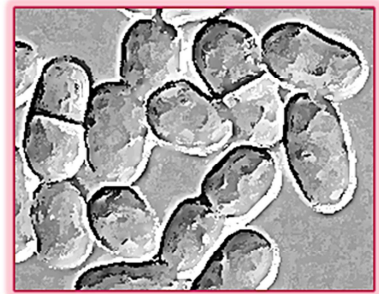
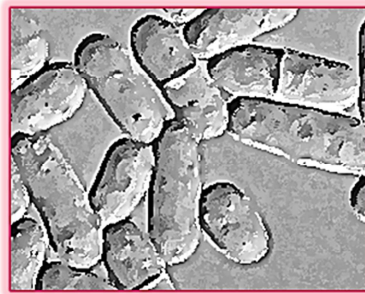




VNiVERSiDAD
D SALAMANCA



Rga6, una GAP de Cdc42, implicada en el control de la morfología celular de *Schizosaccharomyces pombe*



Tesis Doctoral

M^a Teresa Revilla Guarinos

Instituto de Biología Funcional y Genómica
(Universidad de Salamanca/CSIC)

2016

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



**Rga6, una GAP de Cdc42, implicada en el
control de la morfología celular de
*Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada por **M^a Teresa Revilla Guarinos**
para optar al Grado de Doctor en Biología Funcional y
Genómica

Salamanca, 2016



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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Rga6, una GAP de Cdc42, implicada en el control de la morfología celular de *Schizosaccharomyces pombe*”**, presentada por la licenciada **M^a Teresa Revilla Guarinos** para optar al grado de Doctor en Biología Funcional y Genómica por la Universidad de Salamanca, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^a del Pilar Pérez González y la Dra. Rebeca Martín García, 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 2016.

Fdo. Dr. Sergio Moreno Pérez



LA Dra. M^a del PILAR PÉREZ GONZÁLEZ, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC Y LA Dra. REBECA MARTÍN GARCÍA

CERTIFICAN:

Que la licenciada **M^a Teresa Revilla Guarinos** ha realizado el trabajo titulado **“Rga6, una GAP de Cdc42, implicada en el control de la morfología celular de *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, firman el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2016.

Fdo. Dra. M^a del Pilar Pérez González

Fdo. Dra. Rebeca Martín García

Esta tesis doctoral ha sido financiada por una beca predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Economía y Competitividad del Gobierno de España con referencia BES-2011-045514 y asociada al proyecto de investigación BFU2010-15641 en el Organismo CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS (CSIC).

Agradecimientos

Comienzo dando las gracias al Ministerio de Economía y Competitividad por la asignación de un becario FPI a la Dra. M^a del Pilar Pérez González y en especial a ella, por elegirme a mí y darme la oportunidad de realizar esta tesis en su laboratorio. Gracias también a la Dra. Rebeca Martín García por aceptar la codirección de este proyecto. A las dos gracias por haber dirigido este trabajo hasta el final y por haber contribuido a mi formación científica.

He tenido la suerte de poder trabajar y aprender algo de todos los miembros que forman o han formado parte del grupo 1.4. A todos ellos, gracias por enseñarme todo lo que sé de *S. pombe*. Primero comencé trabajando con Nuria, a la que agradezco su ayuda y su lado humano que hacía que trabajar con ella fuese muy fácil. Continué con Miguel, gracias por ser un buen compañero de poyata y de mesa, por mantener la calma en los momentos difíciles y por descubrirme canciones chulas. También de Raúl he aprendido cosas. A él gracias por enseñarme lo que había y lo que no había que hacer. Al final acabé trabajando con Rebeca. Gracias por su ayuda en el día a día, por pelear las cosas hasta que salían, por poder contarle mis ideas libremente sin miedo a que me juzgase y por sus comentarios constructivos. Y como no, siempre presente durante estos 4 años, Pedro. A él le doy las gracias por su ayuda, por su carácter amable, por sus canciones, por sus ánimos en los momentos duros y por hacer del laboratorio un sitio agradable para trabajar. A Víctor, la última incorporación, gracias por aportar nuevos aires y nuevas energías. Mucho ánimo para la tesis. Gracias también a Elvira, porque su trabajo permite que el laboratorio funcione mejor y a Bea por sus ideas en las reuniones de grupo y por su continuo buen humor.

No me olvido de todos aquellos que estuvieron de paso en algún momento y que también contribuyeron a hacer la rutina más amena. Gracias también a los antiguos miembros del grupo, porque cuando en un laboratorio ha trabajado tanta gente, queda presente algo de cada uno de ellos. En especial muchas gracias a Toñi, la Dra. María Antonia Villar Tajadura. Aunque no hemos coincidido, esta tesis es la continuación de su trabajo. Gracias por todas las cepas, oligos y demás cosas que ella hizo y que me han sido de gran ayuda para poder avanzar.

Gracias “al café” y aquí entran todos, que no quiero nombrar uno a uno, no vaya a ser que me deje a alguien, sin querer. A los que estaban al comienzo de esta tesis y que ahora están haciendo carrera científica en el extranjero y a los que me han acompañado hasta el final. Gracias por ese momento de respiro en el día, en el que te sientes comprendido y te das cuenta de que todos tenemos una sensación parecida cuando estamos haciendo la tesis. Gracias también por los buenos momentos fuera del trabajo.

Muchas gracias a todos los miembros del Grupo de Pared, a nuestros seminarios de los lunes y al buen ambiente de trabajo que existe en esta unidad. Gracias por todas las sugerencias y aportaciones constructivas que han ayudado a que esta tesis tomase forma y avanzase poco a poco. Gracias también a los seminarios de centro por hacerme recapitular anualmente el trabajo que tenía, pensar cómo lo podía presentar y por dónde podía continuar. También mis agradecimientos a toda la gente que sin trabajar en mi tema asistía y aportaba ideas. Gracias, por supuesto, a todas las personas que hacen que el IBFG funcione: dirección, administración, cocina, ayuda con los aparatos, etc. En especial muchas gracias a Carmen

Castro por haberme enseñado casi todo lo que sé de microscopía y por haberme ayudado siempre con la mejor sonrisa.

Para acabar, muchísimas gracias a mi familia y amigos. ¡Qué hubiese sido de mí sin vosotros a lo largo de estos 4 años! No lo quiero ni imaginar. Gracias por vuestros ánimos, por confiar en mí y por aportar una visión externa y objetiva. A mis padres gracias por haberme apoyado siempre y por continuar haciéndolo. Gracias por preocuparos por mí, por entenderme y por quererme tanto. A Ainhoa gracias por enseñarme el camino y por ayudarme siempre en cada paso. Compartimos formación y por ello te agradezco tu visión y comentarios científicos, pero sobre todo, gracias por ser la mejor hermana que podría tener. A Nico gracias por haberme oxigenado durante toda la tesis. Me has ayudado a mirar siempre hacia delante y a seguir haciéndolo. Gracias por tu apoyo, por tu ayuda y por tu comprensión. A Laura gracias por ese día a día en Salamanca, por escuchar mis historias y por hacerme ver que las personas que se cruzan en nuestras vidas tienen algo que enseñarnos.

Gracias a todos los que me han apoyado y animado a seguir hasta el final.

A mi familia y amigos.

Abreviaturas, acrónimos y siglas

aa: Aminoácido

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ARN: Ácido ribonucleico

Arp: Proteínas relacionadas con la actina (Actin- related protein)

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BAR: Proteína de la familia Bin - Amphiphysin - Rvs

BH: Dominio con homología a la región Breakpoint cluster (Breakpoint cluster region-Homology)

BSA: Albúmina sérica bovina (Bovine Seric Albumin)

Cdc: Ciclo de División Celular (Cell Division Cycle)

CDK: Quinasa dependiente de ciclina (Cyclin Dependent Kinase)

CFP: Proteína azul fluorescente (Cyan Fluorescent Protein)

CRIB: Dominio de unión a Cdc42/Rac (Cdc42/Rac Interactive Binding)

DAD: Dominio de autoinhibición de la proteína Diaphanous de *Drosophila melanogaster* (Diaphanous Autoinhibitory Domain)

DIC: Contraste Interdiferencial (Differential Interference Contrast)

DID: Dominio de inhibición de la proteína Diaphanous de *Drosophila melanogaster* (Diaphanous Inhibitory Domain)

DMSO: Dimetil Sulfóxido

dNTPs: Desoxirribonucleótidos trifosfato

D.O.: Densidad óptica

DTT: Ditiotreitol

DYRK: Quinasa de especificidad dual regulada por tirosina (dual-specificity tyrosine phosphorylation-regulated kinase)

EDTA: Ácido etilén diamino tetra-acético

EGTA: Ácido etilén glicol bis tetra-acético

EMM: Medio mínimo para *S. pombe* (Edinburgh Minimal Media)

FH: Dominio con homología a las forminas (Formin Homology)

FITC: Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorescein isothiocyanate)

FRAP: Recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

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

GDI: Inhibidor de la disociación de GDP (GDP Dissociation Inhibitor)

GDP: Guanosina 5'-difosfato

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

Abreviaturas, acrónimos y siglas

- GFP:** Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
- GPCR:** Receptor asociado a proteínas G heterotrómicas (*G-protein-coupled receptor*)
- GST:** Glutathion S transferasa
- GTP:** Guanosina 5'-trifosfato
- HA:** Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe (*Hemagglutinin Antigen*)
- HRP:** Peroxidasa de rábano (*Horseradish Peroxidase*)
- HU:** Hidroxiurea
- IPTG:** Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
- Kb:** Kilobase
- kDa:** Kilodalton
- Lat. A:** Latrunculina A
- LB:** Medio rico para *E. coli* (Luria-Bertani)
- LIM:** Dominio proteico cuyas iniciales proceden de las proteínas Lin11, Isl-1 y Mec-3
- MAPK:** Quinasa activada por mitógenos (*Mitogen-Activated Protein Kinase*)
- Mb:** Megabase
- MBC:** Metil 2-Benzimidazol Carbamato
- MEA:** Medio agar extracto de malta (*Malt Extract Agar*)
- min:** Minutos
- MTOC:** Centro Organizador de Mirotúbulos (*Microtubule Organizer Center*)
- NDR:** Proteína quinasa de la familia Nuclear Dbf2-Related
- NETO:** Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo (*New End Take Off*)
- nmT:** Promotor inhibido por tiamina (*No Messenger with Thiamine*)
- NPF:** Factor que promueve la nucleación de la actina (*Nucleation Promoting Factor*)
- NP-40:** Nonidet P-40
- OE:** Sobreexpresión de un gen (*OverExpression*)
- OETO:** Comienzo del crecimiento por el polo celular antiguo (*Old End Take Off*)
- ORF:** Fase de lectura abierta (*Open Reading Frame*)
- PAK:** Proteína quinasa activadas por p-21 (*p21-Activated Kinase*)
- pb:** Pares de bases
- PBR:** Región polibásica (*Polybasic region*)
- PBS:** Tampón fosfato salino (*Phosphate-Buffered Saline*)
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*)
- PEM:** Tampón PIPES con EGTa y Mg₂SO₄
- PH:** Dominio con homología a Pleckstrina (*Pleckstrin Homology*)
- PIP₂:** Fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato
- PI3P:** Fosfatidilinositol 3-fosfato

- PIPES:** Piperazina bis (ácido 2-etanosulfónico)
- PKC:** Proteína Quinasa C (*Protein Kinase C*)
- PMSE:** Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
- PVDF:** Fluoruro de polivinilideno
- RBD:** Dominio de unión a RhoA (*RhoA Binding Domain*)
- RFP:** Proteína roja fluorescente (*Red Fluorescent Protein*)
- Rho:** *Ras Homology*
- rpm:** Revoluciones por minuto
- s:** Segundos
- SDS:** Dodecil sulfato sódico
- SDS-PAGE:** Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (*PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*)
- Ser rich:** Dominio rico en serinas
- SH3:** Dominio con homología a Src3 (*Src3 Homology*)
- SIN:** Complejo de inicio de la septación (*Septation Initiation Network*)
- SNARE:** Soluble N-ethylmaleimide -sensitive fusion attachment protein receptors
- T:** Tiamina
- TAE:** Tampón Tris-Acético EDTA
- TBST:** Tampón Tris salino con Tween-20 (*Tris-Buffered Saline Tween-20*)
- TCA:** Ácido Tricloroacético
- td:** Tandem
- +TIPs:** plus end tracking proteins
- TRIS:** Tris-(hidroximetilamino)-metano
- ua:** Unidades arbitrarias
- UDP:** Uridina 5'-difosfato
- UV:** Ultravioleta
- vic:** Viable en presencia de inmunosupresor e ión cloro (*Viable in the presence of Immunosuppressant and Chloride ion*)
- v/v:** Volumen/volumen
- WASP:** *Wiscott-Aldrich Syndrome Protein*
- wt:** Estirpe silvestre (*Wild Type*)
- YES:** Medio rico para *S. pombe* (*Yeast Extract Supplemented*)
- YFP:** Proteína amarilla fluorescente (*Yellow Fluorescent Protein*)
- 2XYT:** Medio rico para *E. coli* (*Yeast Extract Tryptone*)

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1 Morfogénesis y polaridad celular..... | 3 |
| 2 La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : un modelo eucariota para el estudio de la morfogénesis celular..... | 4 |
| 2.1 Ciclo celular y morfogenético de <i>S. pombe</i> | 6 |
| 2.2 Morfogénesis y control de la polaridad en <i>S. pombe</i> | 7 |
| 2.2.1 El citoesqueleto de microtúbulos y las proteínas marcadoras de polaridad en <i>S. pombe</i> | 7 |
| 2.2.2 El citoesqueleto de actina en <i>S. pombe</i> | 9 |
| 2.2.2.1 Parches de actina: endocitosis..... | 10 |
| 2.2.2.2 Cables de actina: secreción celular polarizada | 12 |
| 2.2.2.3 Anillo contráctil de actomiosina: citocinesis..... | 13 |
| 2.2.3 El complejo del exocisto: secreción celular polarizada | 14 |
| 3 Las GTPasas de la familia Rho | 15 |
| 3.1 Modificaciones postraduccionales de las proteínas Rho..... | 16 |
| 3.2 Regulación de las proteínas Rho | 17 |
| 3.2.1 Las proteínas GEF..... | 18 |
| 3.2.2 Las proteínas GDI..... | 18 |
| 3.2.3 Las proteínas GAP | 19 |
| 4 Las GTPasas de la familia Rho en <i>S. pombe</i> | 20 |
| 4.1 Rho1 y Rho2: Biosíntesis de la pared celular y ruta MAPK de integridad celular..... | 21 |
| 4.2 Rho3 y Rho4: secreción celular y degradación del septo durante la citocinesis..... | 23 |
| 4.3 Rho5..... | 24 |
| 5 La GTPasa Cdc42 en las levaduras: control del crecimiento celular polarizado | 24 |
| 5.1 Cdc42 en <i>S. cerevisiae</i> | 24 |
| 5.2 Cdc42 en <i>S. pombe</i> | 28 |
| OBJETIVOS | 33 |
| RESULTADOS | 37 |
| Apartado I: Caracterización de la proteína Rga6 y de su actividad GAP sobre Cdc42 | 39 |
| 1 Análisis <i>in silico</i> de la proteína Rga6 | 39 |
| 2 La proteína Rga6 participa en el control de las dimensiones celulares de <i>S. pombe</i> | 40 |

| | | |
|---|---|-----------|
| 3 | Rga4 y Rga6 tienen papeles aditivos en el control de la morfología celular | 42 |
| 4 | Rga6 interactúa con las GTPasas Cdc42, Rho2 y Rho3 mediante el ensayo de doble híbrido | 44 |
| 5 | Rga6 tiene actividad GAP <i>in vivo</i> sobre la GTPasa Cdc42 | 44 |
| 6 | Rga6 regula la morfología celular independientemente de las GTPasas Rho2 y Rho3..... | 46 |
| Apartado II: Estudio de la localización y estructura de Rga6..... | | 48 |
| 7 | La proteína Rga6 se localiza en la membrana plasmática y su concentración disminuye en los polos de crecimiento | 48 |
| 8 | Rga6 y Rga4 no colocalizan en los mismos nodos | 50 |
| 9 | La localización de Rga6 y de Rga4 es independiente | 51 |
| 10 | La exclusión de Rga6 de las zonas de crecimiento depende del citoesqueleto de actina | 53 |
| 11 | La proteína Rga6 es más dinámica en la membrana de los polos de crecimiento | 57 |
| 12 | Construcción de versiones truncadas de la proteína Rga6..... | 61 |
| 12.1 | Estudio de la funcionalidad de las versiones truncadas de Rga6 | 64 |
| 13 | Estudio del extremo N-terminal de Rga6..... | 66 |
| 14 | La región polibásica de Rga6 es necesaria y suficiente para la localización de la proteína en la membrana plasmática | 68 |
| Apartado III: Función de la proteína Rga6 en la regulación del crecimiento polarizado y su relación con Cdc42..... | | 70 |
| 15 | Rga6 participa en la regulación de Cdc42 en los polos..... | 70 |
| 16 | Estudio de la relación de Rga6 con los GEFs de Cdc42 | 74 |
| 17 | Relación de Rga6 con la formina For3 | 79 |
| 18 | Intercambio de los dominios GAPs de Rga6 y de Rga4..... | 84 |
| 18.1 | Estudio de la funcionalidad de la quimera Rga6-GAPRga4..... | 86 |
| 19 | Estudio del efecto sobre la morfología celular de la localización dirigida de Rga6 a los polos | 87 |
| DISCUSIÓN | | 91 |
| | Rga6 es una proteína reguladora GAP de Cdc42 que participa, junto con Rga4, en el control de las dimensiones celulares de <i>S. pombe</i> | 93 |
| | Rga6 se localiza en la membrana plasmática y la disminución de sus niveles en los polos de crecimiento depende de los cables de actina nucleados por For3 | 95 |
| | Estudios estructura-función de Rga6..... | 99 |
| | Rga6 regula negativamente las oscilaciones de Cdc42 activa en los polos celulares..... | 101 |

| | |
|---|------------|
| CONCLUSIONES..... | 105 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 109 |
| 1 Microorganismos utilizados | 111 |
| 2 Medios de cultivo..... | 114 |
| 2.1 Medios de cultivo para <i>S. pombe</i> | 114 |
| 2.2 Medios de cultivo para <i>E. coli</i> | 115 |
| 3 Condiciones y estimación del crecimiento..... | 116 |
| 3.1 Condiciones de crecimiento para <i>S. pombe</i> | 116 |
| 3.2 Sincronización de cultivos celulares de <i>S. pombe</i> mediante el uso de cepas mutantes termosensibles..... | 116 |
| 3.3 Ensayos de crecimiento en gota | 116 |
| 3.4 Condiciones de crecimiento para <i>E. coli</i> | 117 |
| 4 Métodos genéticos..... | 117 |
| 4.1 Conjugación | 117 |
| 4.2 Aislamiento de ascosporas | 117 |
| 5 Procedimientos generales de biología molecular..... | 117 |
| 5.1 Vectores utilizados..... | 117 |
| 5.1.1 Vectores de <i>E. coli</i> | 117 |
| 5.1.2 Vectores de <i>S. pombe</i> | 118 |
| 5.2 Obtención de ADN | 119 |
| 5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 119 |
| 5.4 Secuenciación de ADN | 121 |
| 5.5 Manipulación de ADN | 121 |
| 5.6 Transformación de <i>E. coli</i> | 122 |
| 5.7 Transformación de <i>S. pombe</i> | 122 |
| 5.8 Vectores construidos en este trabajo..... | 122 |
| 5.8.1 Construcción de las sobreexpresiones integradas de <i>rga6⁺</i> y de <i>rga4⁺</i> | 122 |
| 5.8.2 Construcción del módulo de integración de <i>rga6⁺</i> y sus versiones truncadas o mutadas..... | 123 |
| 5.8.3 Construcción del módulo de integración de <i>rga4⁺</i> | 124 |
| 5.8.4 Construcción del módulo de integración de las quimeras de <i>rga6⁺</i> y <i>rga4⁺</i> | 125 |
| 5.8.5 Construcción del módulo de integración de las quimeras de <i>rga6⁺</i> y <i>rga2⁺</i> | 126 |

| | | |
|-------|--|------------|
| 6 | Análisis de proteínas | 128 |
| 6.1 | Obtención de extractos celulares | 128 |
| 6.2 | Obtención de extractos celulares con TCA al 20%..... | 128 |
| 6.3 | Electroforesis y electrotransferencia de proteínas..... | 129 |
| 6.4 | Inmunodetección de proteínas..... | 129 |
| 6.5 | Valoración de GTP-Cdc42..... | 130 |
| 6.5.1 | Producción de GST-CRIB | 130 |
| 6.5.2 | Ensayo de unión de GTP-Cdc42 a GST-CRIB asociado a glutation-sefarosa..... | 130 |
| 6.6 | Ensayo de unión de proteínas a fosfolípidos unidos a una membrana comercial (PIP-Strips) | 131 |
| 6.6.1 | Purificación de las proteínas..... | 131 |
| 6.6.2 | Ensayo de unión de proteínas a fosfolípidos..... | 131 |
| 7 | Técnicas microscópicas y tinciones..... | 131 |
| 7.1 | Microscopía de fluorescencia | 132 |
| 7.1.1 | Fluorescencia directa con GFP | 132 |
| 7.1.2 | Tinción de calcoflúor..... | 132 |
| 7.1.3 | Tinción de actina..... | 133 |
| 7.1.4 | Tinción de FITC-lectina..... | 133 |
| 7.2 | Microscopía en tiempo real (time-lapse)..... | 134 |
| 7.2.1 | Ensayos de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) | 134 |
| 7.2.2 | “Streaming”: adquisición de imágenes a muy alta velocidad..... | 134 |
| 7.2.3 | Estudio de las oscilaciones de los niveles de Cdc42 activa en los polos | 135 |
| 8 | Análisis bioinformático de los datos | 135 |
| | BIBLIOGRAFÍA..... | 137 |

INTRODUCCIÓN

1 Morfogénesis y polaridad celular

La morfogénesis constituye uno de los tres aspectos fundamentales del desarrollo biológico, junto con el control del crecimiento y la diferenciación celulares. La palabra morfogénesis significa literalmente el origen de la forma (del griego “morphê”: forma y “génesis”: creación) y se define como el proceso biológico que lleva a que un organismo unicelular o pluricelular desarrolle su forma. Las células presentan una gran variabilidad de formas relacionadas con la función que desempeñan. Esa diversidad de formas es el resultado de la organización polarizada de la célula que conduce a un crecimiento polarizado.

La polaridad celular genera una asimetría estructural y molecular que permite establecer y mantener dominios funcionalmente especializados en la membrana plasmática y en el citoplasma de las células. La distribución espacial y la composición proteica de esos dominios permiten que las células proliferen, se diferencien y adquieran una forma determinada que está estrechamente vinculada con su función fisiológica. Un claro ejemplo de células altamente polarizadas, con una marcada asimetría celular vinculada a su función, es el de las células epiteliales del intestino. Estas células participan en la absorción de nutrientes y se caracterizan por poseer microvellosidades en su extremo apical, en contacto con el contenido intestinal, que permiten ampliar la superficie de absorción y el intercambio de sustancias (Drubin and Nelson, 1996).

Se pueden definir tres etapas en el establecimiento de la polaridad celular (**Figura 1**):

- La selección del sitio en el que se va a establecer la asimetría celular, en respuesta a señales intracelulares o extracelulares.
- El reconocimiento y posterior refuerzo del sitio de polarización, gracias a las señales enviadas al citoesqueleto de la célula.
- La reorganización del citoesqueleto y la secreción hacia el sitio de polarización, lo que genera una redistribución asimétrica de las estructuras, moléculas y procesos de la célula que establecen la polaridad celular.

Para generar y mantener la polaridad celular es necesario que cada etapa este regulada por bucles de retroalimentación o “feedback loops” positivos y negativos (Drubin and Nelson, 1996).

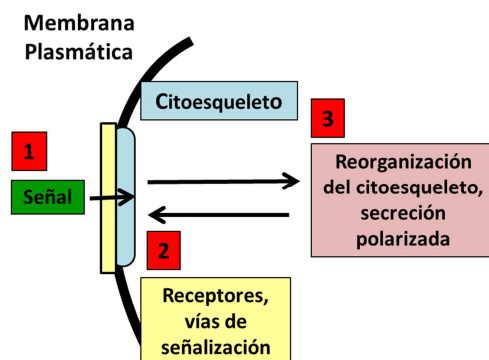


Figura 1. Etapas en el establecimiento de la polaridad celular. 1. Selección del sitio donde se va a establecer la asimetría celular en respuesta a señales extra o intracelulares. 2. Reconocimiento y refuerzo del sitio de polarización mediante la señalización al citoesqueleto de la célula. 3. Reorganización del citoesqueleto y la secreción hacia el sitio de polarización. Figura adaptada de (Drubin and Nelson, 1996).

Aunque la polarización de las células se produce en respuesta a señales extracelulares o intracelulares, las células también son capaces de polarizar en ausencia de esa información. Este proceso se denomina “polarización espontánea” o “rotura de la simetría” (“spontaneous polarization” o “symmetry-breaking”) y conlleva la polarización celular en una zona aleatoria. Para ello es necesaria la concentración local de activadores, que potencian la señalización en un punto concreto y de inhibidores globales, que favorecen la competición por la activación entre distintas zonas (Martin, 2015; Wedlich-Soldner and Li, 2003).

Las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe* experimentan a lo largo de su ciclo de vida cambios marcados en el patrón de crecimiento que determinan directamente su forma celular. Por ello, y gracias a su genética sencilla, se han usado como organismos modelo para estudiar la polaridad celular (Pruyne and Bretscher, 2000). En las levaduras son necesarios tres elementos para generar y mantener la polaridad celular:

- Las proteínas marcadoras de polaridad, que marcan los puntos en los cuales se va a establecer el crecimiento celular polarizado.
- Las GTPasas de la familia Rho, que reconocen el sitio de polarización y transmiten la señal a proteínas reguladoras del citoesqueleto.
- El citoesqueleto, que dirige la llegada de las vesículas de secreción hacia la zona de crecimiento activo (Casamayor and Snyder, 2002).

El crecimiento polarizado y los procesos que regulan la morfología celular como la organización del citoesqueleto, la secreción polarizada y la endocitosis, tienen que ser controlados por las rutas de integridad celular y coordinados con el avance del ciclo celular. Por ello, las proteínas que regulan el ciclo celular, las ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs, Cyclin Dependent Kinases), y las proteínas MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) de las rutas de integridad y de estrés, también participan en el establecimiento de la asimetría que genera la polaridad celular (Pérez and Rincón, 2010).

Las principales moléculas, como las GTPasas Rho, y las vías de señalización que regulan la polaridad celular en las levaduras están altamente conservadas en otros eucariotas. Este hecho sugiere que los mecanismos básicos que regulan el crecimiento polarizado están conservados a lo largo de la evolución. Por este motivo, estudiar cómo se establece y regula la polaridad celular en las levaduras contribuye a ampliar nuestro conocimiento sobre estos procesos en organismos multicelulares (Casamayor and Snyder, 2002; Pérez and Rincón, 2010).

2 La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*: un modelo eucariota para el estudio de la morfogénesis celular

Schizosaccharomyces pombe es un microorganismo eucariota unicelular (**Figura 2**). Contiene un genoma de 13,8 Mb de ADN que codifica 4.824 genes, englobados en tres cromosomas. Esta levadura pertenece al filo Ascomycota del reino de los Hongos, que se definen por la presencia de un asca o saco que contiene las esporas de germinación. *S. pombe* fue aislada por primera vez en 1893 por P. Linder en África, a partir de la cerveza de mijo, un tipo de cereal. De hecho, el nombre de la especie, *pombe*, significa cerveza en swahili.

Posteriormente, se aisló de nuevo a partir de jugos de frutas y de otras bebidas alcohólicas. La utilización de *S. pombe* como organismo modelo para realizar estudios genéticos comenzó en los años cuarenta. Urs Leopold fue quien caracterizó las estirpes homotáticas (968 h⁹⁰) y heterotáticas (972 h⁻ y 975 h⁺) predecesoras de la mayoría de las cepas de *S. pombe* presentes hoy en día en los laboratorios (Hoffman *et al.*, 2015).

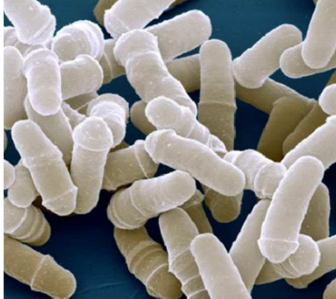


Figura 2. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Fotografía de *S. pombe* adquirida en un microscopio electrónico de barrido. Ilustración tomada de Jürgen Berger/Max Planck Institute for Developmental Biology.

Algunas de las ventajas que hacen de *S. pombe* un buen sistema modelo son: su ciclo de vida rápido, su genética sencilla y manipulable en condiciones de laboratorio y que no es un organismo patógeno. *S. pombe* se usa como organismo modelo para realizar estudios de polaridad, morfogénesis, citocinesis y ciclo celular debido a que su morfología, tamaño y división son muy reproducibles (Pérez and Rincón, 2010). Esta levadura tiene una morfología cilíndrica, crece apicalmente por los polos y mantiene un diámetro constante a lo largo del ciclo celular. *S. pombe* se divide por fisión en su zona media, mediante la formación de un septo; por este motivo, se le denomina también levadura de fisión.

S. pombe es un microorganismo con un ciclo de vida haplodiplobionte, con una fase haploide predominante en su ciclo de vida y una diploide (**Figura 3**).

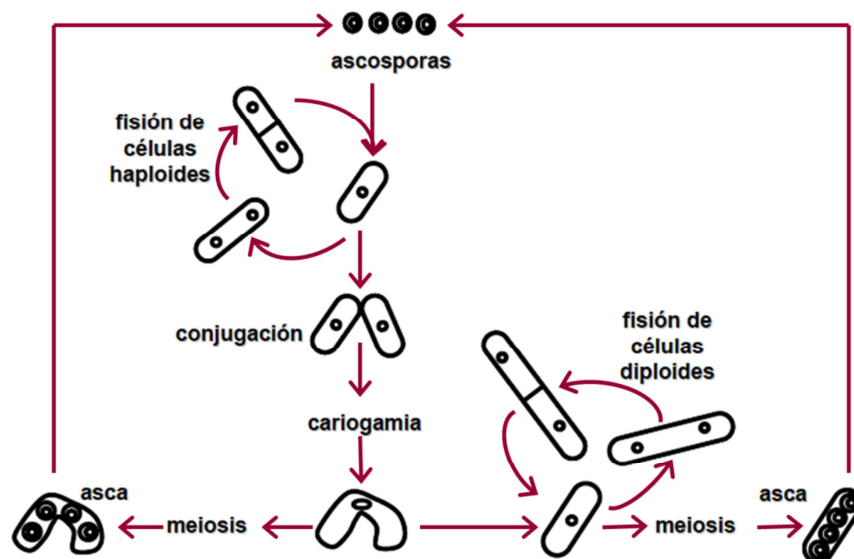


Figura 3. Representación esquemática del ciclo de vida de *S. pombe*. Se muestra la fase de vida haploide (izquierda) y diploide (derecha) de la levadura de fisión.

Las células de *S. pombe* en crecimiento vegetativo tienen forma cilíndrica. Durante la fase haploide, las células poseen un tamaño aproximado de 3-4 μm de diámetro y 7-8 μm de longitud, al comienzo del ciclo celular y crecen apicalmente por los extremos hasta alcanzar 12-15 μm , en el momento de la división celular. Ante la escasez de alimento, células haploides

de tipo sexual opuesto h^+ y h^- inician el proceso de conjugación. Primero tiene lugar la formación del “*shmoo*” o proyección de conjugación, posteriormente la fusión de las células y por último, la formación del cigoto mediante la fusión de los núcleos o cariogamia. Este proceso conduce a la meiosis y a la esporulación, con la producción de un asca con cuatro ascosporas. Cuando las condiciones del medio son las adecuadas, la espora forma un tubo germinativo y finalmente vuelve a dar lugar a una célula haploide. El cigoto diploide puede mantener un ciclo vegetativo diploide si se transfiere a un medio rico en nutrientes.

2.1 Ciclo celular y morfogénico de *S. pombe*

El control de la morfología de *S. pombe* está estrechamente acoplado a la progresión de su ciclo celular (Figura 4). A lo largo de su ciclo mitótico la levadura de fisión presenta cambios en la polaridad del crecimiento, activando el crecimiento en uno o en los dos polos, dependiendo del momento del ciclo en el que se encuentra. Al comienzo del ciclo celular, en G1, las células activan el crecimiento únicamente en el polo viejo, heredado de la célula madre, mostrando un patrón de crecimiento monopolar. Posteriormente, durante la fase G2, cuando la célula adquiere un determinado tamaño, se inicia también el crecimiento en el segundo polo, el polo nuevo resultante de la división celular anterior. Este proceso se conoce como NETO (New End Take Off) y da paso a un patrón de crecimiento bipolar (Mitchison and Nurse, 1985). Cuando la célula entra en mitosis, se detiene el crecimiento en los polos y la maquinaria de crecimiento se redirige hacia la región central de la célula, donde se ensambla un anillo contráctil de actomiosina. Tras la separación de los núcleos, se produce la contracción del anillo y la formación de un septo de división, gracias al aporte de nueva membrana y de componentes de la pared celular. Finalmente, tiene lugar la degradación del septo y la separación de las 2 células hijas.

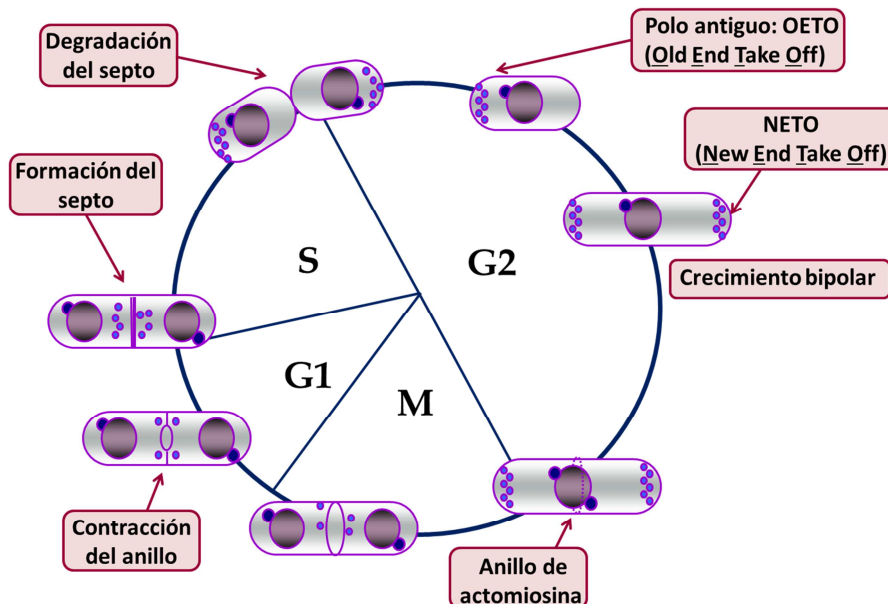


Figura 4. Representación del ciclo celular y morfogénico de *S. pombe*.

2.2 Morfogénesis y control de la polaridad en *S. pombe*

2.2.1 El citoesqueleto de microtúbulos y las proteínas marcadoras de polaridad en *S. pombe*

En *S. pombe*, como en todos los eucariotas, los microtúbulos son polímeros formados por α y β -tubulina que se nuclean en los centros organizadores de microtúbulos (MTOCs, Microtubule Organising Centres), donde la γ -tubulina actúa como un cebador para la polimerización de los microtúbulos (Hagan, 1998; Hagan and Hyams, 1988). Los microtúbulos son estructuras polarizadas con un extremo menos (-), anclado a los MTOCs y un extremo más (+), de carácter dinámico. En *S. pombe* el citoesqueleto de microtúbulos interfásico desempeña un papel esencial en la selección del sitio de crecimiento polarizado (Martin, 2009).

En la levadura de fisión los microtúbulos citoplásmicos se nuclean a partir de MTOCs asociados a la envuelta nuclear (Sawin and Tran, 2006). Los microtúbulos interfásicos se organizan en forma de 2 a 6 haces antiparalelos distribuidos a lo largo del eje longitudinal de la célula. El extremo menos (-) de los microtúbulos, anclado a los MTOCs, se orienta hacia el centro de la célula; de modo que los extremos más (+) de los microtúbulos crecen hacia ambos polos celulares. En los polos celulares los microtúbulos se despolimerizan rápidamente, proceso que se ha denominado “catástrofe” (Brunner and Nurse, 2000). Las fuerzas de empuje ejercidas por el extremo más (+) en crecimiento del microtúbulo, al entrar en contacto con los polos de la célula, contribuyen al posicionamiento correcto del núcleo, el cual está unido a los extremos menos (-) solapantes de los haces de microtúbulos (Tran *et al.*, 2001). La posición del núcleo determina posteriormente el sitio de división celular.

En el extremo más (+) en crecimiento de los microtúbulos se acumula un grupo de proteínas altamente conservadas, denominadas +TIPs, implicadas en el control espacial y temporal del proceso de catástrofe que regula la dinámica de los microtúbulos. En la levadura de fisión estas proteínas son Mal3, un miembro de la familia de proteínas EB1, la kinesina Tea2 y Tip1, un miembro de la familia de proteínas CLIP-170. Su función principal es orientar a los microtúbulos en el espacio intracelular a lo largo del eje longitudinal de la célula, guiando su crecimiento hasta alcanzar los polos celulares (Bieling *et al.*, 2007; Brunner and Nurse, 2000; Busch *et al.*, 2004).

Los microtúbulos interfásicos son los encargados de depositar a las proteínas Tea1 y Tea4 en los polos celulares. Tea1, una proteína con repeticiones Kelch y Tea4, una proteína con un dominio SH3, se acumulan y transportan en los extremos más (+) en crecimiento de los microtúbulos. Una vez depositadas en la membrana de los polos celulares, Tea1 y Tea4 actúan como proteínas marcadoras de la polaridad. Las células *tea1Δ* y *tea4Δ* muestran una morfología curvada y/o ramificada y un defecto en NETO, lo que sugiere que Tea1 y Tea4 además de ser importantes para la selección del sitio de crecimiento, también desempeñan un papel adicional en la transición a crecimiento bipolar (Martin *et al.*, 2005; Mata and Nurse, 1997; Tatebe *et al.*, 2005).

La relación entre los microtúbulos y la morfología celular es más amplia y existe un “feedback loop”, en el que los microtúbulos mantienen la forma cilíndrica de la célula,

controlando el posicionamiento de las zonas de crecimiento polarizado y a su vez la forma cilíndrica controla la organización de los microtúbulos (Terenna *et al.*, 2008) (Figura 5).

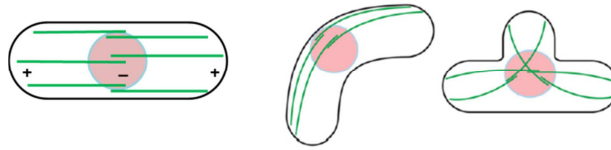


Figura 5. Esquema del citoesqueleto de microtúbulos en una célula silvestre (izquierda) y en células curvadas o con forma de "T". Estas células mutantes son el resultado de un mal posicionamiento del sitio de crecimiento. Figura adaptada de (Huisman and Brunner, 2011).

Aunque no se sabe cómo se ancla el complejo Tea1-Tea4 a la membrana de los polos celulares, se sabe que las proteínas Mod5 y Tea3 participan en la localización polarizada de Tea1. Mod5 es una proteína prenilada (Snaith and Sawin, 2003) y se ha propuesto que Mod5 favorecería la formación de nodos de Tea1 polimerizada (Bicho *et al.*, 2010). Tea3 es una proteína relacionada estructuralmente con Tea1 que participa en la localización de Tea1 en el polo que no está creciendo (Arellano *et al.*, 2002; Snaith *et al.*, 2005).

Además de Tea1 y Tea4, otra proteína marcadora de polaridad es Pom1, un miembro de la familia de proteínas quinasas DYRK. La localización de Pom1 en los polos necesita del citoesqueleto de microtúbulos y de las proteínas Tea1 y Tea4 (Bähler and Pringle, 1998; Hachet *et al.*, 2011). La delección de *pom1⁺* produce defectos en el posicionamiento del sitio de crecimiento y en NETO, fenotipos similares a los observados en las células *tea1Δ* y *tea4Δ*, y además tiene defectos de citocinesis (Bähler and Pringle, 1998). Ello sugiere que Pom1 es un efector importante del complejo Tea1-Tea4 que participa en el establecimiento de la polaridad celular.

Pom1 se localiza en la membrana formando un gradiente que se extiende desde los polos hacia el centro de la célula y actúa como un inhibidor dependiente de dosis de la entrada en mitosis, mediante la vía de la quinasa Cdr2. Cdr2 se localiza en forma de nodos en el centro de la célula, junto con otras proteínas como Wee1 o Mid1. La proteína Cdr2 inhibe, junto con la quinasa Cdr1, a Wee1. La quinasa Wee1 a su vez inhibe a la CDK, Cdc2, que controla el ciclo celular. Se ha propuesto que cuando la célula crece, los niveles de Pom1 en el centro de la célula disminuyen, permitiendo la actividad de Cdr2, la inhibición de Wee1 y la entrada en mitosis. De este modo, se ha propuesto que los gradientes de Pom1 controlan la longitud de la célula y su entrada en mitosis (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009). Sin embargo, el papel del gradiente de Pom1 en el control de la entrada en mitosis ha sido posteriormente cuestionado (Wood and Nurse, 2013). Lo que sí parece demostrado es el papel de Pom1 en la polaridad celular. Esta quinasa es necesaria para marcar la identidad de los polos como zonas de crecimiento axial de la célula (Abenza *et al.*, 2014; Tatebe *et al.*, 2008) y para impedir que la citocinesis se produzca en ellos (Huang *et al.*, 2007; Ullal *et al.*, 2015).

El complejo Tea1-Tea4 es necesario para nuclear los gradientes de Pom1 asociados a la membrana en los polos celulares. Tea4 actúa como subunidad reguladora de la fosfatasa PP1, reclutando a la subunidad catalítica Dis2 de esta fosfatasa a los polos de la célula (Alvarez-Tabarés *et al.*, 2007). El complejo Tea4-Dis2 promueve entonces la desfosforilación local de Pom1, lo cual expone una región de unión a la membrana en esta quinasa. Una vez en la

membrana, difunde lateralmente desde los polos hacia el centro de la célula. Finalmente, Pom1 se autofosforila y vuelve a liberarse gradualmente de la membrana, modulando así el gradiente (Hachet *et al.*, 2011).

Se ha propuesto que las proteínas Tea1, Tea4 y Pom1 podrían regular el proceso de NETO, el cual conlleva la activación del crecimiento en el segundo polo y la transición a crecimiento bipolar. Los mecanismos propuestos establecen un vínculo entre las proteínas marcadoras de polaridad y la GTPasa Cdc42, implicada en el control del crecimiento celular polarizado en *S. pombe* (Miller and Johnson, 1994) (Figura 6).

Por un lado, las proteínas Tea1 y Tea4 podrían regular el proceso de NETO mediante su interacción con For3, una proteína efectora de Cdc42. For3 es una formina que está implicada en la nucleación de los cables de actina en interfase, cuya activación requiere de la GTPasa Cdc42 y de la proteína Bud6 (Martin *et al.*, 2007). For3 interacciona con Tea1 mediante Tea4 y su presencia en el polo nuevo parece proveer la actividad necesaria para inducir el crecimiento bipolar (Martin *et al.*, 2005).

Por otro lado, se ha propuesto que Pom1 podría regular el proceso de NETO regulando la localización de la proteína GAP Rga4, que controla negativamente a la GTPasa Cdc42. Rga4 se localiza en los laterales de la célula y en la zona de división. Tras la separación de las células, Rga4 permanece en el polo nuevo, que no crece, y su exclusión del polo requiere de Pom1 (Tatebe *et al.*, 2008).

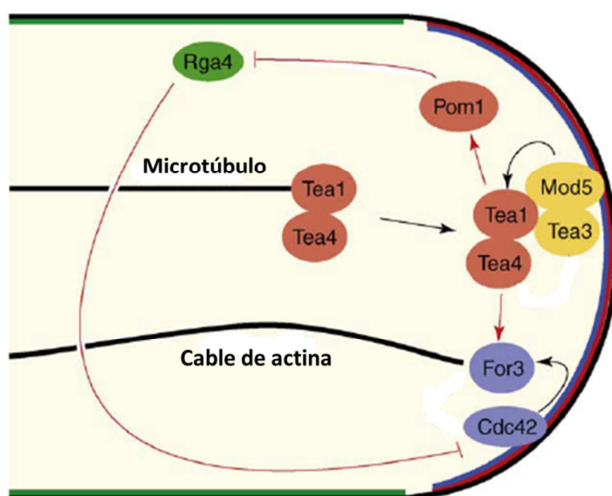


Figura 6. Modelo que ilustra el inicio del crecimiento en el polo nuevo. Los microtúbulos depositan en los polos a las proteínas marcadoras de polaridad Tea1 y Tea4, las cuales reclutan a la quinasa Pom1. Pom1 regula la exclusión de Rga4, una proteína reguladora negativa GAP de Cdc42, permitiendo la activación de esta GTPasa en el polo. Tea4 interacciona con For3, una proteína efectora de Cdc42. For3 nuclea los cables de actina en interfase que participan en el aporte polarizado de vesículas de secreción hacia la zona de crecimiento. Figura adaptada de (Martin, 2009).

2.2.2 El citoesqueleto de actina en *S. pombe*

El citoesqueleto de actina es una compleja red de polímeros dinámicos, que desempeña un papel importante en varios procesos celulares fundamentales como el mantenimiento de la forma de la célula, la polaridad, la división celular, la migración celular, la endocitosis o el tráfico de vesículas (Mishra *et al.*, 2014). El crecimiento polarizado en las levaduras está íntimamente vinculado con la distribución polarizada del citoesqueleto de actina. Por ello, existe una regulación precisa de las estructuras del citoesqueleto durante todas las fases del ciclo de vida de las levaduras (Pruyne and Bretscher, 2000).

La actina es una de las proteínas más abundantes y conservadas presentes en eucariotas y es esencial para la supervivencia de la mayoría de las células eucariotas (Pollard *et al.*, 2000). Esta proteína está presente en dos estados, la actina globular monomérica, conocida como actina-G, y la actina presente en forma de filamentos, conocida como actina-F. La actina filamentosa es una hélice de doble cadena dextrógira que posee un extremo dinámico, donde la actina-G unida a ATP se incorpora, y otro extremo donde la actina se desensambla (Chesarone and Goode, 2009; Pollard, 2007).

La regulación en el espacio y en el tiempo del citoesqueleto de actina permite a las células organizar distintas estructuras de actina en regiones específicas del citoplasma, donde desempeñan su función en respuesta a diferentes estímulos. El ensamblaje y desensamblaje de esas estructuras de actina están regulados por la actividad coordinada de numerosas proteínas accesorias altamente conservadas, que promueven la nucleación y el crecimiento de filamentos de actina, estabilizan y entrecruzan esos filamentos en haces y regulan el desensamblaje de los mismos. Las proteínas responsables de la nucleación de los filamentos de actina son: el complejo proteico Arp2/3, formado por las proteínas Arp2 y Arp3 (Actin-related protein), y las forminas (Pollard, 2007; Pollard and Borisy, 2003).

La levadura de fisión *S. pombe* posee una única isoforma de la proteína actina (Shortle *et al.*, 1982), un complejo proteico Arp2/3 (Winter *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2004) y tres forminas que nuclean filamentos de actina: For3, Cdc12 y Fus1 (Kovar *et al.*, 2011). Además, en comparación con otros eucariotas, posee un número más reducido de proteínas reguladoras de la actina (Moseley and Goode, 2006). El citoesqueleto de actina en *S. pombe* se organiza en forma de tres estructuras distintas a lo largo del ciclo celular: los parches de actina, los cables de actina y el anillo contráctil de actomiosina (Kovar *et al.*, 2011) (**Figura 7**). Además, durante el proceso de conjugación se forma una estructura de actina adicional denominada “actin fusion focus” (Dudin *et al.*, 2015).

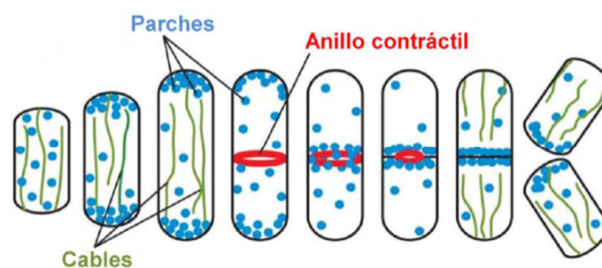


Figura 7. Citoesqueleto de actina a lo largo del ciclo celular de *S. pombe*. Esquema que muestra las distintas estructuras de actina en la levadura de fisión durante el ciclo vegetativo: los cables de actina, los parches y el anillo contráctil de actomiosina, que se forma en el momento de la división celular. Figura adaptada de (Kovar *et al.*, 2011).

2.2.2.1 Parches de actina: endocitosis

El proceso de endocitosis permite a las células tomar nutrientes del medio, retirar y degradar proteínas de la membrana plasmática o regular vías de señalización. La endocitosis es además un proceso necesario para el crecimiento celular polarizado y participa en el control de la morfología celular (Iwaki *et al.*, 2004).

Los parches de actina son redes densas de filamentos de actina ramificados. En *S. pombe* los parches de actina se ensamblan en los sitios de endocitosis y su distribución coincide con las regiones de crecimiento polarizado: los polos, en células en interfase, y la región central, en células en división (Gachet and Hyams, 2005). Ello sugiere que la función endocítica de los parches de actina acompaña la síntesis y la remodelación de la pared celular.

Las proteínas que forman los parches de actina son reclutadas en los sitios de endocitosis de manera ordenada (Sirotkin *et al.*, 2005; Sirotkin *et al.*, 2010) (**Figura 8**). La clatrina y las proteínas adaptadoras, End4 y Pan1, son las primeras moléculas en llegar y marcar los sitios de endocitosis. Las proteínas adaptadoras establecen la conexión entre los componentes de endocitosis y el ensamblaje de actina (Castagnetti *et al.*, 2005; Iwaki *et al.*, 2004; Sirotkin *et al.*, 2010). Pan1 es esencial para la viabilidad (Kovar *et al.*, 2011). End4 se localiza en las zonas de crecimiento, polos y septo, y en su ausencia las células presentan defectos morfológicos y un citoesqueleto de actina desorganizado (Castagnetti *et al.*, 2005; Iwaki *et al.*, 2004).

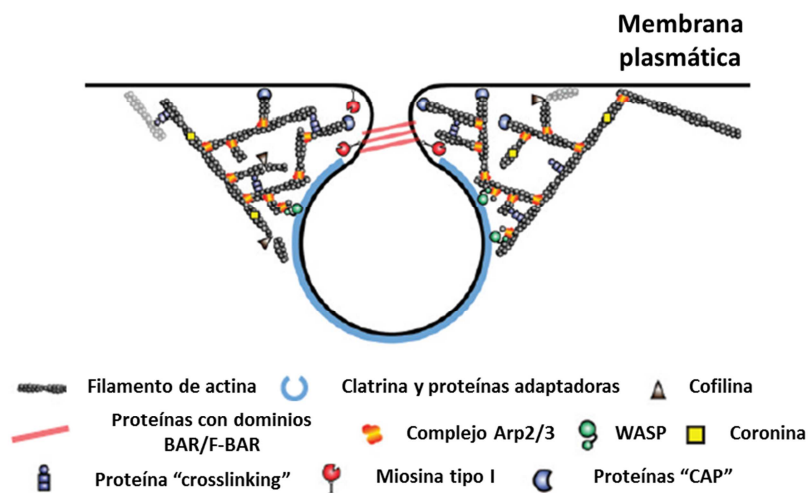


Figura 8. Esquema que ilustra un corte transversal de un parche de actina y las proteínas asociadas a esta estructura del citoesqueleto de actina. Figura adaptada de (Mishra *et al.*, 2014).

Los filamentos de actina que forman parte de los parches son nucleados por el complejo proteico Arp2/3 (Winter *et al.*, 1997; Young *et al.*, 2004). Este complejo nuclea una red densa de filamentos ramificados, generando nuevos filamentos sobre otros ya existentes, con un ángulo de 70° (Mishra *et al.*, 2014). La habilidad del complejo Arp2/3 de dirigir el ensamblaje de actina es estimulada por las proteínas denominadas "NPFs" (Nucleation Promoting Factors). Los factores que promueven la nucleación son: la proteína Wsp1, de la familia WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein) y la miosina I, Myo1 (Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2010; Toya *et al.*, 2001). Wsp1 es el activador más fuerte del complejo Arp2/3. Myo1 es un activador más débil y su actividad NPF es estimulada por la proteína Vrp1 (Sirotkin *et al.*, 2005). La fimbrina, Fim1, entrecruza y refuerza la red de filamentos de los parches de actina alrededor de la vesícula de endocitosis (Skau *et al.*, 2011). Las proteínas "cap", Acp1 y Acp2, bloquean y limitan el crecimiento de los filamentos; la cofilina, Cof1, induce la ruptura de los mismos y la coronina, Crn1, controla su longitud. Estas proteínas regulan la dinámica de los filamentos de los parches de actina. Cuando la vesícula se internaliza, la red de actina se desensambla rápidamente para permitir la fusión de la vesícula con los endosomas y el

reciclaje de la actina. En la levadura de fisión la GTPasa dinamina no participa en la endocitosis dependiente de clatrina (Sirotkin *et al.*, 2010). Para promover la invaginación de la membrana y su escisión, la red de filamentos de actina de los parches coopera con proteínas que contienen dominios BAR (Bin - Amphiphysin - Rvs) y F-BAR. Las proteínas con dominios BAR y F-BAR pueden deformar membranas, sensar la curvatura de las mismas y servir como unión entre las zonas de deformación de la membrana y las del ensamblaje de la actina (Aspenstrom *et al.*, 2006).

2.2.2.2 Cables de actina: secreción celular polarizada

Los cables de actina son haces polarizados de filamentos de actina paralelos, que se distribuyen a lo largo del eje longitudinal de la célula. Están involucrados en el transporte intracelular polarizado hacia las zonas de crecimiento (Moseley and Goode, 2006).

Los cables de actina de la levadura de fisión son un ejemplo de comunicación entre los citoesqueletos de la célula, ya que su sitio de ensamblaje coincide con los factores de polaridad Tea1 y Tea4, transportados en el extremo más (+) de los microtúbulos. Tras ser depositados en los polos de la célula, se cree que el complejo Tea1-Tea4 recluta a factores de polaridad del complejo denominado “polarisoma”, incluyendo la formina For3 y sus proteínas activadoras, la GTPasa Cdc42 y Bud6. For3 es la proteína que nuclea los filamentos de los cables de actina interfásicos. Posteriormente los filamentos de los cables son estabilizados por la tropomiosina Cdc8 (**Figura 9**).

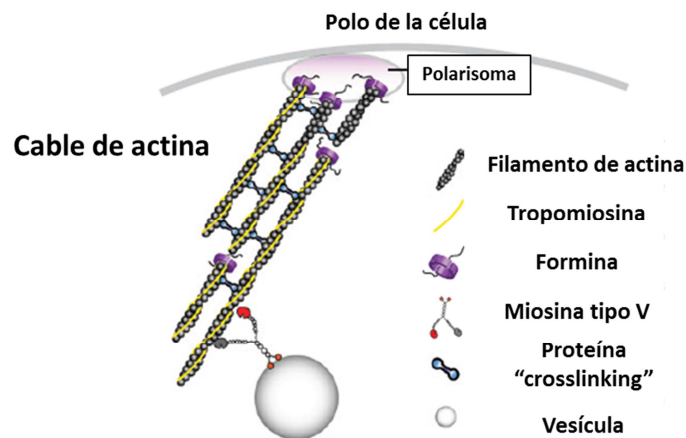


Figura 9. Representación esquemática de un cable de actina y de las proteínas asociadas a esta estructura. Los cables de actina nucleados por For3 son importantes para el crecimiento polarizado, gracias a que sirven como vías mediante las cuales las miosinas de tipo V transportan las vesículas hacia los polos celulares en crecimiento. Figura adaptada de (Mishra *et al.*, 2014).

For3 pertenece a la familia de las forminas, proteínas modulares que contienen un dominio FH1 (Formin Homology 1) y un dominio FH2. El dominio FH1 se une a la profilina, que secuestra la actina-G y el dominio FH2 controla la nucleación de la actina y el ensamblaje de los cables. Muchas forminas, entre ellas For3, contienen además otros dominios reguladores que incluyen el dominio DID (Diaphanous-related formin Inhibitory Domain), el dominio DAD (Diaphanous-related formin Autoregulatory Domain) y un dominio RDB (Rho-Binding Domain). La interacción entre los dominios DID y DAD de las forminas provoca su autoinhibición. Esta

autoinhibición se libera gracias a la unión de GTPasas de la familia Rho al dominio RBD, parcialmente solapante con el dominio DID (Martin *et al.*, 2007). La GTPasa Cdc42 y la proteína Bud6 contribuyen a liberar la autoinhibición de For3, favoreciendo su activación y localización correctas (Martin *et al.*, 2007). Tras ser activada, For3 inicia el ensamblaje de filamentos de actina. Después, la formina viaja con el filamento y se inactiva, al moverse del polo unida al filamento de actina. Debido a la extensión de este filamento de actina por otras moléculas de formina activas en el polo, la formina inactiva se mueve hacia el centro celular. De este modo, junto con el crecimiento del cable de actina, se establece un flujo retrógrado de las forminas hacia el interior celular (Martin and Chang, 2006) (**Figura 10**).

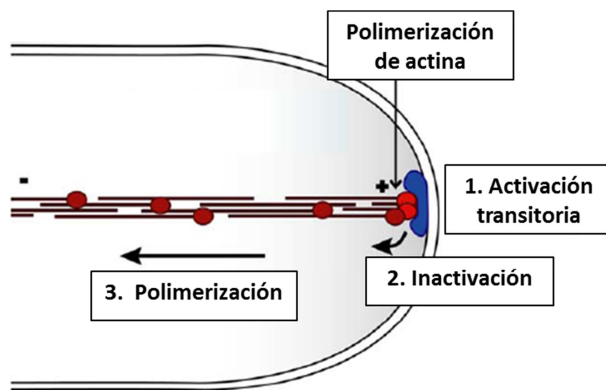


Figura 10. Modelo que ilustra el flujo retrógrado de la formina For3 hacia el interior celular. Las forminas For3 activas (círculos rojos) nuclean filamentos de actina que se incorporan al cable de actina en formación. Posteriormente For3 se inactiva (círculos granates) al moverse del polo unida al filamento de actina. Como resultado de la extensión del cable de actina por otras forminas activas en el polo celular, las moléculas inactivas de For3 se dirigen hacia el interior celular. Figura adaptada de (Martin and Chang, 2006).

Los cables de actina nucleados por For3 son importantes para el crecimiento polarizado, gracias a que sirven como vías mediante las cuales las proteínas motoras, miosinas de tipo V, dirigen el aporte de vesículas y orgánulos hacia los polos celulares en crecimiento (Feierbach and Chang, 2001; Motegi *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001). Además de participar en el transporte, las miosinas de tipo V desempeñan un papel importante en el mantenimiento de la arquitectura y dinámica de los cables de actina (Lo Presti *et al.*, 2012). En *S. pombe* existen dos miosinas de tipo V, Myo51 y Myo52, sin embargo, sólo Myo52 parece contribuir en la secreción polarizada mediada por los cables de actina durante interfase (Win *et al.*, 2001). Los cables de actina y Myo52 permiten el aporte de vesículas que contienen enzimas que remodelan la pared celular, como la α -glucán sintasa Mok1 o las β -glucán sintasas Bgs1 y Bgs4 (Cortés *et al.*, 2005; Mulvihill *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2001).

2.2.2.3 Anillo contráctil de actomiosina: citocinesis

Las células animales y las de los hongos organizan un anillo contráctil de actomiosina necesario para la separación celular tras la mitosis. La citocinesis se lleva a cabo mediante la acción coordinada del anillo contráctil de actomiosina y el depósito dirigido de membrana (Balasubramanian *et al.*, 2004). En hongos y levaduras, al ser organismos con pared celular, la contracción del anillo está además coordinada con la formación del septo que llevan a cabo las enzimas biosintéticas de la pared celular (Willet *et al.*, 2015). El anillo de actomiosina se ensambla en el sitio de división y contribuye a dirigir la secreción y el ensamblaje de la pared celular en el sitio de división (Rincón and Paoletti, 2016).

El anillo de actomiosina en *S. pombe* es una estructura compleja formada por un gran número de proteínas, entre ellas filamentos de actina y las miosinas de tipo II, Myo2 y Myp2. La proteína Cdc12 es la formina que nuclea los filamentos de actina cortos y antiparalelos que

componen el anillo. Posteriormente los filamentos son unidos y estabilizados por la tropomiosina Cdc8 (**Figura 11**). El ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina depende de dos mecanismos complementarios. Por un lado, el sitio de división se establece en la fase G2/M del ciclo celular por la proteína Mid1 que se distribuye en forma de nodos en la zona media de la célula (Sohrmann *et al.*, 1996). Además, en el ensamblaje del anillo participa la vía de señalización denominada SIN (Septation Initiation Network), implicada en la constricción del anillo y la formación del septo al final de anafase, coordinando la citocinesis con el ciclo celular (Hachet and Simanis, 2008; Krapp and Simanis, 2008).

Además de los parches y cables de actina y del anillo contráctil de actomiosina, la levadura de fisión reorganiza el citoesqueleto de actina en el proceso de conjugación, en la fase G1 del ciclo celular. En ausencia de fuente de nitrógeno, células de tipo sexual opuesto h^+ y h^- emiten proyecciones entre ellas, gracias a que polarizan su citoesqueleto de actina en respuesta a las feromonas emitidas. Una vez hecho el contacto entre la punta de las proyecciones, se produce la degradación localizada de la pared celular, lo que permite la fusión de las células. La formina Fus1 se localiza en la punta de las proyecciones, una vez las células han contactado (Petersen *et al.*, 1998a, b) y nuclea los filamentos de actina dando lugar a una estructura específica denominada “actin fusion focus” que, junto con las miosinas de tipo V, favorece la secreción de vesículas con las hidrolasas necesarias para disolver la pared en la zona de contacto (Dudin *et al.*, 2015).

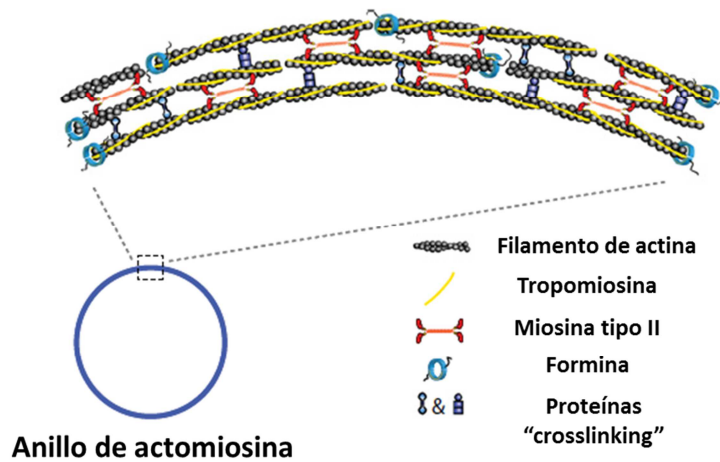


Figura 11. Esquema que ilustra un fragmento del anillo contráctil de actomiosina y de las proteínas asociadas a esta estructura de actina. Figura adaptada de (Mishra *et al.*, 2014).

2.2.3 El complejo del exocisto: secreción celular polarizada

La secreción celular o exocitosis participa, junto con la endocitosis, en el reciclado de la membrana plasmática. El proceso de exocitosis consiste en la fusión de vesículas de secreción intracelulares con la membrana plasmática y supone: el aporte de lípidos para la extensión de la membrana, el aporte de proteínas integrales de membrana a la superficie celular y la liberación de material al espacio extracelular.

La secreción polarizada permite dirigir las vesículas de secreción hacia las zonas de crecimiento activo y desempeña un papel fundamental en el establecimiento de la polaridad

celular y en el control de la morfología. Un ejemplo característico en las levaduras es la secreción polarizada de enzimas hidrolíticas en la zona de división, que es necesaria para disolver el septo primario de la pared entre las células hijas y permitir la citocinesis (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005).

Los cables de actina y las proteínas motoras, miosinas de tipo V, favorecen el transporte de las vesículas de secreción procedentes de los orgánulos intracelulares, fundamentalmente del aparato de Golgi, hacia zonas polarizadas de la membrana plasmática. El contacto inicial entre la vesícula y la membrana plasmática es mediado por el complejo proteico denominado exocisto (He and Guo, 2009). Posteriormente se produce la fusión de las membranas, gracias a la conexión entre proteínas SNAREs (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) presentes en las membranas de las vesículas (v-SNAREs) y en la membrana plasmática (t-SNAREs). Estas parejas de complejos SNARE acoplan las vesículas a la membrana receptora y, finalmente, inducen la fusión de los lípidos (Cai *et al.*, 2007; He and Guo, 2009). La interacción específica de las proteínas v-SNARE con t-SNARE permite que cada clase de vesícula se fusione en el lugar adecuado de la membrana (**Figura 12**).

El complejo del exocisto está muy conservado en los organismos eucariotas y consta de 8 subunidades: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84. En *S. pombe* todas son esenciales, salvo Exo70 (Bendezú *et al.*, 2012; Jourdain *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2002). Las proteínas del exocisto se localizan en las regiones de secreción activa, polos de crecimiento en las células en interfase y zona media en las células en citocinesis.

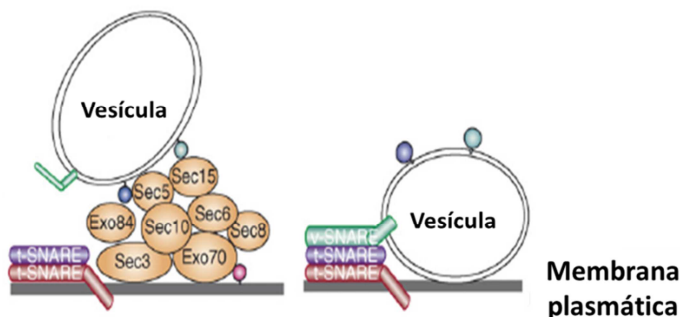


Figura 12. Esquema del complejo proteico denominado exocisto. Este complejo media la unión de vesículas de secreción con la membrana plasmática. Posteriormente se produce la fusión de las membranas gracias a la conexión entre proteínas SNAREs presentes en las membranas de las vesículas (v-SNAREs) y en la membrana plasmática (t-SNAREs). Figura adaptada de (Wu *et al.*, 2008).

En *S. pombe*, el exocisto desempeña un papel esencial tanto en la separación celular (Wang *et al.*, 2002) como en el crecimiento celular polarizado (Bendezú and Martin, 2011).

3 Las GTPasas de la familia Rho

Las proteínas de la familia Rho constituyen un subgrupo de la superfamilia de las proteínas G pequeñas o GTPasas pequeñas. Las proteínas G pequeñas están presentes en todos los organismos eucariotas y son moléculas monoméricas con una masa molecular que puede variar entre 20 y 40 kDa. Se caracterizan porque son proteínas de unión a GTP y presentan similitudes bioquímicas con la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas, cuya conformación molecular cambia dependiendo del nucleótido al que están unidas (Wennerberg *et al.*, 2005). Las proteínas G pequeñas ciclan entre una conformación inactiva,

unida a GDP, y una conformación activa, unida a GTP. En su forma activa, las proteínas G interactúan con sus proteínas efectoras que permiten transducir la señal. En su forma inactiva no interactúan con las proteínas efectoras y la señal no se transmite. Por ese motivo se han denominado “interruptores moleculares” (Vetter and Wittinghofer, 2001). La mayoría de las proteínas G pequeñas están modificadas en su extremo C-terminal por la adición de grupos isoprenoides (farnesilo o geranilgeranilo) que permiten su anclaje a lípidos y son fundamentales para la localización de estas proteínas en las membranas (Bos *et al.*, 2007).

La superfamilia de las GTPasas pequeñas se divide en cinco familias definidas por la similitud de secuencia y función de las proteínas que las forman: Ras, Rho, Rab, Arf y Ran (Wennerberg *et al.*, 2005). Todas ellas están implicadas en la transducción de señales y regulan una amplia variedad de procesos celulares como la proliferación y la diferenciación celular, la dinámica del citoesqueleto, el tráfico de membranas, el transporte núcleo-citoplasma, etc. (de Curtis and Meldolesi, 2012; Militello and Colombo, 2013).

Las GTPasas de la familia Rho están presentes en todas las células eucariotas, desde levaduras hasta mamíferos, y están involucradas principalmente en la regulación de la forma celular, la organización del citoesqueleto de actina y la migración celular (Bos *et al.*, 2007). Se han identificado al menos 22 miembros de la familia de GTPasas Rho en mamíferos, de los cuales los más estudiados son RhoA, Rac1 y Cdc42. RhoA (Ras homology member A) participa en la formación de fibras de estrés de actina y en el ensamblaje de focos de adhesión, Rac1 (Ras-related C3 Botulinum substrate 1) promueve la formación de lamelipodios y Cdc42 activa la formación de filopodios (Gonzalez-Billault *et al.*, 2012).

3.1 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 el extremo C-terminal de estas proteínas y consisten en la incorporación de grupos isoprenoides seguida de una proteólisis y metilación (Wang and Casey, 2016). Esto da lugar a un incremento de la lipofilia 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 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).

La señal de prenilación en la cisteína permite la inserción de las GTPasas en la membrana del retículo endoplasmático, desde donde las proteínas Rho pueden ser distribuidas, a través de la vía secretora, hacia la membrana plasmática (Choy *et al.*, 1999).

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 llevan una serie de aminoácidos básicos en el extremo C-terminal que facilitan su anclaje a la membrana.

3.2 Regulación de las proteínas Rho

En general, las GTPasas pequeñas muestran una alta afinidad de unión tanto por el GDP como por el GTP. En consecuencia, una vez hidrolizado el GTP, la velocidad de disociación del nucleótido unido es muy lenta y el intercambio del GDP por el GTP se produce de manera poco eficiente, aunque la concentración de GTP en la célula es mayor. Por otro lado, la actividad GTPásica intrínseca de algunas proteínas G pequeñas es muy lenta. Para que las proteínas G pequeñas ciclen y realicen correctamente sus funciones, existen proteínas que regulan su activación e inactivación. Las proteínas activadoras se denominan GEFs (Guanine Nucleotide Exchange Factors) y las proteínas inactivadoras se denominan GAPs (GTPase Activating Proteins) y GDIs (GDP Dissociation Inhibitors) (Bos *et al.*, 2007; Vetter and Wittinghofer, 2001) (Figura 13).

GEFs y GAPs son, generalmente, proteínas con múltiples dominios que les permiten unirse a otras proteínas o a membranas. Por ello, además de cambiar el estado de activación de las GTPasas, las proteínas GEFs y GAPs contribuyen a regular su localización y sirven como proteínas andamio que permiten la formación de complejos proteicos (Bos *et al.*, 2007).

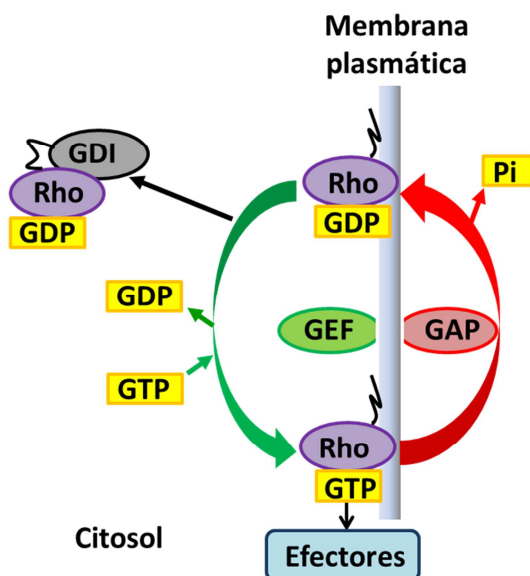


Figura 13. Regulación de las proteínas Rho. Las proteínas con actividad GEF favorecen el intercambio de GDP por GTP y activan a las proteínas Rho, permitiendo la unión a sus efectores. Las proteínas con actividad GAP inactivan a las proteínas Rho estimulando la actividad GTPásica intrínseca de estas proteínas. Las proteínas GDI sacan a las GTPasas de la membrana plasmática y las mantienen en su estado inactivo en el citosol celular.

El número de proteínas GEFs y GAPs es mayor que el de GTPasas, de modo que una única GTPasa puede ser regulada por más de una proteína GEF o por más de una proteína GAP y, además, los factores GEFs y GAPs pueden regular a más de una GTPasa (Bos *et al.*, 2007). Esta promiscuidad permite que funciones específicas de una misma GTPasa sean reguladas por diferentes proteínas GAPs y GEFs.

3.2.1 Las proteínas GEF

Las proteínas GEFs son reguladoras positivas que activan a las GTPasas. Interaccionan con la forma unida a GDP de la GTPasa y provocan la disociación del nucleótido que, posteriormente, es sustituido por GTP.

Las proteínas GEFs modifican el sitio catalítico de la GTPasa y así disminuyen la afinidad de unión del nucleótido, el cual se libera y se sustituye por otro. En las GTPasas Rho el sitio de unión de nucleótidos de guanina consta de las regiones denominadas switch I, switch II y P-loop, la región de unión al fosfato. Estas regiones interaccionan con los fosfatos del nucleótido y con un ión magnesio, permitiendo que la unión entre el nucleótido y la GTPasa sea de alta afinidad (Vetter and Wittinghofer, 2001) (Figura 14). La unión de la proteína GEF a la GTPasa Rho induce cambios conformacionales en las regiones switch y en el P-loop que bloquean el sitio de unión a magnesio. Esto hace que la interacción con los fosfatos se debilite y facilita la liberación del 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 el citoplasma de 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).

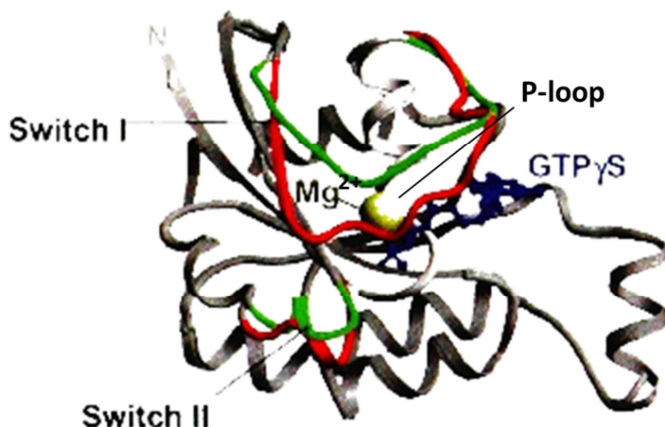


Figura 14. Representación tridimensional del sitio catalítico de las GTPasas Rho. En las GTPasas Rho el sitio de unión de nucleótidos de guanina consta de las regiones denominadas switch I, switch II y del P-loop. Estas regiones interaccionan con los fosfatos del nucleótido y con un ión magnesio, permitiendo que la unión entre el nucleótido y la GTPasa sea de alta afinidad. Imagen adaptada de (Hakoshima *et al.*, 2003).

Los mecanismos que regulan la actividad y la localización de las proteínas GEFs se basan en la inhibición intramolecular, la unión a lípidos, las interacciones proteína-proteína o las fosforilaciones (Bos *et al.*, 2007).

3.2.2 Las proteínas GDI

Las proteínas GDI actúan principalmente sobre proteínas G de la familia Rho y Rab (Bos *et al.*, 2007). Estas proteínas se caracterizaron inicialmente como reguladores negativos de las GTPasas pero su función es más compleja. Las proteínas GDI inhiben la disociación del GDP de las GTPasas y evitan su activación por los reguladores GEFs, pero también bloquean la actividad GTPasa intrínseca, estimulada por las proteínas GAPs. Todo esto se debe a que las proteínas GDI extraen a las GTPasas de las membranas enmascarando su grupo isoprenoide (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Garcia-Mata *et al.*, 2011). De este modo, las mantienen

limita la libertad de la molécula de agua y puede así reducir la barrera energética para la hidrólisis del GTP (Bos *et al.*, 2007; Moon and Zheng, 2003) (Figura 16).

La actividad de las proteínas RhoGAP debe ser finamente regulada en el espacio y en el tiempo para que las proteínas Rho no estén continuamente inactivas. Entre los mecanismos que regulan la actividad y la localización de las proteínas RhoGAP se encuentran: la unión a lípidos, las interacciones proteína-proteína, la fosforilación y la degradación proteolítica. También se ha descrito que la actividad de las proteínas RhoGAP puede regularse mediante inhibiciones intramoleculares que se liberan gracias a la unión a otras proteínas (Bos *et al.*, 2007; Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007).

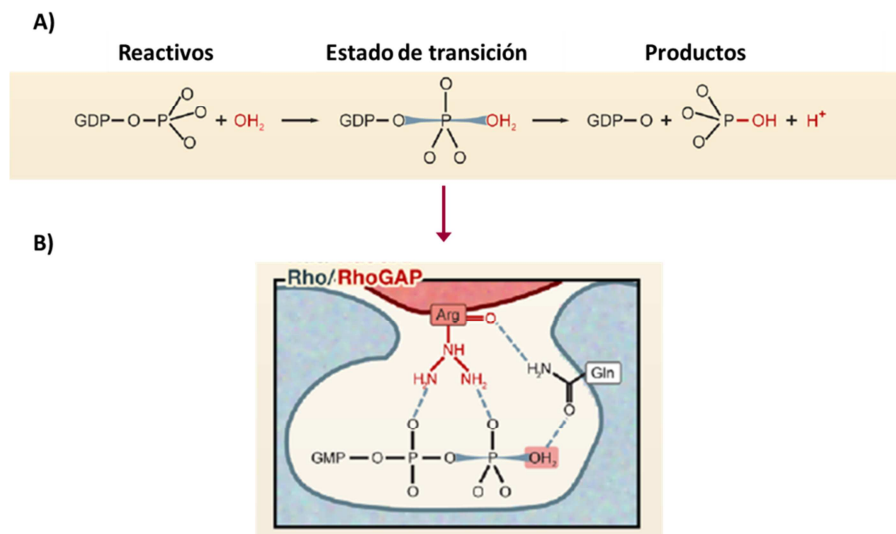


Figura 16. Mecanismo de acción de las RhoGAPs. A) Mecanismo de hidrólisis del GTP: una molécula de agua realiza un ataque nucleofílico al fosfato y del GTP. B) La Arginina catalítica de la proteína RhoGAP contribuye a estabilizar el estado de transición de la reacción de hidrólisis del GTP. Además esta Arginina interacciona con la Glutamina de la GTPasa Rho, permitiendo la orientación correcta de la molécula de agua que realiza el ataque nucleofílico. Figura adaptada de (Bos *et al.*, 2007).

4 Las GTPasas de la familia Rho en *S. pombe*

En *S. pombe*, las GTPasas de la familia Rho son reguladoras esenciales de las vías de señalización implicadas en los procesos de morfogénesis y polaridad celular. En la levadura de fisión el crecimiento está íntimamente relacionado con el dinamismo de su pared celular. Para permitir la expansión de la célula es necesario que la pared se debilite por enzimas hidrolíticas, aporte de nueva membrana plasmática en la superficie celular y síntesis de nueva pared celular por enzimas biosintéticas. Para que el crecimiento sea polarizado, la ruta secretora debe aportar esas enzimas y membranas en puntos discretos de crecimiento de la superficie celular. En *S. pombe*, las GTPasas Rho proporcionan la regulación coordinada de las enzimas biosintéticas o líticas de la pared celular y la organización de la actina necesaria para mantener la integridad y la viabilidad celular durante el crecimiento vegetativo (Cabib *et al.*, 1998; Pérez and Rincón, 2010; Pruyne and Bretscher, 2000). El genoma de la levadura de fisión codifica seis GTPasas de la familia Rho, Rho1 a Rho5 y Cdc42, de las cuales, sólo las GTPasas Rho1 y Cdc42 son esenciales (Pérez and Rincón, 2010).

4.1 Rho1 y Rho2: Biosíntesis de la pared celular y ruta MAPK de integridad celular

Las GTPasas Rho1 y Rho2 se localizan en los sitios de crecimiento polarizado (Arellano *et al.*, 1997; Hirata *et al.*, 1998), son proteínas esenciales en la biosíntesis de la pared celular de *S. pombe* y participan en la regulación de la ruta MAPK de integridad celular.

La pared celular de *S. pombe* es una estructura esencial compuesta fundamentalmente por polisacáridos, de los que el β -glucano y el α -glucano son mayoritarios, y por manoproteínas, cuyo componente glucídico es el galactomanano que representa del 9 al 14% del total de los azúcares de la pared (Figura 17). El β -glucano constituye el 50-54% del contenido total de la pared y es el responsable de la fuerza mecánica y del mantenimiento morfológico de la célula (Ishiguro, 1998). En la pared de *S. pombe* el β -glucano está presente en forma de: β -(1,3)-glucano con ramificaciones β -(1,6), el componente más abundante de la pared, β -(1,3)-glucano lineal, presente principalmente en el septo primario y en menor cantidad en la pared celular y β -(1,6)-glucano muy ramificado que es un componente minoritario de la pared. El α -glucano representa el 28% de la pared y es un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,3), con una pequeña proporción de enlaces α -(1-4) (Durán and Pérez, 2004). Durante la septación, el β -(1,3)-glucano lineal forma el septo primario (Cortés *et al.*, 2005) y tanto el β -glucano ramificado como el α -glucano intervienen en la síntesis del septo secundario y en la formación correcta del septo primario (Cortés *et al.*, 2012; Muñoz *et al.*, 2013).

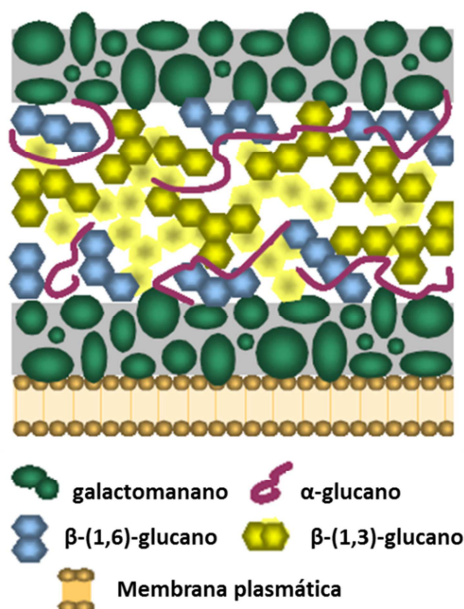


Figura 17. Representación esquemática de la pared celular de *S. pombe*. Esquema que ilustra los polisacáridos de la pared celular de *S. pombe*: el α -glucano, el β -glucano, presente en formas con enlaces distintos y el galactomanano que forma parte de las glicoproteínas de esta estructura celular.

La enzima responsable de la biosíntesis del β -(1,3)-glucano de la pared es la β -(1,3)-glucán sintasa, formada por una subunidad catalítica y una reguladora. La GTPasa Rho1 es la subunidad reguladora de la enzima β -(1,3)-glucán sintasa, participando así en la síntesis directa del β -(1,3)-glucano de la pared celular (Arellano *et al.*, 1996). Rho1-GTP también interacciona con las proteínas quinasas Pck1 y Pck2, de la familia PKC (Protein Kinase C) (Arellano *et al.*, 1999) y es capaz de activar indirectamente la síntesis de pared celular a través de ellas.

Además, la GTPasa Rho1 es necesaria para el mantenimiento de la integridad celular y la polarización del citoesqueleto de actina (Arellano *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997).

La principal enzima responsable de la biosíntesis del α -glucano es la α -glucán sintasa, denominada Ags1 o Mok1. Esta proteína se localiza en los polos de crecimiento y en el septo y su localización es dependiente de actina (Katayama *et al.*, 1999). La GTPasa Rho2, junto con la GTPasa Rho1, regula la síntesis del α -glucano de la pared celular mediante la proteína quinasa Pck2 (Calonge *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 1998). Al igual que Rho1, Rho2 interacciona con Pck1 y con Pck2 (Arellano *et al.*, 1999). Sin embargo, sólo Pck2 se ha descrito como proteína transmisora de la señal de Rho2, cuando actúa como un regulador positivo de la α -glucán sintasa Mok1 (Calonge *et al.*, 2000).

Rho2, a través de Pck2, activa también la ruta de MAPK de mantenimiento de la integridad celular (Ma *et al.*, 2006). Esta cascada de señalización está formada por las quinasas Mkh1 - Pek1 - Pmk1 y está implicada en procesos muy diversos como la biosíntesis de pared celular, la citocinesis, la homeostasis iónica o la fusión de vacuolas (Pérez and Cansado, 2010).

A diferencia de Rho2, Rho1 mantiene una relación aparentemente antagónica con la ruta MAPK de integridad. Así, la pérdida de función de Rho1 causa un aumento de la actividad basal de la MAPK Pmk1, que es dependiente de Rho2 y de Pck2 y es perjudicial para las células (Viana *et al.*, 2013). Sin embargo, en determinadas circunstancias Rho1 puede también activar la ruta MAPK de integridad directamente a través de Pck1 y Pck2 (García *et al.*, 2009b; Sánchez-Mir *et al.*, 2014).

Las funciones de las GTPasas Rho1 y Rho2 están reguladas por diferentes proteínas GEFs y GAPs. Tres proteínas GEFs han sido descritas para la GTPasa Rho1: Rgf1, Rgf2 y Rgf3. Rgf1 activa la síntesis de pared celular y también está implicada en la reorganización de la actina durante el proceso de NETO (García *et al.*, 2006). Esta proteína GEF también regula la ruta de MAPKs de integridad celular (García *et al.*, 2009b). Además, Rgf1 se acumula en el núcleo de forma dependiente del *checkpoint* de replicación de ADN y es importante para la tolerancia al estrés replicativo (Muñoz *et al.*, 2014a). Rgf2 es esencial en esporulación y coopera con Rgf1 en la regulación de la biosíntesis de la pared (Cruz *et al.*, 2013; García *et al.*, 2009a). Rgf3 activa a Rho1 específicamente durante la citocinesis (Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004). También se ha descrito otra proteína GEF, Gef2, que participa en la selección del sitio de división y en la citocinesis, e interacciona tanto con Rho1 como con las GTPasas Rho4 y Rho5, pero se desconoce a que GTPasa regula (Zhu *et al.*, 2013).

Las proteínas GAPs descritas para Rho1 son: Rga1, Rga5 y Rga8. Rga1 es el principal regulador negativo de Rho1 (Nakano *et al.*, 2001). Rga5 tiene funciones en integridad celular y en citocinesis (Calonge *et al.*, 2003). Rga8 tiene actividad GAP *in vivo* frente a Rho1, pero su papel regulador de esta GTPasa es una incógnita. Rga8 es fosforilada por Shk1, una proteína efectora de Cdc42, por lo que esta proteína GAP podría participar en la comunicación entre las dos GTPasas esenciales de la familia Rho, Rho1 y Cdc42 (Yang *et al.*, 2003).

Rho1 además interacciona con Rdi1, la única proteína GDI de *S. pombe*, que también se une a Rho4 y a Cdc42, aunque se desconocen los procesos celulares en los que participa (Nakano *et al.*, 2003).

Los reguladores negativos descritos para la GTPasa Rho2 son Rga2, Rga4 y Rga7 (Martín-García *et al.*, 2014; Soto *et al.*, 2010; Villar-Tajadura *et al.*, 2008). Las tres proteínas GAPs regulan negativamente a Rho2 en la activación de la ruta de MAPK de integridad. Rga2 además regula negativamente a Rho2 en la biosíntesis de la pared celular (Villar-Tajadura *et al.*, 2008). Aún no se ha descrito ninguna proteína GEF para Rho2.

4.2 Rho3 y Rho4: secreción celular y degradación del septo durante la citocinesis

Las GTPasas Rho3 y Rho4 de *S. pombe* no son esenciales y ambas participan en el estadio final de la citocinesis. Regulan la secreción polarizada de enzimas hidrolíticas que digieren el septo primario para liberar a las dos células hijas (Santos *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2003).

Rho3 se localiza en toda la membrana plasmática y está concentrada en las regiones de crecimiento y de división (Nakano *et al.*, 2002). También se ha descrito que interacciona con la formina For3 (Nakano *et al.*, 2002). El gen *rho3⁺* se identificó como un supresor multicopia del mutante termosensible del exocisto *sec8-1* y existe interacción genética negativa de la delección de Rho3 y las cepas mutantes *sec8-1* y *exo70Δ* (Wang *et al.*, 2003). Esta GTPasa regula la función del exocisto y parece desempeñar un papel general en la secreción, no sólo durante la citocinesis. Así, se ha descrito también interacción genética de *rho3⁺* con *pob1⁺* (Nakano *et al.*, 2011) que codifica la proteína adaptadora necesaria para que Cdc42 interaccione con la formina For3 (Rincón *et al.*, 2009). Además, la sobreexpresión tanto de Pob1 como de la GTPasa Rho3 es capaz de suprimir la termosensibilidad de una cepa mutante de Cdc42 con problemas de tráfico de membranas (Estravís *et al.*, 2011).

Rho4 es la única GTPasa Rho localizada exclusivamente en la zona de división y regula la secreción de las enzimas hidrolíticas Eng1 y Agn1 (Santos *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2005), que son las glucanasas responsables de la degradación del septo en el proceso de citocinesis (García *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). La localización correcta de Agn1 y Eng1 en la zona del septo requiere la presencia de las septinas y del exocisto (Martín-Cuadrado *et al.*, 2005). Las septinas son una familia de proteínas de unión a GTP, conservadas en los eucariotas, que forman un anillo en la zona de división y participan en el proceso de citocinesis (Longtine *et al.*, 1996). Rho4, además, interacciona con el exocisto y con las septinas y es necesaria para su localización correcta (Pérez *et al.*, 2015). Además de participar en el proceso de citocinesis, la GTPasa Rho4 está involucrada en el control de la morfología celular mediante la regulación del citoesqueleto de actina y de los microtúbulos citoplásmicos (Nakano *et al.*, 2003).

Las funciones de Rho4 en el proceso de citocinesis son reguladas por la proteína GEF denominada Gef3 (Wang *et al.*, 2015). Esta proteína también interacciona en la zona de división con la forma unida a GTP de la GTPasa Rho3 (Muñoz *et al.*, 2014b). Existe otra proteína GEF que interacciona con Rho4 en la zona de división, Gef2, la cual también interacciona con Rho1 y Rho5 (Zhu *et al.*, 2013) pero su actividad sobre Rho4 no se ha demostrado. Como posibles proteínas reguladoras negativas de Rho4 se han descrito la proteína GAP Rga9 y el único GDI de *S. pombe*, Rdi1, que también se une a Rho1 y Cdc42 (Nakano *et al.*, 2003).

4.3 Rho5

En *S. pombe* Rho5 es una GTPasa no esencial, muy similar a Rho1 (86% de identidad). De hecho, la sobreexpresión de *rho5*⁺ rescata la letalidad de la delección de Rho1, lo que sugiere que, en estas condiciones, puede llegar a realizar las funciones de Rho1 (Nakano *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2006). Rho5 se expresa en fase estacionaria y en condiciones de falta de nutrientes y participa en la formación de la pared de la espora, en el proceso de esporulación (Rincón *et al.*, 2006). La delección de Rho4 y Rho5 en las células produce el denominado fenotipo “vic” (viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion) y defectos en la integridad de la pared celular. Este fenotipo es característico de cepas mutantes en los componentes de la ruta MAPK de integridad celular (Ma *et al.*, 2006). Ello podría sugerir un posible papel de Rho4 y Rho5 en esta vía de señalización (Doi *et al.*, 2015). No se ha descrito ningún regulador específico para Rho5 pero, como ya mencionamos, se ha demostrado que Gef2 interacciona con esta GTPasa, por lo que podría estar implicada en su regulación (Zhu *et al.*, 2013).

5 La GTPasa Cdc42 en las levaduras: control del crecimiento celular polarizado

La GTPasa Cdc42 es un regulador fundamental de la polaridad celular en todos los organismos eucariotas (Etienne-Manneville, 2004). El gen codificante de Cdc42 fue identificado por primera vez en *Saccharomyces cerevisiae* como uno de los genes reguladores del ciclo de división celular, de ahí su nombre (*cell division cycle*) (Adams *et al.*, 1990). Posteriormente, se identificó Cdc42 en cerebro de oveja y en placenta humana. En la especie humana existen 2 isoformas de Cdc42: HsCdc42 y G25K, presente sólo en cerebro. Ambas proteínas son productos del mismo gen, obtenidos por procesamiento alternativo de los transcritos (Munemitsu *et al.*, 1990). Las proteínas Cdc42 están muy conservadas en los distintos organismos eucariotas, llegando a existir un 75% de identidad entre Cdc42 de *S. cerevisiae* y de *Homo sapiens* (Johnson, 1999). El estudio de la estructura cristalográfica de Cdc42 humano, junto con la información obtenida de las mutaciones caracterizadas en diversos organismos, ha permitido definir los dominios funcionales de la proteína, ayudando a entender el funcionamiento de las interacciones de Cdc42 con sus múltiples reguladores y efectores.

5.1 Cdc42 en *S. cerevisiae*

Cdc42 es la GTPasa que participa en el control del crecimiento celular polarizado de la levadura de gemación. La activación local de Cdc42 en el sitio de gemación promueve la polimerización del citoesqueleto de actina y dirige la secreción hacia el sitio de crecimiento (Figura 18).

Las células de *S. cerevisiae* tienen una forma ovalada y se dividen por gemación mediante la formación de una única yema por ciclo celular. En la fase G1 temprana del ciclo celular, la yema crece de manera apical hasta alcanzar un tamaño crítico. En G2, este patrón de crecimiento apical cambia a un patrón de crecimiento isotrópico, en el cual, el crecimiento

de la yema tiene lugar por toda su superficie y se redondea. Tras la mitosis, cuando los núcleos se han separado, se forma un septo entre la madre y la célula hija, separándolas físicamente. Posteriormente el septo se degrada y las dos células se separan, dejando en la célula madre una cicatriz de gemación. En las células haploides la nueva yema se genera adyacente a la anterior zona de gemación. Este patrón de gemación se denomina axial. En las levaduras de gemación diploides las yemas se producen alternando los polos de la célula, siguiendo un patrón de gemación denominado bipolar (Pruyne and Bretscher, 2000).

En el patrón de gemación axial, las septinas de la célula actúan como una señal intracelular transitoria que marca el nuevo sitio de gemación. Las proteínas Axl1, Axl2, Bud3 y Bud4 se localizan con las septinas y actúan como proteínas marcadoras de polaridad, indicando el sitio en el que se va a establecer el crecimiento polarizado de la nueva yema. Posteriormente, el sitio de gemación es reconocido por la GTPasa de la familia Ras, Rsr1/Bud1, regulada por su proteína GEF, Bud5, y su proteína GAP, Bud2 (Bender and Pringle, 1989; Chant *et al.*, 1995; Drubin and Nelson, 1996). La localización de Bud5 en el anillo de septinas depende de las proteínas Axl2, Bud3 y Bud4 y de las propias septinas (Kang *et al.*, 2001; Marston *et al.*, 2001). De este modo, se establece un nexo entre las proteínas marcadoras de polaridad y las GTPasas que participan en el establecimiento de la polaridad celular (Wu *et al.*, 2013).

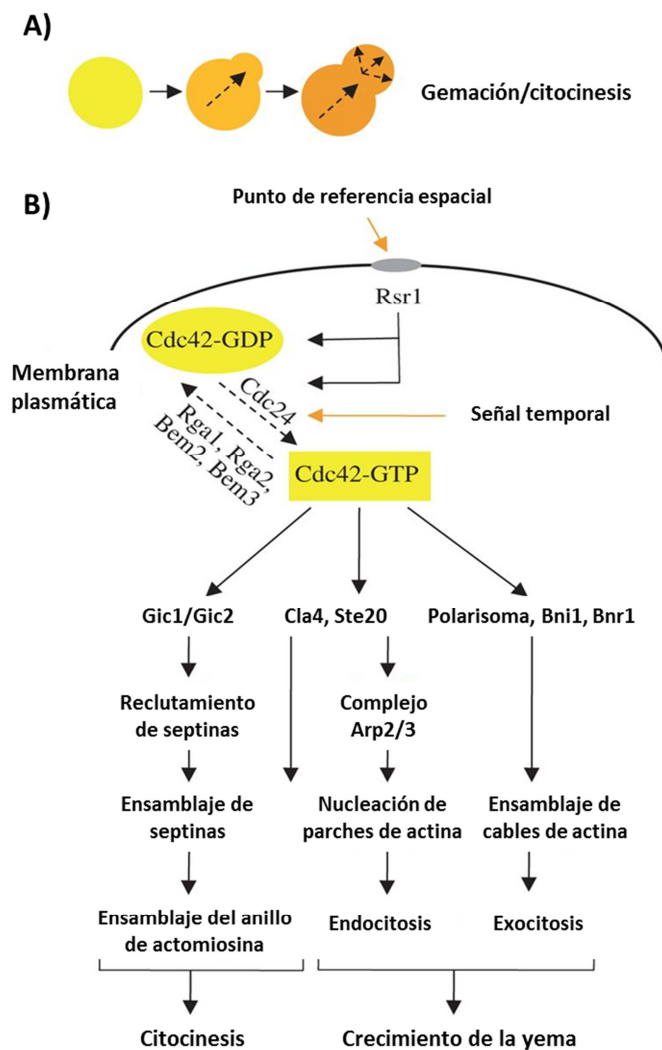


Figura 18. Proteínas efectoras y reguladoras de la GTPasa Cdc42 en *S. cerevisiae*. **A)** Las células de *S. cerevisiae* se dividen por gemación mediante la formación de una yema, que al comienzo del ciclo celular crece de manera apical y posteriormente, en G2, adquiere un patrón de crecimiento isotrópico. Tras la mitosis, se forma un septo entre la madre y la célula hija. Posteriormente el septo se degrada y las dos células se separan dejando en la célula madre una cicatriz de gemación. **B)** La GTPasa Rsr1 reconoce el nuevo sitio de gemación, señalado por proteínas marcadoras de polaridad. Rsr1 en su forma activa interacciona con Cdc24, la proteína GEF de Cdc42. La GTPasa Cdc42 activada localmente coordina el crecimiento polarizado mediante la señalización a sus proteínas efectoras, relacionadas con el citoesqueleto de actina, con la exocitosis y con la organización del anillo de septinas en el cuello de gemación. Las proteínas GAPs Rga1, Rga2, Bem2 y Bem3 regulan la inactivación de la GTPasa Cdc42. Figura adaptada de (Styles *et al.*, 2013).

El módulo de activación de Cdc42 se origina a partir de la GTPasa Rsr1. Rsr1 en su forma activa interacciona con Cdc24, la proteína GEF de Cdc42. En el proceso de activación de Cdc42 también participa Bem1, una proteína adaptadora que se localiza con Cdc24 y Cdc42 en los puntos de crecimiento. Bem1 se une tanto a Rsr1 como a Cdc24 y contribuye así a la formación del complejo proteico (Adams *et al.*, 1990; Bender and Pringle, 1989; Drubin and Nelson, 1996; Pruyne and Bretscher, 2000; Zheng *et al.*, 1995). Recientemente se ha propuesto que la proteína marcadora de polaridad Bud3 también actúa como un factor regulador GEF de Cdc42. Bud3, junto con Rsr1, permitiría la activación inicial de la GTPasa Cdc42 en la fase G1 temprana del ciclo celular. Puesto que el único GEF, Cdc24, es esencial para la viabilidad, la activación realizada por Bud3 no sería suficiente para promover el crecimiento de la yema, siendo necesaria la posterior activación de Cdc42 por Cdc24 (Kang *et al.*, 2014). En un trabajo reciente se ha demostrado que la proteína GAP de Cdc42 denominada Rga1, que afecta al patrón de gemación axial (Tong *et al.*, 2007), presenta una localización fluctuante durante la citocinesis y en G1. Rga1 se localiza en el cuello de gemación y en una zona adyacente de la célula madre durante citocinesis y esta segunda localización es importante para prevenir la regemación en el mismo sitio de división (Lee *et al.*, 2015). En las células hijas, la localización de Rga1 en el cuello de gemación es transitoria y esta localización hace que los niveles de Cdc42-GTP fluctúen en torno al anillo de septinas, hasta que finalmente se estabilizan hacia la mitad de G1 (Lee *et al.*, 2015). Un modelo matemático propuesto en este trabajo sugiere que el eje correcto de polarización de Cdc42-GTP se establece a través de un mecanismo bifásico que implica secuencialmente un “feedback” positivo y un “feedback” negativo transitorio.

Incluso en ausencia de un módulo funcional basado en la GTPasa Rsr1, la GTPasa Cdc42 es capaz de romper la simetría celular y producir una polarización espontánea del crecimiento, de manera dependiente de Bem1 (Iraoqui *et al.*, 2003). La proteína adaptadora Bem1 parece ser capaz de formar un complejo proteico con la proteína GEF Cdc24, la GTPasa Cdc42 y la quinasa Cla4. Este complejo permite una acumulación puntual de Cdc42 activa en un sitio aleatorio suficiente para romper la simetría y promover crecimiento polarizado (Kozubowski *et al.*, 2008). Las células carentes de Rsr1 y de Bem1 son incapaces de formar yemas, se hacen multinucleadas e inviables (Woods *et al.*, 2015).

La GTPasa Cdc42, activada localmente, coordina el crecimiento polarizado mediante la señalización a sus proteínas efectoras: las quinasas PAK (p21-Activated Kinases) Cla4 y Ste20, la formina Bni1, las proteínas Gic1 y Gic2 y las subunidades del exocisto Sec3 y Exo70. Estas proteínas están relacionadas con el citoesqueleto de actina, con la exocitosis y con la organización del anillo de septinas en el cuello de gemación. De este modo, Cdc42 controla la formación de cables de actina orientados que dirigen el transporte de vesículas y orgánulos hacia el sitio de crecimiento, el ensamblaje del anillo de septinas que define el cuello de gemación y la fusión de las vesículas de exocitosis en el sitio de gemación (Drubin and Nelson, 1996; Park and Bi, 2007).

Las proteínas Ste20 y Cla4 son serina/treonina quinasas de la familia PAK que señalizan al citoesqueleto de actina. Cdc42 interacciona con el dominio CRIB (Cdc42/Rac Interacting Binding) de Ste20, liberando la interacción intramolecular responsable de su estado autoinhibido (Lamson *et al.*, 2002). Cdc42 además regula la localización de Ste20 en los puntos de crecimiento (Leberer *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1996). En el caso de la proteína Cla4, su

actividad quinasa está regulada por el ciclo celular y por su unión a Cdc42 (Benton *et al.*, 1997). Ste20 y Cla4 fosforilan y activan a las miosinas de clase I, Myo3 y Myo5, del citoesqueleto (Wu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997). Estas miosinas, junto con la proteína WASP Bee1/Las17 y la proteína Vrp1, participan en la activación del complejo Arp2/3 que nuclea los filamentos de los parches de actina involucrados en el proceso de endocitosis (Lechler *et al.*, 2001; Mishra *et al.*, 2014). La quinasa Cla4 participa además en la organización del anillo de septinas en el cuello de gemación (Cvrcková *et al.*, 1995; Versele and Thorner, 2004).

En *S. cerevisiae* hay dos forminas, Bni1 y Bnr1, que nuclean los filamentos de los cables de actina. Bni1 nuclea los cables desde el polo de la yema y Bnr1 ensambla los cables de actina hacia el cuello de gemación (Moseley and Goode, 2006). En la levadura de gemación las GTPasas Rho1, Rho3 y Rho4 también son activadoras de las forminas. Cdc42 parece tener un papel principal polarizando los cables de actina como activador de las forminas durante el crecimiento apical de la yema en G1 (Dong *et al.*, 2003; Howell and Lew, 2012).

La formina Bni1 forma parte del complejo proteico denominado polarisoma, formado por las proteínas Sph1, Spa2, Pea2 y Bud6. El polarisoma parece actuar como un adaptador entre la señalización de las GTPasas Rho y el ensamblaje de los filamentos de actina, contribuyendo a la organización apical del citoesqueleto de actina (Pruyne and Bretscher, 2000). Bni1 a su vez es necesaria para el reclutamiento al sitio de polarización de la proteína WASP Bee1, activadora del complejo Arp2/3. De modo que, Cdc42 regula la activación del complejo Arp2/3 tanto a través de las quinasas PAKs como mediante la formina Bni1 (Lechler *et al.*, 2001).

Las proteínas efectoras de Cdc42 Gic1 y Gic2 también poseen un dominio CRIB (Brown *et al.*, 1997). Gic y Gic2 se localizan en el sitio de gemación, en el polo de la yema, y participan en el reclutamiento de las septinas hacia el cuello de gemación de la célula madre (Brown *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997; Iwase *et al.*, 2006). Gic2 funciona también como adaptador favoreciendo la interacción de Cdc42 con Bni1 y la activación de esta formina (Chen *et al.*, 2012).

Cdc42 participa en la regulación de la exocitosis polarizada, de manera independiente a su función en la organización de los cables de actina, regulando directamente algunos componentes del exocisto como Sec3 y Exo70 (Wu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008).

Las proteínas GAPs de Cdc42 en *S. cerevisiae* son Rga1, Rga2, Bem2 y Bem3. Bem2 es también GAP de Rho1 y parece contribuir a la activación localizada de Cdc42 en un único sitio (Knaus *et al.*, 2007). Como ya mencionamos, Rga1 establece una zona de exclusión en el sitio de división que bloquea el crecimiento subsecuente de una yema en ese sitio (Tong *et al.*, 2007). Bem3 participa en la regulación del tráfico de membranas y es necesaria para dirigir efectivamente las vesículas secretoras a las zonas de crecimiento polarizado (Mukherjee *et al.*, 2013). Rga2, Bem2 y Bem3 son fosforiladas durante la emergencia de la yema en G1 por la CDK Cdk1 y esta fosforilación reduce su actividad GAP (Knaus *et al.*, 2007; Sopko *et al.*, 2007).

S. cerevisiae tiene una proteína reguladora GDI de Cdc42, Rdi1, que se localiza en el citoplasma, en el polo de las yemas pequeñas y en el cuello de gemación de la célula madre

(Park and Bi, 2007). Rdi1 puede extraer a Cdc42 de las membranas internas y de la membrana plasmática, lo que constituye una vía de reciclaje rápida de la GTPasa que contribuye a modular su distribución en el sitio de gemación. Otro mecanismo de reciclaje de Cdc42 está ligado al tráfico de vesículas que se deriva de la función de esta GTPasa y permite una vía de reciclado más lenta (Slaughter *et al.*, 2009). A su vez, las vesículas de secreción transportadas por los cables de actina polarizados por Cdc42 podrían contribuir al enriquecimiento de la GTPasa en las zonas de crecimiento (Wedlich-Soldner *et al.*, 2003).

En respuesta a las feromonas, las células detienen su ciclo celular en la fase G1. Se produce la formación de una proyección llamada “shmoo” y tiene lugar el proceso de conjugación (Casamayor and Snyder, 2002). El crecimiento polarizado que tiene lugar en los procesos de gemación y de conjugación, se establece mediante la activación localizada en la membrana plasmática de la GTPasa esencial Cdc42 y las funciones de sus proteínas efectoras. En el proceso de conjugación, la asimetría celular se establece en respuesta a las feromonas y el sitio de polarización es reconocido por receptores de feromonas, asociados a proteínas G heterotrómicas (GPCRs, G-protein-coupled receptors). Posteriormente la proteína adaptadora Bem1, Cdc24, Cdc42 y su proteína efectora Ste20 participan en la señalización que produce el crecimiento de la proyección celular (Drubin and Nelson, 1996; Park and Bi, 2007). Promueven la activación de la vía MAPK de conjugación y la transcripción de una amplia variedad de genes necesarios para llevar a cabo el proceso de conjugación y la meiosis (Pérez and Rincón, 2010). Cla4 también podría tener una función en conjugación como regulador negativo de la cascada de MAPKs de conjugación (Heinrich *et al.*, 2007).

5.2 Cdc42 en *S. pombe*

Al igual que en la levadura de gemación, en la levadura de fisión Cdc42 es una GTPasa esencial que participa en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular (Miller and Johnson, 1994; Pérez and Rincón, 2010). La secreción polarizada mediada por los cables de actina, junto con la unión de las vesículas con la membrana plasmática mediada por el exocisto, constituyen dos procesos complementarios y necesarios para la morfología celular. La GTPasa Cdc42 participa en la regulación de ambos procesos (Bendezú and Martin, 2011).

En *S. pombe*, la GTPasa Cdc42 se localiza en las membranas internas y en la membrana plasmática, estando más concentrada en los polos y en el septo (Bendezú *et al.*, 2015; Estravís *et al.*, 2011; Merla and Johnson, 2000). El control espacial de la activación de la GTPasa Cdc42 determina la morfología celular de la levadura de fisión (Kelly and Nurse, 2011) (**Figura 19**). Ese control espacial viene dado por las proteínas reguladoras GEFs y GAP de Cdc42. En *S. pombe* las dos proteínas reguladoras GEFs de la GTPasa Cdc42 son Scd1 y Gef1 (Coll *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 1994; Hirota *et al.*, 2003). Hasta la realización de esta tesis sólo se había descrito una proteína con actividad GAP sobre Cdc42, la proteína Rga4 (Tatebe *et al.*, 2008). Scd1 y Gef1 se localizan en las zonas de crecimiento, los polos y el septo, donde la GTPasa Cdc42 está activa. La delección conjunta de Gef1 y Scd1 es letal, lo que indica que estas proteínas regulan a la GTPasa Cdc42 en funciones esenciales (Coll *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003). La proteína Rga4 se localiza en los laterales de la célula, zonas sin crecimiento celular, donde la GTPasa Cdc42 está inactiva (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008).

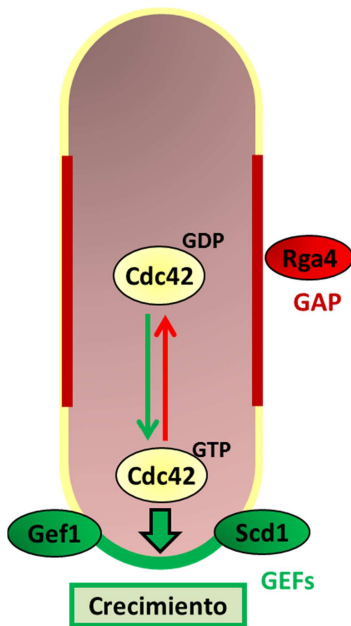


Figura 19. El control espacial de la activación de Cdc42 determina la morfología celular de *S. pombe*. La GTPasa Cdc42 se localiza en las membranas internas y en la membrana plasmática (línea amarilla). Las proteínas GEFs, Gef1 y Scd1, regulan la activación localizada de Cdc42 en las zonas de crecimiento (línea verde). La proteína GAP Rga4 mantiene a la GTPasa Cdc42 inactiva en las zonas sin crecimiento (línea roja).

En ausencia de *scd1*⁺ las células muestran una morfología esférica y son incapaces de conjugarse (*Scd*: *S*hape and *C*onjugation *D*eficiency) (Chang *et al.*, 1994; Fukui and Yamamoto, 1988). *Scd1* parece, por tanto, desempeñar un papel destacado en el control de la morfología celular y desempeña esta función de manera aditiva con la proteína GAP Rga4 (Kelly and Nurse, 2011). La función de la proteína Gef1 parece estar relacionada con la citocinesis y con el proceso de NETO ya que, en su ausencia, las células presentan defectos en la formación del septo y en la transición a crecimiento bipolar (Coll *et al.*, 2003). La proteína de la familia BAR Hob3 participa como proteína adaptadora de Gef1 y Cdc42 en el proceso de citocinesis y contribuye a la activación localizada de Cdc42 en la zona de división (Coll *et al.*, 2007). Recientemente se ha propuesto que la activación de Cdc42 por sus proteínas GEFs en la zona de división está regulada temporalmente, dependiendo de Gef1 en los momentos iniciales de la citocinesis y posteriormente de *Scd1* para la formación del septo (Wei *et al.*, 2016).

La proteína reguladora GAP de Cdc42, Rga4, se localiza en los laterales de la célula, en la zona de división y está excluida de los polos celulares. La delección de *rga4*⁺ da lugar a células más anchas y más cortas que una cepa silvestre, lo cual sugiere que Rga4 contribuye a restringir la actividad de Cdc42 a los polos celulares. Además, en ausencia de *rga4*⁺ las células presentan defectos en el proceso de NETO. La quinasa Pom1, mencionada previamente, regula la localización de Rga4. Pom1 es necesaria para la exclusión de Rga4 del polo que no está en crecimiento (Das *et al.*, 2007; Kelly and Nurse, 2011; Tatebe *et al.*, 2008).

El módulo general de activación de Cdc42 en la zona de crecimiento polarizado está conservado entre *S. cerevisiae* y *S. pombe*. La levadura de fisión contiene una proteína ortóloga de la GTPasa Rsr1, llamada Ras1, que participa en la activación de Cdc42 tanto en el proceso de conjugación como en el crecimiento polarizado (Papadaki *et al.*, 2002). La proteína Ras1 muestra una compartimentalización celular diferente según el proceso que controla. La fracción de la proteína Ras1 que se localiza en la membrana plasmática regula la señalización a la ruta de MAPK que controla la conjugación, mientras que la fracción de Ras1 que se localiza en endomembranas controla la morfología celular mediante la señalización a Cdc42 (Chang and Philips, 2006; Onken *et al.*, 2006). En la vía de señalización de Ras1 que controla la

morfología celular participa Scd1, junto con su proteína adaptadora Scd2, homólogas respectivamente a Cdc24 y a Bem1 de *S. cerevisiae*. Scd2 favorece la interacción de Scd1 con Ras1 y Cdc42 (Chang *et al.*, 1994). Scd1 y Scd2 son mutuamente dependientes para su localización correcta en las zonas de crecimiento (Kelly and Nurse, 2011).

La proteína reguladora Gef1 se encuentra en una vía de señalización distinta a la descrita para Scd1. La localización polarizada de Gef1 depende de la actividad de la quinasa Orb6 (Das *et al.*, 2009). Esta quinasa es un miembro de la familia de quinasas NDR, cuyo gen se identificó en una búsqueda de mutantes termosensibles con defectos en la morfología celular. Los mutantes termosensibles *orb* carecen de polarización y adquieren una morfología esférica (Verde *et al.*, 1995). Orb6 regula la localización de Gef1 en los polos y de ese modo, la localización de la GTPasa Cdc42 activa (Das *et al.*, 2009). La quinasa Orb6 fosforila a Gef1, promoviendo su unión a la proteína Rad24. Rad24 pertenece a la familia de proteínas 14-3-3, implicadas en retirar proteínas de la membrana plasmática. La proteína Rad24 regularía así la disponibilidad de Gef1 en la membrana, controlando la activación de la GTPasa Cdc42 (Das *et al.*, 2015). El complejo formado por la proteína marcadora de polaridad Tea4, subunidad reguladora de la fosfatasa PP1, y Dis2, subunidad catalítica de PP1, es capaz de promover la activación localizada de Cdc42 reclutando a Gef1 y la inhibición de la GTPasa en las zonas adyacentes, excluyendo a la proteína GAP Rga4 de la zona de crecimiento (Kokkoris *et al.*, 2014). Tea4-Dis2 y Orb6 podrían ser reguladores opuestos, positivo y negativo, de la activación de Cdc42 mediada por Gef1. Además, el complejo de la fosfatasa PP2A con la subunidad reguladora Pta2 actúa de forma negativa sobre la actividad de Cdc42 y podría regular, de forma directa o indirecta, la síntesis o el recambio de esta GTPasa (Bernal *et al.*, 2012).

Cdc42 interacciona con Rdi1, el único GDI de *S. pombe*, que también se une a Rho4 y Rho1 (Nakano *et al.*, 2003). La extracción de Cdc42 de las membranas mediada por el GDI, junto con el tráfico de vesículas ligado al citoesqueleto de actina, se asocian a un reciclaje dinámico de Cdc42 que contribuye a su activación localizada, en *S. cerevisiae* (Slaughter *et al.*, 2009). Sin embargo, en *S. pombe* la GTPasa Cdc42 puede polarizarse de manera independiente a estos procesos, proponiéndose que Cdc42 difunde lateralmente en la membrana plasmática y se acumula localmente como consecuencia de la menor movilidad que presenta la GTPasa en su forma activa (Bendezú *et al.*, 2015). La acumulación local de la GTPasa activa, menos móvil, permitiría la polarización del crecimiento, tanto en respuesta a señales extra o intracelulares como de forma espontánea, mediante “feedbacks” positivos y negativos (Bendezú *et al.*, 2015).

Una vez activa, la GTPasa Cdc42 de *S. pombe* controla la polaridad celular mediante la señalización a sus proteínas efectoras: la formina For3 y las quinasas de la familia PAK, Shk1/Pak1 y Shk2/Pak2 (Martin *et al.*, 2007; Otilie *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1998). Además, Cdc42 regula la localización del exocisto y el tráfico de vesículas celulares (Bendezú and Martin, 2011; Estravís *et al.*, 2011) (**Figura 20**).

La GTPasa Cdc42 controla el crecimiento polarizado a través de su proteína efectora For3, responsable de la formación de los cables de actina en interfase (Feierbach and Chang, 2001). For3, como otras forminas, posee un mecanismo de autoinhibición que implica la interacción entre sus dominios DAD y DID. La GTPasa Cdc42 y, en menor medida, la proteína

Bud6 contribuyen a liberar la autoinhibición de For3 y son necesarias tanto para su activación como para su localización (Martin *et al.*, 2007). Pob1 es una proteína adaptadora de Cdc42 que facilita la liberación de la autoinhibición de For3 mediada por Cdc42, para así estimular su localización y la formación de cables de actina (Rincón *et al.*, 2009).

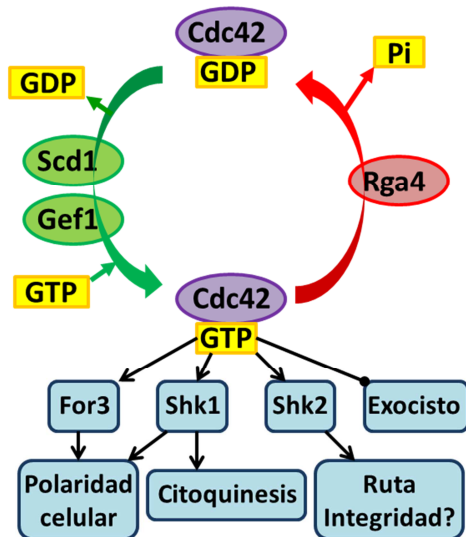


Figura 20. Proteínas efectoras y reguladoras de la GTPasa Cdc42 en *S. pombe*. Las proteínas GEFs, Gef1 y Scd1, regulan la activación de Cdc42. La GTPasa Cdc42 en su estado activo controla la polaridad celular mediante la señalización a sus proteínas efectoras: la formina For3 y las quinasas de la familia PAK, Shk1/Pak1 y Shk2/Pak2. Además Cdc42 regula la localización del exocisto y el tráfico celular de vesículas. La proteína GAP Rga4 regula la inactivación de la GTPasa Cdc42.

Los cables de actina son importantes para el crecimiento polarizado ya que promueven, junto con la miosina de clase V, Myo52, el movimiento de las vesículas secretoras con el nuevo material sintetizado hacia las zonas de crecimiento activo (Motegi *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001). En ausencia de *for3*⁺ las células muestran una morfología alterada y presentan un defecto en NETO, sin embargo, mantienen un crecimiento polarizado (Feierbach and Chang, 2001), sugiriendo que otros mecanismos adicionales regulan el crecimiento polarizado. Cdc42 también está implicada en el tráfico de vesículas y regula, junto con el fosfolípido fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) presente en la membrana plasmática, la localización del exocisto (Bendezú and Martin, 2011; Estravís *et al.*, 2011). Pob1 también participa, como proteína adaptadora de Cdc42, en la regulación del tráfico de vesículas y la localización polarizada del exocisto (Estravís *et al.*, 2011; Nakano *et al.*, 2011). La GTPasa Rho3 presenta interacción genética con Pob1 y desempeña una función parcialmente redundante a la de Cdc42 pero la relación molecular entre ambas GTPasas no se conoce (Estravís *et al.*, 2011; Nakano *et al.*, 2011).

Otras proteínas efectoras de Cdc42 en *S. pombe* son las quinasas PAK, Shk1/Pak1 y Shk2/Pak2. Shk1 es una quinasa esencial de la familia PAK, homóloga a las proteínas Ste20 y Cla4 de *S. cerevisiae* (Marcus *et al.*, 1995; Otilie *et al.*, 1995). El gen que codifica Shk1/Pak1 se identificó también como *orb2* en la búsqueda de mutantes termosensibles con defectos en la morfología celular en que se identificó *orb6*. Las células que llevan el alelo mutante termosensible *orb2-34* de la quinasa Shk1/Pak1 son redondas y presentan un patrón de crecimiento monopolar (Verde *et al.*, 1995). Shk1 se localiza en los polos y en la zona de división y participa en el crecimiento celular polarizado y en el control de la citocinesis (Kim *et al.*, 2003; Loo and Balasubramanian, 2008; Marcus *et al.*, 1995; Otilie *et al.*, 1995). La proteína adaptadora Scd2, además de facilitar la unión de Scd1 y Cdc42, facilita la interacción de la GTPasa activa con la quinasa Shk1 (Chang *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 2003). Las proteínas diana de Shk1 descritas hasta la fecha son: Tea1, Rga8, Myo1 y Rlc1. Tea1 es fosforilada por Shk1 *in*

vitro, lo que sugiere que esta proteína marcadora de polaridad podría ser un sustrato de la quinasa (Kim *et al.*, 2003). Shk1 fosforila también a la proteína Rga8, la cual posee actividad GAP *in vivo* frente a Rho1 (Yang *et al.*, 2003). También se han descrito como proteínas fosforiladas por Shk1 la miosina de tipo I, Myo1, asociada a los parches de actina relacionados con el proceso de endocitosis (Attanapola *et al.*, 2009) y Rlc1, la cadena ligera de la miosina de tipo II, Myo2, que forma parte del anillo contráctil de actomiosina (Loo and Balasubramanian, 2008). Shk1 regula además la activación de la ruta de MAPK que señala el proceso de conjugación celular (Tu *et al.*, 1997).

En un ensayo de doble híbrido se identificaron varias proteínas que interactuaban con Shk1 (Gilbreth *et al.*, 1996). Entre ellas se describieron dos reguladoras positivas de Shk1: la arginina metil transferasa Skb1, inhibidora de la mitosis (Deng and Moseley, 2013; Gilbreth *et al.*, 1998) y Skb5 que contiene un dominio SH3 (Yang *et al.*, 1999) y una reguladora negativa, Skb15 (Kim *et al.*, 2001).

La otra proteína PAK, Shk2/Pak2, no es esencial y sus funciones son parcialmente redundantes con las de Shk1 (Sells *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Se ha relacionado a Pak2 con la ruta de integridad celular ya que interactúa con la MAPKKK Mkh1 de esta vía de señalización, formada por el módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 (Merla and Johnson, 2001). Sin embargo, en estudios posteriores se observó que la activación de Pmk1 en respuesta a diferentes tipos de estrés es independiente de Pak2 (Madrid *et al.*, 2006).

En *S. pombe*, los niveles de la GTPasa Cdc42 activa tienen un comportamiento oscilatorio que, además, es opuesto entre los polos de la célula. En las células bipolares, se observa una alternancia en los niveles de Cdc42 activa entre un polo y otro a lo largo del tiempo. El comportamiento oscilatorio se atribuye a la existencia de una regulación retroalimentada por “feedbacks” positivos y negativos. Se ha propuesto que la proteína activadora Gef1 podría formar parte del “feedback” positivo, mientras que la quinasa efectora Shk1/Pak1 podría formar parte del “feedback” negativo. El comportamiento oscilatorio anticorrelativo entre ambos polos se cree que es debido a la competición por la GTPasa activa y a la disponibilidad de las proteínas reguladoras de Cdc42. Se ha propuesto además que las oscilaciones en los niveles de Cdc42 activa entre el polo viejo, dominante en las células monopolares y el polo nuevo, que compete por empezar a crecer, podrían participar en el proceso de transición a crecimiento bipolar o NETO (Bendezú and Martin, 2012; Das *et al.*, 2012; Das and Verde, 2013).

OBJETIVOS

Objetivos

La línea de investigación del laboratorio, en la que se incluye este trabajo, trata de comprender la función de Cdc42 y de sus proteínas reguladoras GAPs en el control del crecimiento celular polarizado de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*.

En concreto, nuestro propósito es estudiar el papel que desempeña la proteína GAP Rga6, junto con la proteína GAP Rga4 ya descrita, en el control de la morfología celular de *S. pombe* y su relación con la GTPasa Cdc42. Con estas premisas, los objetivos específicos que se abordarán a lo largo de este trabajo son los siguientes:

1. Caracterización de la proteína Rga6 y de su actividad GAP sobre Cdc42.
2. Estudio de la localización y estructura de Rga6.
3. Función de la proteína Rga6 en la regulación del crecimiento polarizado y su relación con Cdc42.

RESULTADOS

Apartado I: Caracterización de la proteína Rga6 y de su actividad GAP sobre Cdc42

1 Análisis *in silico* de la proteína Rga6

En el genoma de *Schizosaccharomyces pombe* se pueden distinguir diez fases de lectura abierta (ORFs) que codifican putativas proteínas GAPs para las GTPasas de la familia Rho, debido a la presencia en todas ellas de un dominio RhoGAP que se encuentra altamente conservado. Estas proteínas se han denominado Rgas (de Rho GAPs).

Dentro de la línea de investigación general del laboratorio, que consiste en estudiar el papel de las GTPasas Rho en el crecimiento polarizado, en este trabajo se decidió abordar el estudio de la proteína Rga6 que no había sido caracterizada. Esta proteína está codificada en la ORF SPBC354.13 correspondiente al gen *rga6*⁺, situado en el cromosoma II de *S. pombe*. La proteína Rga6 tiene 733 aa y posee una masa molecular de 80.78 kDa.

El análisis de la secuencia proteica de Rga6, utilizando la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>), identifica sólo la presencia de un dominio GAP, comprendido entre los aminoácidos 329 y 547. Un análisis más detallado revela además la presencia de una región rica en serinas, comprendida entre los aminoácidos 187 y 253, así como la existencia de una región polibásica en el extremo C-terminal de la proteína, situada entre los aminoácidos 700 y 733 (**Figura 21**).

El dominio RhoGAP se encuentra en una amplia variedad de proteínas con múltiples funciones. Este dominio está formado por 9 hélices α , de las cuales, 4 forman un núcleo central bien definido. En estas hélices centrales se sitúan muchos de los aminoácidos conservados en las proteínas RhoGAP, entre los cuales cabe destacar la Arg 85, implicada en la unión a las proteínas G y en el potenciamiento de su actividad GTPásica (Barrett *et al.*, 1997).

La proteína Rga6 presenta homología de secuencia con dos proteínas GAPs de *S. cerevisiae*, Sac7 y Bem3 (**Figura 21**). La proteína Sac7 (SAC: Suppressor of Actin) se descubrió en una búsqueda de supresores de la cepa termosensible *act1-4* que tiene una mutación en la actina (Glu258Val) (Dunn and Shortle, 1990). Sac7 actúa como GAP de la GTPasa Rho1 que participa en la regulación del citoesqueleto de actina (Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002). Rga6 y Sac7 presentan una identidad del 34%.

Bem3 es una proteína GAP de la GTPasa Cdc42 que participa en la regulación de la organización del citoesqueleto y en el mantenimiento de la polaridad celular (Zheng *et al.*, 1994). Bem3 es sustrato de Cdk1, la quinasa CDK que regula el ciclo celular (Ubersax *et al.*, 2003). Se ha propuesto que la fosforilación de Bem3 por Cdk1 podría inhibir su actividad GAP, contribuyendo a la activación controlada de Cdc42 en el sitio de gemación (Knaus *et al.*, 2007). Las proteínas Rga6 y Bem3 muestran una identidad del 30%. Bem3 además del dominio RhoGAP, tiene en su estructura primaria un dominio PH (Pleckstrin Homology Domain), implicado en la interacción con fosfolípidos de membrana o con residuos de serina y treonina fosforilados (Gibson *et al.*, 1994).

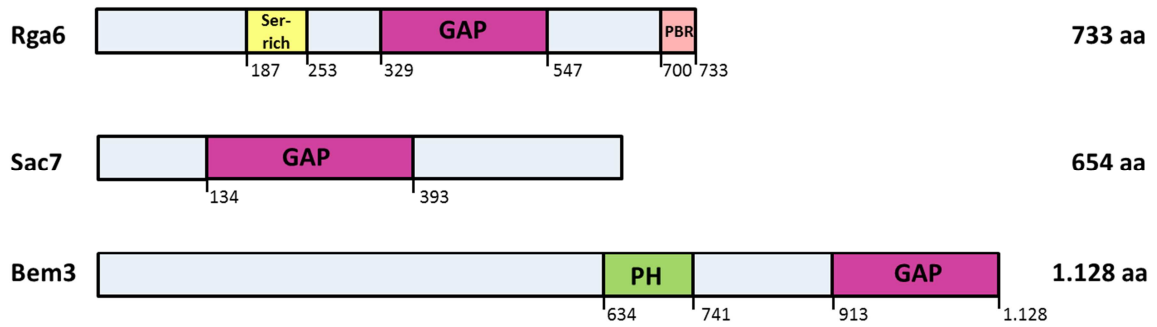


Figura 21. Esquema de las proteínas GAPs Rga6 de *S. pombe* y Sac7 y Bem3 de *S. cerevisiae*. La región rica en serinas se representa de color amarillo, el dominio RhoGAP de color lila y el dominio PH de color verde. La región polibásica de Rga6 (PBR) se representa de color rosa. Los números situados a la derecha indican los aminoácidos de cada proteína. Los números que se encuentran debajo de los esquemas indican la posición de los aminoácidos que limitan cada dominio dentro de las proteínas.

2 La proteína Rga6 participa en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe*

La delección del gen *rga6⁺* da lugar a células viables, capaces de crecer a distintas temperaturas, por lo que no es un gen esencial (Nakano *et al.*, 2001). Sin embargo, mediante microscopía se observó que las células de la cepa *rga6Δ* presentan defectos morfológicos: en el momento de la división son ligeramente más cortas ($13.3 \mu\text{m} \pm 0.8$ versus $13.9 \mu\text{m} \pm 0.9$ ($n=80$)) y más anchas ($4.0 \mu\text{m} \pm 0.3$ versus $3.8 \mu\text{m} \pm 0.3$ ($n=80$)) que las células silvestres (**Figura 22 A**). Estos datos indican que la proteína Rga6 podría participar controlando las dimensiones celulares de *S. pombe*.

El fenotipo observado en la delección de *rga6⁺* es similar al descrito para la delección de *rga4⁺*. Rga4 es una proteína GAP de la GTPasa Cdc42 que se localiza en las zonas laterales de la célula, que no crecen, y que está implicada en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe* (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008) (*rga4Δ* = $12.9 \mu\text{m} \pm 0.8$, $4.3 \mu\text{m} \pm 0.4$ ($n=80$)) (**Figura 22 A**). En base a esta observación, se analizó el efecto sobre la morfología celular de la delección conjunta de ambas proteínas GAPs. Se observó que el mutante doble *rga4Δ rga6Δ* presentaba un fenotipo aditivo. Aunque las células de la cepa *rga4Δ rga6Δ* siguen polarizadas, son más cortas y anchas que las de las cepas parentales y muestran una morfología redondeada (*rga4Δ rga6Δ* = $10.9 \mu\text{m} \pm 0.7$, $4.9 \mu\text{m} \pm 0.6$ ($n=80$)) (**Figura 22 A**).

Para ver con mayor claridad los fenotipos de delección de *rga6⁺* y de *rga4⁺*, así como el papel aditivo de ambas proteínas controlando la morfología celular, se utilizó como fondo genético la cepa mutante *cdc25-22* que, a la temperatura restrictiva de 36°C , se detiene en la fase G2 del ciclo celular y continúa creciendo sin dividirse (Mitchison and Creanor, 1971). Se pudo observar que las células *cdc25-22 rga6Δ* y *cdc25-22 rga4Δ* muestran fenotipos similares. En ambos casos son más cortas y más anchas que las células *cdc25-22*. Sin embargo, el defecto morfológico es más atenuado en el caso de la delección de *rga6⁺*. Rga6 y Rga4 parecen regular conjuntamente las dimensiones celulares ya que, en ausencia de ambas, las células presentan un fenotipo aditivo aunque permanecen polarizadas, como se puso de manifiesto en el fondo genético de la cepa *cdc25-22* (**Figura 22 B y C**).

La sobreexpresión de *rga6*⁺ también altera la morfología celular. Se utilizó el vector de expresión de *S. pombe* pREP1 para expresar *rga6*⁺ bajo el promotor *Pnmt1*, reprimible por tiamina. La sobreproducción de Rga6 durante 22 horas da lugar a células monopolares que se alargan y se estrechan por el polo de crecimiento, marcado con calcoflúor (Figura 22 D). Este compuesto fluorescente se une principalmente al (1-3)-β-glucano lineal de la pared de *S. pombe* y tiñe con mayor intensidad las zonas de crecimiento activo de la célula (Cortés *et al.*, 2007). El fenotipo observado tras la sobreexpresión de *rga6*⁺ es similar al descrito para la sobreexpresión de *rga4*⁺ (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008) (Figura 22 D) y de nuevo sugiere que Rga6 participa en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe*.

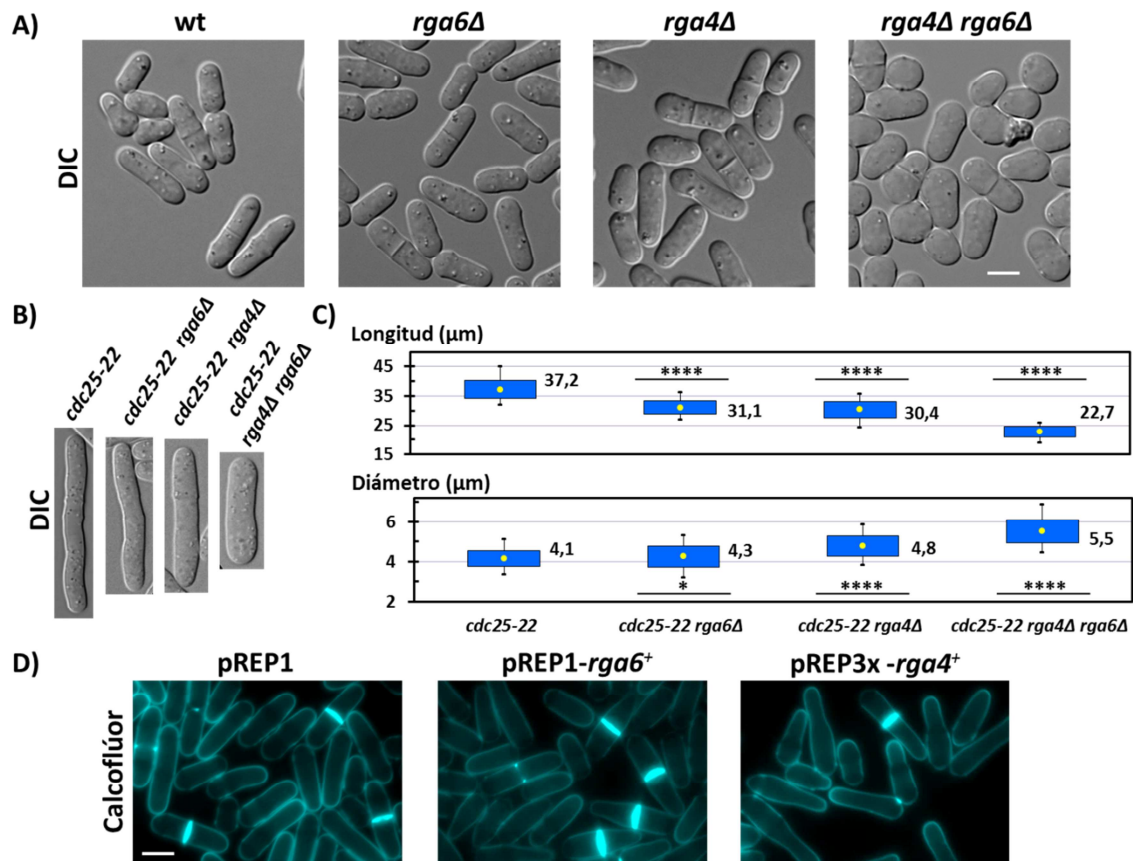


Figura 22. Rga6 participa, junto con Rga4, en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe*. A) Micrografías de contraste diferencial (DIC) que muestran la morfología de células silvestres (wt), *rga6Δ*, *rga4Δ* y *rga4Δ rga6Δ*. Las cepas se cultivaron en medio rico a la temperatura de 28°C y se muestran células creciendo en fase logarítmica temprana. B) Micrografías de contraste diferencial (DIC) de células *cdc25-22*, *cdc25-22 rga6Δ*, *cdc25-22 rga4Δ* y *cdc25-22 rga4Δ rga6Δ* incubadas a 36°C durante 4 horas para bloquearlas en fase G2 del ciclo celular. C) Medidas de la longitud y el diámetro de las cepas del apartado anterior. Las medidas fueron realizadas con el programa Image J y se consideraron sólo células en proceso de división. Se analizaron un total de 50 células de cada cepa. El círculo central representa la media, cuyo valor se indica; los límites superior e inferior de los rectángulos azules corresponden al valor de la media ± la desviación estándar y los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos. Se realizó una prueba t de Student para calcular la significación estadística de los valores obtenidos en las cepas *cdc25-22 rga6Δ*, *cdc25-22 rga4Δ* y *cdc25-22 rga4Δ rga6Δ*, respecto a los obtenidos en la cepa *cdc25-22*: * si $p \leq 0.05$, ** si $p \leq 0.01$, *** si $p \leq 0.001$, **** si $p \leq 0.0001$. D) Micrografías de fluorescencia de células teñidas con calcoflúor transformadas con los plásmidos: pREP1, pREP1-*rga6*⁺ y pREP3x-*rga4*⁺. Las células se cultivaron durante 22 horas en ausencia de tiamina a una temperatura de 28°C. Barra: 5μm.

Para poder estudiar con más detalle el fenotipo de sobreexpresión de *rga6*⁺, se llevó a cabo la integración de *Pnmt1-rga6*⁺ en el locus *leu1*⁺ de una cepa *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 ade-rga6Δ*. Se utilizó el vector integrativo de *S. pombe* pJK-148, tal como se describe en el apartado

5.8.1 de Materiales y Métodos. Del mismo modo, se realizó también la sobreexpresión de *Pnmt1-rga4⁺* integrada en el genoma de una cepa *h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga4Δ*. La sobreexpresión de *rga6⁺*, mediante el cultivo de las células en ausencia de tiamina durante 30 horas, produjo células monopolares que se ensanchan por el polo que no crece; además, en un 10% de la población (n=158) se observaron nuevas zonas de crecimiento detectadas como ramificaciones próximas al septo de división. Sin embargo, tras la sobreexpresión de *rga4⁺* durante 30 horas no se observaron nuevas zonas de crecimiento (**Figura 23**).

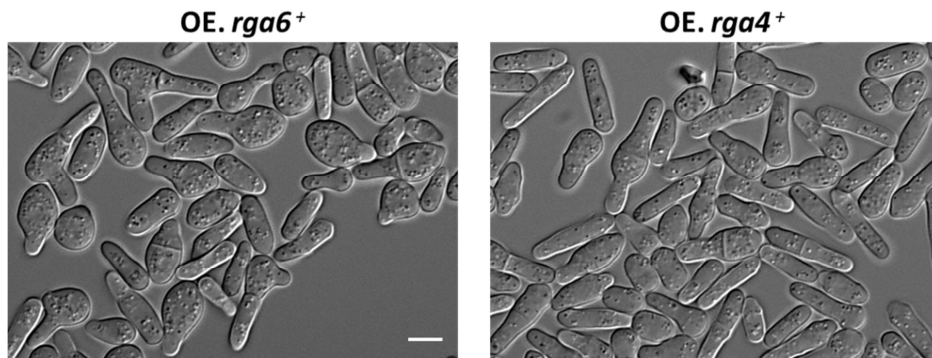


Figura 23. La sobreexpresión de *rga6⁺* a tiempos largos produce células deformes con algunas ramificaciones. Micrografías de contraste diferencial (DIC) que muestran la morfología de células *rga6Δ* que sobreexpresan *rga6⁺* (OE. *rga6⁺*, panel izquierdo) y de células *rga4Δ* que sobreexpresan *rga4⁺* (OE. *rga4⁺*, panel derecho). En ambos casos se utilizó el vector pJK-148 para integrar las sobreexpresiones en el locus *leu1⁺*. Se muestran células cultivadas durante 30 horas en ausencia de tiamina a una temperatura de 28°C. Barra: 5μm.

En conjunto estos datos indican que Rga6 tiene un papel en la regulación de las dimensiones de la célula, tanto en la longitud como en el diámetro celular.

3 Rga4 y Rga6 tienen papeles aditivos en el control de la morfología celular

El efecto aditivo que desempeñan Rga6 y Rga4 en la morfogénesis celular, observado en la cepa *rga4Δ rga6Δ*, sugiere que Rga6 podría ser también una proteína reguladora de la GTPasa Cdc42. Para explorar esta hipótesis, en primer lugar se observó la localización de GTP-Cdc42 en la estirpe *rga4Δ rga6Δ*. Se utilizó como fondo genético una cepa que expresa la construcción CRIB-3GFP, que contiene el dominio CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) de la proteína Gic2 de *S. cerevisiae* fusionado a tres copias de la proteína verde fluorescente (3GFP) (Tatebe *et al.*, 2008). Este dominio lleva además un motivo PH, por esa razón se une específicamente a la GTPasa Cdc42 activa en la membrana plasmática y permite observar su localización *in vivo*.

La señal de Cdc42-GTP, normalmente observada en los polos y en el septo, está sólo ligeramente más extendida en los polos de las cepas carentes de *rga6⁺* y *rga4⁺*. Este resultado ya se había descrito en el caso de las células *rga4Δ* (Kelly and Nurse, 2011). Sin embargo, en la cepa *rga4Δ rga6Δ*, la extensión de Cdc42 activa por la membrana plasmática es mucho mayor a la observada en los mutantes sencillos (**Figura 24 A**).

Este resultado corrobora la idea de que Rga6 y Rga4 podrían desempeñar un papel aditivo en la regulación de Cdc42.

La extensión de Cdc42 activa por toda la membrana plasmática también podría estar causada por la morfología redondeada de la estirpe *rga4Δ rga6Δ*. Para descartar esta idea se analizó la localización de otras proteínas, relacionadas o no con Cdc42, en esta cepa. La formina For3 es una proteína efectora de Cdc42 que se localiza en los polos y en el septo de las células y está implicada en el ensamblaje de los cables de actina en interfase (Feierbach and Chang, 2001; Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009). Al igual que sucede con Cdc42-GTP, la fluorescencia de For3-3GFP en la membrana plasmática estaba mucho más extendida en la cepa *rga4Δ rga6Δ* que en las cepas mutantes sencillas o en las células silvestres (**Figura 24 B**).

A diferencia de lo que sucede con Cdc42-GTP y con su proteína efectora For3, la proteína Tea1, independiente de Cdc42 y fundamental para marcar el sitio de crecimiento de la célula (Mata and Nurse, 1997), permanece correctamente localizada en ausencia de ambas GAPs, Rga6 y Rga4 (**Figura 24 C**).

Estos resultados corroboran que Rga6 es una nueva proteína reguladora de Cdc42 que, junto con Rga4, controla la morfología celular de *S. pombe*.

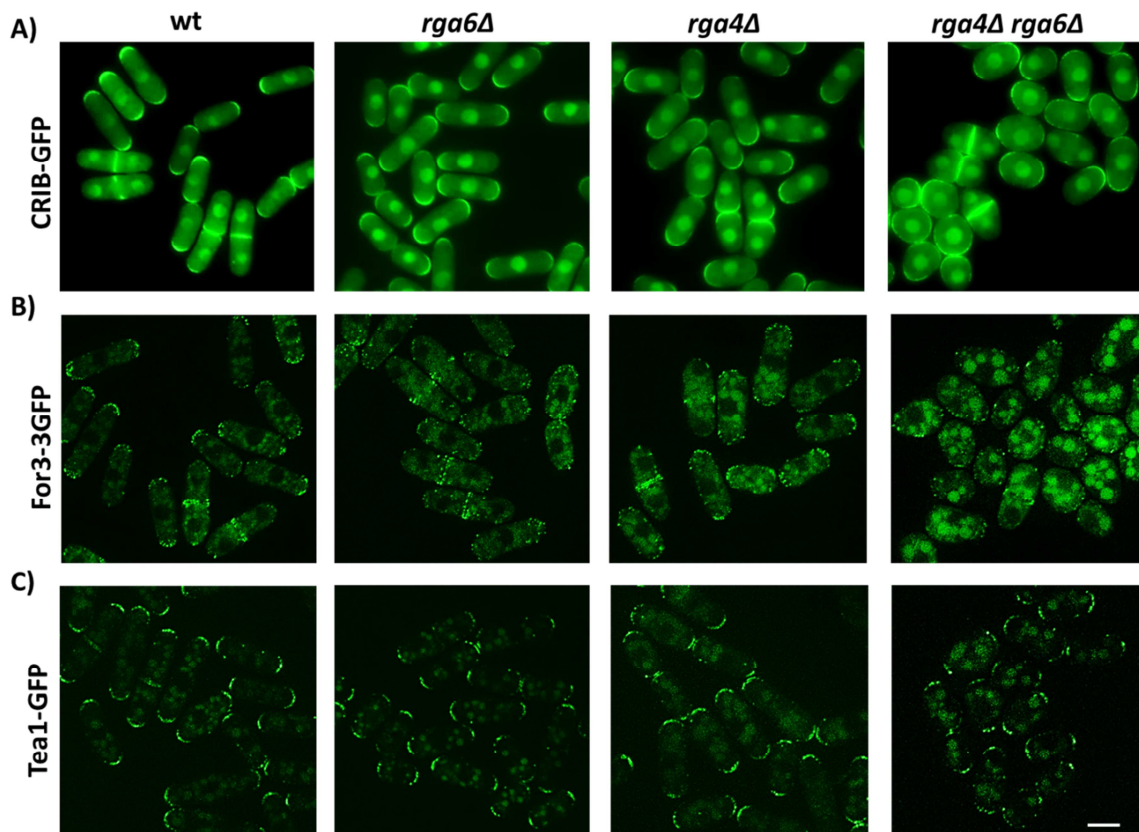


Figura 24. Cdc42-GTP y la formina For3 se extienden en la membrana plasmática de la cepa mutante doble *rga4Δ rga6Δ*. Micrografías de fluorescencia de células wt, *rga6Δ*, *rga4Δ* y *rga4Δ rga6Δ* en las que se muestra la localización de: CRIB-GFP (**A**), For3-3GFP (**B**) y Tea1-GFP (**C**). En los apartados B) y C) se muestra la proyección máxima de varios planos en el eje Z. Las células se examinaron durante la fase logarítmica de crecimiento en medio YES a 28°C. Barra: 5µm.

4 Rga6 interacciona con las GTPasas Cdc42, Rho2 y Rho3 mediante el ensayo de doble híbrido

En estudios previos del laboratorio se habían llevado a cabo ensayos de doble híbrido con Rga6 como cebo y las distintas GTPasas de la familia Rho en su estado constitutivamente activo. Para ello, se clonó la fase de lectura abierta correspondiente a *rga6*⁺ en el plásmido pACT2 en fase con el fragmento que codifica el dominio de activación de la transcripción de *GAL4*. Después, se transformó la cepa Y190 de *S. cerevisiae* con este plásmido y con cada uno de los plásmidos pAS2 que contienen las distintas GTPasas de la familia Rho en fase con el dominio de unión a DNA de *GAL4*. En la **Figura 25**, procedente de la Tesis Doctoral de M^a Antonia Villar Tajadura (2009), se muestra la tinción de actividad β-galactosidasa de las colonias transformantes que permite concluir que la proteína Rga6 interacciona con las formas constitutivamente activas de las GTPasas Cdc42, Rho2 y, muy débilmente, con Rho3 en el ensayo de doble híbrido. No se observó interacción con Rho1 ni tampoco con Rho4. A raíz de estos resultados, se estudió en el laboratorio la posible actividad GAP de Rga6 sobre las GTPasas Rho2 y Rho3 y sobre la regulación de las funciones de Rho2 en la biosíntesis de la pared celular y en la ruta de MAPK de integridad celular (Calonge *et al.*, 2000; Katayama *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2006). Este trabajo fue realizado por la Dra. M^a Antonia Villar Tajadura y, tal como se recoge en su tesis doctoral, permitió concluir que Rga6 regula negativamente a la GTPasa Rho2 en su función activadora de la biosíntesis del α-glucano de la pared celular. No se vio ningún efecto regulador sobre la GTPasa Rho3.

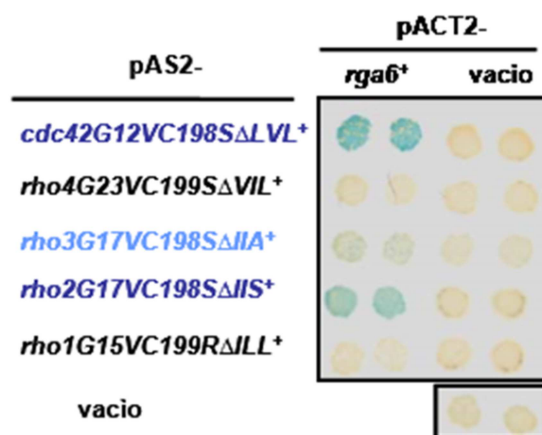


Figura 25. La proteína Rga6 interacciona con Cdc42, Rho2 y Rho3 mediante el ensayo de doble híbrido. Actividad β-galactosidasa de la cepa Y190 de *S. cerevisiae* transformada con los distintos plásmidos expuestos en la figura: pAS2, pAS2-*cdc42G12VC198SΔLVL*⁺, pAS2-*rho4G23VC199SΔVIL*⁺, pAS2-*rho3G17VC198SΔIIA*⁺, pAS2-*rho2G17VC198SΔIIS*⁺ o pAS2-*rho1G15VC199RΔILL*⁺ y pACT2 o pACT2-*rga6*⁺. Figura tomada de la Tesis Doctoral de M^a Antonia Villar Tajadura, (2009).

5 Rga6 tiene actividad GAP *in vivo* sobre la GTPasa Cdc42

Posteriormente, se investigó si Rga6 podría participar en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe* mediante la regulación de la GTPasa Cdc42. La primera aproximación fue estudiar si Rga6 tiene actividad GAP *in vivo* sobre Cdc42. Para ello, se determinó en extractos

celulares de *S. pombe* la concentración de Cdc42 activa en células carentes de *rga6*⁺ o que sobreproducían esta proteína GAP.

La cantidad de Cdc42 activa que existe en la célula se analiza mediante su precipitación con bolas de glutation-sefarosa unidas a GST-CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding). La proteína de fusión GST-CRIB contiene el dominio CRIB de la proteína Pak2, que sólo se une a Cdc42 cuando se encuentra en su forma activa, es decir, unida a GTP (Manser *et al.*, 1998). Para realizar estos ensayos de “pull-down” se utilizó una cepa que lleva la proteína Cdc42 marcada en su extremo 5' con el epítipo HA. Ello permite detectar los niveles de Cdc42 total en los extractos celulares y de Cdc42 activa, unida a GST-CRIB, mediante SDS-PAGE y Western-blot utilizando anticuerpos específicos frente al epítipo HA.

Como se observa en la **Figura 26 A**, los niveles de Cdc42 activa disminuyen ligeramente cuando la proteína GAP está sobreproducida y aumentan en ausencia del gen *rga6*⁺. Estos resultados sugieren que Rga6 tiene actividad GAP *in vivo* sobre la GTPasa Cdc42.

A continuación, se estudió si el papel de Rga6 en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe* está directamente relacionado con su función reguladora como proteína GAP. Para ello, se realizó una mutación puntual en la secuencia de *rga6*⁺ dando lugar a la sustitución de la Arginina 354 conservada en los dominios RhoGAP y descrita como esencial para la actividad GAP de la proteína (Bourne, 1997), por una Glicina. La mutación se realizó directamente en el vector de expresión pREP1-*rga6*⁺ que tiene clonada la fase de lectura abierta del gen de *rga6*⁺ bajo el control del promotor *nmt1*, reprimible por tiamina, obteniendo el plásmido pREP1-*rga6* R354G.

Como ya se ha descrito previamente, la sobreexpresión de *rga6*⁺ silvestre modifica las dimensiones celulares dando lugar a células que se alargan y se estrechan por el único polo de crecimiento (**Figura 26 B y C**). Además, en ensayos de crecimiento en gota la sobreexpresión de *rga6*⁺ resultó ser tóxica, comprometiendo la viabilidad celular. Esta toxicidad fue ligeramente superior a la observada en aquellas células que sobreexpresaban *rga4*⁺ (**Figura 26 D**).

Por el contrario, las células silvestres transformadas con el plásmido de expresión pREP1-*rga6* R354G no manifestaron el fenotipo observado cuando se sobreexpresa *rga6*⁺ silvestre (**Figura 26 B y C**). Además, la toxicidad observada en los ensayos de crecimiento en gota no se produjo cuando se sobreexpresó el alelo mutante *rga6* R354G, catalíticamente inactivo (**Figura 26 D**).

Estos resultados indican que la actividad GAP de Rga6 es necesaria para el control de la morfología celular y que, además, está relacionada con la toxicidad observada cuando se sobreexpresa *rga6*⁺ silvestre.

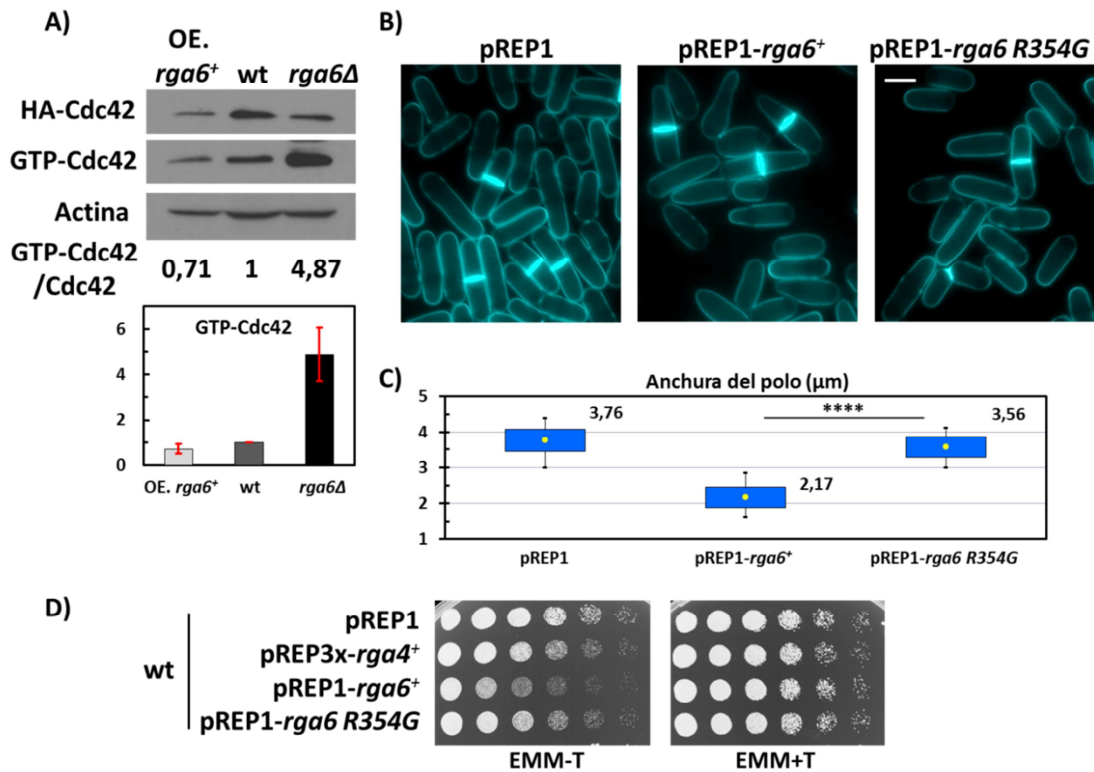


Figura 26. Rga6 tiene actividad GAP *in vivo* sobre la GTPasa Cdc42. **A)** Niveles de HA-Cdc42 total y activa (GTP-HA-Cdc42) en extractos de una cepa silvestre (wt), de una cepa silvestre transformada con el plásmido pREP1-*rga6*⁺, (OE. *rga6*⁺) y de una cepa *rga6*Δ. Todas las cepas producen Cdc42 marcada en su extremo 5' con el epítipo HA. Se cultivaron las células en medio mínimo a una temperatura de 28°C durante 22 horas en ausencia de tiamina. Los niveles de Cdc42 se determinaron mediante Western-blot usando el anticuerpo anti-HA. Además se hibridó la membrana con un anticuerpo anti-actina como control de carga. Una parte de los extractos se precipitó con GST-CRIB de la proteína Pak2 y se analizó mediante Western-blot para determinar los niveles de Cdc42 unido a GTP. En la parte inferior se muestra la cuantificación de la proporción de Cdc42 activa, respecto a Cdc42 total, realizada sobre 3 experimentos de sobreexpresión de *rga6*⁺ y 4 experimentos en ausencia de *rga6*⁺. **B)** Micrografías de fluorescencia de una cepa silvestre transformada con los plásmidos pREP1, pREP1-*rga6*⁺ y pREP1-*rga6* R354G. Se cultivaron las células en medio mínimo a una temperatura de 28°C durante 22 horas en ausencia de tiamina y se tñieron con calcoflúor antes de su observación. Barra: 5μm. **C)** Cuantificación en micrómetros de la anchura del polo en crecimiento en células de las cepas del apartado anterior (n=53 células de cada tipo). El círculo central representa la media, cuyo valor se indica; los límites superior e inferior de los rectángulos azules se corresponden con el valor de la media ± la desviación estándar y los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos. **** p ≤ 0.0001 t de Student. **D)** Ensayo de crecimiento en gota de células silvestres (wt) transformadas con los plásmidos pREP1, pREP3x-*rga4*⁺, pREP1-*rga6*⁺ o pREP1-*rga6* R354G, incubadas durante 3 días a 28°C en medio EMM con o sin tiamina.

6 Rga6 regula la morfología celular independientemente de las GTPasas Rho2 y Rho3

Puesto que Rga4 también es GAP de Rho2 (Soto *et al.*, 2010), el efecto aditivo sobre las dimensiones celulares observado en la cepa *rga4*Δ *rga6*Δ podría estar relacionado con la función GAP de Rga6 y de Rga4 sobre Cdc42 o sobre Rho2, ya que ambas GTPasas son reguladas por las dos proteínas GAP. Para estudiar esta hipótesis se construyó la cepa *rga4*Δ *rga6*Δ *rho2*Δ. Aunque Rga6 no parece actuar como GAP de la GTPasa Rho3, implicada en la secreción polarizada (Nakano *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), también se construyó la cepa mutante *rga4*Δ *rga6*Δ *rho3*Δ. Mediante microscopía se observó que ninguno de los triples

mutantes recupera completamente el fenotipo de la cepa silvestre, presentando un fenotipo similar al del doble mutante *rga4Δ rga6Δ*, más pronunciado en la cepa *rga4Δ rga6Δ rho2Δ* y menos en la cepa *rga4Δ rga6Δ rho3Δ* (Figura 27).

Este resultado sugiere que el papel de Rga6 sobre la morfología celular no se ejerce mediante su función reguladora sobre Rho2 sino como GAP de Cdc42 y quizás, directa o indirectamente, mediante la GTPasa Rho3.

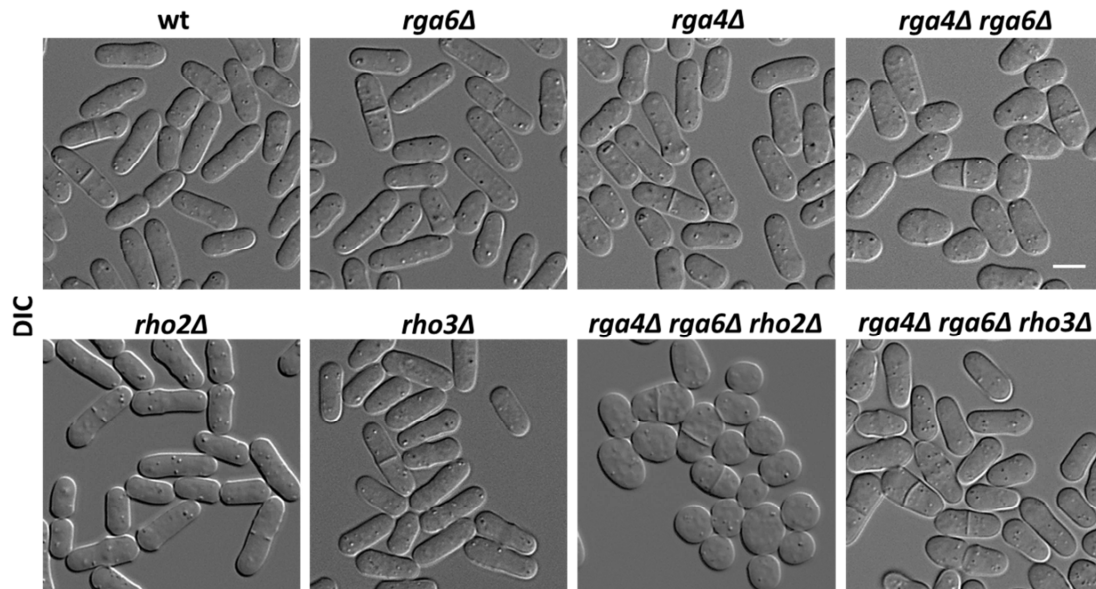


Figura 27. Rga6 regula la morfología celular independientemente de las GTPasas Rho2 y Rho3. Micrografías de contraste diferencial (DIC) de las cepas silvestre (*wt*), *rga6Δ*, *rga4Δ*, *rga4Δ rga6Δ*, *rho2Δ*, *rho3Δ*, *rga4Δ rga6Δ rho2Δ* y *rga4Δ rga6Δ rho3Δ* creciendo en fase logarítmica en medio YES a 28°C. Barra: 5μm.

Apartado II: Estudio de la localización y estructura de Rga6

7 La proteína Rga6 se localiza en la membrana plasmática y su concentración disminuye en los polos de crecimiento

A continuación, se estudió en detalle la localización de Rga6 *in vivo*. Los primeros estudios de localización se realizaron con una cepa que tenía marcado el gen *rga6*⁺ en su propio locus, de manera que la proteína verde fluorescente (GFP) estaba fusionada al extremo C-terminal de Rga6, según el método descrito en (Bähler *et al.*, 1998).

La proteína Rga6-GFP es funcional ya que las células que expresan esta proteína marcada no presentan defectos morfológicos. Mediante microscopía de fluorescencia se observó que Rga6 se localiza en la membrana plasmática celular, formando nodos discretos. Al observar estas células que expresan Rga6-GFP teñidas con calcoflúor, que marca con mayor intensidad las zonas de crecimiento de la célula, se constató que la fluorescencia de Rga6-GFP es menor en los polos que están creciendo (Figura 28). Posteriormente realizamos la fusión de GFP en el extremo N-terminal de Rga6 y su expresión en el locus *leu1*⁺ de una cepa *rga6Δ*, bajo el control del promotor y del terminador de *rga6*⁺ (ver apartado 5.8.2 de Materiales y Métodos). Esta proteína GFP-Rga6 es también funcional y la señal de fluorescencia observada por microscopía es mejor. A lo largo del trabajo utilizaremos ambas indistintamente.

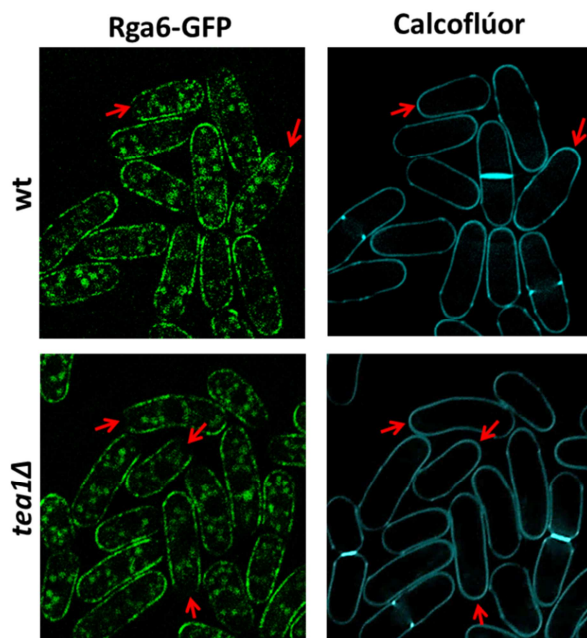


Figura 28. La proteína Rga6 se localiza en la membrana plasmática y su concentración disminuye en los polos de crecimiento. Micrográficas de fluorescencia que muestran la localización de Rga6-GFP (izquierda) y la tinción de las células con calcoflúor (derecha) en una cepa silvestre (wt) y en la cepa mutante monopolar *tea1Δ*. Las flechas señalan la menor concentración de Rga6-GFP que se observa en los polos de crecimiento, teñidos más intensamente con calcoflúor.

Para confirmar la disminución de los niveles de Rga6 en las zonas de crecimiento se utilizó la cepa mutante *tea1Δ*. En ausencia de esta proteína las células son monopolares (Mata and Nurse, 1997). En ellas se aprecia que Rga6 se localiza en la membrana plasmática,

disminuyendo claramente sus niveles en el único polo de crecimiento, teñido más intensamente con calcoflúor (**Figura 28**).

Puesto que Rga6 parece ser una nueva proteína reguladora GAP de la GTPasa Cdc42, se analizó simultáneamente la localización de Rga6 y de Cdc42 activa en las células. Para ello, se empleó una cepa que expresaba la proteína Rga6-GFP y la proteína CRIB-td-Tomato, que se une específicamente a la GTPasa Cdc42 activa en la membrana plasmática. CRIB-td-Tomato se localiza sólo en las zonas de crecimiento: en los polos y en el septo. Cuando se observaron simultáneamente Rga6 y GTP-Cdc42, se pudo apreciar la localización de Rga6-GFP en la membrana plasmática y la reducción de sus niveles en los polos en crecimiento, marcados con CRIB-td-Tomato; de modo que Rga6 está más presente en los polos que no crecen y en los laterales de la célula, donde no hay Cdc42 activa (**Figura 29 A**).

Hasta la realización de este trabajo sólo se había descrito un único regulador negativo de Cdc42, la proteína GAP Rga4 (Tatebe *et al.*, 2008). Con el fin de comparar la relación de cada proteína GAP con la GTPasa Cdc42, se analizó también una cepa que poseía la proteína Rga4 marcada en su extremo C-terminal con GFP y que además producía CRIB-td-Tomato. La proteína Rga4, como ya se ha descrito, se localiza en la membrana lateral de la célula como un corset, excluida de las zonas de crecimiento, marcadas con CRIB-td-Tomato (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008) (**Figura 29 B**).

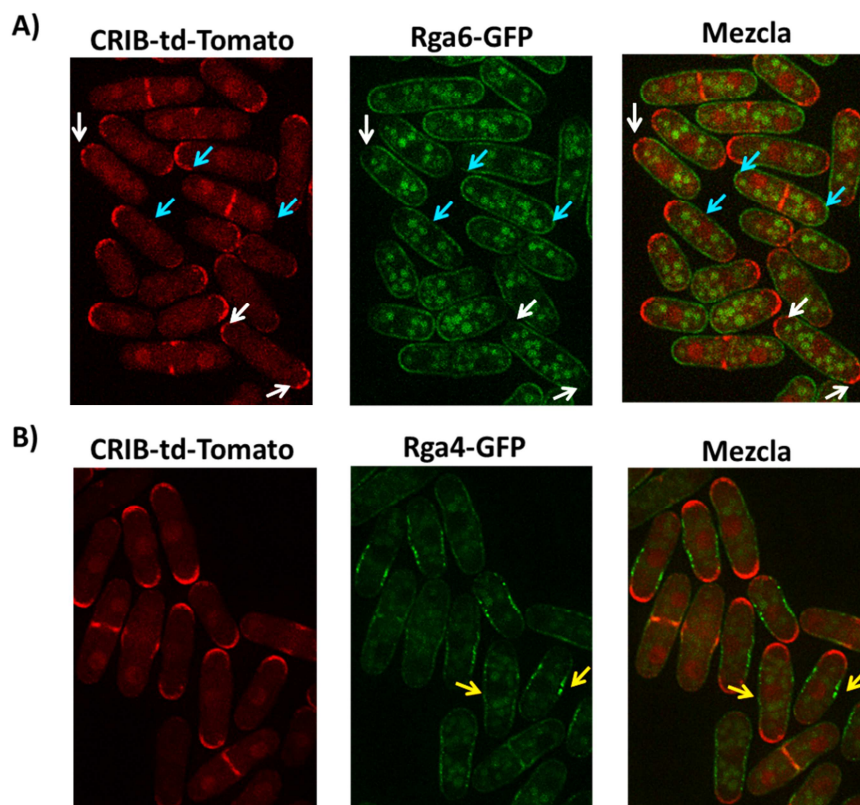


Figura 29. La reducción de los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento coincide con la presencia de la GTPasa Cdc42 activa. Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de la GTPasa Cdc42 activa, marcada con CRIB-td-Tomato, y de las proteínas GAPs (**A**) Rga6 y (**B**) Rga4, marcadas con GFP. Los paneles de la derecha muestran las imágenes solapadas (mezcla) de las señales de fluorescencia verde y roja. Las flechas blancas señalan la menor concentración de Rga6-GFP que se observa en los polos de crecimiento, marcados con CRIB-td-Tomato. Las flechas azules señalan la presencia de Rga6 en los polos que no crecen y en los laterales de la célula, donde no hay Cdc42 activa. Las flechas amarillas señalan la localización de Rga4-GFP en los laterales de la célula.

El análisis en paralelo de la localización de Rga6 y de Rga4, respecto a Cdc42 activa en la membrana plasmática, puso de manifiesto que la localización de Rga6 no es igual a la localización de Rga4. Ambas proteínas GAPs se localizan en los laterales de la célula, donde no hay Cdc42 activa. Sin embargo, Rga6, a diferencia de Rga4, se extiende mucho más en la membrana plasmática, llegando hasta los polos. En los polos en crecimiento, marcados con CRIB-td-Tomato, los niveles de Rga6 se ven reducidos mientras que Rga4 apenas se aprecia (Figuras 29 A y B).

Siguiendo con el estudio de la localización de Rga6 y su relación con Cdc42, también se analizó cómo se localizan esta proteína GAP y la GTPasa activa al sobreexpresar *rga6*⁺. Para ello, se fusionó en fase de lectura la secuencia codificante de la proteína GFP en el extremo N-terminal de la ORF de *rga6*⁺. Posteriormente, se llevó a cabo la integración de *GFP-rga6*⁺ bajo el control del promotor *nmt1*, reprimible por tiamina, en el locus *leu1*⁺ de una cepa *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ* CRIB-td-Tomato. Se cultivaron las células durante 22 horas en ausencia de tiamina y se observó por microscopía de fluorescencia que la sobreexpresión de *GFP-rga6*⁺ era funcional, dando lugar a células monopolares piriformes que se alargan y estrechan por un polo. En ellas, GFP-Rga6 se extiende uniformemente por toda la membrana plasmática sin apreciarse la localización en nodos discretos y sus niveles se reducen ligeramente en el único polo de crecimiento, marcado con CRIB-td-Tomato que indica la presencia de Cdc42 activa (Figura 30).

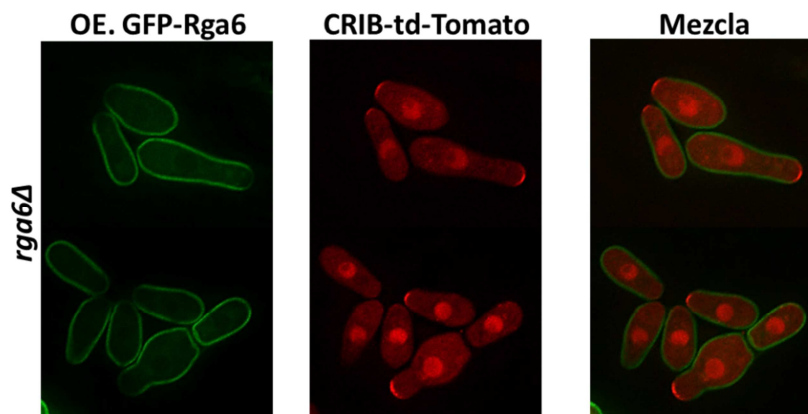


Figura 30. La proteína Rga6 sobreproducida se extiende por toda la membrana plasmática, excluyéndose del polo de crecimiento, marcado con GTP-Cdc42. Micrografías de fluorescencia de células *rga6Δ* que expresan la construcción *Pnmt1-GFP-rga6*⁺ integrada en el locus *leu1*⁺ (OE. GFP-Rga6) y además producen CRIB-td-Tomato. A la derecha se muestra la imagen solapada de ambas señales de fluorescencia (mezcla). Se cultivaron las células en medio mínimo sin tiamina durante 22 h a 28°C.

En conjunto, todos estos resultados muestran que en los polos de crecimiento, donde la GTPasa Cdc42 está activa, los niveles de Rga6 en la membrana plasmática están reducidos, incluso cuando Rga6 está sobreproducida.

8 Rga6 y Rga4 no colocalizan en los mismos nodos

Puesto que tanto Rga6 como Rga4 se localizan en los lados de la célula, se analizó si se encuentran formando parte de los mismos nodos, lo que podría indicar que formasen un complejo proteico. Se construyó una cepa en la que ambas proteínas estaban marcadas con

epítomos distintos en sus extremos C-terminales: Rga6 con GFP y Rga4 con RFP. Se observaron las células por microscopía y se vio una alternancia de puntos discretos verdes y rojos en los laterales de la célula, lo que indica que Rga6 y Rga4 no se localizan en los mismos nodos (**Figura 31 A**). Esta observación se confirmó utilizando la opción denominada “Linescan” del programa Metamorph®, que permite cuantificar simultáneamente la intensidad de fluorescencia de cada proteína GAP (verde y roja) a lo largo del córtex lateral de la célula y representar los valores sucesivos de intensidad en una gráfica (**Figura 31 B**). Se observó una alternancia de picos y valles, verdes y rojos, que confirmó que aunque Rga6 y Rga4 se localizan en los laterales de la célula, no forman parte de los mismos nodos proteicos.

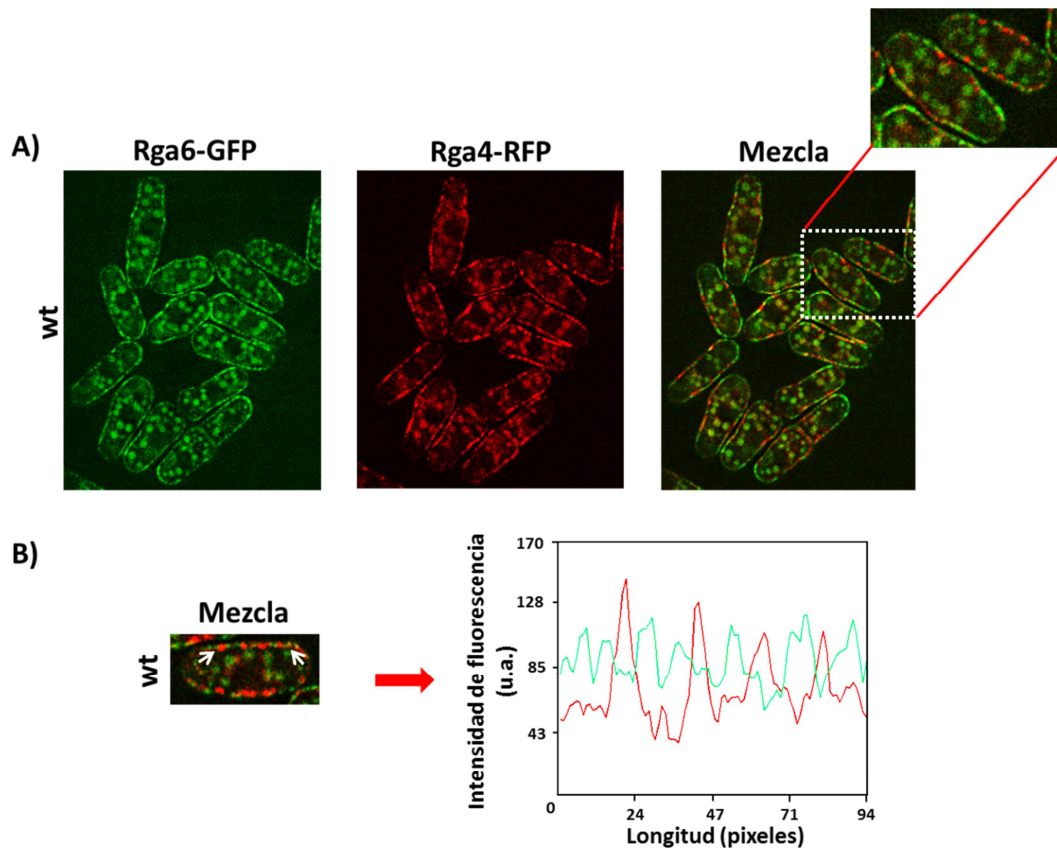


Figura 31. Las proteínas Rga6 y Rga4 no se localizan en los mismos nodos. **A)** Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de Rga6-GFP y Rga4-RFP en células silvestres (wt). A la derecha se muestra la imagen solapada de ambas señales de fluorescencia (mezcla) y una ampliación de algunas de las células de la imagen. Se observa como Rga6-GFP y Rga4-RFP no están en los mismos nodos. **B)** Intensidades de fluorescencia de Rga6-GFP y Rga4-RFP en el córtex lateral de la célula, entre las dos flechas de la micrografía. Se utilizó la opción “Linescan” del programa Metamorph® (u.a.= unidades arbitrarias).

9 La localización de Rga6 y de Rga4 es independiente

Para ver si existía una dependencia entre Rga6 y Rga4 respecto a su localización correcta en la célula, se analizó el patrón de localización de Rga6 en células *rga4Δ* y se comparó con el observado en células silvestres. La proteína Rga6-GFP se localizó en la membrana plasmática de células carentes de *rga4*⁺ de forma similar a como se localiza en una cepa silvestre (**Figura 32 A y B**).

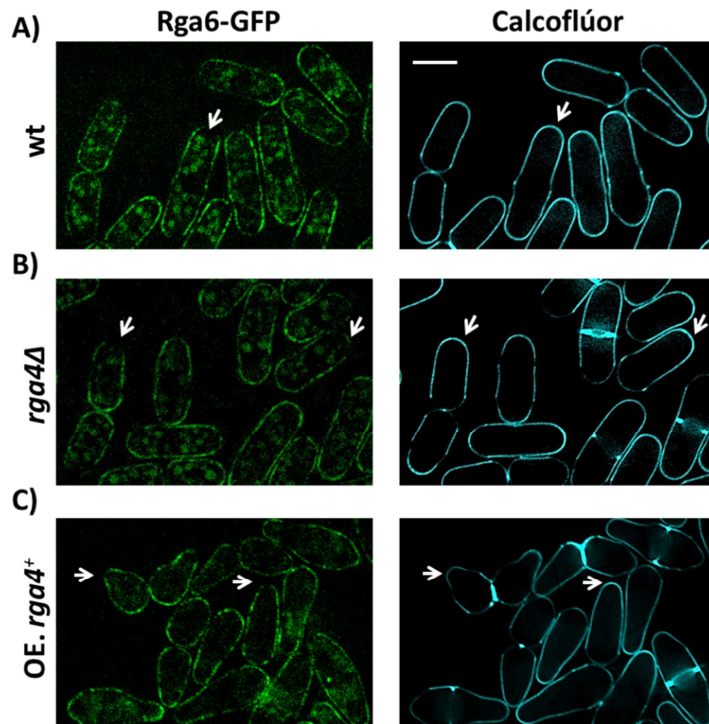


Figura 32. La localización de Rga6 no depende de Rga4. Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de Rga6-GFP (izquierda) y la tinción con calcoflúor (derecha) en (A) células silvestres (wt), (B) células *rga4Δ* y (C) células que expresan *Pnmt1-rga4⁺* (OE. *rga4⁺*) integrado en el locus *leu1⁺*. Las células se incubaron durante 22 horas a 28°C en EMM sin tiamina. Las flechas señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento, teñidos más intensamente con calcoflúor. Barra: 5µm.

También se analizó la localización de Rga6 en células que sobreexpresaban *rga4⁺* integrado en el locus *leu1⁺*. El fenotipo de sobreexpresión de *rga4⁺* produce células monopolares que se alargan y se estrechan por un polo (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008). Rga6-GFP se localizó en forma de nodos en la membrana plasmática de estas células y sus niveles también estaban reducidos en el único polo de crecimiento (Figura 32 C). Por lo tanto, el patrón de localización de Rga6 en la membrana plasmática y la reducción de sus niveles en los polos de crecimiento se mantiene tanto en ausencia como en exceso de *rga4⁺*.

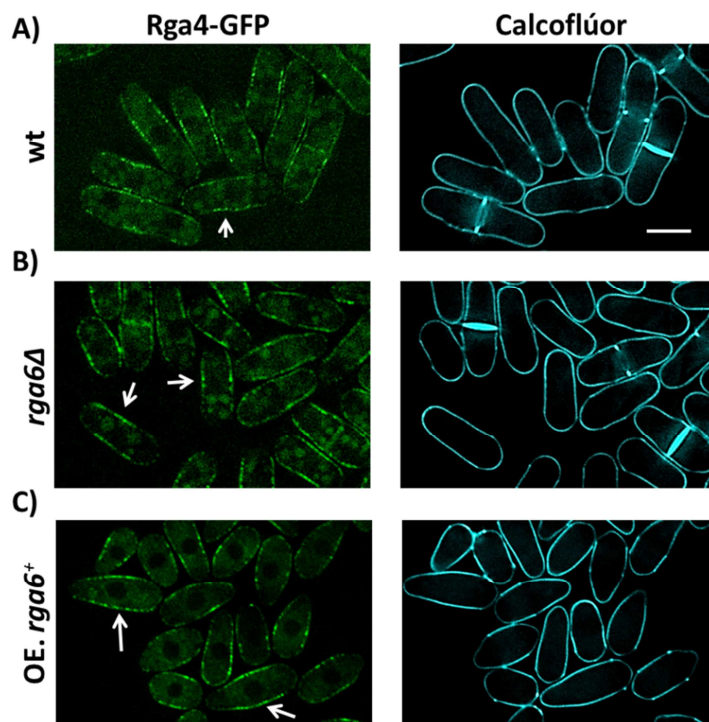


Figura 33. La localización de Rga4 no depende de Rga6. Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de Rga4-GFP (izquierda) y la tinción con calcoflúor (derecha) en (A) células silvestres, (B) células *rga6Δ* y (C) células que expresan *Pnmt1-rga6⁺* (OE. *rga6⁺*) integrado en el locus *leu1⁺*. Las células se incubaron durante 22 h a 28°C en EMM sin tiamina. Las flechas señalan la localización de Rga4-GFP en los lados de las células. Barra: 5µm.

Del mismo modo se analizó el patrón de localización de Rga4 en células *rga6Δ* y en células que sobreexpresaban *rga6⁺* integrada en el locus *leu1⁺* y se comparó con el observado en células silvestres. La localización de la proteína Rga4-GFP fue similar en todos los casos (Figura 33).

En conjunto, todos estos resultados sugieren que Rga6 y Rga4 no dependen una de la otra para su localización.

10 La exclusión de Rga6 de las zonas de crecimiento depende del citoesqueleto de actina

Se ha descrito que la localización de Rga4 es independiente tanto del citoesqueleto de actina como del citoesqueleto de microtúbulos (Kelly and Nurse, 2011). En el estudio de Rga6 se consideró oportuno analizar si la localización de la proteína dependía de alguno de los dos citoesqueletos.

Primero, se analizó la localización de Rga6 en ausencia del citoesqueleto de microtúbulos. Para ello, se trataron las células con MBC (metil 2-benzimidazol carbamato), un compuesto que inhibe la polimerización de los microtúbulos. Para corroborar su efecto se utilizó una cepa que posee la subunidad alfa de la tubulina, Atb2, marcada en su extremo N-terminal con la proteína mCherry. En condiciones normales las células poseen varios haces de microtúbulos dispuestos longitudinalmente a lo largo de la célula. Después de 15 minutos de tratamiento con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de MBC, la tubulina celular se despolimeriza y sólo se observa un punto perinuclear que se corresponde con el centro nucleador de microtúbulos (Figura 34 A).

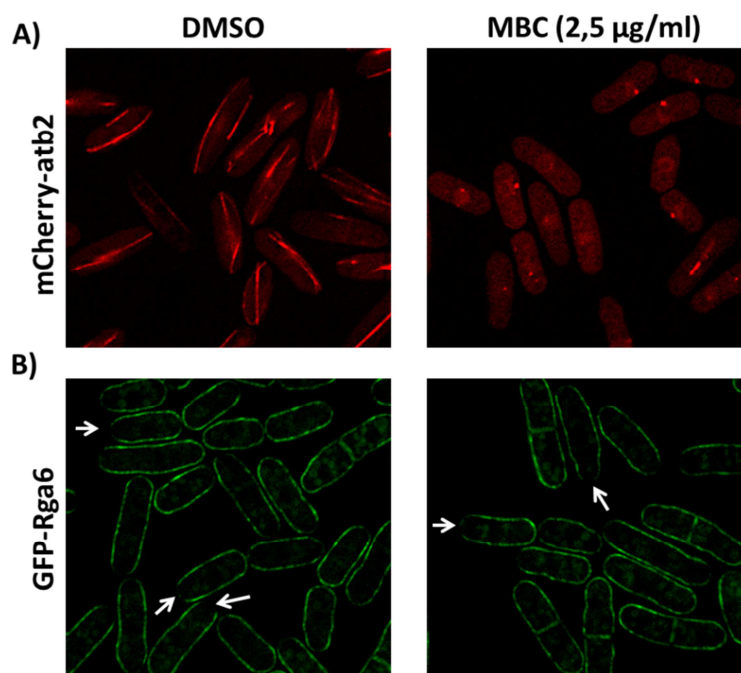


Figura 34. La localización de Rga6 no depende del citoesqueleto de microtúbulos. Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de (A) mCherry-Atb2 y (B) GFP-Rga6 en células cultivadas a 28°C y posteriormente tratadas durante 15 minutos con DMSO (izquierda) o con 2,5 $\mu\text{g/ml}$ de MBC (derecha). Las flechas señalan la menor concentración de GFP-Rga6 en los polos de crecimiento. En (A) se muestra la proyección máxima de varios planos en el eje Z y en (B) un único plano.

El mismo tratamiento con MBC se llevó a cabo en una cepa que produce GFP-Rga6. Por microscopía de fluorescencia se observó que la localización de GFP-Rga6 en la membrana plasmática no se modificó tras el tratamiento con MBC. Además, en ausencia del citoesqueleto

de microtúbulos se seguía observando la reducción en los niveles de Rga6 en los polos en crecimiento (**Figura 34 B**).

A continuación, se estudió si la localización de Rga6 dependía del citoesqueleto de actina. Para ello, se utilizó el compuesto Latrunculina A (Lat. A) que despolimeriza el citoesqueleto de actina (Spector *et al.*, 1989). Como control se utilizó una cepa que expresa un péptido de 17 aminoácidos, denominado “Lifeact”, fusionado a GFP, bajo el control del promotor *act1* de *S. pombe*. La proteína Lifeact-GFP se une a las estructuras de actina filamentosa (actina-F) de las células eucariotas y permite visualizar el citoesqueleto de actina *in vivo* (Huang *et al.*, 2012; Riedl *et al.*, 2008). En *S. pombe*, el citoesqueleto de actina se organiza en tres estructuras bien definidas: los parches de actina, implicados en el proceso de endocitosis; los cables de actina, que participan en la secreción polarizada y el anillo contráctil de actomiosina, que se forma durante la división celular (Marks and Hyams, 1985). En la cepa que produce la proteína Lifeact-GFP todas las estructuras de actina desaparecieron tras 5 minutos de tratamiento con 50 μ M de Latrunculina A (**Figura 35 A**).

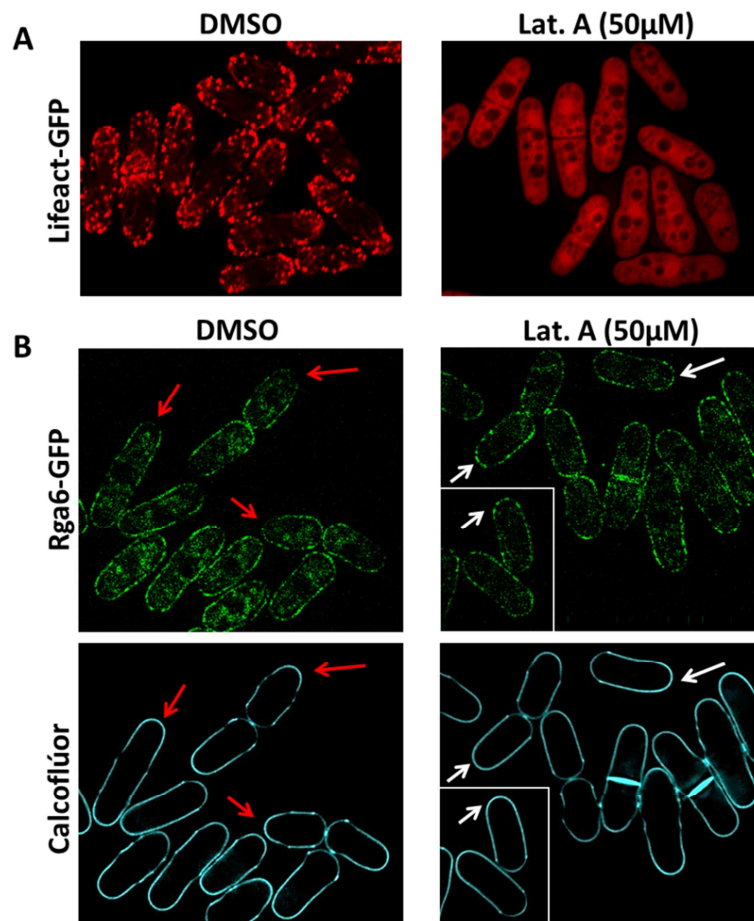


Figura 35. La exclusión de Rga6 de los polos de crecimiento depende del citoesqueleto de actina. (A) Micrografías de fluorescencia de la actina en una cepa que expresa el péptido denominado “Lifeact” fusionado a GFP bajo el control del promotor *act1* de *S. pombe*. Se muestra la proyección máxima de varios planos en el eje Z de células cultivadas a 28°C y posteriormente tratadas durante 5 minutos con DMSO (izquierda) o con 50 μ M de Latrunculina A (Lat. A, derecha). (B) Micrografías de fluorescencia de Rga6-GFP (paneles superiores) y de la tinción con calcoflúor (paneles inferiores) en células silvestres cultivadas a 28°C y posteriormente tratadas durante 15 minutos con DMSO (izquierda) o con 50 μ M de Latrunculina A (Lat. A, derecha). Las flechas rojas señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento. Las flechas blancas, en las células tratadas con Lat. A, señalan la extensión de Rga6 en los polos de crecimiento.

Para analizar si la localización de la proteína GAP Rga6 dependía del citoesqueleto de actina, se trató con Latrunculina A una cepa que producía Rga6-GFP. Por microscopía de fluorescencia se observó que Rga6-GFP seguía localizada en la membrana plasmática después de 15 minutos de tratamiento con 50 μM de Latrunculina A. Sin embargo, dejaba de excluirse de los polos de crecimiento, teñidos más intensamente con calcoflúor y se localizaba homogéneamente por toda la membrana (**Figura 35 B**).

En ausencia del citoesqueleto de actina se afecta tanto la endocitosis como la secreción polarizada. Por ello, se analizó si la exclusión parcial de Rga6 de los polos de crecimiento podría estar relacionada con alguno de estos dos procesos celulares.

Primero se analizó la localización de Rga6 en las cepas mutantes *end4Δ* y *wsp1Δ* que poseen los parches de actina alterados y tienen defectos en el proceso de endocitosis. End4 es una proteína adaptadora entre moléculas que intervienen en la endocitosis y el ensamblaje de actina (Castagnetti *et al.*, 2005; Iwaki *et al.*, 2004). Wsp1 es una proteína que promueve la activación del complejo Arp2/3, responsable de ensamblar los parches de actina (Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2010; Toya *et al.*, 2001). Rga6-GFP se localizó correctamente en las células *end4Δ* y *wsp1Δ*. En ambos casos, al igual que sucedía en una cepa silvestre, la concentración de la proteína GAP disminuía en los polos de crecimiento, marcados con calcoflúor (**Figura 36**). Por lo tanto, la exclusión de Rga6 de los polos no parece depender de endocitosis.

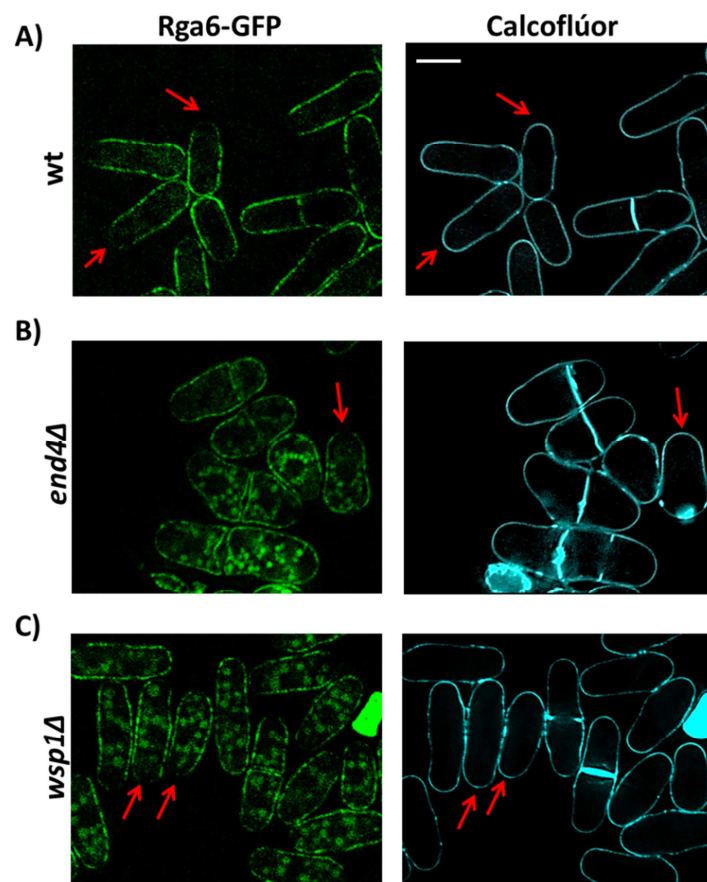


Figura 36. Rga6 se localiza correctamente en mutantes de endocitosis. Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de Rga6-GFP (izquierda) y la tinción con calcoflúor (derecha) en **(A)** células silvestres (wt), **(B)** cepa mutante *end4Δ* y **(C)** cepa mutante *wsp1Δ*. Las flechas señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento, teñidos más intensamente con calcoflúor. Barra: 5 μm .

Descartada la endocitosis, se investigó el posible papel de la secreción polarizada en la disminución de los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento. La proteína For3 es un formina no esencial implicada en la formación de los cables de actina en interfase (Feierbach and Chang, 2001; Sawin, 2002). Los cables de actina son importantes para la secreción polarizada ya que promueven, junto con las miosinas de tipo V (Myo51 y Myo52), el movimiento de las vesículas secretoras con el nuevo material sintetizado hacia las zonas de crecimiento activo (Motegi *et al.*, 2001). Además, se ha descrito que las miosinas de tipo V también contribuyen a la organización de los cables de actina y a su trazado correcto en el interior celular (Lo Presti *et al.*, 2012).

Se observó por microscopía de fluorescencia la localización de la proteína Rga6-GFP en las células mutantes *for3Δ* y *myo52Δ*, en las que los cables de actina están ausentes o alterados, respectivamente, y la secreción polarizada está afectada. Mientras que en una cepa silvestre la concentración de Rga6 disminuye considerablemente en los polos de crecimiento (Figura 37 A), en ausencia de *for3⁺* o de *myo52⁺* se observó una menor exclusión de Rga6 en dichas zonas (Figura 37 B y C), el mismo fenotipo observado tras el tratamiento de las células con Latrunculina A.

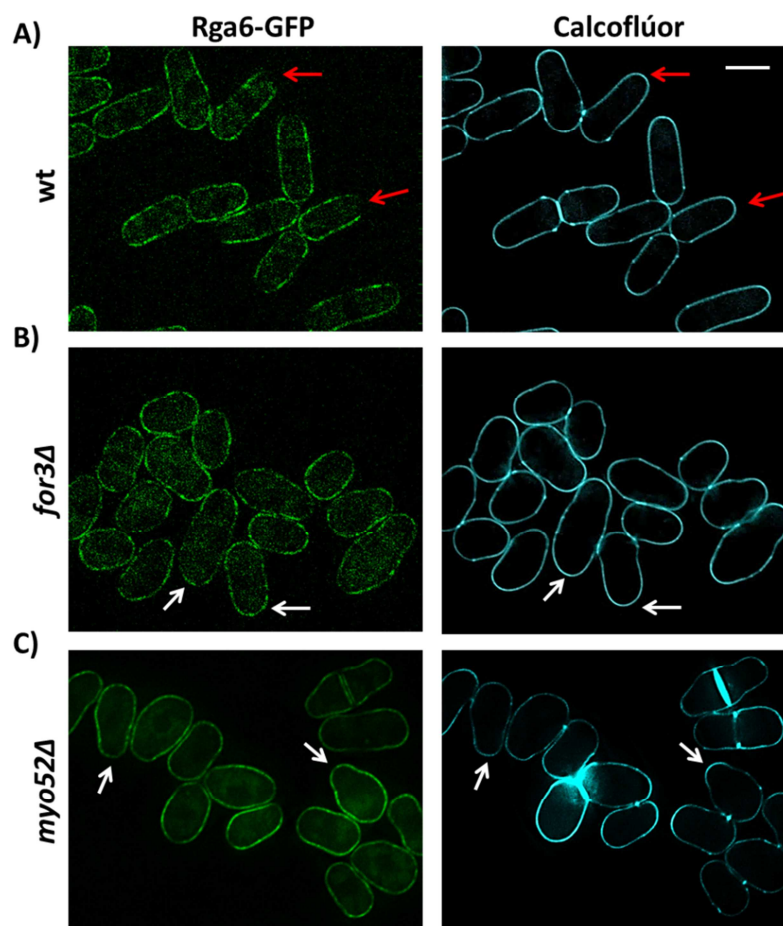


Figura 37. La exclusión de Rga6 de los polos de crecimiento depende de los cables de actina. Micrografías de fluorescencia en las que se muestra la localización de Rga6-GFP (izquierda) y la tinción con calcoflúor (derecha) en (A) células silvestres (wt), (B) cepa mutante *for3Δ* y (C) cepa mutante *myo52Δ*. Las flechas rojas en las células silvestres señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento. Las flechas blancas en las células *for3Δ* y *myo52Δ* señalan la extensión de Rga6 en los polos de crecimiento. Barra: 5µm

Para comprobar la extensión de Rga6 en la membrana plasmática de las células *for3Δ*, se visualizó simultáneamente la proteína Rga6, marcada con GFP y la GTPasa Cdc42 activa, marcada con CRIB-td-Tomato. Como ya se ha visto, en la cepa silvestre la concentración de Rga6 está disminuida en los polos de crecimiento, marcados con CRIB-td-Tomato (**Figura 38 A**). Sin embargo, en ausencia de *for3⁺*, Rga6 no se excluye de las zonas de crecimiento presentando una mayor co-localización con Cdc42-GTP, activa (**Figura 38 B**).

En conjunto, todos estos resultados sugieren que la exclusión de Rga6 de los polos de crecimiento podría depender de la llegada de vesículas a través de los cables de actina formados por For3. Esas vesículas suponen tanto un aporte de nueva membrana como de proteínas asociadas.

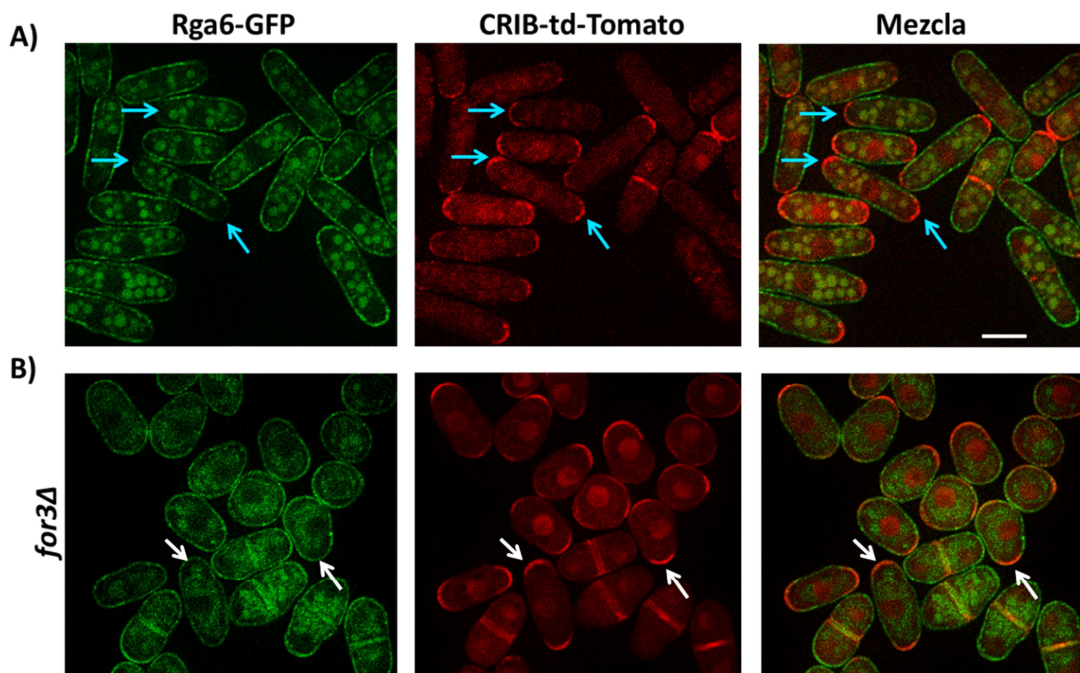


Figura 38. En ausencia de *for3⁺*, Rga6 no se excluye de las zonas de crecimiento, presentando una mayor co-localización con Cdc42-GTP, activa. Micrografías de fluorescencia de Rga6-GFP (paneles izquierdos) y CRIB-td-Tomato (paneles centrales) en **(A)** células silvestres (wt) y **(B)** células *for3Δ*. Los paneles de la derecha muestran las imágenes solapadas (mezcla) de las señales de fluorescencia verde y roja. Las flechas azules señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento, marcados con CRIB-td-Tomato. Las flechas blancas en las células *for3Δ* señalan la extensión de Rga6 en los polos de crecimiento. Barra: 5μm.

11 La proteína Rga6 es más dinámica en la membrana de los polos de crecimiento

Con el fin de estudiar en detalle la dinámica de Rga6 en la membrana plasmática y en concreto en los polos celulares, se realizaron experimentos de recuperación de fluorescencia tras fotoblanqueo (destrucción fotoquímica del fluoróforo) o ensayos de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching).

Lo primero que se observó, realizando los ensayos de fotoblanqueo, fue que GFP-Rga6 presentaba un comportamiento muy dinámico en la membrana plasmática que parecía ocurrir mediante difusión lateral ya que cuanto mayor era la zona fotoblanqueada en la membrana,

menor era la recuperación de la fluorescencia obtenida. También se observaron fluctuaciones muy rápidas de la fluorescencia de GFP-Rga6 en los polos de crecimiento de las células (**Figura 39 A**). Para intentar determinar cómo se produce el nuevo aporte de Rga6 en la membrana, se fotoblanquearon al mismo tiempo los lados y todo el polo en crecimiento de las células silvestres que producían la proteína GFP-Rga6. Se observó que, al fotoblanquear los lados y el polo en crecimiento, se recuperaba primero la fluorescencia de los lados. Por tanto, el aporte de Rga6 parece producirse por difusión en la membrana desde las zonas sin crecimiento, laterales y polo que no crece, hacia los polos en crecimiento (**Figura 39 B**).

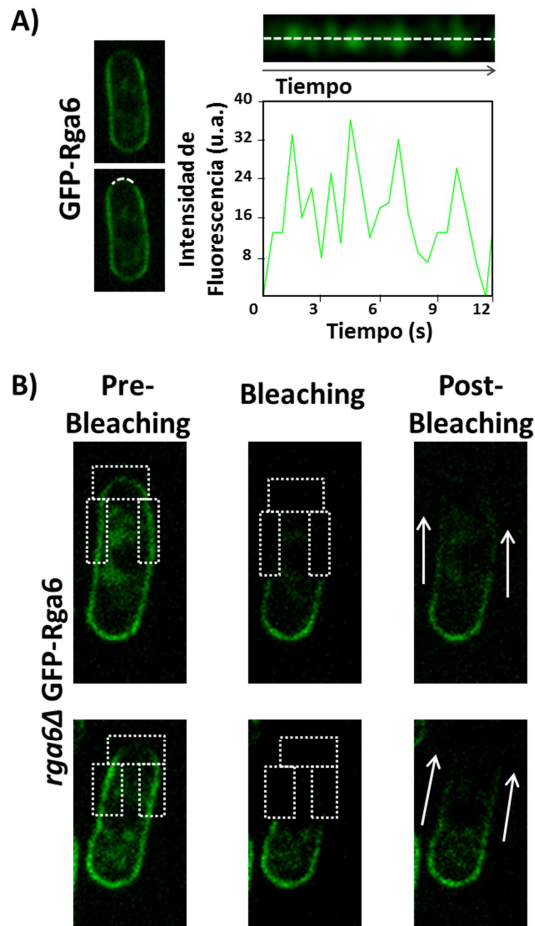


Figura 39. Rga6 presenta un comportamiento muy dinámico que parece ocurrir mediante difusión lateral en la membrana plasmática. A) Kimograma enseñando las fluctuaciones temporales de fluorescencia (panel superior) de una región (8 píxeles) del polo de crecimiento de una célula que expresa GFP-Rga6 (paneles izquierdos). La célula se ha seleccionado de una secuencia de imágenes de vídeo tomadas a intervalos de 0.5 segundos. La gráfica representa la cuantificación de la intensidad de fluorescencia a lo largo del tiempo en la región central del kimograma (línea de puntos). **B)** Micrografías de fluorescencia que muestran la recuperación de la señal de GFP-Rga6 tras el fotoblanqueo de los lados y del polo en crecimiento de la célula. El fotoblanqueo se realizó aplicando un láser a 488 nm. Imágenes tomadas antes de aplicar el fotoblanqueo (pre-bleaching, paneles izquierdos), inmediatamente después del fotoblanqueo (bleaching, paneles centrales) y 55 segundos después (post-bleaching, paneles derechos). Los rectángulos indican la zona de la membrana que se ha fotoblanqueado. Las flechas blancas muestran el sentido en el que parece producirse la difusión de Rga6 en la membrana plasmática, desde la zona que no se ha fotoblanqueado.

En los ensayos de FRAP, se entiende como tiempo medio de recuperación de la fluorescencia ($t_{1/2}$) el tiempo necesario para obtener la mitad de la fluorescencia máxima recuperada después del fotoblanqueo. Cuanto mayor es el valor de $t_{1/2}$, más lenta es la recuperación de la fluorescencia, lo que se corresponde con una menor movilidad de la proteína en estudio. Además, en los ensayos de FRAP el porcentaje de recuperación máxima de la intensidad de fluorescencia, respecto a la fluorescencia inicial, permite cuantificar las fracciones móvil e inmóvil de la proteína en estudio. Cuanto mayor es la recuperación de la intensidad de fluorescencia tras el fotoblanqueo, menor es la fracción inmóvil de la proteína y por lo tanto, refleja un mayor dinamismo en su recambio (**Figura 40**).

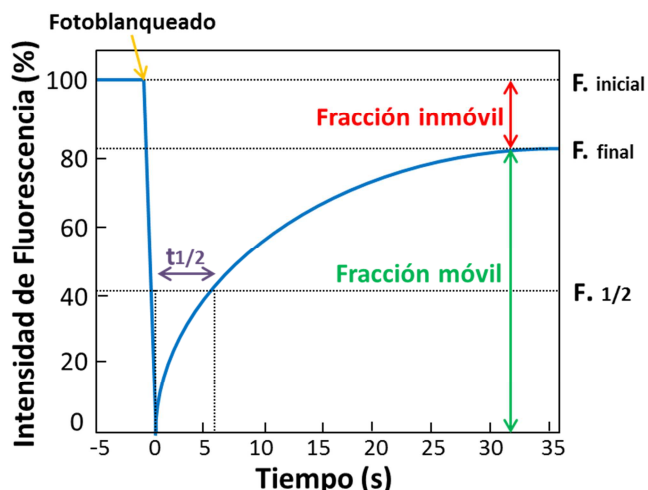


Figura 40. Gráfica teórica de un experimento de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo o FRAP. El valor de $t_{1/2}$ (morado) es el tiempo medio de recuperación de la fluorescencia máxima, es decir, el tiempo transcurrido desde el fotoblanqueo hasta que se recupera la mitad de la fluorescencia máxima final. Los ensayos de FRAP permiten distinguir entre una fracción inmóvil de la proteína en estudio (rojo) y una fracción móvil (verde), según el porcentaje de intensidad de fluorescencia que recupera la proteína después de realizar el fotoblanqueo de la señal.

Se realizó un ensayo de FRAP en la cepa que producía GFP-Rga6 comparando la recuperación de la fluorescencia de GFP-Rga6 en las distintas zonas de la célula, distinguiendo entre polos de crecimiento, polos de no crecimiento y laterales. Las células se cultivaron a una temperatura de 25°C y se fotoblanqueó una región pequeña de la membrana plasmática de dimensiones constantes (199 píxeles = 3.54 μm^2). Tras el fotoblanqueo se adquirieron imágenes cada segundo durante 30 segundos, para analizar la recuperación de la fluorescencia en las distintas zonas (**Figura 41 A y B**). El análisis de los datos obtenidos demostró que GFP-Rga6 presenta un mayor tiempo medio de recuperación de la fluorescencia en los polos, independientemente del crecimiento, respecto al observado en los laterales de la célula ($t_{1/2}$ = 7.8 y 7.6 segundos en polos con y sin crecimiento, respectivamente, *versus* 6.6 segundos en los laterales) (**Figura 41 C**). Una posible explicación a estos resultados es que el nuevo aporte de proteína Rga6 se produzca en la zona central de la célula y luego difunda por la membrana plasmática hacia los polos celulares.

Además, los resultados de FRAP mostraron un mayor porcentaje de recuperación de la fluorescencia de GFP-Rga6 en los polos de crecimiento (66.53%), respecto al observado en los polos que no crecen y en los laterales (45.07% y 45.81%, respectivamente) (**Figura 41 D**). Estos datos sugieren que en los polos de crecimiento, donde se observa una menor concentración de la proteína, hay un recambio más activo de Rga6 que podría ser debido a un proceso de continuo aporte y eliminación de la proteína GAP en esa zona de la membrana plasmática. Sin embargo, en los lados de la célula y en los polos sin crecimiento el recambio de Rga6 es menor.

Puesto que la exclusión de Rga6 de los polos de crecimiento parece depender del citoesqueleto de actina, se realizaron nuevos ensayos de FRAP en células tratadas con Latrunculina A. En presencia de este compuesto, se observa una localización de Rga6 homogénea en la membrana plasmática y por lo tanto, no debería de haber diferencias en la dinámica de recambio de la proteína GAP entre las distintas zonas de la célula.

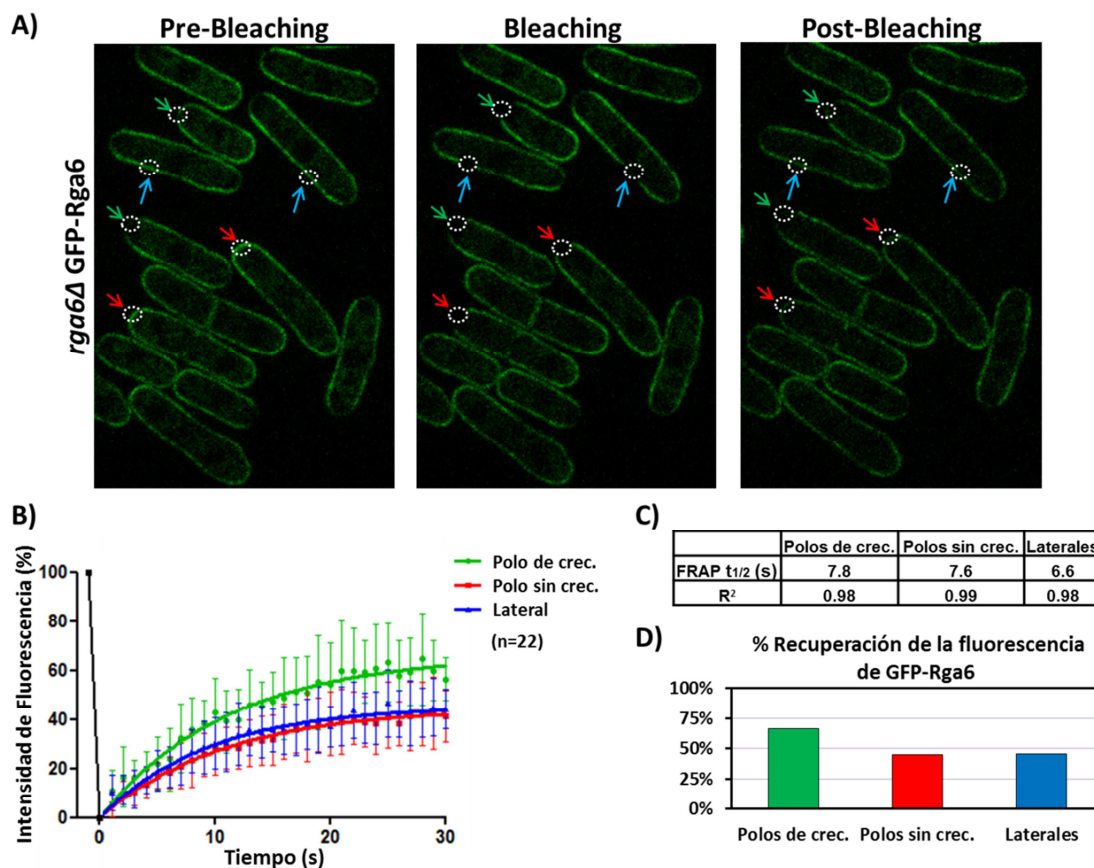


Figura 41. En los polos de crecimiento hay un recambio más activo de GFP-Rga6 en la membrana plasmática. A) Micrografías de fluorescencia de GFP-Rga6 en células sometidas a fotoblanqueo. Se aplicó un láser a 488 nm sobre una región de dimensiones siempre constantes (199 píxeles = $3,54 \mu\text{m}^2$), representada como un círculo blanco. Las flechas verdes señalan los polos de crecimiento, las rojas los polos sin crecimiento y las azules los laterales de las células. Imágenes tomadas antes (pre-bleaching, panel izquierdo), inmediatamente después (bleaching, panel central) y 30 segundos después de aplicar el fotoblanqueo (post-bleaching, panel derecho). **B)** Porcentajes de recuperación de la fluorescencia de GFP-Rga6 en las distintas regiones de las células. Se representa la media y desviación estándar de los datos obtenidos en 22 células, procesados y normalizados con el programa FRAPAnalyzeR de Metamorph®. **C)** Tiempos medios de recuperación de la fluorescencia ($t_{1/2}$) de GFP-Rga6 en las distintas zonas de la célula y valor de R cuadrado (R^2), resultante del análisis estadístico aplicado con el programa Graphpad®. **D)** Valor medio de los porcentajes de recuperación de la fluorescencia obtenidos para GFP-Rga6 en las distintas zonas de las células.

Las células que producían GFP-Rga6, cultivadas a 25°C , se trataron durante 30 minutos con Latrunculina A $50 \mu\text{M}$. Posteriormente, se realizó el experimento de fotoblanqueo y se capturaron imágenes de la recuperación de la fluorescencia durante 40 segundos (**Figura 42 A y B**). Tras analizar los datos obtenidos, se observó un aumento en todos los valores de $t_{1/2}$ de recuperación, respecto a los observados en células sin tratar con Latrunculina A (**Figura 42 C**). Estos datos reflejan una menor movilidad de Rga6 en la membrana plasmática en ausencia del citoesqueleto de actina. Además, cuando se despolimerizaba la actina, Rga6 presentaba una dinámica de recambio similar en los polos y en el resto de la membrana celular, como se refleja en los porcentajes de recuperación de la fluorescencia (**Figura 42 D**).

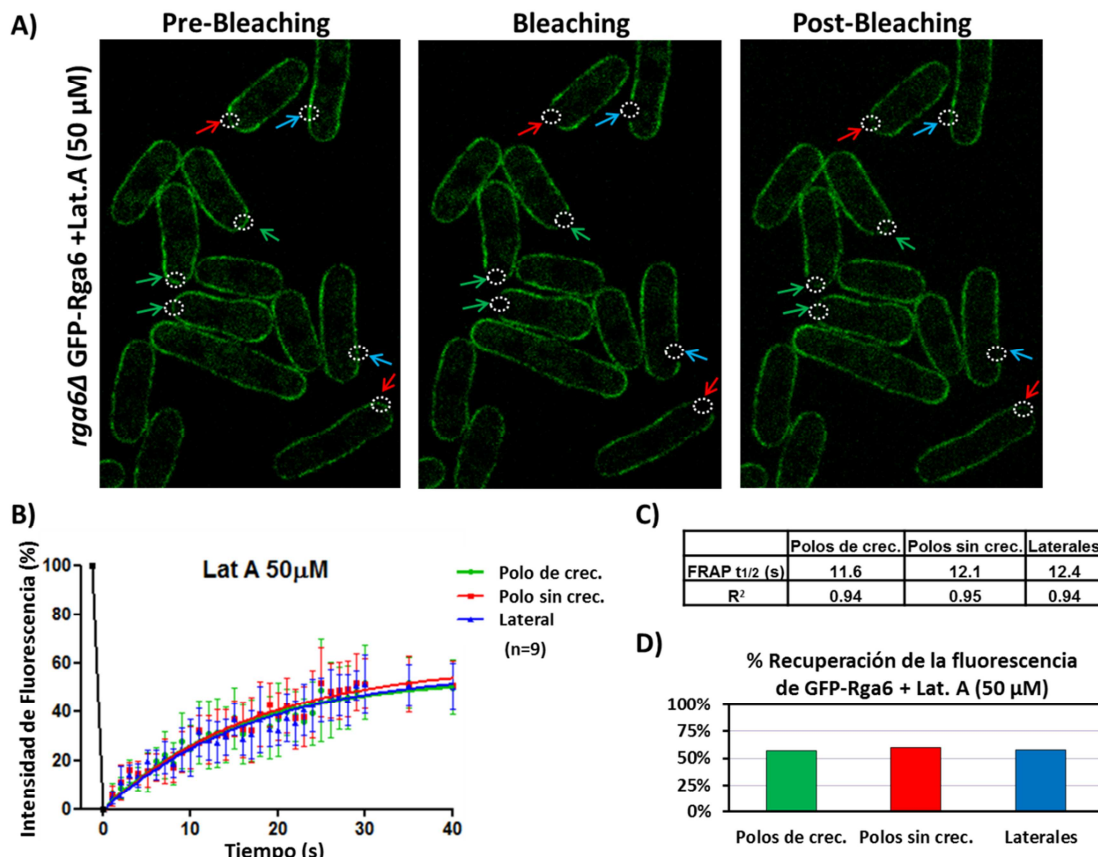


Figura 42. Dinámica de recambio de GFP-Rga6 en presencia de Latrunculina A. **A)** Micrografías de fluorescencia de GFP-Rga6. Previamente al fotoblanqueo las células se incubaron durante 30 minutos con Latrunculina A (50 μ M). El fotoblanqueo se realizó aplicando un láser a 488 nm sobre una región de dimensiones siempre constantes (199 píxeles = 3,54 μ m²), representada como un círculo blanco. Las flechas verdes señalan los polos de crecimiento, las rojas los polos sin crecimiento y las azules los laterales de las células. Imágenes tomadas antes (pre-bleaching, panel izquierdo), inmediatamente después (bleaching, panel central) y 40 segundos después de aplicar el fotoblanqueo (post-bleaching, panel derecho). **B)** Porcentajes de recuperación de la fluorescencia de GFP-Rga6 en las distintas regiones de las células tratadas con Lat. A. Se representa la media y desviación estándar de los datos obtenidos en 9 células, procesados y normalizados con el programa FRAPAnalyzeR de Metamorph®. **C)** Tiempos medios de recuperación de la fluorescencia ($t_{1/2}$) de GFP-Rga6 en las distintas zonas de la célula y valor de R cuadrado (R^2), resultante del análisis estadístico aplicado con el programa Graphpad®. **D)** Valor medio de los porcentajes de recuperación de la fluorescencia obtenidos para GFP-Rga6 en las distintas zonas de las células.

En conjunto, los datos obtenidos sugieren que en ausencia del citoesqueleto de actina, se bloquea el recambio de Rga6 en las zonas de crecimiento y esto se manifiesta en un aumento en los niveles de la proteína GAP en la membrana plasmática.

12 Construcción de versiones truncadas de la proteína Rga6

Según el análisis de la secuencia proteica que se muestra en la base de datos UniProt (<http://www.uniprot.org/>), Rga6 es una proteína de 733 aminoácidos que contiene en su estructura una región rica en serinas y un único dominio definido, el dominio RhoGAP. Rga6 presenta además en su extremo C-terminal una región polibásica, comprendida entre los aminoácidos 700 y 733. Para continuar con el estudio de Rga6 se analizó en detalle el posible papel de los distintos dominios de la proteína en su localización y función.

Resultados

Con el fin de delimitar correctamente el dominio GAP de Rga6, se analizó la similitud de secuencia de los dominios GAPs de Rga6 y de Rga4 mediante el alineamiento de sus secuencias con la base de datos NCBI BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). En base al alineamiento de las Argininas conservadas de Rga4, Arg 783 (Tatebe *et al.*, 2008) y de Rga6, Arg 354, y a la similitud de la secuencia de sus dominios GAPs, se determinó que el dominio GAP de Rga6 está comprendido entre los aminoácidos 329 y 547 de la proteína (**Figura 43 A**).

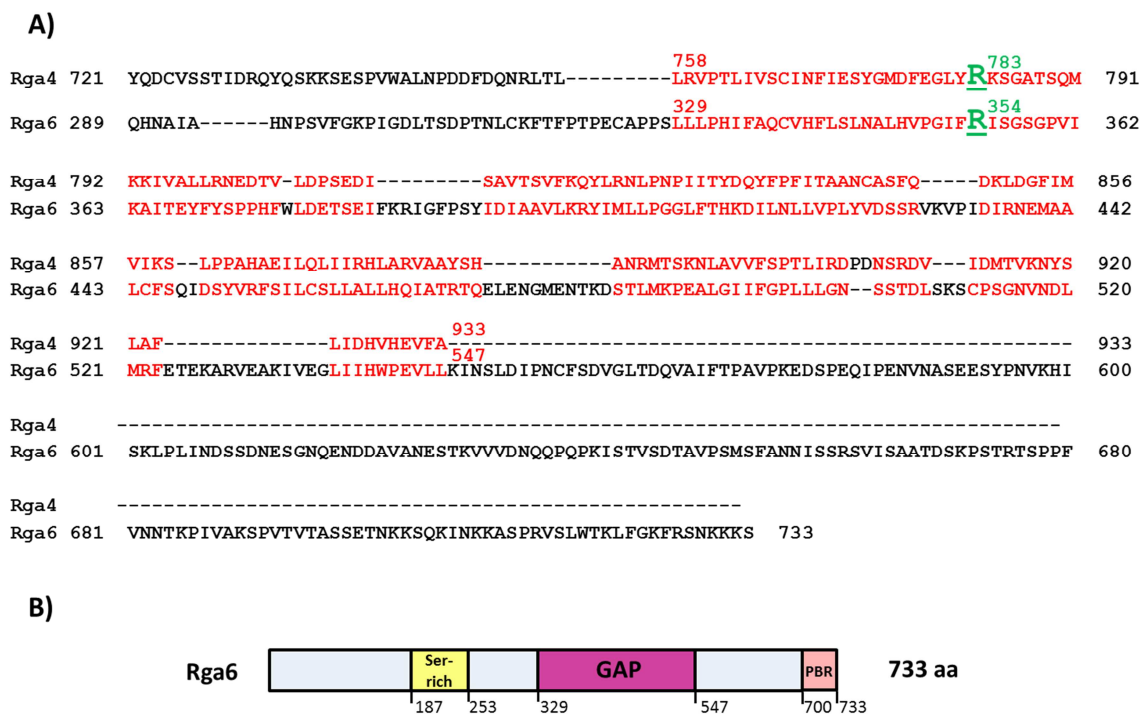


Figura 43. Análisis estructural de la proteína Rga6. **A)** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de los dominios GAP de Rga4 y de Rga6, representados por letras de color rojo. Las Argininas conservadas de Rga4 y de Rga6 están representadas en color verde, subrayadas y de mayor tamaño. **B)** Esquema de la estructura primaria de la proteína Rga6. La región rica en serinas (Ser-rich), comprendida entre los aminoácidos 187 y 253, se indica en color amarillo; el dominio GAP entre los aminoácidos 329 y 547, en color lila y la región polibásica (PBR) entre los aminoácidos 700 y 733, en color rosa.

Para estudiar las posibles funciones del extremo N-terminal (1-260 aa), de la región rica en serinas (187-253 aa) y de la región polibásica (700-733 aa) en la función y la localización de Rga6 (**Figura 43 B**), se realizaron cuatro truncamientos distintos de la proteína, dos del extremo amino y dos del extremo carboxilo. Las secuencias de las diferentes proteínas truncadas y la proteína Rga6 entera, fusionadas a la de la proteína GFP en el extremo 3', se integraron en el locus *leu1⁺* de una cepa *h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ*, bajo el control del promotor y del terminador de *rga6⁺*.

Las cinco cepas construidas produjeron las siguientes proteínas: Rga6-GFP; Rga6-GFP ΔN-term1 (187-733 aa), que carece de la zona N-terminal previa a la región rica en serinas; Rga6-GFP ΔN-term2 (260-733 aa), que carece de la zona N-terminal incluyendo la región rica en serinas; Rga6-GFP ΔC-term1 (1-700 aa), que no tiene los 33 aminoácidos finales correspondientes a la región polibásica y Rga6-GFP ΔC-term2 (1-580 aa), que carece de una región más amplia del extremo C-terminal de la proteína. En todas las construcciones el dominio GAP está presente (**Figura 44**).

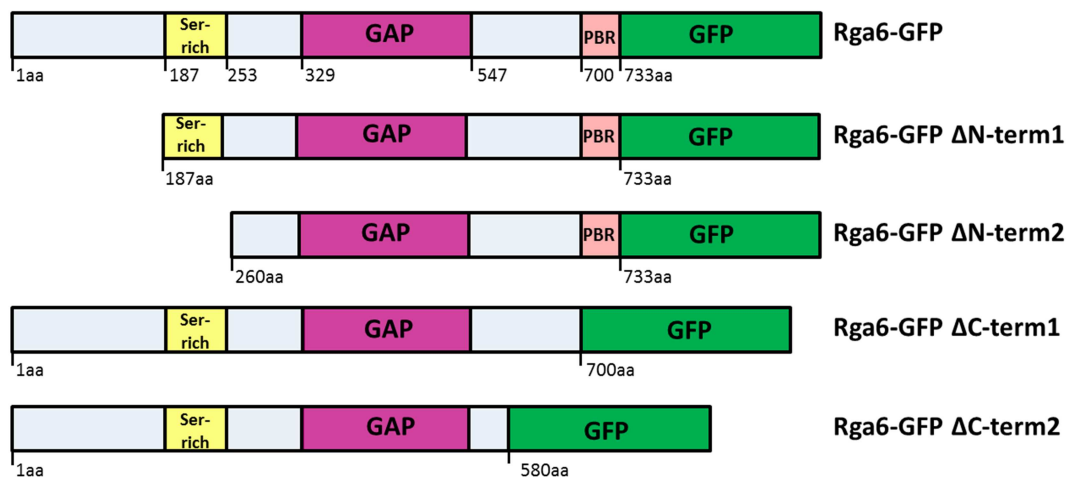


Figura 44. Esquema de las distintas versiones truncadas de Rga6-GFP. La región rica en serinas se representa de color amarillo, el dominio GAP de color lila y la región polibásica de color rosa. La proteína GFP, fusionada en el extremo C-terminal de Rga6 completa y de sus versiones truncadas, se representa de color verde.

Lo primero que se hizo fue comprobar que todas las cepas construidas expresaban las diferentes versiones de Rga6. Para ello, se obtuvieron extractos celulares de las cinco cepas generadas y de una cepa silvestre que no produce Rga6 marcada con GFP. Mediante Western-blot se confirmó la expresión y el tamaño de las diferentes proteínas truncadas y de Rga6. Se observó además, que todas las proteínas truncadas mostraban niveles de expresión superiores a los observados en la proteína Rga6 entera (**Figura 45 A**).

Posteriormente, se analizó por microscopía de fluorescencia la localización de las diferentes proteínas truncadas de Rga6. La proteína control Rga6-GFP es funcional ya que la cepa generada no presenta defectos morfológicos y se localiza correctamente en la membrana plasmática, con una menor concentración en los polos de crecimiento (**Figura 45 B**). Los truncamientos N-terminales de la proteína permiten la localización de Rga6 en la membrana plasmática. No obstante, las células que producían la proteína Rga6-GFP Δ N-term1, que carece de la zona previa a la región de serinas, mostraban un patrón de localización de Rga6 ligeramente modificado, presentando una concentración de la proteína en los polos de crecimiento mayor de la esperada. Las células que producían la proteína Rga6-GFP Δ N-term2, que carece de la región rica en serinas, mostraban una localización de Rga6 uniforme en toda la membrana plasmática, tanto en los polos como en los laterales de las células (**Figura 45 B**).

Estos resultados sugieren que el extremo N-terminal de Rga6 comprendido entre los aminoácidos 1 y 260, que incluye la región rica en serinas, podría ser necesario para la disminución de Rga6 en los polos de crecimiento.

Tanto las células que producían Rga6-GFP Δ C-term 1, que carece de los 33 aminoácidos finales polibásicos de Rga6, como aquellas que producían la proteína Rga6-GFP Δ C-term2, que carece de una región mayor del extremo C-terminal, mostraban una localización citoplásmica (**Figura 45 B**). Estos datos indican que la región polibásica (PBR) es necesaria para que la proteína Rga6 se localice en la membrana plasmática.

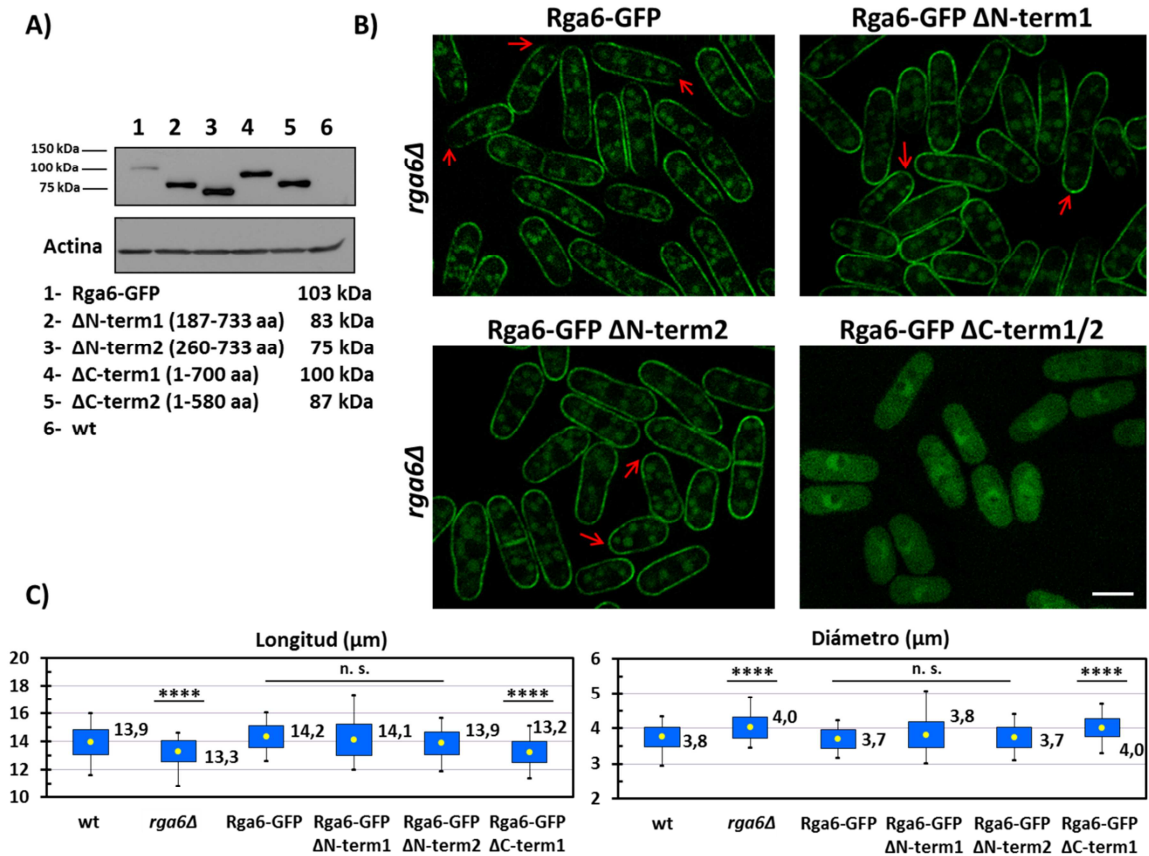


Figura 45. La región polibásica de Rga6 es necesaria para su localización en la membrana plasmática y su extremo N-terminal participa en la regulación de los niveles de la proteína en los polos de crecimiento. **A)** Niveles de expresión de la proteína Rga6 y de sus diferentes versiones truncadas, todas ellas marcadas con GFP, determinados por Western-blot usando el anticuerpo anti-GFP. Se utilizó como control una cepa silvestre que no produce Rga6 marcada con GFP (carril 6, wt). Como control de carga se determinó la actina en esos mismos extractos. **B)** Micrografías de fluorescencia de Rga6-GFP o sus versiones truncadas, integradas en el locus *leu1⁺*. Las flechas señalan algunos polos de crecimiento. El tiempo de exposición de la micrografía de Rga6-GFP es dos veces mayor que el del resto de las imágenes correspondientes a las versiones truncadas de la proteína Rga6-GFP para permitir una comparación mejor de la localización. Barra: 5μm. **C)** Medidas de longitud (izquierda) y diámetro (derecha) de células de las cepas del apartado anterior. Se realizaron también mediciones en células de las cepas silvestre (wt) y *rga6Δ*, como valores de referencia. Se utilizó el programa Image J y se consideraron sólo células en proceso de división. Se analizaron 72 células de cada cepa. El círculo central representa la media, cuyo valor se indica; los límites superior e inferior de los rectángulos azules se corresponden con el valor de la media ± la desviación estándar y los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos obtenidos. Se realizó una prueba t de Student para calcular la significación estadística de los valores obtenidos en las distintas cepas, respecto a los obtenidos en la cepa silvestre: n.s. = $p > 0.05$, **** $p \leq 0.0001$.

12.1 Estudio de la funcionalidad de las versiones truncadas de Rga6

Aunque la localización de las proteínas Rga6-GFP ΔN-term1 y ΔN-term2 en la membrana plasmática estaba modificada, las células que producían estas proteínas truncadas mostraban una morfología muy similar a las células que producían la proteína Rga6 entera fusionada a GFP. Por el contrario, las células que producían la versión citoplásmica de Rga6, Rga6-GFP ΔC-term1, mostraban una morfología similar a las células *rga6Δ* (Figura 45 C). En consecuencia, Rga6 necesita alcanzar la membrana plasmática para ejercer su función.

Con el propósito de corroborar la funcionalidad de las diferentes versiones truncadas de Rga6, se utilizó como fondo genético la cepa mutante doble *rga4Δ rga6Δ* caracterizada por una morfología redondeada.

Mediante microscopía de fluorescencia se observó que la proteína Rga6-GFP entera se localizaba correctamente y recuperaba el fenotipo de delección de *rga6⁺* en el mutante doble *rga4Δ rga6Δ*, que adquiría la morfología de *rga4Δ*. Sin embargo, las 2 versiones de Rga6 truncadas en su extremo N-terminal no revertían completamente el fenotipo de delección de *rga6⁺* de la cepa *rga4Δ rga6Δ*, recuperando el diámetro de *rga4Δ* pero no su longitud, lo cual indica que Rga6 sin su extremo N-terminal es parcialmente funcional (**Figura 46 A y B**).

Las células que producían las proteínas Rga6-GFP Δ C-term1 y Δ C-term2 no eran capaces de revertir los defectos de la delección de *rga6⁺* en la cepa *rga4Δ rga6Δ*, manteniendo la morfología redondeada, lo cual corrobora que Rga6 tiene que estar en la membrana plasmática para ser funcional (**Figura 46 A y B**).

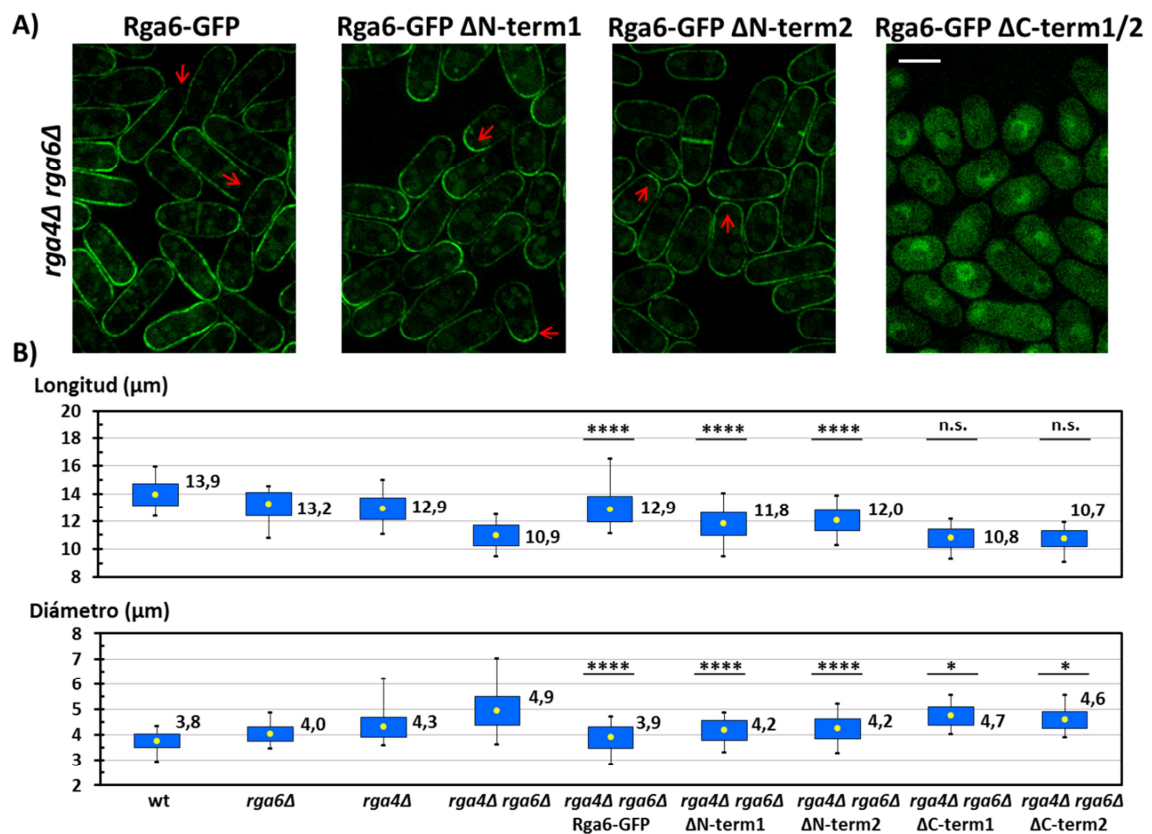


Figura 46. Estudio de la funcionalidad de las versiones truncadas de Rga6-GFP, utilizando como fondo genético la cepa mutante *rga4Δ rga6Δ*. **A)** Micrografías de fluorescencia de las células *rga4Δ rga6Δ* que producen la proteína Rga6-GFP o sus versiones truncadas, integradas en el locus *leu1⁺*. Las flechas señalan algunos polos de crecimiento. Barra: 5 μ m. **B)** Medidas de longitud (arriba) y diámetro (abajo) de células de las cepas del apartado anterior. Se realizaron también mediciones en células de las cepas silvestre (wt), *rga6Δ*, *rga4Δ* y *rga4Δ rga6Δ*, como valores de referencia. Se utilizó el programa Image J y se consideraron sólo células en proceso de división. Se analizaron un total de 70 células de cada cepa. El círculo central representa la media, cuyo valor se indica; los límites superior e inferior de los rectángulos azules se corresponden con el valor de la media \pm la desviación estándar y los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos obtenidos. Se realizó una prueba t de Student para calcular la significación estadística de los valores obtenidos en las células *rga4Δ rga6Δ* que producen la proteína Rga6-GFP o sus versiones truncadas, respecto a los obtenidos en la cepa mutante doble *rga4Δ rga6Δ*: n.s. = $p > 0.05$, * $p \leq 0.05$, **** $p \leq 0.0001$.

En conjunto, todos estos resultados sugieren que el extremo N-terminal de Rga6 podría estar implicado en la estabilidad de la proteína ya que, como se indicó anteriormente, las proteínas Rga6-GFP Δ N-term1 y Δ N-term2 muestran, mediante Western-blot, niveles totales superiores a los observados en la proteína entera; e implicado en su eliminación de las zonas de crecimiento ya que, en su ausencia, la concentración de Rga6 en estas zonas es mayor. Las proteínas Rga6-GFP Δ C-term1 y Rga6-GFP Δ C-term2 también muestran niveles de proteína aumentados en el análisis por Western-blot. Este aumento podría deberse a que estas proteínas tampoco alcanzan la membrana del polo de crecimiento ya que permanecen en el citoplasma o a otras causas más indirectas.

13 Estudio del extremo N-terminal de Rga6

Según los datos experimentales de fosfoproteómica de *S. pombe* (Wilson-Grady *et al.*, 2008), incorporados en la base UniProt (<http://www.uniprot.org>), la treonina en posición 141 de la proteína Rga6, situada en el extremo N-terminal, estaría fosforilada. Las proteínas Rga6-GFP Δ N-term1 y Δ N-term2 carecen del extremo N-terminal de Rga6 donde se localiza la treonina 141 que en la base de datos UniProt se describe como un residuo fosforilado y ambas muestran un patrón de localización en la membrana plasmática modificado. Además, la construcción Δ N-term2, que carece de la región rica en serinas y de los 6 aminoácidos inmediatamente posteriores, se localiza homogéneamente por toda la membrana plasmática. Por ello, se estudió si la región rica en serinas y el estado de fosforilación de la treonina 141 podrían estar implicados en la regulación de Rga6 en los polos de crecimiento. Se construyeron nuevas cepas de *S. pombe* que codificaban las siguientes versiones de la proteína Rga6: con la región rica en serinas deletionada; portando la mutación de la treonina 141 a alanina (aminoácido fosfonulo) o a aspártico (aminoácido fosfomimético); o bien con la combinación simultánea de ambas modificaciones (Figura 47).

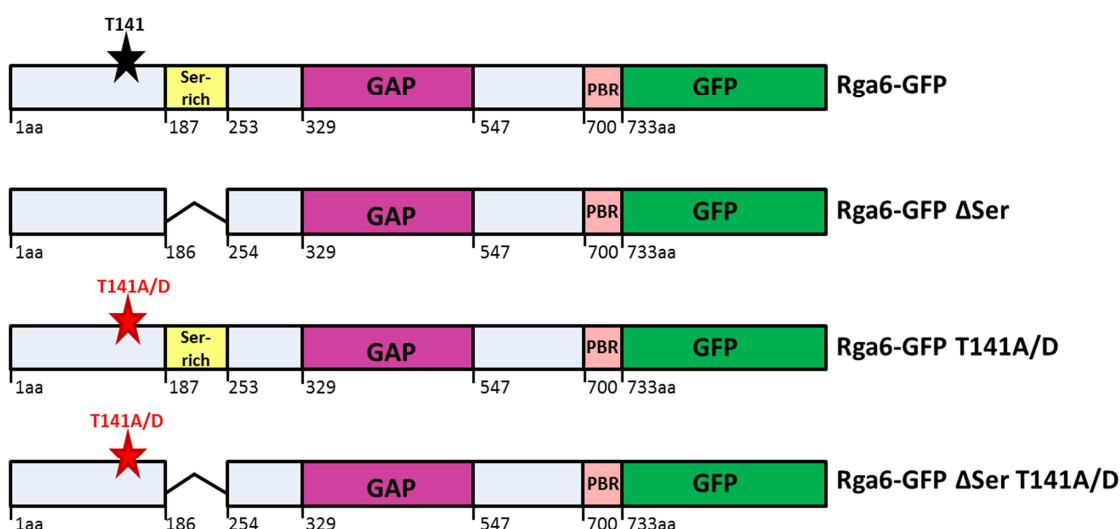


Figura 47. Esquema de las distintas versiones truncadas y/o mutadas de Rga6-GFP. La estrella negra representa la treonina 141. La estrella roja representa la mutación de dicha treonina por una alanina o por un aspártico. La región rica en serinas se representa en amarillo y con el símbolo “^” se representa su delección.

Para ello, se clonó la ORF de *rga6*⁺ con la secuencia codificante para la región de serinas deletionada (*rga6*⁺ Δ SER). Además, sobre la ORF de *rga6*⁺ entera se mutagenizó la secuencia codificante para la treonina 141 y se reemplazó por la de alanina o la del aspártico (*rga6*⁺ T141A/D). Por último, se llevaron a cabo las mismas mutaciones de la treonina 141 sobre la ORF de *rga6*⁺ Δ SER (*rga6*⁺ Δ SER T141A/D). Se fusionó, en fase de lectura, la secuencia codificante de la proteína GFP en el extremo C-terminal de *rga6*⁺ Δ SER, de *rga6*⁺ T141A/D o de *rga6*⁺ Δ SER T141A/D. Finalmente, se llevó a cabo su integración en el locus *leu1*⁺ de una cepa *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6* Δ , bajo el control del promotor y del terminador de *rga6*⁺.

Se analizó por microscopía de fluorescencia la localización en la célula de las nuevas proteínas Rga6 construidas. En el caso de la delección de la región rica en serinas, se observó en algunas células la extensión uniforme de Rga6 por la membrana, similar a la observada en la construcción Rga6-GFP Δ N-term2. Sin embargo, otras células tenían una menor concentración de los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento (**Figura 48**). Estos resultados sugieren que la reducción de los niveles de Rga6 en las zonas de crecimiento depende sólo en parte de la región rica en serinas.

En el caso de las células que producían la proteína Rga6-GFP T141A se observó una localización normal. Sin embargo, en aquellas células que producían la proteína Rga6-GFP T141D, portando la mutación fosfomimética, se observó una mayor presencia de Rga6 en las zonas de crecimiento, como sucedía en la proteína Rga6-GFP Δ N-term1 (**Figura 48**). Por tanto, variaciones en el estado de fosforilación de la treonina 141 podrían participar en la regulación de la exclusión de Rga6 de los polos de crecimiento.

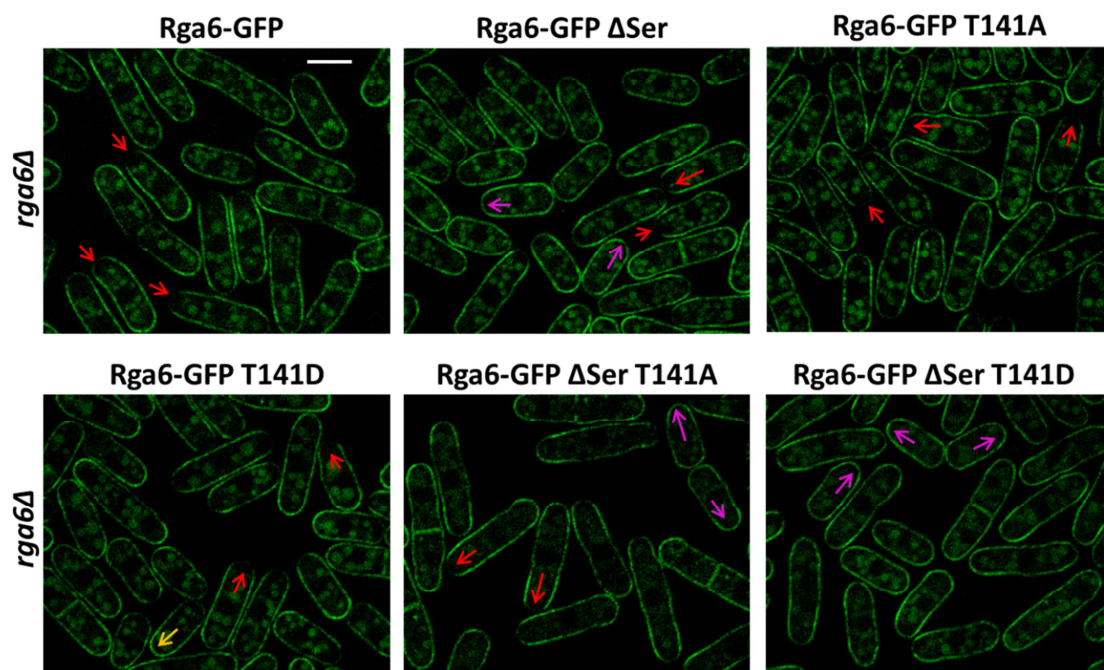


Figura 48. Regulación de los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento mediada por el extremo N-terminal de la proteína comprendido entre los aminoácidos 1 y 260. Micrografías de fluorescencia de Rga6-GFP o de sus versiones truncadas y/o mutadas. Las flechas rojas señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento. Las flechas amarillas señalan el ligero aumento de los niveles de la proteína Rga6-GFP T141D en algunos polos de crecimiento. Las flechas lilas señalan el patrón de localización uniforme de Rga6 por toda la membrana plasmática, observado en casi todas las células que producen la proteína Rga6-GFP Δ Ser T141D y en algunas células que producen las proteínas Rga6-GFP Δ Ser y Rga6-GFP Δ Ser T141A. Barra: 5 μ m.

Por último, se analizaron las células que llevaban la proteína Rga6 con la mutación de la treonina 141 y la delección de la región rica en serinas. El análisis por microscopía de fluorescencia mostró que Rga6-GFP Δ Ser T141A en algunas células se excluía de las zonas de crecimiento y en otras no, al igual que sucedía con la proteína Rga6-GFP Δ Ser. Sin embargo, la mayoría de las células con la proteína Rga6-GFP Δ Ser T141D mostraban una localización de esta proteína uniforme por toda la membrana plasmática (Figura 48).

Estos resultados sugieren que el hecho de que Rga6 Δ N-term2 no se excluya de las zonas de crecimiento se debe a un efecto aditivo de la T141 fosforilada y de la pérdida de la región de serinas, si bien, podrían participar otros aminoácidos de la región N-terminal.

En conjunto, todos estos resultados nos indican que la regulación de los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento es un proceso complejo, en el que participa el extremo N-terminal de la proteína, comprendido entre los aminoácidos 1 y 260, que incluye la treonina 141 y la región rica en serinas.

14 La región polibásica de Rga6 es necesaria y suficiente para la localización de la proteína en la membrana plasmática

Para ver si la región polibásica de Rga6, además de ser necesaria, también es suficiente para la localización de la proteína en la membrana plasmática, la secuencia de Rga6 que codifica los 33 aminoácidos finales de la proteína se fusionó en fase con la secuencia codificante de la proteína GFP, tanto en 3' (PBR-GFP) como en 5' (GFP-PBR). Posteriormente, se llevó a cabo la integración de estas fusiones, bajo el control del promotor y del terminador de *rga6*⁺, en el locus *leu1*⁺ de una cepa *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6* Δ .

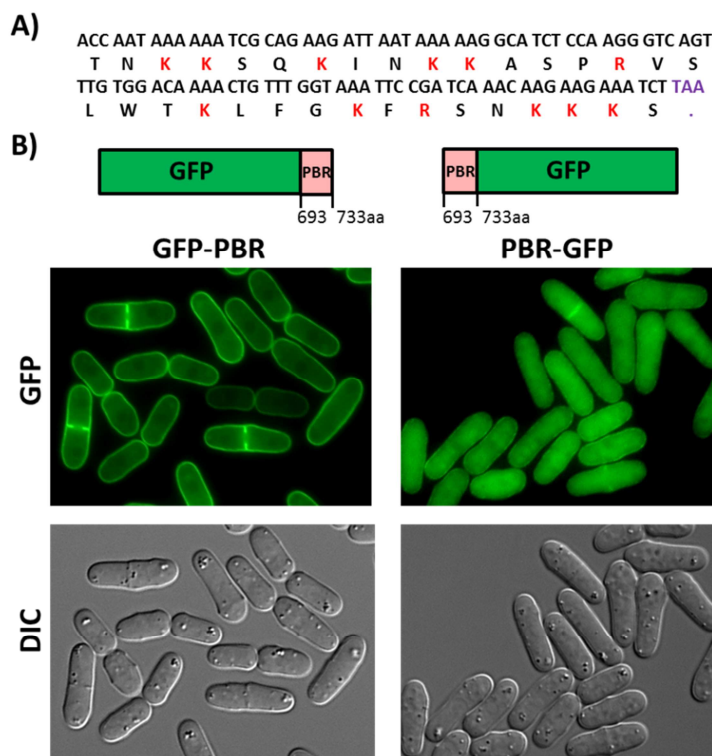


Figura 49. La región polibásica (PBR) de Rga6 es suficiente para que la proteína se localice en la membrana plasmática. A) Secuencia codificante de los 33 aminoácidos finales de Rga6 (700 - 733 aa) que constituyen la región polibásica. En rojo se señalan los aminoácidos con carga básica. En morado se señala el codón de terminación de Rga6. B) Esquema de las proteínas de fusión construidas, GFP-PBR o PBR-GFP y micrografías de fluorescencia y de contraste diferencial (DIC) de células que expresan estas proteínas.

Se analizó por microscopía de fluorescencia la localización de las proteínas de fusión GFP-PBR y PBR-GFP y se observó en ambos casos una localización uniforme por toda la membrana plasmática (**Figura 49**), si bien la fusión GFP-PBR era más eficiente en el anclaje a dicha membrana. Una posible explicación a este resultado podría ser que la fusión de la proteína GFP en el extremo amino o carboxilo de la región PBR de Rga6, de tan solo 33 aminoácidos, pudiese influir de diferente manera en el plegamiento y funcionalidad de esta región.

En base a estos resultados, se concluye que la región polibásica de Rga6 es necesaria y suficiente para la correcta localización de la proteína en la membrana plasmática.

Apartado III: Función de la proteína Rga6 en la regulación del crecimiento polarizado y su relación con Cdc42

15 Rga6 participa en la regulación de Cdc42 en los polos

En *S. pombe*, se ha descrito que la actividad de Cdc42 tiene un comportamiento oscilatorio en los polos de la célula. Este comportamiento oscilatorio está basado en la regulación de esta GTPasa por “feedbacks” positivos y negativos. Se ha propuesto que la proteína activadora Gef1 podría formar parte del “feedback” positivo, mientras que la quinasa Shk1/Pak1, una proteína efectora de Cdc42, podría formar parte del “feedback” negativo (Das *et al.*, 2012). En las células bipolares se observa una alternancia de los niveles de Cdc42 activa entre un polo y otro. Este hecho se ha descrito como un comportamiento oscilatorio anticorrelativo entre ambos polos debido a la competición por la GTPasa activa y a la disponibilidad de las proteínas reguladoras de Cdc42. Se ha propuesto, además, que las oscilaciones en los niveles de Cdc42 activa entre el polo viejo, dominante en las células monopolares y el polo nuevo, que compite por empezar a crecer, podrían participar en la transición a crecimiento bipolar o NETO (New End Take Off) que sucede en G2 (Das *et al.*, 2012; Das and Verde, 2013).

La proteína GAP Rga4 no participa en la regulación de los niveles de Cdc42 activa en los polos (Das *et al.*, 2012), posiblemente debido a su localización restringida a los lados de la célula. Por el contrario, Rga6 sí llega a los polos y los resultados de los ensayos de FRAP mostraron que su comportamiento en los polos de crecimiento es muy dinámico. Es posible por tanto que Rga6 participe en la regulación de la actividad de Cdc42 en los polos.

Se estudió en detalle la localización de Rga6 respecto a Cdc42 activa en los polos de las células, a lo largo del ciclo celular. Se utilizó una cepa que producía GFP-Rga6 y CRIB-td-Tomato y se adquirieron imágenes durante 2 h con un intervalo de 10 min (**Figura 50 A**).

En las células monopolares, GFP-Rga6 se localiza en el polo que no crece y está presente en niveles inferiores en el polo que está creciendo, marcado con CRIB-td-Tomato. Cuando la célula adquiere un patrón de crecimiento bipolar, la activación de Cdc42 en el polo nuevo se correlaciona con una disminución en los niveles de Rga6 en dicho polo, junto con un aumento de los niveles de la proteína GAP en el polo viejo. Una vez la célula comienza a septar, se detiene el crecimiento en los polos, donde aumentan los niveles de Rga6 y el crecimiento se dirige a la región central de la célula, donde se observa un aumento en los niveles de Cdc42 activa y una menor presencia de Rga6 (**Figura 50 A**).

Se utilizó esta misma cepa para adquirir imágenes a muy alta velocidad utilizando la opción de “streaming” del equipo Spinning Disk. Se capturaron 25 imágenes a intervalos de 0.5 s, empleando 200 ms de exposición para cada canal de fluorescencia. Sobre una de las imágenes capturadas, se midió la intensidad de fluorescencia de GFP-Rga6 y de CRIB-td-Tomato a lo largo de los polos de una célula monopolar o bipolar y se representaron los

valores sucesivos de intensidad en una gráfica (Figura 50 B). Se observó un comportamiento opuesto en las intensidades de las fluorescencias de CRIB-td-Tomato y GFP-Rga6. En base a estos resultados, se estudió si la proteína GAP Rga6 podría participar en la regulación de los niveles de Cdc42 activa en los polos de la célula.

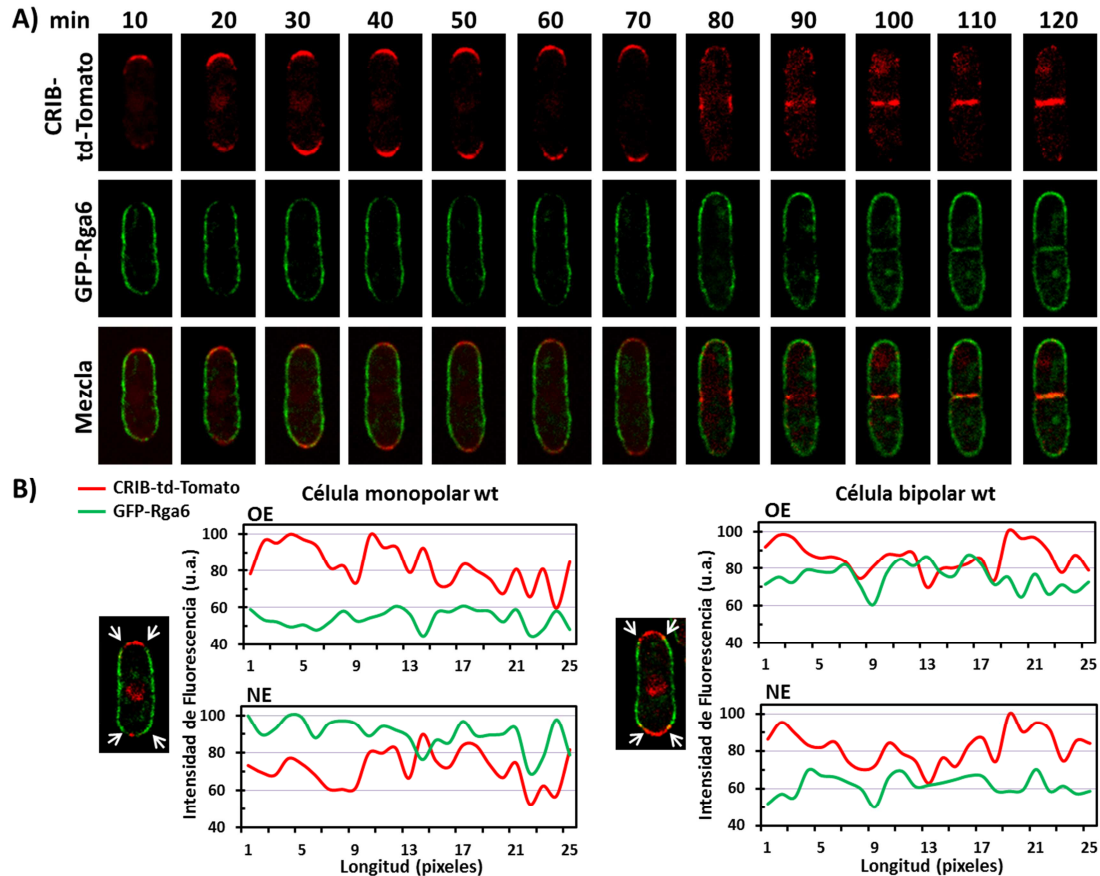


Figura 50. Localización de Rga6 en los polos de las células a lo largo del ciclo celular. **A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia en tiempo real (time-lapse) que muestran la localización de GFP-Rga6 y Cdc42 activa, marcada con CRIB-td-Tomato, a lo largo del ciclo celular y las imágenes solapadas de ambas señales de fluorescencia (mezcla). Las células se cultivaron a 25°C y se capturaron imágenes con un intervalo de 10 minutos durante 2 horas. **B)** Intensidad de fluorescencia de GFP-Rga6 y CRIB-td-Tomato en el polo viejo (OE) y en el polo nuevo (NE) de una célula monopolar (izquierda) y de una célula bipolar (derecha). Se utilizó la opción de “streaming” del equipo de microscopía confocal Spinning Disk para adquirir 25 imágenes con un intervalo de 0.5 s. Sobre una de las imágenes capturadas, se midió la intensidad de fluorescencia de las señales verde y roja en el polo de la célula, entre las dos flechas de la micrografía, con el programa Image J (u.a. = unidades arbitrarias).

Se utilizó la proteína CRIB-GFP para estudiar las oscilaciones en los niveles de Cdc42 activa en ausencia del gen *rga6*⁺ y dichas oscilaciones se compararon con las observadas en una célula silvestre. Se tomaron imágenes de células bipolares a intervalos de 1 min durante 30 min (Figura 51 A). Posteriormente, se analizaron los niveles de Cdc42 activa en los polos de las células y se representaron dichos valores a lo largo del tiempo (Figura 51 B).

En ausencia de *rga6*⁺ se mantienen las oscilaciones de Cdc42 activa en los polos de las células y su periodo, de aproximadamente 4 minutos, no varía respecto a lo descrito en una cepa silvestre. Sin embargo, el patrón oscilatorio de Cdc42 activa en las células *rga6* Δ muestra algunas diferencias respecto al observado en las células silvestres. Mientras que en una célula silvestre los niveles de Cdc42 activa que oscilan entre ambos polos son similares, en ausencia

de *rga6*⁺ los niveles de CRIB-GFP son mayores en el polo viejo de la célula, como se refleja en las imágenes de microscopía de fluorescencia y en las gráficas que muestran la cuantificación de dicha intensidad de fluorescencia (Figura 51 A y B). Además, en una cepa silvestre la alternancia en los niveles de Cdc42 activa entre ambos polos es muy regular, lo cual se refleja en un coeficiente de anti-correlación muy alto, característico de un comportamiento oscilatorio anticorrelativo entre ambos polos. Sin embargo, en ausencia de *rga6*⁺ se observa una anticorrelación mucho menor (coeficiente de correlación = -0.54 ± 0.11 en las células *rga6Δ* versus -0.78 ± 0.03 en las células wt, n = 10) (Figura 51 C).

En ausencia de *rga6*⁺ también se observa en ambos polos una amplitud de las oscilaciones menor a la observada en células silvestres. Además, mientras que dicha amplitud es similar en los dos polos de las células silvestres, en las células *rga6Δ* es menor en el polo nuevo respecto al polo viejo (Figura 51 D).

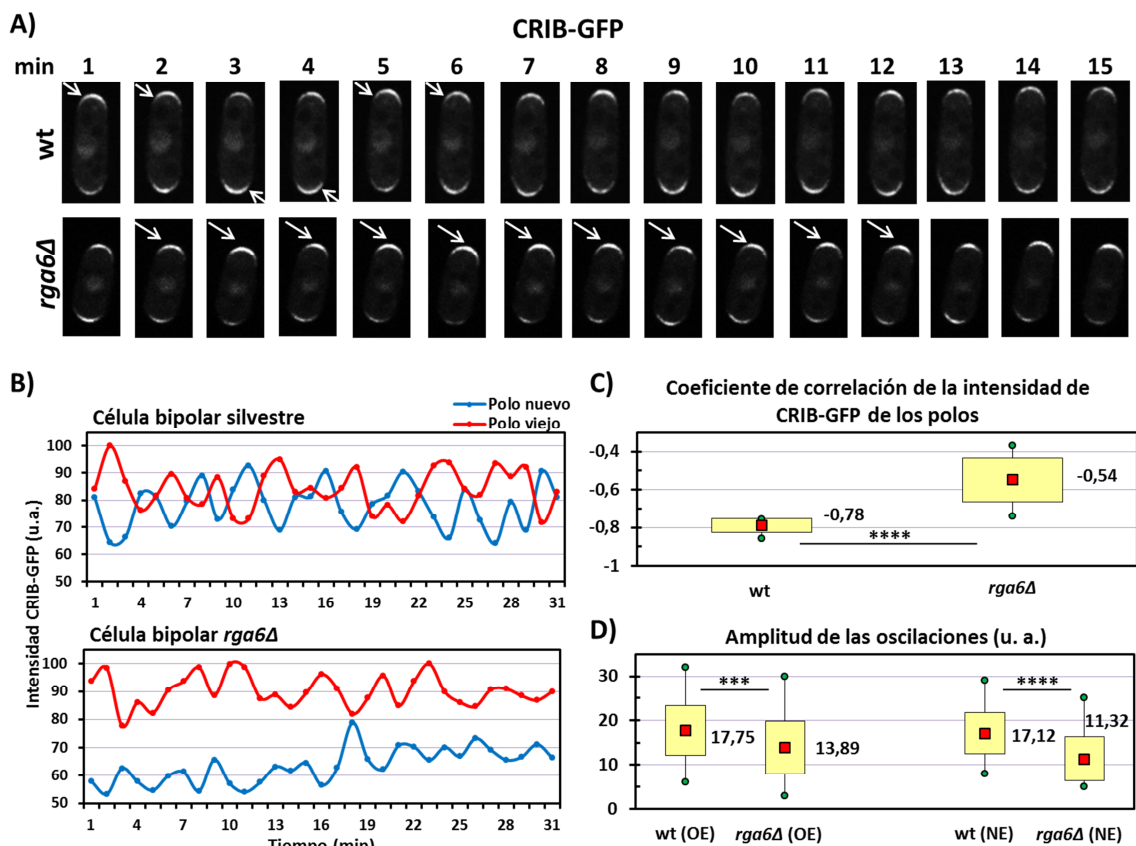


Figura 51. En ausencia de *rga6*⁺ se modifica la dinámica oscilatoria de Cdc42 activa en los polos celulares. **A)** Imágenes de microscopía de fluorescencia obtenidas en tiempo real (time-lapse) de Cdc42 activa, marcada con CRIB-GFP, en células silvestres bipolares (wt, parte superior) y en células *rga6Δ* bipolares (parte inferior). Las células se cultivaron a 28°C y se capturaron imágenes con un intervalo de 1 min durante 30 min. Las flechas señalan el polo con mayor señal de CRIB-GFP. **B)** Oscilaciones de CRIB-GFP en los polos viejo (rojo) y nuevo (azul) de una célula silvestre (gráfica superior) y de una célula *rga6Δ* (gráfica inferior). Las medidas de la intensidad de fluorescencia de CRIB-GFP se realizaron con el programa Image J y se normalizaron respecto al valor máximo de ambos polos (u.a. = unidades arbitrarias). **C)** Coeficiente de correlación entre los valores de intensidad de CRIB-GFP de los polos viejo y nuevo en células silvestres (wt) y *rga6Δ*. Se analizaron un total de 10 células de cada cepa. **D)** Amplitud de las oscilaciones en los polos viejos (OE) y nuevos (NE) en células silvestres (wt) y *rga6Δ* (u.a. = unidades arbitrarias). Se analizó la amplitud de 52 oscilaciones en las células silvestres y de 65 oscilaciones en las células *rga6Δ*. En las gráficas de C) y D) el cuadrado central rojo representa la media, cuyo valor se indica; los extremos superior e inferior de los rectángulos amarillos se corresponden con el valor de la media \pm la desviación estándar y los círculos verdes en los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos. Se realizó la prueba t de Student para calcular la significación estadística entre los diferentes datos: *** $p \leq 0.001$, **** $p \leq 0.0001$.

Si asumimos que los polos celulares compiten por la actividad de Cdc42 (Das *et al.*, 2012), el mayor nivel de activación de Cdc42 observado en el polo viejo de las células *rga6Δ* podría conllevar un menor crecimiento del polo nuevo. Para ver si esta asunción era correcta, se midió el crecimiento de ambos polos en las células silvestres y *rga6Δ*. Las células se tiñeron con FITC-lectina de *Bandeiraea simplicifolia* que se une a la galactosa y marca toda la pared de *S. pombe*. Posteriormente, las células se lavaron y cultivaron durante 2 horas y media a 28°C para permitir su crecimiento. Transcurrido este tiempo, se realizó una tinción con calcoflúor que marca los polos de crecimiento activo de la célula y se analizaron las células mediante microscopía de fluorescencia (Figura 52 A).

Se midió el crecimiento en los polos nuevo y viejo de las células, refiriéndolo a la longitud celular total y se calculó la proporción de crecimiento del polo nuevo respecto al viejo. También se calculó el porcentaje de células monopolares y bipolares en ambas cepas. En las células *rga6Δ*, el crecimiento del polo nuevo respecto al polo viejo es menor al observado en las células silvestres, lo que se asocia con un porcentaje ligeramente inferior de células bipolares en el cultivo (61.6% en las células *rga6Δ* versus 67.8% en las células silvestres, n = 240) (Figura 52 B y C).

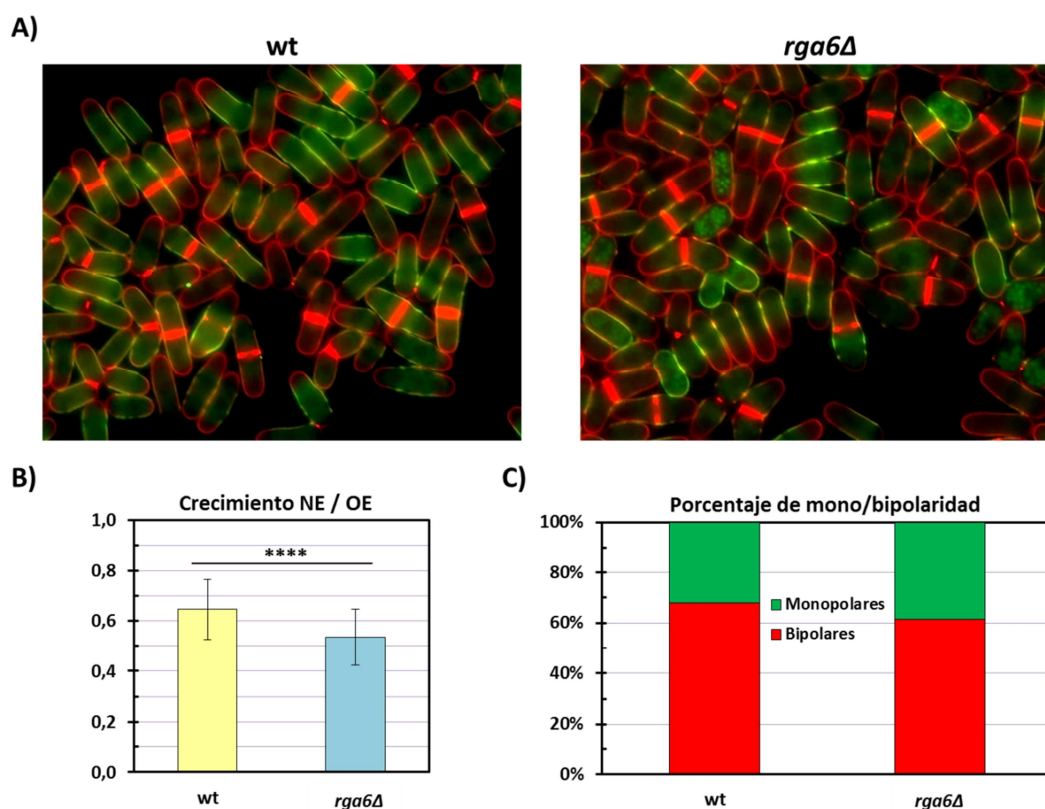


Figura 52. En las células carentes de Rga6 el crecimiento del polo nuevo es menor al observado en las células silvestres. A) Micrografías de fluorescencia de células silvestres (wt) y de células *rga6Δ* teñidas con la lectina de *Bandeiraea simplicifolia* marcada con fluoresceína (verde) y posteriormente cultivadas en medio mínimo a 28°C durante 2 horas y media para permitir su crecimiento. En el momento de la adquisición de las imágenes se realizó una tinción con calcoflúor (rojo) que tiñe las zonas de crecimiento activo. **B)** Proporción de crecimiento del polo nuevo (NE), respecto al polo viejo (OE), en las células del apartado anterior. Las medidas se realizaron con el programa Image J (n = 100 células de cada cepa). Se realizó la prueba t de Student para calcular la significación estadística de los datos: **** p ≤ 0.0001. **C)** Porcentaje de células monopolares y bipolares en la cepa silvestre (wt) y *rga6Δ* (n = 240 células de cada cepa). En el recuento no se tuvieron en cuenta las células con septo.

En conjunto, todos estos resultados indican que en ausencia de *rga6*⁺ la inhibición de los niveles de Cdc42 activa en el polo viejo de las células es menor, lo cual modifica su comportamiento oscilatorio, reflejándose en una menor amplitud de las oscilaciones y una menor anticorrelación entre ambos polos. Finalmente, estos cambios se traducen en un menor crecimiento del polo nuevo. Por lo tanto, la presencia transitoria de Rga6 en los polos de crecimiento parece contribuir a la regulación negativa de Cdc42 y a su comportamiento oscilatorio.

16 Estudio de la relación de Rga6 con los GEFs de Cdc42

Las dos proteínas GEFs descritas para Cdc42 son Gef1 y Scd1; ambas se localizan en las zonas de crecimiento, polos y septos, donde Cdc42 está activa y su eliminación simultánea es letal, lo que sugiere que Scd1 y Gef1 activan a esta GTPasa en sus funciones esenciales (Coll *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 1994; Fukui and Yamamoto, 1988; Hirota *et al.*, 2003). En el caso de la proteína Scd1, se ha descrito que desempeña un papel aditivo con la proteína GAP Rga4 en el control de la morfología celular de *S. pombe* (Kelly and Nurse, 2011). Para estudiar la relación de Rga6 con las proteínas GEFs de Cdc42, se estudió en primer lugar la interacción genética entre ellos. Así, se construyeron las cepas mutantes dobles *rga6Δ gef1Δ* y *rga6Δ scd1Δ* y se analizó su comportamiento en ensayos de crecimiento en gota. Además, se incluyeron en el análisis las cepas *rga4Δ gef1Δ* y *rga4Δ scd1Δ*, para poder analizar posibles diferencias entre ambas proteínas GAPs.

El crecimiento en placa de las distintas cepas mostró que *gef1*⁺ no presenta interacción genética aparente con *rga6*⁺ o con *rga4*⁺. En el caso de *scd1*⁺, sí se observó interacción genética negativa a 36°C que es ligeramente mayor con *rga4*⁺ que con *rga6*⁺ (Figura 53).

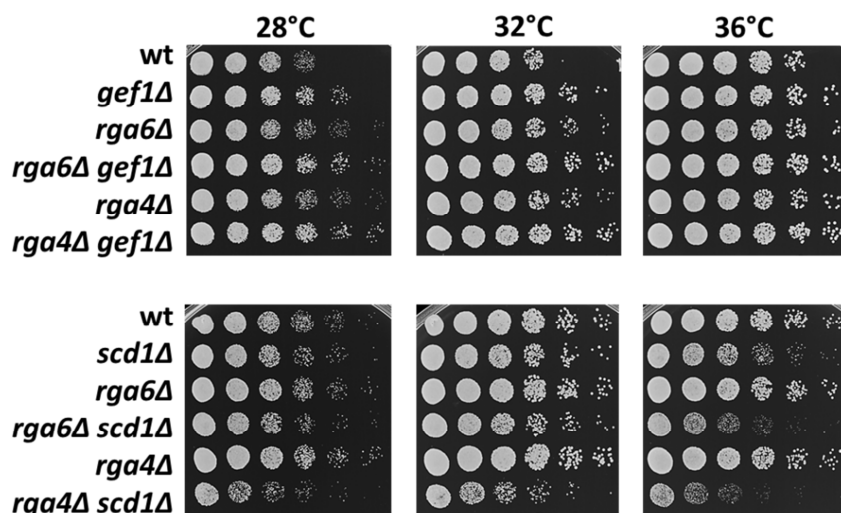


Figura 53. Estudio de la interacción genética de Rga6 con las proteínas GEFs de Cdc42. Ensayo de crecimiento en gota en placas de YES de los mutantes dobles *rga6Δ gef1Δ* y *rga4Δ gef1Δ* (en la parte superior) y de los mutantes dobles *rga6Δ scd1Δ* y *rga4Δ scd1Δ* (en la parte inferior). En todos los casos se utilizó como control una cepa silvestre (wt) y los respectivos mutantes sencillos. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-3 días.

A continuación, se analizó mediante microscopía el fenotipo de los mutantes dobles *GAPsΔ GEFsΔ* en cultivos líquidos. Las células *gef1Δ* son ligeramente más estrechas que una

cepa silvestre (Coll *et al.*, 2003) ($14.0 \mu\text{m} \pm 0.6$ versus $13.9 \mu\text{m} \pm 0.8$ y $3.6 \mu\text{m} \pm 0.3$ versus $3.8 \mu\text{m} \pm 0.3$, en el momento de la división celular ($n=70$ células de cada cepa)). La delección simultánea de *gef1⁺* y de *rga4⁺* produce una suma de fenotipos que resulta en células más cortas y más anchas (Kelly and Nurse, 2011). En las células *rga6Δ gef1Δ* también se observó un efecto aditivo de las delecciones simples sobre la morfología celular (longitud $13.0 \mu\text{m} \pm 0.7$ versus $13.3 \mu\text{m} \pm 0.6$ y diámetro $3.8 \mu\text{m} \pm 0.3$ versus $4.0 \mu\text{m} \pm 0.3$ para *rga6Δ gef1Δ* y *rga6Δ*, respectivamente, en el momento de la división celular ($n=70$ células de cada tipo)) (Figura 54). La proteína Gef1 se localiza en los polos y en el septo y tiene funciones parcialmente redundantes con Scd1, como demuestra la letalidad sintética de la delección doble *scd1Δ gef1Δ* (Coll *et al.*, 2003). En la zona de división, la activación de Cdc42 parece estar regulada en el tiempo, dependiendo de Gef1 en los momentos iniciales de la citocinesis y posteriormente de Scd1 para la formación del septo (Wei *et al.*, 2016). El efecto aditivo sobre la morfología celular observado en los mutantes dobles *rga4Δ gef1Δ* y *rga6Δ gef1Δ* confirma que Gef1, además de participar en el proceso de citocinesis, también debe de participar en la activación de Cdc42 en los polos y en el control de las dimensiones celulares. De hecho, la localización de Gef1 en los polos se regula por la proteína quinasa Orb6 y en la cepa mutante *orb6-25*, Gef1 se extiende hacia los lados, lo que conlleva la activación de Cdc42 y un incremento del diámetro de la célula (Das *et al.*, 2009).

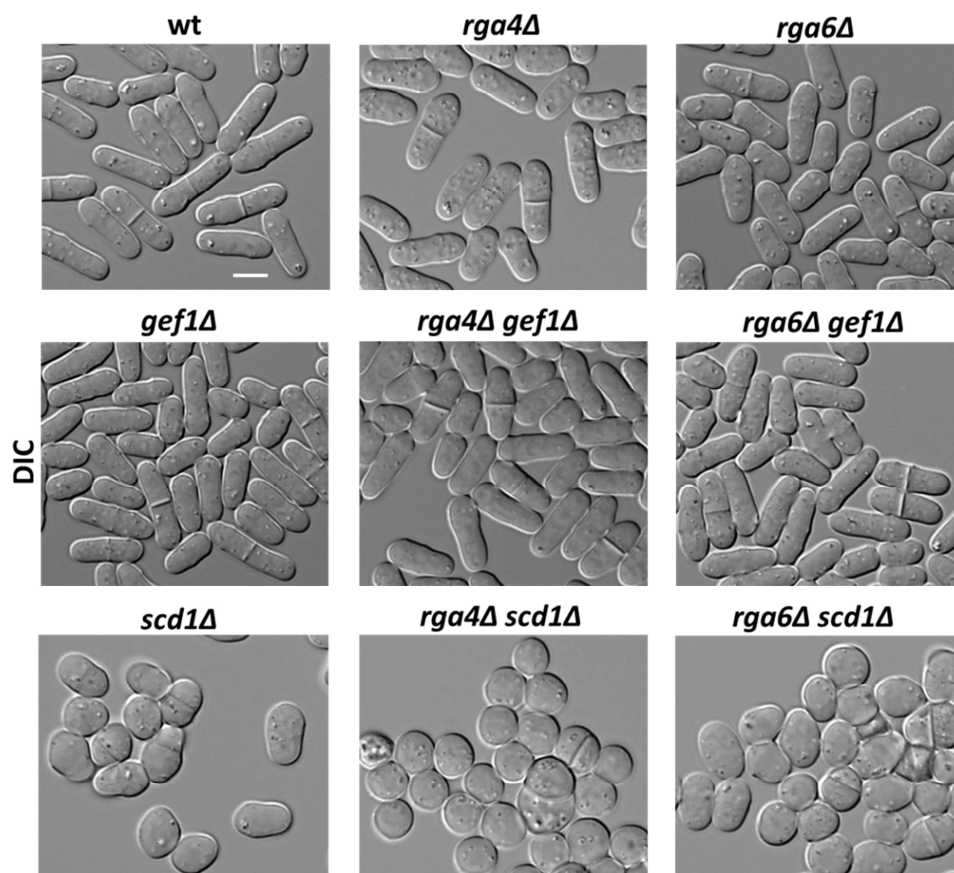


Figura 54. Morfología de las cepas mutantes dobles *GAPsΔ GEFsΔ*. Micrografías de contraste diferencial (DIC) que muestran la morfología de las cepas silvestre (wt), *rga4Δ*, *rga6Δ*, *gef1Δ*, *rga4Δ gef1Δ*, *rga6Δ gef1Δ*, *scd1Δ*, *rga4Δ scd1Δ* y *rga6Δ scd1Δ*. Se muestran células en fase logarítmica temprana cultivadas en medio rico a 28°C. Barra: 5 μm .

En ausencia de *scd1*⁺ las células presentan una morfología muy redondeada, aunque siguen polarizadas; el fenotipo redondeado de las células *scd1Δ* se acentúa en ausencia de *rga4*⁺, lo cual pone de manifiesto el papel aditivo de la proteína GAP Rga4 y del factor GEF Scd1 en el control de la morfología celular (Kelly and Nurse, 2011). Las células *rga6Δ scd1Δ* también tienen una morfología muy redondeada (Figura 54). Sin embargo, resultó difícil determinar si el fenotipo observado era similar al del mutante sencillo *scd1Δ* o si había un efecto aditivo de la ausencia de *rga6*⁺ y de *scd1*⁺.

Para acentuar las posibles diferencias morfológicas de las cepas mutantes, se utilizó hidroxíurea, HU, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa que bloquea la progresión del ciclo celular, pero permite que las células sigan creciendo (Sazer and Sherwood, 1990). Tras cultivar las células durante 5 h en presencia de HU 12 mM, se observó su morfología mediante microscopía. Se comprobó que, a diferencia de las células *rga4Δ scd1Δ* que presentan una morfología redondeada, el mutante doble *rga6Δ scd1Δ* mantiene el fenotipo ligeramente polarizado de las células *scd1Δ* (Figura 55). Estos resultados sugieren que, a diferencia de Rga4, Rga6 podría depender de Scd1 para controlar la morfología celular.

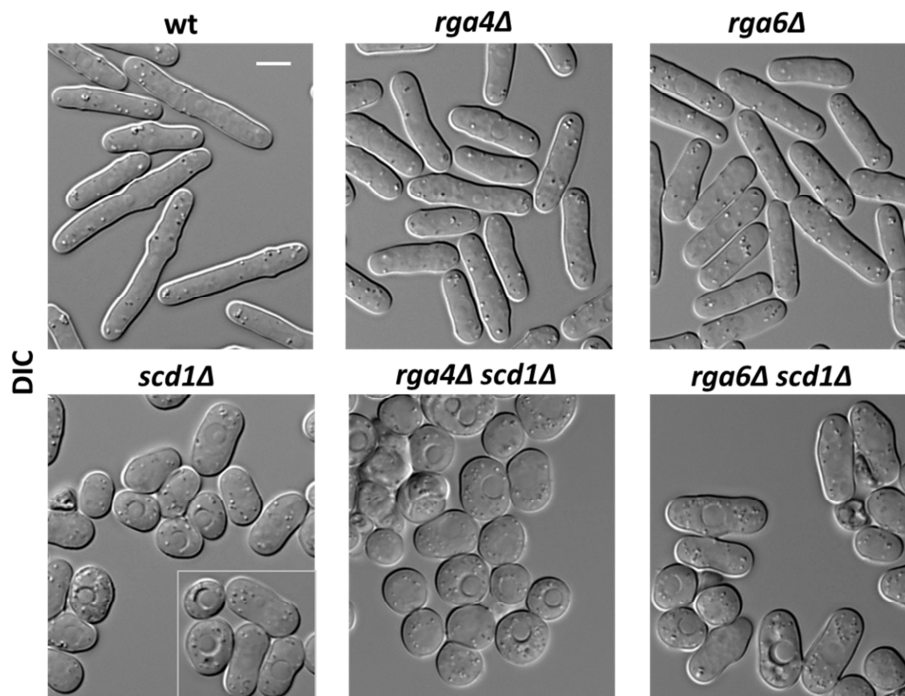


Figura 55. La eliminación de Rga6 carece de efecto en ausencia de Scd1. Micrografías de contraste diferencial (DIC) que muestran la morfología de las cepas silvestre (wt), *rga4Δ*, *rga6Δ*, *scd1Δ*, *rga4Δ scd1Δ* y *rga6Δ scd1Δ* cultivadas durante 5 horas en presencia de hidroxíurea (HU) 12 mM en medio rico a 28°C. Barra: 5µm.

Además del papel aditivo de Rga4 y de Scd1 controlando la morfología celular de *S. pombe*, se ha descrito que su localización en la célula es mutuamente independiente (Kelly and Nurse, 2011). Se analizó si la localización de Rga6 podría depender de los factores GEFs de Cdc42, Gef1 y Scd1.

Para realizar estos estudios, se llevó a cabo la integración de la ORF de *rga6*⁺, marcada en su extremo carboxilo con GFP, en el locus *leu1*⁺ de las cepas *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ gef1Δ* y *rga6Δ scd1Δ*. La proteína Rga6-GFP se expresó bajo el control del promotor y del

terminador de *rga6⁺*, como se describe en el apartado 5.8.2 de Materiales y Métodos. Como control se utilizó la cepa *rga6Δ* que produce la proteína Rga6-GFP integrada en el locus *leu1⁺*.

Se analizó por microscopía de fluorescencia la localización de Rga6-GFP en las cepas construidas y se observó que tanto en la cepa control como en la cepa sin *gef1⁺*, Rga6 se localiza en la membrana plasmática formando nodos discretos y su concentración disminuye en los polos de crecimiento. Sin embargo, en las células *scd1Δ* los nodos de Rga6 se extienden uniformemente por toda la membrana plasmática (**Figura 56 A**). Para observar con mayor claridad este defecto en la localización de Rga6, se cultivaron las células durante 5 h en presencia de HU 12 mM. Ello permitió acentuar el fenotipo polarizado de las células *scd1Δ* y observar mejor que Rga6-GFP se extendía por toda la membrana plasmática (**Figura 56 B**). Estos resultados sugieren que la exclusión de Rga6 del polo de crecimiento podría ser dependiente de la proteína Scd1, un regulador positivo de la GTPasa Cdc42.

A continuación, se estudió si la localización de Scd1 podría verse afectada por la ausencia de *rga6⁺*. Para ello se observó la proteína Scd2 marcada en su propio locus con GFP. Scd2 es una proteína adaptadora de Scd1 y ambas son mutuamente dependientes para su localización (Kelly and Nurse, 2011). Scd2-GFP se localiza correctamente en los polos y en el septo tanto en una cepa silvestre como en la cepa *rga6Δ* (**Figura 56 C**).

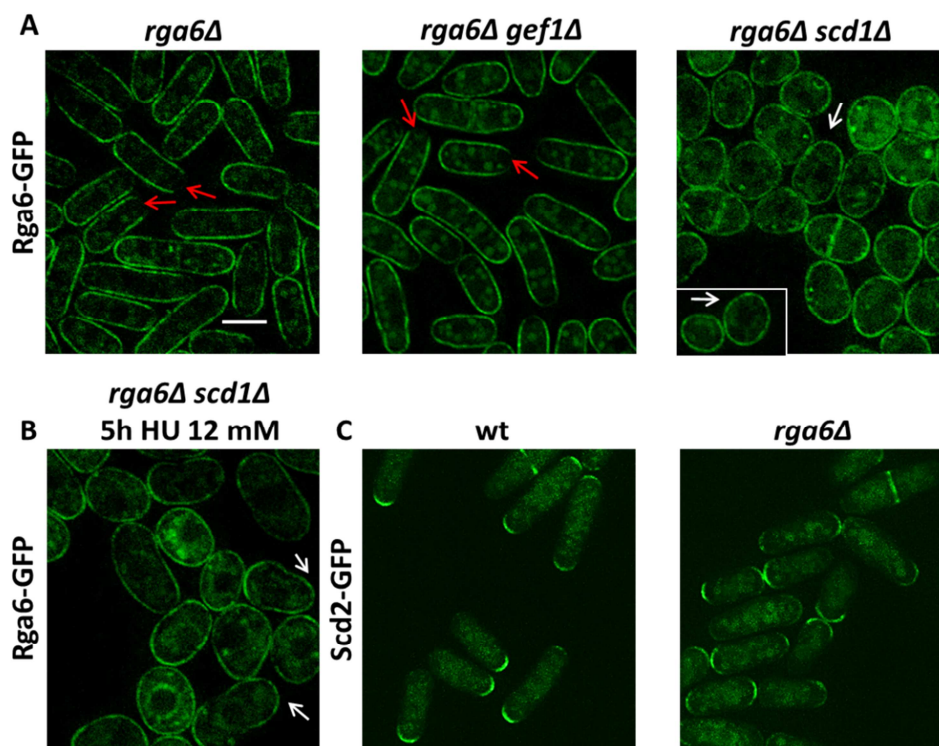


Figura 56. Rga6 se localiza homogéneamente por la membrana plasmática en las células *scd1Δ*. **A)** Micrografías de fluorescencia de Rga6-GFP integrada en el locus *leu1⁺* de las células *rga6Δ*, *rga6Δ gef1Δ*, *rga6Δ scd1Δ* y **B)** en células *rga6Δ scd1Δ* cultivadas durante 5 horas en presencia de hidroxIUrea (HU) 12 mM. Las flechas rojas en las células *rga6Δ* y *rga6Δ gef1Δ* señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento. Las flechas blancas en las células *rga6Δ scd1Δ* señalan la extensión de Rga6 por la membrana plasmática. **C)** Micrografías de fluorescencia de la proteína Scd2-GFP en las células silvestres (wt) y *rga6Δ*. En todos los casos se muestran células en fase logarítmica temprana cultivadas en medio rico a 28°C. Barra: 5 μm.

Se analizó también la localización de Scd2-GFP y de CRIB-GFP en células que sobreexpresaban *rga6⁺* o *rga4⁺*. Se utilizó el vector integrativo pJK-148 para integrar la ORF de

rga6⁺, bajo el promotor *nmt1*, en el locus *leu1*⁺ de las cepas *rga6Δ scd2-GFP* y *rga6Δ CRIB-GFP*, como se describe en el apartado 5.8.1 de Materiales y Métodos. Del mismo modo se realizó la sobreexpresión integrada de *rga4*⁺ en el genoma de las cepas *rga4Δ scd2-GFP* y *rga4Δ CRIB-GFP*. Se confirmó así que Scd2, y por extensión Scd1, se localiza exclusivamente en el polo de crecimiento donde la GTPasa Cdc42 está activa (**Figura 57**).

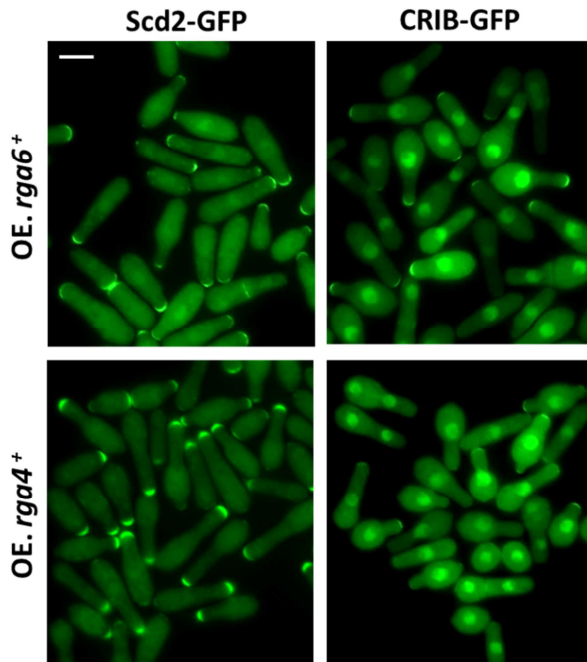


Figura 57. En la sobreexpresión de *rga6*⁺ y de *rga4*⁺, Scd1 activa a Cdc42 en el polo que crece. Micrografías de fluorescencia de Scd2-GFP y CRIB-GFP en células que sobreexpresan *rga6*⁺ (paneles superiores) o *rga4*⁺ (paneles inferiores). Las células se cultivaron durante 22 h sin tiamina a 28°C. Barra: 5µm.

Estos resultados sugieren que la localización de Scd2, y por extensión de Scd1, no depende de Rga6 ni de Rga4.

Finalmente, para analizar posibles diferencias entre las proteínas GAPs Rga6 y Rga4 respecto a su relación con los GEFs de Cdc42, se estudió si la ausencia de *gef1*⁺ o de *scd1*⁺ podría alterar el fenotipo observado en la sobreexpresión de *rga6*⁺ o de *rga4*⁺. Se cultivaron las células durante 22 h en ausencia de tiamina y mediante microscopía se observó su morfología. En ausencia de *gef1*⁺ no se observaron cambios en el fenotipo de sobreexpresión de *rga6*⁺ (**Figura 58 A**). En el caso de *rga4*⁺, la morfología no varió pero se observó un porcentaje más elevado de células septando, lo cual sugiere que la sobreexpresión de *rga4*⁺ acentúa el defecto de citocinesis que presentan las células *gef1Δ*. En ausencia de *scd1*⁺ ni la sobreproducción de Rga6 ni la de Rga4 produjeron el fenotipo característico. En ambos casos se observaron células redondeadas debido a la delección de *scd1*⁺. Sin embargo, en el caso de Rga4 se observaron algunas células puntiagudas que han sido capaces de polarizar, mientras que eso no sucede con la sobreproducción de Rga6 (**Figura 58 A**).

Estos resultados podrían indicar que Rga6 requiere la presencia de Scd1 para ejercer su efecto mientras que, como ya se ha descrito (Kelly and Nurse, 2011), la función de Rga4 es independiente de este GEF.

Se analizó también cómo se localiza la proteína GAP Rga6 sobreproducida en ausencia de *scd1*⁺. Para ello, se llevó a cabo la integración de *Pnmt1-GFP-rga6*⁺ en el locus *leu1*⁺ de la cepa *scd1Δ rga6Δ*. Como control se utilizó la sobreexpresión integrada de *GFP-rga6*⁺ en las

células *rga6Δ*. Se cultivaron las células durante 22 h en ausencia de tiamina y se observó la localización de GFP-Rga6 sobreproducida. Mientras que en las células control GFP-Rga6 se localiza por toda la membrana plasmática y sus niveles disminuyen en el polo de crecimiento, en la cepa *scd1Δ* se observó que la proteína GAP se localiza uniformemente por toda la membrana plasmática de las células redondas (Figura 58 B).

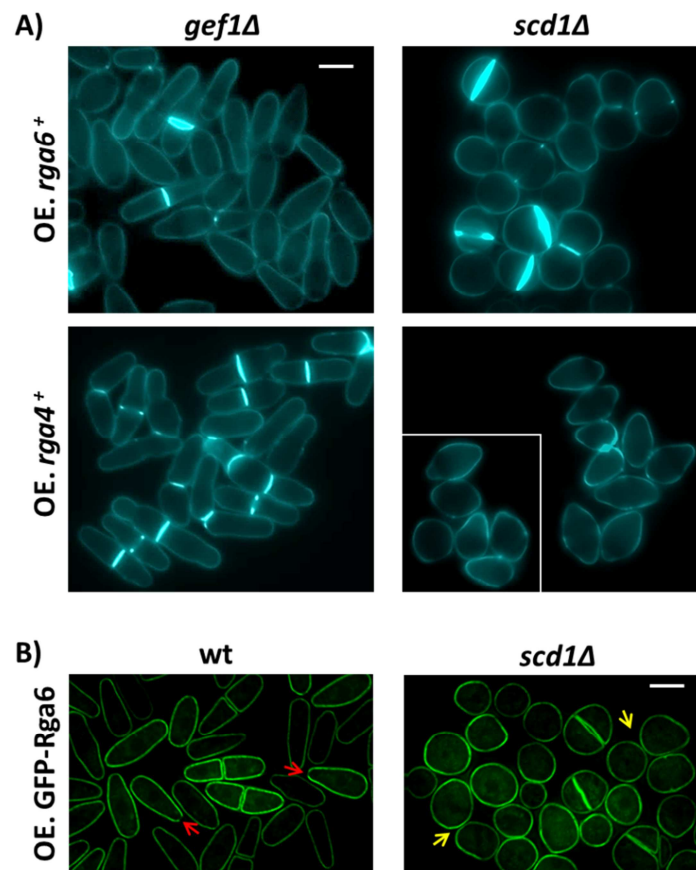


Figura 58. Relación funcional de las proteínas Rga6 y Rga4 con las proteínas GEFs de Cdc42. **A)** Micrografías de fluorescencia de células *gef1Δ* y *scd1Δ* teñidas con calcoflúor que sobreexpresan *rga6*⁺ (parte de arriba) y *rga4*⁺ (parte de abajo) integrados en el locus *leu1*⁺. **B)** Micrografías de fluorescencia de células control (wt) y *scd1Δ* que sobreexpresan *GFP-rga6*⁺ integrado en el locus *leu1*⁺. Las flechas rojas señalan la menor concentración de GFP-Rga6 observada en el polo de crecimiento. Las flechas amarillas señalan la extensión de GFP-Rga6 por la membrana plasmática en ausencia de *scd1*⁺. Las células se cultivaron durante 22 h sin tiamina a 28°C. Barra: 5μm.

Este resultado sugiere que la exclusión de la proteína GAP Rga6 del polo de crecimiento podría ser dependiente de Scd1, una proteína reguladora positiva de la GTPasa Cdc42.

17 Relación de Rga6 con la formina For3

Los resultados presentados sugieren que los niveles disminuidos de Rga6 en los polos de crecimiento podrían estar relacionados con las proteínas Scd1 y For3 ya que, tanto en ausencia de *scd1*⁺ como de *for3*⁺, se observa una localización homogénea de Rga6 por toda la membrana plasmática (Figuras 37 B y 56 B). La formina For3 es localizada y activada por Cdc42 (Martin *et al.*, 2007) y está implicada en la formación de los cables de actina en interfase. Estos cables participan, junto con las miosinas de tipo V (Myo51 y Myo52), en el movimiento de las

vesículas secretoras hacia las zonas de crecimiento activo (Feierbach and Chang, 2001; Motegi *et al.*, 2001). Se ha descrito que For3 está menos concentrada en los polos de las células *rga4Δ* (Das *et al.*, 2007). Del mismo modo, For3 y la miosina Myo52 parecen estar ligeramente más dispersas en los polos de las células *rga6Δ* que en los de las células silvestres (Figura 59). Se realizó también una tinción de actina en las células silvestres y en las células *rga6Δ*. Sin embargo, no se observaron variaciones significativas ni en los cables ni en los parches de actina (Figura 59).

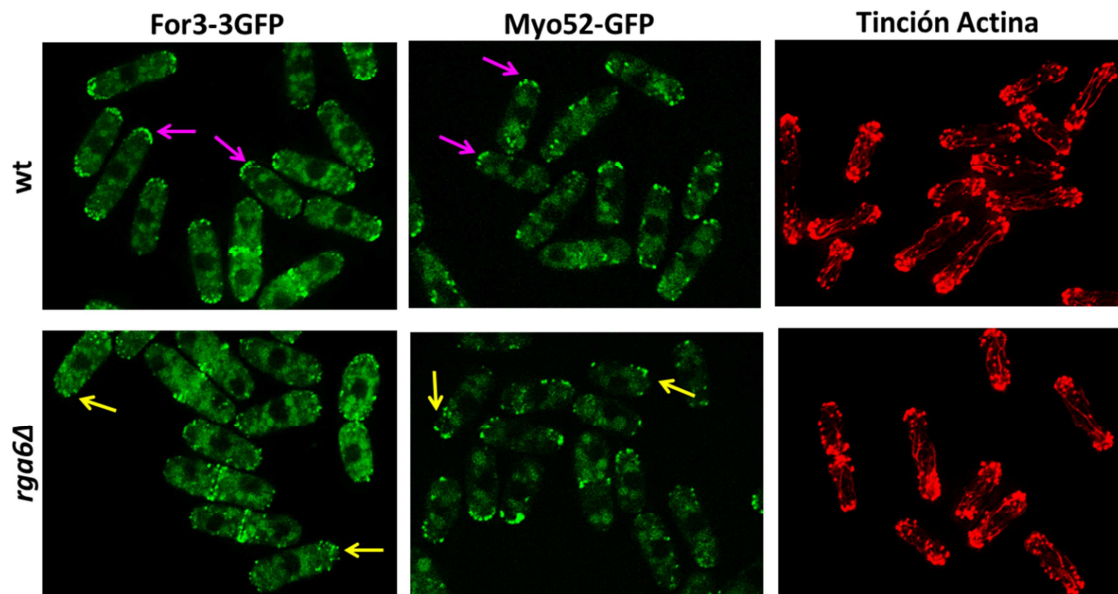


Figura 59. Relación de las proteínas Rga6 y For3. Micrografías de fluorescencia que muestran la proyección máxima de varios planos en el eje Z de la localización de For3-3GFP, Myo52-GFP y la tinción del citoesqueleto de actina en células silvestres (wt) y *rga6Δ*. Las flechas rosas en las células silvestres señalan la localización definida de For3-3GFP y Myo52-GFP en los polos. Las flechas amarillas señalan la dispersión de For3 y de Myo52 en los polos de las células *rga6Δ*. Las células observadas estaban en fase logarítmica de crecimiento en medio YES a 28°C.

Para ver si existía interacción genética entre Rga6 y la proteína For3, se construyó la cepa mutante doble *for3Δ rga6Δ* y se realizó un ensayo de crecimiento en gota. Se incluyó en el análisis la cepa *for3Δ rga4Δ* para poder analizar posibles diferencias entre ambas proteínas GAPs respecto a su relación con la proteína efectora de Cdc42, For3. El crecimiento en placa de las cepas a distintas temperaturas mostró que los mutantes dobles *for3Δ rga6Δ* y *for3Δ rga4Δ* crecen peor que las deleciones simples a altas temperaturas, siendo la interacción genética negativa entre *rga6⁺* y *for3⁺* mayor a la observada entre *rga4⁺* y *for3⁺* (Figura 60 A).

Se analizó mediante microscopía el fenotipo de las células en cultivos líquidos y se observó en los mutantes dobles un aumento de la lisis celular respecto a los mutantes simples. De nuevo, aunque tanto la deleción de *rga6⁺* como la de *rga4⁺* agrava el fenotipo de las células *for3Δ*, el efecto es mucho más marcado en las células *for3Δ rga6Δ* (Figura 60 B y C).

Se estudió también si la ausencia de *for3⁺* podría alterar el fenotipo de sobreexpresión de *rga6⁺*. También se incluyó en el análisis la sobreexpresión de *rga4⁺* para seguir analizando posibles diferencias entre ambas proteínas GAPs respecto a su relación con For3. Se utilizó el vector pJK-148 para integrar *Pnmt1-rga6⁺* o *Pnmt1-rga4⁺* en el locus *leu1⁺* de las cepas *for3Δ rga6Δ* o *for3Δ rga4Δ*, respectivamente. Se cultivaron las células durante 22 h en ausencia de tiamina y mediante microscopía se observó su morfología. El fenotipo de sobreexpresión de

rga4⁺ se mantiene en las células *for3Δ*. Sin embargo, la sobreexpresión de *rga6⁺* en ausencia de *for3⁺* da lugar a células redondeadas (Figura 61).

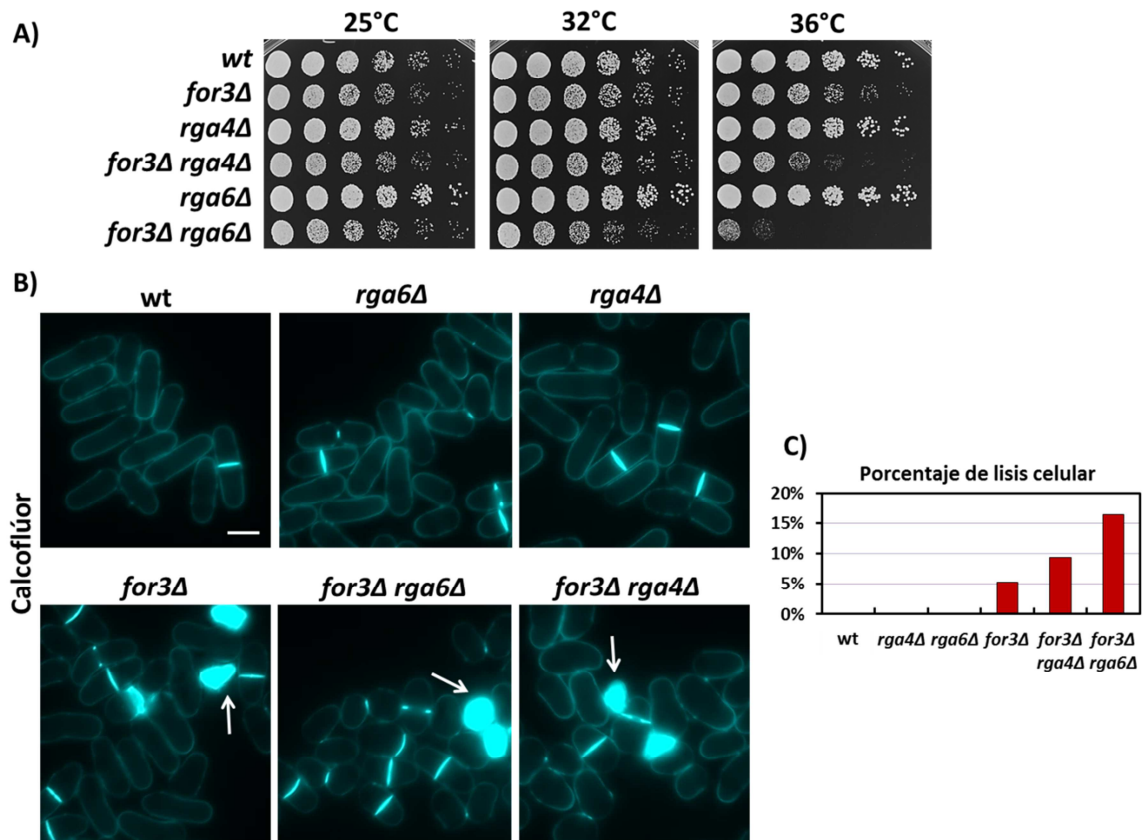


Figura 60. Interacciones genéticas de *rga6⁺* y *rga4⁺* con *for3⁺*. **A)** Ensayo de crecimiento en gota en placas de YES de las cepas mutantes dobles *for3Δ rga4Δ* y *for3Δ rga6Δ*. Se utilizaron como control una cepa silvestre (wt) y las respectivas cepas mutantes parentales. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-3 días. **B)** Micrografías de fluorescencia de las cepas del apartado anterior teñidas con calcoflúor. Las flechas blancas señalan las acumulaciones de calcoflúor en el interior de las células muertas. Se muestran células creciendo en fase logarítmica en medio rico a 28°C. Barra: 5µm. **C)** Porcentaje de lisis celular observado a 28°C en las cepas mutantes sencillas y dobles.

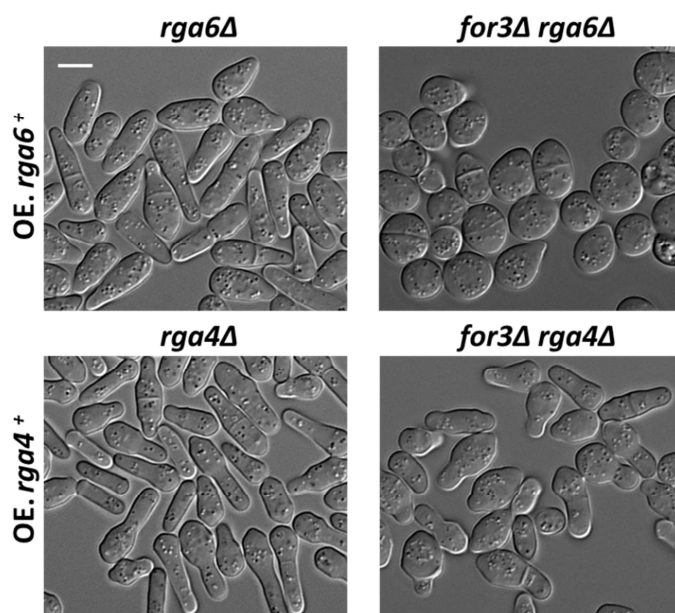


Figura 61. El fenotipo morfológico de la sobreexpresión de *rga6⁺* se suprime en las células *for3Δ*. Micrografías de contraste diferencial (DIC) de células *rga6Δ* y *for3Δ rga6Δ* que sobreexpresan *rga6⁺* (parte de arriba) y de células *rga4Δ* y *for3Δ rga4Δ* que sobreexpresan *rga4⁺* (parte de abajo), integrados en el locus *leu1⁺*. Las células se cultivaron durante 22 h sin tiamina a 28°C. Barra: 5µm.

Como era previsible, la proteína GFP-Rga6 sobreproducida se localiza homogéneamente por toda la membrana plasmática en ausencia de *for3*⁺ y sus niveles no disminuyen en el polo de crecimiento, como ocurre en las células silvestres (Figura 62).

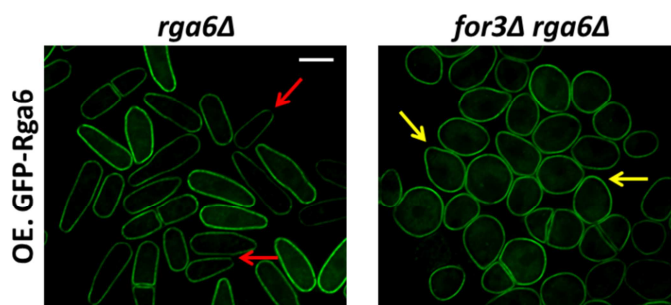


Figura 62. Rga6 sobreproducida se localiza homogéneamente por la membrana plasmática en las células *for3Δ*. Micrografías de fluorescencia de células *rga6Δ* y *for3Δ rga6Δ* que sobreexpresan *GFP-rga6*⁺ integrado en el locus *leu1*⁺. Las flechas rojas señalan la menor concentración de GFP-Rga6 observada en el polo de crecimiento. Las flechas amarillas señalan la extensión de GFP-Rga6 por la membrana plasmática en ausencia de *for3*⁺. Las células se cultivaron durante 22 h sin tiamina a 28°C. Barra: 5μm.

Este resultado sugiere de nuevo que la exclusión parcial de Rga6 de las zonas de crecimiento podría depender de la llegada de vesículas a través de los cables de actina formados por For3, que suponen tanto un aporte de nueva membrana como de las proteínas asociadas a ella.

En el control de la morfología celular realizado por Cdc42 son fundamentales dos procesos. Por un lado, los cables de actina formados por For3 que facilitan la secreción polarizada y por otro, la fusión de las vesículas de secreción con la membrana plasmática mediada por el complejo proteico denominado exocisto, cuya localización está regulada por Cdc42 (Bendezú and Martin, 2011; Estravís *et al.*, 2011). Sin embargo, hasta la fecha no está claro como Cdc42 regula este complejo proteico. Se contempló la posibilidad de que la mayor interacción genética observada entre Rga6 y For3 pudiera ser debida a un papel diferencial de Rga6 y Rga4 controlando la función de Cdc42, en relación con esta formina y con el exocisto. Para estudiar esta hipótesis se analizó la relación entre cada proteína GAP y los componentes del exocisto Exo70, Sec3 y Sec8.

La composición del complejo del exocisto está muy conservada en los organismos eucariotas y consta de 8 subunidades únicas: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84. En la levadura de fisión todas son esenciales, salvo Exo70, cuya delección es viable a temperaturas inferiores a 36°C. Por ello se utilizaron cepas mutantes termosensibles de *sec3* y *sec8* y la delección de *exo70*. A la temperatura restrictiva de 36°C, las células *exo70Δ* y las cepas termosensibles *sec3-2* y *sec8-1* tienen defectos en la degradación del septo, lo que genera células multiseptadas y defectos generales de secreción (Bendezú *et al.*, 2012; Jourdain *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2002).

Se construyeron mutantes dobles de estas cepas y *rga6Δ* o *rga4Δ* y se estudió la interacción genética mediante ensayos de crecimiento en gota. En ningún caso se observaron diferencias significativas entre los mutantes dobles y los simples de los componentes del exocisto analizados (Figura 63). Se analizó mediante microscopía el fenotipo de las células en cultivos líquidos. En todos los mutantes dobles, con independencia de la proteína GAP

ausente, se observó un fenotipo aditivo de multiseptación y células más anchas y cortas (Figura 64).

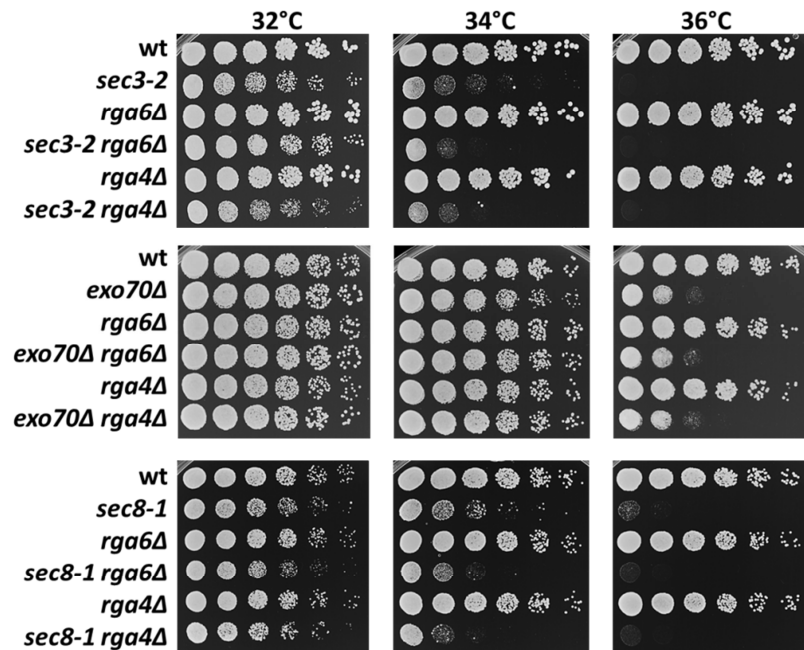


Figura 63. Estudio de la posible relación funcional entre las proteínas GAPs y los componentes del exocisto. Ensayo de crecimiento en gota en placas de YES de las cepas mutantes dobles *sec3-2 rga6Δ* y *sec3-2 rga4Δ* (panel superior), *exo70Δ rga6Δ* y *exo70Δ rga4Δ* (panel central) y *sec8-1 rga6Δ* y *sec8-1 rga4Δ* (panel inferior). En todos los casos se utilizaron como control una cepa silvestre (wt) y las respectivas cepas mutantes parentales. Las placas se incubaron a las temperaturas indicadas durante 2-3 días.

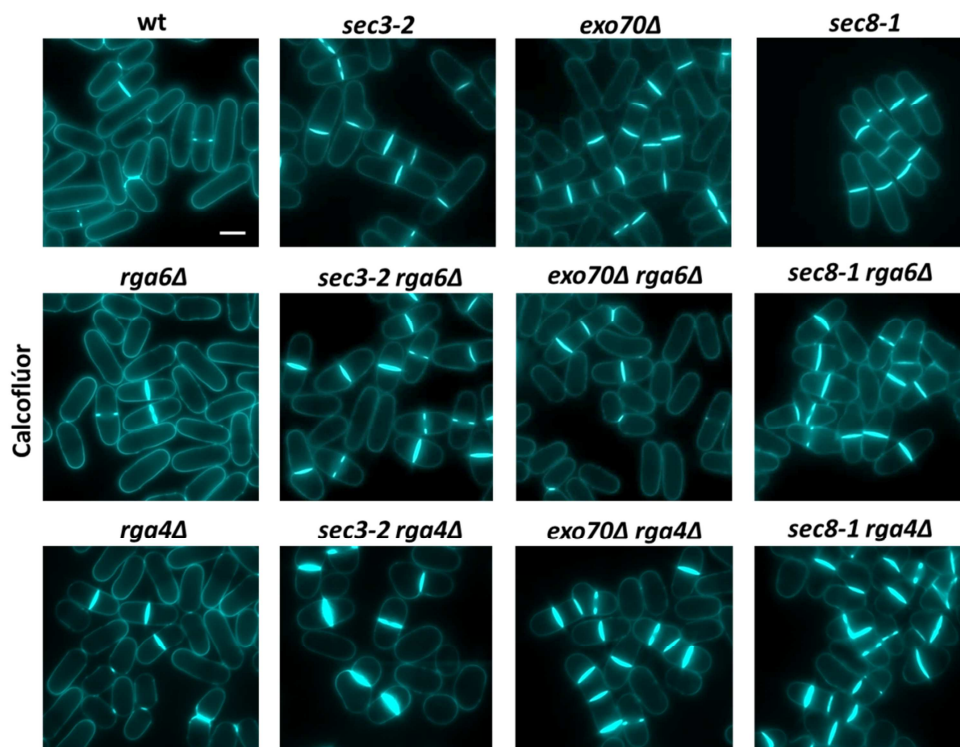


Figura 64. Estudio de la posible relación funcional entre las proteínas GAPs y los componentes del exocisto. Micrografías de fluorescencia de la tinción con calcofluor de las células utilizadas en la Figura 63 incubadas a 36°C durante 4 h. Barra: 5μm.

En función de los resultados de estos experimentos genéticos iniciales, no se han encontrado evidencias que permitan concluir que las diferencias observadas entre los mutantes dobles *for3Δ rga6Δ* y *for3Δ rga4Δ* sean debidas a un papel diferencial entre Rga6 y Rga4 controlando la función de Cdc42 en su regulación del excisto.

18 Intercambio de los dominios GAPs de Rga6 y de Rga4

Los resultados descritos indican que Rga6 es una nueva proteína reguladora GAP de Cdc42 que regula, junto con Rga4, las dimensiones celulares de *S. pombe*. A pesar de las similitudes entre ambas proteínas GAPs, se observan ligeras diferencias en sus fenotipos de delección y de sobreexpresión. Para determinar si las diferencias observadas entre ambas proteínas GAPs eran debidas a una regulación distinta sobre Cdc42 en el espacio y/o en el tiempo, se intercambiaron los dominios GAPs de Rga6 y Rga4 y se analizó tanto la localización de las nuevas proteínas generadas como su repercusión sobre la morfología celular. Utilizando como referencia las Argininas importantes para la actividad GAP que están conservadas en Rga6 y Rga4 y en función de la similitud de la secuencia de aminoácidos con otros dominios GAPs, se delimitó el dominio GAP de Rga6 entre los aminoácidos 329 y 547 de la proteína y el dominio GAP de Rga4 entre los aminoácidos 758 y 933 (Figura 43 A). El intercambio de las secuencias que codifican los dominios GAPs en las ORFs de *rga4⁺* y de *rga6⁺* se realizó tal y como se describe en el apartado 5.8.4 de Materiales y Métodos y a todas las construcciones se le fusionó, en fase de lectura y en el extremo 3', la secuencia codificante de la proteína GFP. La ORF *rga6⁺GAPrga4⁺* marcada con GFP se integró, bajo el control del promotor y terminador de *rga6⁺*, en el locus *leu1⁺* de una cepa *rga6Δ* y la ORF *rga4⁺GAPrga6⁺* marcada con GFP se integró, bajo el control del promotor y terminador de *rga4⁺*, en el locus *leu1⁺* de una cepa *rga4Δ*. Se utilizaron como control las cepas que llevan las proteínas Rga6-GFP o Rga4-GFP integradas en el locus *leu1⁺* (Figura 65).

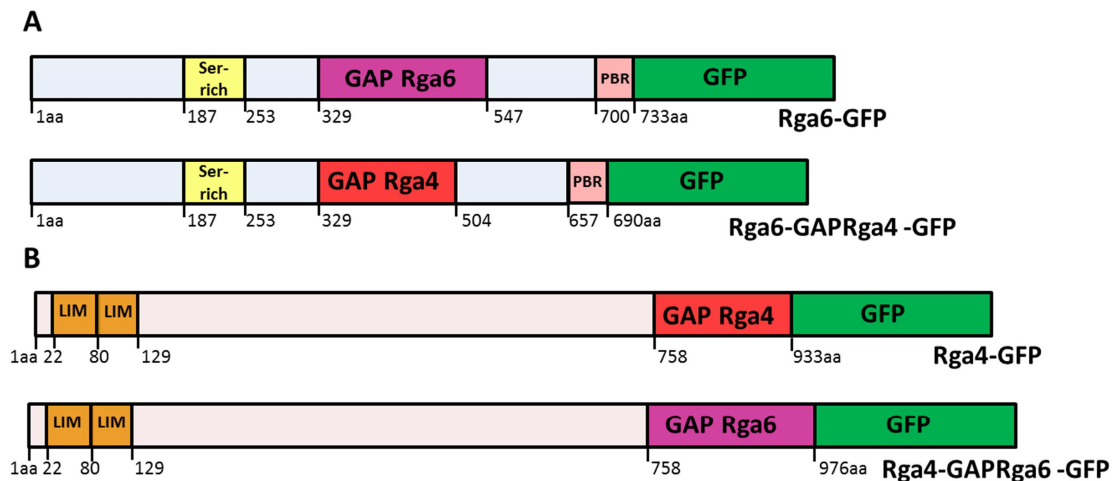


Figura 65. Esquema de las proteínas quiméricas de Rga6 y Rga4. A) Esquema de Rga6-GFP y de la quimera Rga6-GAPRga4-GFP, en la cual se ha reemplazado el dominio GAP de Rga6 (219 aa) por el dominio GAP de Rga4 (176 aa). **B)** Esquema de Rga4-GFP y de la quimera Rga4-GAPRga6-GFP, en la cual se ha reemplazado el dominio GAP de Rga4 por el dominio GAP de Rga6. La región rica en serinas se representa de color amarillo, los dominios LIM de Rga4 de color anaranjado, la región polibásica de Rga6 (PBR) de color rosa y los dominios GAPs de Rga6 y de Rga4 de color lila o rojo, respectivamente. La proteína GFP se representa de color verde.

Mediante análisis por Western-blot se confirmó la expresión y el tamaño de las diferentes proteínas quiméricas de Rga6 y de Rga4 (**Figura 66 A y D**).

La proteína Rga6 con el dominio GAP de Rga4 era funcional ya que la cepa generada no presentó defectos morfológicos. Además, la quimera se localizó correctamente en la membrana plasmática y se observó una menor concentración de la proteína en los polos de crecimiento, como sucede en la cepa que produce Rga6-GFP (**Figura 66 B y C**).

Por el contrario, la proteína Rga4 con el dominio GAP de Rga6 no fue funcional ya que las células de la cepa generada presentaron defectos morfológicos similares a los de la delección de *rga4*⁺. Además, la localización de la quimera era mayoritariamente citoplásmica, aunque se observó una fluorescencia leve de la proteína quimérica en los laterales de las células y en la zona de división (**Figura 66 E**).

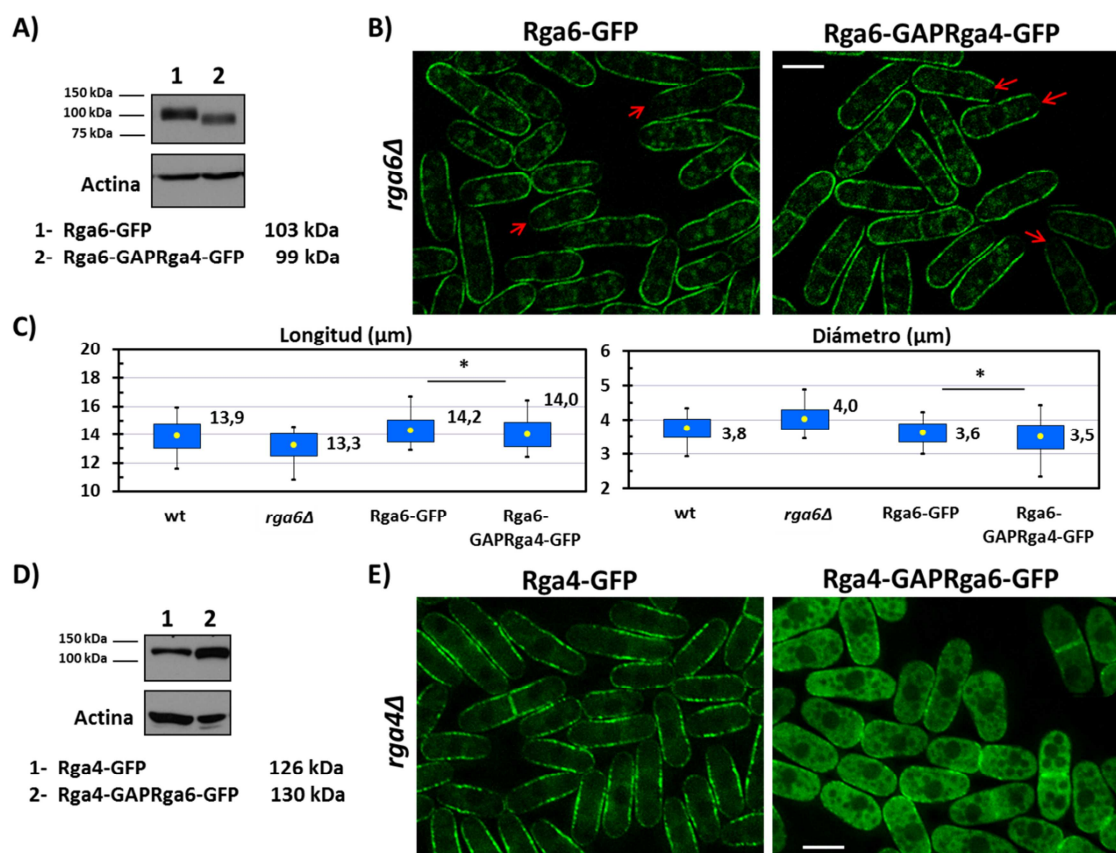


Figura 66. La quimera Rga6 con el dominio GAP de Rga4 es funcional, por el contrario, la proteína Rga4 con el dominio GAP de Rga6 no es funcional. **A)** Western-blot de Rga6 y de la quimera Rga6-GAPRga4 marcadas con GFP. Como control de carga se determinó la actina en esos mismos extractos. **B)** Micrografías de fluorescencia de células *rga6Δ* que producen Rga6-GFP o Rga6-GAPRga4-GFP. Las flechas señalan la menor concentración de las proteínas en los polos de crecimiento. **C)** Medidas de longitud (izquierda) y diámetro (derecha) de células de las cepas del apartado anterior. Se midieron también las cepas silvestre (wt) y *rga6Δ*, como valores de referencia. Las medidas fueron realizadas con el programa Image J y se consideran sólo células en proceso de división (n= 80 células de cada cepa). El círculo central representa la media, cuyo valor se indica; los límites superior e inferior de los rectángulos se corresponden con el valor de la media \pm la desviación estándar y los extremos de las líneas son valores máximos y mínimos. Se realizó la prueba t de Student para calcular la significación estadística de los valores obtenidos en las células que expresan Rga6-GFP y los obtenidos con la quimera Rga6-GAPRga4-GFP: * $p \leq 0.05$. **D)** Western-blot de la proteína Rga4 y de la quimera Rga4-GAPRga6 marcadas con GFP. Como control de carga se determinó la actina en esos mismos extractos. **E)** Micrografías de fluorescencia de células *rga4Δ* que llevan Rga4-GFP o Rga4-GAPRga6-GFP integradas en el locus *leu1*⁺. Barra: 5 μm .

Estos resultados sugieren que los dominios GAP de Rga6 y Rga4 son intercambiables en cuanto a su función reguladora de Cdc42 pero el dominio GAP de Rga4 o el plegamiento de la proteína entorno a este dominio, son necesarios para su localización correcta en la membrana lateral y no son reemplazables por el dominio GAP de Rga6.

18.1 Estudio de la funcionalidad de la quimera Rga6-GAPRga4

Para estudiar con más detalle la funcionalidad de la quimera Rga6-GAPRga4, se utilizó como fondo genético la cepa mutante doble *rga4Δ rga6Δ*. Mediante microscopía de fluorescencia se observó que esta quimera, al igual que la proteína Rga6-GFP entera, se localiza correctamente y revierte el fenotipo redondeado que caracteriza a la cepa mutante *rga4Δ rga6Δ* (Figura 67 A).

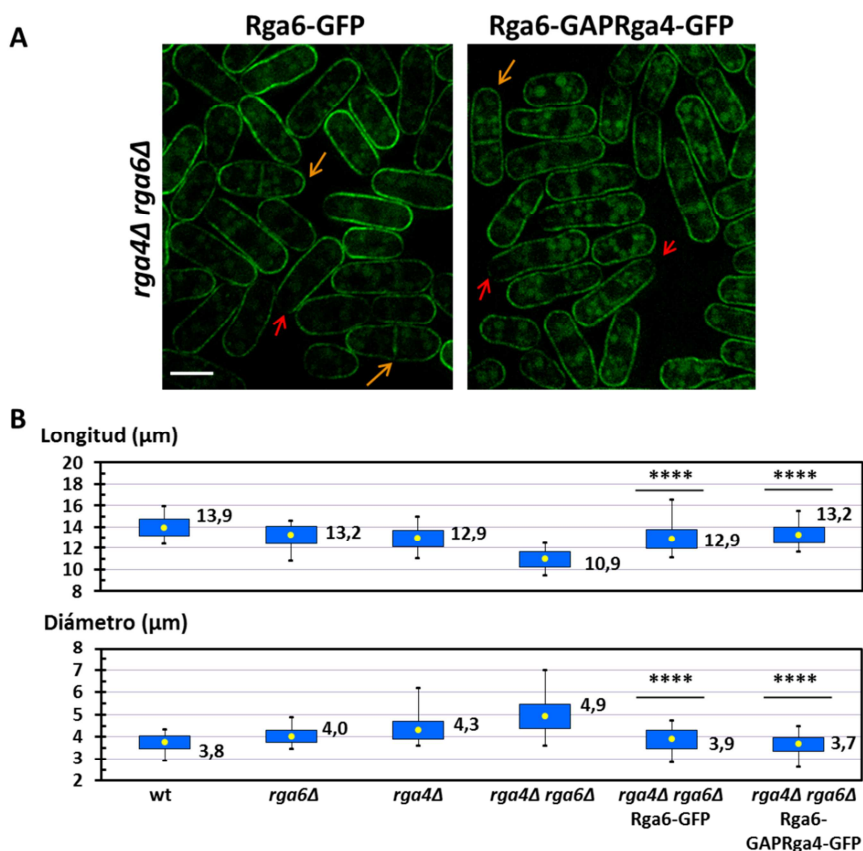


Figura 67. Estudio de la funcionalidad de la quimera Rga6 con el dominio GAP de Rga4, utilizando como fondo genético la cepa mutante *rga4Δ rga6Δ*. **A)** Micrografías de fluorescencia de Rga6-GFP o la quimera Rga6-GAPRga4-GFP integradas en el locus *leu1⁺* de células *rga4Δ rga6Δ*. Las flechas rojas señalan la menor concentración de ambas proteínas en los polos de crecimiento. Las flechas amarillas señalan células en el momento de la división celular. Barra: 5μm. **B)** Medidas de longitud (arriba) y diámetro (abajo) de células de las cepas del apartado anterior. Se midieron también las cepas silvestre (wt), *rga4Δ*, *rga6Δ* y *rga4Δ rga6Δ*, como valores de referencia. Las medidas fueron realizadas con el programa Image J y se consideran sólo células en proceso de división (n= 70 células de cada cepa). El círculo central representa la media, cuyo valor se indica; los límites superior e inferior de los rectángulos se corresponden con el valor de la media ± la desviación estándar y los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos. Se realizó la prueba t de Student para calcular la significación estadística de los valores obtenidos en las células *rga4Δ rga6Δ* que llevan la proteína Rga6-GFP o la proteína quimera Rga6-GAPRga4-GFP, respecto a los de la cepa *rga4Δ rga6Δ*: **** p ≤ 0.0001.

Analizando en detalle las medidas de longitud de las células, se observó que la proteína Rga6-GFP recuperaba el fenotipo de delección de *rga6⁺* en las células *rga4Δ rga6Δ*,

que tenían dimensiones similares a las de las células *rga4Δ* ($12.9 \mu\text{m} \pm 0.9$ y $12.9 \mu\text{m} \pm 0.8$, respectivamente). Sin embargo, la quimera Rga6-GAPRga4 parecía recuperar el fenotipo de delección de *rga4⁺* en la estirpe *rga4Δ rga6Δ* y las dimensiones de las células eran similares a las de *rga6Δ* ($13.2 \mu\text{m} \pm 0.7$ y $13.2 \mu\text{m} \pm 0.8$, respectivamente) (**Figura 67 B**).

Estos resultados sugieren que las diferencias observadas entre las proteínas GAPs Rga6 y Rga4, respecto al control de la morfología de *S. pombe*, podrían deberse no tanto a su localización diferente en la membrana plasmática, sino a una regulación distinta de la GTPasa Cdc42, con una contribución mayor de Rga4 en el control de las dimensiones celulares. Sin embargo, se requerirán experimentos adicionales para apoyar esta hipótesis.

19 Estudio del efecto sobre la morfología celular de la localización dirigida de Rga6 a los polos

El estudio de la proteína reguladora GAP Rga6 reveló por un lado, que su localización en la membrana plasmática depende de la región polibásica situada en el extremo C-terminal y por otro, que su menor concentración en los polos de crecimiento depende del extremo N-terminal de la proteína. Partiendo de estos resultados, se analizó el posible efecto que podría tener sobre la morfología celular la presencia de Rga6 exclusivamente en los polos.

Para lograr la localización dirigida de Rga6 a los polos de la célula, se utilizó el extremo N-terminal de la proteína GAP Rga2, descrito como necesario y suficiente para la localización de la proteína en los polos celulares (Villar-Tajadura *et al.*, 2008). Rga2 regula negativamente a la GTPasa Rho2 y es capaz de interactuar con Cdc42 aunque no lo regule negativamente (Villar-Tajadura *et al.*, 2008).

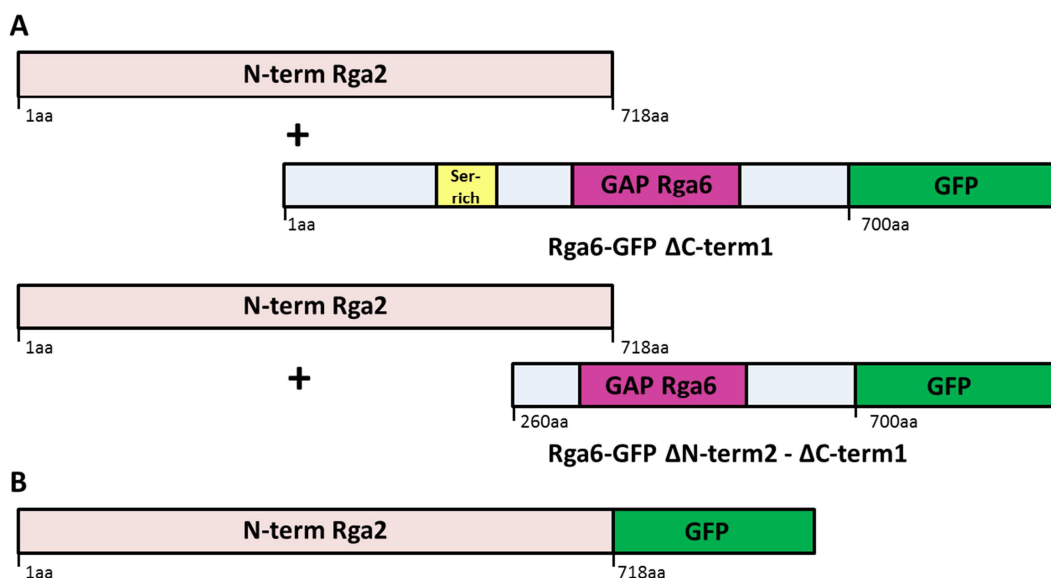


Figura 68. Esquema de las proteínas quiméricas de Rga6 y de Rga2. A) Quimeras formadas por el extremo N-terminal de Rga2 (rectángulo rosa) fusionado, en fase de lectura (+), a la versión truncada de Rga6 ΔC-term1, que carece de la región PBR, o a la versión truncada de Rga6 ΔN-term2-ΔC-term1, que carece del extremo N-terminal y de la PBR. Las quimeras llevan GFP (verde) en su extremo C-terminal. **B)** Proteína control formada por el extremo N-terminal de Rga2 fusionado a GFP.

Resultados

Se utilizó el extremo N-terminal de la proteína Rga2 para construir nuevas cepas de *S. pombe* que producían quimeras de Rga6 localizadas en los polos. Para evitar la localización de Rga6 en la membrana plasmática de la célula, se utilizó la versión truncada de Rga6 Δ C-term1 que carece de la región polibásica (PBR) y se localiza en el citoplasma de la célula. Se construyeron dos quimeras, una que lleva toda la proteína Rga6 excepto la PBR y otra en la que Rga6 carece tanto del extremo N-terminal como de la PBR. Las dos quimeras y la proteína control (extremo N-terminal de Rga2, N-term_{Rga2}) se fusionaron en su extremo C-terminal a la proteína GFP (Figura 68 A y B). La integración de las ORFs quiméricas, bajo el control del promotor y del terminador de *rga6*⁺, se realizó en el locus *leu1*⁺ de una cepa *rga6* Δ utilizando el vector pJK-148, como se describe en el apartado 5.8.5 de Materiales y Métodos. Se analizó por microscopía de fluorescencia la localización de las distintas quimeras, así como la morfología de las células *rga6* Δ que las expresaban.

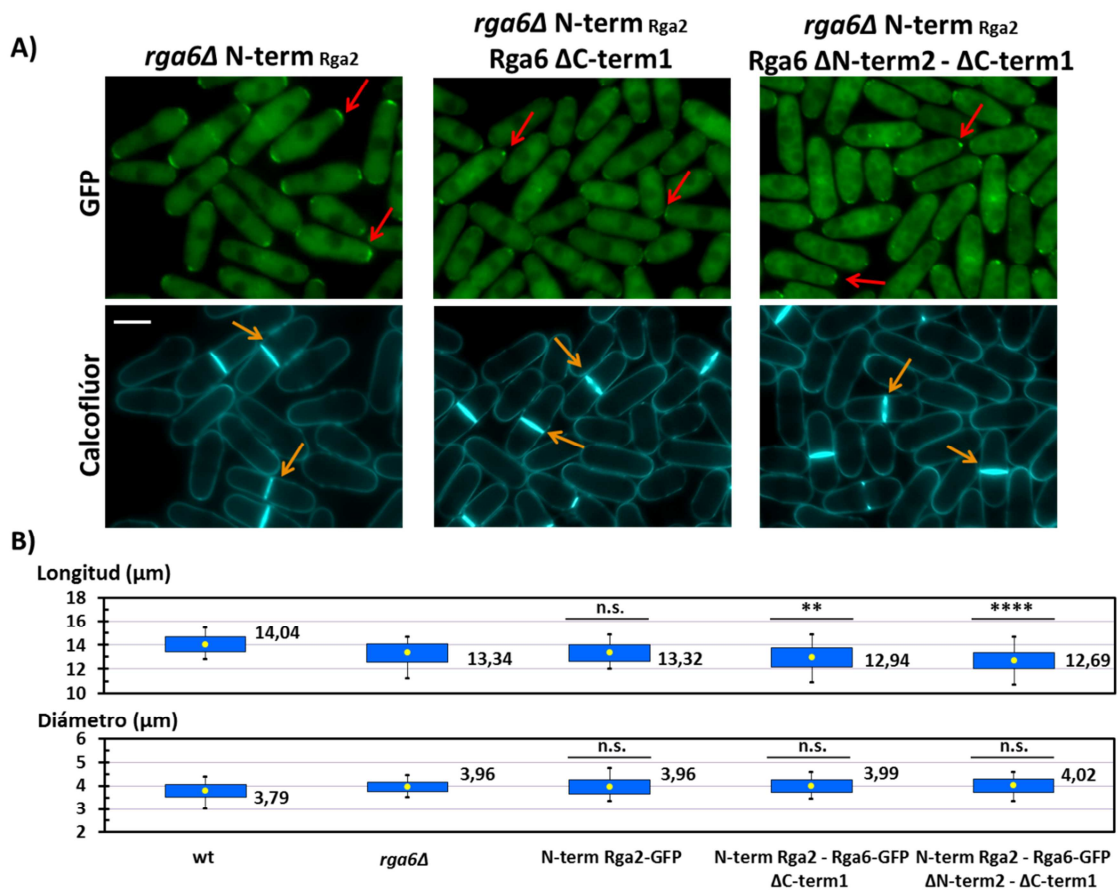


Figura 69. Estudio del efecto sobre la morfología celular de la localización dirigida de Rga6 a los polos. A) Micrografías de fluorescencia de la proteína control N-term_{Rga2}-GFP y las quimeras N-term_{Rga2}-Rga6-GFP Δ C-term1 y N-term_{Rga2}-Rga6-GFP Δ N-term2 - Δ C-term1, integradas en el locus *leu1*⁺ de células *rga6* Δ y tinción de las mismas células con calcofluór. Las flechas rojas señalan la localización de las proteínas en los polos. Las flechas amarillas señalan células septando. Barra: 5μm. **B)** Medidas de longitud (arriba) y diámetro (abajo) de células de las cepas del apartado anterior. Se midieron también las cepas silvestre (wt) y *rga6* Δ , como valores de referencia. Las medidas fueron realizadas con el programa Image J y se consideran sólo células en proceso de división (n= 70 células de cada cepa). El círculo central representa la media, cuyo valor se indica; los límites superior e inferior de los rectángulos se corresponden con el valor de la media \pm la desviación estándar y los extremos de las líneas son los valores máximos y mínimos. Se realizó la prueba t de Student para calcular la significación estadística de los valores obtenidos en las células *rga6* Δ que producen la proteína control o las quimeras, respecto a los valores obtenidos en la cepa *rga6* Δ : n.s. = $p > 0.05$, ** $p \leq 0.01$, **** $p \leq 0.0001$.

Se confirmó la localización en los polos celulares de la proteína control N-term_{Rga2}-GFP que no provocó ningún efecto sobre la morfología celular, ya que las células eran similares a las células *rga6Δ* (**Figura 69 A y B**). Las quimeras N-term_{Rga2}-Rga6-GFP ΔC-term1 y N-term_{Rga2}-Rga6-GFP ΔN-term2 ΔC-term1 también se localizaron en los polos de las células; sin embargo, en estas cepas se observó mayor señal de fluorescencia en el citoplasma y menor en la membrana, respecto a la observada en la cepa con la proteína control N-term_{Rga2}-GFP (**Figura 69 A**).

El análisis de las dimensiones celulares en el momento de la división mostró que las células que producen las quimeras de Rga6 localizadas en los polos son más cortas que las células *rga6Δ*, siendo este fenotipo más marcado en el caso de la quimera que carece del extremo N-terminal de Rga6 (**Figura 69 B**). El extremo N-terminal de Rga6 participa en la disminución de los niveles de esta proteína en los polos de crecimiento, por ello, en ausencia de dicho extremo los niveles de la proteína quimérica podrían estar aumentados en los polos y esto podría suponer una mayor regulación negativa de Cdc42 que influiría en la morfología de la célula. Por tanto, estos resultados sugieren que la presencia de Rga6 en los polos disminuye el crecimiento polarizado.

DISCUSIÓN

La morfogénesis constituye, junto con el crecimiento y la diferenciación celular, uno de los aspectos más importantes del desarrollo de un organismo. La forma celular es debida al crecimiento polarizado y es necesaria para el funcionamiento correcto de muchas células. Algunas de las principales moléculas implicadas en la selección y el mantenimiento de las zonas de crecimiento polarizado, tales como las GTPasas de la familia Rho, están conservadas desde las levaduras a los mamíferos, sugiriendo que los mecanismos básicos de polarización celular se han mantenido a lo largo de la evolución. Una de las claves en el funcionamiento de las GTPasas es su interacción con proteínas reguladoras GAPs, GEFs y GDIs que modulan las transiciones entre los distintos estados de activación de las proteínas G pequeñas. A menudo, estos factores reguladores son proteínas multidominio que además de interactuar con las GTPasas, interactúan con otras proteínas o con las membranas. Gracias a ello, estas proteínas reguladoras, además de cambiar el estado de activación de las GTPasas, contribuyen a regular su localización subcelular, pudiendo influir en la especificidad de su acción (Bos *et al.*, 2007).

Cdc42 es esencial para la viabilidad celular. Se localiza tanto en la membrana plasmática como en las membranas internas y es la GTPasa implicada en el control del crecimiento celular polarizado de *S. pombe* (Miller and Johnson, 1994). Como todas las GTPasas de la familia Rho, la señalización de Cdc42 está regulada por proteínas activadoras, GEFs, e inhibidoras, GAPs. En la levadura de fisión, el control espacial de la activación de Cdc42 determina su morfología celular. Los GEFs, Scd1 y Gef1, se localizan en las zonas de crecimiento, polos y septo, donde Cdc42 está activa (Coll *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003). La única proteína GAP de Cdc42 descrita hasta el comienzo de este trabajo, Rga4, se localiza en la membrana lateral de la célula, en las zonas sin crecimiento, donde Cdc42 está inactiva (Tatebe *et al.*, 2008). Scd1, junto con Rga4, tienen papeles aditivos controlando la morfología celular (Kelly and Nurse, 2011). Gef1 está implicada en el proceso de citoquinesis y participa en NETO (New End Take Off), la transición del crecimiento monopolar a bipolar (Coll *et al.*, 2003). Recientemente se ha descrito que la activación de Cdc42 por sus proteínas GEFs en la zona de división depende de Gef1 en los momentos iniciales de la citocinesis y posteriormente de Scd1 para la formación del septo (Wei *et al.*, 2016).

En este trabajo se ha estudiado el papel que desempeña la proteína GAP Rga6 en el control de la morfología celular de *S. pombe* y su relación con la GTPasa Cdc42.

Rga6 es una proteína reguladora GAP de Cdc42 que participa, junto con Rga4, en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe*

La proteína Rga6 tiene un dominio RhoGAP en su estructura y presenta homología de secuencia con dos proteínas GAPs de *S. cerevisiae*, Sac7 y Bem3, que regulan a Rho1 y Cdc42, respectivamente (Schmidt *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1994). Rga6 participa en el control de la morfología y de las dimensiones celulares de *S. pombe* puesto que las células *rga6Δ* son ligeramente más cortas y más anchas que las células silvestres. La sobreexpresión de *rga6⁺* también altera la morfología celular, generando células que se alargan y estrechan por el único polo de crecimiento.

Estos fenotipos son similares a los descritos para la proteína Rga4, el único regulador GAP de Cdc42 conocido hasta este momento. En base a esta observación, se realizó la delección conjunta de ambas proteínas GAPs, Rga4 y Rga6. Se observó que las células mutantes dobles *rga4Δ rga6Δ* aunque estaban polarizadas, mostraban una morfología redondeada que no se observa en los mutantes parentales sencillos. Este resultado permitió concluir que Rga6 y Rga4 tienen un papel aditivo en el control de la morfología celular de *S. pombe*. Además, en la cepa mutante doble *rga4Δ rga6Δ*, la GTPasa Cdc42 activa y su proteína efectora, For3, perdían su localización definida en los polos celulares y se extendían por la membrana plasmática. Estos resultados sugerían que las proteínas GAPs Rga6 y Rga4 contribuyen a restringir la activación y, en consecuencia, la señalización de la GTPasa Cdc42 a los polos celulares. Esta hipótesis se confirmó tras observar que en ausencia de *rga6⁺* y de *rga4⁺* otras proteínas, como el factor de polaridad Tea1, permanecían correctamente localizadas. Se descartó así la posibilidad de que la forma redondeada de las células *rga4Δ rga6Δ* pudiera tener un efecto general sobre la localización de todas las proteínas, independientemente de su relación con Cdc42.

Posteriormente se confirmó por métodos bioquímicos que Rga6 tenía actividad GAP *in vivo* sobre la GTPasa Cdc42. Además, se observó que la sobreexpresión de *rga6⁺* con una mutación en la Arginina 354 conservada del dominio RhoGAP, que participa en la actividad catalítica, no daba lugar al fenotipo morfológico de sobreexpresión de *rga6⁺*. En conjunto, estos resultados permitieron concluir que el papel de Rga6 en el control de la morfología celular de *S. pombe* se realiza mediante su actividad GAP sobre la GTPasa Cdc42.

Resultados previos del laboratorio, recogidos en la Tesis Doctoral de María Antonia Villar Tajadura (2009), ya habían demostrado mediante un ensayo de doble híbrido que Rga6 interacciona con la forma constitutivamente activa de la GTPasa Cdc42. Además, en estos ensayos también se observó interacción entre Rga6 y las formas constitutivamente activas de las GTPasas Rho2 y Rho3. En dicho trabajo de tesis doctoral (2009) se pudo comprobar la actividad GAP de Rga6 sobre Rho2, pero no se observó actividad GAP sobre la GTPasa Rho3, implicada en la secreción polarizada (Nakano *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003).

Teniendo en cuenta estos antecedentes, para descartar que el papel de Rga6 en el control de la morfología celular pudiese ser debido a su función como GAP de Rho2 o a su interacción con Rho3, se construyeron las cepas mutantes *rga4Δ rga6Δ rho2Δ* y *rga4Δ rga6Δ rho3Δ*. Ninguno de los triples mutantes recuperaba completamente el fenotipo de la cepa silvestre. Las diferencias observadas en la morfología celular del mutante doble *rga4Δ rga6Δ*, respecto al mutante triple *rga4Δ rga6Δ rho2Δ*, podrían ser debidas a problemas añadidos en la pared y en la integridad celular debidos a la ausencia de *rho2⁺* (Calonge *et al.*, 2000). En el caso de la cepa *rga4Δ rga6Δ rho3Δ*, las células mostraron una morfología menos redondeada que la observada en el mutante doble *rga4Δ rga6Δ*. El hecho de que la GTPasa Rho3 tenga funciones parcialmente redundantes con Cdc42 controlando la secreción celular (Estravís *et al.*, 2011) podría explicar el fenotipo observado en este triple mutante. Así, la disminución de la secreción debida a la ausencia de Rho3 en las células *rga4Δ rga6Δ rho3Δ* podría compensar el aumento de secreción provocado por un nivel mayor de activación de la GTPasa Cdc42 en la cepa *rga4Δ rga6Δ*.

Rga6 se localiza en la membrana plasmática y la disminución de sus niveles en los polos de crecimiento depende de los cables de actina nucleados por For3

El estudio de la localización de Rga6 mostró que se localiza en la membrana plasmática formando nodos discretos y su concentración disminuye en los polos en crecimiento. También se observó que la localización de Rga6 no es igual a la localización de la proteína Rga4. Aunque ambas proteínas se localizan en los lados de la célula, donde no hay Cdc42 activa, la visualización simultánea de Rga4-RFP y Rga6-GFP permitió demostrar que Rga4 y Rga6 no forman parte de los mismos nodos. Además, Rga6, a diferencia de Rga4, se extiende mucho más en la membrana plasmática llegando hasta los polos, en los que Rga4 está prácticamente ausente. Por otro lado, Rga6 y Rga4 no dependen una de la otra para su localización. Incluso en las células que sobreexpresan *rga6⁺*, en las que se produce un claro ensanchamiento del polo que no crece, se observó que Rga4 estaba correctamente localizada en las zonas laterales de la célula. Rga4 es, hasta el momento, la única proteína reguladora negativa descrita para la GTPasa Cdc42 (Tatebe *et al.*, 2008). Su localización en los lados de la célula es importante para el crecimiento polarizado ya que inhibe el crecimiento y permite la activación localizada de Cdc42 en los polos celulares por las proteínas GEFs (Kelly and Nurse, 2011). El hecho de que en las células que sobreexpresan *rga6⁺* la morfología esté alterada, aunque la localización de Rga4 sea correcta, pone de manifiesto que Rga4, por sí sola, no es capaz de controlar las dimensiones celulares de *S. pombe*.

La especificidad de los diferentes nodos corticales con los que interactúan Rga4 o Rga6 podría estar definida por la composición proteica y no lipídica de los mismos puesto que, en ensayos de unión de ambas proteínas GAPs a fosfolípidos embebidos en un soporte sólido (PIP-Strips, *Echelon Biosciences P-6001*), se observó que tanto Rga6 como Rga4 se unían mayoritariamente al fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) (**Figura 70**). El PI3P es un fosfoinosítido que está presente en endosomas tempranos y está implicado en la regulación del tráfico de membranas y la señalización celular (Gillooly *et al.*, 2001; Schink *et al.*, 2013). Se observó además que la unión de Rga6 al PI3P se reducía considerablemente cuando el ensayo se realizaba con la versión truncada de Rga6 Δ C-term1, que carece de su región polibásica, necesaria para la localización de esta proteína en la membrana plasmática (**Figura 70**).

Aunque Rga6-GFP tiene una localización definida en la membrana plasmática formando nodos, podría también estar presente en membranas intracelulares, concretamente en endosomas. Varios resultados apoyan esta observación. Por un lado, en la Tesis Doctoral de la Dra. María Antonia Villar Tajadura (2009) se mostró, mediante un fraccionamiento subcelular utilizando un gradiente continuo de sacarosa, que tanto Rga6 como Rga4 se localizan en la membrana plasmática y los endosomas (**Figura 71**). Por otra parte, como ya se ha mencionado, en este trabajo se observó que tanto Rga6 como Rga4 se unen al fosfatidilinositol 3-fosfato (PI3P) (**Figura 70**), un fosfoinosítido que está presente en endosomas tempranos (Gillooly *et al.*, 2001). Estos resultados podrían indicar que Rga4 y Rga6 ejercen su función de regulación de la GTPasa Cdc42 en endosomas. En este sentido, también se ha descrito que la fracción subcelular de la GTPasa Ras1 situada en endomembranas es la que participa en el control de la morfología celular mediante la regulación de Scd1 y Cdc42 (Chang and Philips, 2006; Onken *et al.*, 2006). Sin embargo, en un trabajo reciente se ha descrito que la mayor parte de la proteína Cdc42 en su forma activa está en la membrana

plasmática y que se mueve por difusión lateral. En el mismo trabajo se propone que Cdc42 no necesita reciclaje endocítico para concentrarse en las zonas de crecimiento (Bendezú *et al.*, 2015). Es, por tanto, poco probable que las proteínas GAP actúen en los endosomas y su presencia en estas estructuras podría deberse a que se liberen de la membrana plasmática mediante endocitosis. Así, los endosomas podrían suponer un reservorio de proteína Rga6 capaz de ser reciclada rápidamente desde estos a la membrana.

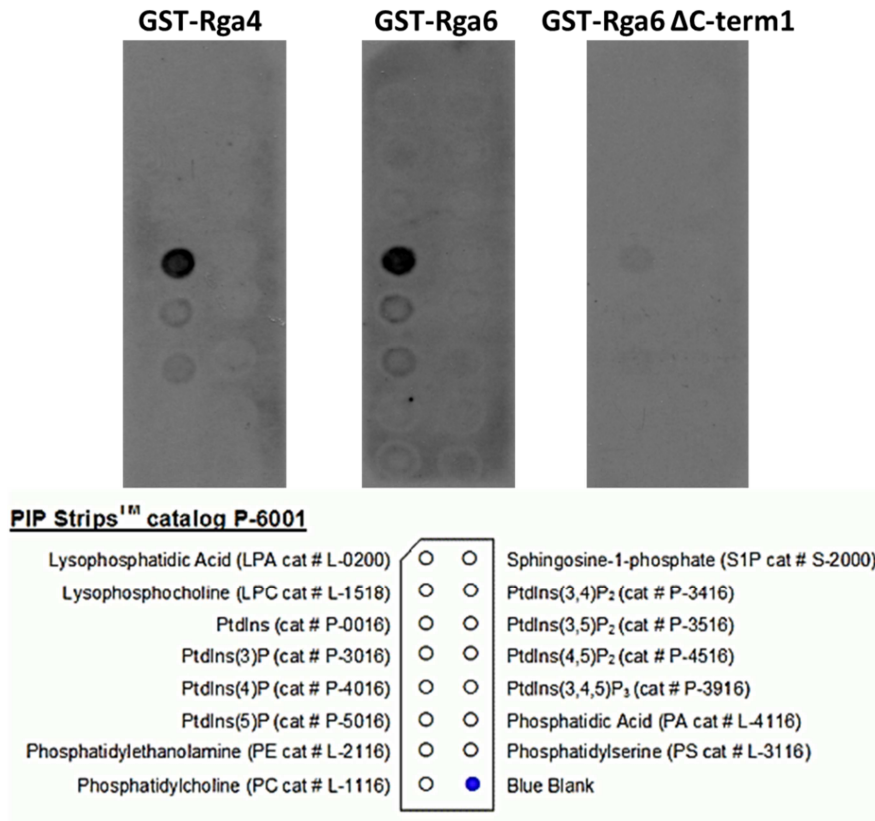


Figura 70. Ensayo de unión de Rga4 y Rga6 a fosfolípidos unidos a una membrana (PIP-Strips). Las diferentes proteínas fusionadas a GST se purificaron a partir de extractos celulares de *S. pombe* que las sobreexpresaban desde los plásmidos pREP-GST-Rga4, pREP-GST-Rga6 y pREP-GST-Rga6 ΔC-term1, respectivamente. Las proteínas se incubaron con las membranas de fosfolípidos, que posteriormente se revelaron utilizando un anticuerpo anti-GST. En la parte inferior se muestra la distribución sobre la membrana de los distintos fosfolípidos ensayados.

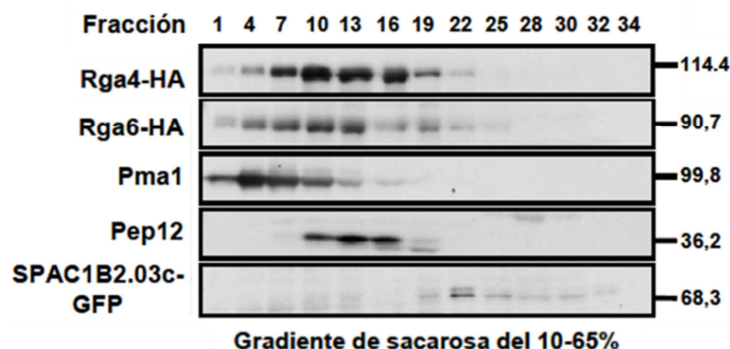


Figura 71. Fraccionamiento subcelular en gradiente de sacarosa (10-65%) de células que producen Rga4-HA y Rga6-HA. Análisis mediante SDS-PAGE y Western-blot de las fracciones 1-34 del gradiente. Las membranas se revelaron con anticuerpos anti-HA, anti-Pma1 (marcador de membrana plasmática), anti-Pep12 (marcador de endosomas) y anti-GFP (marcador de retículo endoplásmico). Los números situados a la derecha de los paneles indican la masa molecular de las proteínas en kDa. Figura tomada de la Tesis Doctoral de M^a Antonia Villar Tajadura, (2009).

La localización de la proteína GAP Rga4 no depende del citoesqueleto de microtúbulos ni del citoesqueleto de actina, aunque en ausencia de éste último se observa una mayor presencia de la proteína GAP en los polos celulares (Das *et al.*, 2007; Kelly and Nurse, 2011). Al igual que Rga4, Rga6 no depende del citoesqueleto de microtúbulos ni de actina para su localización en la membrana plasmática. Sin embargo, cuando se despolimerizó el citoesqueleto de actina, Rga6 dejaba de excluirse de los polos de crecimiento y se localizaba homogéneamente por toda la membrana. Este resultado sugiere que los procesos de endocitosis y/o secreción celular polarizada podrían estar implicados en la reducción de los niveles de Rga6 en la membrana plasmática de los polos de crecimiento. Se comprobó que Rga6 se localizaba correctamente en células que tienen alterada la endocitosis. Por el contrario, Rga6-GFP no se excluía de los polos de crecimiento en las células *for3Δ* que carecen de cables de actina o en las células *myo52Δ*. En estas cepas mutantes la secreción polarizada está alterada puesto que los cables de actina nucleados por For3 sirven como vías mediante las cuales la proteína motora, Myo52, dirige el aporte de vesículas hacia las zonas de crecimiento (Feierbach and Chang, 2001; Motegi *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001). Rga6 sobreproducida en las células *for3Δ* también se localizó uniformemente por la membrana plasmática de las células redondeadas. Se confirmó así que la reducción de los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento depende de la secreción polarizada.

Puesto que For3-3GFP se localiza correctamente en una cepa que carece de las dos miosinas de tipo V, *myo51⁺* y *myo52⁺* (Lo Presti *et al.*, 2012) y Rga6-GFP se extiende homogéneamente en la membrana plasmática de las células que carecen de Myo52, la proteína For3 en sí misma no excluye directamente a Rga6 de las zonas de crecimiento. Por tanto, la disminución de Rga6 en los polos de crecimiento podría estar relacionada con las vesículas que llegan a través de los cables de actina y que suponen tanto un aporte de membrana como de proteínas asociadas. En este sentido, se ha descrito que las membranas también participan en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular (Klose *et al.*, 2010; Wachtler and Balasubramanian, 2006).

Por otro lado, mediante análisis de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) se observó que Rga6 presenta un comportamiento muy dinámico que parece ocurrir mediante difusión lateral en la membrana plasmática. Se ha propuesto que la GTPasa Cdc42 también difunde lateralmente en la membrana plasmática y que se acumula localmente en su forma activa, polarizando el crecimiento, debido a la menor movilidad que presenta esta forma de la GTPasa (Bendezú *et al.*, 2015). Los ensayos de FRAP revelaron, además, que la fracción móvil de Rga6 es mayor en los polos de crecimiento que en los lados de la célula o en los polos por donde la célula no está creciendo. Este comportamiento dinámico indica la existencia de un recambio activo de Rga6 que podría ser debido a un proceso de continuo aporte y exclusión de esta proteína GAP en la membrana plasmática de los polos en crecimiento. En presencia de Latrunculina A, Rga6 se comportó de forma similar en los polos de crecimiento y en el resto de la membrana celular, lo que de nuevo sugiere que el citoesqueleto de actina está implicado en el comportamiento dinámico de Rga6 en las zonas de crecimiento. La extensión uniforme de Rga6 en la membrana plasmática, en presencia de Latrunculina A, indica que cuando se despolimerizan las estructuras de actina celular se produce un bloqueo en el recambio activo de la proteína GAP en la membrana plasmática de

los polos en crecimiento, que se traduce en un aumento de los niveles de Rga6 en estas zonas de la célula.

El hecho de que la disminución de Rga6 en los polos de crecimiento se observase también en mutantes con defectos en endocitosis, sugiere la existencia de algún mecanismo alternativo implicado en retirar a Rga6 de la membrana plasmática, como la proteína Rad24, que pertenece a la familia de proteínas 14-3-3 (Ford *et al.*, 1994). Estas proteínas están altamente conservadas y se unen, en forma de dímeros, a un amplio rango de moléculas señalizadoras. Las proteínas 14-3-3 reconocen en sus ligandos el motivo RxxS, donde la serina está fosforilada (Hermeking and Benzinger, 2006; Yaffe *et al.*, 1997). En *S. pombe* se ha descrito que la proteína Rad24 regula la disponibilidad de Gef1 en la membrana y de esa manera la activación controlada de Cdc42 (Das *et al.*, 2015). En ausencia de Rad24, Rga6 se extiende por toda la membrana (Figura 72 A) y en la secuencia de aminoácidos de Rga6 existen dos sitios putativos de reconocimiento por Rad24, uno dentro de la región rica en serinas y otro detrás de esta región, en los 6 aminoácidos inmediatamente adyacentes. Se deletionó tanto la región rica en serinas como el segundo sitio putativo de reconocimiento por Rad24 y se analizó la localización de la proteína Rga6, observando la extensión de Rga6 por toda la membrana plasmática (Figura 72 B y C). Este resultado sugiere que Rad24 podría regular los niveles de la proteína Rga6 en la membrana plasmática. No obstante, sería necesario realizar experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis, como por ejemplo realizar mutaciones puntuales en los sitios putativos de reconocimiento por Rad24 en Rga6, en vez de deleciones, y analizar su posible efecto sobre la localización de esta proteína GAP. Así mismo, habría que demostrar que ambas proteínas interaccionan físicamente.

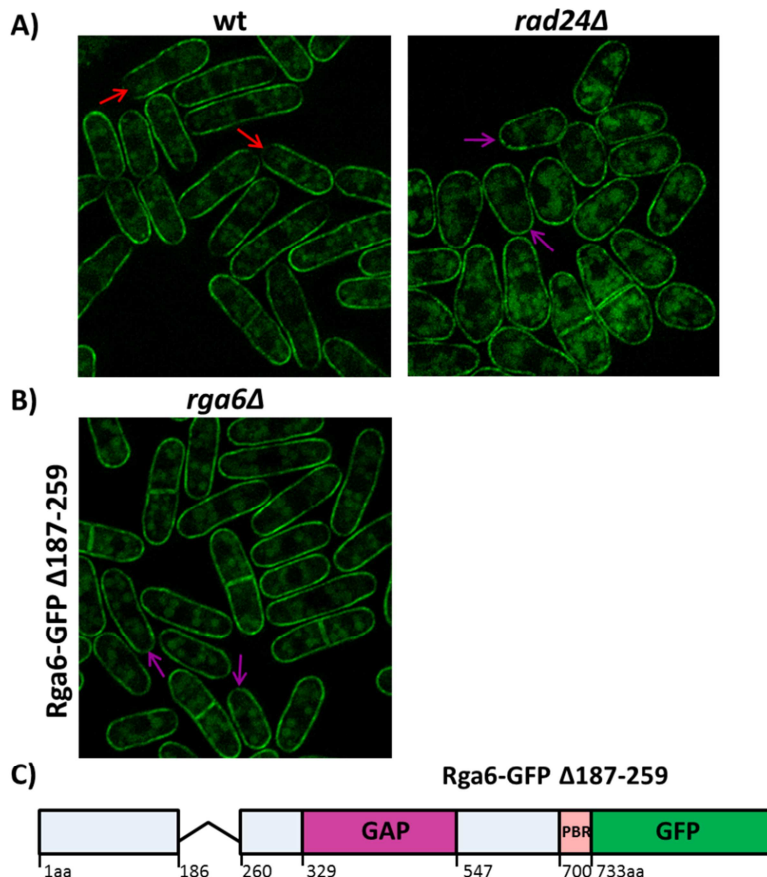


Figura 72. Rad24 podría participar en la regulación de los niveles de Rga6 en las zonas de crecimiento. A) Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de Rga6-GFP en células silvestres (wt) y en la cepa mutante *rad24Δ*. B) Micrografía de fluorescencia de células *rga6Δ* que producen la proteína Rga6-GFP Δ 187-259 integrada en el locus *leu1⁺*. Las flechas rojas (menor concentración de Rga6) y moradas (distribución homogénea de Rga6 en la membrana) señalan algunos polos de crecimiento. C) Esquema de la proteína Rga6-GFP Δ 187-259, que carece tanto de la región rica en serinas como de los dos sitios putativos de reconocimiento por la proteína Rad24.

Estudios estructura-función de Rga6

La proteína Rga6 tiene 733 aminoácidos y contiene en su estructura primaria un dominio RhoGAP, comprendido entre los aminoácidos 329 y 547, una región rica en serinas, comprendida entre los aminoácidos 187 y 253, y una región polibásica en su extremo C-terminal, situada entre los aminoácidos 700 y 733. La utilización de versiones truncadas de la proteína puso de manifiesto que el extremo N-terminal de Rga6, que incluye la región rica en serinas, es necesario para la disminución de los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento ya que, en su ausencia, Rga6 se extendía homogéneamente por toda la membrana. Sin embargo, la delección exclusiva de la región rica en serinas produjo un patrón heterogéneo de la localización de Rga6-GFP en la membrana. Así, en algunas células Rga6-GFP aparecía uniformemente extendida en la membrana plasmática, mientras que en otras se seguía observando menor intensidad de fluorescencia en los polos de crecimiento. Por lo tanto, parece que la reducción de los niveles de Rga6 en las zonas de crecimiento depende sólo parcialmente de la región rica en serinas.

Además de estar implicado en la localización de Rga6, el extremo N-terminal de esta proteína debe de participar en su estabilidad ya que las proteínas Rga6-GFP Δ N-term1 y Δ N-term2 mostraron niveles superiores a los observados para la proteína entera en extractos celulares. Finalmente, Rga6 sin el extremo N-terminal es parcialmente funcional ya que las proteínas truncadas Δ N-term1 y Δ N-term2 de Rga6 no revirtieron totalmente el fenotipo de delección de *rga6*⁺ en la cepa mutante doble *rga4* Δ *rga6* Δ . Parece poco probable que estas truncaciones afecten a la actividad GAP intrínseca de Rga6, pero su extremo N-terminal podría ser necesario para que su función como GAP sobre Cdc42 sea regulada correctamente en el espacio y en el tiempo.

En ausencia de los 33 últimos aminoácidos que constituyen la región polibásica de Rga6, la proteína perdió su localización en la membrana plasmática y no fue capaz de revertir los defectos de la delección de *rga6*⁺, indicando que Rga6 tiene que estar en la membrana plasmática para ser funcional. Las GTPasas Rho para ser activas y realizar sus funciones celulares necesitan estar ancladas en las membranas mediante la unión de grupos prenilos. En consonancia, las proteínas efectoras y reguladoras de las GTPasas también necesitan estar en las membranas para realizar sus funciones. Las proteínas Rga6-GFP Δ C-term1 y Rga6-GFP Δ C-term2 también mostraron niveles más altos que los de la proteína entera Rga6-GFP en extractos celulares, lo cual podría indicar que para que se produzca la reducción de los niveles de Rga6, esta proteína tiene que estar en la membrana plasmática de las zonas de crecimiento.

La fusión de la región polibásica de Rga6 con GFP reveló que esta parte de la proteína es suficiente para su localización en la membrana plasmática. En un grupo de proteínas GAP de células animales, la presencia de una pequeña región polibásica precediendo el dominio RhoGAP está conservada y permite su interacción con los lípidos de la membrana. Tal es el caso de la proteína ortóloga humana CdGAP (Cdc42 GTPase-activating protein) con actividad GAP sobre Rac1 y Cdc42, cuya región polibásica precediendo el dominio RhoGAP es necesaria para su unión específica a PI (3,4,5)P₃ (Karimzadeh *et al.*, 2012). Aunque la región polibásica de la proteína CdGAP no es necesaria para su actividad GAP intrínseca, sí que es necesaria para que sea reclutada a la membrana y allí realice las funciones celulares dependientes de su

actividad GAP (Karimzadeh *et al.*, 2012). En el caso de Rga4, se ha descrito que una región interna de la proteína previa a su dominio GAP, situada entre los aminoácidos 622 y 760, es necesaria para su localización en la membrana plasmática (Tatebe *et al.*, 2008). A diferencia de las anteriormente descritas, la región polibásica de Rga6 se sitúa al final de la proteína pero su papel parece ser el mismo.

Como ya hemos mencionado, Rga6 posee una región rica en serinas en su estructura primaria que podría sufrir modificaciones postraduccionales. Se ha descrito que las serinas pueden estar implicadas en procesos de O-glicosilación, en los que se unen azúcares al grupo β -hidroxilo de serinas y treoninas. En las levaduras y los hongos, la O-glicosilación está presente en muchas de las proteínas que se secretan y tiene lugar en su recorrido a través del Retículo Endoplasmático y el Aparato de Golgi. La glicosilación desempeña un papel importante en las funciones celulares ya que afecta a la localización de las proteínas que se secretan, potencia su estabilidad y solubilidad y ofrece protección frente a la degradación de proteasas (González *et al.*, 2012; Goto, 2007). Sin embargo, Rga6 no parece presentar en su estructura proteica el péptido señal que se encuentra en las proteínas secretadas. Las serinas también pueden estar implicadas en procesos de fosforilación y desfosforilación de proteínas. Quinasas y fosfatasas regulan así, conjuntamente, rutas de señalización relacionadas con múltiples procesos celulares como el crecimiento, la proliferación, la morfogénesis, el metabolismo o la integridad celular (Dickman and Yarden, 1999). Dentro de la familia de las Ser/Tre quinasas se encuentra la familia de proteínas PAK (p21-Activated Kinases), las quinasas dependientes de ciclinas relacionadas con el ciclo celular (CDKs, Cyclin Dependent protein Kinases) o las quinasas NDR (Nuclear Dbf-2-Related). La proteína Bem3, homóloga de Rga6 en *S. cerevisiae*, es sustrato de Cdk1, la quinasa dependiente de ciclina (CDK) que participa en la regulación del ciclo celular en *S. cerevisiae* (Ubersax *et al.*, 2003). Se ha propuesto que la fosforilación de Bem3 por Cdk1 podría inhibir su actividad GAP, contribuyendo a la activación controlada de Cdc42 en el sitio de gemación (Knaus *et al.*, 2007). El alineamiento de las secuencias de Rga6 y Bem3 mostró que Rga6 también posee varios sitios consenso de reconocimiento por las CDKs (S/T*-P-x-K/R) (Ubersax *et al.*, 2003). Estos sitios consenso CDKs están situados en el extremo N-terminal de la proteína, que regula los niveles de Rga6 en los polos de crecimiento. Sin embargo, hasta la fecha, se desconoce si Rga6 podría ser sustrato de quinasas CDKs y si este tipo de fosforilaciones podrían contribuir a la regulación de su localización o exclusión de la membrana plasmática.

Las proteínas encargadas de revertir las fosforilaciones son las Ser/Tre fosfatasas PP1, PP2A, PP2B (Protein Phosphatases). La fosfatasa PP2A desempeña un papel en el control de la morfología celular que incluye la regulación de Cdc42 (Bernal *et al.*, 2012). También se ha descrito que Tea4, como subunidad reguladora que localiza a la fosfatasa PP1, es capaz de promover el crecimiento polarizado favoreciendo la activación de Cdc42 mediante la localización de Gef1 en las zonas de crecimiento y la exclusión de la proteína Rga4, que inhibe a la GTPasa en las zonas adyacentes (Kokkoris *et al.*, 2014). En experimentos preliminares, se ha analizado la localización de Rga6 en ausencia de las dos subunidades catalíticas de la fosfatasa PP1, Dis2 y Sds21, observando que en ambos casos los niveles de Rga6 están disminuidos en el polo de crecimiento, como sucede en una cepa silvestre (**Figura 73**). Por lo tanto, no parece que la regulación de los niveles de Rga6 en las zonas de crecimiento sea mediada por la fosfatasa PP1.

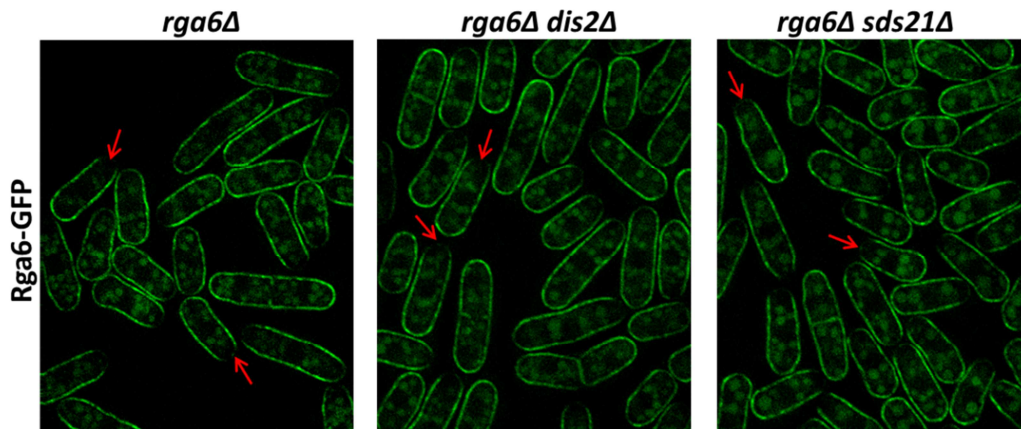


Figura 73. Rga6 se localiza correctamente en la membrana plasmática en las células *dis2Δ* y *sds21Δ*. Micrografías de fluorescencia que muestran la localización de la proteína Rga6-GFP integrada en el locus *leu1⁺* de las células *rga6Δ*, *rga6Δ dis2Δ*, *rga6Δ sds21Δ*. Las flechas señalan la menor concentración de Rga6-GFP en los polos de crecimiento.

En resumen, todos estos resultados indican que el extremo N-terminal de Rga6, comprendido entre los aminoácidos 1 y 260, participa en la regulación de los niveles de la proteína GAP en las zonas de crecimiento. Un proceso que parece muy complejo y finamente regulado, en el que podrían participar: una treonina en posición 141 descrita como fosforilada (Wilson-Grady *et al.*, 2008), la región rica en serinas, los dos sitios putativos de reconocimiento por Rad24 y, quizás, los sitios de reconocimiento por CDKs. Será necesario realizar numerosos experimentos adicionales para poder determinarlo.

Rga6 regula negativamente las oscilaciones de Cdc42 activa en los polos celulares

La GTPasa Cdc42 en el polo presenta un comportamiento dinámico oscilatorio de activación e inactivación, regulado por “feedbacks” positivos y negativos, en los que podrían participar respectivamente Gef1 y Pak1. En las células bipolares se observa un comportamiento oscilatorio anticorrelativo de GTP-Cdc42 entre ambos polos, que se atribuye a la competición por la GTPasa activa y a la disponibilidad de sus proteínas reguladoras. Se ha propuesto, además, que las oscilaciones en los niveles de Cdc42 activa entre el polo viejo, dominante en las células monopolares y el polo nuevo, que compite por empezar a crecer, podrían participar en el proceso de transición a crecimiento bipolar o NETO (New End Take Off) (Das *et al.*, 2012; Das and Verde, 2013).

La proteína GAP Rga4 no parece participar en la regulación negativa de Cdc42 en los polos, posiblemente debido a su localización restringida a los laterales de la célula (Das *et al.*, 2012). En ausencia del gen *rga6⁺*, las oscilaciones de Cdc42 activa entre ambos polos se siguen produciendo y su periodo no varía, sin embargo, disminuye la amplitud de la oscilación en ambos polos y la anticorrelación entre un polo y otro, respecto a los valores observados en una cepa silvestre. Además, en las células *rga6Δ* dicha amplitud es menor en el polo nuevo respecto al polo viejo, mientras que en las células silvestres es similar en los dos polos. Estos resultados sugieren que las células *rga6Δ* presentan un defecto en la regulación negativa de Cdc42 en el polo de crecimiento. El papel de Rga6 en este proceso sería sutil ya que, en ausencia de la proteína GAP, las oscilaciones se siguen produciendo y la falta de Rga6 tampoco

se traduce en un defecto drástico en NETO, como refleja el porcentaje de células monopolares en la cepa mutante *rga6Δ*, sólo ligeramente mayor al observado en una cepa silvestre. Sin embargo, las células *rga6Δ* sí presentan un menor crecimiento del polo nuevo, respecto al observado en una cepa silvestre; esto podría estar causado por una menor inactivación de Cdc42 en el polo viejo que impediría su activación en el polo nuevo, asumiendo que los polos celulares compiten por la concentración de Cdc42 activa o por la disponibilidad de sus proteínas reguladoras (Das *et al.*, 2012).

El hecho de que las oscilaciones de Cdc42 activa se sigan produciendo en ausencia de *rga6⁺*, pone de manifiesto la existencia de mecanismos alternativos que contribuyen a la regulación negativa de la GTPasa en los polos. De hecho, se ha propuesto que la proteína efectora de Cdc42 Shk1/Pak1 forma parte del “feedback” negativo que contribuye a inactivar a la GTPasa en los polos. La ausencia de este “feedback” negativo iría asociada a la acumulación de Cdc42 activa en un solo polo, generando un patrón de crecimiento monopolar y un incremento del diámetro celular, tal como se observa en la cepa mutante termosensible *orb2-34* de la quinasa Shk1 (Das *et al.*, 2012). Es muy probable que esta regulación negativa mediada por Shk1 siga funcionando en ausencia de *rga6⁺*, de modo que Rga6 y la quinasa Shk1 podrían actuar en vías paralelas como reguladores negativos de las oscilaciones de Cdc42 activa en los polos. El hecho de que el mutante doble *orb2-34 rga6Δ* muestre un fenotipo aditivo tras 4 horas a 32°C, con respecto a los mutantes sencillos (Figura 74), apoyaría esta hipótesis. Es posible también que exista redundancia de Rga6 con otras proteínas GAP de Cdc42, no descritas hasta el momento, que también podrían contribuir a su inactivación en los polos. En *S. cerevisiae* existen tres proteínas que tienen actividad GAP específica frente a Cdc42 y otra GAP que actúa sobre Rho1 y Cdc42 (Pérez and Rincón, 2010). La propia actividad GTPasa intrínseca de Cdc42 también podría ayudar a inactivar a la GTPasa, aunque de forma mucho más lenta.

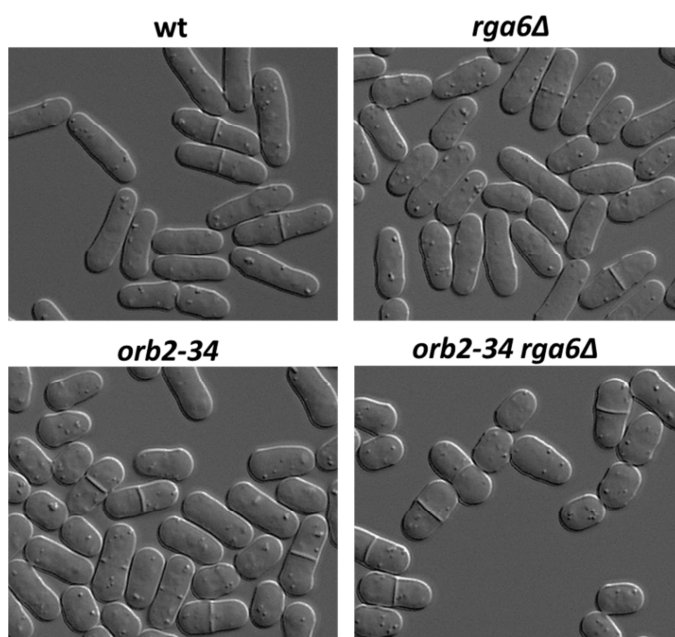


Figura 74. Estudio de la morfología de la cepa mutante doble *orb2-34 rga6Δ*. Micrografías de contraste diferencial (DIC) de células silvestres (wt), *rga6Δ*, *orb2-34* y *orb2-34 rga6Δ* incubadas a 32°C durante 4 h. Se muestran células creciendo en medio YES durante la fase logarítmica temprana.

El estudio de la relación de Rga6 con los GEFs de Cdc42, Scd1 y Gef1, indica que, a diferencia de Rga4, Rga6 podría depender de Scd1 para controlar la morfología celular puesto

que la delección simultánea de *rga6⁺* y de *scd1⁺* tiene el fenotipo de las células *scd1Δ* y el fenotipo morfológico de sobreexpresión de *rga6⁺* se suprime en las células *scd1Δ*. Una explicación alternativa a este resultado podría ser que, aunque tanto Rga6 como Rga4 participan en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe*, la contribución de Rga6 en este proceso fuese menor a la que realiza Rga4. Ello podría ser debido a una menor afinidad de Rga6 por la GTPasa Cdc42 activa o a que Rga6 y Rga4 regulan a Cdc42 en localizaciones distintas de la célula y/o en momentos diferentes de su ciclo morfológico. Como consecuencia, el efecto aditivo de pérdida de polaridad observado en ausencia de *scd1⁺* y *rga4⁺*, se vería atenuado y no se apreciaría en el mutante doble *rga6Δ scd1Δ*.

Además del papel aditivo de Rga4 y de Scd1 controlando la morfología celular de *S. pombe*, se ha descrito que su localización en la célula es mutuamente independiente (Kelly and Nurse, 2011). Sin embargo, en las células *scd1Δ* se observó una localización de Rga6 homogénea por toda la membrana plasmática, como ocurre en las células carentes de la formina For3. Rga6 sobreproducida también se localizó uniformemente por la membrana plasmática de las células redondeadas *scd1Δ* y *for3Δ*. Podría ser que la llegada de Scd1 en las vesículas transportadas por los cables de actina nucleados por For3, estuviese relacionada con la exclusión parcial de Rga6 en las zonas de crecimiento. Se ha descrito que la localización de Scd1 en la membrana plasmática es dependiente del citoesqueleto de actina (Kelly and Nurse, 2011); de manera que, en células tratadas con Latrunculina A, en las que se observa una mayor presencia de Rga6 en los polos de crecimiento, Scd1 y la proteína adaptadora Scd2 no se localizan en la membrana plasmática. Este hecho apoyaría la hipótesis de que la reducción de los niveles de la proteína GAP Rga6 en los polos de crecimiento depende de Scd1 y/o Scd2. Ambas proteínas podrían participar directamente en la regulación de los niveles de Rga6 en los polos en crecimiento o de manera indirecta, mediante la activación de Cdc42; de modo que la señalización celular que realiza la GTPasa activa conlleve la exclusión parcial de Rga6. Sin embargo, con los datos disponibles no es posible determinar con exactitud la relación entre Rga6 y Scd1.

El intercambio de los dominios GAPs de Rga6 y de Rga4 permitió comprobar que la proteína quimérica de Rga6 con el dominio GAP de Rga4 es funcional y revierte el fenotipo redondeado que caracteriza a la cepa doble mutante *rga4Δ rga6Δ*. Por el contrario, la proteína Rga4 con el dominio GAP de Rga6 no es funcional, porque apenas se localiza en la membrana lateral de la célula. Una posible explicación a este resultado sería que la proteína Rga4 establezca, mediante su dominio GAP, interacciones importantes para la localización de la proteína. En este sentido, la interacción con la quinasa DYRK Pom1 mediante su extremo C-terminal, que incluye el dominio GAP de la proteína (Tatebe *et al.*, 2008) podría ser relevante, ya que la exclusión de Rga4 de las zonas de crecimiento depende, al menos en parte, de Pom1 (Tatebe *et al.*, 2008). También es posible que el plegamiento de la proteína quimérica Rga4 con el dominio GAP de Rga6 no sea correcto y esto impida su llegada a la membrana plasmática.

Aunque el dominio GAP de Rga6 es reemplazable por el dominio GAP de Rga4, el estudio de la funcionalidad de la quimera Rga6-GAPRga4, utilizando como fondo genético la cepa mutante doble *rga4Δ rga6Δ*, puso de manifiesto que mientras que la proteína Rga6 silvestre recuperaba el fenotipo de la delección de *rga6⁺* en las células *rga4Δ rga6Δ*, la quimera Rga6-GAPRga4 parecía estar recuperando el fenotipo de la delección de *rga4⁺*. Estos resultados

sugieren que la proteína quimérica Rga6-GAPRga4, que aparentemente se localiza como Rga6, está ejerciendo el mismo efecto que Rga4 en el control de las dimensiones celulares. Las diferencias en la localización lateral de Rga4 y de Rga6 podrían ser, por tanto, menos importantes que su capacidad para actuar como GAP sobre Cdc42, respecto al control de la morfología celular. Será interesante visualizar simultáneamente la localización de la quimera Rga6-GAPRga4 y de Rga4. Aunque la proteína quimérica parece localizarse como Rga6, podría ser que la presencia del dominio GAP de Rga4 promueva una localización de esta proteína en los mismos complejos que Rga4, lo que podría suponer una regulación sobre Cdc42, de la morfología celular, distinta a la que realiza la proteína Rga6 silvestre.

Rga4 y Rga6 participan en el control de las dimensiones celulares y ambas contribuyen a restringir la activación localizada de Cdc42 en los polos celulares, sin embargo, la contribución de Rga4 en este proceso podría ser mayor, como sugiere el fenotipo de delección de *rga4*⁺, que genera células más cortas y más anchas a las observadas en ausencia de *rga6*⁺. Por otra parte, la localización de Rga6, que se extiende mucho más en la membrana plasmática que Rga4, le permite participar en la regulación de las oscilaciones de Cdc42 activa en los polos. A diferencia de Rga4, la localización transitoria de Rga6 en los polos de crecimiento permitiría una regulación distinta sobre Cdc42, que podría ser necesaria para un control preciso de la dinámica oscilatoria de Cdc42 en los polos celulares. No obstante, será necesario realizar experimentos adicionales para confirmar esta hipótesis, como estudiar el efecto de la quimera Rga6-GAPRga4 sobre las oscilaciones de Cdc42 activa. En principio, la regulación de los niveles de la quimera en los polos de crecimiento, mediada por el extremo N-terminal de Rga6, debería ser similar a la descrita para Rga6. Es posible que la presencia en los polos de la proteína quimérica, que contiene el dominio GAP de Rga4, provoque una regulación negativa más fuerte de Cdc42 que se reflejaría en una amplitud mayor de las oscilaciones.

La localización dirigida de Rga6 a los polos de las células, utilizando el extremo N-terminal de la proteína GAP Rga2, confirmó el papel de Rga6 en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe* ya que las células que producían las proteínas quiméricas de Rga6 localizadas en los polos eran más cortas que las células *rga6* Δ . Además, este fenotipo era más marcado en el caso de la quimera que carecía del extremo N-terminal de Rga6, apoyando la hipótesis de que esta parte de la proteína participa en la disminución de los niveles de Rga6 en la membrana plasmática de los polos. Será interesante analizar el efecto de esta quimera de Rga2-Rga6, que carece del extremo N-terminal de Rga6, sobre las oscilaciones de Cdc42 activa. Puesto que la presencia transitoria de Rga6 en los polos de crecimiento parece ser importante en la regulación negativa de los niveles de Cdc42 y en su comportamiento oscilatorio, es posible que la presencia continua de la quimera Rga2-Rga6 en los polos de crecimiento conlleve la pérdida de la dinámica oscilatoria de Cdc42 activa.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Rga6 es una proteína con actividad GAP sobre Cdc42.
2. Rga6 colabora con Rga4 en el control de las dimensiones celulares de *S. pombe*, regulando negativamente a Cdc42 y restringiendo su activación localizada a los polos de crecimiento celular.
3. Rga6 se localiza en la membrana plasmática en forma de nodos definidos, que son distintos a los formados por Rga4. La localización de Rga6 en la membrana plasmática depende de su región polibásica, situada en el extremo C-terminal de la proteína.
4. En los polos de crecimiento los niveles de Rga6 están disminuidos. La región N-terminal de Rga6 y los cables de actina nucleados por For3 participan en la reducción de los niveles de la proteína en los polos de crecimiento.
5. Rga6 presenta un comportamiento muy dinámico en la membrana plasmática y participa en la regulación negativa de las oscilaciones de Cdc42 activa en los polos de crecimiento celular. La función de Rga6 parece depender de la presencia de la proteína GEF Scd1.
6. El dominio GAP de Rga4 puede sustituir al de Rga6 en su función de control de las dimensiones celulares.
7. La localización de Rga6 en los polos disminuye ligeramente el crecimiento polarizado.

MATERIALES Y **MÉTODOS**

1 Microorganismos utilizados

El presente trabajo se ha realizado principalmente con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Todas las cepas empleadas se recogen en la **Tabla I**, donde se detalla su procedencia y genotipo. Las cepas de *S. pombe* se conservaron en glicerol al 25% a -80°C. Para los trabajos de clonación molecular se utilizó la estirpe DH5α de *Escherichia coli*. Las cepas de *E. coli* se conservaron a -80°C en glicerol al 50%.

Tabla I: Cepas utilizadas en este trabajo

| Estirpe | Genotipo | Origen |
|----------|---|-----------------------|
| PPG0371 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18</i> | Colección laboratorio |
| PPG4939 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18</i> | Colección laboratorio |
| PPG4511 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6</i> | Bioneer |
| PPG3906 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::ura4⁺</i> | K. Nakano |
| PPG11957 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::NatMX6</i> | Este trabajo |
| PPG6627 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG7179 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG13078 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG10779 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG0148 | h ⁻ <i>ura4-D18 cdc25-22</i> | Colección laboratorio |
| PPG3930 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 rga6::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG7566 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 rga4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG8222 | <i>leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 rga4::KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG13333 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 Pnmt1-rga6⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13328 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6 Pnmt1-rga4⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG6555 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 CRIB-3GFP:ura4⁺</i> | K. Shiozaki |
| PPG7550 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 CRIB-3GFP:ura4⁺ rga6::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG7151 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 CRIB-3GFP:ura4⁺ rga4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG7563 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 CRIB-3GFP:ura4⁺ rga4::KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG5670 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 for3-3GFP:ura4⁺</i> | S. Martin |
| PPG5870 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- for3-3GFP:ura4⁺ rga6::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG5872 | <i>leu1-32 ura4-D18 ade- for3-3GFP:ura4⁺ rga4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG13019 | <i>leu1-32 ura4-D18 for3-3GFP:ura4⁺ rga4::NatMX6 rga6::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG5248 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 tea1-GFP:KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG3951 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- tea1-GFP:KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG12480 | <i>leu1-32 ura4-D18 tea1-GFP:KanMX6 rga4::NatMX6</i> | Este trabajo |
| PPG13064 | <i>leu1-32 ura4-D18 tea1-GFP:KanMX6 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG5946 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6M rho2::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG11906 | h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rho2::KanMX6 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG3741 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- rho3::ura4⁺</i> | M. Balasubramanian |
| PPG13674 | <i>leu1-32 ura4-D18 rho3::ura4⁺ rga4::NatMX6 rga6::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG4714 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 HA-cdc42:KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG4568 | h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ade- HA-cdc42:KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |

| Estirpe | Genotipo | Origen |
|----------|--|-----------------------|
| PPG4537 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG5241 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 tea1::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG4552 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 tea1::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG13125 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 CRIB-td-Tomato:ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG13032 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 CRIB-td-Tomato:ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG6901 | <i>h⁺ leu1-32 ura4- rga4-GFP:KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG13035 | <i>leu1-32 rga4-GFP:KanMX6 CRIB-td-Tomato:ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG13337 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 Pnmt1-GFP-rga6:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13360 | <i>leu1-32 rga6::KanMX6 Pnmt1-GFP-rga6:leu1 CRIB-td-Tomato:ura⁺</i> | Este trabajo |
| PPG11844 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4-RFP:KanMX6</i> | R. Daga |
| PPG11845 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 rga4-RFP:KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG11041 | <i>leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 rga4::NatMX6</i> | Este trabajo |
| PPG12872 | <i>leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 rga4::KanMX6 Pnmt1-rga4⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG11038 | <i>leu1-32 ura4-D18 rga4-GFP:KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG13677 | <i>leu1-32 ura4-D18 rga4-GFP:KanMX6 rga6::ura4⁺ Pnmt1-rga6⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG8038 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 aur-mCherry-atb2</i> | T. Toda |
| PPG13529 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 pact1-Lifeact-GFP:leu1</i> | M. Balasubramanian |
| PPG8556 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 end4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG12854 | <i>leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 end4::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG3005 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 wsp1::leu</i> | V. Sirotkin |
| PPG12831 | <i>leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 wsp1::leu</i> | Este trabajo |
| PPG2568 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 for3::KanMX6</i> | B. Feierbach |
| PPG13545 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 for3::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG9233 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 myo52::ura4⁺</i> | H. Valdivieso |
| PPG13671 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 myo52::ura4⁺ rga6-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12811 | <i>leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 for3::KanMX6 CRIB-td-Tomato:ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG13611 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 GFP-rga6:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13567 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12802 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GFP ΔN-term1:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13572 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GFP ΔN-term2:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13575 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GFP ΔC-term1:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13573 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GFP ΔC-term2:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12877 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺ rga6-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12879 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺ rga6-GFP ΔN-term1:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12878 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺ rga6-GFP ΔN-term2:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12881 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺ rga6-GFP ΔC-term1:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12880 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺ rga6-GFP ΔC-term2:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13629 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GFP ΔSer:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13632 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-T141A-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13635 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-T141D-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13644 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-T141A-GFP ΔSer:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13641 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-T141D-GFP ΔSer:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12855 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 PBR-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12857 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 GFP-PBR:leu1</i> | Este trabajo |

| Estirpe | Genotipo | Origen |
|----------|---|-----------------------|
| PPG13623 | <i>leu1-32 rga6::KanMX6 GFP-rga6:leu1 CRIB-td-Tomato:ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG2601 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 gef1::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG11066 | <i>leu1-32 ura4-D18 ade- gef1::ura4⁺ rga6::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG7305 | <i>leu1-32 ura4-D18 gef1::ura4⁺ rga4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG3637 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 scd1::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG4303 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 scd1::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG12414 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade- scd1::KanMX6 rga6::NatMX6</i> | Este trabajo |
| PPG6657 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 scd1::ura4⁺ rga4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG13660 | <i>leu1-32 ura4-D18 ade- gef1::ura4⁺ rga6::KanMX6 rga6-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13601 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade- scd1::KanMX6 rga6::NatMX6 rga6-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG5668 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 scd2-GFP:KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG13005 | <i>leu1-32 ura4-D18 scd2-GFP:KanMX6 rga6::NatMX6</i> | Este trabajo |
| PPG13352 | <i>leu1-32 ura4-D18 ade- gef1::ura4⁺ rga6::KanMX6 Pnmt1-rga6⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13349 | <i>leu1-32 ura4-D18 gef1::ura4⁺ rga4::KanMX6 Pnmt1-rga4⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13369 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade- scd1::KanMX6 rga6::NatMX6 Pnmt1-rga6⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13366 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 scd1::ura4⁺ rga4::KanMX6 Pnmt1-rga4⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13380 | <i>leu1-32 ura4-D18 scd2-GFP:KanMX6 rga6::KanMX6 Pnmt1-rga6⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13501 | <i>leu1-32 ura4-D18 scd2-GFP:KanMX6 rga4::KanMX6 Pnmt1-rga4⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13357 | <i>leu1-32 ura4-D18 CRIB-3GFP:ura4⁺ rga6::KanMX6 Pnmt1-rga6⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13354 | <i>leu1-32 ura4-D18 CRIB-3GFP:ura4⁺ rga4::KanMX6 Pnmt1-rga4⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13519 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade- scd1::KanMX6 rga6::NatMX6 Pnmt1-GFP-rga6:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG5665 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 hys3-D1 myo52-GFP:KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG5866 | <i>leu1-32 ura4-D18 ade- myo52-GFP:KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG11915 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- for3::KanMX6 rga6::ura4⁺</i> | Este trabajo |
| PPG11912 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 for3::KanMX6 rga4::NatMX6</i> | Este trabajo |
| PPG12373 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 sec3-2 his5⁺ ura4⁺</i> | S. Martin |
| PPG13053 | <i>leu1-32 ura4-D18 ade- sec3-2 his5⁺ ura4⁺ rga6::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG13056 | <i>leu1-32 ura4-D18 sec3-2 his5⁺ ura4⁺ rga4::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG3736 | <i>h⁻ leu1-32 ura4- ade- exo70::ura4⁺</i> | Colección laboratorio |
| PPG13323 | <i>leu1-32 ura4- ade- exo70::ura4⁺ rga6::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG13503 | <i>leu1-32 ura4- exo70::ura4⁺ rga4::KanMX6</i> | Este trabajo |
| PPG3701 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 sec8-1</i> | M. Balasubramanian |
| PPG11841 | <i>leu1-32 ura4-D18 sec8-1 rga6::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG11839 | <i>leu1-32 ura4-D18 sec8-1 rga4::KanMX6</i> | Colección laboratorio |
| PPG13518 | <i>leu1-32 ura4-D18 ade- for3::KanMX6 rga6::KanMX6 Pnmt1-rga6⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13520 | <i>leu1-32 ura4-D18 for3::KanMX6 rga4::KanMX6 Pnmt1-rga4⁺:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13666 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- for3::KanMX6 rga6::ura4⁺ Pnmt1-GFP-rga6:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13614 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GAPrga4-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13617 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6 rga4-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13620 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6 rga4-GAPrga6-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG13638 | <i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4::NatMX6 rga6::ura4⁺ rga6-GAPrga4-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12861 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 N-term_{rga2}-GFP:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12865 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 N-term_{rga2}-rga6-GFP ΔC-term1:leu1</i> | Este trabajo |
| PPG12869 | <i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 N-term_{rga2}-rga6-GFP ΔN-term2 ΔC-term1:leu1</i> | Este trabajo |

| Estirpe | Genotipo | Origen |
|----------|---|-----------------------|
| PPG6831 | $h^- leu1-32 ura4-D18 dis2::ura4^+$ | A. Bueno |
| PPG13656 | $leu1-32 ura4-D18 dis2::ura4^+ rga6::KanMX6 rga6-GFP:leu1$ | Este trabajo |
| PPG6828 | $h^- leu1-32 ura4-D18 sds21::ura4^+$ | A. Bueno |
| PPG13658 | $leu1-32 ura4-D18 sds21::ura4^+ rga6::KanMX6 rga6-GFP:leu1$ | Este trabajo |
| PPG9856 | $h^+ leu1-32 ura4-D18 ade- rad24::NatMX6$ | Colección laboratorio |
| PPG12824 | $leu1-32 ura4-D18 rga6-GFP:KanMX6 rad24::NatMX6$ | Este trabajo |
| PPG13778 | $h^+ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6::KanMX6 rga6-GFP \Delta 187-259:leu1$ | Este trabajo |
| PPG4514 | $leu1-32 ura4-D18 orb2-34$ | Colección laboratorio |
| PPG11918 | $leu1-32 ura4-D18 orb2-34 rga6::KanMX6$ | Este trabajo |

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 el autoclave.

– Medio YES (medio rico)

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. 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 o nourseothricina o clonNat (*WERNER BioAgents*) a una concentración de 50 µg/ml, a partir de soluciones madre esterilizadas por filtración, después de la esterilización del medio en el autoclave.

– 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 bajo el control del promotor del gen *nmt1⁺*. En estos experimentos las células se cultivaron en medio mínimo con los suplementos adecuados y tiamina (5 µg/ml), consiguiendo la represión del promotor (Maudrell, 1990). Posteriormente, las células se lavaron 4 veces con agua 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 0,3%, Na₂HPO₄ al 0,22% y 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):** 0,26 M MgCl₂·6H₂O, 5 mM Cl₂Ca·2H₂O, 0,67 M KCl y 14 mM Na₂SO₄.

– **Solución concentrada de minerales (10.000X):** 81 mM H₃BO₃, 23,7 mM MnSO₄, 14 mM ZnSO₄·7H₂O, 7,4 mM FeCl₃·6H₂O, 2,5 mM MoO₄·2H₂O, 6 mM KI, 1,6 mM CuSO₄·5H₂O y 47,6 mM ácido cítrico.

– **Solución concentrada de vitaminas (1.000X):** 81,2 mM ácido nicotínico, 55,5 mM inositol, 40,8 mM biotina y 4,2 mM ácido pantoténico.

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**

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).

Cuando fue necesario, los medios empleados para el crecimiento de *S. pombe* se suplementaron con diversos compuestos:

– Para estudiar la dependencia de la localización de Rga6 respecto a los citoesqueletos de la célula se usó la droga Latrunculina A (*Sigma*), que despolimeriza el citoesqueleto de actina, a una concentración de 50 µM en cultivos de medio YES líquido, partiendo de una solución madre preparada en DMSO a una concentración de 5 mM. Para despolimerizar el citoesqueleto de microtúbulos, se utilizó el compuesto metil benzimidazol carbamato (MBC, *Sigma*) a una concentración de 2,5 µg/ml en cultivos de medio YES líquido, partiendo de una solución madre preparada en DMSO a una concentración de 2,5 mg/ml. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Como control se usó un cultivo tratado con el solvente DMSO al 1%.

– Para acentuar el fenotipo de la cepa mutante doble *rga6Δ scd1Δ* se usó la hidroxurea, un inhibidor de la ribonucleótido reductasa que bloquea la progresión del ciclo celular, pero permite que las células sigan creciendo. La hidroxurea (HU, *Sigma*) se utilizó a 12 mM a partir de una solución madre preparada en agua estéril a 1 M.

2.2 Medios de cultivo para *E. coli*

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

– **Medio LB (Luria-Bertani)**

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 (100 µg/ml).

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.

De manera rutinaria, se preparó un preinóculo en medio líquido, al que se dejó alcanzar la fase exponencial y posteriormente se inoculó 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, 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 Sincronización de cultivos celulares de *S. pombe* mediante el uso de cepas mutantes termosensibles

La cepa mutante de *S. pombe cdc25-22* es termosensible. Presenta un ciclo mitótico normal a la temperatura permisiva (25°C), mientras que a la temperatura restrictiva (36°C) las células detienen el ciclo celular en fase G2 (Mitchison and Creanor, 1971). Esta propiedad se puede aprovechar para conseguir cultivos sincrónicos.

Inicialmente, la cepa mutante se cultivó en medio YES a 25°C durante toda la noche. A la mañana siguiente, se inoculó medio YES a una densidad óptica a 600 nm de 0,3 y se incubó a 36°C durante 4 horas para provocar la parada del ciclo celular. Posteriormente las células se analizaron mediante microscopía.

3.3 Ensayos de crecimiento en gota

Los estudios de termosensibilidad y de crecimiento a diferentes temperaturas de *S. pombe* se realizaron en medios sólidos YES o medio mínimo con o sin tiamina. Partiendo de cultivos líquidos, las células se concentraron hasta una densidad óptica a 600 nm igual a 2, 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 de la temperatura.

3.4 Condiciones de crecimiento para *E. coli*

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

4 Métodos genéticos

4.1 Conjugación

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe*, se usaron estirpes heterotálicas 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 (Malt Extract Agar). Los cigotos se originan transcurridas 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

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, y se trataron con 20-50 unidades de glucusasa (*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.

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 α 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. En el laboratorio, se construyó una versión modificada del plásmido pBluescript SK+ cuyo sitio de clonación múltiple fue alterado introduciendo nuevos sitios de clonación y un epítipo de hemaglutinina del virus de la influenza. Este plásmido fue construido por el Dr. Manuel Arellano.

– pGEX (Pharmacia)

Contiene el gen que codifica la proteína GST (de Glutathion-S Transferasa), el gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7 junto con el operón de la 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*

– 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 de corte único que lo linearice. Normalmente, se utilizaron los sitios de restricción de las enzimas *NruI* o *Tth111I*, que se encuentran 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. Este plásmido descrito en (Keeney and Boeke, 1994) 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* de *S. pombe*; un gen marcador de complementación de auxotrofías de *S. pombe* 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).

Dentro de la familia de plásmidos pREP se encuentra también el vector pREP-KZ o pREP1-GST (Shiozaki and Russell, 1995). Se trata de un vector pREP1 que contiene en el extremo 5' del sitio de clonación múltiple, la secuencia codificante de la proteína GST y un sitio de corte para la trombina, y en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple, la secuencia codificante de dos epítomos de la hemaglutinina.

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, 0,05 U/µl de polimerasa Taq (BioTaq, *Bioline*) o 0,02 U/µl de polimerasa Phusion High-Fidelity, (*Thermo Scientific*) 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 (*GE Healthcare*).

La mutación de la treonina 141 de Rga6 se realizó por mutagénesis dirigida mediante PCR. Para ello se usó la enzima Pfu Ultra High Fidelity Polymerase (*Agilent Technologies*), oligos solapantes que contenían la mutación deseada y como ADN molde la ORF de *rga6⁺* clonada en el vector pGEM-T. El ADN resultante se secuenció para confirmar el reemplazamiento de la treonina 141 tanto por una alanina como por un aspártico. La ORF de *rga6⁺* mutada se clonó en el vector pJK-148 y se integró en el locus *leu1⁺* de la cepa *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ*, como se ha descrito en el apartado 5.1.2 de Materiales y Métodos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por *Integrated DNA Technologies (IDT)* y sus secuencias y utilidad se describen en la **Tabla II**.

Tabla II: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

| Nombre | Secuencia | Utilidad |
|------------------------|---|--|
| Apa1 Prga6 F | 5'-ATATAGGGGCCACTGTTTATACTTGTGTCTC-3' | Clonación del promotor de <i>rga6⁺</i> |
| Sall Prga6 R | 5'-ATATAGTCGACACTTCTCCCAACAATTTC-3' | Clonación del promotor de <i>rga6⁺</i> |
| BamHI Trga6 F | 5'-ATATAGGATCCGAAAGGATTTCTGTTTTCCG-3' | Clonación del terminador de <i>rga6⁺</i> |
| SacI Trga6 R | 5'-ATATAGAGCTCCTGCATTTATACAATCTAGC-3' | Clonación del terminador de <i>rga6⁺</i> |
| Sall ORFrga6 F | 5'-ATATAGTCGACATGACCTTAAATCCTTCGACTC-3' | Clonación de la ORF de <i>rga6⁺</i> |
| BamHI Cter rga6 R | 5'-ATATAGGATCCAGATTTCTTCTGTTTGATCG-3' | Clonación de la ORF de <i>rga6⁺</i> |
| Sall ATG Ser rga6 F | 5'-ATATAGTCGACATGTCATCCCTAAATCTAAGCTCC-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP ΔN-term1 |
| Sall ATG +GAP rga6 F | 5'-ATATAGTCGACATGCTTACTTACTCTCCAAACGTC-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP ΔN-term2 |
| BamHI ΔC580 rga6 R | 5'-ATATAGGATCCTGGAGAATCTTCTTCCGGAC-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP ΔC-term2 |
| BamHI ΔCrga6 –PBR R | 5'-ATATAGGATCCTCCGAAGAAGCAGTAACAGTG-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP ΔC-term1 |
| Sall ATG PBR F | 5'-ATATAGTCGACATGGTCACTGTTACTGCTTCTTCG-3' | Clonación de la región polibásica de <i>rga6⁺</i> |
| BamHI Cter rga6 STOP R | 5'-ATATAGGATCCTTAAAGATTTCTTCTGTTTGATCG-3' | Clonación de la región polibásica de <i>rga6⁺</i> |
| SER MENOS BgIII R | 5'-ATATAAGATCTCCTCCCTAGAGACCATTG-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP ΔSer |
| SER MENOS BgIII F | 5'-ATATAAGATCTATCTCCGCCGCCCTCTC-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP ΔSer |
| Rga6 T141A F | 5'-CATGTGGATCCCCTGCTAAGCTGATACTCG-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP T141A |
| Rga6 T141A R | 5'-CGAGTGTATCAGCTTAGCAGGGGATCCACATG-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP T141A |
| Rga6 T141D F | 5'-CATGTGGATCCCCTGATAAGCTGATACTCG-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP T141D |
| Rga6 T141D R | 5'-CGAGTGTATCAGCTTATCAGGGGATCCACATG-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP T141D |
| BgIII+GAP rga6 F | 5'-ATATAAGATCTTACTTACTCTCCAAACGTC-3' | Construcción de la cepa Rga6-GFP Δ187-259 |
| Apal Prga4 F | 5'-ATATAGGGCCCCGTTCTCGCTGACAGGATTG-3' | Clonación del promotor de <i>rga4⁺</i> |
| Sall Prga4 R | 5'-ATATAGTCGACAAGGAAATCAATATTCTGAAAATT-3' | Clonación del promotor de <i>rga4⁺</i> |
| BamHI Trga4 F | 5'-ATATAGGATCCATTCACACTATCCTTTAATAATTG-3' | Clonación del terminador de <i>rga4⁺</i> |
| SacI Trga4 R | 5'-ATATAGAGCTCTGATAATGCATTATGAAGAAGC-3' | Clonación del terminador de <i>rga4⁺</i> |
| Sall ORFrga4 F | 5'-ATATAGTCGACATGAATTCGGGTACGACTTC-3' | Clonación de la ORF de <i>rga4⁺</i> |
| BamHI GAPrga4 R | 5'-ATATAGGATCCGGCAAAGACTTCATGTACATG-3' | Clonación de la ORF de <i>rga4⁺</i> |
| BamHI GAPrga6R | 5'-ATATAGGATCCAAGTAGTACCTTGCCAGTG-3' | Construcción de la cepa Rga4-GAPrga6-GFP |
| ORFrga4 GAPrga6 | 5'-CTTCGATCAAACAGGCTAACACTCTGTTGCTCCAC ATATTTTGCTC-3' | Construcción de la cepa Rga4-GAPrga6-GFP |
| ORFrga6 GAPrga4 | 5'-CACTCCTGAATGTGCACCTCTTCTTTGAGAGTCCGAC GCTTATCGTTTC-3' | Construcción de la cepa Rga6-GAPrga4-GFP |
| PstI GAPrga4 R | 5'-ATATACTGCAGGAGTAAAATAGCAACTTGGTCAGTTA ACCCAACATCAGAAAAACAATTGGGTATGTCGAGAGAAT TGATTTTGGCAAAGACTTCATG TACATG-3' | Construcción de la cepa Rga6-GAPrga4-GFP |

| Nombre | Secuencia | Utilidad |
|---------------------|--|---|
| NdeI ORFrga6 F | 5'-ATATACATATGATGACCTTAAATCCTTCGACTC-3' | Clonación de la ORF de <i>rga6</i> ⁺ sin la PBR, para realizar el ensayo de unión a fosfolípidos |
| Sall ΔCrga6 -PBR R | 5'-ATATAGTCGACTTATTCCGAAGAAGCAGTAACAGTG-3' | Clonación de la ORF de <i>rga6</i> ⁺ sin la PBR, para realizar el ensayo de unión a fosfolípidos |
| Sall N-term rga2F | 5'-ATATAGTCGACATGGTAAAGATGGATGTTGTG-3' | Clonación del extremo N-term de <i>rga2</i> ⁺ |
| Sall N-term rga2 R | 5'-ATATAGTCGACCTCAGGAGGAAGAAAGAATACATC-3' | Clonación del extremo N-term de <i>rga2</i> ⁺ (para llevar Rga6 a los polos) |
| BamHI N-term rga2 R | 5'-ATATAGGATCCCTCAGGAGGAAGAAAGAATACATC-3' | Clonación del extremo N-term de <i>rga2</i> ⁺ |

5.4 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*).

La técnica usada se basa en el protocolo descrito (Sanger *et al.*, 1977), pero en este caso, se emplearon dideoxinucleótidos marcados con fluorocromos y un láser capaz de reconocer los distintos colores (longitud de onda de emisión) de los fluorocromos, que corresponden a cada una de las bases del DNA. El fundamento de este sistema es una reacción de PCR en la cual la extensión enzimática de una cadena de DNA a partir de un oligonucleótido iniciador, empleando DNA bicatenario como molde, es interrumpida por la incorporación de dideoxinucleótidos.

5.5 Manipulación de ADN

Todos los protocolos utilizados para la manipulación de ADN se recogen en (Ausubel *et al.*, 1995) y (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 el agente intercalante de ADN Midori Green Advance (*Nippon Genetics Europe*) a una concentración final de 0,04 µl/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*).

5.6 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).

5.7 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 (Bähler *et al.*, 1998).

5.8 Vectores construidos en este trabajo

5.8.1 Construcción de las sobreexpresiones integradas de *rga6*⁺ y de *rga4*⁺

Para poder integrar las sobreexpresiones de *rga6*⁺ y de *rga4*⁺ en el locus *leu1*⁺ de las cepas *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ* y *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 rga4Δ*, respectivamente, se utilizaron los vectores pREP1-Rga6, pREP1-GFP-Rga6 y pREP3X-Rga4. A partir de ellos, se obtuvieron directamente los módulos de integración "Promotor *nmt1*⁺ - (GFP) ORF *rga6*⁺/*rga4*⁺ - Terminador *nmt1*⁺" como PstI/ SacI y se clonaron en el sitio de clonación múltiple del plásmido pJK-148 (Figura 75). Posteriormente se linearizó el vector pJK-148 mediante digestión con las enzimas *NruI* o *Tth111I* y se integró en el gen *leu1*⁺ de las células.

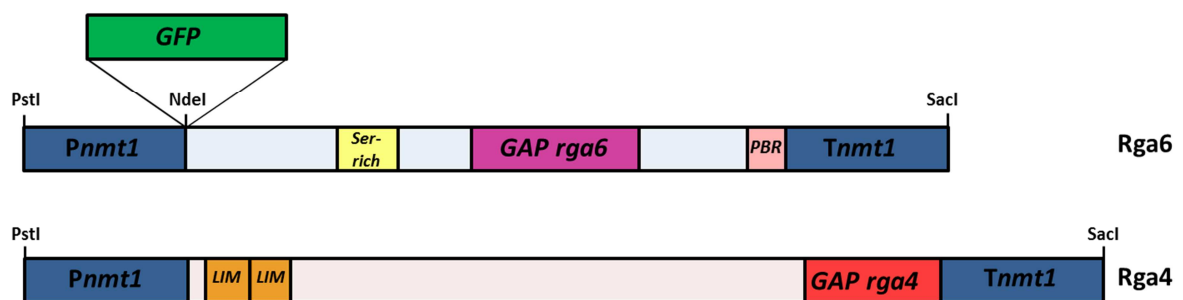


Figura 75. Módulo de integración para sobreexpresar *rga6*⁺ y *rga4*⁺.

Los plásmidos obtenidos fueron los siguientes:

- pJK-148 *Pnmt1* - *rga6*⁺ - *Tnmt1*
- pJK-148 *Pnmt1* - *GFP-rga6* - *Tnmt1*
- pJK-148 *Pnmt1* - *rga4*⁺ - *Tnmt1*

5.8.2 Construcción del módulo de integración de *rga6*⁺ y sus versiones truncadas o mutadas

Para poder integrar la ORF de *rga6*⁺ y sus versiones truncadas o mutadas en el locus *leu1*⁺ de la cepa *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ*, se construyó un módulo de integración (**Figura 76**). Este módulo contenía 500 pares de bases de la región promotora de *rga6*⁺, la ORF de *rga6*⁺ completa o sus versiones truncadas y 500 pares de bases de la región 3' no codificante de *rga6*⁺. Además, se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de las ORF codificantes para las versiones truncadas de *rga6*⁺ y tanto en el extremo 5' como 3' de la ORF completa de *rga6*⁺ y de su región polibásica (PBR).

Se obtuvieron las distintas partes del módulo mediante una PCR de alta fidelidad. Se utilizó como molde el vector pREP1-Rga6 para obtener las distintas versiones de la ORF de *rga6*⁺ y ADN genómico de *S. pombe* para amplificar las regiones 3' y 5' no codificantes del gen. Se emplearon oligonucleótidos que incorporaban los sitios de restricción Apal y Sall para la región promotora de *rga6*⁺, Sall y BamHI para las distintas versiones de la ORF de *rga6*⁺ y BamHI y SacI para amplificar el terminador de *rga6*⁺. La ORF de *rga6*⁺ con la región rica en serinas delecionada se clonó como Sall/ BglII/ BamHI. En el extremo 5' o 3' de las distintas ORFs de *rga6*⁺ se clonó la proteína GFP como Sall/ Sall o como BamHI/ BamHI, respectivamente.

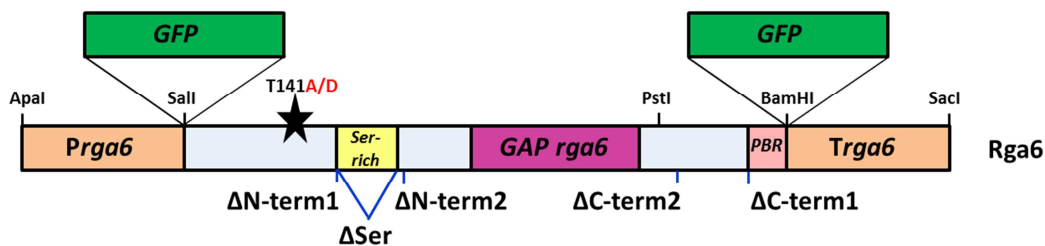


Figura 76. Módulo de integración de *rga6*⁺ y de sus versiones mutadas o truncadas.

Los productos de PCR se clonaron en los plásmidos pGEM-T y KS+ para permitir su secuenciación y la construcción progresiva de los distintos módulos de integración. Posteriormente los módulos completos se clonaron en el plásmido pJK-148, en el sitio Apal-SacI de su secuencia de clonación múltiple. Se linearizó el vector pJK-148 mediante digestión con las enzimas *NruI* o *Tth111I* y se integró en el gen *leu1*⁺ de las células.

Los vectores obtenidos fueron los siguientes:

- **pJK-148 GFP-Rga6:** se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 5' de la ORF de *rga6*⁺ completa (1-733 aa).
- **pJK-148 Rga6-GFP:** se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6*⁺ completa (1-733 aa).
- **pJK-148 Rga6-GFP ΔN-term1:** se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6*⁺ ΔN-term1 (187-733 aa), que carece de la zona previa a la región rica en serinas.
- **pJK-148 Rga6-GFP ΔN-term2:** se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6*⁺ ΔN-term2 (260-733 aa), que carece tanto de la zona previa a la región rica en serinas, como de dicha región.

- **pJK-148 Rga6-GFP Δ C-term1**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺ Δ C-term1* (1-700 aa), que no tiene los 33 aminoácidos finales correspondientes a la región polibásica (PBR).
- **pJK-148 Rga6-GFP Δ C-term2**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺ Δ C-term2* (1-580 aa), que carece de una región más amplia del extremo C-terminal de la proteína.
- **pJK-148 Rga6-GFP Δ Ser**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺ Δ Ser* (Δ 187-253 aa), que carece de la región rica en serinas.
- **pJK-148 Rga6-GFP T141A**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺* que contiene, por mutagénesis dirigida, la mutación de la treonina 141 por una alanina.
- **pJK-148 Rga6-GFP T141D**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺* que contiene, por mutagénesis dirigida, la mutación de la treonina 141 por un aspártico.
- **pJK-148 Rga6-GFP Δ Ser T141A**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺* que carece de la región rica en serinas (Δ 187-253 aa) y que además contiene, por mutagénesis dirigida, la mutación de la treonina 141 por una alanina.
- **pJK-148 Rga6-GFP Δ Ser T141D**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺* que carece de la región rica en serinas (Δ 187-253 aa) y que además contiene, por mutagénesis dirigida, la mutación de la treonina 141 por un aspártico.
- **pJK-148 Rga6-GFP Δ 187-259**: se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺* que carece de la región rica en serinas y, además, de los dos sitios putativos de reconocimiento por la proteína Rad24 (Δ 187-259 aa).
- **pJK-148 PBR-GFP**: se clonó la secuencia de Rga6 que codifica los 41 aminoácidos finales de la proteína (693-733 aa), que incluyen los 33 aminoácidos correspondientes a la región polibásica (PBR, 700-733 aa), y se le fusionó en el extremo 3', en fase de lectura, la ORF de la proteína GFP.
- **pJK-148 GFP-PBR**: se clonó la secuencia de Rga6 que codifica los 41 aminoácidos finales de la proteína (693-733 aa), que incluyen los 33 aminoácidos correspondientes a la región polibásica (PBR, 700-733 aa), y se le fusionó en el extremo 5', en fase de lectura, la ORF de la proteína GFP.

5.8.3 Construcción del módulo de integración de *rga4⁺*

Para poder integrar la ORF de *rga4⁺* en el locus *leu1⁺* de la cepa *h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga4 Δ* , se construyó un módulo de integración (**Figura 77**). Este módulo contenía 500 pares de bases de la región promotora de *rga4⁺*, la ORF de *rga4⁺* completa y 240 pares de bases de la región 3' no codificante de *rga4⁺*. Además, se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga4⁺*.

Las distintas partes se obtuvieron llevando a cabo una PCR de alta fidelidad. Se utilizó como molde el vector pREP3X-Rga4 para obtener la ORF de *rga4⁺* y ADN genómico de *S. pombe* para amplificar las regiones 3' y 5' no codificantes del gen. Se emplearon oligonucleótidos que incorporaban los sitios de restricción Apal y Sall para la región promotora

de *rga4*⁺, Sall y BamHI para la ORF de *rga4*⁺ y BamHI y SacI para amplificar el terminador de *rga4*⁺. La proteína GFP se clonó como BamHI/ BamHI en el extremo 3' de la ORF de *rga4*⁺.



Figura 77. Módulo de integración de *rga4*⁺.

Los productos de PCR se clonaron en los plásmidos pGEM-T y KS+ para permitir su secuenciación y la construcción progresiva del módulo de integración. Posteriormente el módulo completo se clonó en el plásmido pJK-148, en el sitio Apal-SacI de su secuencia de clonación múltiple. Se linearizó el vector pJK-148 mediante digestión con la enzima *Tth1111* y se integró en el gen *leu1*⁺ de las células.

El vector obtenido fue el siguiente:

– **pJK-148 Rga4-GFP:** se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga4*⁺ completa (1-933 aa).

5.8.4 Construcción del módulo de integración de las quimeras de *rga6*⁺ y *rga4*⁺

Para poder integrar la ORF de *rga6*⁺ con su dominio GAP reemplazado por el de Rga4 en el locus *leu1*⁺ de la cepa *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ*, se construyó un módulo de integración (**Figura 78 A**). Dicho módulo contenía 500 pares de bases de la región promotora de *rga6*⁺, la ORF de *rga6*⁺ con su dominio GAP intercambiado por el de Rga4 y 500 pares de bases de la región 3' no codificante de *rga6*⁺. Se construyó otro módulo de integración para poder integrar la ORF de *rga4*⁺ con su dominio GAP reemplazado por el de Rga6 en el locus *leu1*⁺ de la cepa *h*⁺ *leu1-32 ura4-D18 rga4Δ* (**Figura 78 B**). Este módulo contenía 500 pares de bases de la región promotora de *rga4*⁺, la ORF de *rga4*⁺ con su dominio GAP intercambiado por el de Rga6 y 240 pares de bases de la región 3' no codificante de *rga4*⁺. En ambos casos, se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de las ORFs quiméricas.

Las distintas partes se obtuvieron llevando a cabo una PCR de alta fidelidad. Se utilizaron como moldes los vectores pREP1-Rga6 y pREP3X-Rga4 para obtener las ORFs quiméricas y ADN genómico de *S. pombe* para obtener las regiones 3' y 5' no codificantes de los genes. Se emplearon oligonucleótidos que incorporaban los sitios de restricción Apal y Sall para las regiones promotoras de *rga6*⁺ o de *rga4*⁺, Sall y BamHI para las ORFs quiméricas y BamHI y SacI para amplificar sus regiones terminadoras. La proteína GFP se clonó como BamHI/ BamHI en el extremo 3' de las quimeras.

Para realizar el intercambio de los dominios GAPs sin introducir ningún sitio de restricción entre el dominio GAP donante y la ORF receptora, se utilizaron los sitios de restricción PstI y BglII, únicos en las ORFs de *rga6*⁺ y de *rga4*⁺, respectivamente. Se realizó una primera PCR con oligos largos, que permitió amplificar los dominios GAPs y añadir en sus

extremos un fragmento de secuencia complementaria a la ORF receptora. Posteriormente, se llevó a cabo el reemplazamiento de los dominios GAPs mediante una segunda PCR sobre la ORF receptora. Para ello se utilizó el primer producto de PCR, correspondiente al dominio GAP donante, como uno de los oligos. Por último, se clonó la quimera resultante sobre el módulo de integración de *rga6⁺*, como Sall/ PstI y sobre el módulo de integración de *rga4⁺*, como BgIII/ BamHI.

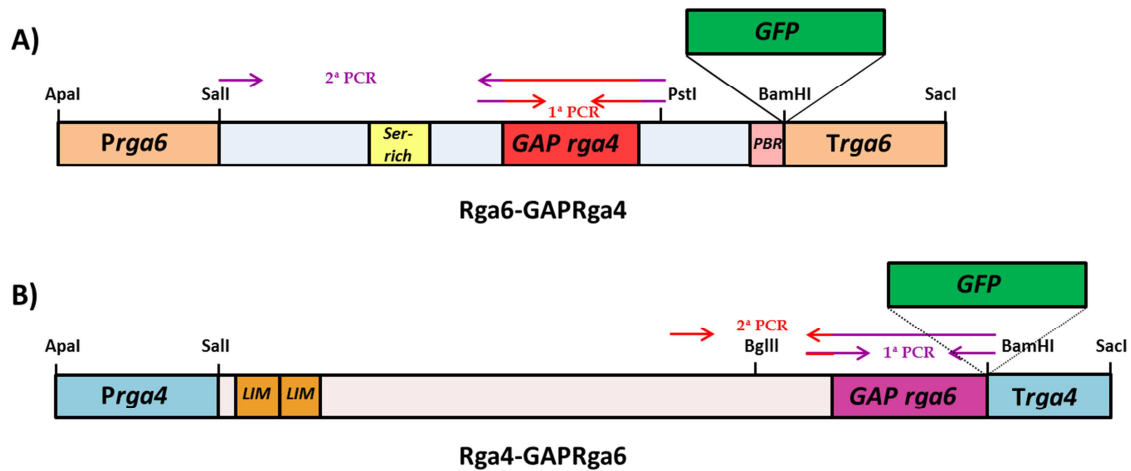


Figura 78. Módulos de integración de las ORFs quiméricas entre *rga6⁺* y *rga4⁺*. A) Módulo de integración usado para reemplazar el dominio GAP de *rga6⁺* por el de *rga4⁺*. B) Módulo de integración usado para reemplazar el dominio GAP de *rga4⁺* por el de *rga6⁺*. Se representa como flechas los oligonucleótidos utilizados como cebadores en las PCRs para reemplazar los dominios GAPs. El color rojo indica complementariedad de la secuencia del oligonucleótido con *rga4⁺* y el color morado indica complementariedad de la secuencia con *rga6⁺*.

Todos los productos de PCR se clonaron en los plásmidos pGEM-T y KS+ para permitir su secuenciación y la construcción progresiva de los distintos módulos de integración. Los módulos finales completos se clonaron en el plásmido pJK-148, en el sitio Apal-SacI de su secuencia de clonación múltiple. Posteriormente se linealizó el vector pJK-148 mediante digestión con las enzimas *NruI* o *Tth111I* y se integró en el gen *leu1⁺* de las células.

Los vectores obtenidos fueron los siguientes:

- **pJK-148 Rga6-GAPRga4-GFP:** se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga6⁺*, en la que se había reemplazado su dominio GAP (329-547 aa) por el de Rga4 (758-933 aa).
- **pJK-148 Rga4-GAPRga6-GFP:** se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de la ORF de *rga4⁺*, en la que se había reemplazado su dominio GAP por el de Rga6.

5.8.5 Construcción del módulo de integración de las quimeras de *rga6⁺* y *rga2⁺*

Para integrar la secuencia codificante de las proteínas quiméricas Rga2-Rga6 en el locus *leu1⁺* de la cepa *h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade- rga6Δ*, se construyeron dos módulos de integración que contenían: 500 pares de bases de la región promotora de *rga6⁺*, la secuencia codificante del extremo N-terminal de *rga2⁺* fusionada, en fase de lectura, con cada una de las dos versiones truncadas de la ORF de *rga6⁺* y 500 pares de bases de la región 3' no codificante de *rga6⁺* (Figura 79 A y B). Como control de la localización en los polos, se construyó otro

módulo de integración que contenía sólo el extremo N-terminal de *rga2*⁺, bajo el control del promotor y del terminador de *rga6*⁺ (Figura 79 C). En todos los casos, se clonó la ORF de la proteína GFP en el extremo 3' de las quimeras.

Las distintas partes se obtuvieron llevando a cabo una PCR de alta fidelidad. Se utilizó como molde ADN plasmídico conteniendo las ORFs de *rga2*⁺ o de *rga6*⁺ para amplificar la región codificante de interés de cada gen y ADN genómico de *S. pombe* para obtener las regiones 3' y 5' no codificantes de *rga6*⁺. Se emplearon oligonucleótidos que incorporaban los sitios de restricción Apal y Sall para la región promotora de *rga6*⁺, Sall y Sall para el extremo N-terminal de *rga2*⁺ (o Sall/ BamHI en el plásmido control), Sall y BamHI para la ORFs truncadas de *rga6*⁺ y BamHI y SacI para amplificar el terminador de *rga6*⁺. La proteína GFP se clonó como BamHI/ BamHI en el extremo 3' de las quimeras.

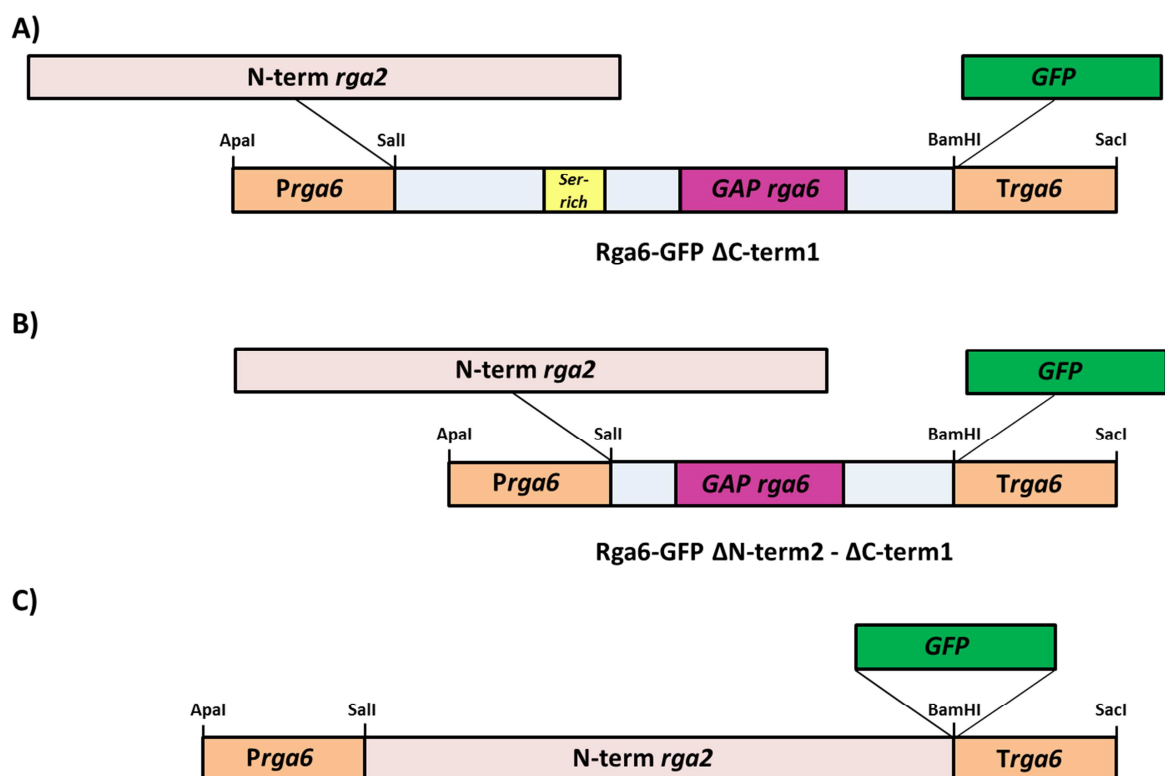


Figura 79. Módulos de integración de las ORFs quiméricas entre *rga6*⁺ y *rga2*⁺. A) y B) Módulos de integración usados para construir las quimeras entre Rga6 y Rga2. C) Módulo de integración usado para expresar el extremo N-terminal de Rga2 bajo el control del promotor y del terminador de *rga6*⁺.

Los productos de PCR se clonaron en los plásmidos pGEM-T y KS+ para permitir su secuenciación y la construcción progresiva de los módulos de integración. Posteriormente los módulos finales completos se clonaron en el plásmido pJK-148, en el sitio Apal-SacI de su secuencia de clonación múltiple. Se linearizó el vector pJK-148 mediante digestión con la enzima *Tth1111* y se integró en el gen *leu1*⁺ de las células.

Los vectores obtenidos fueron los siguientes:

– **pJK-148 N-term _{Rga2}-GFP:** plásmido control. Se clonó el extremo N-terminal de la proteína GAP Rga2 (1-718 aa) fusionado a GFP.

– **pJK-148 N-term_{Rga2}-Rga6-GFP Δ C-term1**: se clonó el extremo N-terminal de Rga2 (1-718 aa) fusionado, en fase de lectura, con la versión truncada de Rga6 Δ C-term1 (1-700 aa) que carece de la región polibásica de Rga6 (PBR). Se marcó la proteína quimérica en su extremo 3' con GFP para estudiar su localización.

– **pJK-148 N-term_{Rga2}-Rga6-GFP Δ N-term2 - Δ C-term1**: se clonó el extremo N-terminal de Rga2 (1-718 aa) fusionado, en fase de lectura, con la versión truncada de Rga6 Δ N-term2 - Δ C-term1 (260-700 aa), que carece del extremo N-terminal de Rga6 y de su región polibásica. Se marcó la quimera en su extremo 3' con GFP para estudiar su localización.

6 Análisis de proteínas

6.1 Obtención de extractos celulares

Los ensayos de Western-blot y purificación de proteínas se realizaron a partir de extractos celulares obtenidos de la siguiente manera: se resuspendieron 1×10^7 células en 300 μ l de tampón de lisis B (NP-40 al 0,5%, NaCl 20 mM, glicerol al 10%, MgCl₂ 2 mM, DTT 0,1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7,6) con inhibidores de proteasas (2 μ g/ml aprotinina, 2 μ g/ml leupeptina, 2 μ g/ml peptatina y 1 mM PMSF). Las células se lisaron con bolitas de vidrio (v/v) (G8772, *Sigma*) en una Fast-Prep FP120 (*Bio 101 Savant*), durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6,0. 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 en los extractos celulares se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito en (Bradford, 1976). Para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida, las muestras de extracto obtenidas se prepararon en tampón de carga 1X (SDS al 2%, glicerol al 10%, DTT 50 mM y azul de bromofenol al 0,04%).

6.2 Obtención de extractos celulares con TCA al 20%

Para analizar la expresión de las versiones truncadas de Rga6 y de las proteínas quiméricas de Rga6 y de Rga4, se obtuvieron extractos celulares de las distintas cepas con TCA al 20%. Se recogieron 50 ml de células creciendo en fase exponencial ($D.O_{600nm} = 0,6$) y se lavaron con 1 ml de TCA al 20%. Se resuspendieron en 200 μ l de TCA al 20% y se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, *Sigma*) en una Fast-Prep FP120 (*Bio 101 Savant*), durante 2 pulsos de 20 segundos a una potencia de 6,5. Se añadieron otros 200 μ l de TCA al 20% y se agitaron las células vigorosamente en un vórtex, para completar el proceso de lisis. Se retiraron mediante centrifugación las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares. El sobrenadante obtenido se centrifugó durante 10 minutos a 11.000 rpm. Se resuspendió el pellet en 300 μ l de tampón de carga 2X (SDS al 4%, glicerol al 20%, DTT 100 mM y azul de bromofenol al 0,08%) y se añadieron 200 μ l de Tris-HCl 1 M pH 9,0. Se hirvieron las muestras 3 minutos a 95°C y a continuación, se centrifugaron durante 10 minutos a 11.000 rpm. Finalmente, se recuperó el sobrenadante y se analizó la proteína presente en los extractos mediante Western-blot.

6.3 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 11.000 rpm durante 1 minuto.

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.

6.4 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% o con leche desnatada al 1-3%, durante 1 hora 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 peroxidasa por quimioluminiscencia. Se empleó el kit WesternBright™ Sirius HRP substrate (*Advanta, Ecogen*). Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron usando películas X Ray Film 100NIF (*Fujifilm*).

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal de rata frente al epítipo HA, HA High Affinity (*Roche*), a una dilución de 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal de ratón frente a 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.
- 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 rata unido a HRP (*Santa Cruz Biotechnology*) a una dilución 1:15.000.
- Anticuerpo policlonal anti-GST unido a HRP (*GE Healthcare*) a una dilución 1:5.000.

6.5 Valoración de GTP-Cdc42

6.5.1 Producción de GST-CRIB

Los niveles de Cdc42 activa se determinaron mediante el ensayo de precipitación con GST-CRIB. Este dominio sólo se asocia a Cdc42 cuando está unida a GTP. La proteína recombinante GST-CRIB se obtuvo en una cepa DH5 α de *E. coli* transformada con el plásmido pGEX-CRIB. Este plásmido lleva el fragmento de ADN que codifica el dominio CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) de la proteína Pak2 de células humanas, fusionado a la secuencia que codifica la proteína GST (Glutathion S-Transferasa) (Manser *et al.*, 1998). 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 densidad óptica 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 a 28°C durante 3 horas más. 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, con inhibidores de proteasas (2 μ g/ml de pestatina, 2 μ g/ml de leupeptina, 2 μ g/ml de aprotinina y 1 mM PMSF) y lisozima (2 mg/ml). Tras 30 minutos de incubación en hielo, las células se sonicaron 3 veces a una potencia de 14 μ m de amplitud de onda durante 2 minutos. Se añadió Tritón TX-100 a una concentración final del 1% y se centrifugaron las células lisadas a 10.000 rpm durante 1 hora a 4°C.

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

La cantidad de proteína se cuantificó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomassie Brilliant Blue R-250, comparándola con diferentes cantidades conocidas de seroalbúmina bovina.

6.5.2 Ensayo de unión de GTP-Cdc42 a GST-CRIB asociado a glutation-sefarosa

Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio que producían la proteína Cdc42 fusionada al epítipo HA en su extremo N-terminal, tal y como se describió en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos. Se tomaron 2 mg de los extractos proteicos, se llevaron hasta 500 μ l con tampón de lisis B y se añadieron 10 μ g de GST-CRIB asociado a las bolas de glutation-sefarosa. La mezcla se incubó durante 2 horas a 4°C y se lavó 4 veces con 1 ml de tampón de lisis B. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 30 μ l de tampón de carga 2X y se sometió a SDS-PAGE en un gel de poliacrilamida al 12%. Después se transfirió a una membrana de PVDF, que se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-HA High Affinity (*Roche*),

para detectar la fracción de la proteína HA-Cdc42 unida a GTP, que había precipitado al unirse al dominio CRIB de Pak2.

6.6 Ensayo de unión de proteínas a fosfolípidos unidos a una membrana comercial (PIP-Strips)

6.6.1 Purificación de las proteínas

Para poder purificar las proteínas de interés se fusionaron a GST y se sobreexpresaron. Para ello se utilizó el vector pREP-KZ, descrito en el apartado 5.1.2 de esta sección. Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio, como se ha descrito previamente en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos, utilizando como tampón de lisis: Tris-HCl 20 mM pH 8, NaCl 100 mM, EDTA 2 mM y Triton X-100 0,1%. En un 1 ml de tampón de lisis, se incubaron durante 2 horas en agitación a 4°C, 8 mg de los extractos obtenidos con 130 µl de bolitas de glutation-sefarosa (*GE Healthcare*) al 50%. Tras el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con el tampón de lisis. Las proteínas de interés fusionadas a GST se eluyeron de la matriz de glutation-sefarosa con 150 µl de tampón de elución: Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 100 mM, Triton X-100 0,1% y Glutation reducido 20 mM.

6.6.2 Ensayo de unión de proteínas a fosfolípidos

Para el posterior ensayo de unión, primero se bloqueó durante 1 hora la membrana comercial con los fosfolípidos unidos (*Echelon Biosciences P-6001*) con leche al 1% en TBST. A continuación se incubaron las proteínas purificadas con la membrana a una concentración de 1 µg/ml en solución de bloqueo durante 1 hora. Se realizaron 3 lavados con TBST y se incubó la membrana de fosfolípidos con anticuerpo anti-GST conjugado con HRP (*GE Healthcare*) a una dilución 1:5.000. Se lavó la membrana y las proteínas unidas se detectaron mediante quimioluminiscencia.

7 Técnicas microscópicas y tinciones

Para llevar a cabo estas técnicas las muestras se tomaron directamente de cultivos líquidos, creciendo en fase logarítmica y se emplearon diversos microscopios para su observación: Leica DM RXA y Nikon Eclipse i90 con cámara Orca-ER, ambos controlados mediante el programa Metamorph® (*MDS Analytical Technologies*). Además, se utilizó el equipo Personal Deltavision Microscope (*Applied Precision*), que consta de un microscopio invertido Olympus IX-71, controlado mediante el programa softWoRx Resolve3D. Las imágenes obtenidas fueron capturadas con una cámara CoolSNAP HQ² (*PHOTOMETRICS*) y se procesaron posteriormente con los programas Metamorph® (*MDS Analytical Technologies*), ImageJ o Adobe Photoshop CS4 (*Adobe System, Inc*). Para el estudio de las oscilaciones de los niveles de Cdc42 activa en los polos y para realizar los experimentos de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), se utilizó el equipo Spinning Disk, que consta de un microscopio invertido Olympus IX-81, controlado mediante el programa Metamorph® (*MDS Analytical*

Technologies), una cámara Evolve y un módulo confocal de Spinning Disk CSU-X1 de Yokogawa.

7.1 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).

7.1.1 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 de lectura con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la muestra en el microscopio de fluorescencia. Existen 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; la proteína azul fluorescente o CFP (Cian Fluorescent Protein), que emite luz de 475 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 433 nm; o la proteína amarilla fluorescente o YFP (Yellow Fluorescent Protein), que emite luz de 527 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 514 nm.

Existe además la proteína roja fluorescente (DsRFP), que emite luz de 586 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 554 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. Además, estas proteínas pueden fusionarse en tándem para aumentar la intensidad de la luz de emisión, como la proteína td-Tomato, que emite luz de 581 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 554 nm. El marcaje de parejas de proteínas con diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes permite la realización de experimentos de co-localización (Shaner *et al.*, 2005).

7.1.2 Tinción de calcoflúor

El calcoflúor es un fluorocromo que, en *S. cerevisiae*, tiñe las zonas de pared ricas en quitina pero que en *S. pombe* se une fundamentalmente al (1-3)- β -glucano lineal del septo y de los polos en crecimiento (Cortés *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).

7.1.3 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). Se usa la faloidina conjugada a un compuesto fluorescente, en nuestro caso Alexa-fluor 448, como sonda para detectar y teñir la actina en el interior celular.

La tinción de actina se realizó a partir del protocolo inicial, descrito por (Marks and 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, Mg_2SO_4 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 compuesto fluorescente. Finalmente, se lavaron 3 veces con PEM, se tomó 1 μ l de células permeabilizadas y se mezcló 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 o 2 días a 4°C.

7.1.4 Tinción de FITC-lectina

Para ver las zonas de crecimiento, se realizó la tinción de la pared celular con lectina. Se utilizó lectina procedente de *Bandeiraea simplicifolia* conjugada al fluorocromo FITC (*Sigma*), preparada a una concentración de 1 μ g/ μ l. La tinción se realizó según las indicaciones del protocolo descrito por (Bähler and Pringle, 1998), con las siguientes modificaciones. Se partió de cultivos en fase exponencial incubados a 28°C en medio mínimo líquido. Las células se recogieron por centrifugación (5 minutos a 3.000 rpm) y se resuspendieron en medio mínimo más 5 μ g/ml de FITC-lectina. Se incubaron las células en agitación y en oscuridad a 28°C durante 15 minutos. Posteriormente, se recogieron las células por centrifugación y se lavaron 2 veces con medio mínimo. Se incubaron de nuevo las células, ya teñidas con FITC-lectina, en medio mínimo a 28°C durante 2 horas y media, en agitación y oscuridad. Transcurrido este tiempo, se observaron las células al microscopio. Se realizó la tinción de calcoflúor para poder distinguir las nuevas zonas de crecimiento en la pared, de las zonas viejas teñidas con FITC-lectina.

7.2 Microscopía en tiempo real (time-lapse)

Esta técnica permite la observación de células a lo largo del tiempo. Para ello, se utilizaron cámaras multipocillo μ -Slide (*Ibidi*). Se pusieron 0.3 ml de cultivos líquidos creciendo en fase logarítmica en uno de los 8 pocillos, previamente recubierto con 10 μ l de lectina (*Sigma-Aldrich*) a 1 mg/ml (Cortés *et al.*, 2012). Los experimentos de time-lapse se realizaron a 25°C o 28°C gracias a una cámara termostatazada acoplada a los microscopios Personal Deltavision Microscope (*Applied Precision*) y Spinning Disk. Se capturaron imágenes en un único plano, en el punto medio de enfoque, a distintos intervalos de tiempo.

7.2.1 Ensayos de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching)

Los ensayos de FRAP se realizaron a 25°C a partir de cultivos líquidos en fase logarítmica. Se recogieron células por centrifugación (1 min a 3.000 rpm) y se prepararon las muestras para su observación al microscopio sobre un portaobjetos. El fotoblanqueo se realizó mediante 3 repeticiones de quemado, aplicando un láser a 488 nm, sobre una región de dimensiones constantes en todos los experimentos (199 píxeles = 3.54 μm^2). Las imágenes se tomaron antes de aplicar el fotoblanqueo, inmediatamente después del fotoblanqueo y durante la posterior recuperación de la fluorescencia, a los tiempos establecidos.

Para procesar y normalizar los datos de los experimentos de FRAP se utilizó la aplicación denominada FRAPanalyzER de Metamorph®. Este programa permite normalizar la intensidad de fluorescencia recuperada en los ensayos de FRAP respecto a la señal de fondo de las imágenes y respecto a la pérdida de la señal de fluorescencia en células no fotoblanqueadas, como consecuencia de la propia adquisición de las imágenes a lo largo del tiempo.

Posteriormente se calculó el porcentaje final de recuperación de la intensidad de fluorescencia tras el fotoblanqueo. Para ello, se consideró la señal de fluorescencia previa al fotoblanqueo como 100% de intensidad de fluorescencia y la señal de fluorescencia en el momento del fotoblanqueo como 0% de intensidad de fluorescencia.

Se utilizó el programa GraphPad® para obtener las curvas ajustadas a los valores medios obtenidos de recuperación de la fluorescencia en las distintas regiones de la célula, a partir de “n” regiones fotoblanqueadas. Además, se aplicó a los datos un análisis estadístico “One phase exponential association” que permitió obtener los valores de “ $t_{1/2}$ ”, el porcentaje de recuperación máxima de la fluorescencia y el “R cuadrado” de las curvas.

7.2.2 “Streaming”: adquisición de imágenes a muy alta velocidad

Para estudiar en detalle la localización de Rga6 respecto a Cdc42 activa en los polos de las células, se adquirieron imágenes en tiempo real utilizando la opción de “streaming” del equipo Spinning Disk, que consiste en la adquisición de datos de forma continua, sin descargar los archivos, para lograr una mayor velocidad de adquisición de imágenes. Se cultivó en medio líquido a una temperatura de 25°C una cepa que producía GFP-Rga6 y CRIB-td-Tomato, que se une a la GTPasa Cdc42 activa localizada en la membrana plasmática. Para la adquisición de

imágenes a lo largo del tiempo, las células en crecimiento exponencial se prepararon en las cámaras multipocillo μ -Slide (*Ibidi*), previamente recubiertas con lectina, como se ha descrito anteriormente. Se adquirieron 25 imágenes a intervalos de 0.5 segundos, empleando un tiempo de exposición de 200 ms para cada canal de fluorescencia.

Sobre una de esas imágenes capturadas, se utilizó el programa Image J para trazar una línea en el polo de la célula y medir la intensidad de la señal de fluorescencia de GFP-Rga6 y CRIB-td-Tomato. Los valores de intensidad obtenidos se normalizaron respecto al valor máximo de ambos canales y se representaron frente a la longitud, en píxeles, analizada en el polo celular.

7.2.3 Estudio de las oscilaciones de los niveles de Cdc42 activa en los polos

Para analizar las oscilaciones de los niveles de Cdc42 activa en los polos, se partió de cultivos líquidos creciendo en fase exponencial de células silvestres y *rga6* Δ que producían la proteína CRIB-3GFP, que se une a la GTPasa Cdc42 activa localizada en la membrana plasmática. Las células se cultivaron a una temperatura de 28°C.

Para la adquisición de imágenes a lo largo del tiempo, se prepararon las células en las cámaras multipocillo μ -Slide (*Ibidi*), previamente recubiertas con lectina, como se ha descrito anteriormente. Se seleccionaron las células bipolares, en función del tamaño y la forma del polo, y se capturaron imágenes durante 30 minutos con un intervalo de 1 minuto.

Se utilizó el programa Image J para medir la intensidad de la señal de CRIB-GFP en los polos de las células, respecto a la señal de fondo de las imágenes. Los valores de intensidad obtenidos se normalizaron respecto al valor máximo de ambos polos y se representaron frente al tiempo. Con los datos normalizados se calculó el coeficiente de correlación entre los valores de intensidad de CRIB-GFP obtenidos en el polo viejo y en el polo nuevo. Sobre las gráficas obtenidas se calculó el periodo y la amplitud de las oscilaciones, siendo el periodo el tiempo entre 2 picos sucesivos y la amplitud la diferencia de intensidad entre pico y valle de una misma oscilación. Por último, se calculó la significación estadística entre los diferentes valores mediante una prueba t de Student.

8 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 ClustalW.

Las secuencias de genes y proteínas se obtuvieron de la base de datos de *S. pombe*, The Wellcome Trust Sanger Institute *Schizosaccharomyces pombe* Gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>), actualmente (<http://www.pombase.org>).

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

BIBLIOGRAFÍA

- Abenza, J.F., Chessel, A., Raynaud, W.G., and Carazo-Salas, R.E. (2014). Dynamics of cell shape inheritance in fission yeast. *PLoS One* *9*, e106959.
- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F., and Pringle, J.R. (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of cell biology* *111*, 131-142.
- Alvarez-Tabarés, I., Grallert, A., Ortiz, J.M., and Hagan, I.M. (2007). *Schizosaccharomyces pombe* protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *Journal of cell science* *120*, 3589-3601.
- Arellano, M., Durán, A., and Pérez, P. (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J* *15*, 4584-4591.
- Arellano, M., Durán, A., and Pérez, P. (1997). Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* *110*, 2547-2555.
- Arellano, M., Niccoli, T., and Nurse, P. (2002). Tea3p is a cell end marker activating polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current biology : CB* *12*, 751-756.
- Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Durán, A., and Pérez, P. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *Journal of cell science* *112*, 3569-3578.
- Aspenstrom, P., Fransson, A., and Richnau, N. (2006). Pombe Cdc15 homology proteins: regulators of membrane dynamics and the actin cytoskeleton. *Trends Biochem Sci* *31*, 670-679.
- Attanapola, S.L., Alexander, C.J., and Mulvihill, D.P. (2009). Ste20-kinase-dependent TEDS-site phosphorylation modulates the dynamic localisation and endocytic function of the fission yeast class I myosin, Myo1. *Journal of cell science* *122*, 3856-3861.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Bähler, J., and Pringle, J.R. (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* *12*, 1356-1370.
- Bähler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R. (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* *14*, 943-951.
- Balasubramanian, M.K., Bi, E., and Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Current biology : CB* *14*, R806-818.
- Barrett, T., Xiao, B., Dodson, E.J., Dodson, G., Ludbrook, S.B., Nurmahomed, K., Gamblin, S.J., Musacchio, A., Smerdon, S.J., and Eccleston, J.F. (1997). The structure of the GTPase-activating domain from p50rhoGAP. *Nature* *385*, 458-461.

- Basi, G., Schmid, E., and 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, 131-136.
- Bender, A., and Pringle, J.R. (1989). Multicopy suppression of the cdc24 budding defect in yeast by CDC42 and three newly identified genes including the ras-related gene RSR1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 9976-9980.
- Bendezú, F.O., and Martin, S.G. (2011). Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Molecular biology of the cell* 22, 44-53.
- Bendezú, F.O., and Martin, S.G. (2012). Cdc42 oscillations in yeasts. *Sci Signal* 5, pe53.
- Bendezú, F.O., Vincenzetti, V., and Martin, S.G. (2012). Fission yeast Sec3 and Exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell poles. *PLoS One* 7, e40248.
- Bendezú, F.O., Vincenzetti, V., Vavylonis, D., Wyss, R., Vogel, H., and Martin, S.G. (2015). Spontaneous Cdc42 polarization independent of GDI-mediated extraction and actin-based trafficking. *PLoS biology* 13, e1002097.
- Benton, B.K., Tinkelenberg, A., González, I., and Cross, F.R. (1997). Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol Cell Biol* 17, 5067-5076.
- Bernal, M., Sanchez-Romero, M.A., Salas-Pino, S., and Daga, R.R. (2012). Regulation of fission yeast morphogenesis by PP2A activator pta2. *PLoS One* 7, e32823.
- Bicho, C.C., Kelly, D.A., Snaith, H.A., Goryachev, A.B., and Sawin, K.E. (2010). A catalytic role for Mod5 in the formation of the Tea1 cell polarity landmark. *Current biology : CB* 20, 1752-1757.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D., and Surrey, T. (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system *in vitro*. *Nature* 450, 1100-1105.
- Bos, J.L., Rehmann, H., and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.
- Bourne, H.R. (1997). G proteins. The arginine finger strikes again. *Nature* 389, 673-674.
- 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* 7, 248-254.
- Brown, J.L., Jaquenoud, M., Gulli, M.P., Chant, J., and Peter, M. (1997). Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev* 11, 2972-2982.
- Brunner, D., and Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell cycle* 102, 695-704.
- Busch, K.E., Hayles, J., Nurse, P., and Brunner, D. (2004). Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Developmental cell* 6, 831-843.

- Cabib, E., Drgonová, J., and Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 67, 307-333.
- Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. *Developmental cell* 12, 671-682.
- Calonge, T.M., Arellano, M., Coll, P.M., and Pérez, P. (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular microbiology* 47, 507-518.
- Calonge, T.M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I., and Pérez, P. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Molecular biology of the cell* 11, 4393-4401.
- Casamayor, A., and Snyder, M. (2002). Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol.* 5, 179-186.
- Casey, P.J. (1994). Lipid modifications of G proteins. *Current opinion in cell biology* 6, 219-225.
- Castagnetti, S., Behrens, R., and Nurse, P. (2005). End4/Sla2 is involved in establishment of a new growth zone in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* 118, 1843-1850.
- Coll, P.M., Rincón, S.A., Izquierdo, R.A., and Pérez, P. (2007). Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *EMBO J* 26, 1865-1877.
- Coll, P.M., Trillo, Y., Ametzazurra, A., and Pérez, P. (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell* 14, 313-323.
- Cortés, J.C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A., and 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. *Journal of cell science* 118, 157-174.
- Cortés, J.C., Konomi, M., Martins, I.M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Osumi, M., Durán, A., and Ribas, J.C. (2007). The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Molecular microbiology* 65, 201-217.
- Cortés, J.C., Sato, M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Clemente-Ramos, J.A., Ramos, M., Okada, H., Osumi, M., Durán, A., and Ribas, J.C. (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *The Journal of cell biology* 198, 637-656.
- Cruz, S., Muñoz, S., Manjón, E., García, P., and Sánchez, 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, 778-794.
- Cvrcková, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J.R., and Nasmyth, K. (1995). Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* 9, 1817-1830.

- Chang, E., Bartholomeusz, G., Pimental, R., Chen, J., Lai, H., Wang, L.H., Yang, P., and 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, 8066-8074.
- Chang, E.C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H.P., and Wigler, M.H. (1994). Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell cycle* 79, 131-141.
- Chang, E.C., and Philips, M.R. (2006). Spatial segregation of Ras signaling: new evidence from fission yeast. *Cell cycle* 5, 1936-1939.
- Chant, J., Mischke, M., Mitchell, E., Herskowitz, I., and Pringle, J.R. (1995). Role of Bud3p in producing the axial budding pattern of yeast. *The Journal of cell biology* 129, 767-778.
- Chen, G.C., Kim, Y.J., and Chan, C.S. (1997). The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11, 2958-2971.
- Chen, H., Kuo, C.C., Kang, H., Howell, A.S., Zyla, T.R., Jin, M., and Lew, D.J. (2012). Cdc42p regulation of the yeast formin Bni1p mediated by the effector Gic2p. *Molecular biology of the cell* 23, 3814-3826.
- Chesarone, M.A., and Goode, B.L. (2009). Actin nucleation and elongation factors: mechanisms and interplay. *Current opinion in cell biology* 21, 28-37.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E., and Philips, M.R. (1999). Endomembrane Trafficking of Ras. *Cell* 98, 69-80.
- Das, M., Drake, T., Wiley, D.J., Buchwald, P., Vavylonis, D., and Verde, F. (2012). Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science* 337, 239-243.
- Das, M., Nuñez, I., Rodriguez, M., Wiley, D.J., Rodriguez, J., Sarkeshik, A., Yates, J.R., 3rd, Buchwald, P., and Verde, F. (2015). Phosphorylation-dependent inhibition of Cdc42 GEF Gef1 by 14-3-3 protein Rad24 spatially regulates Cdc42 GTPase activity and oscillatory dynamics during cell morphogenesis. *Molecular biology of the cell* 26, 3520-3534.
- Das, M., and Verde, F. (2013). Role of Cdc42 dynamics in the control of fission yeast cell polarization. *Biochemical Society transactions* 41, 1745-1749.
- Das, M., Wiley, D.J., Chen, X., Shah, K., and Verde, F. (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Current biology : CB* 19, 1314-1319.
- Das, M., Wiley, D.J., Medina, S., Vincent, H.A., Larrea, M., Oriolo, A., and Verde, F. (2007). Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Molecular biology of the cell* 18, 2090-2101.
- de Curtis, I., and Meldolesi, J. (2012). Cell surface dynamics - how Rho GTPases orchestrate the interplay between the plasma membrane and the cortical cytoskeleton. *Journal of cell science* 125, 4435-4444.
- Deng, L., and Moseley, J.B. (2013). Compartmentalized nodes control mitotic entry signaling in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 24, 1872-1881.

- DerMardirossian, C., and Bokoch, G.M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends in cell biology* *15*, 356-363.
- Dickman, M.B., and Yarden, O. (1999). Serine/threonine protein kinases and phosphatases in filamentous fungi. *Fungal Genet Biol* *26*, 99-117.
- Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M.D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L., and Hall, A. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* *351*, 400-402.
- Doi, A., Kita, A., Kanda, Y., Uno, T., Asami, K., Satoh, R., Nakano, K., and Sugiura, R. (2015). Geranylgeranyltransferase Cwg2-Rho4/Rho5 module is implicated in the Pmk1 MAP kinase-mediated cell wall integrity pathway in fission yeast. *Genes Cells* *20*, 310-323.
- Dong, Y., Pruyne, D., and Bretscher, A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *The Journal of cell biology* *161*, 1081-1092.
- Drubin, D.G., and Nelson, W.J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell* *84*, 335-344.
- Dudin, O., Bendezú, F.O., Groux, R., Laroche, T., Seitz, A., and Martin, S.G. (2015). A formin-nucleated actin aster concentrates cell wall hydrolases for cell fusion in fission yeast. *The Journal of cell biology* *208*, 897-911.
- Dunn, T.M., and Shortle, D. (1990). Null alleles of SAC7 suppress temperature-sensitive actin mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* *10*, 2308-2314.
- Durán, A., and Pérez, P. (2004). Cell Wall Synthesis. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*, R. Egel (ed.). Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 269-279.
- Endo, M., Shirouzu, M., and Yokoyama, S. (2003). The Cdc42 binding and scaffolding activities of the fission yeast adaptor protein Scd2. *J. Biol. Chem.* *278*, 843-852.
- Estravís, M., Rincón, S.A., Santos, B., and Pérez, P. (2011). Cdc42 regulates multiple membrane traffic events in fission yeast. *Traffic* *12*, 1744-1758.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42--the centre of polarity. *Journal of cell science* *117*, 1291-1300.
- Feierbach, B., and Chang, F. (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Current biology : CB* *11*, 1656-1665.
- Ford, J.C., al-Khodairy, F., Fotou, E., Sheldrick, K.S., Griffiths, D.J., and Carr, A.M. (1994). 14-3-3 protein homologs required for the DNA damage checkpoint in fission yeast. *Science* *265*, 533-535.
- Forsburg, S.L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* *21*, 2955-2956.
- Fukui, Y., and Yamamoto, M. (1988). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to ras1. *Mol Gen Genet* *215*, 26-31.
- Gachet, Y., and Hyams, J.S. (2005). Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *Journal of cell science* *118*, 4231-4242.
- Garcia-Mata, R., Boulter, E., and BurrIDGE, K. (2011). The 'invisible hand': regulation of RHO GTPases by RHO GDIs. *Nature reviews. Molecular cell biology* *12*, 493-504.

- García, I., Jiménez, D., Martín, V., Durán, A., and Sánchez, Y. (2005). The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 97, 569-576.
- García, P., García, I., Marcos, F., de Garibay, G.R., and Sánchez, 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, 1321-1334.
- García, P., Tajadura, V., García, I., and Sánchez, Y. (2006). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 17, 1620-1631.
- García, P., Tajadura, V., and Sánchez, Y. (2009b). The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 20, 721-731.
- Gibson, T.J., Hyvönen, M., Musacchio, A., Saraste, M., and Birney, E. (1994). PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 19, 349-353.
- Gilbreth, M., Yang, P., Bartholomeusz, G., Pimental, R.A., Kansra, S., Gadiraju, R., and Marcus, S. (1998). Negative regulation of mitosis in fission yeast by the shk1 interacting protein skb1 and its human homolog, Skb1Hs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 14781-14786.
- Gilbreth, M., Yang, P., Wang, D., Frost, J., Polverino, A., Cobb, M.H., and Marcus, S. (1996). The highly conserved *skb1* gene encodes a protein that interacts with Shk1, a fission yeast Ste20/PAK homolog. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 13802-13807.
- Gillooly, D.J., Simonsen, A., and Stenmark, H. (2001). Cellular functions of phosphatidylinositol 3-phosphate and FYVE domain proteins. *Biochem. J.* 355, 249-258.
- Golub, E.I. (1988). 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 16, 1641.
- Gonzalez-Billault, C., Muñoz-Llancao, P., Henriquez, D.R., Wojnacki, J., Conde, C., and Caceres, A. (2012). The role of small GTPases in neuronal morphogenesis and polarity. *Cytoskeleton* 69, 464-485.
- González, M., Brito, N., and González, C. (2012). High abundance of Serine/Threonine-rich regions predicted to be hyper-O-glycosylated in the secretory proteins coded by eight fungal genomes. *BMC microbiology* 12, 213.
- Goto, M. (2007). Protein O-glycosylation in fungi: diverse structures and multiple functions. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 71, 1415-1427.
- Hachet, O., Berthelot-Grosjean, M., Kokkoris, K., Vincenzetti, V., Moosbrugger, J., and Martin, S.G. (2011). A phosphorylation cycle shapes gradients of the DYRK family kinase Pom1 at the plasma membrane. *Cell* 145, 1116-1128.
- Hachet, O., and Simanis, V. (2008). Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev* 22, 3205-3216.
- Hagan, I.M. (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *Journal of cell science* 111, 1603-1612.

- Hagan, I.M., and Hyams, J.S. (1988). The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* *89*, 343-357.
- Hakoshima, T., Shimizu, T., and Maesaki, R. (2003). Structural basis of the Rho GTPase signaling. *J Biochem* *134*, 327-331.
- He, B., and Guo, W. (2009). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Current opinion in cell biology* *21*, 537-542.
- Heinrich, M., Kohler, T., and Mosch, H.U. (2007). Role of Cdc42-Cla4 interaction in the pheromone response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryotic cell* *6*, 317-327.
- Hermeking, H., and Benzinger, A. (2006). 14-3-3 proteins in cell cycle regulation. *Seminars in cancer biology* *16*, 183-192.
- Hirata, D., Nakano, K., Fukui, M., Takenaka, H., Miyakawa, T., and 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. *Journal of cell science* *111*, 149-159.
- Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K., and 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*. *Molecular biology of the cell* *14*, 3617-3627.
- Hoffman, C.S., Wood, V., and Fantes, P.A. (2015). An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* *201*, 403-423.
- Howell, A.S., and Lew, D.J. (2012). Morphogenesis and the cell cycle. *Genetics* *190*, 51-77.
- Huang, J., Huang, Y., Yu, H., Subramanian, D., Padmanabhan, A., Thadani, R., Tao, Y., Tang, X., Wedlich-Soldner, R., and Balasubramanian, M.K. (2012). Nonmedially assembled F-actin cables incorporate into the actomyosin ring in fission yeast. *The Journal of cell biology* *199*, 831-847.
- Huang, Y., Chew, T.G., Ge, W., and Balasubramanian, M.K. (2007). Polarity determinants Tea1p, Tea4p, and Pom1p inhibit division-septum assembly at cell ends in fission yeast. *Developmental cell* *12*, 987-996.
- Huisman, S.M., and Brunner, D. (2011). Cell polarity in fission yeast: a matter of confining, positioning, and switching growth zones. *Seminars in cell & developmental biology* *22*, 799-805.
- Irazoqui, J.E., Gladfelter, A.S., and Lew, D.J. (2003). Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat Cell Biol* *5*, 1062-1070.
- Ishiguro, J. (1998). Genetic control of fission yeast cell wall synthesis: the genes involved in wall biogenesis and their interactions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Genet Syst* *73*, 181-191.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* *153*, 163-168.

- Iwaki, T., Tanaka, N., Takagi, H., Giga-Hama, Y., and Takegawa, K. (2004). Characterization of *end4⁺*, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 21, 867-881.
- Iwase, M., Luo, J., Nagaraj, S., Longtine, M., Kim, H.B., Haarer, B.K., Caruso, C., Tong, Z., Pringle, J.R., and Bi, E. (2006). Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Molecular biology of the cell* 17, 1110-1125.
- Johnson, D.I. (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 54-105.
- Jourdain, I., Dooley, H.C., and Toda, T. (2012). Fission yeast sec3 bridges the exocyst complex to the actin cytoskeleton. *Traffic* 13, 1481-1495.
- Kang, P.J., Lee, M.E., and Park, H.O. (2014). Bud3 activates Cdc42 to establish a proper growth site in budding yeast. *The Journal of cell biology* 206, 19-28.
- Kang, P.J., Sanson, A., Lee, B., and Park, H.O. (2001). A GDP/GTP exchange factor involved in linking a spatial landmark to cell polarity. *Science* 292, 1376-1378.
- Karimzadeh, F., Primeau, M., Mountassif, D., Rouiller, I., and Lamarche-Vane, N. (2012). A stretch of polybasic residues mediates Cdc42 GTPase-activating protein (CdGAP) binding to phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate and regulates its GAP activity. *The Journal of biological chemistry* 287, 19610-19621.
- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P., and 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. *The Journal of cell biology* 144, 1173-1186.
- Keeney, J.B., and Boeke, J.D. (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136, 849-856.
- Kelly, F.D., and Nurse, P. (2011). Spatial control of Cdc42 activation determines cell width in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 22, 3801-3811.
- Kim, H., Yang, P., Catanuto, P., Verde, F., Lai, H., Du, H., Chang, F., and 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*. *The Journal of biological chemistry* 278, 30074-30082.
- Kim, H.W., Yang, P., Qyang, Y., Lai, H., Du, H., Henkel, J.S., Kumar, K., Bao, S., Liu, M., and Marcus, S. (2001). Genetic and molecular characterization of Skb15, a highly conserved inhibitor of the fission yeast PAK, Shk1. *Mol Cell Biol* 7, 1095-1101.
- Klose, C., Ejsing, C.S., Garcia-Saez, A.J., Kaiser, H.J., Sampaio, J.L., Surma, M.A., Shevchenko, A., Schwille, P., and Simons, K. (2010). Yeast lipids can phase-separate into micrometer-scale membrane domains. *The Journal of biological chemistry* 285, 30224-30232.
- Knaus, M., Pelli-Gulli, M.P., van Drogen, F., Springer, S., Jaquenoud, M., and Peter, M. (2007). Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence. *EMBO J* 26, 4501-4513.

- Kokkoris, K., Gallo Castro, D., and Martin, S.G. (2014). The Tea4-PP1 landmark promotes local growth by dual Cdc42 GEF recruitment and GAP exclusion. *Journal of cell science* *127*, 2005-2016.
- Kovar, D.R., Sirotkin, V., and Lord, M. (2011). Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends in cell biology* *21*, 177-187.
- Kozubowski, L., Saito, K., Johnson, J.M., Howell, A.S., Zyla, T.R., and Lew, D.J. (2008). Symmetry-breaking polarization driven by a Cdc42p GEF-PAK complex. *Current biology* : CB *18*, 1719-1726.
- Krapp, A., and Simanis, V. (2008). An overview of the fission yeast septation initiation network (SIN). *Biochemical Society transactions* *36*, 411-415.
- Kushner, R.S. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. Boyer, H.W. and Nicosia, S. (ed.) *Genetic engineering*. Elsevier, Amsterdam, 17-24.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* *227*, 680-685.
- Lamson, R.E., Winters, M.J., and Pryciak, P.M. (2002). Cdc42 Regulation of Kinase Activity and Signaling by the Yeast p21-Activated Kinase Ste20. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 2939-2951.
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Segall, J.E., and Thomas, D.Y. (1997). Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J* *16*, 83-97.
- Lechler, T., Jonsdottir, G.A., Klee, S.K., Pellman, D., and Li, R. (2001). A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast. *The Journal of cell biology* *155*, 261-270.
- Lee, M.E., Lo, W.C., Miller, K.E., Chou, C.S., and Park, H.O. (2015). Regulation of Cdc42 polarization by the Rsr1 GTPase and Rga1, a Cdc42 GTPase-activating protein, in budding yeast. *Journal of cell science* *128*, 2106-2117.
- Lee, W.L., Bezanilla, M., and Pollard, T.D. (2000). Fission yeast myosin-I, Myo1p, stimulates actin assembly by Arp2/3 complex and shares functions with WASp. *The Journal of cell biology* *151*, 789-800.
- Lo Presti, L., Chang, F., and Martin, S.G. (2012). Myosin Vs organize actin cables in fission yeast. *Molecular biology of the cell* *23*, 4579-4591.
- Longtine, M.S., DeMarini, D.J., Valencik, M.L., Al-Awar, O.S., Fares, H., De Virgilio, C., and Pringle, J.R. (1996). The septins: roles in cytokinesis and other processes. *Current opinion in cell biology* *8*, 106-119.
- Loo, T.H., and Balasubramanian, M. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pak-related protein, Pak1p/Orb2p, phosphorylates myosin regulatory light chain to inhibit cytokinesis. *The Journal of cell biology* *183*, 785-793.
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y., and Sugiura, R. (2006). Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Molecular biology of the cell* *17*, 5028-5037.

- Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M., and Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry* *281*, 2033-2043.
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T., and Lim, L. (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell Biol.* *1*, 183-192.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M.H., and 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*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 6180-6184.
- Marks, J., and Hyams, J.S. (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *S. pombe*. *European journal of cell biology* *39*, 27-32.
- Marston, A.L., Chen, T., Yang, M.C., Belhumeur, P., and Chant, J. (2001). A localized GTPase exchange factor, Bud5, determines the orientation of division axes in yeast. *Current biology : CB* *11*, 803-807.
- Martín-Cuadrado, A.B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Vázquez de Aldana, C.R., and del Rey, F. (2003). The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* *116*, 1689-1698.
- Martín-Cuadrado, A.B., Morrell, J.L., Konomi, M., An, H., Petit, C., Osumi, M., Balasubramanian, M., Gould, K.L., Del Rey, F., and de Aldana, C.R. (2005). Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Molecular biology of the cell* *16*, 4867-4881.
- Martín-García, R., Coll, P.M., and Pérez, P. (2014). F-BAR domain protein Rga7 collaborates with Cdc15 and Imp2 to ensure proper cytokinesis in fission yeast. *Journal of cell science* *127*, 4146-4158.
- Martin, S.G. (2009). Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends in cell biology* *19*, 447-454.
- Martin, S.G. (2015). Spontaneous cell polarization: Feedback control of Cdc42 GTPase breaks cellular symmetry. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* *37*, 1193-1201.
- Martin, S.G., and Berthelot-Grosjean, M. (2009). Polar gradients of the DYRK-family kinase Pom1 couple cell length with the cell cycle. *Nature* *459*, 852-856.
- Martin, S.G., and Chang, F. (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Current biology : CB* *16*, 1161-1170.
- Martin, S.G., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd, and Chang, F. (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Developmental cell* *8*, 479-491.
- Martin, S.G., Rincón, S.A., Basu, R., Pérez, P., and Chang, F. (2007). Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Molecular biology of the cell* *18*, 4155-4167.

- Mata, J., and Nurse, P. (1997). *tea1* and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* 89, 939-949.
- Maundrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *The Journal of biological chemistry* 265, 10857-10864.
- Merla, A., and Johnson, D.I. (2000). The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European journal of cell biology* 79, 469-477.
- Merla, A., and Johnson, D.I. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr Genet* 39, 205-209.
- Militello, R., and Colombo, M.I. (2013). Small GTPases as regulators of cell division. *Communicative & integrative biology* 6, e25460.
- Miller, P.J., and Johnson, D.I. (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol.* 14, 1075-1083.
- Mishra, M., Huang, J., and Balasubramanian, M.K. (2014). The yeast actin cytoskeleton. *FEMS microbiology reviews* 38, 213-227.
- Mitchison, J.M., and Creanor, J. (1971). Induction synchrony in the fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res* 67, 368-374.
- Mitchison, J.M., and Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* 75, 357-376.
- Moon, S.Y., and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in cell biology* 13, 13-22.
- Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in enzymology* 194, 795-823.
- Morrell-Falvey, J.L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G.D., and Gould, K.L. (2005). Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *Journal of cell science* 118, 5563-5573.
- Moseley, J.B., and Goode, B.L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 70, 605-645.
- Moseley, J.B., Mayeux, A., Paoletti, A., and Nurse, P. (2009). A spatial gradient coordinates cell size and mitotic entry in fission yeast. *Nature* 459, 857-860.
- Motegi, F., Arai, R., and 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. *Molecular biology of the cell* 12, 1367-1380.
- Mukherjee, D., Sen, A., Boettner, D.R., Fairn, G.D., Schlam, D., Bonilla Valentin, F.J., Michael McCaffery, J., Hazbun, T., Staiger, C.J., Grinstein, S., Lemmon, S.K., and Claudio Aguilar, R. (2013). Bem3, a Cdc42 GTPase-activating protein, traffics to an intracellular compartment and recruits the secretory Rab GTPase Sec4 to endomembranes. *Journal of cell science* 126, 4560-4571.

- Mulvihill, D.P., Edwards, S.R., and Hyams, J.S. (2006). A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motility and the Cytoskeleton* 63, 149-161.
- Munemitsu, S., Innis, M.A., Clark, R., McCormick, F., Ullrich, A., and Polakis, P. (1990). Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol Cell Biol* 10, 5977-5982.
- Muñoz, J., Cortés, J.C.G., Sipiczki, M., Ramos, M., Clemente-Ramos, J.A., Moreno, M.B., Martins, I.M., Pérez, P., and Ribas, J.C. (2013). Extracellular cell wall $\beta(1,3)$ glucan is required to couple septation to actomyosin ring contraction. *The Journal of cell biology* 203, 265-282.
- Muñoz, S., Manjón, E., García, P., Sunnerhagen, P., and Sánchez, Y. (2014a). The checkpoint-dependent nuclear accumulation of Rho1p exchange factor Rgf1p is important for tolerance to chronic replication stress. *Molecular biology of the cell* 25, 1137-1150.
- Muñoz, S., Manjón, E., and Sánchez, Y. (2014b). The putative exchange factor Gef3p interacts with Rho3p GTPase and the septin ring during cytokinesis in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* 289, 21995-22007.
- Musacchio, A., Cantley, L.C., and Harrison, S.C. (1996). Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 alpha subunit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 14373-14378.
- Mutoh, T., Nakano, K., and 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, 1189-1202.
- Nakano, K., Arai, R., and 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, 679-694.
- Nakano, K., Arai, R., and Mabuchi, I. (2005). Small GTPase Rho5 is a functional homologue of Rho1, which controls cell shape and septation in fission yeast. *FEBS letters* 579, 5181-5186.
- Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh-E, A., Matsui, Y., and Mabuchi, I. (2002). The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *Journal of cell science* 115, 4629-4639.
- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R., and Mabuchi, I. (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* 8, 357-370.
- Nakano, K., Mutoh, T., and 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, 1031-1042.
- Nakano, K., Toya, M., Yoneda, A., Asami, Y., Yamashita, A., Kamasawa, N., Osumi, M., and Yamamoto, M. (2011). Pob1 ensures cylindrical cell shape by coupling two distinct rho signaling events during secretory vesicle targeting. *Traffic* 12, 726-739.

- Onken, B., Wiener, H., Philips, M.R., and Chang, E.C. (2006). Compartmentalized signaling of Ras in fission yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *103*, 9045-9050.
- Ottilie, S., Miller, P.J., Johnson, D.I., Creasy, C.L., Sells, M.A., Bagrodia, S., Forsburg, S.L., and 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*, 5908-5919.
- Papadaki, P., Pizon, V., Onken, B., and Chang, E.C. (2002). Two Ras Pathways in Fission Yeast Are Differentially Regulated by Two Ras Guanine Nucleotide Exchange Factors. *Molecular and Cellular Biology* *22*, 4598-4606.
- Park, H.O., and Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* *71*, 48-96.
- Pérez, P., and Cansado, J. (2010). Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Current protein & peptide science* *11*, 680-692.
- Pérez, P., Portales, E., and Santos, B. (2015). Rho4 interaction with exocyst and septins regulates cell separation in fission yeast. *Microbiology* *161*, 948-959.
- Pérez, P., and Rincón, S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *The Biochemical journal* *426*, 243-253.
- Peter, M., Neiman, A.M., Park, H.O., van Lohuizen, M., and Herskowitz, I. (1996). Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J* *15*, 7046-7059.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R., and Hagan, I.M. (1998a). F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science* *111*, 867-876.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R., and Hagan, I.M. (1998b). FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *The Journal of cell biology* *141*, 1217-1228.
- Pollard, T.D. (2007). Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* *36*, 451-477.
- Pollard, T.D., Blanchoin, L., and Mullins, R.D. (2000). Molecular mechanisms controlling actin filament dynamics in nonmuscle cells. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* *29*, 545-576.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* *112*, 453-465.
- Pruyne, D., and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. I. Establishment and maintenance of polarity states. *Journal of cell science* *113* 365-375.
- Riedl, J., Crevenna, A.H., Kessenbrock, K., Yu, J.H., Neukirchen, D., Bista, M., Bradke, F., Jenne, D., Holak, T.A., Werb, Z., Sixt, M., and Wedlich-Soldner, R. (2008). Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nature methods* *5*, 605-607.

- Rincón, S.A., and Paoletti, A. (2016). Molecular control of fission yeast cytokinesis. *Seminars in cell & developmental biology pii: S1084-9521, 30007-30006*.
- Rincón, S.A., Santos, B., and Pérez, P. (2006). Fission yeast Rho5p GTPase is a functional paralogue of Rho1p that plays a role in survival of spores and stationary-phase cells. *Eukaryotic cell* 5, 435-446.
- Rincón, S.A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M.A., Santos, B., Martín, S.G., and Pérez, P. (2009). Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Molecular biology of the cell* 20, 4390-4399.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Madrid, M., Viana, R.A., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P., and 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.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463-5467.
- Santos, B., Gutiérrez, J., Calonge, T.M., and Pérez, P. (2003). Novel Rho GTPase Involved in Cytokinesis and Cell Wall Integrity in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell* 2, 521-533.
- Santos, B., Martín-Cuadrado, A.B., Vázquez de Aldana, C.R., del Rey, F., and Pérez, P. (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryotic cell* 4, 1639-1645.
- Sawin, K.E. (2002). Cell polarity: following formin function. *Current biology : CB* 12, R6-8.
- Sawin, K.E., and Tran, P.T. (2006). Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast* 23, 1001-1014.
- Sazer, S., and Sherwood, S.W. (1990). Mitochondrial growth and DNA synthesis occur in the absence of nuclear DNA replication in fission yeast. *Journal of cell science* 97, 509-516.
- Schink, K.O., Raiborg, C., and Stenmark, H. (2013). Phosphatidylinositol 3-phosphate, a lipid that regulates membrane dynamics, protein sorting and cell signalling. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 35, 900-912.
- Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T., and Hall, M.N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531-542.
- Schmidt, A., Schmelzle, T., and Hall, M.N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 45, 1433-1441.
- Sells, M.A., Barratt, J.T., Caviston, J., Otilie, S., Leberer, E., and Chernoff, J. (1998). Characterization of Pak2p, a pleckstrin homology domain-containing, p21-activated protein kinase from fission yeast. *The Journal of biological chemistry* 273, 18490-18498.

- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature methods* 2, 905-909.
- Shiozaki, K., and Russell, P. (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378, 739-743.
- Shortle, D., Haber, J.E., and Botstein, D. (1982). Lethal disruption of the yeast actin gene by integrative DNA transformation. *Science* 217, 371-373.
- Sirotkin, V., Beltzner, C.C., Marchand, J.B., and Pollard, T.D. (2005). Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *The Journal of cell biology* 170, 637-648.
- Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L., and Pollard, T.D. (2010). Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Molecular biology of the cell* 21, 2894-2904.
- Skau, C.T., Courson, D.S., Bestul, A.J., Winkelman, J.D., Rock, R.S., Sirotkin, V., and Kovar, D.R. (2011). Actin filament bundling by fimbrin is important for endocytosis, cytokinesis, and polarization in fission yeast. *The Journal of biological chemistry* 286, 26964-26977.
- Slaughter, B.D., Das, A., Schwartz, J.W., Rubinstein, B., and Li, R. (2009). Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis. *Developmental cell* 17, 823-835.
- Snaith, H.A., Samejima, I., and Sawin, K.E. (2005). Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J* 24, 3690-3699.
- Snaith, H.A., and Sawin, K.E. (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* 423, 647-651.
- Sohrmann, M., Fankhauser, C., Brodbeck, C., and Simanis, V. (1996). The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2707-2719.
- Sopko, R., Huang, D., Smith, J.C., Figeys, D., and Andrews, B.J. (2007). Activation of the Cdc42p GTPase by cyclin-dependent protein kinases in budding yeast. *EMBO J* 26, 4487-4500.
- Soto, T., Villar-Tajadura, M.A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P., and Cansado, J. (2010). Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *The Journal of biological chemistry* 285, 11516-11525.
- Spector, I., Shochet, N.R., Blasberger, D., and Kashman, Y. (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13, 127-144.
- Styles, E., Youn, J.Y., Mattiazzzi Usaj, M., and Andrews, B. (2013). Functional genomics in the study of yeast cell polarity: moving in the right direction. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368, 20130118.
- Tajadura, V., García, B., García, I., García, P., and Sánchez, Y. (2004). *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall beta-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *Journal of cell science* 117, 6163-6174.

- Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R., and Shiozaki, K. (2008). Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Current biology : CB* 18, 322-330.
- Tatebe, H., Shimada, K., Uzawa, S., Morigasaki, S., and Shiozaki, K. (2005). Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Current biology : CB* 15, 1006-1015.
- Tcherkezian, J., and Lamarche-Vane, N. (2007). Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 99, 67-86.
- Terenna, C.R., Makushok, T., Velve-Casquillas, G., Baigl, D., Chen, Y., Bornens, M., Paoletti, A., Piel, M., and Tran, P.T. (2008). Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape in fission yeast. *Current biology : CB* 18, 1748-1753.
- Tiedje, C., Sakwa, I., Just, U., and Hofken, T. (2008). The Rho GDI Rdi1 regulates Rho GTPases by distinct mechanisms. *Molecular biology of the cell* 19, 2885-2896.
- Tong, Z., Gao, X.D., Howell, A.S., Bose, I., Lew, D.J., and Bi, E. (2007). Adjacent positioning of cellular structures enabled by a Cdc42 GTPase-activating protein-mediated zone of inhibition. *The Journal of cell biology* 179, 1375-1384.
- Toya, M., Motegi, F., Nakano, K., Mabuchi, I., and Yamamoto, M. (2001). Identification and functional analysis of the gene for type I myosin in fission yeast. *Genes Cells* 6, 187-199.
- Tran, P.T., Marsh, L., Doye, V., Inoué, S., and Chang, F. (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *The Journal of cell biology* 153, 397-411.
- Tu, H., Barr, M., Dong, D.L., and Wigler, M. (1997). Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17, 5876-5887.
- Ubersax, J.A., Woodbury, E.L., Quang, P.N., Paraz, M., Blethrow, J.D., Shah, K., Shokat, K.M., and Morgan, D.O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859-864.
- Ullal, P., McDonald, N.A., Chen, J.S., Lo Presti, L., Roberts-Galbraith, R.H., Gould, K.L., and Martin, S.G. (2015). The DYRK-family kinase Pom1 phosphorylates the F-BAR protein Cdc15 to prevent division at cell poles. *The Journal of cell biology* 211, 653-668.
- Verde, F., Mata, J., and Nurse, P. (1995). Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *The Journal of cell biology* 131, 1529-1538.
- Versele, M., and Thorner, J. (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *The Journal of cell biology* 164, 701-715.
- Vetter, I.R., and Wittinghofer, A. (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.

- Viana, R.A., Pinar, M., Soto, T., Coll, P.M., Cansado, J., and Pérez, P. (2013). Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics* 195, 421-432.
- Villar-Tajadura, M.A., Coll, P.M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B., and Pérez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Molecular microbiology* 70, 867-881.
- Wachtler, V., and Balasubramanian, M.K. (2006). Yeast lipid rafts?--an emerging view. *Trends in cell biology* 16, 1-4.
- Wang, H., Tang, X., and Balasubramanian, M.K. (2003). Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 164, 1323-1331.
- Wang, H., Tang, X., Liu, J., Trautmann, S., Balasundaram, D., McCollum, D., and Balasubramanian, M.K. (2002). The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell* 13, 515-529.
- Wang, M., and Casey, P.J. (2016). Protein prenylation: unique fats make their mark on biology. *Nature reviews. Molecular cell biology* 17, 110-122.
- Wang, N., Wang, M., Zhu, Y.H., Grosel, T.W., Sun, D., Kudryashov, D.S., and Wu, J.Q. (2015). The Rho-GEF Gef3 interacts with the septin complex and activates the GTPase Rho4 during fission yeast cytokinesis. *Molecular biology of the cell* 26, 238-255.
- Wedlich-Soldner, R., Altschuler, S., Wu, L., and Li, R. (2003). Spontaneous cell polarization through actomyosin-based delivery of the Cdc42 GTPase. *Science* 299, 1231-1235.
- Wedlich-Soldner, R., and Li, R. (2003). Spontaneous cell polarization: undermining determinism. *Nat Cell Biol* 5, 267-270.
- Wei, B., Hercyk, B.S., Mattson, N., Mohammadi, A., Rich, J., DeBruyne, E., Clark, M.M., and Das, M. (2016). Unique Spatiotemporal Activation Pattern of Cdc42 by Gef1 and Scd1 Promotes Different Events during Cytokinesis. *Molecular biology of the cell pii: mbc.E15-10-0700*.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L., and Der, C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of cell science* 118, 843-846.
- Wilson-Grady, J.T., Villen, J., and Gygi, S.P. (2008). Phosphoproteome analysis of fission yeast. *Journal of proteome research* 7, 1088-1097.
- Willet, A.H., McDonald, N.A., and Gould, K.L. (2015). Regulation of contractile ring formation and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Current opinion in microbiology* 28, 46-52.
- Win, T.Z., Gachet, Y., Mulvihill, D.P., May, K.M., and Hyams, J.S. (2001). Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo51 is a component of the cytokinetic actin ring. *Journal of cell science* 114, 69-79.
- Winter, D., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., and Li, R. (1997). The complex containing actin-related proteins Arp2 and Arp3 is required for the motility and integrity of yeast actin patches. *Current biology : CB* 7, 519-529.

- Wood, E., and Nurse, P. (2013). Pom1 and cell size homeostasis in fission yeast. *Cell cycle* 12, 3228-3236.
- Woods, B., Kuo, C.C., Wu, C.F., Zyla, T.R., and Lew, D.J. (2015). Polarity establishment requires localized activation of Cdc42. *The Journal of cell biology* 211, 19-26.
- Wu, C., Lee, S.F., Furmaniak-Kazmierczak, E., Côté, G.P., Thomas, D.Y., and Leberer, E. (1996). Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *The Journal of biological chemistry* 271, 31787-31790.
- Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, D.Y., and Leberer, E. (1997). The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *The Journal of biological chemistry* 272, 30623-30626.
- Wu, C.F., Savage, N.S., and Lew, D.J. (2013). Interaction between bud-site selection and polarity-establishment machineries in budding yeast. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 368, 20130006.
- Wu, H., Rossi, G., and Brennwald, P. (2008). The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends in cell biology* 18, 397-404.
- Wu, H., Turner, C., Gardner, J., Temple, B., and Brennwald, P. (2010). The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. *Molecular biology of the cell* 21, 430-442.
- Yaffe, M.B., Rittinger, K., Volinia, S., Caron, P.R., Aitken, A., Leffers, H., Gamblin, S.J., Smerdon, S.J., and Cantley, L.C. (1997). The structural basis for 14-3-3:phosphopeptide binding specificity. *Cell cycle* 91, 961-971.
- Yang, P., Kansra, S., Pimental, R.A., Gilbreth, M., and Marcus, S. (1998). Cloning and characterization of *shk2⁺*, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *The Journal of biological chemistry* 273, 18481-18489.
- Yang, P., Pimental, R., Lai, H., and Marcus, S. (1999). Direct activation of the fission yeast PAK Shk1 by the novel SH3 domain protein, Skb5. *The Journal of biological chemistry* 274, 36052-36057.
- Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X., and 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*. *The Journal of biological chemistry* 278, 48821-48830.
- Young, M.E., Cooper, J.A., and Bridgman, P.C. (2004). Yeast actin patches are networks of branched actin filaments. *The Journal of cell biology* 166, 629-635.
- Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K.G., Lipschutz, J.H., and Guo, W. (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *The Journal of biological chemistry* 276, 46745-46750.
- Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A., and Guo, W. (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *The Journal of cell biology* 180, 145-158.

- Zheng, Y., Bender, A., and Cerione, R.A. (1995). Interactions among proteins involved in bud-site selection and bud-site assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 270, 626-630.
- Zheng, Y., Cerione, R., and Bender, A. (1994). Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *The Journal of biological chemistry* 269, 2369-2372.
- Zhou, C., Yang, Y., and Jong, A.Y. (1990). Mini-prep in ten minutes. *BioTechniques* 8, 172-173.
- Zhu, Y.H., Ye, Y., Wu, Z., and Wu, J.Q. (2013). Cooperation between Rho-GEF Gef2 and its binding partner Nod1 in the regulation of fission yeast cytokinesis. *Molecular biology of the cell* 24, 3187-3204.