rho1:leu1</i>	Este trabajo
PPG10671	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 GFP-rho1-C17R:leu1</i>	Este trabajo
PPG11420	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 GFP-rho1-C17R:leu1</i>	Este trabajo
PPG6860	h ⁻ <i>ura4-D18 HA-rho1:leu1</i>	Este trabajo
PPG6858	h ⁻ <i>ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 HA-rho1-C17R:leu1</i>	Este trabajo
PPG5945	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pmp1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG7603	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 pmp1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4135	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pmk1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG8021	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 pmk1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG8055	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 pmp1::KanMX6 pmk1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG0370	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 rho2::ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG7609	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 rho2::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5929	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG7542	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG9278	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 pyp1::hygMX6</i>	E. Hidalgo
PPG9715	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 pyp1::hygMX6</i>	Este trabajo
PPG8052	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 sty1::ura4⁺</i>	E. Hidalgo
PPG8053	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 sty1::ura4⁺</i>	Este trabajo
MBY1325	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 rho3::ura4⁺</i>	M. K. Balasubramanian

MATERIALES Y MÉTODOS

PPG9214	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 rho3::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG1544	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 rho4::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG7667	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 rho4::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG1801	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 rho5::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG9206	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 rho5::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG1848	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG8033	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 rga4::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4210	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 pck2::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG7955	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 pck2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7616	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 rgf1::KanMX6</i>	Y. Sánchez
PPG9708	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 rgf1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7601	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 pek1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG7611	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 pek1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG11439	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 atf1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG11440	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 atf1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG8808	h ⁻ <i>ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 HA-rho1-C17R:leu1 pmk1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG3558	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1::ura4+ pREP41HA-rho1⁺</i>	Colección laboratorio
MI200	h ⁺ <i>leu1-32 ade6-M216 pmk1-HA6Hys:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
LS201	h ⁻ <i>leu1-32 rho1-C17R:NatMX6 pmk1-HA6Hys:ura4⁺</i>	Este trabajo
MI700	h ⁺ <i>leu1-32 ade6-M216 rho2::KanMX6 pmk1-HA6Hys:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
LS202	h ⁺ <i>leu1-32 rho1-C17R:NatMX6 rho2::KanMX6 pmk1-HA6Hys:ura4⁺</i>	Este trabajo
GB3	h ⁺ <i>leu1-32 ade6-M216 pck2::KanMX6 pmk1-HA6Hys:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
LS203	h ⁺ <i>leu1-32 rho1-C17R:NatMX6 pck2::KanMX6 pmk1-HA6Hys:ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5944	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 lys3-D1 ppb1::ura4⁺</i>	T. Toda
PPG9767	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 cnb1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG11417	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ppb1-GFP:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG11449	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 ppb1-GFP:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG160	h ⁺ <i>leu1-32 ade6-M210 HA-rho1</i>	Colección laboratorio
PPG11473	h ⁻ <i>leu1-32 ppb1-GFP:KanMX6 HA-rho1</i>	Este trabajo
KK308-8B (PPG11467)	h ⁺ <i>ura4-294::pkk2 integrated (PCDRE-GFP:ura4⁺) his2</i>	D. Hirata
PPG11477	h ⁻ <i>ura⁻ rho1-C17R:NatMX6 PCDRE-GFP:ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG8875	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 prz1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG8877	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 prz1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG8874	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 yam8::ura4⁺</i>	J. C. Ribas
PPG9208	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 yam8::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG10629	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 apl5::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG10653	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 apl5::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG10630	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 apl6::KanMX6</i>	Colección laboratorio

PPG10638	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 apl6::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG10631	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 apm3::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG10640	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 apm3::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG10632	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 aps3::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG10642	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 aps3::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7423	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 cdc42-L160S:KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG9381	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 cpy1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG4277	h ⁻ <i>erg11-GFP:KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG12121	h ⁻ <i>rho1-C17R:NatMX6 erg11-GFP:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG6753	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 anp1-linker-mcherry:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG10677	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 anp1-linker-mcherry:ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG8526	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 KanMX6:GFP-syb1</i>	Colección laboratorio
PPG9224	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6 KanMX6:GFP-syb1</i>	Este trabajo
PPG11401	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 ire1::KanMX6</i>	Colección laboratorio

Escherichia coli

DH5α	F- φ80dlacZΔM 15, Δ(lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies
------	--	-------------------

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* han sido descritos en (Moreno, *et al.*, 1991). 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 un autoclave.

- **Medio YES.** Se utilizó rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Su composición es: glucosa al 3 % y extracto de levadura al 0,5 %. El medio es suplementado con leucina, histidina, adenina, lisina y uracilo (250 mg/l) y ajustado a un pH de 5,6. En los casos en que era necesaria la presencia de un estabilizador osmótico, se añadió sorbitol, a una concentración de 1,2 M previamente a la esterilización del medio de cultivo.

La selección de cepas resistentes a antibióticos se realizó añadiendo al medio rico: sulfato de geneticina (G-418, Life Technologies) a una concentración final de 100 µg/ml, nourseothricina o clonNat (WERNER BioAgents) a una concentración de 100 µg/ml o higromicina B de *Streptomyces hygroscopicus* (SIGMA) a una

concentración de 50 µg/ml, a partir de soluciones *stock* esterilizadas por filtración, después de la esterilización del medio en el autoclave.

Cuando fue necesario, el medio YES se suplementó con diversos compuestos disueltos en agua o DMSO como: caspofungina (MERK), calcoflúor (BAYER), MgCl₂ (Fisher Chemical), KCl (Fisher Chemical), CaCl₂ (Probus, S.A.), NaCl (MERK), H₂O₂ (SIGMA), FK506 (LC Laboratories), miconazol (SIGMA), equinocandina, EGTA (SIGMA), tunicamicina (Santa Cruz Biotechnology), (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfónico) o MES (SIGMA), cafeína (SIGMA), ditiotreitól o DTT (Fermentas) y β-mercaptoetanol (BIO RAD). Todos ellos se añadieron al medio una vez esterilizado, a la concentración final indicada en cada experimento, partiendo de soluciones *stock* más concentradas y esterilizadas por filtración.

- **Medio mínimo (EMM, *Edinburgh Minimal Media*).** Se utilizó para la selección y/o cultivo de cepas de *S. pombe* auxótrofas y en experimentos de sobreexpresión de genes con el promotor del gen *nmt*. En estos experimentos las células se cultivaron en medio mínimo con los suplementos adecuados y tiamina (5 µg/l), consiguiendo la represión del promotor (Maundrell, 1990). Posteriormente, las células se lavaron 4 veces con medio estéril y se reinocularon en medio mínimo sin tiamina, provocando la inducción del promotor y la expresión del gen regulado por él. La composición del EMM es la siguiente: glucosa al 2%, ftalato monopotásico al 0,3%, Na₂HPO₄ al 0,22%, NH₄Cl al 0,5%. Esta disolución se esteriliza en el autoclave y posteriormente se le añaden diferentes cantidades de las soluciones concentradas de sales, minerales y vitaminas, que han sido esterilizadas previamente por filtración:
 - Solución concentrada de sales (50X): MgCl₂·6H₂O 0,26 M, Cl₂Ca·2H₂O 5 mM, KCl 0,67 M y Na₂SO₄ 14 mM.
 - Solución concentrada de minerales (10.000X): H₃BO₃ 81 mM, MnSO₄ 23,7 mM, ZnSO₄·7H₂O 14 mM, FeCl₃·6H₂O 7,4 mM, MoO₄·2H₂O 2,5 mM, KI 6 mM, CuSO₄·5H₂O 1,6 mM y ácido cítrico 47,6 mM.
 - Solución concentrada de vitaminas (1.000X): ácido nicotínico 81,2 mM, inositol 55,5 mM, biotina 40,8 mM y ácido pantoténico 4,2 mM.

El medio se suplementó con leucina, histidina, adenina o uracilo (225 mg/l) en aquellos casos en los que la cepa lo requería.

- **Medio de esporulación (MEA).** Usado para la conjugación y la esporulación en *S. pombe*. Su composición es: extracto de malta al 3% suplementado con adenina, histidina, leucina y uracilo (225 mg/l).

- **Medio de esporulación (SPA).** Este medio se utilizó para inducir la conjugación y la esporulación de las células de *S. pombe*. Su composición es: glucosa al 1%, KH_2PO_4 7,3 mM y vitaminas (1 ml/l del stock 1.000X, antes mencionado).

2.2 Medios de cultivo para *E. coli*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de *E. coli* fueron los siguientes:

- **Medio Luria-Bertani (LB).** Se utilizó para el crecimiento rutinario de *E. coli*. Su composición es: Triptona al 1%, extracto de levadura al 0,5% y NaCl al 1%. Antes de esterilizar en el autoclave, se ajustó el pH a 7,2-7,4.
- **Medio 2XYT.** Su composición es: Triptona al 1,6 %, extracto de levadura al 1% y NaCl al 1%.

La selección de clones resistentes a antibióticos se realizó suplementando los medios con ampicilina a una concentración final de 100 $\mu\text{g/ml}$ (Wood, *et al.*).

3. CONDICIONES Y ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO

3.1 Condiciones de crecimiento para *S. pombe*

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de cepas de *S. pombe* cuyas características genéticas se habían comprobado anteriormente.

Normalmente se preparó un preinóculo en medio líquido, que se dejó alcanzar la fase exponencial; posteriormente, se preparó el cultivo a analizar partiendo del preinóculo. Todos los cultivos se incubaron a la temperatura requerida por el experimento concreto, normalmente, 25°C, 28°C, 32°C, 34°C, 35°C, 36°C o 37°C. En el caso de los cultivos líquidos, los matraces se mantuvieron con una agitación de entre 200 y 250 rpm y el volumen de cultivo no superó $\frac{1}{4}$ del volumen del matraz, para permitir su correcta aireación.

El crecimiento en medio líquido se determinó mediante lectura de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro (BioRad Smart-Spec 3000). Se emplearon curvas de calibración obtenidas previamente en el laboratorio según las cuales una

densidad óptica de 0,8 equivale aproximadamente a 10^7 células/ml de *S. pombe*. El mantenimiento de las cepas se realizó por resiembra en placas de medio sólido.

3.2 Condiciones de crecimiento para *E. coli*

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

3.3 Ensayos de crecimiento en gota

Los estudios de termosensibilidad y de crecimiento a diferentes temperaturas se realizaron en medios sólidos YES, YES con sorbitol 1,2M o medio mínimo con y sin tiamina. Partiendo de cultivos líquidos, las células se concentraron hasta una D.O. de 1 en el caso de crecimiento en YES y de 4 en el caso de crecimiento en medio mínimo. Se realizaron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$ hasta un total de 6 concentraciones decrecientes de células y con un replicador (Sigma) se colocó una gota de cada concentración sobre las placas con el medio de cultivo. Las placas fueron incubadas a las distintas temperaturas de 2 a 4 días dependiendo del medio y la temperatura.

4. MÉTODOS GENÉTICOS

4.1 Conjugación

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe* se usaron estirpes heterotáticas de tipo sexual opuesto (h^+ o h^-) incubadas durante 24 horas en placas de medio YES. Se recogió aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa y se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (25 μ l). A continuación, se depositó la suspensión de células en una placa de MEA o SPA. Los cigotos se originan después de 12-20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 1-2 días de incubación a 25°C.

4.2 Aislamiento de ascosporas al azar

Para obtener esporas, se hicieron suspensiones en agua estéril de la mezcla de conjugación incubadas durante 2 días a 25°C en placas de MEA o SPA, y se trataron con 20-50 unidades de glucosidasa (PerkinElmer Life Sciences Inc.) 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 3.000 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 diluciones apropiadas para obtener entre 100 y 1.000 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.

4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: Análisis de tétradas

Con el fin de determinar los productos de la segregación meiótica se realizó el análisis de tétradas. El proceso se llevó a cabo con un micromanipulador automático (Singer MSM System Series 200) de la forma siguiente: se resuspendió una pequeña cantidad de cultivo esporulado en 200 µl de agua estéril y se extendieron 5 µl en un extremo de una placa de YES. Se recogieron ascas y se depositaron en una zona de la placa libre de células. Se incubó la placa durante 4-6 horas a 25°C o 32°C. Se depositaron las 4 esporas de cada asca en posiciones libres de células de la misma placa. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C. Finalmente, para realizar el estudio genotípico de cada espora, se realizaron réplicas en medios selectivos o se incubaron a temperaturas permisiva y restrictiva para el análisis de las cepas termosensibles.

5. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

5.1 Vectores utilizados

5.1.1 Vectores de *E. coli*

- **pBluescript 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 de la β -galactosidasa (LacZ'). Los dos vectores se diferencian por la orientación del sitio de clonación múltiple y los promotores de las ARN-polimerasas T3 y T7 que los flanquean y que sirven para la síntesis *in vitro* del ARN. Llevan el origen de replicación del fago f1 que permite la obtención de ADN monocatenario tras infección de las células portadoras del plásmido con el fago auxiliar M13K07.
- **pGEX (Pharmacia).** Contiene el gen que codifica la proteína GST (de Glutation-S Transferasa), el gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7 junto con el operón de lactosa para inducir la expresión del gen clonado en presencia de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).
- **pGEM-T (Promega).** Es un vector de 3 kb que contiene 13 sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción y se comercializa linearizado con una timidina adicional en sus extremos, lo que facilita la inserción de fragmentos generados por PCR. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7. Al igual que el vector pBluescript SK⁺ permite la selección de clones recombinantes por α -complementación (azul-blanco).

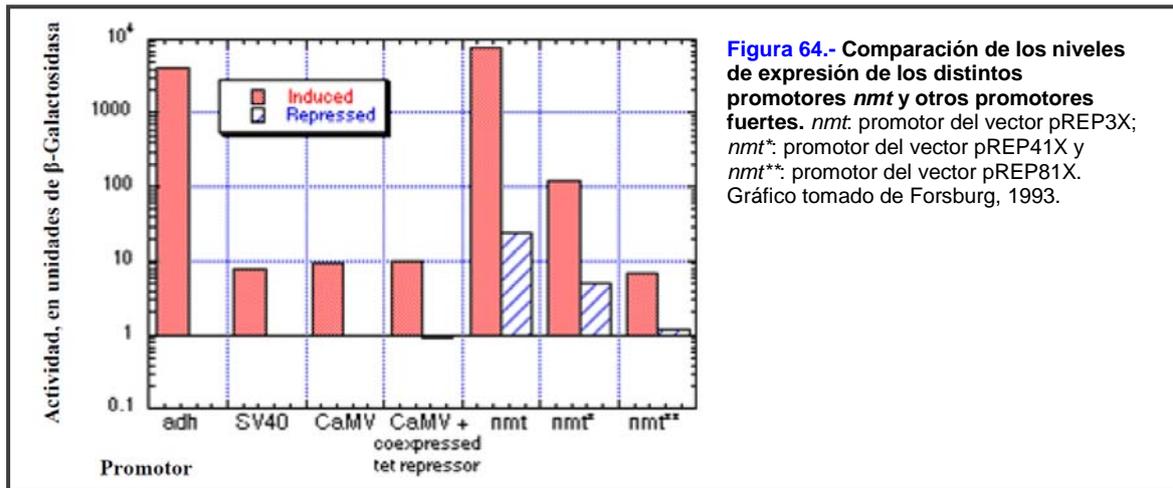
5.1.2 Vectores de *S. pombe*

- **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⁺* y el gen *LEU2* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *leu1* de *S. pombe*.
- **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 ADN en el genoma de *S. pombe*. Para que la integración tenga lugar, es necesario digerir el

plásmido con una enzima de restricción que lo linearice. Normalmente se utiliza el sitio de restricción de *NruI*, que se encuentra en el gen *leu1⁺*. El plásmido linearizado se introduce en una cepa *leu1-32*, de modo que, tras la recombinación, en el genoma de *S. pombe* se reconstituyen 2 copias del gen *leu1*, una mutada y otra silvestre, recuperándose así la capacidad de crecer en un medio sin leucina (Keeney y Boeke, 1994). Este plásmido posee además: un fragmento de ADN que incluye sitios de reconocimiento para 19 enzimas de restricción; el gen de resistencia a ampicilina; un fragmento del fago f1 que codifica las funciones requeridas para la obtención de ADN monocatenario; un origen de replicación para *E. coli*; y el gen *lacZ* de la β -galactosidasa para la selección de clones por su color blanco o azul.

- **pREP.** Son una serie de vectores de expresión en *S. pombe*, reprimibles en presencia de tiamina. Todos ellos poseen elementos comunes en su estructura: un origen de replicación de *E. coli*; el gen de resistencia a ampicilina; el origen de replicación *ars1⁺*; un gen marcador de complementación de auxotrofías y el promotor del gen *nmt1⁺* (*no messenger with thiamine*) fusionado a un sitio de clonación múltiple, que permite sobreexpresar los insertos clonados cuando se incuban las células en ausencia de tiamina. Todos los vectores pREPX proceden del vector pREP1 (Maundrell, 1990), de elevada expresión, al que se le incorporó un sitio *XhoI* en el sitio de clonación múltiple (Forsburg, 1993). Los distintos vectores pREPX se diferencian entre sí por:
 - *El marcador de selección:* *LEU2* de *S. cerevisiae* (que complementa estirpes *leu1-32*), en el caso de los vectores denominados con número impar, pREP1, pREP3X, pREP41X y pREP81X; y *ura4⁺* (que complementa estirpes *ura4-D18*), en el caso de los vectores denominados con número par, pREP4X, pREP42X y pREP82X.
 - *El promotor:* para poder inducir niveles de expresión intermedios, se modificó el promotor *nmt* original introduciendo una serie de mutaciones en su secuencia TATA, que disminuyen la fortaleza de éste. Así, los vectores de expresión fuerte son los plásmidos pREP1, pREP3X y pREP4X, los de expresión intermedia son pREP41X y pREP42X; y los de expresión baja son pREP81X y pREP82X (Basi, *et al.*, 1993) (**Figura 64**).

Se ha utilizado también una serie de vectores pREP, amablemente cedidos por el Dr. Ian Hagan, en los que se puede clonar el gen deseado en fase con la secuencia del epítipo HA de la hemaglutinina (Craven, *et al.*, 1998).



5.2 Obtención de ADN

La extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias se efectuó por el método de lisis alcalina (Zhou, *et al.*, 1990), que consiste en romper las células en presencia de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). Cuando fue preciso obtener ADN de pureza superior y en mayor cantidad, se utilizaron columnas de intercambio aniónico comerciales Wizard Plus Minipreps (Promega).

La extracción de ADN plasmídico de levaduras se realizó según los protocolos descritos por (Moreno, *et al.*, 1991).

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se llevó a cabo en los termocicladores GeneAmp PCR System 2.700 de Applied Biosystems y MyCycler™ Thermal Cycler de BioRad. Las mezclas de reacción contenían: tampón de reacción suministrado por el proveedor, MgCl₂ 1,5 mM, los 4 desoxinucleótidos trifosfato precursores a una concentración final de 0,2 mM cada uno, 0,40 μM de cada oligonucleótido utilizado como cebador, 0,5 U/μl de polimerasa Taq y una cantidad de ADN molde variable, dependiendo de si se trataba de ADN genómico o plasmídico. Para la comprobación rutinaria de cepas mutantes de *S. pombe*, se utilizaron células directamente, sin necesidad de extraer el ADN. La reacción requiere la desnaturalización del ADN molde, el anillamiento de los cebadores u oligonucleótidos incorporados a la reacción y, finalmente, la extensión de las hebras sintetizadas. En cada momento se requiere que la reacción se encuentre a una temperatura determinada. El número de

ciclos, la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión se modificó dependiendo de las características del experimento. La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de GE Healthcare.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Thermo y sus secuencias y utilidad se describen en la **tabla VI**.

Tabla VI.- Lista de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA	UTILIDAD
HC23	5'-CGCTTTTTGAATTTAGGAATTCATC-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC7	5'-CTCGAGGAATGCTGTTTAATTTTATGAGTA-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC24	5'-GAGCGGTGTCAGAATTTGAGTCG-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC8	5'-GATATCCCCTAGATTTGTTTACTTTCT-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC11	5'-CATATGGCCATGGCGACAGAACTTCGC-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
RA-1	5'-CGAGGTCTATGTTCCCACTG-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
RtRho1-B1	5'-ACGGAGATCAGCCTTGCAAGC-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC12	5'-GGATCCTTACAACAAGATACAACGCT-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC13	5'-GGATCCCGTTCCAGATTACGCTGCTC-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
Tadh-1	5'-GCGACCTCATACTATACCTGA-3'	Comprobación cassette <i>rho1</i> ⁺
Kan-5	5'-GGCCTCCATGTCGCTGGCCG-3'	Comprobación cassette <i>rho1</i> ⁺
Kan-1	5'-GCTAGGATACAGTTCTCACATCACATC CG-3'	Comprobación cassette <i>rho1</i> ⁺
Kan-2	5'-GATTGTCGCACCTGATTGCCCGAC-3'	Comprobación cassette <i>rho1</i> ⁺
Kan-3	5'-CGGATTCAGTCGTCACCTCATGGTG-3'	Comprobación cassette <i>rho1</i> ⁺
Kan-4	5'-TGGATGGCGGCGTTAGTATCG-3'	Comprobación cassette <i>rho1</i> ⁺
HC9	5'-GCGGCCGCACAGCTTGTTTCAAATTTTT AAC-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HCn-2	5'-CCCGGGAACATGATAGGCCACACAATG CA-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC10	5'-CCGCGGGGTAGAAAGGATAATAATGAT-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
HC22	5'-GGTTTTGATCGAGTTTCAATC-3'	Construcción cassette <i>rho1</i> ⁺
pmp1-1	5'-ATATGGATCCATATGTCTCAAAAACCTACCT CCC-3'	Clonación de <i>pmp1</i> ⁺
pmp1-2	5'-ATATGGATCCTCAAGAAGCATCATTACTTA TAC-3'	Clonación de <i>pmp1</i> ⁺
pmp1-3	5'-GCTTTGGAACCTGATAAGCTTG-3'	Clonación de <i>pmp1</i> ⁺
pmp1-4	5'-GCGATCATCAAACAAGCAGAG-3'	Clonación de <i>pmp1</i> ⁺

MATERIALES Y MÉTODOS

ppb1.1	5'-ATATAGGATCCATATGACTTCGGGTCCTC ATAATT-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺ y de <i>ppb1ΔC</i>
ppb1.2	5'-CTTGTGGGCTTTGAAAATATGG-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺ y de <i>ppb1ΔC</i>
ppb1.3	5'-CGGGTTTCCATCTTTGATGAC-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺ y de <i>ppb1ΔC</i>
ppb1.4	5'-GCTATCAATTCCTTCGATGATG-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺
ppb1.5	5'-CGTCGGAATATAAGTTGCTGG-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺ y de <i>ppb1ΔC</i>
ppb1.6	5'-CTTATTCATAATAGCTGCCAAAGG-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺ y de <i>ppb1ΔC</i>
ppb1.7	5'-CCACAAATGGAAGACTCCAAG-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺ y de <i>ppb1ΔC</i>
ppb1.8	5'-ATATAGGATCCTACAAAGAGCTTTTCTTAT CTG-3'	Clonación de <i>ppb1</i> ⁺
ppb1ΔC	5'-ATATAGGATCCTTAAATAATTTGCCTACGA GCTTCAA-3'	Clonación de <i>ppb1ΔC</i>
3'-ppb1-2	5'-CAGCTTTACTGCAGTATAAGTTC-3'	Construcción <i>ppb1-GFP</i>
ppb1-CtagA	5'-AAGAAGTAATGAATTCGTCTGAAGATGATA CCTCTATCGATCATTTGGTAGAACGCTTTGCA GATAAGAAAAGCTCTTTGCGGATCCCCGGGTT AATTAA-3'	Construcción <i>ppb1-GFP</i>
ppb1-CtagB	5'-AAAAAGTTTATTATGAATATCTAAATGCAAT GCTTATGTATCTAGTCATCGGTTATCTTGTATT ATGCTAAAGTAAACTCGAATTCGAGCTCGTTT AAAC-3'	Construcción <i>ppb1-GFP</i>
NMT-1	5'-CTCTCGGCTACTGGATGG-3'	Secuenciación promotor <i>nmt1</i>
Nat-2	5'-TGAAGGACCCATCCAGTGCCTC-3'	Comprobación <i>rho1-C17R:NatMX6</i>
Nat-3	5'-GCGCTCTACATGAGCATGCCCT-3'	Comprobación <i>rho1-C17R:NatMX6</i>
Oligo#28	5'-ATGGCTTACCCATACGATGTTCC-3'	Marcaje epítipo HA
HA-1	5'-TACCCGTACGATGTTCTGACTATG-3'	Marcaje epítipo HA
HA-2	5'-GAGCGTAATCTGGAACGTCGTAAG-3'	Marcaje epítipo HA
HA-3	5'-ATAAGAATGCGGCCGCAATGTACCCGTAC GATGTTCTG-3'	Marcaje epítipo HA
HA-4	5'-CGCGGATCCTTAATGAGCGTAATCTGGAA CGTCG-3'	Marcaje epítipo HA
HA-5	5'-ATATACATATGGCTTACCCATACGATGT TC-3'	Marcaje epítipo HA

5.4 Diseño de la PCR degenerada

Para obtener una población de moléculas de *rho1* mutadas al azar, se realizó una PCR degenerada sobre este gen, según se describe en (Cadwell y Joyce, 1992; Roh, *et al.*, 2002). Se utilizó la enzima AmpliTaq DNA polimerasa (Perkin-Elmer) con el tampón suministrado por el fabricante. A la mezcla de reacción se añadió MgCl₂ 2,5 mM, y 100 ng por cada 100 μl de mezcla de reacción del plásmido SK -*rho1*⁺. Además, para inducir errores en el proceso de amplificación, se añadió una mezcla no equitativa de nucleótidos, que contenía dCTP / dTTP 1 mM y dGTP / dATP 0,2 mM. Como cebadores

de la reacción se usaron los oligonucleótidos HC11, que incluye el sitio *Nde*I, y HC12, que incluye el sitio *Bam*HI (Tabla VI).

5.5 Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN se realizó en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca que utiliza un secuenciador automático Abi prism 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems).

5.6 Manipulación de ADN

Todos los protocolos utilizados para la manipulación de ADN se recogen en Ausubel *et al.*, 1995 y Sambrook *et al.*, 1989 (Ausubel, *et al.*, 1995; Sambrook, *et al.*, 1989). Además de las indicaciones generales de estos manuales de laboratorio, se tuvieron en cuenta las especificaciones de las casas comerciales suministradoras de los materiales y enzimas utilizados.

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o por amplificación mediante PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (UltraPure, Life Technologies) de distinto porcentaje (0,6-1,5 %), según el tamaño de los fragmentos a analizar. Los geles de agarosa llevaban bromuro de etidio a una concentración final de 0,1 µg/ml, para localizar el ADN mediante iluminación con una fuente de luz ultravioleta. El tampón utilizado, tanto para preparar la agarosa como para realizar la electroforesis, fue TAE (Tris-Acetato 40 mM, EDTA (ácido etilén diamino tetra-acético) 1 mM, pH 8,0).

El aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN después de su separación en geles de agarosa se llevó a cabo mediante el sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de GE Healthcare.

La ligación de fragmentos de ADN, tras eliminar el grupo fosfato del extremo 5' del vector mediante tratamiento con fosfatasa alcalina (AP 713023, Boehringer), se realizó con la enzima ADN ligasa del fago T4 (EL0335, Fermentas).

5.7 Transformación de *E. coli*

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

térmico (Kushner, 1978). En algunos casos, la transformación con plásmidos purificados se realizó por un método simplificado conocido como “transformación del minuto” (Golub, 1988).

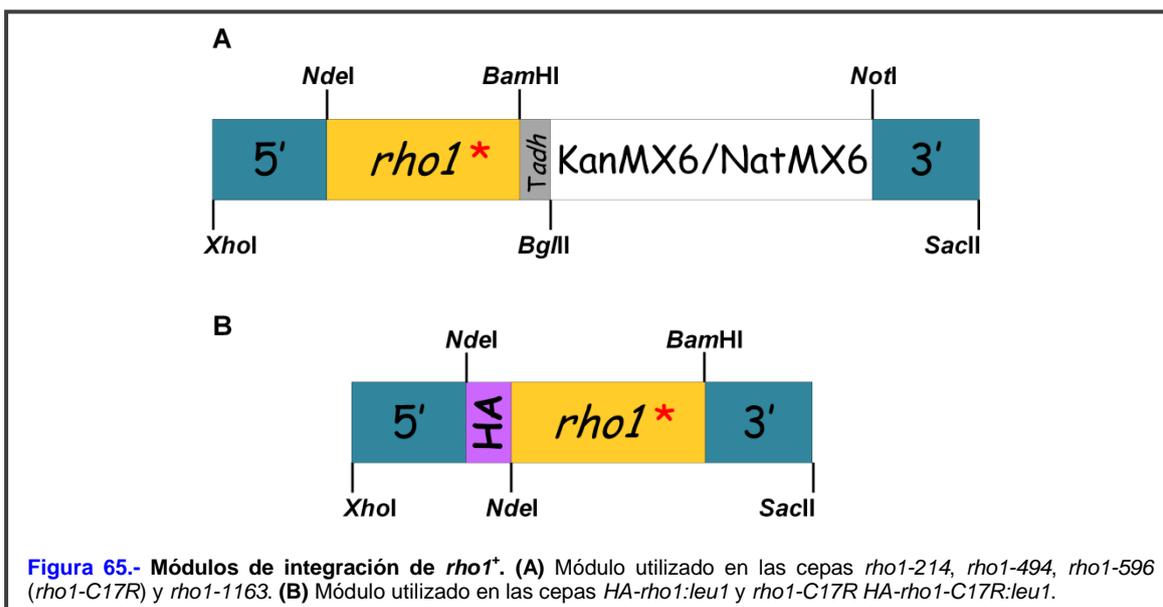
5.8 Transformación de *S. pombe*

La transformación de *S. pombe* se realizó por el método del acetato de litio-sorbitol (Ito, *et al.*, 1983), con las modificaciones descritas (Bahler, *et al.*, 1998).

5.9 Construcción del módulo de integración de *rho1*⁺

Para poder intercambiar las ORF de *rho1*⁺ por las versiones mutadas de la misma, se construyó un módulo de integración. Este módulo contenía 650 pares de bases de la región promotora de *rho1*⁺, las ORFs de *rho1*⁺ mutadas, la secuencia 3' no codificante del gen *adh* como terminador, el módulo de resistencia a geneticina (*KanMX6*) o el gen de resistencia a clonNat (*NatMX6*) y 500 pares de bases de la región 3' no codificante de *rho1*⁺. El módulo de integración se construyó mediante clonación secuencial de cada una de las partes en el plásmido KS⁺ (**Figura 65A**).

Una versión simplificada de este módulo sirvió para la construcción de distintos alelos de *rho1*⁺ marcados con HA. Este módulo contenía 650 pares de bases de la región promotora de *rho1*⁺, un epítipo HA en el sitio *NdeI*, las distintas ORFs de *rho1* y 500 pares de bases de la región 3' no codificante de *rho1*⁺ (**Figura 65B**). Inicialmente se



construyó mediante clonación secuencial de cada una de las partes en el plásmido KS⁺. Posteriormente el módulo completo se clonó en el plásmido pJK-148, en el sitio *Apal-SacII* de su secuencia de clonación múltiple.

5.10 Clonación de genes (*pmp1⁺* y *ppb1⁺*)

Determinados genes de *S. pombe* se utilizaron para ver si eran capaces de suprimir en sobreexpresión la termosensibilidad de la cepa mutante *rho1-C17R*. Dichos genes se clonaron llevando a cabo una PCR de alta fidelidad a partir de una genoteca de ADN codificante. Se utilizaron oligonucleótidos de los distintos genes, que incorporan los sitios *Bam*HI y *Nde*I en la región 5' del gen y otros que incorporan el sitio *Bam*HI en la región 3' del mismo (**Tabla VI**). Los productos de la PCR de alta fidelidad se clonaron en el plásmido KS⁺ para permitir la secuenciación de diferentes clones. Una vez comprobado que la secuencia era correcta, se clonaron en los plásmidos pREP3X, pREP41X y pREP81X en el sitio *Bam*HI de su secuencia de clonación múltiple.

5.11 Clonación del gen *ppb1ΔCt*

Para obtener una fosfatasa calcineurina independiente del complejo Ca²⁺/Calmodulina y constitutivamente activa, se deletionó el extremo C-terminal de dicho gen. Para lo cual, se llevó a cabo una PCR de alta fidelidad a partir del plásmido KS-*ppb1⁺*. Se utilizó el oligonucleótido *ppb1.1*, que incorpora los sitios *Bam*HI y *Nde*I en la región 5' del gen y el oligonucleótido *ppb1ΔC* que sustituye el codón de la lisina 445 por un codón de parada e incorpora el sitio *Bam*HI en la región 3' (**Tabla VI**). Los productos de la PCR de alta fidelidad se clonaron en el plásmido KS⁺ para permitir la secuenciación de diferentes clones. Una vez comprobado que la secuencia era correcta, se clonaron en el plásmido pREP3X en el sitio *Bam*HI de su secuencia de clonación múltiple.

5.12 Plásmido de expresión NMT1-V5-6His-CPY*

El plásmido NMT1-V5-6His-CPY*, fue cedido amablemente por el Dr. Eric C. Chang. Este plásmido contiene el marcador de selección LEU2 de *S. cerevisiae* (que complementa estirpes *leu1-32* de *S. pombe*), el promotor *nmt1*, el epítipo V5 y seis unidades de histidina (6His) en fase con el gen de la carboxipeptidasa de *S. cerevisiae*

con una mutación puntual, que causa la sustitución del aminoácido glicina en la posición 255 por una arginina (G255R). Dicha mutación hace que la proteína presente defectos en el plegamiento, lo que impide que siga la ruta normal de transporte, acumulándose en el retículo endoplasmático y por ello, sirve de sustrato del mecanismo ERAD (*Endoplasmic Reticulum Associated Degradation*) (Hartmann-Petersen, *et al.*, 2004; Otero, *et al.*, 2010).

5.13 Obtención de cepas *GFP-rho1:leu1* y *GFP-rho1-C17R:leu1*

Para poder observar la localización de las proteínas GFP-Rho1 y GFP-Rho1-C17R en un fondo genético silvestre o *rho1-C17R*, se integraron los genes que codificaban dichas proteínas en el locus de *leu1*⁺. Para lo cual, se partió de la variación módulo de integración de *rho1*⁺ descrito en la **figura 65B**, clonado en el plásmido pJK-148 con las ORFs de *rho1*⁺ y *rho1-C17R* (pJK-148-*HArho1* y pJK-148-*HArho1-C17R*). Se procedió a sustituir el epítipo HA en el sitio *Ndel* de la región 5' del gen de *rho1*⁺ por el epítipo GFP + 8 Ala. Esta nueva secuencia presenta 8 alaninas en su extremo 3' que funcionan como puente entre la proteína GFP y Rho1 o Rho1-C17R.

Tras la obtención de los plásmidos pJK-148-*GFPrho1* y pJK-148-*GFPrho1-C17R* se procedió a transformar las cepas *leu1-32* y *rho1-C17R leu1-32* con dichos plásmidos linearizados con la enzima *NruI*.

5.14 Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo

Para marcar la proteína Ppb1 en el extremo carboxilo con la proteína verde fluorescente (GFP), se utilizó el método descrito por (Bahler, *et al.*, 1998), que permite la fusión de este epítipo en fase con la ORF del gen de interés. Como molde, se utilizó el plásmido que contienen las secuencias del epítipo deseado 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.

6. BÚSQUEDA DE SUPRESORES EN UNA GENOTECA DE *S. pombe* DE ADN GENÓMICO

Para encontrar supresores del fenotipo de termosensibilidad de la cepa *rho1-C17R*, se transformó la cepa *leu1-32 ura4D-18 rho1-C17R:NatMX6* con la genoteca de ADN genómico pURSP1 ("American Type Culture Collection"). En los plásmidos de esta genoteca, que son capaces de complementar estirpes *ura4-D18*, se encuentra clonado el genoma de *S. pombe*, con insertos de 2,5 kb a 10 kb. Teniendo en cuenta que el genoma de *S. pombe* es de 14 Mb aproximadamente y considerando que cada fragmento del genoma se encontrase igualmente representado en la genoteca, necesitaríamos alrededor de 10.000 clones para tener un 99% de probabilidad de encontrar una secuencia determinada del genoma en uno de ellos. Para hacer estos cálculos se utiliza la siguiente expresión:

$$N = \ln(1-P) / \ln(1-I/G)$$

donde N es el número de clones necesarios para obtener una buena representación del genoma; P es la probabilidad de encontrar una secuencia determinada en el genoma; I es el tamaño medio del inserto expresado en pares de bases y G es el tamaño del genoma expresado en pares de bases (Seed, *et al.*, 1982).

Una vez transformada la cepa problema, se puso a crecer en un medio mínimo carente de uracilo a una temperatura de 28°C. Los transformantes resultantes fueron replicados en el mismo medio e incubados a una temperatura de 35°C, y se seleccionaron aquellos que eran capaces de corregir el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante.

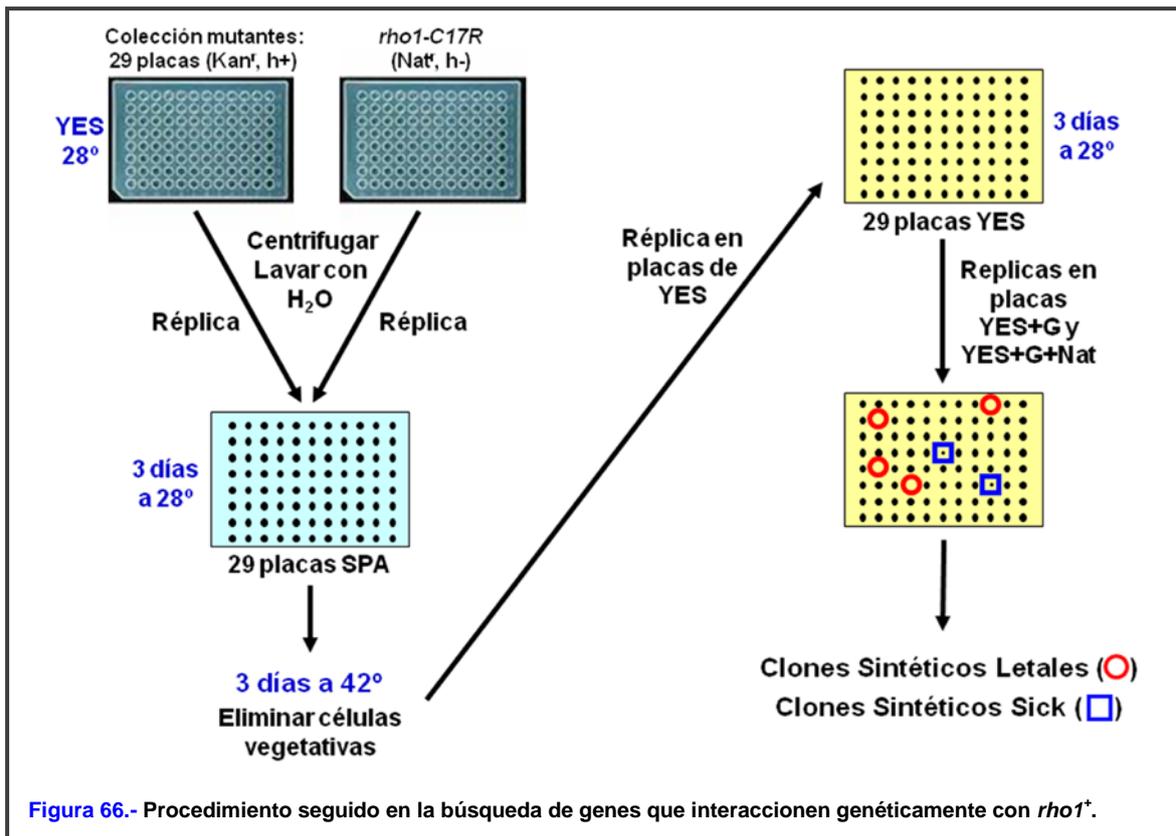
Tras recuperar el ADN plasmídico de los clones revertientes, se secuenciaron los extremos de los insertos contenidos en estos plásmidos y se comprobó a qué fragmento del genoma de *S. pombe* correspondían los insertos, identificándose los posibles genes supresores.

7. BÚSQUEDA DE INTERACCIONES GÉNICAS MEDIANTE CRUCE CON UNA COLECCIÓN DE CEPAS DE *S. pombe* CON DELECIÓN DE UN GEN

Para encontrar posibles interacciones génicas entre *rho1*⁺ y otros genes de *S. pombe*, se utilizó una colección de cepas mutantes de esta levadura, en la que cada clon presenta delecionado un gen no esencial. La colección de mutantes de delección fue desarrollada en conjunto por la compañía coreana Bioneer y el Instituto de Investigaciones en Ciencias Biológicas y Biotecnología de Corea del Sur (KRIBB) en colaboración con el Dr. Paul Nurse, del Centro de Investigación del Cáncer del Reino Unido. La versión 2.0 comprende 2.900 cepas haploides (con un genotipo h⁺ *ade6-M210 ura4-D18 leu1-32*) que cubren aproximadamente el 93,5% de los genes no esenciales de *S. pombe*. Para su construcción, cada gen se eliminó y se reemplazó por un módulo de delección mediante recombinación homóloga. Cada módulo contiene el gen marcador *kanMX4*, que confiere resistencia a la geneticina (G-418) y una pareja de códigos de barras que identifica cada delección como una entidad única (Kim, *et al.*, 2010; Spirek, *et al.*, 2010)(<http://www.bioneer.com>).

Para realizar este *screening* se utilizó la cepa mutante h⁻ *leu1-32 ura4-D18 rho1-C17R:NatMX6*, cruzándose con todos los clones de la colección en medio SPA. Después de tres días a 28°C, se produjo la conjugación y esporulación de las cepas obteniéndose: esporas, diploides y células vegetativas sin cruzar. Para seleccionar las esporas se incubaron las placas durante tres días a 42°C, al ser estas más resistentes a la temperatura, tras lo cual se realizó una réplica de la placa SPA en medio no selectivo. Se permitió germinar a las esporas durante tres días a 28°C y se replicaron primero en medio rico suplementado con geneticina y después en este mismo medio pero suplementado con geneticina y clonNat, de tal forma que únicamente las cepas mutantes dobles eran capaces de crecer (**Figura 66**).

A continuación, se procedió a observar las colonias resultantes, que se compararon con aquellas crecidas en medio con geneticina. Un tamaño menor de colonia identifica clones *sintéticos sick* o enfermos y la ausencia de crecimiento, indica una interacción *sintética letal* entre los genes parentales. En este último caso, hay que descartar aquellas delecciones que por sí solas provocan esterilidad y las delecciones de los genes físicamente ligados a *rho1*⁺ en el cromosoma.



8. MARCAJE Y FRACCIONAMIENTO DE LOS POLÍMEROS DE LA PARED CELULAR

Se utilizó el método descrito por (Arellano, *et al.*, 1996). Las células se incubaron en medio rico antes de añadir el precursor radiactivo. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica a 600 nm entre 0,5-0,8 se llevó a cabo el marcaje de los mismos, durante un periodo de 6 horas a 28°C y con 0,5 μ Ci/ml de ¹⁴C-glucosa. Se tomaron dos muestras de 50 μ l al comenzar y dos al terminar la incubación para calcular la incorporación total de glucosa radiactiva en las células. El resto de cultivo se recogió, se lavó tres veces con EDTA 1 mM y se sometió a rotura mecánica mediante agitación con bolas de vidrio en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant). La rotura se comprobó por observación al microscopio de contraste de fases. El extracto obtenido se diluyó hasta 1 ml con EDTA 1 mM, se decantaron las bolas de vidrio y se centrifugó a 1.000 x g para recoger las paredes. Estas se lavaron tres veces con NaCl 2 M y otras dos veces con EDTA 1 mM y se tomaron dos alícuotas de 20 μ l para determinar la incorporación total de ¹⁴C-glucosa en las paredes. Después, las paredes se hirvieron 5 minutos para inactivar las posibles glucanasas incluidas en la pared y se resuspendieron en 500 μ l de EDTA 1 mM. Se hicieron alícuotas de 100 μ l, de las cuales una se incubó con 100 μ l de tampón citrato-

fosfato 50 mM pH 5,6; dos alícuotas se incubaron en el mismo tampón en presencia de 10 µg de Zymoliasa 100T (Seikagaku Kogio) y otras dos se incubaron en 100 µl del tampón Tris-HCl 50 mM pH 7,5 con 100 unidades de Quantazima (Quantum, Biotechnologies ING), que es una endo- β -(1,3)-glucanasa recombinante.

Todas las muestras se incubaron a 28°C durante 36 horas, tras lo cual se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y de los precipitados. Todas las alícuotas (excepto los sobrenadantes que se valoraron directamente) se diluyeron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10 %, manteniéndose a 4°C hasta ser filtradas sobre papel Whatman GF/C. Estos filtros se lavaron 3 veces con 1 ml de TCA y 2 veces con 3 ml de etanol. Después se secaron y se determinó su radiactividad en un contador de centelleo Wallac 1409, añadiendo líquido de centelleo Optiphase "Hisafe" (Hartmann-Petersen, *et al.*). El precipitado de la incubación con Zymoliasa 100T corresponde al α -glucano presente en la pared mientras que el sobrenadante de la incubación con Quantazima corresponde al β -(1,3)-glucano. La diferencia entre los precipitados de Quantazima y Zymoliasa 100T corresponde a galactomanano y β -(1,6)-glucano.

9. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA β -(1,3)-D-GLUCÁN SINTASA

Para realizar este ensayo se partió de un volumen de cultivo de 100 ml, creciendo exponencialmente, a una D.O.₆₀₀ máxima de 1,0. En cada ensayo se realizaron dos cultivos de cada cepa, para tener datos por duplicado.

Las muestras se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos y a 4°C. Las células se lavaron con 10 ml de tampón de lavado (Tris-HCl 50 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; β -mercaptoetanol 1 mM), y se volvieron a centrifugar en las mismas condiciones. Tras esto, las células se resuspendieron en 600 µl de este mismo tampón y se transfirieron a un tubo de microcentrífuga frío. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a 3.000 rpm (a 4°C) y se descartaron los sobrenadantes. A cada muestra se le añadieron 100-150 µl de tampón de lavado y perlas de vidrio de 0,45 nm de diámetro, frías ("Glasperlen", Braun Biotech International), en una "Fast Prep" FP120 (Savant; Bio101) 2 veces durante 10 segundos, a una velocidad de 6 m/s y a 4°C. Posteriormente, los extractos se transfirieron a tubos fríos, se diluyeron hasta 15 ml con tampón de lavado y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga a 4°C para eliminar las paredes celulares. Seguidamente los sobrenadantes se pasaron a tubos fríos de 30 ml y

se centrifugaron durante 30 minutos a 18.000 rpm en una centrífuga Beckman con rotor 81X56Y a 4°C, para recoger las membranas celulares. Éstas se resuspendieron en un volumen final de 150 µl de tampón de resuspensión (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 1 mM; β-mercaptoetanol 1 mM; 33% glicerol) usando varillas de vidrio y vórtex. Después se pasaron a un tubo de microcentrífuga frío y se centrifugaron a 3.000 rpm a 4°C, para eliminar cualquier bola de vidrio o célula sin romper. El sobrenadante se pasó a un tubo nuevo.

La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito por (Bradford, 1976).

Seguidamente se prepararon las mezclas de reacción empleando [¹⁴C] UDP-D-glucosa como sustrato. Las mezclas de reacción que se prepararon contenían los siguientes componentes:

Mezcla A para reacciones con GTP (cantidades añadidas por cada muestra):

- H₂O: 9 µl
- [¹⁴C] UDP-D-glucosa (2x10⁵ cpm/µmol) 5 mM: 5 µl
- Seroalbúmina Bovina al 6%: 5 µl
- GTP 6 mM: 1 µl

Mezcla A para reacciones sin GTP (cantidades añadidas por cada muestra):

- H₂O: 10 µl
- [¹⁴C] UDP-D-glucosa (2x10⁵ cpm/µmol) 5 mM: 5 µl
- Seroalbúmina Bovina al 6%: 5 µl

Mezcla B (cantidades añadidas por cada muestra):

- H₂O: 2 µl
- EDTA 17 mM: 5 µl
- Tris-HCl 1 M pH 8: 3 µl
- Membranas (de cada muestra): 10 µl

Se tomaron 20 µl de la mezcla de reacción A y se añadieron 20 µl de la mezcla de reacción B de cada muestra en tubos de vidrio. El volumen final de cada reacción fue de 40 µl, en los que 10 µl correspondían a extractos de membrana de cada muestra. El control negativo o blanco de la reacción tenía 20 µl de la mezcla A sin GTP, 12 µl de agua, 5 µl de EDTA 17mM y 3 µl de Tris-HCl 1M pH 8. Las reacciones se incubaron a 30°C durante 1h. Después de este tiempo las reacciones se pararon añadiendo 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10% a cada tubo y se incubaron a 4°C durante un mínimo de 30 minutos. Después las muestras se filtraron utilizando filtros Watman (Watman GF/C) que se lavaron 2 veces con 2 ml de TCA al 10% y dos veces más con 5 ml de etanol al 96%. Posteriormente los filtros se introdujeron en viales con 2 ml de solución de centelleo (OptiPhase "HiSafe", Wallac). La radioactividad de las muestras se valoró en un contador de centelleo (Wallac 1409). Como control, se colocaron 5 µl de [¹⁴C] UDP-D-glucosa 5 mM en un filtro, para obtener las cuentas totales de la reacción.

Para calcular la actividad específica en miliunidades por miligramo de proteína se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{cpm obtenidas} \times 200 \times 1.000 / \text{cpm totales} \times \text{minutos} \times \mu\text{g proteína} = \text{mU/mg}$$

donde cpm son las cuentas por minuto y los minutos son 60.

La unidad específica se define como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1 µmol de glucosa en glucano por minuto a 30°C.

10. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

10.1 Obtención de extractos celulares

Los ensayos de Western-blot para comprobar la expresión de proteínas marcadas con distintos epítomos, se realizaron a partir de extractos celulares obtenidos de la siguiente manera: Se resuspendieron 1×10^8 células en 200µl del tampón de lisis que consta de Tris-HCl 20 mM pH8, EDTA 2 mM, NaCl 137 mM, glicerol al 10% y NP-40 al 0,5% con inhibidores de proteasas (aprotinina 2 µg/ml, leupeptina 2 µg/ml, pestatina 2 µg/ml y PMSF 1 mM). 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 m/s.

Se comprobó la rotura celular por observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante

centrifugación a 5.000 rpm durante 10 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 descrito por (Bradford, 1976). Finalmente las muestras se prepararon en tampón de carga (SDS al 2%, glicerol al 10%, DTT 50 mM y azul de bromofenol al 0,04%) para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

10.2 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Las muestras de extracto total o de los precipitados se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100°C y se centrifugaron a 12.000 rpm durante otros 5 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 30 mA por gel. El tampón de carrera utilizado fue Tris/ Glicina (24,8 mM/192 mM) y SDS al 0,1 % pH 8,3. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) mediante el sistema Mini Protean III 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.

10.3 Inmunodetección de proteínas

En primer lugar, las membranas se bloquearon en TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y Tween 20 al 0,1% de SIGMA) con seroalbúmina bovina al 1-3% 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 4 veces durante 5 minutos con abundante TBST y se incubaron después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa (HRP, *horseradish peroxidase*) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se volvieron a lavar 4 veces con TBST y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia. Se empleó el kit ECL (RPN2106 Amersham Corporation). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron usando películas X Ray Film 100NIF (Fujifilm).

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal de ratón frente al epítipo HA, 12CA5 (Boehringer), a una dilución 1:6.000.
- Anticuerpo monoclonal de rata frente al epítipo HA, HA *high affinity* (Wood, *et al.*), a una dilución de 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína actina, C4 (ICN Biomedicals), a una dilución 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína GFP, JL-8 (BD Biosciences), a una dilución 1:3.000-1:6.000.
- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína Cpy de *S. cerevisiae*, 10A5 (Molecular Probes, Invitrogen), a una dilución 1:100.
- Anticuerpo monoclonal de ratón frente al epítipo V5, SV5-pk1 (Thermo Scientific) a una dilución 1:5.000.
- Anticuerpo policlonal de conejo frente a la proteína MAPK p44/42, p44/42 (Cell Signaling Technology) a una dilución 1:1.000.
- Anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG de ratón unido a HRP (BioRad) a una dilución 1:10.000-1:15.000.
- Anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG de conejo unido a HRP (BioRad) a una dilución 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal de cabra anti-IgG de rata unido a HRP (Santa Cruz Biotechnology) a una dilución 1:15.000.

10.4 Inmunoprecipitación

Para realizar los ensayos de inmunoprecipitación, se obtuvieron extractos de 5×10^8 células que expresaban las diferentes proteínas marcadas con epítipos HA y GFP. El tampón de lisis utilizado en estas coprecipitaciones consta de Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 137 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 0,5 % y un cóctel de inhibidores de proteasas comercial (*Protease Inhibitor cocktail*; SIGMA). Los extractos (2 mg) se incubaron con anticuerpos policlonales frente al epítipo HA durante 2 horas, posteriormente se incubaron con 40 μ l de proteína A -sefariosa (Protein A sepharose CL-4B, GE Healthcare) al 50 % en tampón de lisis durante 2-4 horas más a 4°C. A

continuación, los complejos unidos a la matriz de sefarosa se sedimentaron por centrifugación y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis. Finalmente, los complejos se resuspendieron en 30 μ l de tampón de carga 2X (SDS al 4 %, glicerol al 20 %, DTT 100 mM y azul de bromofenol al 0,08 %) para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

El anticuerpo utilizado para la inmunoprecipitación fue:

- Anticuerpo policlonal de conejo frente al epítipo HA (Abcam), 2 μ g.

Para el revelado de las membranas se utilizó:

- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a la proteína GFP, JL-8 (BD Biosciences), a una dilución 1:3.000.
- Anticuerpo monoclonal de rata frente al epítipo HA, HA *high affinity* (Wood, *et al.*), a una dilución de 1:10.000.

10.5 Análisis de los niveles de GTP-Rho1

10.5.1 Producción de GST-RBD

La cantidad de Rho1 activa en distintas cepas de *S. pombe* se determinó mediante el ensayo de precipitación con GST-RBD que contiene el dominio de unión a RhoA (RBD, *Rho Binding Domain*) de la proteína rotequina fusionada a la secuencia que codifica la proteína GST (Reid, *et al.*, 1996). Este dominio solo se asocia a Rho1 cuando está unida a GTP. La proteína recombinante GST-RBD se obtuvo en una cepa DH5 α de *E. coli* transformada con el plásmido pGEX-RBD. Las bacterias transformadas se incubaron a 28°C en 400 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm 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 y se incubaron 3 horas más a 28°C.

Se recogieron las células por centrifugación a 5.000 rpm y se resuspendieron en 20 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂HPO₄ 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM) frío al que se añadieron previamente inhibidores de proteasas (pestatina 2 μ g/ml, leupeptina 2 μ g/ml, aprotinina 2 μ g/ml y PMSF 1mM) 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 7.800 x g durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se añadieron 600 de glutation -sefarosa al 50% previamente equilibrada con PBS y se incubó durante 2 horas a 4°C. A continuación, las bolas de glutation-sefarosa con la proteína de fusión GST-RBD unida, se lavaron 3 veces con 40 ml de PBS, recogiendo por centrifugación a 3.000 rpm. Por último, se resuspendieron al 50% en solución de lisis B: Tris-HCl 50 mM pH 7,6, NaCl 20 mM, glicerol al 10%, MgCl₂ 2 mM, DTT 0,1 mM y NP-40 al 0,5%, con inhibidores de proteasas a la misma concentración que la descrita anteriormente.

La cantidad de proteína GST-RBD purificada se cuantificó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie, comparándola con diferentes cantidades de seroalbúminabovina.

10.5.2 Ensayo de unión

Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio que expresaban HA-Rho1, tal y como se describió en el apartado 10.1 de Materiales y Métodos, pero utilizando tampón de lisis B. Los extractos (2 mg de proteína total), se igualaron a 500 µl con tampón de lisis B y se añadieron 10µg de GST -RBD asociado a bolas de glutation 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 de poliacrilamida al 12%. Luego se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-HA 12CA5 para detectar la fracción de la proteína HA-Rho1 unida a GTP que había precipitado al unirse al dominio RBD.

10.6 Ensayo de *immunoblot* de colonias

El ensayo de *immunoblot* de colonias para detectar la proteína Cpy1 secretada se realizó como lo describió (Iwaki, *et al.*, 2006) con las modificaciones utilizadas por (Codlin y Mole, 2009). Células creciendo en fase exponencial se concentraron hasta una D.O._{600nm} de 2, y se depositaron 5µl de esta suspensión de células sobre una membrana de nitrocelulosa colocada sobre placas de YES o YES suplementado con sorbitol 1,2 M, incubándose durante 3-5 días a 25°C. Tras lavar la membrana con TBST para eliminar las células, se procedió a bloquear la membrana en TBST con seroalbúmina bovina al 1%

y se inmunodetectó la Cpy1, tal y como se describe en el apartado 10.3 de esta sección, con el anticuerpo monoclonal anti-Cpy.

10.7 Ensayo de determinación de la actividad de Pmk1

Para determinar la actividad de la MAPK Pmk1 se analizó el grado de fosforilación de esta proteína. Se incubaron las células en medio YES normal o YES suplementado para conseguir distintos estreses, a una temperatura de 28°C, recogiendo mediante filtración 40 ml de cultivo al tiempo de incubación necesario para cada experimento. A continuación se recuperaron las células del filtro en tubos de microcentrífuga fríos a los que previamente se les había añadido 1 ml de PBS frío. Los precipitados resultantes se congelaron y se guardaron en hielo seco. A continuación, todas las muestras se descongelaron y se resuspendieron en 150 µl de solución de lisis E (Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM, glicerol al 10%, NP-40 al 0,1% e imidazol 15 mM) con inhibidores de proteasas (aprotinina 2 µ/ml, leupeptina 2 µ/ml, pestatina 2 µ/ml y PMSF 1 mM). 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 velocidad de 6,0 m/s. Se comprobó la rotura celular por observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 15 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 por el método colorimétrico descrito por (Bradford, 1976). Pmk1-HA-6H se purificó a partir de 800 µg de extracto celular utilizando 60 µl de bolas de níquel Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen) al 50% e incubando las distintas muestras durante dos horas en agitación a 4°C. Posteriormente, Pmk1 unida a las bolas de níquel se sedimentó por centrifugación y se lavó tres veces con 1 ml de Tris-HCl 1 M pH 8. Finalmente, la proteína se resuspendió en 25 µl de tampón de carga 2X para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida al 10% y posterior análisis por Western-blot. Para detectar el estado activo de Pmk1 se utilizaron anticuerpos policlonales anti-fosfo-p44/42 y para detectar la cantidad total de Pmk1 purificada se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-HA, 12CA5.

10.8 Valoración de la estabilidad de la proteína CPY*

Para determinar la vida media de la proteína CPY* en las cepas silvestre y *rho1-C17R* se siguió el protocolo descrito por (Hartmann-Petersen, *et al.*, 2004; Otero, *et al.*,

2010). Las células transformadas con el plásmido NMT1-V5-6His-CPY* se incubaron en medio mínimo líquido sin tiamina durante 21 horas a 28°C para permitir la expresión de CPY*. Posteriormente, el medio se suplementó con tiamina 100 mM y cicloheximida (SIGMA) 250 µg/ml para bloquear la expresión del plásmido y la síntesis proteica *de novo*, respectivamente. A continuación, se recogieron muestras a las 0; 0,5; 1; 2 y 4 horas, después de haber añadido estos compuestos y se resuspendieron las células en tampón STOP (NaCl 154 mM, NaN₃ 1 mM y EDTA 10 mM) para parar el metabolismo celular y se congelaron a -80°C. Los extractos proteicos fueron obtenidos tal y como se describe en el apartado 10.1 de esta sección y analizados por Western-blot. La inmunodetección de CPY* se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal anti-V5.

11. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS Y TINCIÓNES

Para llevar a cabo estas técnicas, se emplearon diversos microscopios: **Leica DM RXA** equipado con un sistema de iluminación halógena, filtros para microscopía de contraste interdiferencial (DIC) y contraste de fases, objetivos de inmersión en aceite y una cámara fotográfica digital Leica DFC350FX acoplada al microscopio; **Nikon Eclipse TE-2000U** con una cámara Orca-ER. Ambos microscopios controlados mediante el software MetaMorph® (*MDS Analytical Technologies*); **Leica DM RXS** cuya captación de imágenes se realizó con una cámara digital Leica Qsensys y el programa informático Qfish; y el equipo Personal Deltavision Microscope (*Applied Precision*), que incluye un microscopio invertido **Olympus IX-70**, controlado mediante el software softWoRx Resolve3D, y la cámara CoolSNAP HQ2 (PHOTOMETRICS). Las imágenes se procesaron posteriormente con los programas MetaMorph® (*MDS Analytical Technologies*), Image-J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y Adobe Photoshop CS3 (*Adobe System, Inc*).

11.1 Microscopía de campo claro: contraste de fases y contraste diferencial (Nomarski)

Para la observación de células en campo claro o en contraste de fases se tomaron muestras directamente de los cultivos incubados en medio líquido o en placa.

11.1.1 Tinción con azul de metileno

El azul de metileno es un colorante que solo entra en las células que están muertas y han perdido la permeabilidad selectiva, de modo que éstas quedan teñidas de color azul, mientras que las células intactas no se tiñen con este colorante. En los casos que interesó comprobar si las células mantenían la integridad celular se tomaron muestras de los cultivos y se mezclaron con un volumen igual de una solución de azul de metileno al 0,1%. Las muestras se observaron inmediatamente mediante microscopía de campo claro.

11.2 Microscopía de fluorescencia

Para la observación de muestras fluorescentes, se utilizaron 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. Siempre se realizaron como referencia imágenes de contraste interdifereencial (Nomarsky) o de contraste de fases.

11.2.1 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 488 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, es necesario fusionar la secuencia de ADN que codifica esta proteína en fase con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la muestra en el microscopio de fluorescencia. En los experimentos también se han empleado variantes de la proteína verde fluorescente, como la EGFP (*Enhanced Green Fluorescent Protein*), más brillante que la original, que emite luz de 507 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 488 nm.

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 (Shaner, *et al.*, 2005) y que fue utilizada, en algunos casos, en este trabajo.

Además, estas proteínas pueden fusionarse en tándem para aumentar la intensidad de la luz de emisión.

11.2.2 Tinción de calcoflúor

El calcoflúor es un fluorocromo que tiñe las zonas de pared celular ricas en quitina en *S. cerevisiae*, pero que en *S. pombe* se une fundamentalmente al β -(1-3)-glucano lineal del septo y de los polos en crecimiento (Cortes, *et al.*, 2007) ya que *S. pombe* carece de quitina. El calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul. El calcoflúor (*Blankophor BBH*, Bayer Corporation) se preparó en agua a una concentración de 1 mg/ml. Para conseguir la completa disolución, se añadieron gotas de KOH 10 N. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

La tinción de calcoflúor se realizó directamente sobre la muestra antes de su observación, añadiendo el calcoflúor a una dilución 1/6 (v/v).

11.2.3 Tinción de actina

Para esta tinción se utiliza la faloidina, una toxina extraída del hongo *Amanita phalloides*, que se une con alta afinidad a la actina F (actina polimerizada), conjugada a un compuesto fluorescente, en nuestro caso, Alexa-fluor 448 (λ excitación 493 nm; λ emisión 520 nm).

La tinción de actina se realizó a partir del protocolo inicial descrito por (Marks y Hyams, 1985), siguiendo las indicaciones y modificaciones realizadas por F. Chang. Partiendo de un cultivo en fase exponencial, se tomaron 5 ml de células y se fijaron añadiendo 1 ml (1/5 del volumen del cultivo) de formaldehído al 16% (EM-grade MeOH Free, Polysciences) y 500 μ l (1/10 del volumen del cultivo) de tampón PEM (PIPES 100 mM, EGTA 1 mM, Mg₂SO₄ 1 mM, pH 6,9). Las células se incubaron en agitación a la temperatura del cultivo durante 1 hora y posteriormente se lavaron 3 veces con tampón PEM. Se recogieron de nuevo las células y se permeabilizaron resuspendiéndolas en PEM con Tritón T-X100 al 1% durante 30 segundos, para permitir la posterior entrada del fluorescente. Finalmente, se lavaron tres veces con PEM, se taponó las células permeabilizadas y se mezclaron con 8 μ l de Alexa-fluor 448-faloidina (*Molecular Probes*), resuspendida en PEM. Estas muestras se incubaron en oscuridad durante 1 hora en un agitador orbital a temperatura ambiente. Las muestras así teñidas pueden guardarse durante 1 ó 2 días a 4°C. Éstas se examinaron con el microscopio de fluorescencia.

11.2.4 Tinción con FM4-64

Para analizar el proceso de endocitosis se empleó la tinción de células vivas con el colorante FM4-64 (Vida y Emr, 1995). El FM4-64 [dibromuro de N-(3-trietilamoniopropil)-4-(6-(dietilamino)fenil) hexatrienil] piridina] es un colorante lipofílico fluorescente que permite observar el proceso de endocitosis desde su incorporación a la membrana plasmática, su transporte por la ruta endosomal y su llegada e incorporación a la membrana vacuolar como destino final. Esta última característica permite también analizar la morfología de dichos orgánulos celulares.

Para la tinción con este colorante se partió de cultivos en fase logarítmica de crecimiento (D.O._{600nm} 0,8-1,0). Se tomó 1 ml de cultivo de la muestra y se centrifugó a 3.000 rpm durante 1 minuto. Posteriormente se retiró el sobrenadante dejando una pequeña cantidad del mismo para resuspender las células. El tubo con la muestra se introdujo en hielo de 3 a 5 minutos para así detener el proceso de endocitosis. Una vez transcurrido este tiempo se añadieron 1,2µl de una dilución 1:10 en agua del colorante FM4-64 (Synptored, Biotium, stock disuelto en agua a 10 mM). Para permitir una incorporación eficiente del colorante a la membrana se mantuvieron las muestras en hielo durante 3-5 minutos. A partir de este tiempo se pudieron observar claramente las zonas activas de endocitosis en la membrana plasmática, siendo el marcaje más intenso en las zonas de los polos y de septación de las células en división. Debido a la rápida internalización de este colorante, a los 2 minutos ya se apreciaban endosomas en el interior celular. Para ver la envuelta vacuolar fue necesario incubar las muestras un mínimo de 30 minutos a 28°C después de haber añadido el colorante.

Las células se observaron al microscopio de fluorescencia (λ excitación 508 nm; λ emisión 751 nm) tras la incubación.

11.2.5 Tinción con CDCFDA

Para observar la morfología vacuolar se realizaron tinciones con el compuesto 5-6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato (CDCFDA). Este compuesto entra en las células por un mecanismo independiente de la endocitosis y se almacena en las vacuolas (Roberts, *et al.*, 1991).

Las células en crecimiento exponencial se recogieron, se lavaron con medio suplementado con ácido cítrico 10 mM y se incubaron durante 30 minutos a 28°C en medio con ácido cítrico 10 mM y CDCFDA 2,5 µM. Posteriormente las células se lavaron

con medio con ácido cítrico 10 mM y se realizaron micrografías de fluorescencia a una λ excitación 492 nm y una λ emisión 517 nm.

11.3 Microscopía a tiempo real

El seguimiento de la viabilidad de células *rho1-C17R* a temperatura no permisiva a lo largo del tiempo, se llevó a cabo mediante experimentos de video-microscopía. En estos experimentos es necesario mantener las células en un medio con los nutrientes necesarios para garantizar su crecimiento, y es imprescindible que las células no se muevan en el portaobjetos para obtener una imagen enfocada en cada tiempo y poder comparar la evolución de la lisis. Para ello, se utilizaron portaobjetos excavados en los que se añadieron 50 μ l de medio sólido fundido. Tras solidificar el medio, se añadieron 2 μ l de la suspensión de células, se colocó el cubreobjetos y se selló la preparación para evitar que las células se movieran. Se tomaron fotografías a distintos intervalos de tiempo.

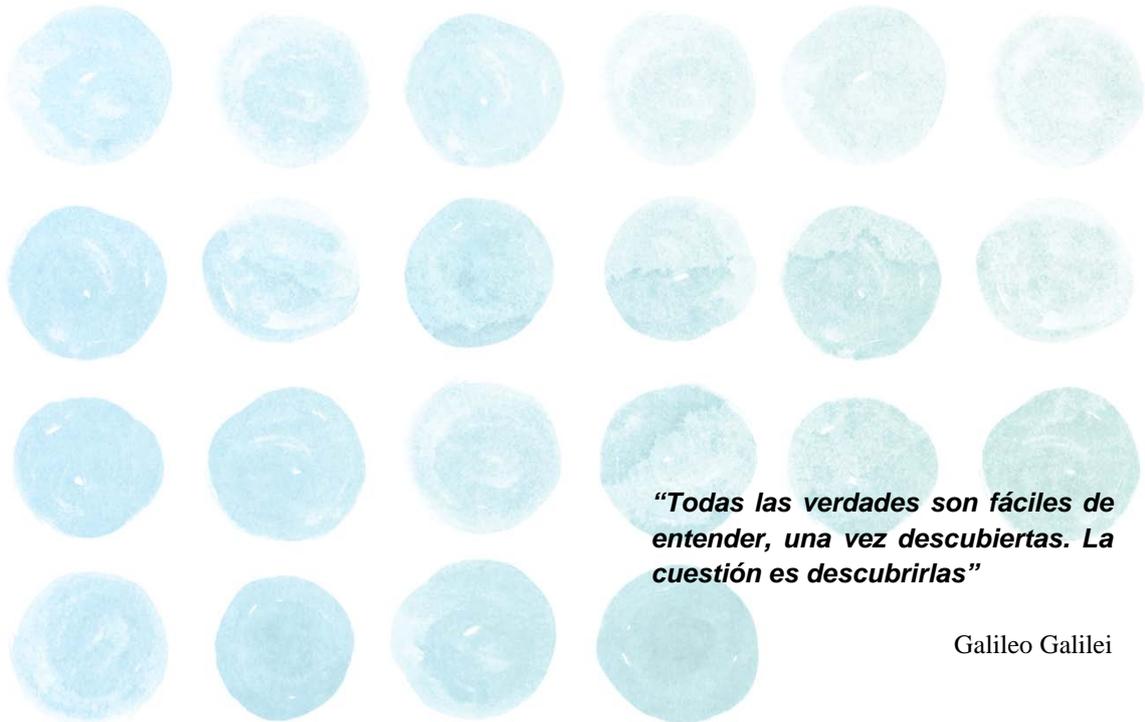
12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS

Para el análisis informático de las secuencias de ADN y de proteínas, alineamiento de secuencias y mapas de restricción, se utilizaron los programas DNASTar, DNASTrider y Clustal Omega.

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>).

Las búsquedas bibliográficas se realizaron a través de la base de datos de MedLine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=pubmed>).

Apéndices



“Todas las verdades son fáciles de entender, una vez descubiertas. La cuestión es descubrirlas”

Galileo Galilei

APÉNDICE I

ENSAYOS DE CRECIMIENTO DE LA CEPA *rho1-C17R* Y OTRAS CEPAS RELACIONADAS EN MEDIO YES A 28°C EN PRESENCIA DE DISTINTOS COMPUESTOS

Ensayo de crecimiento en gota de las cepas indicadas en cada tabla, en medio YES suplementado con distintos compuestos en las concentraciones señaladas. A partir de una suspensión de células con una $D.O_{600nm}$ de 2 se hicieron diluciones seriadas $\frac{1}{4}$. Las placas se incubaron durante 3 días a 28°C.

El grado de crecimiento se muestra como:

NC No crecimiento

+ Crecimiento hasta la dilución 1 ó 1/4

++ Crecimiento hasta la dilución 1/16 ó 1/64

+++ Crecimiento hasta la dilución 1/256 ó 1/1.024

Tabla I.- Sensibilidad a $MgCl_2$

Cepa	$MgCl_2$ (M)				
	0	0,010	0,015	0,025	0,050
wt	+++	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	+++	+++	+
<i>rho1-C17R rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	++

Tabla II.- Sensibilidad a KCl

Cepa	KCl (M)				
	0	0,3	0,6	1	1,2
wt	+++	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	+++	++	++
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++	++	+
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+	+
<i>ppb1Δ</i>	+++	++	NC	NC	NC
<i>pmp1Δ</i>	+++	+++	+++	++	++

Tabla III.- Sensibilidad a NaCl

Cepa	NaCl (M)			
	0	0,05	0,10	0,20
wt	+++	+	+	NC
<i>rho1-C17R</i>	+++	+	NC	NC
<i>rho2Δ</i>	+++	++	+	NC
<i>pmk1Δ</i>	+++	++	+	NC
<i>ppb1Δ</i>	+++	++	NC	NC
<i>pmp1Δ</i>	+++	+	NC	NC

Tabla IV.- Sensibilidad a CaCl₂

Cepa	CaCl ₂ (M)					
	0	0,025	0,050	0,075	0,100	0,200
wt	+++	+++	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	+++	+++	+++	NC
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	++	++	NC	NC
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++	NC
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+	NC	NC	NC
<i>pmp1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++	NC

Tabla V.- Sensibilidad a FK506

Cepa	FK506 (μg/ml)			
	0	0,05	0,10	0,20
wt	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	++	+	NC
<i>rho1-C17R rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+++
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+++	+++

Tabla VI.- Sensibilidad a Calcoflúor

Cepa	Calcoflúor (mg/ml)			
	0	0,1	0,2	0,4
wt	+++	+++	+++	++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+	NC	NC
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+++
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++
<i>ppb1Δ</i>	+++	NC	NC	NC
<i>pmp1Δ</i>	+++	++	+	+

Tabla VII.- Sensibilidad a Caspofungina

Cepa	Caspofungina (μg/ml)				
	0	0,05	0,10	0,50	1,00
wt	+++	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	+++	NC	NC
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	NC	NC
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+
<i>pmp1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++

Tabla VIII.- Sensibilidad a Equinocandina

Cepa	Equinocandina (μg/ml)				
	0	0,1	0,2	0,4	0,6
wt	+++	+++	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	+	NC	NC
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	++
<i>pmp1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+++

Tabla IX.- Sensibilidad a Cafeína

Cepa	Cafeína (mM)		
	0	4	8
wt	+++	++	NC
<i>rho1-C17R</i>	+++	++	NC
<i>rho1-C17R rho2Δ</i>	+++	+++	+
<i>rho1-C17R pmk1Δ</i>	+++	+	NC
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	++
<i>pmp1Δ</i>	+++	+++	+++
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	NC

Tabla X.- Sensibilidad a EGTA

Cepa	EGTA (mM)		
	0	0,5	1,0
wt	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	++
<i>rho1-C17R pmk1Δ</i>	+++	+++	+++
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++
<i>yam8Δ</i>	+++	+++	+++
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	++

Tabla XI.- Sensibilidad a Miconazol

Cepa	Miconazol (μM)				
	0	0,1	0,2	0,5	1,0
wt	+++	+++	+++	+++	+
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	+++	++	NC
<i>rho2Δ</i>	+++	+++	+++	+	NC
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	++	+	NC
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+++	++	NC
<i>pmp1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	+

Tabla XII.- Sensibilidad a DTT

Cepa	DTT (mM)				
	0	10,0	12,5	15,0	17,5
wt	+++	+++	+++	++	++
<i>rho1-C17R</i>	+++	+++	++	++	++
<i>rho1-C17R pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	++	+
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	++
<i>ire1Δ</i>	+++	+++	+++	+	NC
<i>pmp1Δ</i>	+++	+++	++	++	++
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+++	+++	++

Tabla XIII.- Sensibilidad a Tunicamicina

Cepa	Tunicamicina (μg/ml)		
	0	0,03	0,05
wt	+++	+++	+++
<i>rho1-C17R</i>	+++	++	+
<i>rho1-C17R pmk1Δ</i>	+++	+++	++
<i>pmk1Δ</i>	+++	+++	+++
<i>ire1Δ</i>	+++	+++	+
<i>pmp1Δ</i>	+++	++	++
<i>ppb1Δ</i>	+++	+++	+++

APÉNDICE II

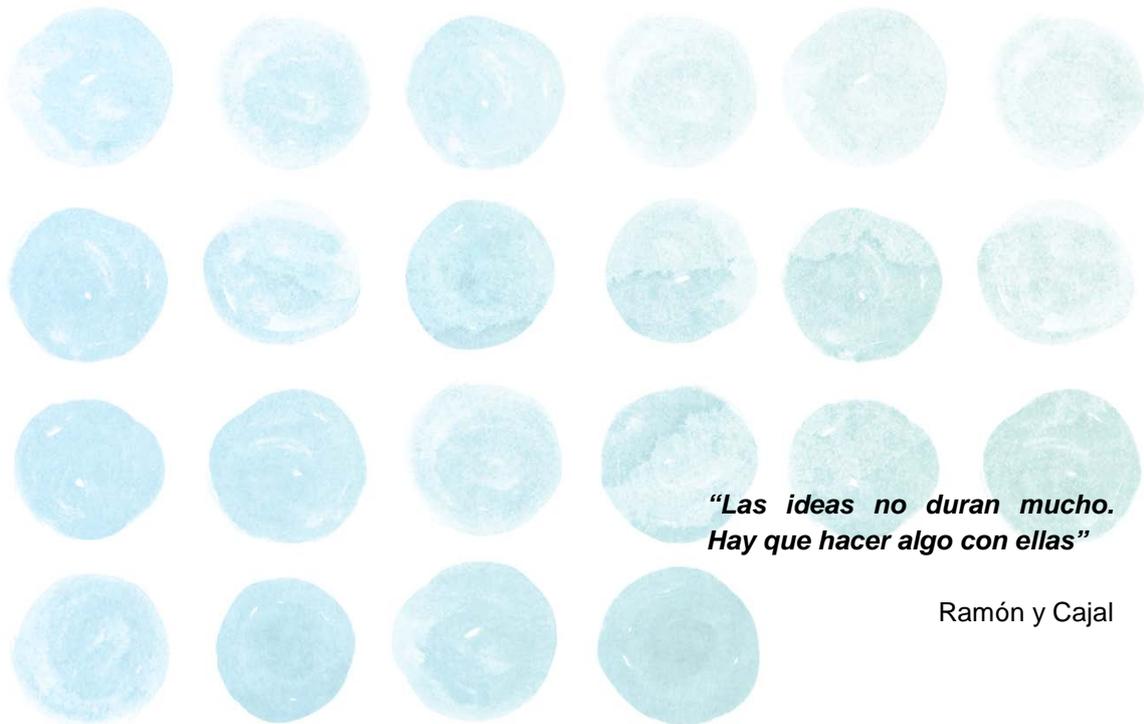
RESULTADOS DE LA BUSQUEDA DE INTERACCIONES GENÉTICAS DE LA CEPA MUTANTE *rho1-C17R* CON LA COLECCIÓN DE DELECCIONES VIABLES DE *S. pombe*

En esta tabla se muestran los genes que dieron interacción negativa con la cepa mutante *rho1-C17R*, tanto de tipo *sintético sick* como *sintético letal*.

Nombre del gen	Descripción del gen
<i>rgf1</i> ⁺	Rho-GEF.
<i>pck1</i> ⁺	Serine/threonine protein kinase, protein kinase C-like, Phorbol esters/diacylglycerol binding domain (C1 domain), HR1 repeat, C2 domain, similar to <i>S. cerevisiae</i> YBL105C, similar to <i>S. pombe</i> <i>pck2</i> (paralog), essential, involved in cellular morphogen.
<i>rga8</i> ⁺	GTPase activating protein, target Rho1 (implicated), RhoGAP domain, DEP domain, FCH domain, phosphorylated by Shk1p, localization cell ends (interphase), localization cell division site (cytokinesis), similar to <i>S. cerevisiae</i> YFL047W, SPAC2F7.18c.
<i>rga7</i> ⁺	GTPase activating protein, target Rho2, RhoGAP domain, DEP domain, FCH domain.
<i>rga2</i> ⁺	GTPase activating protein, pleckstrin homology domain, RhoGAP domain, similar to <i>S. cerevisiae</i> YPL115C.
<i>mtl2</i> ⁺	Glycoprotein (predicted), serine-rich protein, localization cell surface (predicted), 1 predicted transmembrane helix, possibly <i>S. pombe</i> specific.
<i>wsc1</i> ⁺	Transmembrane receptor Wsc1.
<i>ppb1</i> ⁺	Calcineurin catalytic subunit.
<i>cnb1</i> ⁺	Calcineurin regulatory subunit.
<i>cch1</i> ⁺	Involved in calcium ion transport, involved in calcium ion homeostasis.
<i>yam8</i> ⁺	Involved in calcium ion transport, involved in calcium ion homeostasis.
<i>pmr1</i> ⁺	P-type ATPase, calcium transporting.
<i>pmp1</i> ⁺	Dual-specificity MAP kinase phosphatase, non-essential, similar to <i>S. cerevisiae</i> YIL113W and YNL053W.
<i>pyp3</i> ⁺	Protein-tyrosine phosphatase, target Cdc2p, similar to <i>S. cerevisiae</i> YDL230W.
<i>sty1</i> ⁺	MAPK, SAPK cascade.
<i>kin1</i> ⁺	Serine/threonine protein kinase, non-essential, KA1 domain, microtubule affinity-regulating kinase, involved in cell polarity (establishment) (implicated), involved in microtubule-based movement (regulation), involved in new end formation (interphase).
<i>tsc1</i> ⁺	Hamartin, interacts physically with Tsc2p (predicted), deletion mutant defective in nutrient uptake, involved in intracellular protein transport, involved in regulation of arginine metabolism, involved in response to nutrients and disease associated.
<i>pac2</i> ⁺	cAMP-independent regulatory protein, involved in sexual development (regulation) (initiation), similar to <i>S. pombe</i> <i>gti1</i> , similar to <i>S. cerevisiae</i> YEL007W and YHR177W.
<i>ppk14</i> ⁺	Flipasa-serine/threonine protein kinase (predicted), similar to <i>S. pombe</i> SPBC1861.09, similar to <i>S. cerevisiae</i> YNR047W and YCR091W.
<i>mto1</i> ⁺	Involved in microtubule cytoskeleton organization and biogenesis, involved in astral microtubule organization.

<i>alp14</i> ⁺	TOG ortholog Alp14, attachment of spindle microtubules to kinetochore.
<i>klp6</i> ⁺	Kinesin-like protein Klp6.
<i>mug33</i> ⁺	Tea1-interacting protein involved in exocytosis.
<i>tip1</i> ⁺	CLIP170-like protein, CAP-Gly domain, similar to <i>S. cerevisiae</i> YCL029C, expression increased by heat shock, <i>noc1</i> .
<i>tea4</i> ⁺	Src (SH3) homology domain, involved in cell polarity (pers. comm. Sophie Martin), similar to <i>S. cerevisiae</i> YAR014C.
<i>tea1</i> ⁺	Microtubule-associated protein, kelch repeat protein, involved in cell-end anchoring (required), similar to <i>S. cerevisiae</i> YHR158C and YGR238C, similar to <i>S. pombe</i> <i>tea3</i> .
<i>tea2</i> ⁺	Kinesin-like protein, KIP2 subfamily, involved in the localization of polarity factors (PMID:12034771), no apparent <i>S. cerevisiae</i> ortholog.
<i>spa2</i> ⁺	GIT repeat protein (SMART), GTPase activating protein (predicted), similar to <i>S. cerevisiae</i> YLL021W and YLR313C.
<i>art7</i> ⁺	Arrestin family, calcium binding protein (predicted), PY motif (predicted), similar to <i>S. cerevisiae</i> YOR018W and YFR022W, similar to <i>S. pombe</i> SPCC584.15C, possibly binds to ubiquitin-protein ligase.
<i>clp1</i> ⁺	Cdc14-related protein phosphatase, Cdc14 family, non-essential, regulates coordination of cytokinesis with cell cycle progression, target Cdc25p (dephosphorylation), interacts physically with Cdc25p, promotes the destabilization of Cdc25p.
<i>fin1</i> ⁺	Serine/threonine protein kinase, NIMA-related kinase, expression peaks at M-G1 phase, regulated by PBF transcription complex, similar to <i>S. cerevisiae</i> YAR018C, involved in the localization of Plp1p, SIN component, involved in the asymmetry of SIN.
<i>blt1</i> ⁺	Contractil ring protein.
<i>cyk3</i> ⁺	Src (SH3) homology domain, involved in cytokinesis (predicted), localization contractile ring (pers. comm. Matthew Lord and Thomas D. Pollard), similar to <i>S. cerevisiae</i> YDL117W, non-essential (pers. comm. Matthew Lord and Thomas D. Pollard).
<i>fic1</i> ⁺	Hypothetical protein, similar to <i>S. cerevisiae</i> YNL152W, C2 domain.
<i>pxl1</i> ⁺	Paxillin-like protein.
<i>hob3</i> ⁺	Amphiphysin, GTPase-binding (predicted), actin cortical patch component (predicted), involved in cell cycle regulation, Human BIN3 complements the F-actin localization defects caused by loss of Hob3p, involved in cytokinesis, involved in actin cytosol.
<i>spn3</i> ⁺	Septin.
<i>mid2</i> ⁺	Anillin homologue.
<i>dma1</i> ⁺	Ubiquitin-protein ligase (E3) involved in spindle assembly checkpoint, required to prevent septum formation if spindle function is compromised, required to prevent premature exit from mitosis.
<i>mac1</i> ⁺	Membrane anchored protein, 3 predicted transmembrane helices, predicted N-terminal signal sequence, localization cell ends and septum.
<i>art7</i> ⁺	Arrestin, calcium binding protein, PY motif (predicted), possibly binds to ubiquitin-protein ligase.
<i>apl6</i> ⁺	AP-3 adaptor complex involved in Golgi to vacuole transport.
<i>apm3</i> ⁺	AP-3 adaptor complex involved in Golgi to vacuole transport.
<i>apl5</i> ⁺	AP-3 adaptor complex involved in Golgi to vacuole transport.
<i>aps3</i> ⁺	AP-3 adaptor complex involved in Golgi to vacuole transport.
<i>vam7</i> ⁺	Vacuolar SNARE (predicted), PX domain protein.

Bibliografía



***“Las ideas no duran mucho.
Hay que hacer algo con ellas”***

Ramón y Cajal

- Abruzzo, G. K., Gill, C. J., Flattery, A. M., Kong, L., Leighton, C., Smith, J. G., Pikounis, V. B., Bartizal, K. y Rosen, H. (2000).** Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother* **44**, 2310-8.
- Aghamohammadzadeh, S. y Ayscough, K. R. (2009).** Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat Cell Biol* **11**, 1039-42.
- Alcaide-Gavilan, M., Lahoz, A., Daga, R. R. y Jimenez, J. (2014).** Feedback Regulation of SIN by Etd1 and Rho1 in Fission Yeast. *Genetics* **196**, 455-70.
- Alvarez-Tabares, I., Grallert, A., Ortiz, J. M. y Hagan, I. M. (2007).** Schizosaccharomyces pombe protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *J Cell Sci* **120**, 3589-601.
- Anand, V. C., Daboussi, L., Lorenz, T. C. y Payne, G. S. (2009).** Genome-wide analysis of AP-3-dependent protein transport in yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 1592-604.
- Aono, T., Yanai, H., Miki, F., Davey, J. y Shimoda, C. (1994).** Mating pheromone-induced expression of the mat1-Pm gene of Schizosaccharomyces pombe: identification of signalling components and characterization of upstream controlling elements. *Yeast* **10**, 757-70.
- Aoyama, K., Aiba, H. y Mizuno, T. (2001).** Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of Schizosaccharomyces pombe. *Biosci Biotechnol Biochem* **65**, 2347-52.
- Aoyama, K., Mitsubayashi, Y., Aiba, H. y Mizuno, T. (2000).** Spy1, a histidine-containing phosphotransfer signaling protein, regulates the fission yeast cell cycle through the Mcs4 response regulator. *J Bacteriol* **182**, 4868-74.
- Arellano, M., Coll, P. M. y Perez, P. (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., Duran, A. y Perez, P. (1996).** Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in Schizosaccharomyces pombe morphogenesis. *EMBO J* **15**, 4584-91.
- Arellano, M., Duran, A. y Perez, P. (1997).** Localisation of the Schizosaccharomyces pombe rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* **110 (Pt 20)**, 2547-55.
- Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Duran, A. y Perez, P. (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 (Pt 20)**, 3569-78.
- Asp, E., Nilsson, D. y Sunnerhagen, P. (2008).** Fission yeast mitogen-activated protein kinase Sty1 interacts with translation factors. *Eukaryot Cell* **7**, 328-38.
- Audhya, A. y Emr, S. D. (2002).** Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Dev Cell* **2**, 593-605.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. y Struhl, K. (1995).** Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.
- Ayscough, K. R., Eby, J. J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K. G. y Drubin, D. G. (1999).** Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol Biol Cell* **10**, 1061-75.
- Bahler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. y Pringle, J. R. (1998).** Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in Schizosaccharomyces pombe. *Yeast* **14**, 943-51.
- Balasubramanian, M. K., Bi, E. y Glotzer, M. (2004).** Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* **14**, R806-18.
- Balasubramanian, M. K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K. C., Naqvi, N. I., He, X., Sazer, S. y Gould, K. L. (1998).** Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* **149**, 1265-75.

- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Nunez, A., Vicente, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2008).** Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* **20**, 748-57.
- Bardwell, L. (2006).** Mechanisms of MAPK signalling specificity. *Biochem Soc Trans* **34**, 837-41.
- Basi, G., Schmid, E. y Maundrell, K. (1993).** TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* **123**, 131-6.
- Bendezu, F. O. y Martin, S. G. (2011).** Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol Biol Cell* **22**, 44-53.
- Berro, J., Sirotkin, V. y Pollard, T. D. (2010).** Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Mol Biol Cell* **21**, 2905-15.
- Betz, W. J., Mao, F. y Bewick, G. S. (1992).** Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *J Neurosci* **12**, 363-75.
- Betz, W. J., Mao, F. y Smith, C. B. (1996).** Imaging exocytosis and endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **6**, 365-71.
- Bi, E. y Park, H. O. (2012).** Cell polarization and cytokinesis in budding yeast. *Genetics* **191**, 347-87.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E. L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D. y Surrey, T. (2007).** Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* **450**, 1100-5.
- Bishop, A. L. y Hall, A. (2000).** Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* **348 Pt 2**, 241-55.
- Boehm, M. y Bonifacino, J. S. (2001).** Adaptins: the final recount. *Mol Biol Cell* **12**, 2907-20.
- Bone, N., Millar, J. B., Toda, T. y Armstrong, J. (1998).** Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol* **8**, 135-44.
- Bonilla, M. y Cunningham, K. W. (2003).** Mitogen-activated protein kinase stimulation of Ca(2+) signaling is required for survival of endoplasmic reticulum stress in yeast. *Mol Biol Cell* **14**, 4296-305.
- Bonilla, M., Nastase, K. K. y Cunningham, K. W. (2002).** Essential role of calcineurin in response to endoplasmic reticulum stress. *EMBO J* **21**, 2343-53.
- Bos, J. L., Rehmann, H. y Wittinghofer, A. (2007).** GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* **129**, 865-77.
- Bosch, D. E., Wittchen, E. S., Qiu, C., BurrIDGE, K. y Siderovski, D. P. (2011).** Unique structural and nucleotide exchange features of the Rho1 GTPase of *Entamoeba histolytica*. *J Biol Chem* **286**, 39236-46.
- Boulter, E., Estrach, S., Garcia-Mata, R. y Feral, C. C. (2012).** Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases. *FASEB J* **26**, 469-79.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Brett, C. L. y Merz, A. J. (2008).** Osmotic regulation of Rab-mediated organelle docking. *Curr Biol* **18**, 1072-7.
- Brodsky, F. M. (2012).** Diversity of clathrin function: new tricks for an old protein. *Annu Rev Cell Dev Biol* **28**, 309-36.
- Brunner, D. y Nurse, P. (2000).** CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* **102**, 695-704.
- Bultynck, G., Heath, V. L., Majeed, A. P., Galan, J. M., Haguenaer-Tsapis, R. y Cyert, M. S. (2006).** Slm1 and slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Mol Cell Biol* **26**, 4729-45.
- Busch, K. E., Hayles, J., Nurse, P. y Brunner, D. (2004).** Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev Cell* **6**, 831-43.

- Bush, D. A., Horisberger, M., Horman, I. y Wursch, P. (1974).** The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol* **81**, 199-206.
- Cabib, E., Drgonova, J. y Drgon, T. (1998).** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* **67**, 307-33.
- Cabrera, M., Langemeyer, L., Mari, M., Rethmeier, R., Orban, I., Perz, A., Brocker, C., Griffith, J., Klose, D., Steinhoff, H. J., Reggiori, F., Engelbrecht-Vandre, S. y Ungermann, C. (2010).** Phosphorylation of a membrane curvature-sensing motif switches function of the HOPS subunit Vps41 in membrane tethering. *J Cell Biol* **191**, 845-59.
- Cadou, A., Couturier, A., Le Goff, C., Xie, L., Paulson, J. R. y Le Goff, X. (2013).** The Kin1 kinase and the calcineurin phosphatase cooperate to link actin ring assembly and septum synthesis in fission yeast. *Biol Cell* **105**, 129-48.
- Cadwell, R. C. y Joyce, G. F. (1992).** Randomization of genes by PCR mutagenesis. *PCR Methods Appl* **2**, 28-33.
- Calonge, T. M., Arellano, M., Coll, P. M. y Perez, P. (2003).** Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* **47**, 507-18.
- Calonge, T. M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I. y Perez, P. (2000).** *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol Biol Cell* **11**, 4393-401.
- Carnero, E., Ribas, J. C., Garcia, B., Duran, A. y Sanchez, Y. (2000).** *Schizosaccharomyces pombe* ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol Gen Genet* **264**, 173-83.
- Casey, P. J. (1994).** Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* **6**, 219-25.
- Cid, V. J., Cenamor, R., Sanchez, M. y Nombela, C. (1998).** A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* **144** (Pt 1), 25-36.
- Codlin, S. y Mole, S. E. (2009).** *S. pombe* btn1, the orthologue of the Batten disease gene CLN3, is required for vacuole protein sorting of Cpy1p and Golgi exit of Vps10p. *J Cell Sci* **122**, 1163-73.
- Cohen, P. (1989).** The structure and regulation of protein phosphatases. *Annu Rev Biochem* **58**, 453-508.
- Coll, P. M., Rincon, S. A., Izquierdo, R. A. y Perez, P. (2007).** Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *EMBO J* **26**, 1865-77.
- Coll, P. M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. y Perez, P. (2003).** Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **14**, 313-23.
- Collister, M., Didmon, M. P., MacIsaac, F., Stark, M. J., MacDonald, N. Q. y Keyse, S. M. (2002).** YIL113w encodes a functional dual-specificity protein phosphatase which specifically interacts with and inactivates the Slt2/Mpk1p MAP kinase in *S. cerevisiae*. *FEBS Lett* **527**, 186-92.
- Cortes, J. C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sanchez, Y., Duran, A. y Ribas, J. C. (2005).** The novel fission yeast (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci* **118**, 157-74.
- Cortes, J. C., Ishiguro, J., Duran, A. y Ribas, J. C. (2002).** Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* **115**, 4081-96.
- Cortes, J. C., Katoh-Fukui, R., Moto, K., Ribas, J. C. y Ishiguro, J. (2004).** *Schizosaccharomyces pombe* Pmr1p is essential for cell wall integrity and is required for polarized cell growth and cytokinesis. *Eukaryot Cell* **3**, 1124-35.
- Cortes, J. C., Konomi, M., Martins, I. M., Munoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., Duran, A. y Ribas, J. C. (2007).** The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol* **65**, 201-17.

- Cortes, J. C., Sato, M., Munoz, J., Moreno, M. B., Clemente-Ramos, J. A., Ramos, M., Okada, H., Osumi, M., Duran, A. y Ribas, J. C. (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol* **198**, 637-56.
- Cowles, C. R., Odorizzi, G., Payne, G. S. y Emr, S. D. (1997). The AP-3 adaptor complex is essential for cargo-selective transport to the yeast vacuole. *Cell* **91**, 109-18.
- Craven, R. A., Griffiths, D. J., Sheldrick, K. S., Randall, R. E., Hagan, I. M. y Carr, A. M. (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **221**, 59-68.
- Craven, R. J., Mallory, J. C. y Hand, R. A. (2007). Regulation of iron homeostasis mediated by the heme-binding protein Dap1 (damage resistance protein 1) via the P450 protein Erg11/Cyp51. *J Biol Chem* **282**, 36543-51.
- Cruz, S., Munoz, S., Manjon, E., Garcia, P. y Sanchez, Y. (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**, 778-94.
- Chang, E., Bartholomeusz, G., Pimental, R., Chen, J., Lai, H., Wang, L., Yang, P. y Marcus, S. (1999). Direct binding and In vivo regulation of the fission yeast p21-activated kinase shk1 by the SH3 domain protein scd2. *Mol Cell Biol* **19**, 8066-74.
- Chang, E. C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H. P. y Wigler, M. H. (1994). Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**, 131-41.
- Chang, F. (2001). Establishment of a cellular axis in fission yeast. *Trends Genet* **17**, 273-8.
- Chang, F. y Martin, S. G. (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **1**, a001347.
- Chang, F. y Peter, M. (2003). Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol* **5**, 294-9.
- Chang, F. y Verde, F. (2004). Control of cell polarity and morphogenesis in fission yeast. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond.*, (ed. R.Egel), 255-68: Springer.
- Chapman, R. E. y Munro, S. (1994). The functioning of the yeast Golgi apparatus requires an ER protein encoded by ANP1, a member of a new family of genes affecting the secretory pathway. *EMBO J* **13**, 4896-907.
- Chhabra, E. S. y Higgs, H. N. (2007). The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nat Cell Biol* **9**, 1110-21.
- Daga, R. R., Lahoz, A., Munoz, M. J., Moreno, S. y Jimenez, J. (2005). Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *EMBO J* **24**, 2436-46.
- Das, M., Drake, T., Wiley, D. J., Buchwald, P., Vavylonis, D. y Verde, F. (2012). Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science* **337**, 239-43.
- Das, M., Wiley, D. J., Medina, S., Vincent, H. A., Larrea, M., Oriolo, A. y Verde, F. (2007). Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Mol Biol Cell* **18**, 2090-101.
- Davey, J. (1992). Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone. *EMBO J* **11**, 951-60.
- Davis, R. J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-52.
- de Leon, N., Sharifmoghdam, M. R., Hoya, M., Curto, M. A., Doncel, C. y Valdivieso, M. H. (2013). Regulation of cell wall synthesis by the clathrin light chain is essential for viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **8**, e71510.
- de Medina-Redondo, M., Arnaiz-Pita, Y., Clavaud, C., Fontaine, T., del Rey, F., Latge, J. P. y Vazquez de Aldana, C. R. (2010). beta(1,3)-glucanosyl-transferase activity is essential for cell wall integrity and viability of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **5**, e14046.

- Dean, J. L., Sully, G., Clark, A. R. y Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* **16**, 1113-21.
- Degols, G., Shiozaki, K. y Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **16**, 2870-7.
- deHart, A. K., Schnell, J. D., Allen, D. A., Tsai, J. Y. y Hicke, L. (2003). Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Mol Biol Cell* **14**, 4676-84.
- Deng, L., Sugiura, R., Takeuchi, M., Suzuki, M., Ebina, H., Takami, T., Koike, A., Iba, S. y Kuno, T. (2006). Real-time monitoring of calcineurin activity in living cells: evidence for two distinct Ca²⁺-dependent pathways in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 4790-800.
- DerMardirossian, C. y Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* **15**, 356-63.
- Douglas, C. M., Marrinan, J. A., Li, W. y Kurtz, M. B. (1994). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3-beta-D-glucan synthase. *J Bacteriol* **176**, 5686-96.
- Duran, A. y Perez, P. (2004). Cell Wall Synthesis, en: Egel, R. (Ed.), *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer, New York, pp. 269-79.
- Edamatsu, M. y Toyoshima, Y. Y. (2003). Fission yeast synaptobrevin is involved in cytokinesis and cell elongation. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 641-5.
- Egel, R. y Egel-Mitani, M. (1974). Premeiotic DNA synthesis in fission yeast. *Exp Cell Res* **88**, 127-34.
- Ellgaard, L. y Helenius, A. (2003). Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 181-91.
- Estravis, M., Rincon, S. y Perez, P. (2012). Cdc42 regulation of polarized traffic in fission yeast. *Commun Integr Biol* **5**, 370-3.
- Estravis, M., Rincon, S. A., Santos, B. y Perez, P. (2011). Cdc42 regulates multiple membrane traffic events in fission yeast. *Traffic* **12**, 1744-58.
- Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 469-86.
- Facchinetti, V., Ouyang, W., Wei, H., Soto, N., Lazorchak, A., Gould, C., Lowry, C., Newton, A. C., Mao, Y., Miao, R. Q., Sessa, W. C., Qin, J., Zhang, P., Su, B. y Jacinto, E. (2008). The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J* **27**, 1932-43.
- Fang, Y., Sugiura, R., Ma, Y., Yada-Matsushima, T., Umeno, H. y Kuno, T. (2008). Cation diffusion facilitator Cis4 is implicated in Golgi membrane trafficking via regulating zinc homeostasis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 1295-303.
- Feierbach, B. y Chang, F. (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* **11**, 1656-65.
- Fitch, P. G., Gammie, A. E., Lee, D. J., de Candal, V. B. y Rose, M. D. (2004). Lrg1p is a Rho1 GTPase-activating protein required for efficient cell fusion in yeast. *Genetics* **168**, 733-46.
- Flandez, M., Cosano, I. C., Nombela, C., Martin, H. y Molina, M. (2004). Reciprocal regulation between SlT2 MAPK and isoforms of Msg5 dual-specificity protein phosphatase modulates the yeast cell integrity pathway. *J Biol Chem* **279**, 11027-34.
- Forsburg, S. L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* **21**, 2955-6.
- Free, S. J. (2013). Fungal cell wall organization and biosynthesis. *Adv Genet* **81**, 33-82.
- Frost, A., Elgort, M. G., Brandman, O., Ives, C., Collins, S. R., Miller-Vedam, L., Weibezahn, J., Hein, M. Y., Poser, I., Mann, M., Hyman, A. A. y Weissman, J. S. (2012). Functional repurposing revealed by comparing *S. pombe* and *S. cerevisiae* genetic interactions. *Cell* **149**, 1339-52.

- Fujita, M., Sugiura, R., Lu, Y., Xu, L., Xia, Y., Shuntoh, H. y Kuno, T. (2002).** Genetic interaction between calcineurin and type 2 myosin and their involvement in the regulation of cytokinesis and chloride ion homeostasis in fission yeast. *Genetics* **161**, 971-81.
- Fukui, Y. y Yamamoto, M. (1988).** Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to *ras1*. *Mol Gen Genet* **215**, 26-31.
- Gachet, Y. y Hyams, J. S. (2005).** Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci* **118**, 4231-42.
- Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K. y Russell, P. (1998).** Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev* **12**, 1464-73.
- Gaits, F. y Russell, P. (1999).** Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/Sty1 in fission yeast. *Mol Biol Cell* **10**, 1395-407.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E. y Burrige, K. (2011).** The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHOGDIs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 493-504.
- Garcia-Rodriguez, L. J., Trilla, J. A., Castro, C., Valdivieso, M. H., Duran, A. y Roncero, C. (2000).** Characterization of the chitin biosynthesis process as a compensatory mechanism in the *fks1* mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **478**, 84-8.
- Garcia, P., Garcia, I., Marcos, F., de Garibay, G. R. y Sanchez, Y. (2009a).** 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**, 1321-34.
- Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. y Sanchez, Y. (2006).** Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 1620-31.
- Garcia, P., Tajadura, V., Garcia, I. y Sanchez, Y. (2006b).** Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* **23**, 1031-43.
- Garcia, P., Tajadura, V. y Sanchez, Y. (2009b).** The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 721-31.
- Gemmill, T. R. y Trimble, R. B. (2004).** Protein glycosylation, en: Egel, R. (Ed.), *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer, New York, pp. 405-515.
- Golub, E. I. (1988).** 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **16**, 1641.
- Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y. y Yamamoto, M. (1993).** *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **13**, 6427-34.
- Green, R., Lesage, G., Sdicu, A. M., Menard, P. y Bussey, H. (2003).** A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology* **149**, 2487-99.
- Grun, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P. y Vliegthart, J. F. (2005).** The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology* **15**, 245-57.
- Guzman-Vendrell, M., Baldissard, S., Almonacid, M., Mayeux, A., Paoletti, A. y Moseley, J. B. (2013).** Blt1 and Mid1 provide overlapping membrane anchors to position the division plane in fission yeast. *Mol Cell Biol* **33**, 418-28.
- Hachet, O., Berthelot-Grosjean, M., Kokkoris, K., Vincenzetti, V., Moosbrugger, J. y Martin, S. G. (2011).** A phosphorylation cycle shapes gradients of the DYRK family kinase Pom1 at the plasma membrane. *Cell* **145**, 1116-28.
- Hahn, J. S. y Thiele, D. J. (2002).** Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* Slt2 kinase pathway by the stress-inducible Sdp1 dual specificity phosphatase. *J Biol Chem* **277**, 21278-84.
- Hall, A. (1998).** Rho GTPases and the actin cytoskeleton. *Science* **279**, 509-14.

- Hall, A. (2012). Rho family GTPases. *Biochem Soc Trans* **40**, 1378-82.
- Hamasaki-Katagiri, N. y Ames, J. B. (2010). Neuronal calcium sensor-1 (Ncs1p) is up-regulated by calcineurin to promote Ca²⁺ tolerance in fission yeast. *J Biol Chem* **285**, 4405-14.
- Hartmann-Petersen, R., Wallace, M., Hofmann, K., Koch, G., Johnsen, A. H., Hendil, K. B. y Gordon, C. (2004). The Ubx2 and Ubx3 cofactors direct Cdc48 activity to proteolytic and nonproteolytic ubiquitin-dependent processes. *Curr Biol* **14**, 824-8.
- Hayles, J. y Nurse, P. (2001). A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 647-56.
- He, Y., Sugiura, R., Ma, Y., Kita, A., Deng, L., Takegawa, K., Matsuoka, K., Shuntoh, H. y Kuno, T. (2006). Genetic and functional interaction between Ryh1 and Ypt3: two Rab GTPases that function in *S. pombe* secretory pathway. *Genes Cells* **11**, 207-21.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L. y Hedges, S. B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**, 1129-33.
- Heo, J., Raines, K. W., Mocanu, V. y Campbell, S. L. (2006). Redox regulation of RhoA. *Biochemistry* **45**, 14481-9.
- Hirata, D., Nakano, K., Fukui, M., Takenaka, H., Miyakawa, T. y Mabuchi, I. (1998). Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role of a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *J Cell Sci* **111 (Pt 2)**, 149-59.
- Hirayama, S., Sugiura, R., Lu, Y., Maeda, T., Kawagishi, K., Yokoyama, M., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Shuntoh, H. y Kuno, T. (2003). Zinc finger protein Prz1 regulates Ca²⁺ but not Cl⁻ homeostasis in fission yeast. Identification of distinct branches of calcineurin signaling pathway in fission yeast. *J Biol Chem* **278**, 18078-84.
- Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. y Yamamoto, M. (2003). Gef1p and Scd1p, the Two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **14**, 3617-27.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J. y Klausner, R. D. (1998). Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 9161-6.
- Hohmann, S. (2002). Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 300-72.
- Hoog, J. L., Schwartz, C., Noon, A. T., O'Toole, E. T., Mastronarde, D. N., McIntosh, J. R. y Antony, C. (2007). Organization of interphase microtubules in fission yeast analyzed by electron tomography. *Dev Cell* **12**, 349-61.
- Horisberger, M. y Vonlanthen, M. (1977). Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeasts with gold markers. *Arch Microbiol* **115**, 1-7.
- Horisberger, M., Vonlanthen, M. y Rosset, J. (1978). Localization of alpha-galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* **119**, 107-11.
- Hoseki, J., Ushioda, R. y Nagata, K. (2010). Mechanism and components of endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biochem* **147**, 19-25.
- Hughes, A. L., Powell, D. W., Bard, M., Eckstein, J., Barbuch, R., Link, A. J. y Espenshade, P. J. (2007). Dap1/PGRMC1 binds and regulates cytochrome P450 enzymes. *Cell Metab* **5**, 143-9.
- Hughes, S. M. (1983). Are guanine nucleotide binding proteins a distinct class of regulatory proteins? *FEBS Lett* **164**, 1-8.
- Huisman, S. M. y Brunner, D. (2011). Cell polarity in fission yeast: a matter of confining, positioning, and switching growth zones. *Semin Cell Dev Biol* **22**, 799-805.
- Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S. A. y Osumi, M. (2001). In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* **18**, 433-44.

- Ihara, K., Muraguchi, S., Kato, M., Shimizu, T., Shirakawa, M., Kuroda, S., Kaibuchi, K. y Hakoshima, T. (1998). Crystal structure of human RhoA in a dominantly active form complexed with a GTP analogue. *J Biol Chem* **273**, 9656-66.
- Imai, Y. y Yamamoto, M. (1994). The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner. *Genes Dev* **8**, 328-38.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-8.
- Iwaki, T., Hosomi, A., Tokudomi, S., Kusunoki, Y., Fujita, Y., Giga-Hama, Y., Tanaka, N. y Takegawa, K. (2006). Vacuolar protein sorting receptor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **152**, 1523-32.
- Jahn, R. y Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 631-43.
- James, T. Y., Kauff, F., Schoch, C. L., Matheny, P. B., Hofstetter, V., Cox, C. J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H. T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A. E., Amtoft, A., Stajich, J. E., Hosaka, K., Sung, G. H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J. M., Slot, J. C., Wang, Z., Wilson, A. W., Schussler, A., Longcore, J. E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P. M., Powell, M. J., Taylor, J. W., White, M. M., Griffith, G. W., Davies, D. R., Humber, R. A., Morton, J. B., Sugiyama, J., Rossman, A. Y., Rogers, J. D., Pfister, D. H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R. A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R. A., Serdani, M., Crous, P. W., Hughes, K. W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W. A., Lucking, R., Budel, B., Geiser, D. M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., McLaughlin, D. J., Spatafora, J. W. y Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443**, 818-22.
- Janson, M. E., Loughlin, R., Loiodice, I., Fu, C., Brunner, D., Nedelec, F. J. y Tran, P. T. (2007). Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell* **128**, 357-68.
- Jendretzki, A., Wittland, J., Wilk, S., Straede, A. y Heinisch, J. J. (2011). How do I begin? Sensing extracellular stress to maintain yeast cell wall integrity. *Eur J Cell Biol* **90**, 740-4.
- Jung, U. S. y Levin, D. E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol Microbiol* **34**, 1049-57.
- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. y Mabuchi, I. (2005). Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol* **7**, 916-7.
- Karin, M. y Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr Biol* **5**, 747-57.
- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Perez, P. y Toda, T. (1999). Fission yeast alpha-glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J Cell Biol* **144**, 1173-86.
- Kato, T., Jr., Okazaki, K., Murakami, H., Stettler, S., Fantes, P. A. y Okayama, H. (1996). Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett* **378**, 207-12.
- Keeney, J. B. y Boeke, J. D. (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **136**, 849-56.
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A. y Beach, D. (1988). Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J* **7**, 1537-47.
- Kim, D. U., Hayles, J., Kim, D., Wood, V., Park, H. O., Won, M., Yoo, H. S., Duhig, T., Nam, M., Palmer, G., Han, S., Jeffery, L., Baek, S. T., Lee, H., Shim, Y. S., Lee, M., Kim, L., Heo, K. S., Noh, E. J., Lee, A. R., Jang, Y. J., Chung, K. S., Choi, S. J., Park, J. Y., Park, Y., Kim, H. M., Park, S. K., Park, H. J., Kang, E. J., Kim, H. B., Kang, H. S., Park, H. M., Kim, K., Song, K., Song, K. B., Nurse, P. y Hoe, K. L. (2010). Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* **28**, 617-23.
- Kim, H., Kim, A. y Cunningham, K. W. (2012). Vacuolar H⁺-ATPase (V-ATPase) promotes vacuolar membrane permeabilization and nonapoptotic death in stressed yeast. *J Biol Chem* **287**, 19029-39.

- Kim, H., Yang, P., Catanuto, P., Verde, F., Lai, H., Du, H., Chang, F. y Marcus, S. (2003). The kelch repeat protein, Tea1, is a potential substrate target of the p21-activated kinase, Shk1, in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **278**, 30074-82.
- Kissinger, C. R., Parge, H. E., Knighton, D. R., Lewis, C. T., Pelletier, L. A., Tempczyk, A., Kalish, V. J., Tucker, K. D., Showalter, R. E., Moomaw, E. W. y et al. (1995). Crystal structures of human calcineurin and the human FKBP12-FK506-calcineurin complex. *Nature* **378**, 641-4.
- Kita, A., Li, C., Yu, Y., Umeda, N., Doi, A., Yasuda, M., Ishiwata, S., Taga, A., Horiuchi, Y. y Sugiura, R. (2011). Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome trafficking through functional interaction with adaptin in Fission Yeast. *PLoS One* **6**, e16842.
- Kitamura, K. y Shimoda, C. (1991). The *Schizosaccharomyces pombe* mam2 gene encodes a putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* Ste2 protein. *EMBO J* **10**, 3743-51.
- Kjaerulff, S., Davey, J. y Nielsen, O. (1994). Analysis of the structural genes encoding M-factor in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: identification of a third gene, mfm3. *Mol Cell Biol* **14**, 3895-905.
- Kjaerulff, S., Lautrup-Larsen, I., Truelsen, S., Pedersen, M. y Nielsen, O. (2005). Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals ste11 as a mitogen-activated protein kinase target. *Mol Cell Biol* **25**, 2045-59.
- Klee, C. B., Crouch, T. H. y Krinks, M. H. (1979). Calcineurin: a calcium- and calmodulin-binding protein of the nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**, 6270-3.
- Klee, C. B. y Krinks, M. H. (1978). Purification of cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase inhibitory protein by affinity chromatography on activator protein coupled to Sepharose. *Biochemistry* **17**, 120-6.
- Klee, C. B., Ren, H. y Wang, X. (1998). Regulation of the calmodulin-stimulated protein phosphatase, calcineurin. *J Biol Chem* **273**, 13367-70.
- Koch, E. N., Costanzo, M., Bellay, J., Deshpande, R., Chatfield-Reed, K., Chua, G., D'Urso, G., Andrews, B. J., Boone, C. y Myers, C. L. (2012). Conserved rules govern genetic interaction degree across species. *Genome Biol* **13**, R57.
- Kokkoris, K., Castro, D. G. y Martin, S. G. (2014). Tea4-phosphatase I landmark promotes local growth by dual Cdc42 GEF recruitment and GAP exclusion. *J Cell Sci*
- Kono, K., Nogami, S., Abe, M., Nishizawa, M., Morishita, S., Pellman, D. y Ohya, Y. (2008). G1/S cyclin-dependent kinase regulates small GTPase Rho1p through phosphorylation of RhoGEF Tus1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **19**, 1763-71.
- Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T. y Osumi, M. (2003). Characterization and behaviour of alpha-glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast* **20**, 427-38.
- Kovar, D. R., Sirotkin, V. y Lord, M. (2011). Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol* **21**, 177-87.
- Krisak, L., Strich, R., Winters, R. S., Hall, J. P., Mallory, M. J., Kreitzer, D., Tuan, R. S. y Winter, E. (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **8**, 2151-61.
- Kume, K., Koyano, T., Kanai, M., Toda, T. y Hirata, D. (2011). Calcineurin ensures a link between the DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth. *Nat Cell Biol* **13**, 234-42.
- Kushner, S. R. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1-derived plasmids. Elsevier, North Holland, Amsterdam.
- Kyriakis, J. M. y Avruch, J. (2001). Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* **81**, 807-69.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lesage, G. y Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**, 317-43.

- Leupold, U. (1950).** Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol.* **24**, 381-480.
- Levin, D. E. (2005).** Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **69**, 262-91.
- Levin, D. E. (2011).** Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics* **189**, 1145-75.
- Li, H., Rao, A. y Hogan, P. G. (2011).** Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol* **21**, 91-103.
- Lim, J. P. y Gleeson, P. A. (2011).** Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol Cell Biol* **89**, 836-43.
- Liu, J., Tang, X., Wang, H. y Balasubramanian, M. (2000).** Bgs2p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* **478**, 105-8.
- Liu, J., Wang, H., McCollum, D. y Balasubramanian, M. K. (1999).** Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **153**, 1193-203.
- Loewith, R., Hubberstey, A. y Young, D. (2000).** Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **113 (Pt 1)**, 153-60.
- Logan, M. R., Jones, L. y Eitzen, G. (2010).** Cdc42p and Rho1p are sequentially activated and mechanistically linked to vacuole membrane fusion. *Biochem Biophys Res Commun* **394**, 64-9.
- Lopez-Aviles, S., Lambea, E., Moldon, A., Grande, M., Fajardo, A., Rodriguez-Gabriel, M. A., Hidalgo, E. y Aligue, R. (2008).** Activation of Srk1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Mol Biol Cell* **19**, 1670-9.
- Lu, Y., Sugiura, R., Yada, T., Cheng, H., Sio, S. O., Shuntoh, H. y Kuno, T. (2002).** Calcineurin is implicated in the regulation of the septation initiation network in fission yeast. *Genes Cells* **7**, 1009-19.
- Lustoza, A. C., Palma, L. M., Facanha, A. R., Okorokov, L. A. y Okorokova-Facanha, A. L. (2011).** P(5A)-type ATPase Cta4p is essential for Ca²⁺ transport in the endoplasmic reticulum of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* **6**, e27843.
- Ma, Y., Jiang, W., Liu, Q., Ryuko, S. y Kuno, T. (2011a).** Genome-wide screening for genes associated with FK506 sensitivity in fission yeast. *PLoS One* **6**, e23422.
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y. y Sugiura, R. (2006).** Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* **17**, 5028-37.
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Nabata, T., Uno, S. y Sugiura, R. (2006a).** Genetic evidence for phospholipid-mediated regulation of the Rab GDP-dissociation inhibitor in fission yeast. *Genetics* **174**, 1259-71.
- Ma, Y., Sugiura, R., Koike, A., Ebina, H., Sio, S. O. y Kuno, T. (2011).** Transient receptor potential (TRP) and Cch1-Yam8 channels play key roles in the regulation of cytoplasmic Ca²⁺ in fission yeast. *PLoS One* **6**, e22421.
- MacNeill, S. A. y Fantes, P. A. (1997).** Genetic and physiological analysis of DNA replication in fission yeast. *Methods Enzymol* **283**, 440-59.
- Madaule, P. y Axel, R. (1985).** A novel ras-related gene family. *Cell* **41**, 31-40.
- Madrid, M., Fernandez-Zapata, J., Sanchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2013).** Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. *BMC Microbiol* **13**, 34.
- Madrid, M., Nunez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2007).** Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol Biol Cell* **18**, 4405-19.

- Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Perez, P., Gacto, M. y Cansado, J. (2006).** Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **281**, 2033-43.
- Magnelli, P. E., Cipollo, J. F. y Robbins, P. W. (2005).** A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Anal Biochem* **336**, 202-12.
- Manners, D. J. y Meyer, M. T. (1977).** The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydrate Research* **57**, 189-203.
- Manning, B. D., Padmanabha, R. y Snyder, M. (1997).** The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **8**, 1829-44.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M. H. y Wigler, M. H. (1995).** Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 6180-4.
- Markgraf, D. F., Ahnert, F., Arlt, H., Mari, M., Peplowska, K., Epp, N., Griffith, J., Reggiori, F. y Ungermann, C. (2009).** The CORVET subunit Vps8 cooperates with the Rab5 homolog Vps21 to induce clustering of late endosomal compartments. *Mol Biol Cell* **20**, 5276-89.
- Marks, J., Hagan, I. M. y Hyams, J. S. (1986).** Growth polarity and cytokinesis in fission yeast: the role of the cytoskeleton. *J Cell Sci Suppl* **5**, 229-41.
- Marks, J. y Hyams, J. S. (1985).** Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J Cell Biol* **39**, 27-32.
- Martin, H., Rodriguez-Pachon, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. y Molina, M. (2000).** Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Slr2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 1511-9.
- Martin, S. G. y Chang, F. (2006).** Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol* **16**, 1161-70.
- Martin, S. G., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd y Chang, F. (2005).** Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell* **8**, 479-91.
- Martin, S. G., Rincon, S. A., Basu, R., Perez, P. y Chang, F. (2007).** Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell* **18**, 4155-67.
- Martin, V., Garcia, B., Carnero, E., Duran, A. y Sanchez, Y. (2003).** Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **2**, 159-69.
- Martin, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Duran, A. y Sanchez, Y. (2000).** bgs2+, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* **38**, 308-21.
- Martin, V., Rodriguez-Gabriel, M. A., McDonald, W. H., Watt, S., Yates, J. R., 3rd, Bahler, J. y Russell, P. (2006).** Cip1 and Cip2 are novel RNA-recognition-motif proteins that counteract Csx1 function during oxidative stress. *Mol Biol Cell* **17**, 1176-83.
- Masuda, T., Tanaka, K., Nonaka, H., Yamochi, W., Maeda, A. y Takai, Y. (1994).** Molecular cloning and characterization of yeast rho GDP dissociation inhibitor. *J Biol Chem* **269**, 19713-8.
- Mata, J. y Bahler, J. (2006).** Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 15517-22.
- Mata, J. y Nurse, P. (1997).** tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* **89**, 939-49.
- Matheos, D. P., Kingsbury, T. J., Ahsan, U. S. y Cunningham, K. W. (1997).** Tcn1p/Crz1p, a calcineurin-dependent transcription factor that differentially regulates gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* **11**, 3445-58.
- Maundrell, K. (1990).** nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* **265**, 10857-64.

- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. y Foor, F. (1995).** Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* **15**, 5671-81.
- Mendizabal, I., Rios, G., Mulet, J. M., Serrano, R. y de Larrinoa, I. F. (1998).** Yeast putative transcription factors involved in salt tolerance. *FEBS Lett* **425**, 323-8.
- Merla, A. y Johnson, D. I. (2000).** The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* **79**, 469-77.
- Merla, A. y Johnson, D. I. (2001).** The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr Genet* **39**, 205-9.
- Militello, R. y Colombo, M. I. (2013).** Small GTPases as regulators of cell division. *Commun Integr Biol* **6**, e25460.
- Millar, J. B., Buck, V. y Wilkinson, M. G. (1995).** Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* **9**, 2117-30.
- Miller, P. J. y Johnson, D. I. (1994).** Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **14**, 1075-83.
- Mitchison, J. (1970).** Methods in Cell Physiology. *Academic Press*. **4**, 131-65.
- Mitchison, J. M. y Nurse, P. (1985).** Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* **75**, 357-76.
- Miyatake, M., Kuno, T., Kita, A., Katsura, K., Takegawa, K., Uno, S., Nabata, T. y Sugiura, R. (2007).** Valproic acid affects membrane trafficking and cell-wall integrity in fission yeast. *Genetics* **175**, 1695-705.
- Moon, S. Y. y Zheng, Y. (2003).** Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* **13**, 13-22.
- Moreno, S., Klar, A. y Nurse, P. (1991).** Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* **194**, 795-823.
- Morigasaki, S., Shimada, K., Ikner, A., Yanagida, M. y Shiozaki, K. (2008).** Glycolytic enzyme GAPDH promotes peroxide stress signaling through multistep phosphorelay to a MAPK cascade. *Mol Cell* **30**, 108-13.
- Morrell-Falvey, J. L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G. D. y Gould, K. L. (2005).** Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J Cell Sci* **118**, 5563-73.
- Moseley, J. B., Mayeux, A., Paoletti, A. y Nurse, P. (2009).** A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* **459**, 857-60.
- Motegi, F., Arai, R. y Mabuchi, I. (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**, 1367-80.
- Mukaiyama, H., Iwaki, T., Idiris, A. y Takegawa, K. (2011).** Processing and maturation of carboxypeptidase Y and alkaline phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol* **90**, 203-13.
- Munoz, S., Manjon, E., Garcia, P., Sunnerhagen, P. y Sanchez, Y. (2014).** The checkpoint-dependent nuclear accumulation of Rho1p exchange factor Rgf1p is important for tolerance to chronic replication stress. *Mol Biol Cell* **25**, 1137-50.
- Muñoz, J., Cortes, J. C., Sipiczki, M., Ramos, M., Clemente-Ramos, J. A., Moreno, M. B., Martins, I. M., Perez, P. y Ribas, J. C. (2013).** Extracellular cell wall beta(1,3)glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *J Cell Biol* **203**, 265-82.
- Murray, J. M. y Johnson, D. I. (2001).** The Cdc42p GTPase and its regulators Nrf1p and Scd1p are involved in endocytic trafficking in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **276**, 3004-9.
- Mutoh, T., Nakano, K. y Mabuchi, I. (2005).** Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* **10**, 1189-202.
- Nadin-Davis, S. A. y Nasim, A. (1988).** A gene which encodes a predicted protein kinase can restore some functions of the ras gene in fission yeast. *EMBO J* **7**, 985-93.
- Nakagomi, S., Barsoum, M. J., Bossy-Wetzel, E., Sutterlin, C., Malhotra, V. y Lipton, S. A. (2008).** A Golgi fragmentation pathway in neurodegeneration. *Neurobiol Dis* **29**, 221-31.

- Nakano, K., Arai, R. y Mabuchi, I. (1997).** The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **2**, 679-94.
- Nakano, K., Arai, R. y Mabuchi, I. (2005).** Small GTPase Rho5 is a functional homologue of Rho1, which controls cell shape and septation in fission yeast. *FEBS Lett* **579**, 5181-6.
- Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh, E. A., Matsui, Y. y Mabuchi, I. (2002).** The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J Cell Sci* **115**, 4629-39.
- Nakano, K. y Mabuchi, I. (1995).** Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding Rho proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **155**, 119-22.
- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. y Mabuchi, I. (2003).** The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* **8**, 357-70.
- Nakano, K., Mutoh, T. y Mabuchi, I. (2001).** Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **6**, 1031-42.
- Nakano, K., Toya, M., Yoneda, A., Asami, Y., Yamashita, A., Kamasawa, N., Osumi, M. y Yamamoto, M. (2011).** Pob1 ensures cylindrical cell shape by coupling two distinct rho signaling events during secretory vesicle targeting. *Traffic* **12**, 726-39.
- Neiman, A. M., Stevenson, B. J., Xu, H. P., Sprague, G. F., Jr., Herskowitz, I., Wigler, M. y Marcus, S. (1993).** Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms. *Mol Biol Cell* **4**, 107-20.
- Nguyen, A. N., Lee, A., Place, W. y Shiozaki, K. (2000).** Multistep phosphorelay proteins transmit oxidative stress signals to the fission yeast stress-activated protein kinase. *Mol Biol Cell* **11**, 1169-81.
- Nguyen, A. N. y Shiozaki, K. (1999).** Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes Dev* **13**, 1653-63.
- Nicholas, R. O., Williams, D. W. y Hunter, P. A. (1994).** Investigation of the value of β -glucan-specific fluorochromes for predicting the β -glucans content of the cell wall of zoopathogenic fungi. *Mycol. Res.* **98**, 694-98.
- O'Connor, K. y Chen, M. (2013).** Dynamic functions of RhoA in tumor cell migration and invasion. *Small GTPases* **4**,
- Osumi, M. (1998a).** [Dynamics of cell wall formation from *Trichophyton mentagrophytes* protoplast]. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **39**, 151-9.
- Osumi, M. (1998b).** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* **29**, 207-33.
- Otero, J. H., Suo, J., Gordon, C. y Chang, E. C. (2010).** Int6 and Moe1 interact with Cdc48 to regulate ERAD and proper chromosome segregation. *Cell Cycle* **9**, 147-61.
- Ottillie, S., Miller, P. J., Johnson, D. I., Creasy, C. L., Sells, M. A., Bagrodia, S., Forsburg, S. L. y Chernoff, J. (1995).** Fission yeast pak1+ encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *EMBO J* **14**, 5908-19.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y. y Takai, Y. (1996).** Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* **15**, 2196-207.
- Ozoe, F., Kurokawa, R., Kobayashi, Y., Jeong, H. T., Tanaka, K., Sen, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. y Kawamukai, M. (2002).** The 14-3-3 proteins Rad24 and Rad25 negatively regulate Byr2 by affecting its localization in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **22**, 7105-19.
- Palacios, L., Dickinson, R. J., Sacristan-Reviriego, A., Didmon, M. P., Marin, M. J., Martin, H., Keyse, S. M. y Molina, M. (2011).** Distinct docking mechanisms mediate interactions between the Msg5 phosphatase and mating or cell integrity mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **286**, 42037-50.
- Palmer, C. P., Aydar, E. y Djamgoz, M. B. (2005).** A microbial TRP-like polycystic-kidney-disease-related ion channel gene. *Biochem J* **387**, 211-9.

- Paredes, V., Franco, A., Madrid, M., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2004).** Transcriptional and post-translational regulation of neutral trehalase in *Schizosaccharomyces pombe* during thermal stress. *Yeast* **21**, 593-603.
- Paredes, V., Franco, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2003).** Different roles for the stress-activated protein kinase pathway in the regulation of trehalose metabolism in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **149**, 1745-52.
- Pelham, R. J., Jr. y Chang, F. (2001).** Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* **3**, 235-44.
- Perez, P. y Cansado, J. (2010).** Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr Protein Pept Sci* **11**, 680-92.
- Perez, P. y Ribas, J. C. (2004).** Cell wall analysis. *Methods* **33**, 245-51.
- Perez, P. y Rincon, S. A. (2010).** Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* **426**, 243-53.
- Petersen, J. y Hagan, I. M. (2005).** Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature* **435**, 507-12.
- Philip, B. y Levin, D. E. (2001).** Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signaling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* **21**, 271-80.
- Pinar, M., Coll, P. M., Rincon, S. A. y Perez, P. (2008).** *Schizosaccharomyces pombe* Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* **19**, 1727-38.
- Pringle, J. R., Preston, R. A., Adams, A. E., Stearns, T., Drubin, D. G., Haarer, B. K. y Jones, E. W. (1989).** Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol* **31**, 357-435.
- Prosser, D. C., Drivas, T. G., Maldonado-Baez, L. y Wendland, B. (2011).** Existence of a novel clathrin-independent endocytic pathway in yeast that depends on Rho1 and formin. *J Cell Biol* **195**, 657-71.
- Prosser, D. C. y Wendland, B. (2012).** Conserved roles for yeast Rho1 and mammalian RhoA GTPases in clathrin-independent endocytosis. *Small GTPases* **3**, 229-35.
- Pujol, N., Bonet, C., Vilella, F., Petkova, M. I., Mozo-Villarias, A. y de la Torre-Ruiz, M. A. (2009).** Two proteins from *Saccharomyces cerevisiae*: Pfy1 and Pkc1, play a dual role in activating actin polymerization and in increasing cell viability in the adaptive response to oxidative stress. *FEMS Yeast Res* **9**, 1196-207.
- Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. y Ohya, Y. (1996).** Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* **272**, 279-81.
- Qi, M. y Elion, E. A. (2005).** MAP kinase pathways. *J Cell Sci* **118**, 3569-72.
- Quinn, J., Findlay, V. J., Dawson, K., Millar, J. B., Jones, N., Morgan, B. A. y Toone, W. M. (2002).** Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* **13**, 805-16.
- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. y Narumiya, S. (1996).** Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhotillin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* **271**, 13556-60.
- Rincon, S. A., Estravis, M. y Perez, P. (2014).** Cdc42 regulates polarized growth and cell integrity in fission yeast. *Biochem Soc Trans* **42**, 201-5.
- Rincon, S. A., Santos, B. y Perez, P. (2006).** Fission yeast Rho5p GTPase is a functional paralogue of Rho1p that plays a role in survival of spores and stationary-phase cells. *Eukaryot Cell* **5**, 435-46.
- Rincon, S. A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M. A., Santos, B., Martin, S. G. y Perez, P. (2009).** Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* **20**, 4390-9.
- Roberts, C. J., Raymond, C. K., Yamashiro, C. T. y Stevens, T. H. (1991).** Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol* **194**, 644-61.

- Rodicio, R. y Heinisch, J. J. (2010). Together we are strong--cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast* **27**, 531-40.
- Rodriguez-Gabriel, M. A., Burns, G., McDonald, W. H., Martin, V., Yates, J. R., 3rd, Bahler, J. y Russell, P. (2003). RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *EMBO J* **22**, 6256-66.
- Roh, D. H., Bowers, B., Riezman, H. y Cabib, E. (2002). Rho1p mutations specific for regulation of beta(1-->3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Mol Microbiol* **44**, 1167-83.
- Ron, D. y Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 519-29.
- Sacristan-Reviriego, A., Madrid, M., Cansado, J., Martin, H. y Molina, M. (2014). A Conserved Non-Canonical Docking Mechanism Regulates the Binding of Dual Specificity Phosphatases to Cell Integrity Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPKs) in Budding and Fission Yeasts. *PLoS One* **9**, e85390.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Samejima, I., Lourenco, P. C., Snaith, H. A. y Sawin, K. E. (2005). Fission yeast mto2p regulates microtubule nucleation by the centrosomin-related protein mto1p. *Mol Biol Cell* **16**, 3040-51.
- Samejima, I., Mackie, S. y Fantes, P. A. (1997). Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J* **16**, 6162-70.
- Samejima, I., Mackie, S., Warbrick, E., Weisman, R. y Fantes, P. A. (1998). The fission yeast mitotic regulator win1+ encodes an MAP kinase kinase kinase that phosphorylates and activates Wis1 MAP kinase in response to high osmolarity. *Mol Biol Cell* **9**, 2325-35.
- Sanchez-Mir, L., Franco, A., Madrid, M., Vicente-Soler, J., Villar-Tajadura, M. A., Soto, T., Perez, P., Gacto, M. y Cansado, J. (2012). Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast. *J Biol Chem* **287**, 26038-51.
- Sanchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Madrid, M., Viana, R. A., Vicente, J., Gacto, M., Perez, P. y Cansado, J. (2014). Rho1 GTPase and PKC Ortholog Pck1 Are Upstream Activators of the Cell Integrity MAPK Pathway in Fission Yeast. *PLoS One* **9**, e88020.
- Sanchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O. y Aligue, R. (2002). The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J Biol Chem* **277**, 17722-7.
- Santos, B., Gutierrez, J., Calonge, T. M. y Perez, P. (2003). Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* **2**, 521-33.
- Santos, B., Martin-Cuadrado, A. B., Vazquez de Aldana, C. R., del Rey, F. y Perez, P. (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell* **4**, 1639-45.
- Saraste, M., Sibbald, P. R. y Wittinghofer, A. (1990). The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**, 430-4.
- Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H. y Sugiura, R. (2009). Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Mol Biol Cell* **20**, 2473-85.
- Sawin, K. E. (2002). Cell polarity: following formin function. *Curr Biol* **12**, R6-8.
- Scrimale, T., Didone, L., de Mesy Bentley, K. L. y Krysan, D. J. (2009). The unfolded protein response is induced by the cell wall integrity mitogen-activated protein kinase signaling cascade and is required for cell wall integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **20**, 164-75.
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B. y Hall, M. N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol* **22**, 1329-39.
- Schmidt, A. y Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* **16**, 1587-609.

- Seed, B., Parker, R. C. y Davidson, N. (1982).** Representation of DNA sequences in recombinant DNA libraries prepared by restriction enzyme partial digestion. *Gene* **19**, 201-9.
- Sekiya-Kawasaki, M., Botstein, D. y Ohya, Y. (1998).** Identification of functional connections between calmodulin and the yeast actin cytoskeleton. *Genetics* **150**, 43-58.
- Sells, M. A., Barratt, J. T., Caviston, J., Otilie, S., Leberer, E. y Chernoff, J. (1998).** Characterization of Pak2p, a pleckstrin homology domain-containing, p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* **273**, 18490-8.
- Sengar, A. S., Markley, N. A., Marini, N. J. y Young, D. (1997).** Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* **17**, 3508-19.
- Shaner, N. C., Steinbach, P. A. y Tsien, R. Y. (2005).** A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* **2**, 905-9.
- Shen, X., Li, H., Ou, Y., Tao, W., Dong, A., Kong, J., Ji, C. y Yu, S. (2008).** The secondary structure of calcineurin regulatory region and conformational change induced by calcium/calmodulin binding. *J Biol Chem* **283**, 11407-13.
- Shieh, J. C., Wilkinson, M. G., Buck, V., Morgan, B. A., Makino, K. y Millar, J. B. (1997).** The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev* **11**, 1008-22.
- Shiozaki, K. y Russell, P. (1995).** Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J* **14**, 492-502.
- Shiozaki, K. y Russell, P. (1995b).** Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**, 739-43.
- Shiozaki, K. y Russell, P. (1996).** Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2276-88.
- Shiozaki, K. y Russell, P. (1997).** Stress-activated protein kinase pathway in cell cycle control of fission yeast. *Methods Enzymol* **283**, 506-20.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. y Russell, P. (1997).** Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol Biol Cell* **8**, 409-19.
- Shiozaki, K., Shiozaki, M. y Russell, P. (1998).** Heat stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol Biol Cell* **9**, 1339-49.
- Sio, S. O., Suehiro, T., Sugiura, R., Takeuchi, M., Mukai, H. y Kuno, T. (2005).** The role of the regulatory subunit of fission yeast calcineurin for in vivo activity and its relevance to FK506 sensitivity. *J Biol Chem* **280**, 12231-8.
- Sipos, G., Puoti, A. y Conzelmann, A. (1995).** Biosynthesis of the side chain of yeast glycosylphosphatidylinositol anchors is operated by novel mannosyltransferases located in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. *J Biol Chem* **270**, 19709-15.
- Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L. y Pollard, T. D. (2010).** Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Mol Biol Cell* **21**, 2894-904.
- Smith, D. A., Toone, W. M., Chen, D., Bahler, J., Jones, N., Morgan, B. A. y Quinn, J. (2002).** The *Srk1* protein kinase is a target for the *Sty1* stress-activated MAPK in fission yeast. *J Biol Chem* **277**, 33411-21.
- Snaith, H. A., Samejima, I. y Sawin, K. E. (2005).** Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J* **24**, 3690-9.
- Snaith, H. A. y Sawin, K. E. (2003).** Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* **423**, 647-51.
- Solinger, J. A. y Spang, A. (2013).** Tethering complexes in the endocytic pathway: CORVET and HOPS. *FEBS J* **280**, 2743-57.

- Soto, T., Beltran, F. F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J. B., Vicente-Soler, J., Cansado, J. y Gacto, M. (2002).** Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Biochem* **269**, 5056-65.
- Soto, T., Villar-Tajadura, M. A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Perez, P. y Cansado, J. (2010).** Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* **285**, 11516-25.
- Spirek, M., Benko, Z., Carnecka, M., Rumpf, C., Cipak, L., Batova, M., Marova, I., Nam, M., Kim, D. U., Park, H. O., Hayles, J., Hoe, K. L., Nurse, P. y Gregan, J. (2010).** *S. pombe* genome deletion project: an update. *Cell Cycle* **9**, 2399-402.
- Stathopoulos-Gerontides, A., Guo, J. J. y Cyert, M. S. (1999).** Yeast calcineurin regulates nuclear localization of the Crz1p transcription factor through dephosphorylation. *Genes Dev* **13**, 798-803.
- Stathopoulos, A. M. y Cyert, M. S. (1997).** Calcineurin acts through the CRZ1/TCN1-encoded transcription factor to regulate gene expression in yeast. *Genes Dev* **11**, 3432-44.
- Steinbach, W. J., Reedy, J. L., Cramer, R. A., Jr., Perfect, J. R. y Heitman, J. (2007).** Harnessing calcineurin as a novel anti-infective agent against invasive fungal infections. *Nat Rev Microbiol* **5**, 418-30.
- Stemmer, P. M. y Klee, C. B. (1994).** Dual calcium ion regulation of calcineurin by calmodulin and calcineurin B. *Biochemistry* **33**, 6859-66.
- Stoorvogel, W., Oorschot, V. y Geuze, H. J. (1996).** A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. *J Cell Biol* **132**, 21-33.
- Strahl, T. y Thorner, J. (2007).** Synthesis and function of membrane phosphoinositides in budding yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1771**, 353-404.
- Subramanian, D., Huang, J., Sevugan, M., Robinson, R. C., Balasubramanian, M. K. y Tang, X. (2013).** Insight into actin organization and function in cytokinesis from analysis of fission yeast mutants. *Genetics* **194**, 435-46.
- Sugawara, T., Sato, M., Takagi, T., Kamasaki, T., Ohno, N. y Osumi, M. (2003).** In situ localization of cell wall alpha-1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc (Tokyo)* **52**, 237-42.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y. y Yamamoto, M. (1991).** *Schizosaccharomyces pombe* ste11+ encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* **5**, 1990-9.
- Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S. O. y Kuno, T. (2003).** Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* **424**, 961-5.
- Sugiura, R., Sio, S. O., Shuntoh, H. y Kuno, T. (2002).** Calcineurin phosphatase in signal transduction: lessons from fission yeast. *Genes Cells* **7**, 619-27.
- Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H. y Kuno, T. (1999).** The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* **399**, 479-83.
- Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M. y Kuno, T. (1998).** pmp1+, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J* **17**, 140-8.
- Svarovsky, M. J. y Palecek, S. P. (2005).** Disruption of LRG1 inhibits mother-daughter separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **22**, 1117-32.
- Tabuchi, M., Iwaihara, O., Ohtani, Y., Ohuchi, N., Sakurai, J., Morita, T., Iwahara, S. y Takegawa, K. (1997).** Vacuolar protein sorting in fission yeast: cloning, biosynthesis, transport, and processing of carboxypeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* **179**, 4179-89.
- Tajadura, V., Garcia, B., Garcia, I., Garcia, P. y Sanchez, Y. (2004).** *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall beta-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J Cell Sci* **117**, 6163-74.
- Takada, H., Nishida, A., Domae, M., Kita, A., Yamano, Y., Uchida, A., Ishiwata, S., Fang, Y., Zhou, X., Masuko, T., Kinoshita, M., Kakehi, K. y Sugiura, R. (2010).** The cell surface protein gene ecm33+ is a

target of the two transcription factors Atf1 and Mbx1 and negatively regulates Pmk1 MAPK cell integrity signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* **21**, 674-85.

Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Kuno, T. y Sugiura, R. (2007). Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Mol Biol Cell* **18**, 4794-802.

Tanaka, K., Davey, J., Imai, Y. y Yamamoto, M. (1993). *Schizosaccharomyces pombe* map3+ encodes the putative M-factor receptor. *Mol Cell Biol* **13**, 80-8.

Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R. y Shiozaki, K. (2008). Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr Biol* **18**, 322-30.

Tcherkezian, J. y Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* **99**, 67-86.

Tibbles, L. A. y Woodgett, J. R. (1999). The stress-activated protein kinase pathways. *Cell Mol Life Sci* **55**, 1230-54.

Tiedje, C., Sakwa, I., Just, U. y Hofken, T. (2008). The Rho GDI Rdi1 regulates Rho GTPases by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell* **19**, 2885-96.

Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. y Kuno, T. (1996). 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**, 6752-64.

Toda, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M. (1991). Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* **5**, 60-73.

Toda, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J* **12**, 1987-95.

Tooze, J. y Hollinshead, M. (1991). Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *J Cell Biol* **115**, 635-53.

Toya, M., Iino, Y. y Yamamoto, M. (1999). Fission yeast Pob1p, which is homologous to budding yeast Boi proteins and exhibits subcellular localization close to actin patches, is essential for cell elongation and separation. *Mol Biol Cell* **10**, 2745-57.

Tu, H., Barr, M., Dong, D. L. y Wigler, M. (1997). Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* **17**, 5876-87.

Vay, H. A., Philip, B. y Levin, D. E. (2004). Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the Wsc1 cell wall stress sensor. *Microbiology* **150**, 3281-8.

Vembar, S. S. y Brodsky, J. L. (2008). One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 944-57.

Verde, F. (1998). On growth and form: control of cell morphogenesis in fission yeast. *Curr Opin Microbiol* **1**, 712-8.

Verde, F., Mata, J. y Nurse, P. (1995). Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *J Cell Biol* **131**, 1529-38.

Vetter, I. R. y Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* **294**, 1299-304.

Vida, T. A. y Emr, S. D. (1995). A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J Cell Biol* **128**, 779-92.

Villar-Tajadura, M. A., Coll, P. M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B. y Perez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol Microbiol* **70**, 867-81.

Wang, H., Du, Y., Xiang, B., Lin, W., Li, X. y Wei, Q. (2008). A renewed model of CNA regulation involving its C-terminal regulatory domain and CaM. *Biochemistry* **47**, 4461-8.

- Wang, H., Tang, X. y Balasubramanian, M. K. (2003). Rho3p regulates cell separation by modulating excyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* **164**, 1323-31.
- Wang, J. H. y Desai, R. (1977). Modulator binding protein. Bovine brain protein exhibiting the Ca²⁺-dependent association with the protein modulator of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *J Biol Chem* **252**, 4175-84.
- Wang, Y., Xu, H. P., Riggs, M., Rodgers, L. y Wigler, M. (1991). *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol Cell Biol* **11**, 3554-63.
- Warbrick, E. y Fantès, P. A. (1991). The *wis1* protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* **10**, 4291-9.
- Watanabe, D., Abe, M. y Ohya, Y. (2001). Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-beta-glucan synthesis. *Yeast* **18**, 943-51.
- Wei, Y., Zhang, Y., Derewenda, U., Liu, X., Minor, W., Nakamoto, R. K., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P. y Derewenda, Z. S. (1997). Crystal structure of RhoA-GDP and its functional implications. *Nat Struct Biol* **4**, 699-703.
- Wennerberg, K., Rossman, K. L. y Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* **118**, 843-6.
- Wilkinson, M. G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, W. M., Shieh, J. C., Toda, T., Millar, J. B. y Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev* **10**, 2289-301.
- Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M. A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., Basham, D., Bowman, S., Brooks, K., Brown, D., Brown, S., Chillingworth, T., Churcher, C., Collins, M., Connor, R., Cronin, A., Davis, P., Feltwell, T., Fraser, A., Gentles, S., Goble, A., Hamlin, N., Harris, D., Hidalgo, J., Hodgson, G., Holroyd, S., Hornsby, T., Howarth, S., Huckle, E. J., Hunt, S., Jagels, K., James, K., Jones, L., Jones, M., Leather, S., McDonald, S., McLean, J., Mooney, P., Moule, S., Mungall, K., Murphy, L., Niblett, D., Odell, C., Oliver, K., O'Neil, S., Pearson, D., Quail, M. A., Rabinowitz, E., Rutherford, K., Rutter, S., Saunders, D., Seeger, K., Sharp, S., Skelton, J., Simmonds, M., Squares, R., Squares, S., Stevens, K., Taylor, K., Taylor, R. G., Tivey, A., Walsh, S., Warren, T., Whitehead, S., Woodward, J., Volckaert, G., Aert, R., Robben, J., Grymonprez, B., Weltjens, I., Vanstreels, E., Rieger, M., Schafer, M., Muller-Auer, S., Gabel, C., Fuchs, M., Dusterhoft, A., Fritz, C., Holzer, E., Moestl, D., Hilbert, H., Borzym, K., Langer, I., Beck, A., Lehrach, H., Reinhardt, R., Pohl, T. M., Eger, P., Zimmermann, W., Wedler, H., Wambutt, R., Purnelle, B., Goffeau, A., Cadieu, E., Dreano, S., Gloux, S., Lelaure, V., Mottier, S., Galibert, F., Aves, S. J., Xiang, Z., Hunt, C., Moore, K., Hurst, S. M., Lucas, M., Rochet, M., Gaillardin, C., Tallada, V. A., Garzon, A., Thode, G., Daga, R. R., Cruzado, L., Jimenez, J., Sanchez, M., del Rey, F., Benito, J., Dominguez, A., Revuelta, J. L., Moreno, S., Armstrong, J., Forsburg, S. L., Cerutti, L., Lowe, T., McCombie, W. R., Paulsen, I., Potashkin, J., Shpakovski, G. V., Ussery, D., Barrell, B. G. y Nurse, P. (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-80.
- Xue-Franzen, Y., Kjaerulff, S., Holmberg, C., Wright, A. y Nielsen, O. (2006). Genomewide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast. *BMC Genomics* **7**, 303.
- Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T. y Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **125**, 1077-93.
- Yang, P., Kansra, S., Pimental, R. A., Gilbreth, M. y Marcus, S. (1998). Cloning and characterization of *shk2*, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* **273**, 18481-9.
- Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X. y Marcus, S. (2003). The novel Rho GTPase-activating protein family protein, Rga8, provides a potential link between Cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* **278**, 48821-30.
- Yang, S. A. y Klee, C. B. (2000a). Low affinity Ca²⁺-binding sites of calcineurin B mediate conformational changes in calcineurin A. *Biochemistry* **39**, 16147-54.
- Ye, Y., Lee, I. J., Runge, K. W. y Wu, J. Q. (2012). Roles of putative Rho-GEF Gef2 in division-site positioning and contractile-ring function in fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* **23**, 1181-95.
- York, J. D. (2006). Regulation of nuclear processes by inositol polyphosphates. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 552-9.

- Yoshida, S., Bartolini, S. y Pellman, D. (2009).** Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev* **23**, 810-23.
- Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D. M., Bartolini, S., Yaffe, M. B., Ohya, Y. y Pellman, D. (2006).** Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* **313**, 108-11.
- Yoshida, T., Toda, T. y Yanagida, M. (1994).** A calcineurin-like gene *ppb1+* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J Cell Sci* **107 (Pt 7)**, 1725-35.
- Zaitsevskaya-Carter, T. y Cooper, J. A. (1997).** Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *EMBO J* **16**, 1318-31.
- Zhao, C., Jung, U. S., Garrett-Engle, P., Roe, T., Cyert, M. S. y Levin, D. E. (1998).** Temperature-induced expression of yeast FKS2 is under the dual control of protein kinase C and calcineurin. *Mol Cell Biol* **18**, 1013-22.
- Zhou, C., Yang, Y. y Jong, A. Y. (1990).** Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* **8**, 172-3.
- Zhou, X., Ma, Y., Kato, T. y Kuno, T. (2012).** A measurable activation of the bZIP transcription factor Atf1 in a fission yeast strain devoid of stress-activated and cell integrity mitogen-activated protein kinase (MAPK) activities. *J Biol Chem* **287**, 23434-9.
- Zhu, Y. H., Ye, Y., Wu, Z. y Wu, J. Q. (2013).** Cooperation between Rho-GEF Gef2 and its binding partner Nod1 in the regulation of fission yeast cytokinesis. *Mol Biol Cell* **24**, 3187-204.