



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

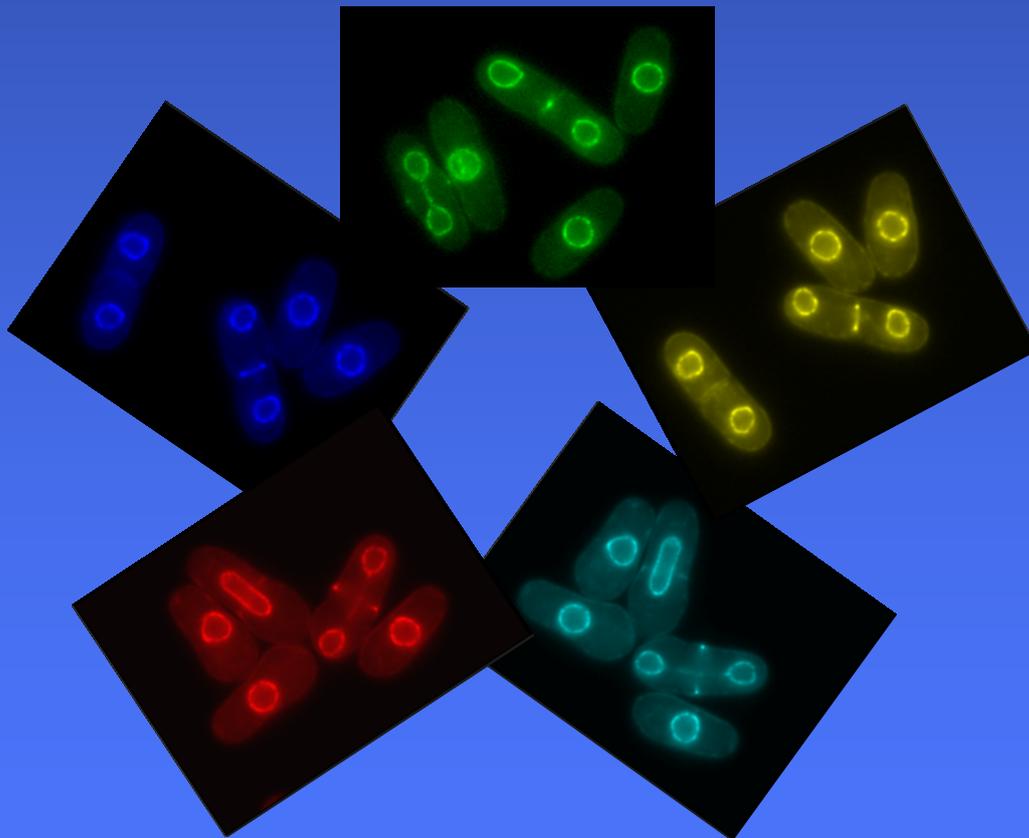
Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Microbiología Bioquímica

(USAL/CSIC)



**Estudio de la proteína Pxl1 como moduladora de las
GTPasas de la familia Rho y su participación en el
proceso de citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe***



Mario Pinar Sala

2009

Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Microbiología Bioquímica
(USAL/CSIC)



imb



**Estudio de la proteína Pxl1 como moduladora de las
GTPasas de la familia Rho y su participación en el
proceso de citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada por **Mario Pinar Sala** para optar al Grado
de Doctor en Biología

Salamanca, 2009



imb



Dr. ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI, CATEDRÁTICO DE MICROBIOLOGÍA
Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE
LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICA:

Que la memoria titulada **“Estudio de la proteína Pxl1 como moduladora de las GTPasas de la familia Rho y su participación en el proceso de citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe*”** presentada por el licenciado **Mario Pinar Sala**, para optar al Grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^a del Pilar Pérez González y el Dr. Pedro Miguel Coll Fresno en el centro mixto Instituto de Microbiología Bioquímica (CSIC) / Departamento de de Microbiología y Genética (USAL).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca a ____ de _____ de 2009.

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri



imb



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

CERTIFICAN:

Que el licenciado **Mario Pinar Sala** ha realizado el trabajo titulado “**Estudio de la proteína Pxl1 como moduladora de las GTPasas de la familia Rho y su participación en el proceso de citocinesis en *Schizosaccharomyces pombe***”, bajo su dirección, en el centro mixto Instituto de Microbiología Bioquímica (CSIC) / Departamento de de Microbiología y Genética (USAL).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos el presente certificado en Salamanca a ____ de _____ de 2009.

Fdo. Dra M^a del Pilar Pérez González

Fdo. Dr. Pedro Miguel Coll Fresno

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar me gustaría darle las gracias a la Dra. Pilar Pérez por haberme dado la oportunidad de realizar este trabajo, por su dedicación y por todas sus enseñanzas durante esta etapa. Al Dr. Pedro Miguel Coll por ayudarme siempre que lo necesito y por todo aquello que me ha enseñado a lo largo de la realización de este trabajo, aunque siempre me quite los bolígrafos.

A mis compañeros PPGs, a Toñi, por aguantar mi impaciencia (aunque a veces es un poco gruñonona...) y por ayudarme en todo momento, a Bea por estar siempre dispuesta a revisar cualquier tipo de documento y más importante, por sus bizcochos de chocolate (¡que ricos!), a Sergio por ser mi primer maestro y por aficionarme aún más al mundo de los videojuegos, a las nuevas incorporaciones, Raúl y Miguel que la fuerza os acompañe, a Elvira por sus células competentes y por esas tartitas de queso que tanto me gustan, a Rosa por el orden que ha puesto en el laboratorio y a Talía que aunque vive aquí al lado es una PPG mas, siempre dispuesta a ayudar.

A todas las personas que forman parte del IMB, y en especial al grupo de pared, por sus consejos y críticas, siempre constructivas, en los seminarios. A Henar por ser siempre tan amable y ayudarme en todo lo que puede.

Al personal técnico, a Carmen por su ayuda con los microscopios, a Paco Alonso por estar siempre disponible cuando algún aparato falla, a Encarna por dar de comer a mis bichos, y a Paco Soriano y Alegría por ser tan eficientes a la hora de resolver problemas burocráticos.

Por último quiero dar las gracias a mi familia: a mis padres, hermanos y abuela. Muchas gracias.

A Toñi

ABREVIATURAS

¹⁴C Isótopo radiactivo carbono 14

3AT 3-amino**triazol**

ADN Ácido desoxirribonucleico

ARN Ácido ribonucleico

ATP Adenosina 5'-trifosfato

BAR Proteína de la familia Bin/anfifisina/Rvs (Bin/Amphiphysin/Rsv)

βGS β-glucán sintasa

CAR Anillo contráctil de actomiosina (Contractile Actomyosin Ring)

CDK Quinasa dependiente de ciclina (Cyclin Dependent Kinases)

CFP Proteína azul fluorescente (Cyan Fluorescent Protein)

Ci Curio

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

DIC Contraste diferencial

DMSO Dimetil Sulfóxido

D.O. Densidad óptica

DTT Ditioneitol

EDTA Ácido etilén diamino tetra-acético

EGFP Variante de la proteína verde fluorescente (Enhanced Green Fluorescent Protein)

EGTA Ácido etilen glicol bis tetra-acético

FCH Dominio con homología a FER-CIP4 (FER-CIP4 Homology)

FRAP Fluorescent 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 (Guanosine 5' diphosphate)

GEF Guanine nucleoyide Exchange Factor

GFP Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

GST Glutation S transferasa

GTP Guanosina 5'-trifosfato (Guanosine 5' triphosphate)

HA Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe

HRP Peroxidasa de rábano (horseradish peroxidase)

IQGAP Familia de proteínas con dominios IQ (de unión a calmodulina) y GAP

kb Kilobase

kDa Kilodalton

LB Medio Luria - Bertani.

Lat A Latrunculina A

IPTG isopropil β -D-tiogalactopiranosido

MAPK Quinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)

MEA Medio agar extracto de malta (Malt Extract Agar)

MM Medio mínimo para *S. pombe*

MTOC Centro Organizador de Microtúbulos (Microtubule Organizing Center)

NaF Fluoruro Sódico

NETO Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo (New End Take Off)

NP-40 Nonidet P-40

PBS Tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)

PCH Proteína con homología a Cdc15 de *S. pombe* (Pombe Cdc15 Homology)

ORF Fase de lectura abierta (Open Reading Frame)

PCR Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)

PIPES Piperazina bis (ácido 2-etanosulfónico)

PMSF 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)

rpm Revoluciones por minuto

SDS Dodecil sulfato sódico

SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

SH3 Dominio con homología a Src3 (Sr3 Homology)

SIN Complejo de inicio de la septación (Septation Inciation Network)

SPB Cuerpo polar del huso (Spindle Pole Body)

TAE Tampón Tris-acético EDTA

TBST Tampón tris salino con Tween-20 (Tris-Buffered Saline Tween-20)

TCA Ácido Tricloroacético

TRIS Tris-(hidroximetilamino)-metano

UDP Uridina 5'-difosfato

WT Estirpe silvestre (Wild Type)

YES Medio rico para *S. pombe* (Yeast Extract + Supplements)

YEPD Medio rico para *S. cerevisiae* (Yeast Extract Peptone Dextrose)

YFP Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein)

YNB Medio mínimo para *S. cerevisiae* (Yeast Nitrogen Base)

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. <i>Schizosaccharomyces pombe</i> : UN MODELO EUCARIOTA PARA EL ESTUDIO DE LA MORFOGÉNESIS CELULAR	1
1.1. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	1
2. MORFOGÉNESIS Y CONTROL DE LA POLARIDAD EN <i>S. pombe</i>	3
2.1. Ciclo celular y morfogenético de <i>S. pombe</i>	3
2.2. El citoesqueleto de actina en <i>S. pombe</i>	4
2.2.1. Los parches de actina	4
2.2.2. Los cables de actina	5
2.2.3. El anillo de actomiosina	7
2.3. Las miosinas	7
2.3.1. Miosinas de clase I	7
2.3.2. Miosinas de clase II	8
2.3.3. Miosinas de clase V	9
2.4. El citoesqueleto de microtúbulos	9
2.4.1. Establecimiento de los puntos de crecimiento por los microtúbulos	10
2.5. Las septinas	12
3. BIOSÍNTESIS Y COMPOSICIÓN DE LA PARED CELULAR DE <i>S. pombe</i>	13
3.1. Composición de la pared celular	14
3.2. Biosíntesis de los componentes de la pared celular	14
3.2.1. Biosíntesis de β -glucano	14
3.2.2. Biosíntesis de α -glucano	16
3.2.3. Biosíntesis de galactomanoproteínas	17
3.3. Regulación de la biosíntesis de pared celular	17
3.3.1. Regulación de la biosíntesis de β -glucano	17
3.3.2. Regulación de la biosíntesis de α -glucano	18
4. LAS GTPasas DE LA FAMILIA RHO	18
4.1. Regulación de las GTPasas de la familia Rho	18
4.1.1. Regulación por cambio de nucleótido	19
4.1.2. Otros tipos de regulación	21
4.2. Moléculas efectoras de las GTPasas de la familia Rho	21
4.3. Las GTPasas de la familia Rho en <i>S. pombe</i>	22
4.3.1. Rho1	22
4.3.2. Rho2	25
4.3.3. Rho3	26
4.3.4. Rho4	26
4.3.5. Rho5	27
4.3.6. Cdc42	27
5. LA CITOCINESIS COMO UN PROCESO MORFOGENÉTICO EN <i>S. pombe</i>	28
5.1. Selección del sitio de división	30
5.2. Ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina	31

5.3. Contracción del CAR	33
5.3.1. La ruta SIN	35
5.4. Deposición de material de membrana y síntesis del septo	38
5.5. Separación celular	39
OBJETIVOS	42
RESULTADOS	43
APARTADO I: RELACIÓN DE PXL1 CON LA GTPasa RHO1	43
1.1. Búsqueda de proteínas relacionadas con las GTPasas de la familia Rho en <i>S. pombe</i>	43
1.2. La sobreexpresión de <i>pxl1</i> ⁺ corrige el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante <i>cdc42-1625</i>	44
1.3. La eliminación de <i>pxl1</i> ⁺ da lugar a células con defectos en el proceso de citocinesis	46
1.4. Pxl1 interacciona con Rho1 y no con Cdc42	47
1.5. Pxl1 regula negativamente a Rho1	49
1.6. La cepa <i>pxl1Δ</i> presenta alteraciones en la estructura de la pared celular	50
1.7. La cepa mutante <i>pxl1Δ</i> presenta interacción genética con la cepa mutante del activador de Rho1, Rgf3	51
1.8. La sobreexpresión de <i>rgf3</i> ⁺ agrava los defectos de la cepa mutante <i>pxl1Δ</i>	53
1.9. Relación de Pxl1 con las proteínas GAP de las GTPasas de la familia Rho	55
1.10. Pxl1 interacciona con Rga4 y Rga7 en ensayos de coinmunoprecipitación	57
1.11. La cepa mutante <i>pxl1Δ</i> presenta interacción génica con las cepas mutantes <i>rga4Δ</i> y <i>rga7Δ</i>	59
1.12. Rga7 presenta defectos de localización en la cepa <i>pxl1Δ</i>	61
APARTADO II: RELACIÓN DE PXL1 CON EL PROCESO DE CITOCINESIS DE <i>S. pombe</i>	62
2.1. La proteína Pxl1 se localiza en la región de división celular	62
2.2. Estudio detallado de la localización de Pxl1 durante el proceso de citocinesis	63
2.3. La concentración de Pxl1 aumenta durante el proceso de citocinesis	64
2.4. El extremo amino de Pxl1 es necesario para su localización, mientras que los dominios LIM son necesarios para que la proteína realice su función	65
2.5. Las proteínas Pxl1 de <i>S. cerevisiae</i> y paxilina de <i>Gallus gallus</i> no se localizan en <i>S. pombe</i>	66
2.6. La localización de Pxl1 depende de la correcta formación del anillo de actomiosina y es independiente de la activación de la ruta SIN	69
2.6.1. La localización de Pxl1 en la zona de división depende de la actina	69
2.6.2. La correcta localización de Pxl1 depende de proteínas implicadas en la polimerización y ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina	71
2.6.3. La localización de Pxl1 es independiente de la señal generada por la ruta SIN	73
2.6.4. La localización de Pxl1 es independiente del exocisto	75
2.7. La cepa mutante <i>pxl1Δ</i> presenta interacción genética con diversas cepas mutantes afectadas en el proceso de citocinesis.....	75

2.8. Pxl1 forma parte del anillo de actomiosina	80
2.9. Pxl1 se requiere para la organización correcta de las miosinas de tipo II en el anillo contráctil	83
2.10. La cepa mutante <i>pxl1Δ</i> presenta un retraso en el proceso de contracción del anillo de actomiosina	89
DISCUSIÓN	91
1. Pxl1 regula negativamente a la GTPasa Rho1	91
2. Pxl1 forma parte del anillo contráctil de actomiosina	94
3. Pxl1 interviene en la estabilización y contracción del anillo de actomiosina durante la citocinesis	97
4. Interdependencia de la contracción del anillo y la síntesis del septo	99
5. Posible relación de Rho1 en la regulación de la estabilidad y contracción del anillo de actomiosina a través de Pxl1	100
CONCLUSIONES	104
MATERIALES Y MÉTODOS	105
1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS	105
2. MEDIOS DE CULTIVO	109
2.1. Medios de cultivo para <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	109
2.2. Medios de cultivo para <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	110
2.3. Medios de cultivo para <i>Escherichia coli</i>	110
3. CONDICIONES Y ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO	111
3.1. Condiciones de crecimiento para <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i>	111
3.2. Sincronización de cultivos celulares de <i>S. pombe</i> mediante el uso de cepas mutantes termosensibles	111
3.3. Condiciones de crecimiento para <i>E. coli</i>	112
4. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA EN PLACA	112
5. MÉTODOS GENÉTICOS	112
5.1. Conjugación y obtención de diploides	112
5.2. Aislamiento de ascosporas al azar	113
5.3. Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: Análisis de tétradas	113
6. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR	114
6.1. Vectores utilizados	114
6.1.1. Vectores de <i>E. coli</i>	114
6.1.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	114
6.1.3. Vectores de <i>S. cerevisiae</i>	116
6.2. Obtención de ADN	116
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	116
6.4. Secuenciación de ADN	117
6.5. Manipulación del ADN	117
6.6. Transformación de <i>E. coli</i>	119
6.7. Transformación de levaduras	119
6.8. Deleción de <i>pxl1</i> ⁺	119
6.9. Clonación de <i>pxl1</i> ⁺	120
6.10. Construcción del módulo de integración de <i>pxl1</i> ⁺	120

6.11. Obtención de las cepas mutantes <i>pxl1Δ123</i> , <i>pxl1Δ23</i> , <i>pxl1Δ3</i> y <i>pxl1ΔN</i>	121
6.12. Obtención de las cepas que expresan las proteínas quiméricas SpPx11/ScPx11 y SpPx11/paxilina fusionadas a la proteína GFP	121
7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	122
7.1. Obtención de extractos celulares	122
7.2. Precipitación e inmunoprecipitación	122
7.3. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas	123
7.4. Inmunodetección de proteínas	123
7.5. Valoración de GTP-Rho1	124
7.5.1. Producción de GST-RBD	124
7.5.2. Ensayo de unión	125
8. MARCAJE Y FRACCIONAMIENTO DE LOS POLÍMEROS DE LA PARED CELULAR	125
9. TÉCNICAS MICROSCÓPICA Y TINCIONES	126
9.1. Microscopía de campo claro: contraste de fases y contraste diferencial (Nomarski)	126
9.2. Microscopía de fluorescencia	126
9.2.1. Fluorescencia directa con GFP	127
9.2.2. Tinción de calcoflúor	127
9.2.3. Tinción de actina	128
9.2.4. Microscopía en tiempo real	128
9.2.5. Microscopía confocal	129
10. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS	129
BIBLIOGRAFÍA	130

INTRODUCCIÓN

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

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* fue descrita por primera vez en 1893 por P. Lindner, quien la aisló de una cerveza de mijo del este de África, de hecho su nombre específico “pombe” significa cerveza en Swahili. Posteriormente se denominó “levadura de fisión” debido a que su división sucede por fisión transversal. La mayoría de cepas usadas hoy en día en el laboratorio derivan de una estirpe homotática h^{90} aislada por Ostewalder en Francia en 1921 a partir de jugo de uva con cantidades enormes de sulfuro, de la que se obtuvieron cepas heterotáticas con los dos tipos sexuales opuestos, h^+ y h^- (Leupold, 1950). Este género está clasificado por los sistemas taxonómicos dentro de los Ascomycota al igual que *Saccharomyces cerevisiae*, sin embargo se estima que la separación evolutiva entre estas dos levaduras tuvo lugar hace 1.144 millones de años y con plantas y metazoos hace 1.600 (Heckman *et al.*, 2001).

S. pombe constituye un excelente modelo de estudio por varias razones: Es fácil de manejar en condiciones de laboratorio, no es patógeno, presenta un ciclo de vida y un ciclo sexual de corta duración y es susceptible de análisis genético clásico y molecular ya que la secuenciación de su genoma fue completada en 2002 (Wood *et al.*, 2002). Además *S. pombe* es muy similar citológicamente a las células eucariotas superiores, especialmente si nos referimos al modo de división celular, por fisión transversal mediante la formación de un anillo contráctil de actomiosina en el plano medio de la célula. También presenta un ciclo celular eucariótico convencional. Por todas estas razones *S. pombe* es un sistema modelo para el estudio de procesos como la división celular, el ciclo celular y la morfogénesis (Yanagida, 2002). De hecho en los últimos 20 años *S. pombe* se ha convertido en un organismo atractivo para el estudio de multitud de procesos biológicos sobre todo los que conciernen a la maquinaria de crecimiento y ciclo celular. Los importantes hallazgos obtenidos en este campo mediante el uso de *S. pombe* y *S. cerevisiae* han sido reconocidos mediante la concesión del premio Nobel de Fisiología y Medicina a Lee Hartwell, por sus trabajos acerca del ciclo celular de la levadura de gemación, y a Paul Nurse, por sus estudios en la levadura de fisión, premio que compartieron además con Tim Hunt por el trabajo realizado utilizando el erizo de mar, *Arbacia punctulata*.

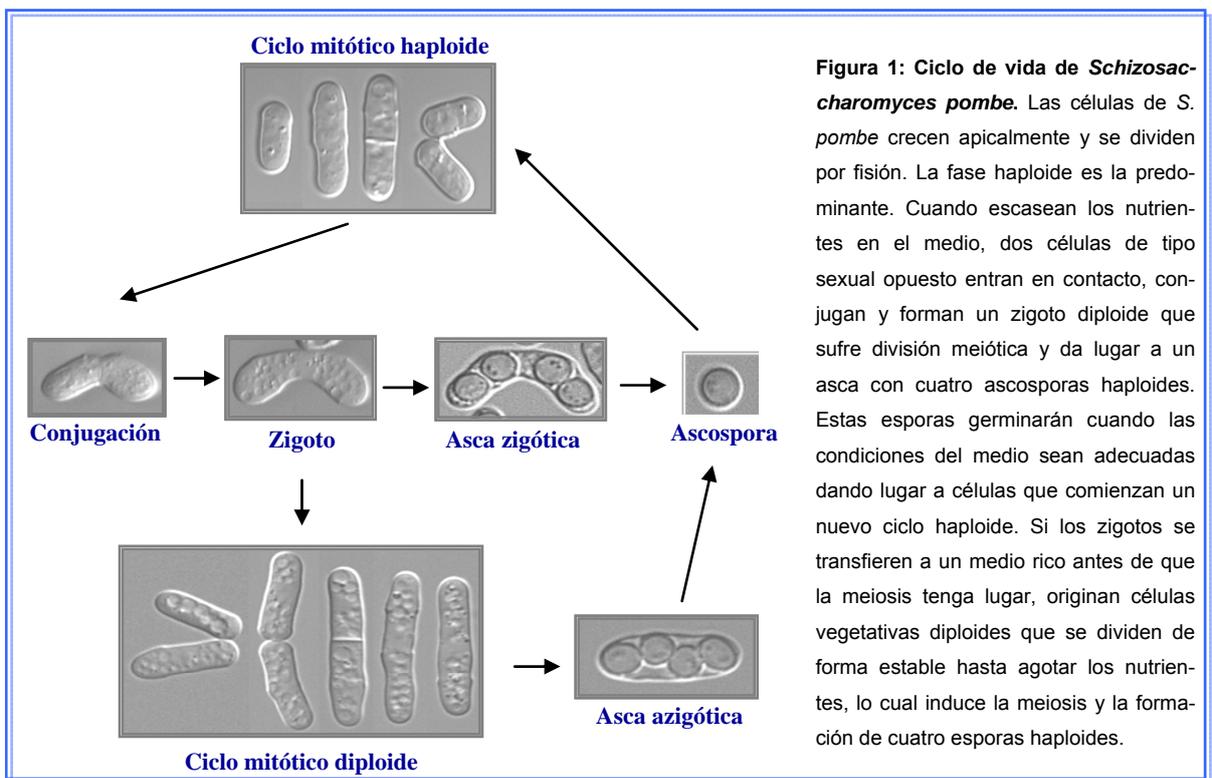
1.1. Ciclo de vida de *S. Pombe*

S. pombe es un organismo con un ciclo de vida haplodiplobionte, con una fase haploide y una diploide. Durante la fase haploide, que es la predominante en este organismo, las células tienen forma cilíndrica con un tamaño aproximado, al comienzo de su ciclo de vida,

de 3-4 μm de diámetro y 7-8 μm de longitud, crecen de manera polarizada por extensión de sus extremos y se dividen por fisión transversal, mediante la formación de un septo perpendicular al eje mayor de la célula que tras la citocinesis se digiere dando lugar a dos células hijas de idéntico tamaño.

Cuando células de tipos sexuales complementarios se encuentran en un medio pobre en nutrientes, sobre todo pobre en nitrógeno, comienzan a producir feromonas y receptores para estas feromonas (Kelly *et al.*, 1988). Las células h^- secretan factor M y producen receptores para el factor P y las células h^+ secretan factor P y producen receptores para el factor M. La unión de las feromonas a sus receptores desencadena el proceso de conjugación. Éste empieza con la formación de una proyección denominada “shmoo” en un extremo de cada célula hasta que ambas se ponen en contacto y se fusionan, formándose un cigoto diploide que acto seguido sufre meiosis y esporulación dando lugar a un asca con cuatro esporas haploides. En un momento determinado, la pared del asca se rompe y libera las esporas haploides que permanecerán latentes hasta que las condiciones del medio sean favorables, entonces germinan reiniciando el ciclo.

En el laboratorio y bajo determinadas condiciones pueden mantenerse células diploides en cultivo a partir de cigotos si estos se transfieren a un medio de crecimiento rico inmediatamente después de la conjugación y antes de la meiosis. Estos individuos diploides pueden entrar en sucesivos ciclos mitóticos diploides (Egel and Egel-Mitani, 1974). Las células diploides de *S. pombe* (de 11-14 μm de longitud al comienzo de su ciclo de vida y 20-25



µm antes de la división) son muy inestables y tienden a esporular rápidamente si entran en fase estacionaria o si escasean los nutrientes en el medio, formándose un asca azigótica con cuatro ascosporas haploides (Figura 1).

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

La generación de la polaridad celular es de suma importancia para la función de prácticamente todos los tipos de células y es la base de procesos tan diversos como la división, diferenciación, migración celular, señalización célula-célula y fertilización. *S. pombe* es un modelo excelente para el estudio de la regulación de la forma celular ya que sus células crecen de forma polarizada manteniendo una forma cilíndrica, no como esferas.

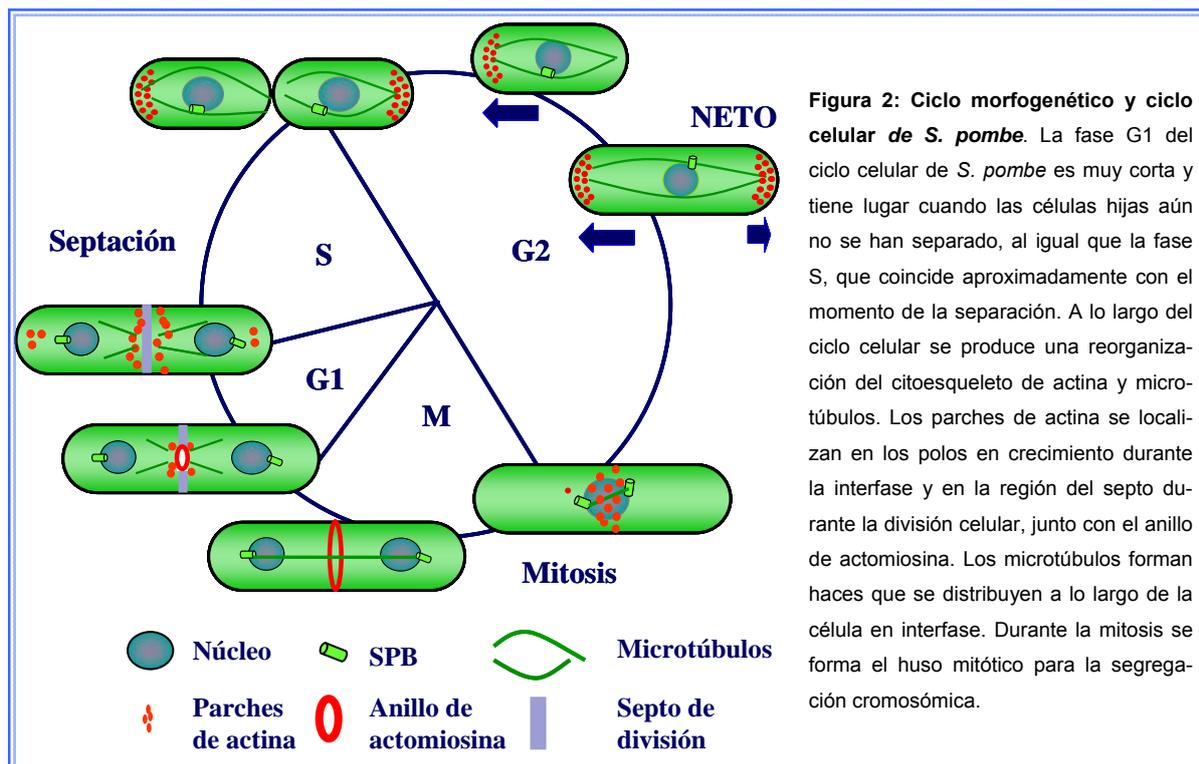
La forma de las células está coordinada con la fase del ciclo celular en la que se encuentran y depende del mantenimiento de la polaridad celular, que a su vez esta determinada por la organización del citoesqueleto, el transporte intracelular y por la biosíntesis de pared celular.

El conocimiento de los mecanismos que establecen y regulan la polaridad celular ha sido posible gracias a la obtención de mutantes defectivos en diferentes aspectos de la morfogénesis celular; (Chang and Peter, 2003; Chang and Verde, 2004). Entre ellos se encuentran los mutantes *orb* incapaces de mantener un crecimiento polarizado, por lo que adquieren forma redondeada; mutantes *tea*, *ban* o *pom*, con células ramificadas o torcidas que crecen de forma polarizada pero fallan al establecer el sitio de crecimiento; mutantes *pom* o *mid* defectivos en el posicionamiento del septo de división que originan células hijas de diferente tamaño y mutantes que crecen de forma polarizada pero no activan el crecimiento en uno de los extremos celulares. Mediante el estudio de estas cepas mutantes se han podido identificar diferentes fases en el establecimiento del crecimiento polarizado. En primer lugar se necesita definir los lugares de crecimiento en la célula mediante la actividad de proteínas marcadoras, éstas se encargan de reclutar y activar proteínas de cascadas de señalización que a su vez regulan la morfogénesis organizando el citoesqueleto de actina y reclutando las enzimas necesarias para el crecimiento celular.

2.1. Ciclo celular y morfogenético en *S. pombe*

En las células de *S. pombe* el crecimiento se produce de forma polarizada y asimétrica y está coordinado temporalmente con el avance del ciclo celular. Después de la mitosis las células comienzan a crecer de forma monopolar por el “polo antiguo”, el polo que ya existía en la célula madre. Cuando la célula alcanza un tamaño determinado se produce la transición de crecimiento monopolar a bipolar (Mitchison and Nurse, 1985). Esta transición se

produce en fase G2 y se conoce como NETO, del inglés “New End Take Off”. Después de NETO la célula continúa creciendo de forma bipolar, aunque el crecimiento sigue siendo más rápido por el “polo viejo”, hasta que alcanza un tamaño celular crítico, momento en el cual el crecimiento cesa y la célula entra en la fase M (mitosis) del ciclo celular. Al comenzar esta fase toda la maquinaria biosintética se dirige de nuevo al centro de la célula para formar el septo de división, que finalmente será degradado dando lugar a la separación celular definitiva (Hayles and Nurse, 2001; Martin and Chang, 2005) (Figura 2).



2.2. El citoesqueleto de actina en *S. pombe*

La actina es un componente esencial para el crecimiento polarizado y en la morfogénesis de *S. pombe*. En este organismo, los monómeros de actina se organizan en filamentos polarizados y flexibles que forman tres tipos de estructuras: 1) Parches, localizados en la zona cercana a la membrana plasmática, 2) cables, que se extienden desde los polos celulares a lo largo del citoplasma y 3) el anillo contráctil de actomiosina, esencial durante el proceso de citocinesis.

2.2.1. Los parches de actina

Los parches de actina son estructuras muy dinámicas que se localizan siguiendo un patrón que depende del ciclo celular: Inicialmente se encuentran localizados en el polo viejo

de la célula, posteriormente tras NETO se localizan en ambos polos y durante la mitosis desaparecen de los extremos celulares para pasar a concentrarse en la región media de la célula, donde permanecen flanqueando al septo en formación. Por esta razón los parches de actina se han empleado normalmente como marcadores de polaridad. Sin embargo no siempre existe una correlación entre los parches de actina y el crecimiento polarizado ya que existen cepas mutantes con parches de actina deslocalizados que son capaces de crecer de forma polar (Feierbach and Chang, 2001; Morrell *et al.*, 1999).

La formación de los parches de actina depende del complejo Arp2/3 con capacidad para polimerizar monómeros de actina (McCollum *et al.*, 1996; Morrell *et al.*, 1999). Este complejo se activa por dos rutas: Una dependiente de la proteína Wsp1 y de la verprolina Vrp1 y otra dependiente de la miosina de clase I, Myo1 (Sirotkin *et al.*, 2005).

Aunque en *S. pombe* se desconoce todavía la función exacta de los parches de actina, por similitud a *S. cerevisiae* se cree que podrían estar relacionados con los procesos de secreción polarizada y endocitosis (Moseley and Goode, 2006). Las cepas mutantes *arp2*, del complejo Arp2/3, y *cps8*, afectada en el gen de la actina, presentan defectos en el proceso de endocitosis. Además los parches de actina y las vesículas endocíticas colocalizan (Gachet and Hyams, 2005). Los parches de actina también se han relacionado con la división celular ya que cepas mutantes en el complejo Arp2/3 y en sus activadores Wsp1 y Myo1 presentan un retraso en la formación y disolución del septo de división, aunque su función exacta en este proceso se desconoce (Wu *et al.*, 2006).

En experimentos de regeneración de protoplastos se han descrito unas estructuras vesiculares rodeadas por finos filamentos de actina denominadas “filasomas” que colocalizan con los parches y aparecen en los lugares donde se sintetiza nueva pared celular. Las microvesículas del filasoma se fusionan o se anclan a la membrana plasmática, lo que sugiere que podrían estar relacionados con el transporte de enzimas o materiales necesarios para la síntesis de nueva pared celular (Takagi *et al.*, 2003).

2.2.2. Los cables de actina

Los cables son haces de filamentos largos de actina que se observan principalmente durante la interfase. El número de cables y su longitud en las células es variable.

En el ensamblaje de los cables de actina participan la formina For3 y la tropomiosina Cdc8 (Feierbach and Chang, 2001; Nakano *et al.*, 2002). Las forminas son unas proteínas muy conservadas a lo largo de la evolución cuya función es el ensamblaje de estructuras de actina, como los cables o el anillo de actomiosina, mientras que la tropomiosina Cdc8 estabiliza los cables de actina y participa en la interacción de la actina con las miosinas (Balasubramanian *et al.*, 1992; Skoumpla *et al.*, 2007). Además de For3, en *S. pombe* exis-

ten otras dos forminas, Fus1 y Cdc12. Fus1 participa en el reclutamiento de la actina en la punta de la célula durante el proceso de conjugación (Petersen *et al.*, 1998) y Cdc12 es esencial en la nucleación de la actina del anillo de actomiosina durante la división celular (Chang *et al.*, 1997).

Se ha propuesto que los cables son necesarios para la polaridad celular, sin embargo en la cepa mutante *for3Δ* que carece de cables, las células son viables y presentan un crecimiento polarizado. La cepa *for3Δ* presenta diferentes defectos morfológicos, originando células engrosadas o con forma de limón y con defectos en la división, que suele ser asimétrica dando lugar a dos células hijas que difieren en tamaño y en su patrón de crecimiento: Una de las células hijas va a crecer de forma monopolar y la otra presenta un crecimiento bipolar prematuro. Estos datos indicarían que los cables de actina no son estrictamente necesarios pero sí importantes para el crecimiento celular polarizado y que debe de existir un mecanismo de polarización celular independiente de los mismos (Feierbach and Chang, 2001).

Las funciones de los cables de actina sobre el crecimiento polarizado son debidas a que actúan como guías para el transporte de vesículas secretoras, mediado por la miosina de tipo V Myo52, que aportan nuevo material de membrana y que transportan los componentes necesarios para la síntesis de nueva pared celular (Motegi *et al.*, 2001; Mulvihill *et al.*, 2006). En esta función de transporte de material necesario para el crecimiento polarizado influye la orientación de los cables. El extremo en crecimiento de los cables se orienta siempre hacia el lugar donde se realiza la deposición de nuevo material: Hacia los polos celulares durante la interfase o hacia la zona media de la célula durante la mitosis. Estas diferentes orientaciones aseguran el transporte de materiales necesarios a las zonas de crecimiento en las distintas etapas del ciclo celular (Kamasaki *et al.*, 2005). Los cables de actina también participan en el movimiento de los parches (Martin and Chang, 2006; Pelham and Chang, 2001).

Cuando se produce la transición a crecimiento bipolar, los cables de actina y los parches son redirigidos hacia el polo nuevo, aunque la distribución de los mismos no es completamente simétrica ya que el polo viejo mantiene 1,5 veces más parches que el nuevo (Gachet and Hyams, 2005). La transición a crecimiento bipolar también origina que las enzimas responsables de la síntesis de pared celular, como Bgs1, Bgs4 o Ags1/Mok1, pasen a localizarse en ambos polos. Para que esto ocurra es necesario que el citoesqueleto de actina esté correctamente polimerizado (Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2002; Katayama *et al.*, 1999).

2.2.3. El anillo de actomiosina

Durante la mitosis temprana la actina se reorganiza formando un anillo contráctil en la zona ecuatorial de la célula en asociación con las miosinas de tipo II y otras proteínas. Esta estructura se denomina anillo contráctil de actomiosina (CAR) y es esencial para que se produzca la división celular.

En mitosis tardía, el CAR marca el sitio donde se va a producir la formación del septo y genera la fuerza necesaria para que se produzca la fusión de la membrana plasmática formada entre las dos células hijas (Chang *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 2003). El proceso de formación del anillo contráctil y su composición se describe más en detalle en el apartado 5.2.

2.3. Las miosinas

Las miosinas son una superfamilia de proteínas motoras que utilizan la hidrólisis de ATP como fuente de energía y los filamentos de actina como puntos de anclaje para el movimiento. Estas proteínas desempeñan funciones en importantes procesos como el movimiento celular, la citocinesis, la fagocitosis, el mantenimiento de la forma celular o el tráfico de orgánulos y partículas (Berg *et al.*, 2001). Las miosinas están constituidas por un complejo de tres proteínas denominadas cadena pesada, cadena ligera esencial y cadena ligera reguladora. En las cadenas pesadas a su vez se pueden diferenciar tres regiones funcionales conservadas: Un dominio motor, denominado “cabeza globular”, de unos 80 kDa donde se encuentra la zona de unión a la actina y el dominio de unión e hidrólisis de ATP. A este dominio le sigue una región en α -helice, denominada “cuello”, que se caracteriza por contener uno o varios motivos IQ y por ser la zona donde se unen las cadenas ligeras. La tercera región es la zona C-terminal, denominada “cola”, implicada en la localización, que confiere a las miosinas sus funciones específicas, como la actividad quinasa y la unión a membranas o a la actina. Las miosinas se pueden clasificar en 18 clases considerando las secuencias del dominio motor y del “cuello”, y la estructura de su “cola” C-terminal. Cada una de estas clases está asociada a un conjunto de funciones biológicas conservadas (Berg *et al.*, 2001). En *S. pombe* existen cinco cadenas pesadas de miosinas que se agrupan en tres clases diferentes: I, II y V (Figura 3) (Gachet *et al.*, 2004).

2.3.1. Miosinas de clase I

Están asociadas con procesos de crecimiento polarizado y endocitosis. Existe una única miosina de clase I en *S. pombe*, Myo1, que se localiza en los polos de crecimiento y en el septo. Las cepas mutantes *myo1 Δ* presentan alteraciones en la localización de la actina, en la estructura de la pared celular y del septo y defectos en el proceso de conjugación (Lee *et*

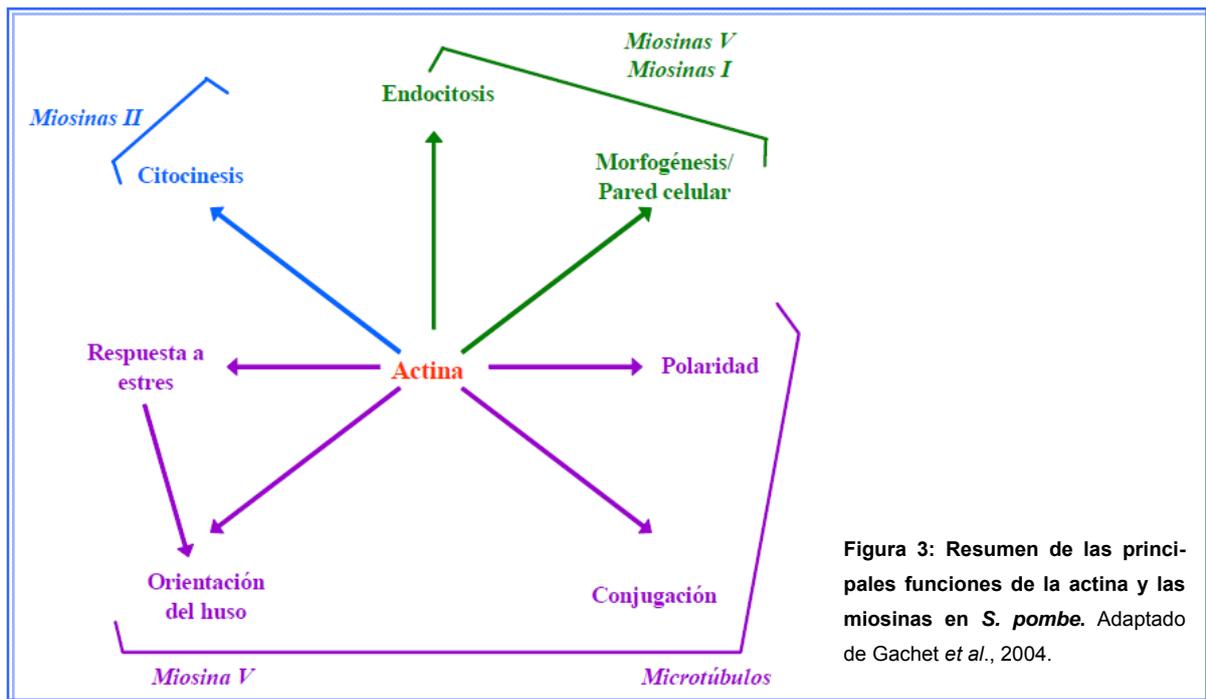


Figura 3: Resumen de las principales funciones de la actina y las miosinas en *S. pombe*. Adaptado de Gachet *et al.*, 2004.

al., 2000). El dominio C-terminal de Myo1 presenta homología con el dominio A de proteínas WASP/Scar que estimulan al complejo Arp2/3, el cual participa en la formación de parches de actina (Sirotkin *et al.*, 2005). También se ha descrito que Myo1 es necesaria para la correcta organización de los dominios de lípidos de la membrana plasmática (“lipids rafts”) (Takeda and Chang, 2005).

2.3.2. Miosinas de clase II

Estas miosinas se encuentran normalmente formando hexámeros compuestos por dos cadenas pesadas y cuatro cadenas ligeras (dos cadenas ligeras esenciales, ELC, y dos cadenas ligeras reguladoras, RLC) que se unen al dominio IQ de la zona del “cuello” de la cadena pesada. *S. pombe* posee dos cadenas pesadas de miosinas de tipo II, Myo2 y Myo3/Myp2 a la que denominaremos a partir de ahora Myp2. Ambas presentan cadenas ligeras comunes, Cdc4 que es la cadena ligera esencial y Rlc1 que es la cadena ligera reguladora (Le Goff *et al.*, 2000; McCollum *et al.*, 1995; Motegi *et al.*, 2000; Naqvi *et al.*, 2000). Myp2 presenta una estructura no convencional, ya que no se encuentra asociada a otra cadena de Myp2 como ocurre con Myo2. En la cola de Myp2 se distingue un dominio central rico en prolinas que divide la cola en dos subdominios que se pliegan uno sobre el otro de forma antiparalela formando una miosina de tipo II con una sola cabeza, portadora del dominio motor de la miosina (Bezanilla and Pollard, 2000). Sólo otra miosina de tipo II, Myo1 de *S. cerevisiae*, presenta una cola con una estructura similar a la de Myp2 (Bezanilla and Pollard, 2000; Lord *et al.*, 2005).

Myo2 y Myp2 se localizan en la región de división formando parte del anillo contráctil de actomiosina, sin embargo su llegada a esta zona no se produce de manera simultánea. Myo2 es uno de los componentes del anillo de actomiosina que llega inicialmente a la zona de división mientras que Myp2 llega a esta zona unos 30 minutos más tarde (Wu *et al.*, 2003). Ambas miosinas desempeñan sus funciones durante el proceso de división celular, sin embargo, únicamente Myo2 es esencial. La cepa mutante *myo2Δ* es capaz de germinar pero muere debido a los graves defectos de citocinesis que padece (Kitayama *et al.*, 1997; May *et al.*, 1997). El fenotipo de la cepa *myp2Δ* es más leve, presentando solamente defectos en citocinesis cuando las células se encuentran en condiciones de estrés, como son la alta concentración de KCl en el medio o la baja temperatura (Bezanilla *et al.*, 1997; Motegi *et al.*, 1997). Sin embargo, el hecho de que la cepa doble mutante *myo2-E1 myp2Δ* presente mayores defectos en la división que los mutantes sencillos sugiere que ambas proteínas deben ejercer funciones importantes en la citocinesis en condiciones normales de crecimiento (Bezanilla and Pollard, 2000; Motegi *et al.*, 2000).

2.3.3. Miosinas de clase V

En *S. pombe* existen dos miosinas de clase V: Myo51 y Myo52. Myo51 se localiza exclusivamente en la región de división, formando parte del anillo de actomiosina, aunque su función todavía se desconoce (Motegi *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001). Myo52 se localiza en los polos celulares durante la interfase y en la zona de división durante la citocinesis, y su localización depende del citoesqueleto de actina. Myo52 está estructural y funcionalmente relacionada con la miosina de clase V Myo2 de *S.cerevisiae*, siendo una de sus funciones el transporte de vesículas que portan componentes necesarios para la síntesis de pared celular. De hecho la cepa mutante *myo52Δ* da lugar a células que pierden parcialmente la polaridad, acumulan vesículas y muestran defectos en la pared celular debido a que tanto la α -glucán sintasa, Mok1, como la β -1,3-glucán sintasa, Bgs1, no se localizan de forma correcta en esta cepa. Por lo tanto, una de las posibles funciones de Myo52 sería transportar a la membrana vesículas secretoras necesarias para la síntesis de la pared celular (Motegi *et al.*, 2001; Mulvihill *et al.*, 2006; Win *et al.*, 2001). Myo52 juega además un papel importante en la distribución y fusión de las vacuolas y en la orientación del huso mitótico (Gachet *et al.*, 2004; Mulvihill *et al.*, 2001b).

2.4. El citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos son cilindros de aproximadamente 25 nm de diámetro compuestos por dímeros de α/β tubulina (Streiblova and Girbardt, 1980). Normalmente se polimerizan desde un centro organizador de microtúbulos (MTOC) y tienen un extremo positivo y uno nega-

tivo. Durante la interfase se organizan formando de 3 a 5 haces constituidos por dos filamentos antiparalelos que se extienden a lo largo del eje longitudinal de la célula, formando una cesta alrededor del núcleo (Hagan, 1998; Sawin and Tran, 2006). El extremo positivo del microtúbulo se encuentra orientado hacia los polos celulares y el extremo negativo hacia la zona media de la célula. Los microtúbulos son estructuras muy dinámicas, normalmente cada haz de microtúbulos crece por su extremo positivo hasta contactar con uno de los polos de la célula y una vez que lo alcanza, se produce un desensamblaje que lo hace retroceder hacia la zona media, para volver a crecer de nuevo hacia el mismo polo (Drummond and Cross, 2000). Los microtúbulos son importantes para la regulación de la polaridad celular en *S. pombe*. Las células con microtúbulos anormales a menudo están curvadas, forman ramas, adquieren forma de T y presentan defectos en la posición del núcleo en el ecuador celular (Chang and Verde, 2004).

Otra característica de los microtúbulos es que normalmente sólo se retraen cuando alcanzan el polo celular y no lo hacen cuando alcanzan los lados de la célula (Brunner and Nurse, 2000). Esto genera una serie de fuerzas frecuentes y transitorias que podrían ser responsables de la localización del núcleo en la zona media de la célula (Tran *et al.*, 2001).

Durante la mitosis los microtúbulos se desensamblan y se forma el huso mitótico intranuclear, necesario para la segregación de los cromosomas, a partir del cuerpo polar del huso o SPB (“Spinde Pole Body”). Una vez separados los núcleos, el huso se desensambla y comienza a formarse un nuevo citoesqueleto de microtúbulos, denominado “post-anaphase array” desde el denominado EMTOC (centro organizador de microtúbulos ecuatorial) en la región media de la célula y desde el SPB (Heitz *et al.*, 2001).

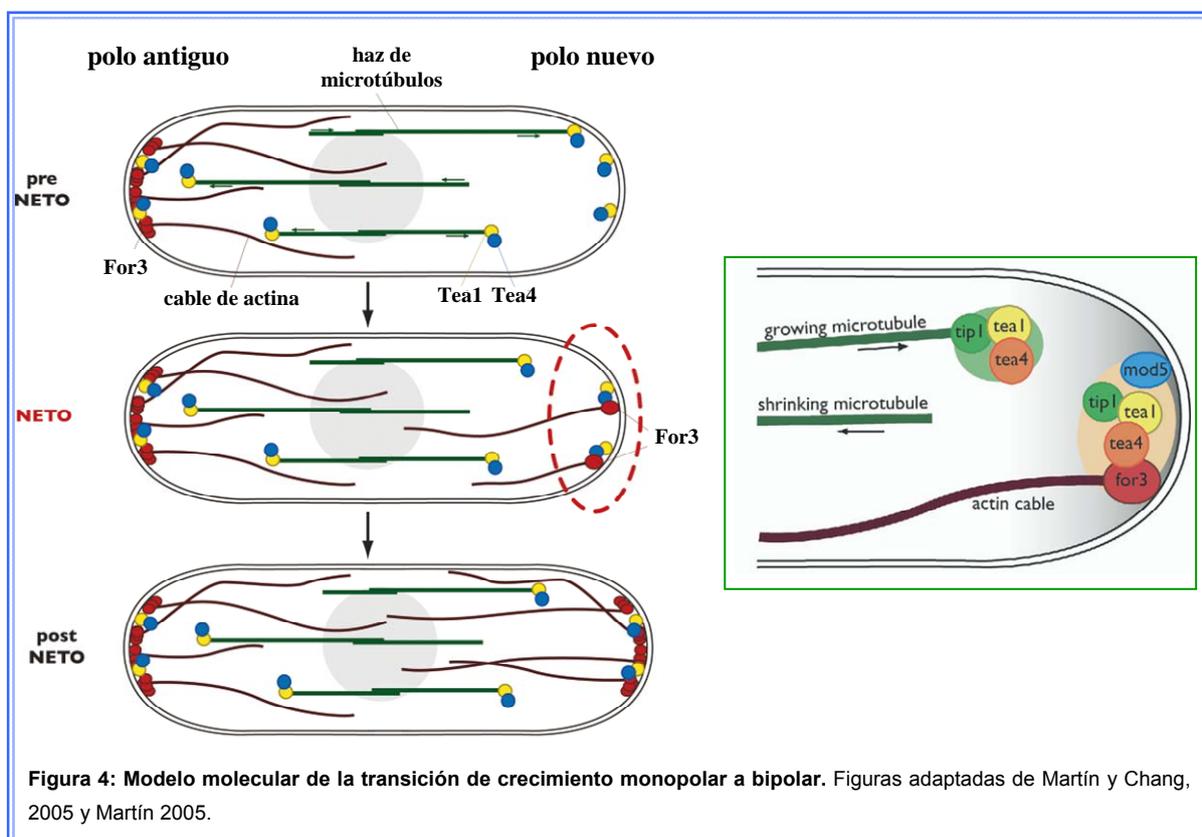
2.4.1. Establecimiento de los puntos de crecimiento por los microtúbulos

La capacidad de los microtúbulos para establecer los lugares de crecimiento se debe a que transportan proteínas necesarias para la activación de la nucleación de actina. Mediante el aislamiento de cepas mutantes con morfología curvada o ramificada (*ban* o *tea*) ha sido posible la identificación de los genes necesarios para establecer las zonas de crecimiento polarizado y mantener el eje longitudinal de crecimiento (Hayles and Nurse, 2001). Así se han identificado proteínas como Tea1, Tea3 o Tea4, marcadoras de los puntos de crecimiento, que estarían formando parte de un complejo macromolecular que podría ser semejante a los complejos formados en las placas de adhesión focal de células animales.

Tea1 es una proteína de elevado peso molecular con similitud a la proteína Kelch de *Drosophila* y esencial para el crecimiento bipolar. Tea1 se localiza en los extremos positivos de los microtúbulos para ser transportada. Esta localización depende de la quinesina Tea2, que transporta a Tea1 a lo largo del microtúbulo para mantenerla en el extremo posi-

tivo y de Mal3. Además, Tip1 (similar a CLIP-170 en células animales), es necesaria para regular la dinámica de los microtúbulos (Browning *et al.*, 2003; Browning *et al.*, 2000; Brunner and Nurse, 2000). En el 15% de las células *tea1Δ* los microtúbulos no retroceden al alcanzar el polo y a veces se curvan en este punto, lo que indicaría que Tea1 también tiene capacidad para provocar la despolimerización de los microtúbulos (Mata and Nurse, 1997).

Los microtúbulos una vez que tocan el polo de crecimiento de la célula depositan a Tea1, que se ancla a esta zona a través de su interacción con Mod5, una proteína asociada a membrana (Snaith and Sawin, 2003). De esta forma Tea1 se acumula en los dos polos de la célula marcando sus extremos. Aunque Tea1 se localiza en ambos polos de la célula, el crecimiento sólo se activa en uno de ellos durante G1. Una posible explicación podría ser que la regulación de la localización de Tea1 en ambos polos sea diferente durante el crecimiento monopolar. Se ha propuesto que en el polo de no crecimiento la localización de Tea1 depende de la proteína Tea3 (Snaith and Sawin, 2005). Esta regulación no estaría presente en el polo de crecimiento donde deben existir otros factores que regulen la localización de Tea1, incluso en ausencia de microtúbulos (Snaith and Sawin, 2005). Uno de estos factores es la proteína Tea4, una proteína con un dominio SH3 que sirve de puente de unión entre Tea1 y la formina For3 en el polo de crecimiento. Otras proteínas como Bud6 (Amberg *et al.*, 1997), un posible regulador de For3, también forman parte de este complejo que podría coordinar muchos aspectos necesarios para el crecimiento polarizado,



como el ensamblaje de actina y la localización de la secreción (Figura 4) (Martin and Chang, 2005; Martin *et al.*, 2005).

Las GTPasas de la familia Rho también desempeñan funciones en esta ruta ya que For3 interacciona tanto con Rho3 como con Cdc42 (Nakano *et al.*, 2002). En el caso de la GTPasa Cdc42, se sabe que es necesaria para activar y localizar For3 eliminando el mecanismo de autoinhibición intramolecular que presenta esta proteína, permitiendo de esta forma que la formina se localice y active la nucleación de actina correctamente en los polos celulares (Martin *et al.*, 2007). Además, recientemente se ha publicado que la proteína Pob1 (Toya *et al.*, 1999) actúa facilitando la interacción de For3 con Cdc42 (Rincón *et al.*, 2009).

2.5. Las septinas

Además del citoesqueleto de actina y de microtúbulos, las células poseen una estructura en forma de filamentos formada principalmente por septinas. Las septinas son una familia de proteínas de unión a GTP conservadas desde levaduras a células animales que, entre otras funciones, están implicadas en la separación celular, polaridad, secreción y deposición de membrana. En células animales las septinas se asocian a componentes del exocisto y a proteínas SNARE (Faty *et al.*, 2002; Field and Kellogg, 1999; Gladfelter *et al.*, 2001; Longtine and Bi, 2003; Versele and Thorner, 2005). Sus primeros miembros fueron identificados en la levadura de gemación en un escrutinio de mutantes termosensibles afectados en el ciclo celular (Hartwell, 1971). En esta levadura existen cinco septinas durante el crecimiento vegetativo: Cdc3, Cdc10, Cdc11, Cdc12 (esenciales) y Shs1/Sep7 (no esencial); y dos más (Spr28 y Spr3) que se inducen durante meiosis (De Virgilio *et al.*, 1996; Fares *et al.*, 1996). Éstas se organizan formando un macrocomplejo (Cdc3, Cdc10, Cdc12, Cdc11)₂, en el que el heterotetrámero (Cdc3-Cdc12)₂ forma el núcleo esencial necesario para ensamblar un complejo estable y formar filamentos (Versele *et al.*, 2004). En *S. cerevisiae* las principales funciones de las septinas son: 1) Servir de soporte estructural para reclutar otras proteínas a la zona de división ya que se han descrito hasta 21 proteínas en el cuello que requieren un correcto ensamblaje de los filamentos de septinas (Faty *et al.*, 2002; Field and Kellogg, 1999; Gladfelter *et al.*, 2001; Longtine and Bi, 2003). 2) Actuar como barreras de difusión estableciendo un compartimento celular cortical, donde se localizan factores implicados directamente en la citocinesis, como la proteína del exocisto Sec3, la proteína adaptadora Spa2 o la quitín sintasa Chs2 (Barral *et al.*, 2000; Dobbelaere and Barral, 2004; Faty *et al.*, 2002). Las septinas tienen un papel similar en células animales, donde se ha demostrado también la existencia de una barrera de difusión (Schmidt and Nichols, 2004).

En *S. cerevisiae* las septinas se localizan como un acúmulo polarizado en la yema incipiente durante G1 y según progresa el ciclo celular se reorganizan formando un anillo de filamentos en el cuello que separa la célula madre de la hija. El anillo se divide en dos durante la citocinesis y acaba desensamblándose al final del proceso (Frazier *et al.*, 1998; Gladfelter *et al.*, 2001).

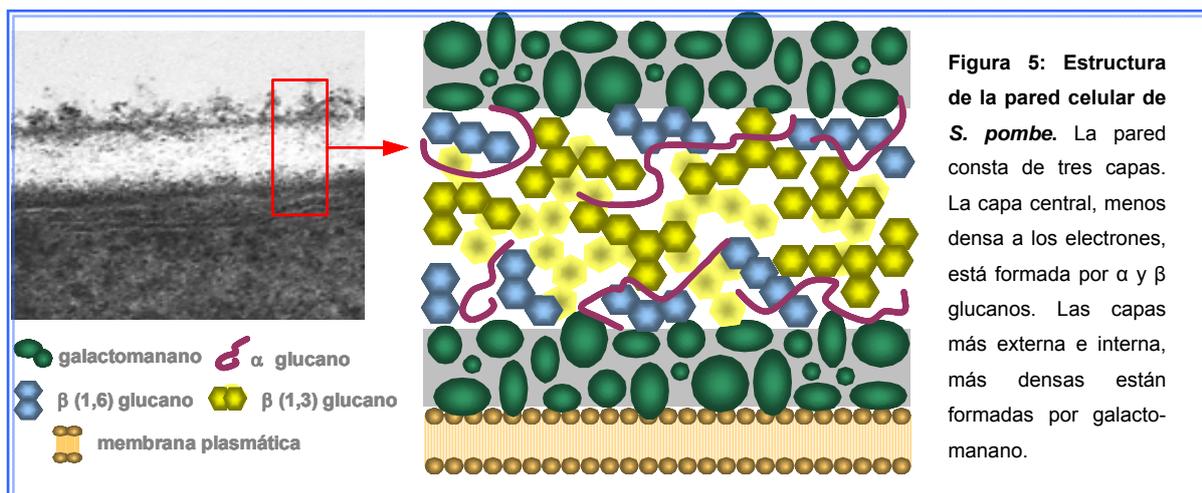
En *S. pombe* se han identificado las septinas Spn1, Spn2, Spn3 y Spn4 homólogas a Cdc3, Cdc10, Cdc11 y Cdc12 de *S. cerevisiae* respectivamente. Estas proteínas se organizan de un modo similar al complejo de *S. cerevisiae*, siendo la unión entre Spn1 y Spn4 clave para la formación de filamentos (An *et al.*, 2004). A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, las cepas mutantes *spnΔ* de *S. pombe* son viables aunque presentan defectos en la separación celular originando células encadenadas. De acuerdo con este fenotipo, las septinas se localizan en la región de división tras el ensamblaje del anillo de actomiosina. Una vez formado el septo, el anillo de septinas se desdobra en dos anillos que desaparecen tras la separación celular. Para la correcta organización del anillo de septinas en la zona de división se requiere la proteína Mid2, relacionada con las anilinas de células animales (Berlin *et al.*, 2003; Tasto *et al.*, 2003). Las células que carecen de Mid2 presentan defectos de separación celular similares a los de la delección de las septinas. La expresión del gen *mid2*⁺ y los niveles de proteína fluctúan durante el ciclo celular de manera dependiente del factor de transcripción Ace2 (Alonso-Núñez *et al.*, 2005). Esta proteína es responsable de la estabilidad del anillo de septinas ya que mediante análisis FRAP (Fluorescent Recovery After Photobleaching) se ha demostrado que esta estructura es muy estable en células silvestres y muy dinámica en células *mid2Δ*. Además, la expresión de una forma no degradable de Mid2 hace que el anillo de septinas se estabilice, lo que sugiere que la degradación de Mid2 puede ser necesaria para su desensamblaje (An *et al.*, 2004; Berlin *et al.*, 2003; Tasto *et al.*, 2003).

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

La pared celular es una estructura rígida, externa a la membrana plasmática que proporciona a la célula una protección mecánica y resistencia a la presión osmótica interna. Además es una estructura dinámica que se adapta a todos los cambios morfológicos que se producen durante el ciclo de vida de la levadura, como son la transición a crecimiento bipolar, la citocinesis, la conjugación o la formación de la pared de la espora. Todos estos cambios exigen una remodelación de la pared celular y se correlacionan con cambios en el citoesqueleto de actina (Durán and Pérez, 2004).

3.1. Composición de la pared celular

La pared celular representa del 15 al 25% del peso seco de las levaduras y está compuesta principalmente por polisacáridos y por pequeñas cantidades de proteínas. Cuando se observa al microscopio electrónico de transmisión, la pared celular de *S. pombe* muestra una estructura trilaminar, con dos capas, externa e interna, densas a los electrones separadas por una capa central menos densa. Las dos capas más densas están formadas por galactomanano, el cual se encuentra unido a proteínas formando galactomanoproteínas y representa el 9-14% del total de los carbohidratos de la pared. La capa central está formada por polisacáridos, principalmente por $\beta(1,3)$ -glucanos (48-54%) interconectados en una maraña fibrilar con $\alpha(1,3)$ -glucanos (18-28%) y con una pequeña proporción de $\beta(1,6)$ -glucanos (2-4%) (Figura 5) (Bush *et al.*, 1974; Kopecka *et al.*, 1995; Manners and Meyer, 1977).



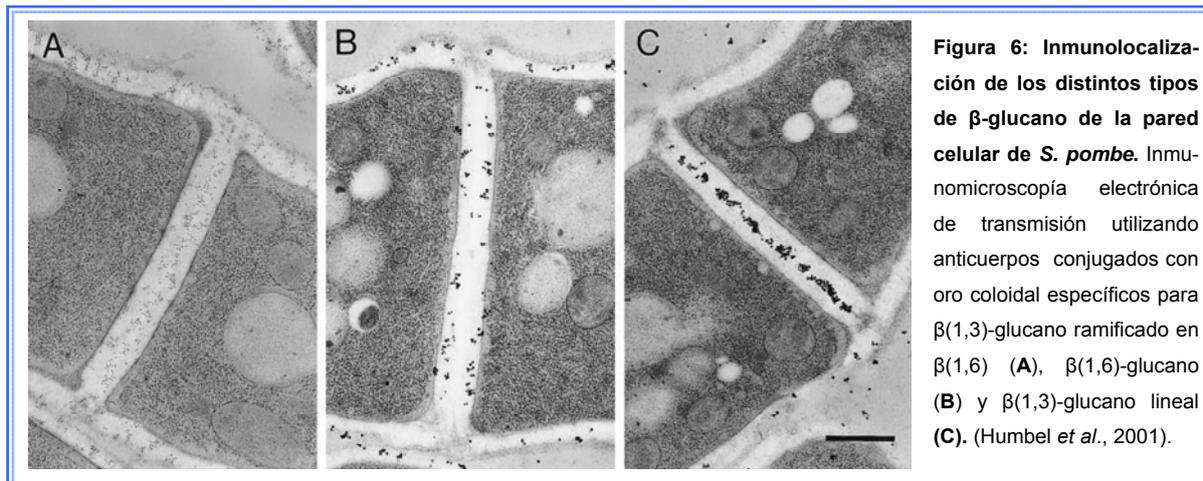
3.2. Biosíntesis de los componentes de la pared celular

3.2.1. Biosíntesis de β -glucano

Estudios de regeneración de la pared celular a partir de protoplastos demostraron que el β -glucano es el primer polímero que se deposita en la pared celular. Las microfibrillas de este compuesto aparecen en un polo y se extienden hasta cubrir la superficie del protoplasto restableciéndose así la forma cilíndrica de *S. pombe* (Osumi, 1998). Sobre este armazón se ensambla el α -glucano y el galactomanano.

Mediante experimentos de inmuno-microscopía se han descrito tres tipos de β -glucano diferentes en la pared de *S. pombe*: $\beta(1,3)$ -glucano lineal, $\beta(1,3)$ -glucano con ramificaciones $\beta(1,6)$ y $\beta(1,6)$ -glucano (Humbel *et al.*, 2001).

Además, en experimentos de inmuno-microscopía electrónica se ha visto que el $\beta(1,3)$ -glucano ramificado se detecta por toda la pared celular y en el septo primario y secundario (capa más densa a los electrones situada a ambos lados del septo primario). El $\beta(1,6)$ -glucano se distribuye en el septo secundario y por toda la pared celular cerca de la capa más externa de galactomanano y el $\beta(1,3)$ -glucano lineal se localiza exclusivamente en la región del septo primario (capa interna del septo menos densa a los electrones) y en los polos (Figura 6) (Humbel *et al.*, 2001).



A pesar de existir tres tipos de β -glucano sólo se ha descrito una actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa (E.C.2.4.1.34, UDP-glucosa: (1,3)- β -D-glucano-3- β -glucosiltransferasa). Esta enzima se encuentra asociada a la cara interna de la membrana plasmática y emplea como sustrato UDP-glucosa, formando cadenas lineales de unos 60-70 residuos de glucosa. La actividad β -glucán sintasa (β GS) está constituida por, al menos, dos componentes (Kang and Cabib, 1986): Una fracción catalítica y una reguladora que es la GTPasa Rho1 (Arellano *et al.*, 1996; Cabib *et al.*, 1998).

En *S. pombe* se han identificado cuatro genes que codifican posibles subunidades catalíticas del complejo β -glucán sintasa: *bgs1*⁺, *bgs2*⁺, *bgs3*⁺ y *bgs4*⁺. Todos estos genes son esenciales para la viabilidad celular de *S. pombe*. Las proteínas Bgs son proteínas transmembranales de elevado peso molecular que presentan similitud con Fks1 y Fks2, las β -glucán sintasas descritas en *S. cerevisiae* (Mazur *et al.*, 1995), y con otras β -glucán sintasas de hongos (Lesage and Bussey, 2006) y de plantas (Verma and Hong, 2001). Bgs1, también denominada Cps1, fue la primera β -glucán sintasa en describirse. Las cepas mutantes *cps1* son capaces de germinar y ensamblar normalmente su pared celular pero son incapaces de formar septos, por ello se le ha asignado a Bgs1 un papel en la formación del septo primario (Cortés *et al.*, 2007). Bgs1 se localiza en los polos celulares durante la inter-

fase y en la zona media de la célula durante el proceso de división celular. Esta localización depende de la correcta formación del anillo de actomiosina, de la señal generada por la ruta SIN y de la miosina de tipo V, Myo52 (Cortés *et al.*, 2002; Mulvihill *et al.*, 2006). Además, recientemente se ha descrito que la proteína Cfh3 participa en la estabilización de la localización de Bgs1 en la zona de división en condiciones de estrés (Sharifmoghadam and Valdivieso, 2009).

El gen *bgs2*⁺ se expresa durante el proceso de esporulación y es imprescindible para la correcta maduración de la espora (Liu *et al.*, 2000a; Martín *et al.*, 2000). Por su parte, *bgs3*⁺ es esencial para el mantenimiento de la viabilidad y de la polaridad celular durante el crecimiento vegetativo. Las células en las que la expresión de *bgs3*⁺ se apaga presentan una estructura de la pared celular alterada (Martín *et al.*, 2003). Finalmente, *bgs4*⁺ es esencial para la germinación de la espora y para el crecimiento vegetativo y se ha propuesto como la enzima mayoritaria encargada de la síntesis del septo secundario y del β -glucano de la pared (Cortés *et al.*, 2005). Bgs4, al igual que Bgs1 y que Bgs3, se localiza en los polos de la célula en interfase y en la zona media de la célula durante la división celular. Su localización depende de la correcta formación del anillo de actomiosina y es independiente de la señal generada por la ruta SIN (Cortés *et al.*, 2005).

La subunidad reguladora de la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa es la GTPasa Rho1 de la que hablaremos más en detalle en el apartado 4.3.1. Rho1 se modifica mediante la adición de un resto hidrofóbico geranil-geranilo por el complejo Cwg2-Cwp1 de la geranil-geranil transferasa I (Díaz *et al.*, 1993; Arellano *et al.*, 1998; Arellano *et al.*, 1996). Para activar la síntesis de β -glucano, Rho1 debe encontrarse en su estado activo, unida a GTP y prenilada. De esta forma Rho1 puede unirse a la membrana plasmática en las inmediaciones de la subunidad catalítica correspondiente, interaccionando con ella y activando la síntesis de glucano.

3.2.2. Biosíntesis de α -glucano

Se han identificado varios genes en *S. pombe* que codifican posibles subunidades catalíticas de la α -glucán sintasa: *mok1*⁺, *mok11*⁺, *mok12*⁺, *mok13*⁺ y *mok14*⁺. De todos ellos solamente *mok1*⁺ parece estar relacionado con la biosíntesis de α -glucano durante el crecimiento vegetativo. Mok1 se localiza en los polos de crecimiento y en el septo en formación y es esencial para la viabilidad celular durante el crecimiento vegetativo (Hochstenbach *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999). La cepa mutante termosensible *mok1-664* presenta menor porcentaje de α -glucano en la pared y una morfología redondeada. Además la sobreexpresión de *mok1*⁺ produce un aumento en la cantidad de este polímero de la pared celular (Katayama *et al.*, 1999).

El resto de genes *mok*, *mok11⁺*, *mok12⁺*, *mok13⁺* y *mok14⁺* no son esenciales para el crecimiento vegetativo, interviniendo en el proceso de esporulación donde son necesarios para la correcta maduración de las esporas (García *et al.*, 2006).

3.2.3. Biosíntesis de Galactomanoproteínas

Las glicoproteínas destinadas a la pared celular viajan a través de la ruta secretora antes de incorporarse a la misma. A lo largo de este viaje, estas proteínas son N- y O-glicosiladas. Los O-oligosacáridos son cadenas cortas de manosas que se anclan a los residuos de serina o treonina de la proteína, mientras que los N-oligosacáridos son cadenas largas y ramificadas de manosas que se unen a los residuos de asparragina. Ambos tipos de glicosilación se inician en el retículo endoplásmico donde se anclan los oligosacáridos a la proteína. Posteriormente el procesamiento y la extensión de estas cadenas oligosacáridicas se continúa en el aparato de Golgi. En *S. cerevisiae* esta extensión se produce exclusivamente con residuos de manosa, mientras que en *S. pombe*, el aparato de Golgi contiene varias galactosiltransferasas que agregan residuos de galactosa a los N-oligosacáridos de manosa (Ballou *et al.*, 1994; Gemmill and Trimble, 1999).

En *S. pombe* a pesar de que se han obtenido varias cepas mutantes afectadas en el proceso de glicosilación de proteínas de la pared celular y se han identificado galactosiltransferasas como Alg11, se sabe muy poco del proceso de síntesis de galactomanano en general (Ribas *et al.*, 1991; Umeda *et al.*, 2000).

3.3. Regulación de la biosíntesis de pared celular

3.3.1. Regulación de la biosíntesis de β -glucano

El principal regulador de la biosíntesis de $\beta(1,3)$ -glucano es la GTPasa Rho1 (Arellano *et al.*, 1999a). Rho1 regula la formación de este polímero por dos vías, una actuando directamente como activador de la β -glucán sintasa (Arellano *et al.*, 1999a) y otra a través de su interacción con las quinasas Pck1 y Pck2 (homólogas a PKC de mamíferos). En concreto, Pck2 es un activador de la enzima $\beta(1,3)$ -glucán sintasa, por lo que Rho1 podría activar a esta enzima a través de Pck2 y en menor medida a través de Pck1 (Arellano *et al.*, 1999b). Ambas Pcks se unen a Rho1 activa por su extremo N-terminal, esta interacción las estabiliza haciendo que aumente su concentración en las zonas de crecimiento (Arellano *et al.*, 1999b) y como en células animales podría facilitar su activación por quinasas dependientes de lípidos como PDK1 (Flynn *et al.*, 2000).

3.3.2. Regulación de la biosíntesis de α -glucano

La regulación de la biosíntesis de α -glucano se lleva a cabo a través de la quinasa Pck2. Esta quinasa es necesaria para que la posible α -glucán sintasa Mok1 se localice correctamente y desarrolle su actividad catalítica (Katayama *et al.*, 1999).

Tanto Rho1 como Rho2 se unen a Pck2 y facilitan su activación. Además la sobreexpresión de Rho2 produce un aumento en la cantidad de α -glucano de la pared celular (Calonge *et al.*, 2000). Se sabe también que Rho2 y Pck2 están relacionadas ya que interaccionan físicamente y las cepas mutantes en estos dos genes presentan fenotipos similares. Por lo tanto, aunque no está claro cómo Rho2 interacciona con Mok1, los datos anteriores indicarían que esta interacción se produce a través de Pck2 (Arellano *et al.*, 1999b; Calonge *et al.*, 2000).

4. LAS GTPasas DE LA FAMILIA RHO

Las GTPasas de la familia Rho (Ras Homology), forman parte de una gran superfamilia de proteínas G pequeñas relacionadas con Ras, proteína fundadora del grupo. Las proteínas G pequeñas son moléculas de un tamaño de 20-40 kDa presentes sólo en organismos eucariotas y conservadas desde levaduras hasta mamíferos, con una función bioquímica similar a la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas (Boueux *et al.*, 2007).

Al igual que el resto de miembros de la superfamilia Ras, las GTPasas Rho se activan cuando se encuentran unidas a GTP y se inactivan cuando este compuesto es hidrolizado a GDP (Figura 7).

En su estado activo, las GTPasas Rho se unen a distintas moléculas efectoras, lo que les permite activar y regular una gran variedad de procesos, incluidos la morfogénesis, la migración celular, el desarrollo neuronal, la división, la adhesión celular, el tráfico de vesículas, la dinámica de los microtúbulos, la expresión génica y/o la progresión del ciclo celular (Bustelo *et al.*, 2007; Etienne-Manneville and Hall, 2002; Heasman and Ridley, 2008).

4.1. Regulación de las GTPasas de la familia Rho

Las proteínas Rho requieren anclarse a la membrana para poder realizar sus funciones biológicas. La condición esencial para ello es sufrir un cambio postraducciona. Estas modificaciones postraduccionales suelen producirse en el extremo carboxilo de las proteínas y consisten en la incorporación de grupos de naturaleza isoprenoide seguida de una proteólisis.

La primera fase de esta modificación consiste en la incorporación de un grupo geranilgeranilo o farnesilo a la cisteína situada en la "caja CAAX" (siendo A un aminoácido alifáti-

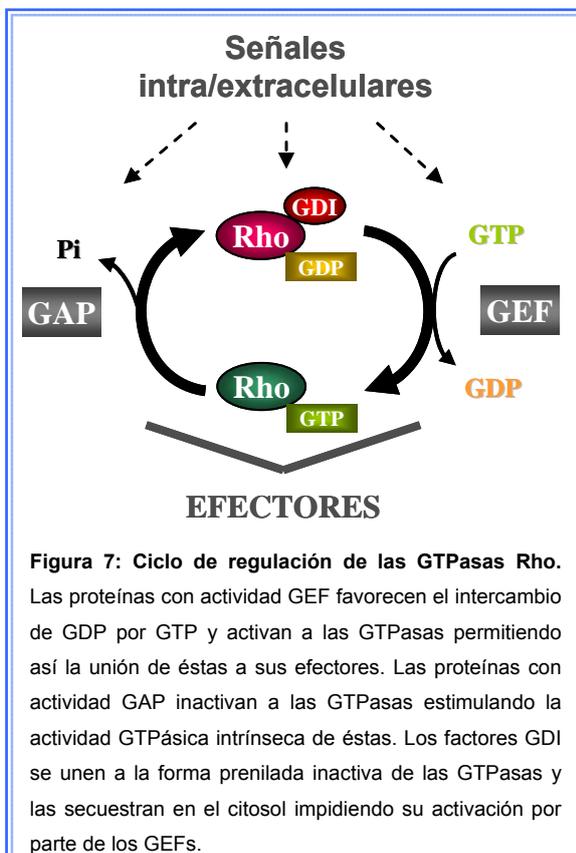
co y X cualquier aminoácido) del extremo C-terminal de la GTPasa. Este proceso se lleva a cabo en el citoplasma celular por la acción de geranyl-geranyl o farnesil transferasas de tipo I. La incorporación del grupo isoprenoide promueve la translocación de la GTPasa al retículo endoplásmico, donde se va producir la proteólisis del tripeptido “AAX” y posterior metilación de la cisteína C-terminal (Bustelo *et al.*, 2007; Wennerberg *et al.*, 2005).

Aparte de los grupos isoprenoides, existen otras señales necesarias para la localización de estas moléculas. La localización de diferentes miembros de la familia Rho depende de una secuencia polibásica situada justo por encima de la “caja CAAX”. En el caso de Rac1, es necesaria una secuencia rica en prolinas para la translocación de esta proteína a los focos de adhesión focal (ten Klooster *et al.*, 2006). En otros casos se produce una segunda modificación postraduccional que consiste en la incorporación de grupos palmitoilo.

Además de estas modificaciones, las células controlan la actividad de estas proteínas a través de varios tipos de regulación.

4.1.1. Regulación por cambio de nucleótido

El ciclo de las GTPasas Rho alterna entre un estado inactivo y uno activo dependiendo de si la proteína se encuentra unida a GDP o a GTP y se encuentra regulado por dos tipos de proteínas: GEFs y GAPs (Figura 7). Las GTPasas requieren para activarse la acción de



factores GEFs (Guanine Exchange Factor).

Los GEFs son proteínas que al interactuar con las GTPasas provocan un cambio conformacional que favorece la unión del GTP. Estos GEFs interactúan con la forma unida a GDP de la GTPasa y provocan la disociación del nucleótido que, posteriormente, es sustituido por GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001). El sitio de unión de nucleótidos de guanina se sitúa entre los switch I y switch II de la proteína G. Estas regiones junto con el P-loop (región de unión al fosfato) interactúan con los fosfatos y con el ión magnesio, que son moléculas imprescindibles para que la unión entre el nucleótido y la GTPasa sea de alta afinidad (Vetter and Wittinghofer, 2001). La unión del GEF a la proteína G induce cambios confor-

macionales en las regiones switch y en el P-loop que bloquean el sitio de unión al magnesio. Esto hace que la interacción con los fosfatos se debilite. Todos estos cambios facilitan que se libere el nucleótido y permita la entrada a otro nucleótido nuevo. En general la proteína G presenta una afinidad similar por el GDP y el GTP, y el GEF no favorece la unión de uno o de otro. La unión del GTP se produce porque la concentración de este nucleótido en la célula es diez veces superior al del GDP. El GEF desplaza al nucleótido unido y posteriormente el nuevo nucleótido desplaza al GEF (Bos *et al.*, 2007).

Las GTPasas poseen actividad GTPásica intrínseca, pero ésta es muy poco eficiente. Por ello, en su inactivación intervienen proteínas GAP (GTPase Activating Protein) que aceleran la hidrólisis de GTP en varios órdenes de magnitud. Las proteínas RhoGAP realizan esta función a través del dominio RhoGAP. Este dominio consiste en nueve α -hélices y un residuo de Arginina altamente conservado. El dominio RhoGAP interacciona con los switch I y II y el P-loop de las proteínas Rho, que es lo que constituye el sitio de unión de GTP (Moon and Zheng, 2003).

En general existen más GEFs y GAPs que proteínas G a las que regulan, de hecho una misma GTPasa puede ser regulada por varios GEFs y GAPs, lo que permite una gran especificidad en el control de las diferentes rutas de señalización en las que participan. Además, GEFs y GAPs son proteínas complejas, con múltiples dominios capaces de interactuar con otras proteínas o con lípidos, lo que indica que podrían actuar como señales de localización o como adaptadores para la formación de complejos multiproteicos (Bos *et al.*, 2007; Moon and Zheng, 2003; Rossman *et al.*, 2005; Schmidt and Hall, 2002).

Las GTPasas Rho también son reguladas por una tercera clase de proteínas, los GDIs (Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor). Estos factores actúan de varias formas diferentes. Por un lado, se unen a la GTPasa inactiva, manteniéndola en este estado e impidiendo su activación por parte de los GEFs. Por otro lado, los GDIs son capaces de interactuar con la GTPasa activa unida a GTP, bloqueando la hidrólisis del nucleótido e impidiendo con su unión que la GTPasa activa se ponga en contacto con sus efectores (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Olofsson, 1999).

Los GDIs también participan en la regulación del anclaje a la membrana de estas proteínas. Los GDIs se unen a la GTPasa localizada en la membrana una vez ha finalizado el proceso de señalización, favoreciendo su liberación de esta estructura y ocultando su grupo isoprenilo. De esta forma secuestran a la GTPasa en su estado inactivo en el citosol e impiden su activación. La disociación de los GDIs y las GTPasas es esencial para que se produzca su activación por parte de los GEFs y para su asociación a la membrana (DerMardirossian and Bokoch, 2005; Olofsson, 1999).

4.1.2. Otros tipos de regulación

En mamíferos muchas GTPasas de la familia Rho presentan una expresión específica dependiente del tipo celular o de diferentes estímulos. Otras son reguladas mediante degradación en sitios específicos de la célula, por ubiquitinación, degradación por caspasas, etc. Las GTPasas también pueden ser fosforiladas en residuos específicos. Esta modificación postraduccional puede influir en su interacción con los GDIs, en su estabilidad en la membrana y en sus funciones efectoras (Bustelo *et al.*, 2007).

Existen también formas de regulación específicas como la que presenta la proteína RhoU en células animales. La regulación se produce a través de un posible dominio de autoinhibición situado en su extremo N-terminal. Dicha autoinhibición se desactiva por la unión a una proteína adaptadora, lo que permite que la interacción de la GTPasa con sus efectores sea más eficaz (Bustelo *et al.*, 2007).

4.2. Moléculas efectoras de las GTPasas de la familia Rho

Una vez activadas y translocadas a sus sitios específicos de actuación, las proteínas Rho interaccionan con sus moléculas efectoras para aumentar la señal específica de las cascadas de transducción de señales. Hasta ahora se han descrito más de 70 moléculas efectoras potenciales para los miembros de la familia de GTPasas Rho más estudiados, RhoA, Rac1 y Cdc42. Entre estos efectores se incluyen serina/treonina quinasas, tirosina quinasas, lipasas, oxidasas y proteínas adaptadoras (Jaffe and Hall, 2005). Las moléculas efectoras se unen a las regiones switch I y switch II de la GTPasa, que son los sitios principales de reconocimiento. Cuando la GTPasa se activa, el GTP induce un cambio conformacional de la proteína que hace que el switch I y el switch II queden al descubierto, permitiendo a las proteínas diana acceder a estas zonas. Por el contrario, estas regiones no se encuentran accesibles para los efectores cuando la GTPasa está inactiva (Milburn *et al.*, 1990).

El anclaje de las proteínas efectoras a la membrana es a veces necesario para ser activadas. De hecho la activación de las quinasas ROCK y Citron por parte de RhoA se produce una vez se han translocado a las zonas más activas de señalización celular. Por el contrario, la activación de la quinasa Pak1 por Rac1 sólo se produce en el citosol de las células (Bustelo *et al.*, 2007).

En la mayoría de los casos el modo de actuación de las proteínas Rho consiste en provocar un cambio conformacional en la proteína efectora que le permite salir de una conformación autoinhibida, dando lugar a una estructura activa. Por ejemplo, las serina/treonina quinasas Pak1-3 presentan un dominio regulador intramolecular que inhibe su actividad

quinasa. La unión de la GTPasa desplaza la secuencia inhibidora permitiendo al dominio quinasa ejercer su función (Bishop and Hall, 2000; Jaffe and Hall, 2005). En otros casos, la unión de la GTPasa favorece la liberación de la molécula efectora de un factor inhibidor al cual estaba asociada. También hay que destacar que en ocasiones la GTPasa activa, actúa inhibiendo y no estimulando, la función de la proteína efectora (Bustelo *et al.*, 2007).

El resultado final de la regulación de las moléculas efectoras es la generación de señales ramificadas que permiten llevar a cabo importantes funciones durante el ciclo celular, la citocinesis, la regulación de la morfogénesis y la polaridad celular, o durante la migración celular. Cabe destacar que entre las funciones de las proteínas efectoras en muchos casos también se encuentra la de regular a las propias GTPasas, lo que contribuye a una señalización por GTPasas coordinada y equilibrada. Esto pone de manifiesto el alto grado de plasticidad que presentan las rutas de transducción de señales de GTPasas (Bustelo *et al.*, 2007; Park and Bi, 2007).

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

Como en otros organismos eucariotas muchos de los procesos morfogénicos que tienen lugar durante el ciclo de vida de *S. pombe* están regulados por las GTPasas de la familia Rho. En este organismo existen 6 miembros de esta familia de GTPasas: Rho1-5 y Cdc42, de los cuales sólo dos, Rho1 y Cdc42 son esenciales para la supervivencia de la célula (Arellano *et al.*, 1996; Miller and Johnson, 1994; Nakano *et al.*, 1997).

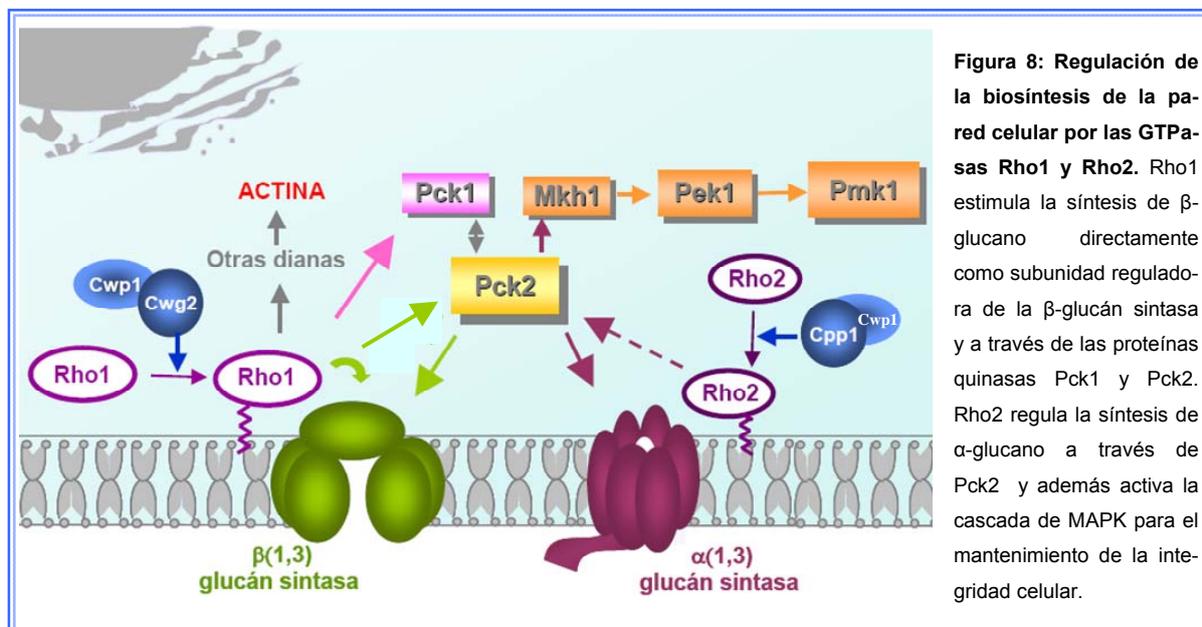
4.3.1. Rho1

Rho1 es la principal GTPasa que interviene en la biosíntesis de la pared celular y por ello su eliminación es letal. *rho1*⁺ fue aislado utilizando ADNc de RhoA como sonda frente a una genoteca de ADNc de *S. pombe*. SpRho1 presenta un 73% y un 67% de identidad frente a Rho1 de *S. cerevisiae* y RhoA de *Homo sapiens* respectivamente (Nakano and Maibuchi, 1995).

En *S. pombe* Rho1 presenta funciones relacionadas con la biosíntesis de la pared celular y con la polarización de la actina. En relación con la biosíntesis de pared celular, Rho1 activa directamente a la $\beta(1,3)$ -glucán sintasa (Arellano *et al.*, 1996). Las células que sobreexpresan *rho1*⁺ presentan una pared mucho más gruesa, apareciendo también células encadenadas incapaces de dividirse, lo que sugiere un posible papel de Rho1 en el proceso de citocinesis. Por el contrario, cuando se elimina la expresión de *rho1*⁺ o se sobreexpresa el alelo constitutivamente inactivo *rho1T20N*, la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa disminuye y las células se lisan principalmente al finalizar el proceso de citocinesis, durante la separación celular (Arellano *et al.*, 1997).

En relación con el control de la polarización de la actina, la sobreexpresión del alelo constitutivamente activo *rho1G15V* provoca la aparición de acúmulos de actina mientras que la eliminación de la expresión de Rho1 causa la desaparición de la actina cortical (Arellano *et al.*, 1997).

Otras dos proteínas efectoras sobre las que actúa Rho1 son las quinasas Pck1 y Pck2. La eliminación de cualquiera de las dos proteínas por separado no es esencial para la célula, pero sí la doble deleción, lo que indica que comparten una función esencial para la viabilidad celular (Toda *et al.*, 1993). Ambas proteínas, al igual que ocurre con Pkc1 de *S. cerevisiae* (Lee and Levin, 1992; Levin *et al.*, 1994; Paravicini and Friedli, 1996) intervienen en el mantenimiento de la integridad celular ya que su eliminación por separado genera defectos relacionados con la biosíntesis de la pared celular. Rho1 activa la biosíntesis de pared celular directamente a través de la $\beta(1,3)$ -glucán sintasa e indirectamente a través de Pck1 y Pck2 (Figura 8).



Rho1 se localiza en los lugares de crecimiento celular, polos y septo, donde activa la síntesis de pared (Arellano *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997). Rho1 funciona por debajo de los marcadores de polaridad Tea1 y Tea2 ya que su localización en las áreas de crecimiento activo depende de estas proteínas (Arellano *et al.*, 1997).

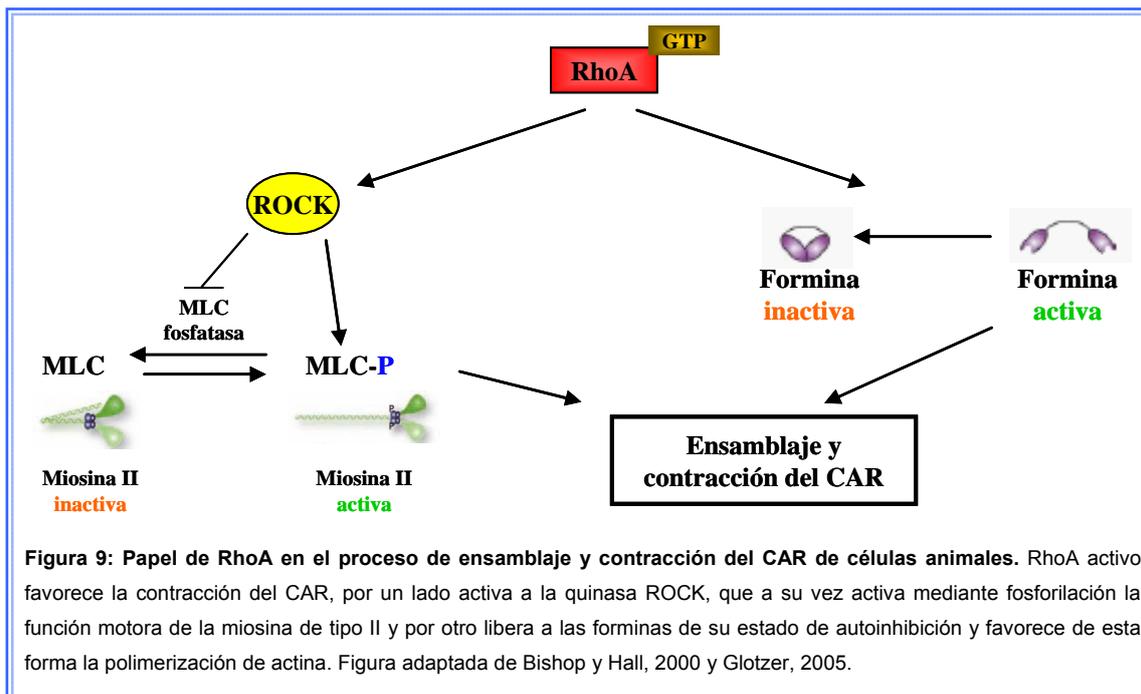
En cuanto a la regulación de Rho1, hasta ahora se han identificado tres reguladores positivos o GEFs: Rgf1, Rgf2 y Rgf3. Rgf1 regula la biosíntesis de la pared celular, es necesario para la activación del crecimiento en el polo nuevo durante NETO y participa en la activación de la ruta de MAPK, Mkh1-Pek1-Pmk1 (García *et al.*, 2006a; García *et al.*, 2009b). Rgf2 es esencial durante el proceso de esporulación y podría actuar cooperando con Rgf1

en la biosíntesis de pared durante el crecimiento vegetativo (García *et al.*, 2009a). Rgf3 activa a Rho1 específicamente durante el proceso de citocinesis (Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004). También se han identificado tres reguladores negativos o GAPs para Rho1: Rga1, Rga5 y Rga8. Rga1 es el principal regulador negativo de Rho1. Su eliminación ralentiza el crecimiento y provoca alteraciones morfológicas similares a las producidas por la sobreexpresión de Rho1 (Nakano *et al.*, 2001). Rga5 participa en la regulación de la actividad β -glucán sintasa y en el mantenimiento de la integridad celular (Calonge *et al.*, 2003). Rga8 se aisló a partir de una búsqueda de proteínas que interactuaban con Pak1/Shk1, quinasa efectora de Cdc42, pero su función apenas se conoce (Yang *et al.*, 2003).

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

En *S. cerevisiae* Rho1 regula la síntesis de β -glucano al menos por dos vías diferentes, directamente regulando a las β -glucán sintasas Fks1 y Fks2 e indirectamente como activador de la ruta de MAP quinazas que controlan la integridad celular. Esta ruta está formada por el homólogo de la Proteína quinasa C, Pkc1, un modulo de MAP quinazas y los factores de transcripción Rlm1 y Swi4/6. La activación de la ruta en respuesta a factores externos, como daños en la pared celular, produce la activación de la transcripción de genes relacionados con la biosíntesis de componentes de la pared como *FKS1*, *FKS2* y *CHS3* (Levin, 2005; Park and Bi, 2007). En *S. pombe* se ha relacionado recientemente a Rho1 y a su GEF Rgf1 con la cascada de quinazas de la ruta de integridad Mkh1-Pek1-Pmk1. La sobreexpresión tanto de Rho1 como de Rgf1 produce un aumento en los niveles de fosforilación de Pmk1 dependiente de Pck2 y Mkh1 (García *et al.*, 2009b), sin embargo no se ha descrito ningún gen relacionado con la biosíntesis de pared cuya transcripción se active por la ruta Mkh1-Pek1-Pmk1. En *S. cerevisiae*, Rho1 también participa en la formación de filamentos de actina y del anillo contráctil de actomiosina a través de las forminas Bni1 y Bnr1 (Levin, 2005). A su vez, Rho1 está regulada por la polo quinasa Cdc5, necesaria para reclutar dos GEFs al sitio de división (Tus1 y Rom2), que localizan a Rho1 en esta zona y lo activan. El fallo de este mecanismo conduce a que la formina Bni1 no alcance el cuello de la yema, ocasionando graves defectos en el ensamblaje del anillo (Yoshida *et al.*, 2006).

En células de mamífero, RhoA interviene en la formación del anillo contráctil de actomiosina, liberando a las forminas de su estado de autoinhibición. RhoA activa también a la quinasa ROCK que a su vez activa las miosinas responsables del ensamblaje y contracción del anillo, directamente mediante fosforilación de la cadena ligera de la miosina e indirectamente a través de la inhibición de la fosfatasa que actúa sobre la misma (Figura 9)



(Glotzer, 2005). En *S. pombe* aún no se ha descrito ninguna relación de Rho1 con cualquiera de sus forminas. Tampoco se han identificado otras posibles dianas sobre las que actúa Rho1 para regular al citoesqueleto de actina.

4.3.2. Rho2

Al igual que Rho1, Rho2 participa en el mantenimiento de la integridad celular regulando la biosíntesis de pared celular. La delección del gen no es letal pero da lugar a células con morfología más redondeada y con alteraciones en la pared celular (Hirata *et al.*, 1998). Rho2 interviene en la biosíntesis de α -glucano de la pared celular a través de Pck2 (figura 8) (Calonge *et al.*, 2000). Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de α -glucano durante el crecimiento vegetativo es llevada a cabo por Mok1 (Katayama *et al.*, 1999). La delección de esta enzima es letal, sin embargo, las cepas *rho2Δ* o *pck2Δ* son viables, lo que sugiere la existencia de un mecanismo alternativo de activación de Mok1 (Calonge *et al.*, 2000).

Rho2 actúa también a través de Pck2 en la activación de la ruta de MAP quinasas formada por Mkh1-Pek1-Pmk1 (Figura 8). La sobreexpresión de Rho2 y de Pck2 induce un aumento en los niveles de fosforilación de Pmk1, mientras que en las cepas mutantes de estos genes se produce una disminución de Pmk1 fosforilada (Barba *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2006). En una búsqueda realizada para identificar reguladores de la ruta de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1, se aisló una cepa mutante con una mutación en el gen *cpp1*⁺ que codifica la subunidad β de la farnesiltransferasa. El análisis de esta cepa mutante indicó que Cpp1

actúa farnesilando a Rho2, permitiendo de esta forma su anclaje a la membrana (Ma *et al.*, 2006).

El único regulador descrito hasta la fecha para esta GTPasa es la proteína GAP Rga2. Rga2 regula negativamente a Rho2 tanto en la regulación de la biosíntesis de α -glucano como en la activación de la ruta de MAP quinasas Mkh1-Pek1-Pmk1 (Villar-Tajadura *et al.*, 2008).

4.3.3. Rho3

En *S. cerevisiae* Rho3 está involucrada en el transporte de vesículas exocíticas a través de los cables de actina y en el anclaje de éstas a la membrana plasmática (Adamo *et al.*, 1999; Brennwald and Rossi, 2007; Roumanie *et al.*, 2005). En *S. pombe* Rho3 no es esencial, pero a elevada temperatura (37°C) la cepa mutante *rho3Δ* presenta defectos de crecimiento y células multibacadas con morfología aberrante. Rho3 se localiza en la membrana y está más concentrada en las regiones de crecimiento y división (Nakano *et al.*, 2002).

Rho3 se aisló como supresor multicopia de las cepas mutantes del exocisto *sec8-1* y *exo70Δ* y existen interacciones genéticas de *rho3Δ* con estas cepas. Además la localización de Rho3 depende del complejo del exocisto (Wang *et al.*, 2003) y la cepa *rho3Δ* acumula vesículas a 37°C y muestra una secreción reducida (Wang *et al.*, 2003). Por todo esto, se ha propuesto que Rho3 podría actuar modulando las funciones de este complejo.

Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, en *S. pombe* Rho3 interacciona con la formina For3 (Nakano *et al.*, 2002), aunque hasta ahora no se ha demostrado si esta GTPasa participa en su activación.

En relación con su regulación, hasta la fecha no se ha descrito ninguna proteína reguladora específica para esta GTPasa.

4.3.4. Rho4

Rho4 es la única GTPasa de la familia Rho que se localiza exclusivamente en la región de división. Rho4 no es esencial pero su eliminación produce la acumulación de vesículas alrededor del septo y defectos en la separación celular a alta temperatura (Nakano *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2003). Rho4 regula la secreción de las glucanasas Eng1 y Agn1, necesarias para la degradación del septo y la separación de las dos células hijas. En una cepa *rho4Δ*, Eng1 y Agn1 no se localizan de forma correcta en la zona de división a 37°C. Además la sobreexpresión de cualquiera de estas dos glucanasas corrige el fenotipo de multi-septación de la cepa mutante *rho4Δ* (Santos *et al.*, 2005).

La falta de Rho4 produce también una deslocalización de los parches de actina y una incorrecta polarización de los haces de microtúbulos por lo que se ha sugerido que Rho4

podría actuar regulando tanto el citoesqueleto de actina como el de microtúbulos (Nakano *et al.*, 2003).

4.3.5. Rho5

Rho5 es, dentro de las GTPasas de la familia Rho, la más similar a Rho1 (86% de identidad). Rho5 no es esencial, la cepa mutante *rho5Δ* es indistinguible de la cepa silvestre, sin embargo, en ausencia de Rho1 regula la actividad β -glucán sintasa y la organización del citoesqueleto de actina. Esto indica que Rho5 puede realizar las funciones de Rho1 aunque de forma menos eficiente (Nakano *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2006). *rho5⁺* se expresa principalmente durante la fase estacionaria y durante el proceso de reproducción sexual. De hecho, participa en la formación de la pared de la espora. La cepa que expresa el alelo constitutivamente inactivo, *rho5T20N*, da lugar a esporas inviables mientras que las esporas de la cepa que expresa el alelo constitutivamente activo, *rho5G15V*, presentan una morfología aberrante (Rincón *et al.*, 2006).

4.3.6. Cdc42

Cdc42 es esencial, participa en el control del crecimiento celular polarizado y es necesaria para mantener la morfología cilíndrica de *S. pombe* (Miller and Johnson, 1994).

En *S. pombe* se han identificado dos GEFs de Cdc42, Ral1/Scd1 y Gef1 y una proteína GAP, Rga4 (Coll *et al.*, 2003; Fukui and Yamamoto, 1988; Hirota *et al.*, 2003; Tatebe *et al.*, 2008). Scd1 es necesario para la respuesta sexual, ya que su eliminación origina células redondeadas incapaces de conjugarse, y para mantener la morfología, activando la ruta Ras1-Scd1-Cdc42-Pak1 durante el crecimiento vegetativo (Chang *et al.*, 1994; Fukui and Yamamoto, 1988). Gef1 participa en el proceso de citocinesis y en la transición de crecimiento monopolar a bipolar (Coll *et al.*, 2003). La eliminación simultánea de estos dos GEFs es letal, generando células redondeadas que mimetizan el fenotipo de la delección de Cdc42. Esto sugiere que Scd1 y Gef1 activan a esta GTPasa en sus funciones esenciales (Coll *et al.*, 2003; Hirota *et al.*, 2003).

Rga4 es una proteína GAP que se localiza en las regiones de no crecimiento de la célula, quedando excluida de los polos celulares. La cepa mutante *rga4Δ* da lugar a células más cortas y gruesas que las de una cepa silvestre (Das *et al.*, 2007). Utilizando el dominio de unión a Cdc42 activa de la proteína Gic2 de *S. cerevisiae* marcado con GFP (CRIB-GFP), se ha visto que aunque Cdc42 se localiza por toda la membrana de la célula y en la región de división (Coll *et al.*, 2007; Merla and Johnson, 2000), GTP-Cdc42 se localiza únicamente en las regiones de crecimiento, donde no está siendo regulada negativamente por Rga4 (Tatebe *et al.*, 2008).

Los dos efectores mejor conocidos de Cdc42 son las proteínas quinasas Pak1/Shk1/Orb2 y Pak2/Shk2. Shk1 es una proteína esencial necesaria para el crecimiento polarizado, el control del ciclo celular y la conjugación (Marcus *et al.*, 1995; Otilie *et al.*, 1995; Verde *et al.*, 1995). Shk2 no es esencial y sus funciones son parcialmente redundantes a las de Shk1 ya que la sobreexpresión de Shk2 rescata la letalidad de la delección de Shk1 (Sells *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Shk2 se ha relacionado con la activación de la ruta de MAP quinasas formada por Mkh1-Pek1-Pmk1 puesto que se ha detectado interacción mediante ensayo de doble híbrido entre Shk2 y Mkh1 (Merla and Johnson, 2001). Sin embargo, la activación por fosforilación de Pmk1 en respuesta a diferentes tipos de estrés es independiente de Shk2 (Madrid *et al.*, 2006).

Otra función importante de Cdc42 es la regulación del ensamblaje de los cables de actina. Como ya se ha comentado en el apartado 2.4.1, Cdc42 es necesaria para la activación y localización de la formina For3, encargada de la formación de los cables, mediante la liberación de su estado de autoinhibición. La cepa mutante *cdc42-1625*, con una mutación puntual en *cdc42*⁺, presenta unos cables de actina cortos y finos. Además, en esta cepa la proteína For3 no se encuentra correctamente localizada en los polos celulares (Martin *et al.*, 2007).

5. LA CITOCINESIS COMO UN PROCESO MORFOGENÉTICO EN *S. pombe*

La citocinesis es la fase final del ciclo celular a través de la cual se produce la segregación de los componentes de la célula madre para dar lugar a dos células hijas independientes. El proceso de citocinesis está regulado espacial y temporalmente para asegurar la correcta segregación cromosómica y el reparto equitativo de material celular entre las dos células hijas.

Tanto en células animales como en levaduras, este proceso requiere la formación de un anillo contráctil de actomiosina (CAR), el cual al contraerse genera la fuerza necesaria que permite la separación física entre las dos células hijas. Muchos de los componentes implicados en este proceso como la profilina, la tropomiosina, las miosinas de tipo II o la actina, están conservados a lo largo de la evolución (Tabla I). En hongos y levaduras, la citocinesis requiere además la formación de un septo de división formado por material de pared, cuya síntesis debe estar coordinada con la contracción del anillo de actomiosina y el resto de eventos que tienen lugar durante el proceso de división (Balasubramanian *et al.*, 2004).

En *S. pombe*, al comienzo de la mitosis cuando se produce la duplicación del SPB (cuerpo polar del huso) y el ensamblaje del huso mitótico, los parches de actina comienzan a desaparecer de los polos celulares y a concentrarse en la zona media de la célula junto

Tabla I: Genes implicados en el proceso de citocinesis de *S. pombe*

GEN	PROTEÍNA	GEN	PROTEÍNA
Componentes del anillo contráctil		Posición del anillo contráctil	
<i>act1</i> ⁺	Actina	<i>mid1</i> ⁺	Proteína similar a anilina
<i>adf1</i> ⁺	Cofilina	<i>plo1</i> ⁺	POLO quinasa
<i>ain1</i> ⁺	Alfa-actinina	<i>pom1</i> ⁺	Quinasa
<i>cdc3</i> ⁺	Profilina	Regulación de la ruta SIN	
<i>cdc4</i> ⁺	Cadena ligera esencial de miosina II	<i>dma1</i> ⁺	Proteína de unión a Sid4
<i>cdc8</i> ⁺	Tropomiosina	<i>etd1</i> ⁺	Proteína de unión a Cdc15
<i>cdc12</i> ⁺	Formina	<i>flp1</i> ⁺	Fosfatasa
<i>cdc15</i> ⁺	Proteína de tipo PCH	<i>par2</i> ⁺	Fosfatasa
<i>lmp2</i> ⁺	Proteína de tipo PCH	<i>cdc2</i> ⁺ - <i>cdc13</i> ⁺	Complejo CDK-ciclina mitótica
<i>fim1</i> ⁺	Fimbrina	Síntesis del septo y deposición de membrana	
<i>myo2</i> ⁺	Cadena pesada de miosina II	<i>bgs1</i> ⁺	$\beta(1,3)$ -glucán sintasa
<i>myp2</i> ⁺	Cadena pesada de miosina II	<i>bgs4</i> ⁺	$\beta(1,3)$ -glucán sintasa
<i>plo1</i> ⁺	POLO quinasa	<i>bgs3</i> ⁺	$\beta(1,3)$ -glucán sintasa
<i>rlc1</i> ⁺	Cadena ligera reguladora de miosina II	<i>mok1</i> ⁺	α -glucán sintasa
<i>rng2</i> ⁺	Proteína IQGAP	<i>rho1</i> ⁺	GTPasa
<i>rng3</i> ⁺	Proteína con dominio UCS	<i>rho2</i> ⁺	GTPasa
Ruta de señalización SIN		<i>rga5</i> ⁺	GAP
<i>byr4</i> ⁺	Proteína de unión a Cdc16	<i>arp2</i> ⁺	Proteína relacionada con actina
<i>cdc7</i> ⁺	Quinasa	<i>arp3</i> ⁺	Proteína relacionada con actina
<i>cdc11</i> ⁺	Proteína adaptadora	<i>myo51</i> ⁺	Miosina de tipo V
<i>cdc14</i> ⁺	proteína de unión a Sid1	<i>myo52</i> ⁺	Miosina de tipo V
<i>cdc16</i> ⁺	GAP	<i>hob3</i> ⁺	Proteína BAR
<i>mob1</i> ⁺	Quinasa	Degradación del septo de división	
<i>plo1</i> ⁺	POLO quinasa	<i>agn1</i> ⁺	$\alpha(1,3)$ -glucanasa
<i>sid1</i> ⁺	Quinasa	<i>eng1</i> ⁺	Endo- $\beta(1,3)$ glucanasa
<i>sid2</i> ⁺	Quinasa	<i>spn1</i> ⁺ - <i>4</i> ⁺	Septinas
<i>sid4</i> ⁺	Proteína adaptadora	<i>exo70</i> ⁺ - <i>sec8</i> ⁺	Proteínas del exocisto
<i>spg1</i> ⁺	GTPasa	<i>mid2</i> ⁺	Proteína similar a anilina

con otros componentes necesarios para la formación del CAR. Una vez formado el anillo, algunos parches de actina se mantienen en esta región flanqueando al septo en formación.

Al final de la anafase, cuando el huso mitótico se desensambla, se produce la contracción del anillo de actomiosina y la deposición de material de pared para formar el septo primario y secundario. Finalmente, la digestión de la pared celular lateral y del septo primario da lugar a dos células hijas independientes (Balasubramanian *et al.*, 2004; Wolfe and Gould, 2005).

Se han identificado numerosas cepas mutantes afectadas en el proceso de citocinesis (Balasubramanian *et al.*, 1998; Gould and Simanis, 1997; Nurse *et al.*, 1976). El estudio de los genes afectados en estas cepas mutantes y el análisis de sus fenotipos ha permitido dividir la citocinesis en varias etapas principales (Balasubramanian and McCollum, 2004):

- 1) Selección del sitio de división.
- 2) Ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina.
- 3) Contracción del CAR.
- 4) Deposición de material de membrana y síntesis del septo de división.
- 5) Separación celular.

5.1. Selección del sitio de división

Aunque la localización del CAR va a predecir dónde se va a realizar la división celular, existen variaciones entre diferentes organismos eucariotas en cuanto a la selección del sitio de división. En células animales, el plano de división se determina por la posición del huso mitótico al comienzo de la anafase (Glotzer, 2004). En *S. cerevisiae* el lugar donde va a producirse la división se determina durante G1 en una localización adyacente o enfrentada a la anterior división (Casamayor and Snyder, 2002). En este proceso juegan un papel importante las septinas, ya que marcan el plano de división y se encargan de reclutar otros factores que intervienen en la citocinesis.

En *S. pombe* el sitio de división se determina antes de la anafase, por la posición del núcleo y por la presencia en la región de la membrana plasmática adyacente al núcleo de la proteína Mid1, una proteína similar a la anilina de mamíferos (Wolfe and Gould, 2005). La posición del núcleo en la región media de la célula se mantiene gracias a las fuerzas que ejercen los microtúbulos interfásicos, que por una parte contactan con la envuelta nuclear y por otra con los polos de la célula (Daga *et al.*, 2006).

La proteína Mid1 es fundamental en la elección del plano de división. Mid1 es una proteína que fue aislada en un “screening” de mutantes termosensibles con defectos en la posición o el ensamblaje del anillo de actomiosina (Sohrmann *et al.*, 1996). La cepa *mid1Δ* presenta anillos y septos mal situados debido a que el ensamblaje del CAR no se produce en la región central (Wu *et al.*, 2003). Durante la interfase, Mid1 se localiza principalmente en el núcleo y en una banda difusa en la región perinuclear (Figura 10) (Almonacid *et al.*, 2009; Paoletti and Chang, 2000). Cuando las células entran en mitosis, Mid1 es exportada

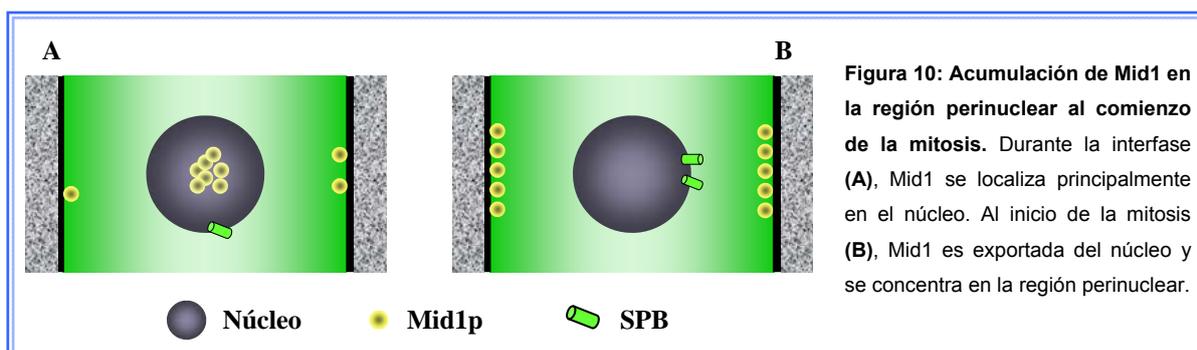


Figura 10: Acumulación de Mid1 en la región perinuclear al comienzo de la mitosis. Durante la interfase (A), Mid1 se localiza principalmente en el núcleo. Al inicio de la mitosis (B), Mid1 es exportada del núcleo y se concentra en la región perinuclear.

del núcleo y se concentra en la región perinuclear, en un proceso dependiente de la quinasa Plo1 (Bähler *et al.*, 1998a). La cepa mutante en esta quinasa, *plo1-1*, también presenta defectos en la localización del anillo. Si se modifica la señal de localización nuclear de Mid1, esta molécula se localiza en la región perinuclear de forma independiente de Plo1, pero es incapaz de corregir los defectos de localización del anillo de la cepa mutante *plo1-1*. Esto sugiere que esta quinasa tiene otras funciones relacionadas con el posicionamiento del anillo además de la regulación de la localización de Mid1 (Paoletti and Chang, 2000).

Otra quinasa necesaria para que la división tenga lugar en la región central de la célula es Pom1, que regula la posición donde se va a formar el septo ejerciendo una restricción espacial sobre Mid1 (Bähler and Pringle, 1998). En la cepa *pom1Δ*, Mid1 no se localiza sólo en la región perinuclear de la célula, sino que además se extiende hacia el polo de no crecimiento (Celton-Morizur *et al.*, 2006; Padte *et al.*, 2006). Esto hace que el anillo de actomiosina se ensamble en una zona más cercana al polo de no crecimiento. Estos datos demuestran que Pom1 regula la exclusión de Mid1 de los polos. Sin embargo, deben de existir mecanismos adicionales que excluyan a Mid1 del polo de crecimiento en las células *pom1Δ*.

Recientemente se ha demostrado que Mid1 interacciona con Cdr2 (Almonacid *et al.*, 2009). Cdr2 es una quinasa que promueve la mitosis a través de la fosforilación inhibidora de la tirosina quinasa Wee1 (Breeding *et al.*, 1998; Kanoh and Russell, 1998). Cdr2 se localiza, al igual que Mid1, en nódulos corticales en la zona media de la célula (Morrell *et al.*, 2004a), y participa en el anclaje del extremo N-terminal de Mid1 a esta región durante G2. La regulación negativa que ejercen los polos celulares sobre la localización de Mid1 en interfase requiere Cdr2 ya que en ausencia de esta quinasa, la señal de Mid1 se extiende hacia los polos de la célula (Almonacid *et al.*, 2009). De hecho se ha visto que Pom1 restringe la localización de Cdr2 a la zona media de la célula. Por tanto, Pom1 regula la posición del plano de división y la progresión del ciclo celular a través de la regulación negativa de Cdr2 (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009). Cdr2 se encuentra hiperfosforilada al sobreexpresar *pom1⁺*, e hipofosforilada en la cepa *pom1Δ*. Estos resultados indican que es posible que Cdr2 sea un sustrato directo de Pom1, aunque también podría ser que Pom1 actúe sobre Cdr2 de forma indirecta a través de otras quinasas (Martin and Berthelot-Grosjean, 2009; Moseley *et al.*, 2009).

5.2. Ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina

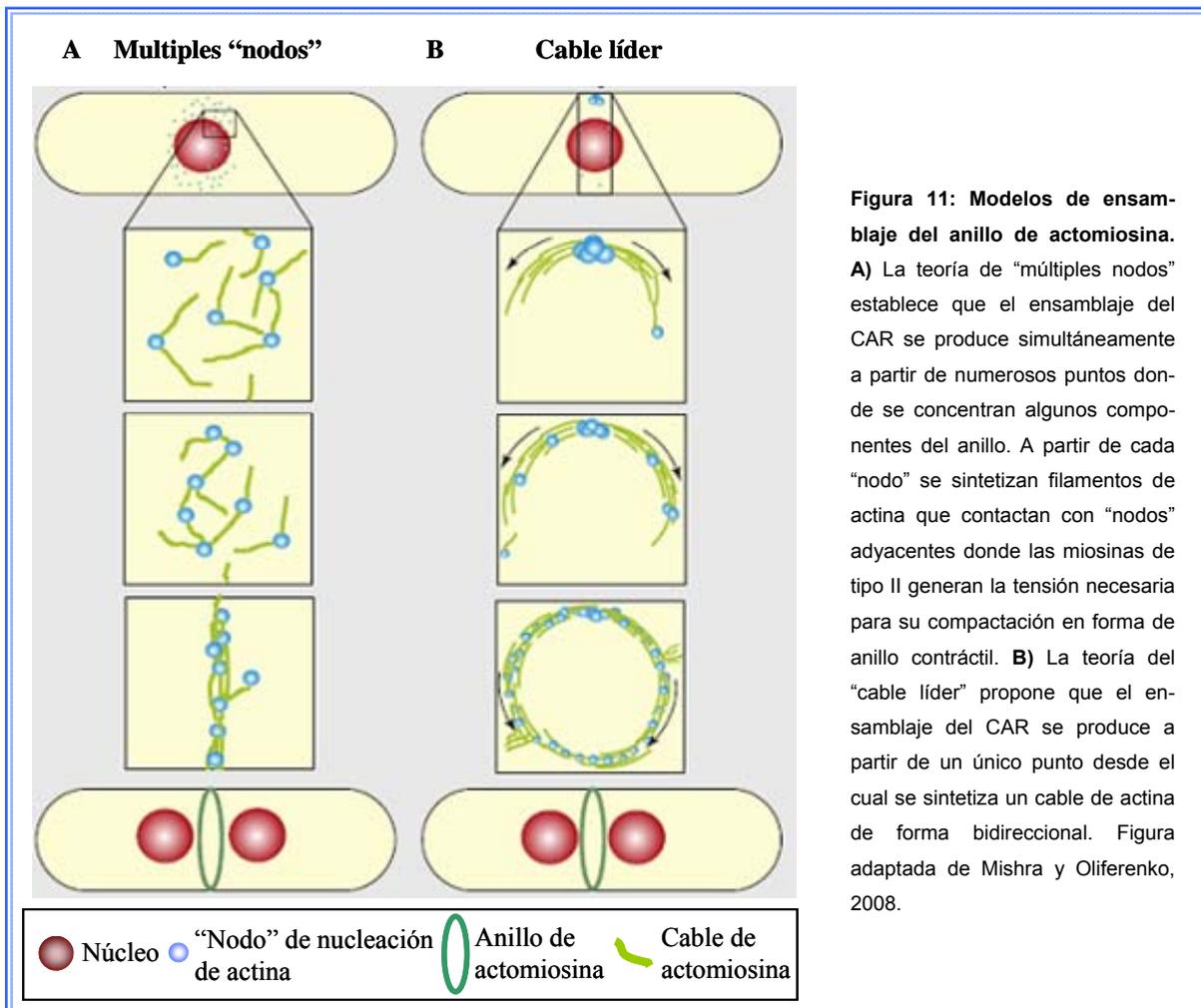
Aunque el mecanismo de selección del sitio de división es diferente entre células animales y levaduras, ambos se dividen usando un anillo contráctil de actomiosina. La mayoría de componentes del CAR se encuentran conservados: la actina y la miosina son compo-

nentes esenciales del anillo en todos los organismos. Además existe un alto grado de conservación en otros componentes no esenciales de esta estructura, aunque hay diferencias en cuanto al orden de llegada a la región de división y al orden de ensamblaje en el anillo (Guertin *et al.*, 2002a).

En *S. pombe* se han identificado numerosos componentes del CAR, algunos de ellos esenciales para su ensamblaje, como la formina Cdc12, la profilina Cdc3, la cadena pesada de miosina de tipo II Myo2 y su cadena ligera Cdc4, la proteína IQGAP Rng2, la tropomiosina Cdc8 y la proteína PCH Cdc15 (Wu *et al.*, 2006). Cdc15 es el miembro fundador de la familia de proteínas PCH (Pombe Cdc15 Homology) (Fankhauser *et al.*, 1995). Estas proteínas, importantes para el funcionamiento del citoesqueleto de actina, presentan un dominio FCH en su extremo N-terminal y uno o más dominios SH3 en su extremo C-terminal (Lippincott and Li, 2000). Cdc15 se requiere para la correcta formación del anillo. Su sobreexpresión en interfase induce la formación de anillos ectópicos de actina (Fankhauser *et al.*, 1995). Cdc15 recluta además al complejo Arp2/3 y a sus activadores, Wsp1 y Myo1, necesarios para la nucleación de actina en la región que flanquea al septo de división (Wolfe and Gould, 2005). Se ha comprobado que el complejo Arp2/3 no es necesario para la formación del anillo sino mas bien para procesos posteriores como la formación de nueva membrana y la síntesis del septo (Wu *et al.*, 2006).

En las etapas iniciales del ensamblaje, Mid1 interacciona con la miosina tipo II Myo2. La acumulación de Myo2 en la región de división y su unión a Mid1 depende de la defosforilación de la serina 1.444 de la miosina, que induce la liberación del estado de autoinhibición de su extremo C-terminal, permitiendo su interacción con Mid1 a través de esta región en la zona media de la célula (Motegi *et al.*, 2004).

Los siguientes pasos de formación del CAR son controvertidos ya que existen dos propuestas acerca de cómo se produce su ensamblaje (Figura 11) (Mishra and Oliferenko, 2008). Una de las teorías, defendida por T.D. Pollard y colaboradores, se basa en que la polimerización de actina del anillo se produce en múltiples lugares o “nodos” cuya localización viene determinada por Mid1 (Vavylonis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006). Llevando a cabo estudios de seguimiento *in vivo* mediante video-microscopía de pares de proteínas del anillo marcadas con proteínas fluorescentes, se ha demostrado que las primeras moléculas reclutadas en la región de división de forma dependiente de Mid1 son Myo2 junto con las cadenas ligeras de la miosina de tipo II, Cdc4 y Rlc1, y la proteína IQGAP, Rng2, que es esencial pero cuya función aún se desconoce. Estas proteínas se localizan formando una banda difusa de “nodos” alrededor de la zona de división (Wu and Pollard, 2005; Wu *et al.*, 2006). Posteriormente, Cdc12 y Cdc15 se incorporan a estos “nodos”. Cdc12 es la formina responsable de la polimerización de los cables de actina del anillo (Pelham and Chang,



2002). Una vez formados los “nodos”, Cdc12 y la profilina Cdc3 comienzan la formación de filamentos de actina. Estos filamentos contactan con “nodos” adyacentes, donde se unen a la miosina de tipo II que gracias a su actividad motora hace que los “nodos” se acerquen entre sí hasta fusionarse y formar un anillo compacto de actomiosina al inicio de la anafase (Vavylonis *et al.*, 2008; Wu *et al.*, 2006).

La segunda teoría que trata de explicar el ensamblaje del anillo se basa en que su formación se produce a partir de un punto progenitor formado por la miosina de tipo II (Hou and McCollum, 2002; Wong *et al.*, 2002) o por Cdc12-Cdc15 y Cdc3 (Carnahan and Gould, 2003; Chang *et al.*, 1997; Yonetani *et al.*, 2008). A partir de este único punto se produciría la síntesis bidireccional de un cable líder de actina que se extendería por el contorno de la célula definido por la proteína Mid1 (Kamasaki *et al.*, 2007).

5.3. Contracción del CAR

Una vez que se ha ensamblado el anillo se inicia su contracción. Una característica fundamental del CAR es que es una estructura muy dinámica. La contracción del anillo requiere

re un intercambio rápido de las moléculas que lo forman. De hecho, se ha calculado que se produce un intercambio activo de sus componentes cada minuto (Pelham and Chang, 2002). Esto indica que durante la contracción están ocurriendo simultáneamente tres procesos diferentes: Ensamblaje, mantenimiento (o estabilización) y desensamblaje de sus componentes.

En el caso de la actina, esto implica la polimerización y despolimerización activa de los filamentos de actina. Se ha descrito que el anillo mantiene su anchura y la densidad de filamentos durante la contracción (Schroeder, 1972) y para que esto sea posible se tiene que producir un desensamblaje neto de actina. De hecho, los filamentos de actina de un anillo en contracción son más cortos que los de un anillo recién formado (Kamasaki *et al.*, 2007).

En el caso de las miosinas, en células animales es necesaria su fosforilación para que se produzca la contracción del anillo. En este proceso interviene la GTPasa RhoA que activa a la quinasa ROCK, la cual a su vez activa a la miosina de tipo II directamente, fosforilando a la cadena ligera reguladora (MLC) en una serina conservada, e indirectamente, inactivando a una fosfatasa de esta miosina. La fosforilación de MLC libera a la miosina de tipo II de su estado de autoinhibición, permitiendo que se active su función motora necesaria para la contracción del anillo. RhoA también interviene en la activación de las forminas encargadas de la polimerización de actina del anillo favoreciendo su liberación del estado de autoinhibición en el que se encuentran (Figura 9) (Glotzer, 2005; Piekny *et al.*, 2005).

En *S. cerevisiae* las miosinas no parecen ser esenciales en el proceso de división ya que la cepa mutante afectada en Myo1, la única miosina de tipo II de esta levadura, es viable y es capaz de dividirse aunque presenta defectos en el proceso de citocinesis (Bi *et al.*, 1998; Wolfe and Gould, 2005).

En *S. pombe* se ha demostrado que la proteína Rng3 participa en el plegamiento de las miosinas de tipo II y estimula la actividad motora y su capacidad de deslizarse sobre los filamentos de actina, lo que sugiere que podría estar implicada en la activación de la contracción del anillo (Lord *et al.*, 2008). Además recientemente se ha visto que la quinasa Pak1/Shk1 fosforila a la cadena ligera reguladora de la miosina de tipo II Rlc1 inhibiéndola, de esta forma se impide que la citocinesis tenga lugar antes de que se produzca la segregación del material genético (Loo and Balasubramanian, 2008). Como se ha mencionado en el apartado 4.3.6., Pak1/Shk1 es un efector de la GTPasa Cdc42, sin embargo se desconoce si esta GTPasa o alguna otra están implicadas en la regulación de la actividad de las miosinas de tipo II.

Cdc42 se localiza en la región de división durante la citocinesis y esta localización es dependiente de Hob3 (Coll *et al.*, 2007). Hob3 es una proteína con un dominio BAR cuya delección origina un retraso en la velocidad de contracción del anillo de actomiosina, lo que

probablemente es la causa del aumento del número de células septando que se observa en la cepa *hob3Δ*. La ausencia de Cdc42 de la zona de división en la cepa carente de Hob3 puede ser la causa del retraso en la velocidad de contracción del CAR que presenta esta cepa. De hecho, se ha propuesto que Cdc42 participaría en la contracción del anillo de actomiosina regulando la polimerización de actina necesaria para este proceso a través del complejo Arp2/3 (Coll *et al.*, 2007).

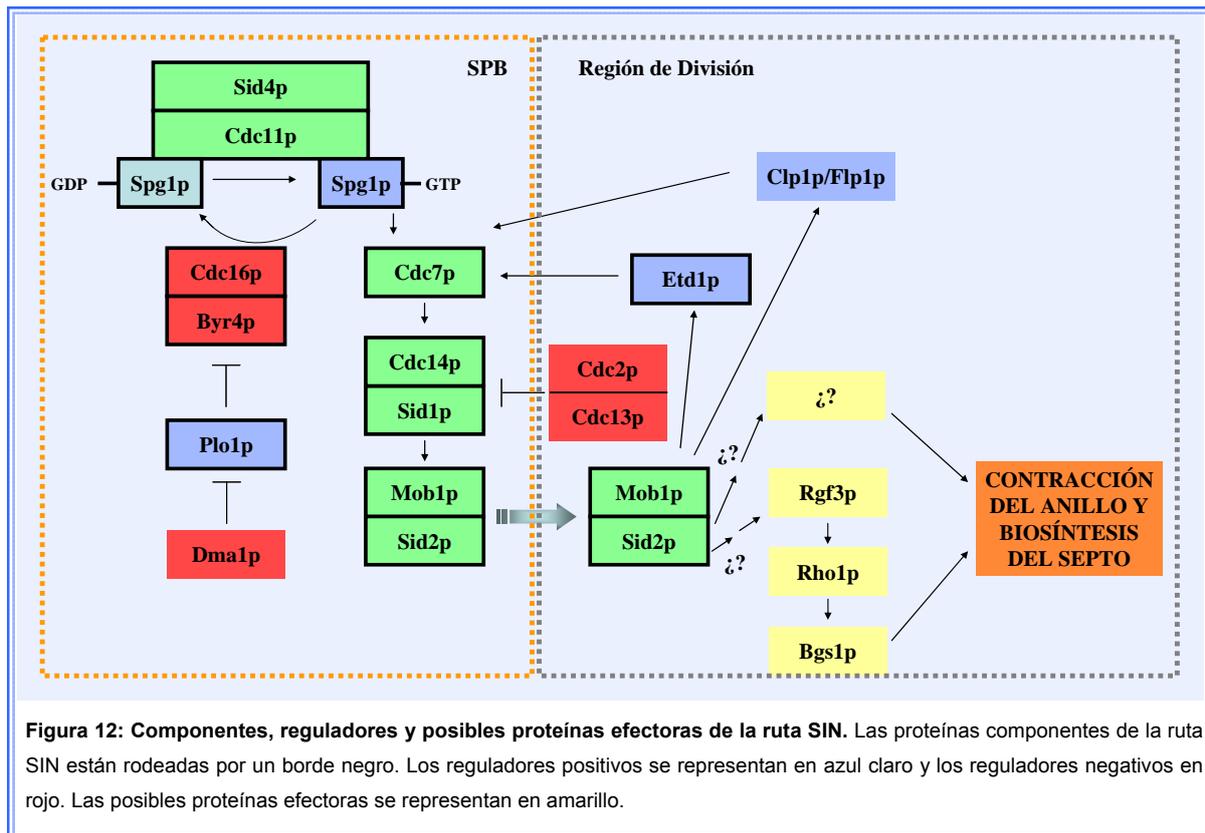
Otra proteína que interviene en la estabilización del CAR durante su contracción es Chs2, una proteína transmembrana que interacciona con Myp2. Chs2 interviene en el mantenimiento de la integridad estructural del anillo de actomiosina durante las últimas etapas del proceso de contracción (Martín-García and Valdivieso, 2006).

Aunque el anillo de actomiosina ya está formado al comienzo de la anafase, su contracción y la formación del septo sólo se producen cuando los núcleos se han separado y el huso mitótico se desensambla. Por lo tanto, se requiere una estricta coordinación de ambos procesos para asegurar el reparto equitativo de material celular y genético entre las células hijas (Krapp *et al.*, 2004; Simanis, 2003). En *S. pombe*, ésta es la función de una cascada de señalización denominada SIN (Septation Initiation Network) que coordina la finalización de la mitosis con el proceso de contracción del anillo y la síntesis del septo.

5.3.1. La ruta SIN

La ruta SIN está formada por una serie de proteínas adaptadoras, un módulo de GTPasas y una cascada de quinasas, localizadas principalmente en el SPB y algunas de ellas en la región de división (Figura 12). Cdc11 y Sid4 son las proteínas adaptadoras que permiten el anclaje de las proteínas de la ruta al SPB (Morrell *et al.*, 2004b). La GTPasa Spg1 se encuentra unida al SPB (Schmidt *et al.*, 1997) junto con el complejo Cdc16-Byr4 que actúa como GAP de esta GTPasa inactivando la ruta e impidiendo que se active la cascada de quinasas formada por Cdc7, Sid1-Cdc14 y Sid2-Mob1 (Furge *et al.*, 1998). El complejo Cdc16-Byr4 se disocia del SPB al principio de la mitosis, permitiendo la activación de Spg1. Esto hace que Cdc7 sea reclutada a ambos SPB, desapareciendo de uno de ellos al comienzo de la anafase B, cuando los núcleos empiezan a separarse. Esta asimetría se debe a que en uno de los SPB, Spg1 es inactivada por el complejo Cdc16-Byr4. Cdc7 recluta a su vez a Sid1 y a su proteína reguladora Cdc14, que activan al complejo Sid2-Mod1 promoviendo su translocación desde el SPB a la región del septo al final de la anafase. Se cree que Sid2-Mod1 genera la señal que desencadena la contracción del anillo y la síntesis del septo (Krapp *et al.*, 2004; Simanis, 2003).

Existen cepas mutantes en las que la ruta SIN se encuentra inactivada, como son las cepas que presentan pérdida de función de Spg1, de Cdc11, de Sid4 o de cualquiera de las



quinasas de la ruta o de sus proteínas asociadas. En estas cepas, el anillo de actomiosina se forma correctamente pero no se contrae y termina por desensamblarse, de tal manera que no se van a formar septos. Sin embargo, las células siguen llevando a cabo la mitosis y el crecimiento polar, por lo que se originan células alargadas y con varios núcleos. Por el contrario, las cepas mutantes del complejo GAP en las que la ruta está permanentemente activa, forman múltiples septos situados al azar en una sola ronda de mitosis (Krapp *et al.*, 2004; Simanis, 2003).

Hasta muy recientemente (Cortés and McCollum, 2009) no se había descrito ninguna proteína con actividad GEF de la GTPasa Spg1, por lo que no se sabía cómo se activa esta GTPasa. Parece que la proteína Etd1 (Daga *et al.*, 2005) activa a Spg1. Cuando el huso mitótico se ha alargado, Spg1 entra en contacto con Etd1 en los polos celulares, de esta forma se inicia la citocinesis en anafase tardía (Cortés and McCollum, 2009). Además se ha demostrado que la quinasa Plo1 es reclutada al SPB y activa la ruta SIN (Tanaka *et al.*, 2001). Un regulador negativo de la ruta es la proteína Dma1 que se une al SPB a través de Sid4 e impide la localización de Plo1 en esta estructura (Guertin *et al.*, 2002b), lo que apoya la teoría de que Plo1 es un regulador positivo de la ruta SIN.

Hasta ahora no se han identificado dianas directas de la ruta SIN que puedan promover la contracción del anillo. Un posible candidato es la subunidad catalítica de la actividad

$\beta(1,3)$ -glucán sintasa, Bgs1, ya que su localización en la zona media depende de la activación de la ruta SIN (Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002). También es posible que la subunidad reguladora del complejo β -glucán sintasa, Rho1, o su GEF Rgf3, que participa en citocinesis, puedan ser regulados por el SIN ya que su sobreexpresión suprime los defectos de la cepa mutante *sid2-250* (Jin *et al.*, 2006; Tajadura, 2007).

La ruta SIN promueve la contracción del anillo de actomiosina, sin embargo no se le habían asignado funciones en el proceso de formación de esta estructura ya que las cepas mutantes de la ruta SIN son capaces de ensamblar anillos. Por otra parte, la sobreexpresión de Spg1 induce la formación del CAR en interfase lo que sugiere que la ruta SIN pueda ejercer alguna función en este proceso (Schmidt *et al.*, 1997). De hecho recientemente se ha descrito que la activación de la ruta SIN promueve la desfosforilación de Cdc15, paso necesario para que se acumule en la región de división y forme parte del anillo contráctil (Hachet and Simanis, 2008).

La regulación de la ruta SIN es fundamental para la coordinación de la citocinesis con el ciclo celular. La progresión del ciclo está regulada por la actividad de la quinasa Cdc2, que en cada fase del ciclo se encuentra unida a una ciclina diferente. La entrada en mitosis depende de la interacción de Cdc2 con la ciclina Cdc13, sin embargo, para que se produzca la activación de la ruta SIN y la contracción del anillo es necesaria la inactivación de este complejo CDK-ciclina. Así, la formación del septo no se solapa con la mitosis (Balasubramanian *et al.*, 2004). La pérdida de actividad CDK hace que se produzca la unión de Sid1-Cdc14 al SPB donde Spg1 está activa, esto promueve la translocación de Sid2-Mob1 del SPB a la región de división, de esta forma Sid1-Cdc14 actúa como sensor de ciclo para activar la ruta SIN después de la separación nuclear (Guertin *et al.*, 2000).

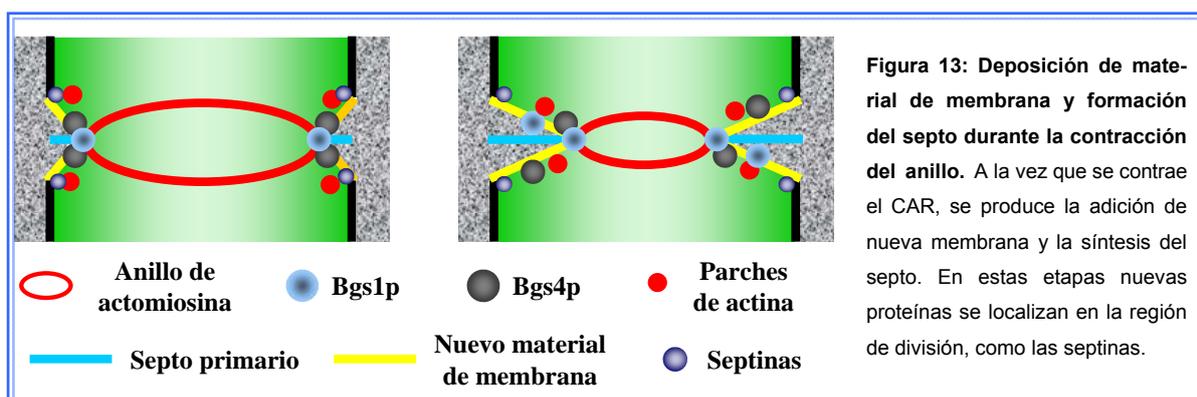
Al analizar las cepas mutantes de Bgs1 *cps1-191* y *cps1-N12* a temperatura restrictiva, se observó que eran capaces de terminar la mitosis aunque el siguiente ciclo celular se detenía en G2 manteniendo el anillo de actomiosina formado pero sin que llegase a contraerse. Este fenotipo es contrario al observado en los mutantes de la ruta SIN, que a pesar de no poder contraer el anillo de actomiosina y sintetizar septos de división, sufren varias rondas de mitosis llegando a acumular muchos núcleos. Esto indica la existencia de un "checkpoint" de citocinesis que provoca una parada del ciclo celular que asegura que no se produzca una nueva ronda de mitosis sin completarse antes la división celular y mantiene el anillo de actomiosina estable para retomar la división cuando las condiciones sean favorables (Le Goff *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000b). Este punto de control requiere que la ruta SIN sea funcional. Además la parada del ciclo tampoco se produce en cepas con mutaciones en la quinasa Wee1 o en Cdc2, lo que sugiere que la fosforilación que inactiva Cdc2 es necesaria para la parada del ciclo (Liu *et al.*, 2000b). El "checkpoint" de citocinesis también

depende de actina ya que el tratamiento de los mutantes *cps1-191* y *cps1-N12* con drogas que despolimerizan la actina hace que no se produzca la parada. Por otra parte, se ha comprobado que la fosfatasa Clip1/Flp1 también participa en la interrupción del ciclo. Esta fosfatasa contribuye a reducir la actividad de Cdc2 al final de la mitosis, promoviendo su fosforilación mediante la inactivación y degradación de la fosfatasa Cdc25 (Wolfe and Gould, 2004). Además, Clip1/Flp1 activa la ruta SIN ya que en la cepa mutante *cps1-191* a temperatura restrictiva, la localización de Cdc7 y Sid1 depende de Clip1/Flp1 (Trautmann *et al.*, 2001). Esto permite que el anillo de actomiosina permanezca estable y no se desensamble. Sin embargo no se conoce sobre qué componentes de la ruta SIN actúa Clip1/Flp1 para mantenerla activa e inducir la parada en G2 (Mishra *et al.*, 2004).

5.4. Deposición de material de membrana y síntesis del septo de división.

Durante el proceso de citocinesis se va a ensamblar el septo de división a la vez que se produce la adición de nueva membrana plasmática de forma coordinada a la contracción del anillo de actomiosina, lo que genera las barreras físicas que separan a las dos células hijas (Figura 13). Algunos resultados indican que la formación del septo de división regula la contracción del anillo ya que ésta se encuentra bloqueada en presencia de Brefeldina A, que inhibe el transporte de vesículas y la síntesis de pared, y en presencia de mutaciones en las enzimas necesarias para la síntesis de pared celular (Balasubramanian *et al.*, 2004).

Se ha descrito la existencia de dominios de membrana plasmática ricos en esteroides (ergosterol, colesterol) y esfingolípidos, denominados “lipid rafts”, que se concentran en los polos en interfase y en la zona media durante la anafase (Wachtler and Balasubramanian, 2006). Esta localización es sensible a Brefeldina A, lo que indica que es necesario que la ruta secretora sea funcional (Rajagopalan *et al.*, 2003). La formación de estos dominios requiere la proteína Cdc15, que, a través de Myo1, podría promover su formación (Takeda and Chang, 2005). Los “lipid rafts” son esenciales para mantener la posición y la estructura del anillo durante la citocinesis, ejerciendo una restricción espacial en la localización de la maquinaria de división en el ecuador de la célula e impidiendo la difusión de proteínas por



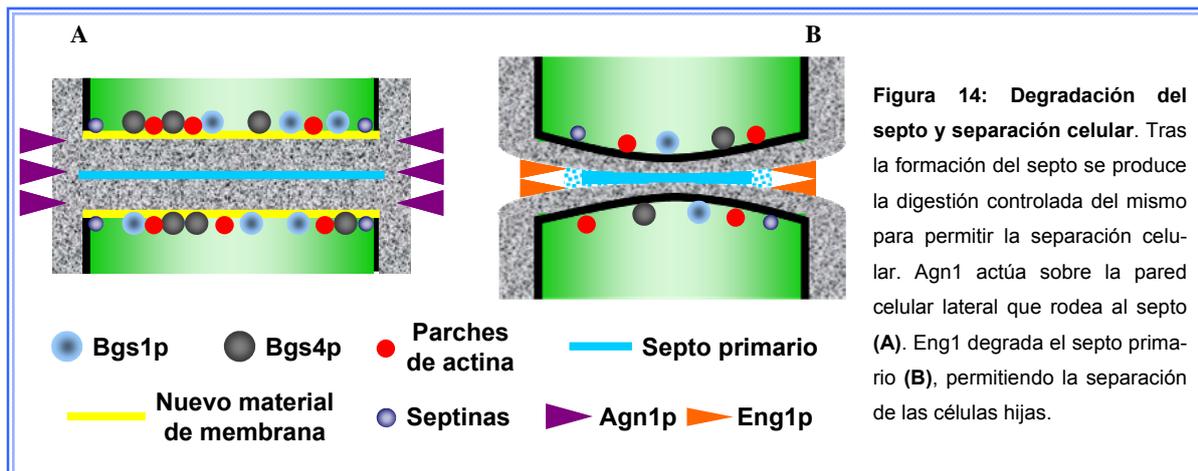
la membrana. También son importantes para el anclaje de las vesículas secretoras encargadas de la adición de nueva membrana (Wachtler and Balasubramanian, 2006; Wachtler *et al.*, 2003).

Al mismo tiempo que se contrae el anillo de actomiosina y se deposita nuevo material de membrana, tiene lugar la síntesis del septo primario (formado por $\beta(1,3)$ -glucano lineal), y del septo secundario (formado por $\beta(1,3)$ -glucano ramificado) que se deposita a ambos lados del primario. Bgs1 es la enzima encargada de la síntesis del septo primario (Cortés *et al.*, 2007), mientras que Bgs4 se ha propuesto como la principal subunidad catalítica de la β GS responsable de la síntesis del septo secundario (Cortés *et al.*, 2005). La localización de Bgs1 y Bgs4, tanto en los polos como en la región media, depende del citoesqueleto de actina (Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2002; Mulvihill *et al.*, 2006). Además Bgs1 necesita que la ruta SIN se active para cambiar su localización de los polos a la región media al comienzo de la división celular (Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005). Al finalizar el proceso de citocinesis, Bgs1 y Bgs4 desaparecen de la zona media y pasan a localizarse en el polo antiguo donde comienza el crecimiento. En la cepa mutante *cdc16-116* que presenta la ruta SIN hiperactivada, Bgs1 se mantiene localizada en muchos de los septos que se han formado, lo que indica que la inactivación del SIN también es necesaria para que Bgs1 desaparezca del septo y se relocalice en los polos. Esto no ocurre con Bgs4 (Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005; Mulvihill *et al.*, 2006).

5.5. Separación celular

Una vez formado el septo, es necesaria su digestión controlada para permitir la separación de las dos células hijas. El estudio de diversas cepas mutantes ha permitido implicar a numerosas proteínas en este proceso: Glucanasas, septinas y Mid2, proteínas del complejo del exocisto, Rho4, la ruta de MAPK Mkh1-Pek1/Shk1-Pmk1/Spm1, la fosfatasa Ppb1, Scw1, etc.

En la digestión del septo participan al menos dos enzimas con actividad glucanasa: La α -glucanasa, Agn1 (Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005), y la β -glucanasa, Eng1 (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Agn1 es necesaria para degradar la pared celular lateral que rodea al septo, lo que permite que Eng1 digiera el β -glucano del septo primario (Figura 14). Agn1 y Eng1 son secretadas al medio de cultivo y se localizan exclusivamente en la región del septo. Las cepas mutantes que carecen de estas enzimas presentan un fenotipo de células encadenadas. A pesar de estos defectos en separación, estas cepas no detienen su crecimiento y acaban resolviendo los septos y separándose, lo que sugiere que otra u otras glucanasas menos eficientes podrían realizar esta función, o bien que la presión de turgencia ejercida por las células haga que el septo se desgarre.



La expresión de las glucanasas es cíclica y está regulada por el factor de transcripción Ace2, presentando un pico de expresión momentos antes de la septación. Ace2 regula además la expresión de otros genes relacionados con la división celular (Bähler, 2005).

En *S. cerevisiae*, Ace2 controla también la expresión de las glucanasas implicadas en la separación celular. En esta levadura, la expresión de Ace2 está controlada por los factores de transcripción Fkh1 y Fkh2. En *S. pombe* ocurre algo similar ya que Sep1, un factor de transcripción de la familia de Fkh1 y Fkh2, regula la expresión de Ace2 y de otros genes que participan en la citocinesis. Las cepas mutantes *ace2Δ* y *sep1Δ* presentan defectos similares, con células encadenadas y ramificadas lo que indicaría la existencia de una cascada transcripcional implicada en el proceso de separación celular (Alonso-Núñez *et al.*, 2005).

Otras proteínas que desempeñan funciones importantes durante la separación celular son las septinas y Mid2. Estas proteínas son importantes para la localización de Agn1 y Eng1 en la zona del septo. En células que carecen de Mid2, las glucanasas se localizan de forma difusa a lo largo del septo, lo que podría ser la causa del retraso en separación y la acumulación de células encadenadas que presenta la cepa *mid2Δ* (Martín-Cuadrado *et al.*, 2005).

El complejo del exocisto en *S. pombe* también interviene en la separación celular. El exocisto es un complejo multiproteico conservado a lo largo de la evolución, implicado en el transporte de vesículas derivadas del aparato de Golgi a sitios específicos y en su fusión a la membrana (Hsu *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2004). Este complejo es necesario para que se produzca la abscisión de las dos células hijas en organismos superiores (McCollum, 2005). En *S. pombe* el exocisto está formado por, al menos, cinco subunidades que interactúan entre sí: Sec6, Sec8, Sep10, Sep15 y Exo70 (Wang *et al.*, 2002). Excepto Exo70, el resto de componentes del complejo son esenciales. Todas estas proteínas se localizan en los polos en interfase y en la zona media durante la división celular, donde forman un anillo

que se desdobra al comenzar la contracción del CAR. Esta localización es dependiente de la formación del anillo de actomiosina e independiente de la ruta exocítica (Wang *et al.*, 2002). A diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, donde las cepas con mutaciones en genes que codifican componentes del exocisto poseen defectos en polaridad celular (Hsu *et al.*, 1999), en *S. pombe* las cepas con defectos en la función del exocisto crecen de forma polarizada y sintetizan el septo de división, pero son defectuosas en su degradación y en la separación celular (Wang *et al.*, 2002). La cepa mutante termosensible *sec8-1* da lugar a células encadenadas con septos engrosados. Además, acumula vesículas de aproximadamente 100 nm de diámetro en zonas cercanas a la región del septo, lo que sugiere que a pesar de que las vesículas son transportadas de forma polarizada, existe un defecto en su fusión con la membrana plasmática. Esto indicaría que el complejo del exocisto podría estar implicado en el transporte de proteínas hidrolíticas que participan en la degradación del septo. De hecho, se ha demostrado que la localización de Agn1 y Eng1 depende del complejo del exocisto (Martín-Cuadrado *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado en el apartado 4.3.4., la eliminación de Rho4 también provoca defectos en la separación celular. Esta GTPasa regula la secreción polarizada de Agn1 y Eng1, especialmente a altas temperaturas (Santos *et al.*, 2005).

La cascada de MAPK Mkh1-Pek1/Shk1-Pmk1/Spm1 también participa de algún modo en el proceso de citocinesis de *S. pombe*, ya que las cepas mutantes en esta ruta presentan defectos en separación y sus células poseen septos y paredes celulares engrosados bajo determinadas condiciones de estrés (Loewith *et al.*, 2000; Sengar *et al.*, 1997; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997). Esto puede ser debido a un aumento de la actividad biosintética del septo y la pared celular o a un fallo en la producción o transporte de las enzimas líticas implicadas en la separación (Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997).

El gen *ppb1*⁺, que codifica una fosfatasa similar a la calcineurina de células de mamíferos, no es esencial para la levadura de fisión, aunque su ausencia provoca un aumento en el número de células septando y la aparición de células ramificadas (Yoshida *et al.*, 1994). Ppb1 está implicada en otros procesos como polaridad celular, conjugación o posición del SPB y del núcleo (Yoshida *et al.*, 1994).

Otra proteína cuya carencia provoca defectos en separación, originando células multi-septadas y septos engrosados es Scw1p que contiene un dominio de unión a ARN en su extremo C-terminal. Cepas con mutaciones de la ruta SIN que no forman septos, combinados con la delección del gen *scw1*⁺ dan lugar a un fenotipo similar al de las células *scw1*Δ, lo que sugiere que Scw1p actúa en sentido contrario a la ruta SIN, como regulador negativo de la síntesis del septo, aunque se desconoce el mecanismo a través del cual actúa (Karagiannis *et al.*, 2002).

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue la identificación de nuevas proteínas efectoras o reguladoras de las vías de señalización de las GTPasas de la familia Rho. Para llevar a cabo este objetivo nos planteamos:

1. El estudio de la ORF SPBC4F6.12, que codifica una proteína homóloga a Pxl1 de *S. cerevisiae* y a la paxilina de células animales.
2. Determinar la posible relación de SpPxl1 con las GTPasas de la familia Rho, Rho1 y Cdc42.
3. Estudiar de las funciones de Pxl1 en *S. pombe*.

RESULTADOS

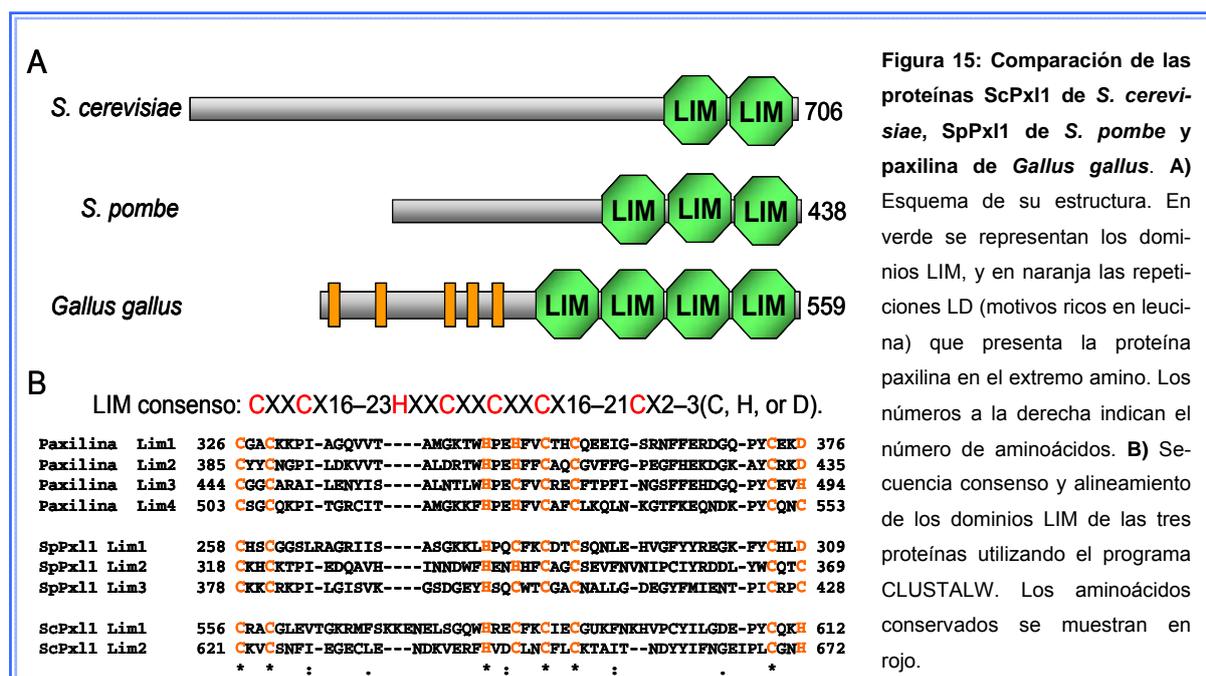
APARTADO 1: RELACIÓN DE PXL1 CON LA GTPASA RHO1

1.1. Búsqueda de proteínas relacionadas con las GTPasas de la familia Rho en *S. pombe*

En *S. cerevisiae* se ha descrito una proteína, denominada ScPxl1, homóloga a la proteína paxilina de células animales, una molécula adaptadora presente en los puntos de adhesión focal. ScPxl1 se aisló como supresor del fenotipo de termosensibilidad de cepas mutantes de *cdc42* con defectos en la localización del exocisto. Sin embargo se ha demostrado que esta proteína no interacciona con Cdc42 y sí lo hace con la GTPasa Rho1 a la cual regula negativamente (Gao *et al.*, 2004).

En *S. pombe* existe una proteína homóloga a ScPxl1 codificada por el locus SPBC4F6.12. Esta ORF codifica una proteína de 438 aminoácidos y un peso molecular aproximado de 49 kDa. Esta proteína presenta un extremo N-terminal sin ningún dominio aparente y tres dominios LIM en la región C-terminal. La proteína de *S. cerevisiae*, ScPxl1, presenta dos dominios LIM y la paxilina de células animales cuatro. El extremo N-terminal es diferente en las proteínas de estas tres especies. Además la paxilina tiene varios dominios LD (regiones ricas en leucina) en el extremo N-terminal (figura 15A).

Los dominios LIM son dominios de interacción proteína-proteína identificados por primera vez en las proteínas de *C. elegans* *lin-11*, *isl-1* y *mec-3*, de donde procede su nombre. Están formados por dos dedos de zinc, cada uno de los cuales coordina un ion zinc, separados por dos aminoácidos, de acuerdo con la secuencia consenso [CXXCX₁₆₋₂₃HXX(H/C)]-XX-[CXXCX₁₆₋₂₁CXX(D/H/C)] (Freyd *et al.*, 1990; Michelsen *et al.*, 1993). Estos dominios

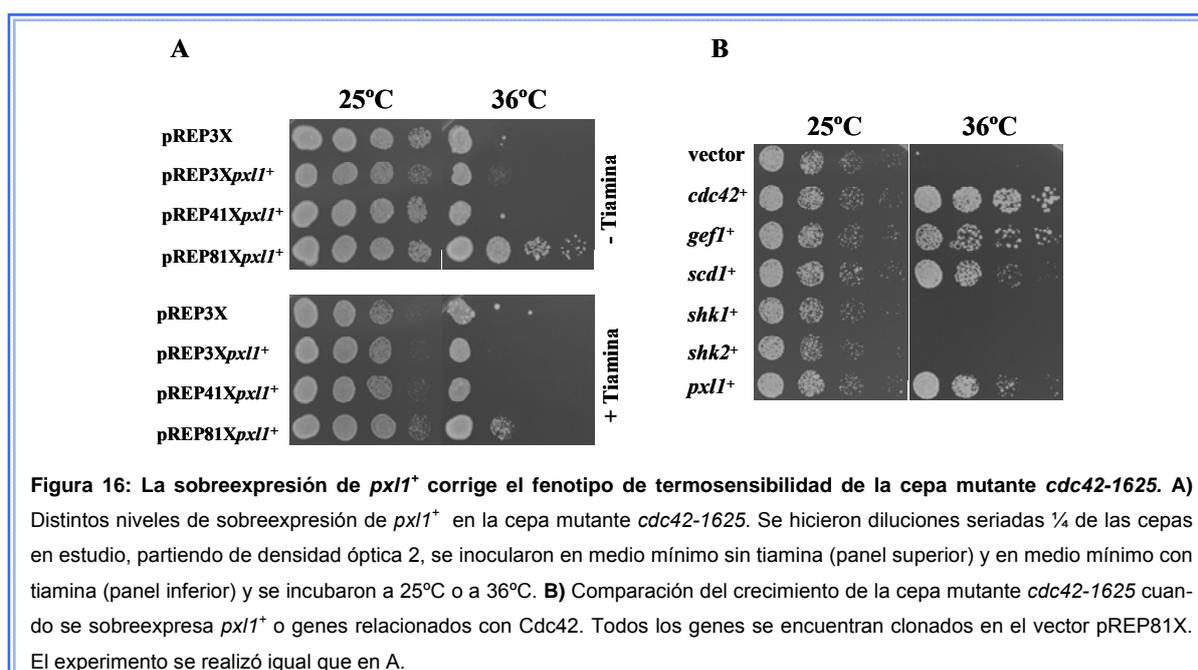


forman parte de múltiples proteínas que participan en muy variados procesos, como factores de transcripción, protooncogenes y proteínas que intervienen en la regulación del citoesqueleto (Michelsen *et al.*, 1993). En *S. pombe*, además de en Pxl1, estos dominios están presentes en las proteínas GAP Rga1, Rga3 y Rga4, con la diferencia de que en estas moléculas los dominios LIM se encuentran situados en el extremo N-terminal.

Si llevamos a cabo un alineamiento de los dominios LIM de las proteínas de *S. cerevisiae*, *Gallus gallus* y *S. pombe* observamos que los aminoácidos consenso se encuentran conservados (figura 15B). El porcentaje de identidad de estas proteínas es de un 23% entre SpPxl1 y la paxilina de gallo y de un 18% entre SpPxl1 y ScPxl1. Cuando comparamos únicamente la región C-terminal donde se encuentran los dominios LIM el porcentaje de identidad es de un 35% entre SpPxl1 y la paxilina y de un 26% entre SpPxl1 y ScPxl1.

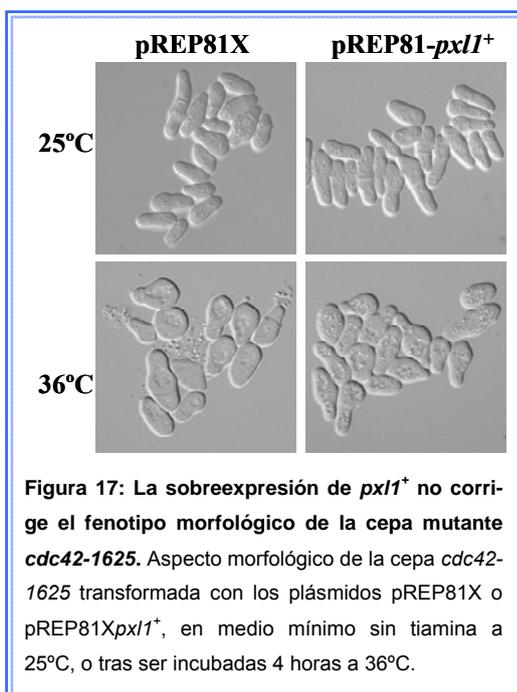
1.2. La sobreexpresión de *pxl1*⁺ corrige el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-1625*

Como la sobreexpresión de *PXL1* en *S. cerevisiae* corrige los defectos de crecimiento de cepas mutantes de *cdc42*, quisimos comprobar si el gen de *S. pombe* era capaz de realizar la misma función en cepas mutantes de este organismo afectadas en esta GTPasa. Por ello, clonamos *pxl1*⁺ y observamos si era capaz de corregir los defectos de una colección de cepas mutantes termosensibles afectadas en *cdc42*⁺ de la que disponemos en el laboratorio (Martin *et al.*, 2007). Transformamos las cepas mutantes *cdc42-879*, *cdc42-1024* y *cdc42-1625* con los plásmidos pREP3X*pxl1*⁺, pREP41X*pxl1*⁺ y pREP81X*pxl1*⁺, en los cuales los genes se encuentran bajo el control del promotor *Pnmt1* reprimible por tiami-



na y presentan diferentes niveles de expresión en función de la secuencia de la caja TATA (ver apartado 6.1.2. de Materiales y Métodos). Observamos que sólo la sobreexpresión más suave de *pxl1*⁺ era capaz de corregir el crecimiento de la cepa *cdc42-1625* a 36°C (figura 16A). Esta cepa presenta defectos de crecimiento, de morfología, de formación de cables de actina y de secreción (Martin *et al.*, 2007). Como se ha descrito previamente en nuestro laboratorio, los defectos de crecimiento de esta estirpe son suprimidos por la sobreexpresión de *cdc42*⁺ o de sus activadores GEF *scd1*⁺ y *gef1*⁺, pero no por la sobreexpresión de sus dos efectores conocidos, *shk1*⁺ y *shk2*⁺ (Martin *et al.*, 2007). Por ello quisimos comparar los efectos que la sobreexpresión de *pxl1*⁺ genera en esta cepa mutante, con los efectos de la sobreexpresión de estos genes relacionados con Cdc42, todos ellos clonados en el vector pREP81X. Como se muestra en la figura 16B *pxl1*⁺ es capaz de rescatar el crecimiento de la cepa mutante a 36°C en los mismos niveles que lo hace la sobreexpresión de *scd1*⁺ o de *gef1*⁺, que codifican los activadores de Cdc42.

Una vez visto que *pxl1*⁺ suprime el fenotipo de termosensibilidad de la cepa *cdc42-1625*, quisimos comprobar si era capaz de suprimir también su fenotipo morfológico. Esta cepa mutante presenta defectos morfológicos tanto a temperatura permisiva como a temperatura restrictiva. A 25°C se observan células con los polos de crecimiento ligeramente más finos



y el ecuador celular ligeramente abombado. A 36°C estos defectos se ven agravados, apareciendo células mucho más engrosadas en la región central. Para observar el efecto de la sobreexpresión de *pxl1*⁺ sobre la morfología de las células *cdc42-1625*, transformamos esta cepa mutante con los plásmidos pREP81X o pREP81X*pxl1*⁺. A continuación cultivamos las células en un medio sin tiamina durante 16 horas para permitir la expresión de los plásmidos y observamos su fenotipo tanto a temperatura permisiva (25°C) como a temperatura restrictiva (36°C).

Como se observa en la figura 17 la cepa mutante transformada con el plásmido pREP81X*pxl1*⁺, presenta los mismos defectos morfológicos que la transformada con el plásmido pREP81X tanto a 25°C como a 36°C. Por tanto la sobreexpresión de *pxl1*⁺ no es capaz de corregir los defectos morfológicos de la cepa mutante *cdc42-1625*.

1.3. La eliminación *pxl1*⁺ da lugar a células con defectos en el proceso de citocinesis

Para estudiar la función de Pxl1, decidimos en primer lugar obtener cepas carentes de esta proteína. Para ello, la fase de lectura abierta del gen *pxl1*⁺ se sustituyó por la secuencia del gen *KanMX6* o del gen *ura4*⁺ en uno de los cromosomas de una cepa diploide, por si *pxl1*⁺ fuera esencial para la viabilidad celular, mediante la técnica de reemplazamiento génico en un solo paso descrita por Rothstein (Rothstein, 1983; Rothstein, 1991). Esta técnica consiste en transformar la estirpe deseada con un fragmento lineal de DNA al que denominamos “módulo de delección”, en el cual la región promotora y terminadora del gen

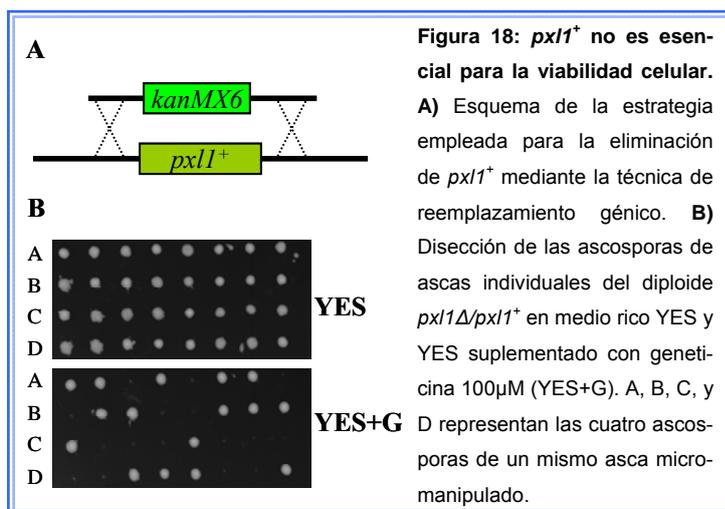


Figura 18: *pxl1*⁺ no es esencial para la viabilidad celular.

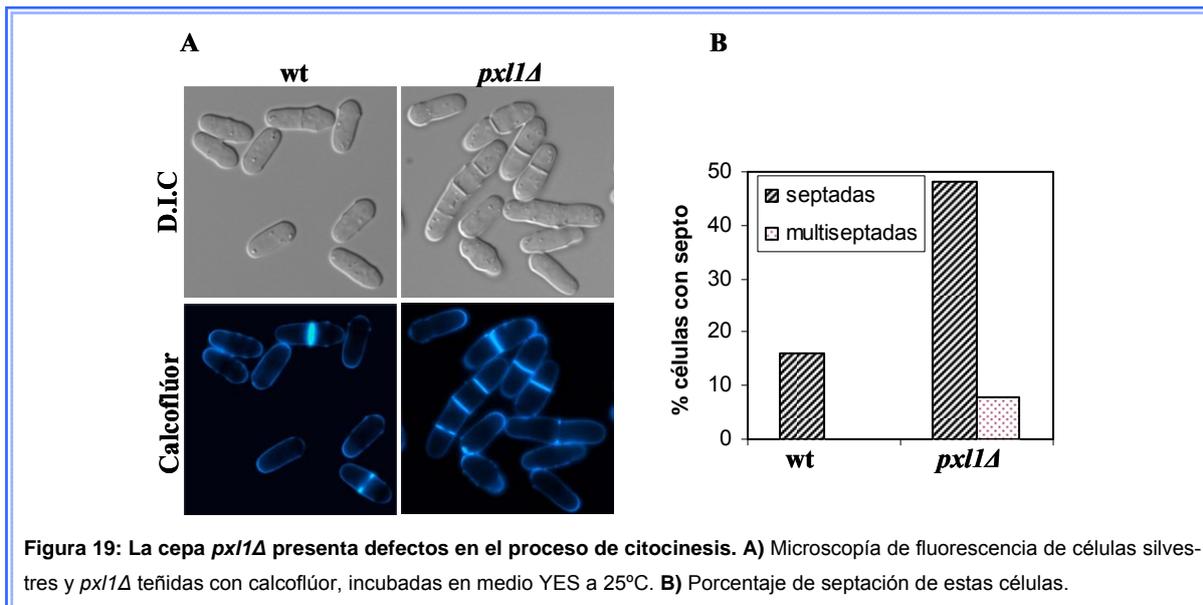
A) Esquema de la estrategia empleada para la eliminación de *pxl1*⁺ mediante la técnica de reemplazamiento génico. **B)** Disección de las ascasporas de ascas individuales del diploide *pxl1Δ/pxl1*⁺ en medio rico YES y YES suplementado con geneticina 100μM (YES+G). A, B, C, y D representan las cuatro ascasporas de un mismo asca micro-manipulado.

pxl1⁺ flanquean la secuencia codificante de un marcador de selección (*ura4*⁺ o *KanMX6*) del que carece la estirpe transformada. Este fragmento se integra en el genoma por recombinação homóloga sustituyendo la copia silvestre del gen (figura 18A). Los transformantes obtenidos se analizaron mediante PCR para comprobar que los módulos de delección se hubieran integrado correctamente en el locus *pxl1*⁺.

Una vez comprobado, se indujo la esporulación de la cepa heterocigótica diploide dando como resultado cuatro esporas viables, de las cuales dos presentaban el marcador de selección, resistencia a geneticina o eran prototofas para uracilo (figura 18B). Estos resultados indican que el gen *pxl1*⁺ no es esencial para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*.

Con el fin de analizar los posibles fenotipos de la cepa *pxl1Δ*, decidimos en primer lugar examinar su capacidad de crecimiento a diferentes temperaturas. Para ello realizamos un ensayo de crecimiento en medio YES agar utilizando la cepa haploide *pxl1Δ*, junto a una cepa silvestre como control. Tras el periodo de incubación observamos que no había diferencias observables en el crecimiento de las cepas a las distintas temperaturas analizadas (datos no mostrados). Por tanto la falta de Pxl1 no da lugar a defectos en el crecimiento de la levadura.

Para comprobar si la ausencia de Pxl1 causa algún defecto morfológico, observamos células *pxl1Δ* procedentes de un cultivo en medio YES líquido al microscopio. Detectamos un aumento en el número de células en septación (49%; n=200), comparado con las células silvestres (16%; n=200), y la aparición de células multiseptadas (8%; n=200) (figura 19). Además algunas células presentaban el septo desplazado o un engrosamiento ligero en la

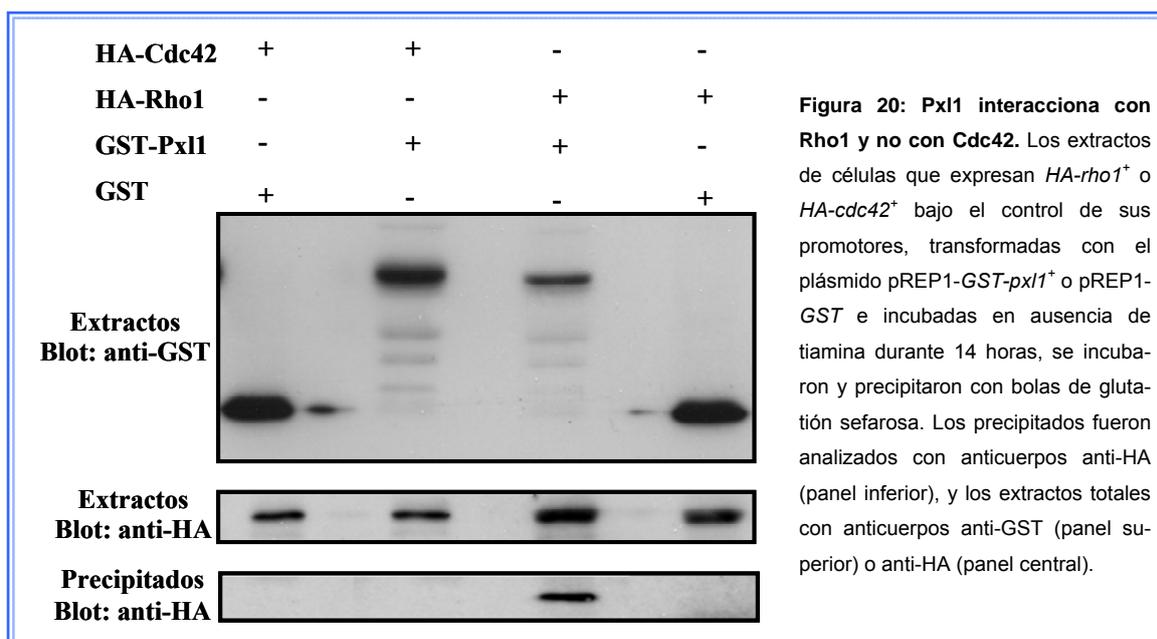


región central. Este dato sugiere que Pxl1 podría desempeñar alguna función durante el proceso de citocinesis.

1.4. Pxl1 interactúa con Rho1 y no con Cdc42

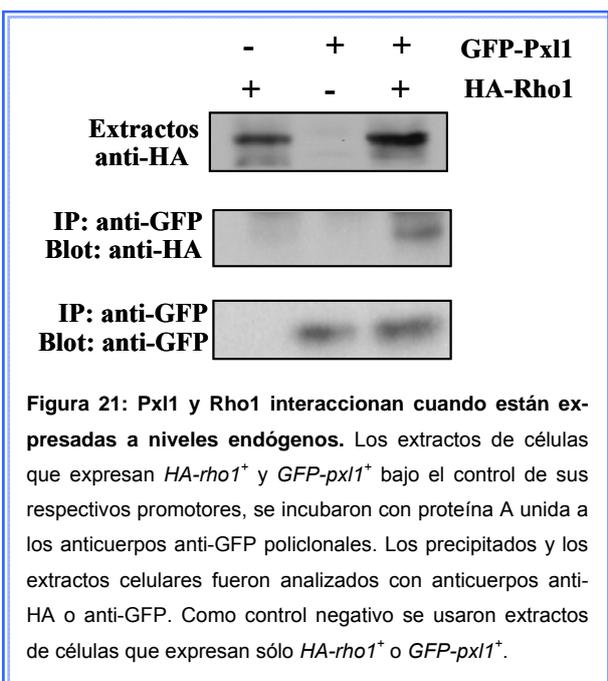
Como la sobreexpresión moderada de *pxl1*⁺ es capaz de corregir los defectos de crecimiento de la cepa mutante *cdc42-1625*, quisimos comprobar si existía una interacción física entre estas dos proteínas o si por el contrario, como ocurre en *S. cerevisiae*, Pxl1 es capaz de interactuar con la GTPasa Rho1 y no con Cdc42. Para ello se llevaron a cabo ensayos de “pull-down” con GST-Pxl1 en extractos obtenidos de cepas que expresan *HA-cdc42*⁺ o *HA-rho1*⁺ bajo el control de sus propios promotores, en las cuales la secuencia del epítipo HA se encuentra fusionada en fase al principio de la ORF (Arellano *et al.*, 1997; Coll *et al.*, 2007). Las cepas se transformaron con los plásmidos pREP1-GST o pREP1-GST-*pxl1*⁺ y se cultivaron en medio sin tiamina para permitir la expresión de los plásmidos durante 14 horas. Los extractos celulares se incubaron con bolas de sefarosa que llevan fusionado glutatión para unir las proteínas conjugadas a GST. Tras el periodo de incubación, las muestras se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Como se puede observar en la [figura 20](#), al revelar las membranas con anticuerpos anti-HA, se detectó HA-Rho1 en los extractos de la cepa que expresaba GST-*pxl1*⁺ y no en la que expresaba únicamente GST. No fuimos capaces de detectar HA-Cdc42 ni en la cepa que expresaba GST ni en la cepa que expresaba GST-*pxl1*⁺, lo que indicaría que Pxl1 interactúa de forma específica con Rho1.

Para confirmar estos resultados, realizamos experimentos de inmunoprecipitación en condiciones fisiológicas, evitando la sobreexpresión de Pxl1, utilizando cepas que expresan



HA-rho1⁺, *GFP-pxl1*⁺ o ambos genes bajo el control de sus respectivos promotores. Los extractos de dichas cepas se incubaron con anticuerpos policlonales anti-GFP. Tras realizar la inmunoprecipitación con bolas de proteína A-sefarosa, se realizaron ensayos de tipo “Western-blot” empleando anticuerpos anti-HA o anti-GFP para detectar la presencia de Rho1 y Pxl1 respectivamente, a partir de los inmunoprecipitados de los extractos celulares iniciales. GFP-Pxl1 sólo se detectó en los inmunoprecipitados y no en los extractos celulares

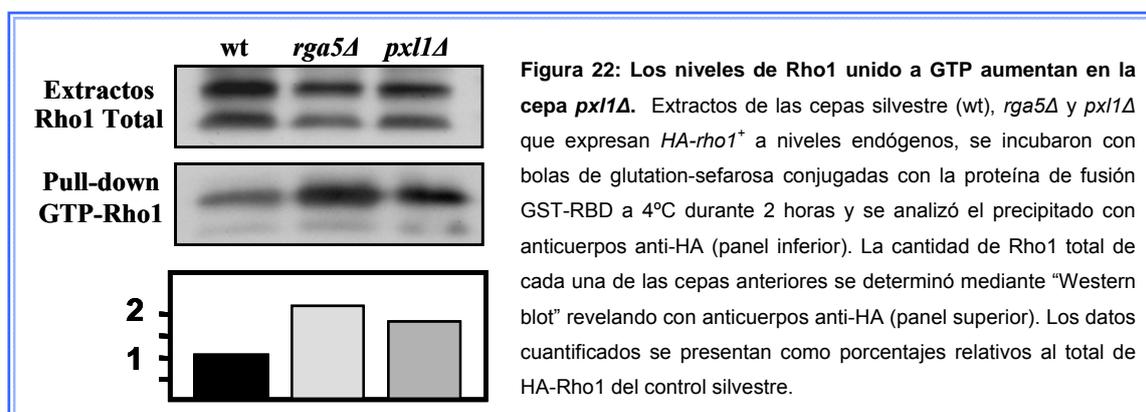
totales, esto puede deberse a su escasa abundancia en la célula. Como se muestra en la [figura 21](#), HA-Rho1 se detectó en los inmunoprecipitados procedentes de la cepa que porta ambas proteínas marcadas (HA-Rho1 y GFP-Pxl1), pero no en los procedentes de la cepa carente de GFP-Pxl1 usada como control. Por lo tanto, Pxl1 interacciona con Rho1 cuando ambas proteínas están expresadas a niveles endógenos.



Así pues estos datos nos indican que Pxl1, al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, interacciona con Rho1 pero no con Cdc42.

1.5. Pxl1 regula negativamente a Rho1

Ya que SpPxl1 interacciona con Rho1, nos preguntamos si esta proteína podría tener alguna función en la regulación de esta GTPasa. Para comprobarlo analizamos los niveles de Rho1 activa, unido a GTP, en la cepa *pxl1Δ* y en células silvestres, mediante un ensayo de “pull-down” usando GST-RBD que contiene el dominio de unión de la rotequina que se une a RhoA activa (Reid *et al.*, 1996). Como control positivo utilizamos la cepa que presenta la delección del regulador negativo *rga5⁺*, una proteína GAP específica de Rho1 cuya falta induce un aumento en el número de células con septo (Calonge *et al.*, 2003). Como se aprecia en la [figura 22](#), la cepa *pxl1Δ* presenta una mayor cantidad de Rho1 activa en comparación con la cepa silvestre. Este incremento es ligeramente menor al que se produce en la cepa *rga5Δ*.

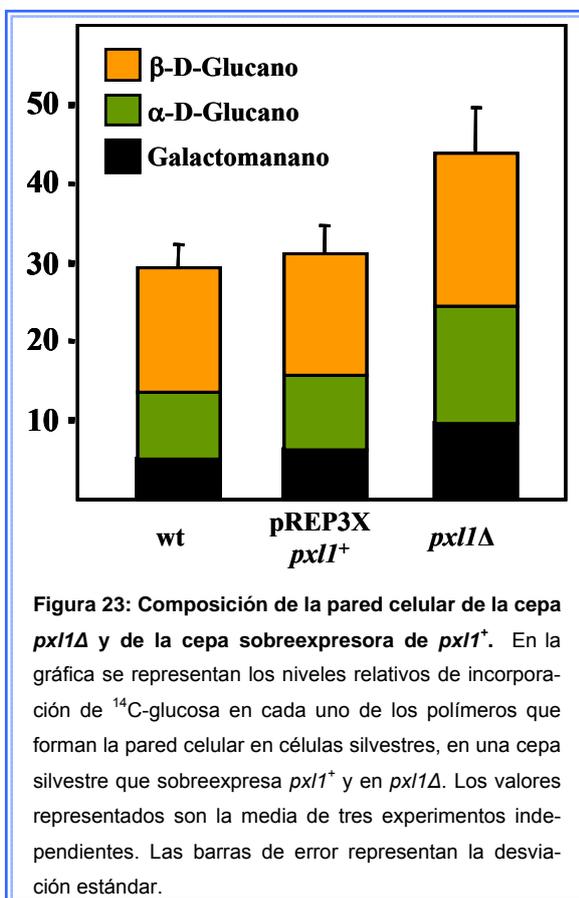


Ya que la eliminación del gen *pxl1⁺* induce un aumento de los niveles de Rho1 activa, quisimos comprobar si un exceso de Pxl1 tendría un efecto opuesto. Por ello sobreexpresamos *pxl1⁺* en una cepa que expresa *HA-rho1⁺* utilizando el plásmido pREP3X*pxl1⁺* y analizamos los niveles de Rho1 activa. El resultado fue que no obtuvimos variación de los niveles de GTP-Rho1 mediante este tipo de experimento (datos no mostrados). Esto concuerda con el hecho de que la sobreexpresión de *pxl1⁺* en una cepa silvestre no causa defectos de crecimiento, y sugiere que Pxl1 no es un regulador negativo *per se* sino que podría actuar facilitando la acción de alguna proteína Rho-GAP. En conjunto, nuestros resultados indican que Pxl1 actuaría regulando negativamente a Rho1. Teniendo en cuenta este dato y que la sobreexpresión de *pxl1⁺* es capaz de corregir la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-1625*, es posible que las vías de señalización de Rho1 y Cdc42 puedan ser antagónicas como ya se ha propuesto en *S. cerevisiae* (Gao *et al.*, 2004) y en *S. pombe* (Yang *et al.*, 2003).

1.6. La cepa *pxl1Δ* presenta alteraciones en la estructura de la pared celular

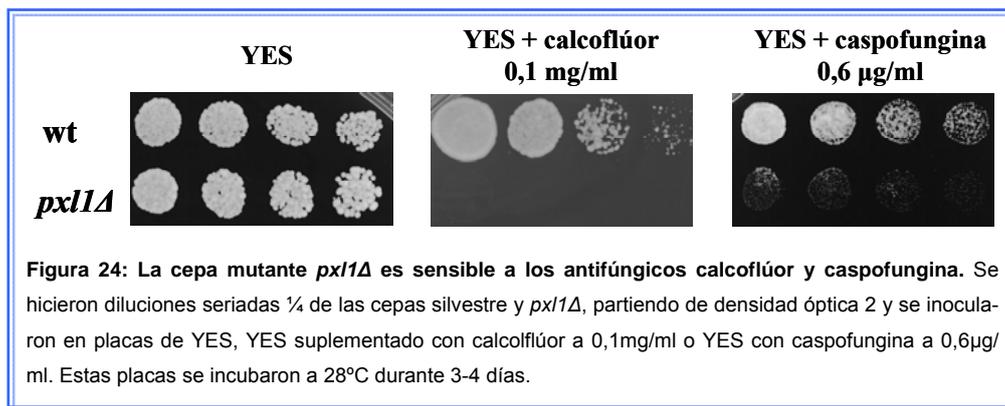
Una de las funciones de Rho1 en *S. pombe* es regular la formación de la pared celular, principalmente activando la biosíntesis de β -glucano (Arellano *et al.*, 1999a). Por ello, quisimos comprobar si el aumento en los niveles de GTP-Rho1 de la cepa *pxl1Δ* da lugar a alteraciones en la composición de su pared celular. Para ello se llevó a cabo una cuantificación de los polímeros mayoritarios de esta estructura en las cepas silvestre, *pxl1Δ*, y en la cepa sobreexpresora de *pxl1⁺* tal y como se describe en el apartado 8 de materiales y métodos. Observamos que en la cepa *pxl1Δ* se produce un aumento general en la síntesis de pared celular como refleja la mayor incorporación de ^{14}C -glucosa (figura 23). Esto mismo ocurre cuando se sobreexpresa *rho1⁺* (Arellano *et al.*, 1996), lo que indica que el aumento de actividad de Rho1 que se induce por la falta de Pxl1 afecta a las funciones de esta GTPasa relacionadas con la regulación de la síntesis de pared celular.

Para estudiar más profundamente el papel de Pxl1 en la regulación de la biosíntesis de pared celular, analizamos la sensibilidad de la cepa *pxl1Δ* a los antifúngicos calcoflúor y caspofungina. El calcoflúor interacciona con polímeros lineales de enlace $\beta(1,4)$ como quitina y celulosa, y también con $\beta(1,3)$ -glucano lineal. Esta interacción desorganiza el ensamblaje de los polímeros de la pared celular (Nicholas *et al.*, 1994). La caspofungina es un antibiótico lipopeptídico de origen natural que inhibe específicamente la síntesis del $\beta(1,3)$ -



glucano tanto *in vitro* (Douglas *et al.*, 1994) como *in vivo* (Abruzzo *et al.*, 2000). Como se aprecia en la figura 24, la cepa *pxl1Δ* es hipersensible a 0,1 mg/ml de calcoflúor y a 0,6 $\mu\text{g/ml}$ de caspofungina en medio sólido, mientras que la estirpe silvestre es capaz de crecer perfectamente a estas concentraciones. Esto nos estaría indicando que la pared celular de la cepa mutante *pxl1Δ* es defectuosa y por ello no puede soportar las alteraciones adicionales provocadas por la presencia de estos compuestos, lo que hace que no sea capaz de crecer a concentraciones del antifúngico en las que una cepa silvestre es perfectamente viable. Por tanto el aumento de GTP-Rho1 en las células con la delección de *pxl1⁺* provoca alteraciones en la estructura

de la pared celular de esta cepa.



1.7. La cepa mutante *pxl1Δ* presenta interacción genética con la cepa mutante del activador de Rho1, Rgf3.

Hemos visto hasta ahora que Pxl1 interacciona y regula negativamente a la GTPasa Rho1. Lo siguiente que quisimos comprobar fue si existía alguna relación entre Pxl1 y los GEFs de esta GTPasa descritos hasta la fecha.

Existen tres GEFs descritos para la GTPasa Rho1 en *S. pombe*: Rgf1, que activa la síntesis de la pared celular, participa en la transición de crecimiento monopolar a bipolar y recientemente se ha descrito su participación en la activación de la ruta de MAPK de integridad celular (García *et al.*, 2006a; García *et al.*, 2009b). Rgf3, que participa en el proceso de citocinesis y es esencial. Existen varios mutantes termosensibles afectados en este gen, uno de ellos es *ehs2-1* con una mutación puntual en el dominio RhoGEF de *rgf3*⁺ (Tajadura *et al.*, 2004). La tercera proteína con actividad GEF de Rho1 es Rgf2 que actúa principalmente durante el proceso de esporulación y no durante el ciclo vegetativo (García *et al.*, 2009a). Por ello, nos centramos en el estudio de la posible relación de Pxl1 con Rgf1 y Rgf3.

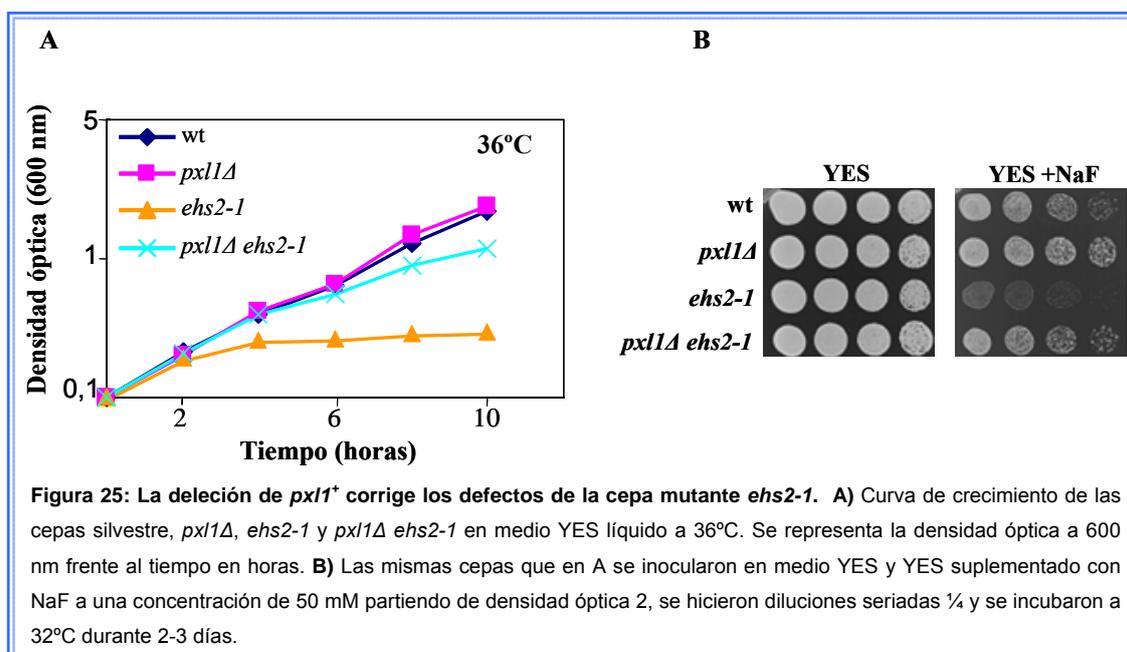
Tanto la cepa *rgf1Δ* como el mutante *ehs2-1* presentan una disminución en los niveles de Rho1 activa, lo cual da lugar a diversos defectos celulares (García *et al.*, 2006a; Tajadura *et al.*, 2004). Por ello quisimos analizar si la eliminación de *pxl1*⁺ en estas cepas era capaz de compensar algunos de los defectos que se producen debido a una insuficiente cantidad de Rho1 activa en la célula.

Se obtuvieron las cepas dobles mutantes *pxl1Δ rgf1Δ* y *pxl1Δ ehs2-1* y se analizó su fenotipo comparándolo con el fenotipo de las cepas parentales.

En primer lugar analizamos el crecimiento de *pxl1Δ ehs2-1* a 36°C, ya que la cepa mutante *ehs2-1*, que porta un alelo termosensible de *rgf3*⁺, es incapaz de crecer a esta temperatura. Las cepas parentales (*pxl1Δ* y *ehs2-1*), la cepa doble mutante y una estirpe silvestre

se cultivaron en medio YES líquido a temperatura permisiva. Los cultivos, con una densidad óptica a 600 nm de 0,1, se transfirieron a un incubador a 36°C, tomando muestras cada 2 horas para medir su crecimiento. En la [figura 25A](#) se puede ver que la cepa doble mutante presenta un crecimiento similar al de la cepa silvestre. Por tanto la eliminación de Pxl1 es capaz de suprimir el defecto de crecimiento de la cepa *ehs2-1* a 36°C.

Otro fenotipo que presenta la cepa *ehs2-1* es la hipersensibilidad a NaF (resultados no publicados de la Dra. Yolanda Sánchez), de forma similar al mutante *lad1-1*, otra cepa mutante afectada en *rgf3*⁺ (Morrell-Falvey *et al.*, 2005). Para comprobar si la delección de *pxl1*⁺ era capaz de corregir también este fenotipo se llevó a cabo un ensayo de crecimiento utilizando placas suplementadas con NaF a una concentración de 50 mM. Como se aprecia en la [figura 25B](#), la cepa doble mutante es capaz de crecer en presencia de NaF de forma similar a las cepas usadas como control. Por tanto, el aumento de los niveles de Rho1 activa inducido por la delección de *pxl1*⁺ corrige también este defecto de la cepa *ehs2-1*.



La cepa *rgf1Δ* es hipersensible al antifúngico caspofungina, este fenotipo es corregido por la sobreexpresión de *rho1*⁺ (García *et al.*, 2006a). Para ver si el aumento de GTP-Rho1 que se produce con la ausencia de Pxl1 es capaz de corregir este defecto, realizamos un ensayo de crecimiento de la cepa *pxl1Δ rgf1Δ* en medio YES sólido suplementado con 0,1 µg/ml de caspofungina. En la [figura 26](#) se puede apreciar que el doble mutante *pxl1Δ rgf1Δ* y el mutante simple *rgf1Δ* son hipersensibles a esta concentración de antifúngico, por el contrario la cepa silvestre y la cepa mutante *pxl1Δ* crecen perfectamente. Estos datos indican que el aumento en los niveles de actividad de la GTPasa Rho1 que induce la falta de

pxl1⁺ no es capaz de compensar los defectos que provoca la falta de Rho1 activa en la ce-

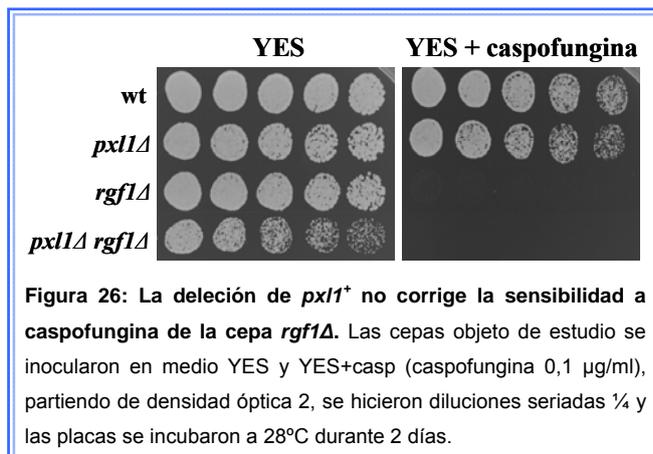


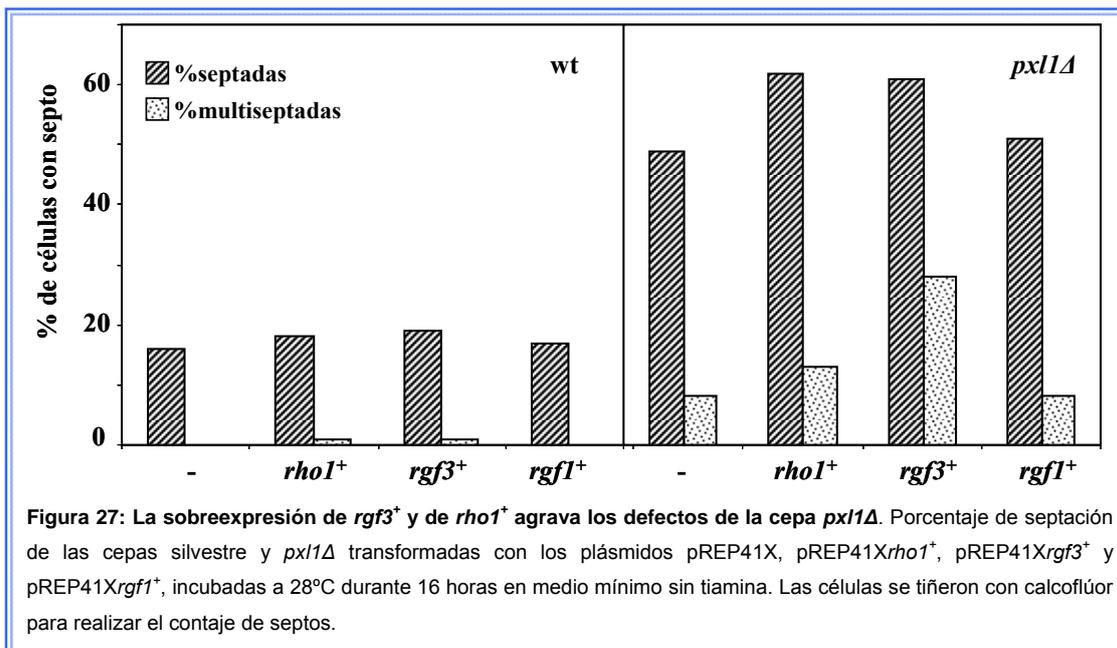
Figura 26: La delección de *pxl1*⁺ no corrige la sensibilidad a caspofungina de la cepa *rgf1*Δ. Las cepas objeto de estudio se inocularon en medio YES y YES+casp (caspofungina 0,1 μg/ml), partiendo de densidad óptica 2, se hicieron diluciones seriadas ¼ y las placas se incubaron a 28°C durante 2 días.

pa *rgf1*Δ, pero sí suprime los defectos de la cepa mutante *ehs2-1* afectada en el gen *rgf3*⁺. Esto sugiere que Pxl1 regula negativamente la actividad de Rho1 específicamente durante el proceso de citocinesis, ya que Rgf1 activa a Rho1 principalmente durante el crecimiento polarizado y Rgf3 lo hace durante el proceso de citocinesis (García *et al.*, 2006b).

1.8. La sobreexpresión de *rgf3*⁺ agrava los defectos de la cepa mutante *pxl1*Δ.

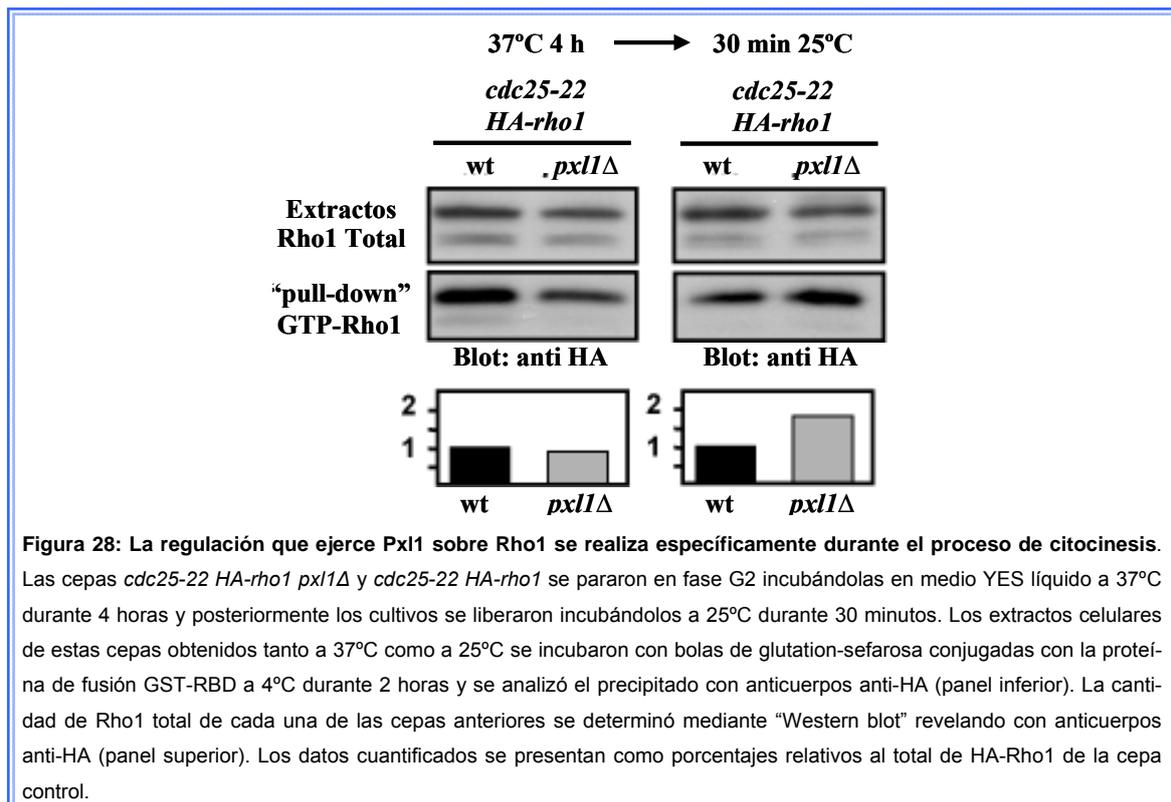
Para corroborar estos resultados, quisimos ver el efecto que produce la sobreexpresión de *rho1*⁺ o de sus activadores *rgf1*⁺ o *rgf3*⁺ en la cepa *pxl1*Δ, que presenta una mayor cantidad de Rho1 activa. La sobreexpresión de estas moléculas aumentaría aun más los niveles de GTP-Rho1, pudiendo incrementar el índice de septación que presentan las células *pxl1*Δ. Se ha descrito que la sobreexpresión de *rho1*⁺ da lugar a tres tipos de fenotipos: Células ramificadas, células redondeadas y células multiseptadas. Además, la señal de fluorescencia producida por calcoflúor es mayor que en células silvestres, probablemente debido a un incremento en la cantidad de pared (Arellano *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1997). De forma similar, la sobreexpresión de *rgf3*⁺ origina la aparición de células multiseptadas y un aumento de la señal de fluorescencia generada por el calcoflúor (Tajadura *et al.*, 2004), mientras que la sobreexpresión de *rgf1*⁺ da lugar a células mas largas con septos anormales y con un incremento en la señal generada por el calcoflúor (García *et al.*, 2006a).

Para llevar a cabo este experimento se utilizaron las estirpes *pxl1*Δ y silvestre transformadas con los plásmidos pREP41X, pREP41X*rho1*⁺, pREP41X*rgf3*⁺, pREP41X*rgf1*⁺ de expresión moderada. Estas cepas se incubaron a 28°C durante 16 horas sin tiamina para permitir la expresión de los plásmidos. Posteriormente se tomaron muestras de todas las cepas y se analizaron los niveles de septación mediante una tinción con calcoflúor. Como se muestra en la [figura 27](#) tanto la sobreexpresión de *rho1*⁺ como la de *rgf3*⁺ en una cepa silvestre produce un incremento muy ligero en el número de células en fase de septación (de un 16% a un 18% y 19% respectivamente; n=200), estos incrementos son más acusados en el caso de la cepa *pxl1*Δ (de un 49% a un 62% y 63% respectivamente; n=200). Se puede ver también que la sobreexpresión de *rgf3*⁺ en la cepa *pxl1*Δ induce un incremento notable en el número de células multiseptadas (de 8% a 28%; n=200). Por el contrario la sobre-



expresión de *rgf1*⁺ no produce efectos a nivel de septación ni en la cepa silvestre ni en la delección de *pxl1*⁺. Una vez más se demuestra que existe una relación entre *pxl1*⁺ y *rgf3*⁺ y no entre *pxl1*⁺ y *rgf1*⁺, lo que nos sugiere que la mayor cantidad de Rho1 activa que posee la cepa *pxl1*Δ actuaría a nivel de la región de división, afectando al proceso de citocinesis de *S. pombe*.

Hemos visto que la delección de *pxl1*⁺ induce un aumento de los niveles de Rho1 activa. Para determinar si este aumento se produce específicamente durante el proceso de citocinesis llevamos a cabo el siguiente experimento: Utilizamos la cepa *cdc25-22*, que a temperatura restrictiva se detiene en la fase del ciclo celular G2 (Mitchison and Creanor, 1971), con el gen *rho1*⁺ endógeno marcado con el epítipo HA y la delección *pxl1*Δ. Esta cepa y la cepa control (*cdc25-22 HA-rho1*⁺ *pxl1*⁺) se pararon en G2 incubando el cultivo durante 4 horas a 37°C y posteriormente se liberaron de la parada pasando los cultivos a 25°C. Llevamos a cabo ensayos de unión a rotequina para determinar los niveles de Rho1 activa tanto de las células paradas en G2 a 37°C como de las células tras 30 minutos de la liberación a 25° cuando ya han entrado en mitosis. Como se puede ver en la [figura 28](#) los niveles de GTP-Rho1 en G2 son similares en la cepa problema y en el control a 37°C, mientras que cuando estas células se liberan, tras 30 minutos a 25°C la cantidad de Rho1 activa aumenta en la cepa que carece de Pxl1. Esto nos confirma que la regulación que ejerce Pxl1 sobre Rho1 se lleva a cabo específicamente durante el proceso de citocinesis.



1.9. Relación de Pxl1 con las proteínas GAP de las GTPasas de la familia Rho.

Según los datos obtenidos, Pxl1 actuaría regulando Rho1 negativamente durante el proceso de citocinesis. Sin embargo, Pxl1 no presenta ningún dominio GAP (GTPase activating protein) en su estructura proteica, que pudiera estar realizando esta función en la célula. Por este motivo pensamos que la regulación negativa que ejerce Pxl1 sobre Rho1 podría ser indirecta, a través de alguno de los GAPs presentes en *S. pombe*. En el genoma de esta levadura existen 10 ORFs que codifican putativas proteínas de tipo GAP para las GTPasas de la familia Rho (Rga1-10). Se ha descrito que Rga1, Rga5 y Rga8 actúan como GAPs de Rho1 (Calonge *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003), Rga4 regula a Cdc42 (Tatebe *et al.*, 2008) y Rga2 a Rho2 (Villar-Tajadura *et al.*, 2008). No se conoce a qué GTPasas se encuentran regulando el resto de proteínas GAP.

En una primera aproximación, para determinar si Pxl1 era capaz de interactuar con alguna proteína de tipo GAP, realizamos un ensayo de “pull-down” mezclando extractos totales de células que expresaban *GST-pxl1*⁺ con extractos totales de células que presentaban los diferentes Rgas con el epítipo HA fusionado en el extremo N-terminal. Por un lado usamos una cepa de *S. pombe* transformada con el plásmido pREP1-*GST-pxl1*⁺, y por otro lado cepas de *S. cerevisiae* transformadas con los plásmidos pAS2-*rga1*⁺, pAS2-*rga3*⁺, pACT2-*rga4*⁺, pAS2-*rga5*⁺, pAS2-*rga6*⁺, pACT2-*rga7*⁺, pAS2-*rga8*⁺ y pAS2-*rga9*⁺ respectivamente (se usaron plásmidos pAS2 o pACT2 indistintamente según las construcciones

disponibles en el laboratorio). En estos plásmidos los genes se encuentran fusionados al epítipo HA. Las cepas se cultivaron en los medios adecuados para permitir la expresión de los plásmidos y posteriormente se prepararon los extractos celulares. Para llevar a cabo el ensayo de “pull-down” se mezclaron 300 µg de extracto total de la cepa de *S. pombe* que sobreexpresa *GST-pxl1*⁺ con 3 mg de cada uno de los extractos celulares totales de las cepas de *S. cerevisiae* que presentan las proteínas GAP fusionadas al epítipo HA. Las mezclas de extractos se incubaron con bolas de glutatión sefarosa para unir las proteínas fusionadas a GST. Tras el periodo de incubación las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida y se transfirieron a membranas de PVDF. Como se observa en la [figura 29](#), al revelar con anticuerpos anti-HA las membranas donde se habían transferido los precipitados, solamente fuimos capaces de detectar la banda correspondiente a Rga4. Sin embargo, como se puede ver en la membrana de extractos totales, los niveles de las diferentes proteínas GAP fusionadas al epítipo HA varían mucho: Detectamos muy débilmente las bandas correspondientes a Rga1 y Rga3 y no fuimos capaces de detectar las bandas correspondientes a Rga7 y Rga9. Por lo tanto, los resultados obtenidos en este experimento no pudieron ser considerados como definitivos.

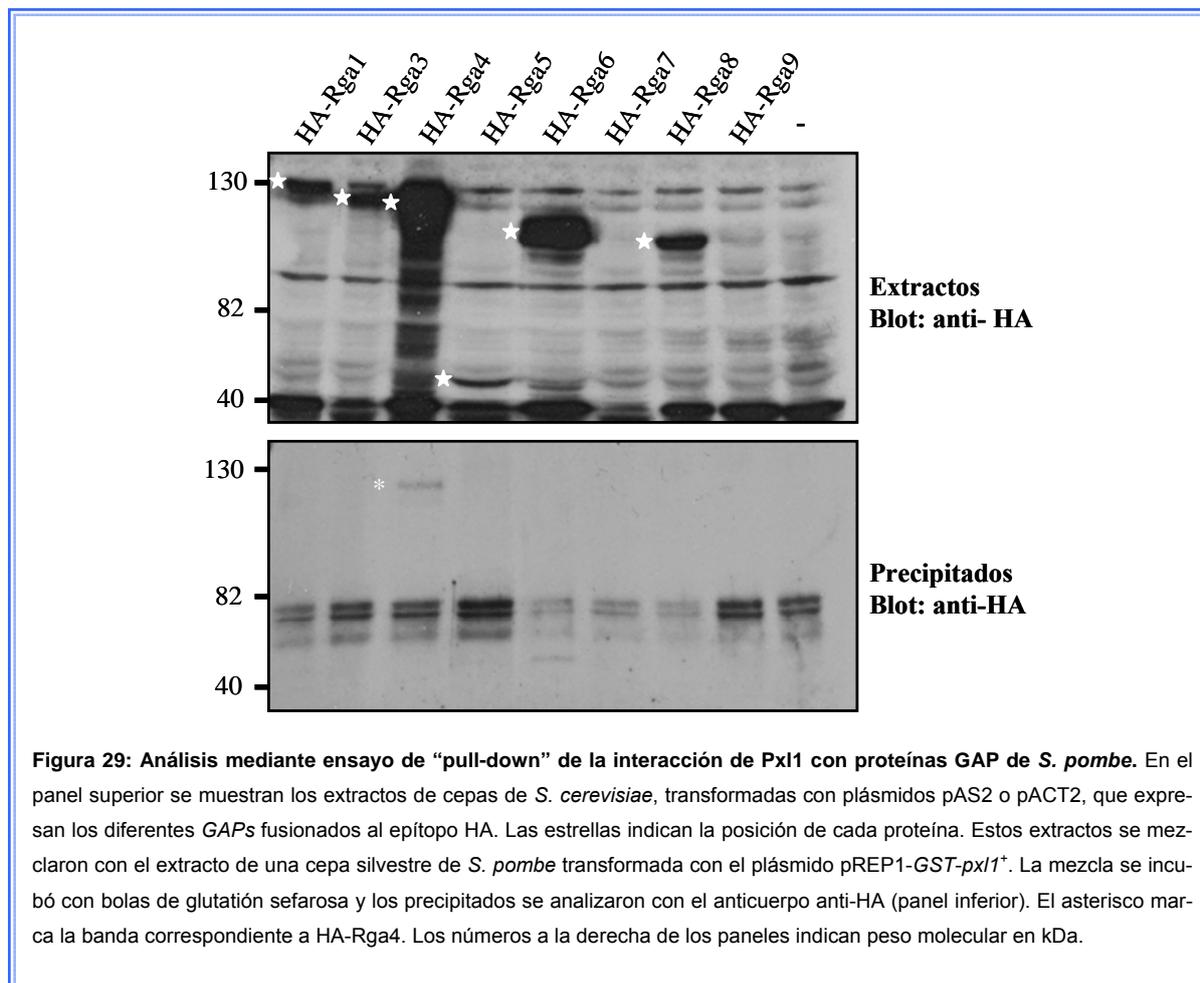
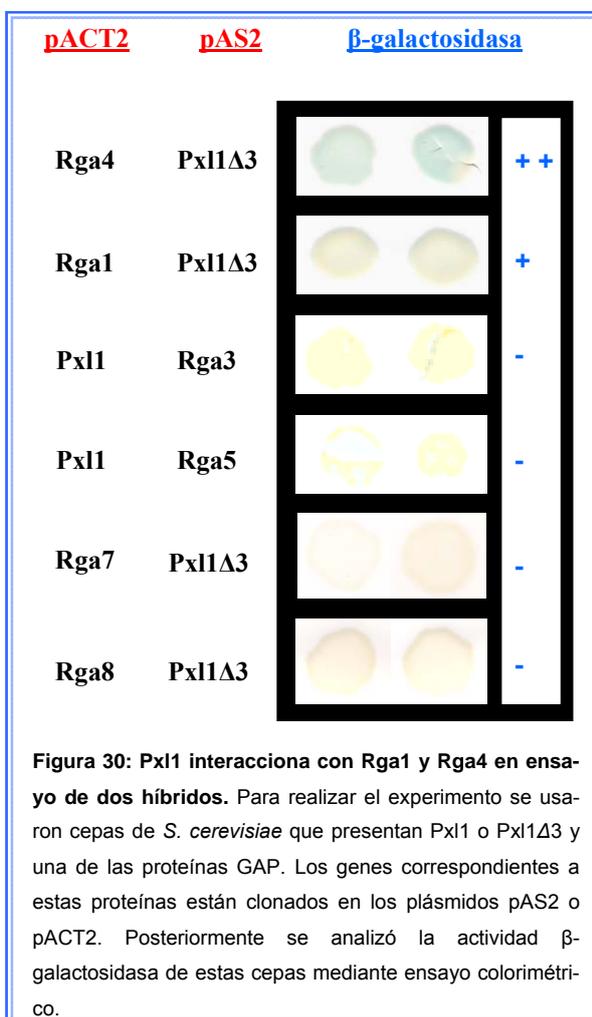


Figura 29: Análisis mediante ensayo de “pull-down” de la interacción de Pxl1 con proteínas GAP de *S. pombe*. En el panel superior se muestran los extractos de cepas de *S. cerevisiae*, transformadas con plásmidos pAS2 o pACT2, que expresan los diferentes GAPs fusionados al epítipo HA. Las estrellas indican la posición de cada proteína. Estos extractos se mezclaron con el extracto de una cepa silvestre de *S. pombe* transformada con el plásmido pREP1-*GST-pxl1*⁺. La mezcla se incubó con bolas de glutatión sefarosa y los precipitados se analizaron con el anticuerpo anti-HA (panel inferior). El asterisco marca la banda correspondiente a HA-Rga4. Los números a la derecha de los paneles indican peso molecular en kDa.

Por ello realizamos un ensayo de dos híbridos para intentar determinar la posible interacción de Pxl1 y las proteínas GAP de *S. pombe*. Para realizar este experimento, se clonó *pxl1*⁺ en fase con el dominio de unión a DNA del factor de transcripción Gal4 en el plásmido pAS2 o con el dominio de activación de la transcripción de Gal4 en el plásmido pACT2. Estas construcciones se usaron como cebo frente a *rga1*⁺, *rga3*⁺ *rga5*⁺, y *rga8*⁺ (por ser GAPs de Rho1), *rga4*⁺ (para comprobar el resultado obtenido en el ensayo de “pull-down”) y *rga7*⁺ clonados en los plásmidos pACT2 o pAS2. Sólo si existe interacción entre las proteínas se reconstituye el factor de transcripción que regula la expresión del gen “reporter” β-galactosidasa. El primer problema que nos encontramos al realizar el experimento fue que



Pxl1 producida en el plásmido pAS2 (y no en el pACT2), era capaz de activar la transcripción del gen “reporter” en *S. cerevisiae* por sí sola, por lo que esta fusión no pudo ser usada para el ensayo. Para evitar la activación de la transcripción realizamos una truncación de *pxl1*⁺ en la que eliminamos el dominio LIM 3’ del gen (*pxl1Δ3*⁺). Clonamos esta secuencia en el plásmido pAS2 y comprobamos que en este caso la proteína truncada no era capaz de activar la β-galactosidasa por sí misma, por lo que usamos esta construcción para realizar el ensayo de dos híbridos.

Como se muestra en la [figura 30](#) sólo observamos una débil actividad β-galactosidasa en la cepa que produce Pxl1 y Rga4, lo cual confirma el resultado obtenido en el experimento de “pull-down”, y en la cepa que produce Pxl1 y Rga1. Esto sugiere una posible interacción de Pxl1 con Rga1 además de con Rga4.

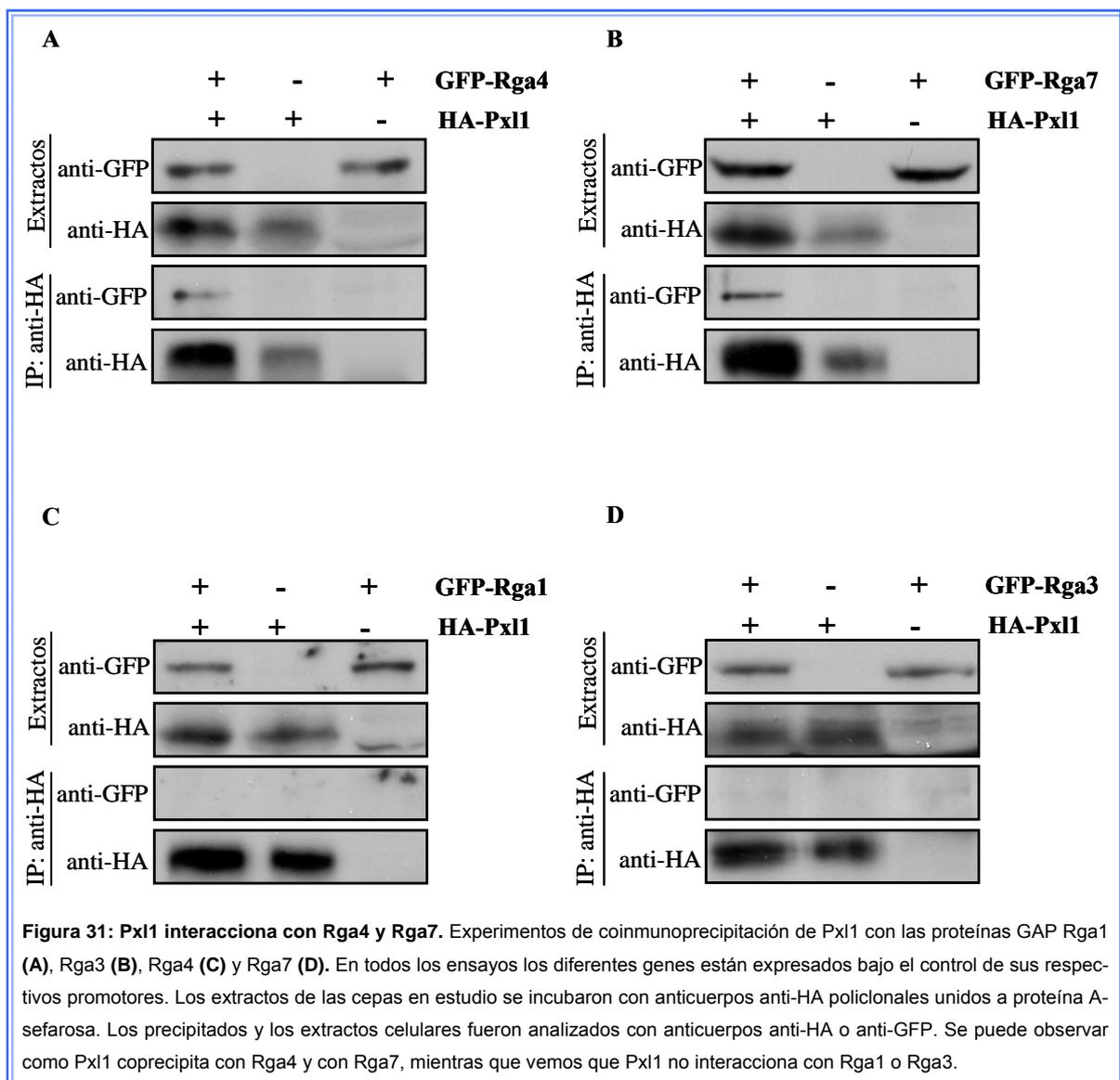
1.10. Pxl1 interacciona con Rga4 y Rga7 en ensayos de coimmunoprecipitación

Como el ensayo de 2 híbridos da lugar en muchas ocasiones a falsos resultados positivos o falsos negativos, quisimos corroborar los datos obtenidos anteriormente mediante experimentos de coimmunoprecipitación entre Pxl1 y las proteínas GAP expresadas a nive-

les endógenos.

Realizamos estos experimentos con las proteínas GAP, Rga1, Rga3, Rga4 y Rga7, puesto que en el laboratorio disponíamos de cepas con estas proteínas marcadas con la proteína GFP. Con Rga5 y Rga8 no pudimos llevar a cabo el ensayo ya que no fuimos capaces de detectarlas mediante ensayos de “Western-blot” cuando se produjeron a niveles endógenos.

Para llevar a cabo las coimmunoprecipitaciones usamos las cepas que presentan de forma simultánea HA-Pxl1 y una de las proteínas GAP marcada con GFP producidas a niveles endógenos. Los extractos celulares de estas cepas y de las respectivas cepas usadas como control se incubaron en presencia de anticuerpos policlonales anti-HA unidos a proteína A-sefarosa. Tras la incubación se realizó un “Western-blot” empleando anticuerpos anti-GFP o anti-HA para detectar las proteínas GAP o Pxl1 en los inmunoprecipitados y extractos celulares. Como se observa en la [figura 31](#), Pxl1 es capaz de interactuar con



Rga4 y Rga7, mientras que no se detectó interacción entre Pxl1 y Rga1 o Rga3. Así pues, con todos estos datos podemos decir que Pxl1 interacciona tanto con Rga4 como con Rga7.

1.11. La cepa mutante *pxl1Δ* presenta interacción genética con las cepas mutantes *rga4Δ* y *rga7Δ*.

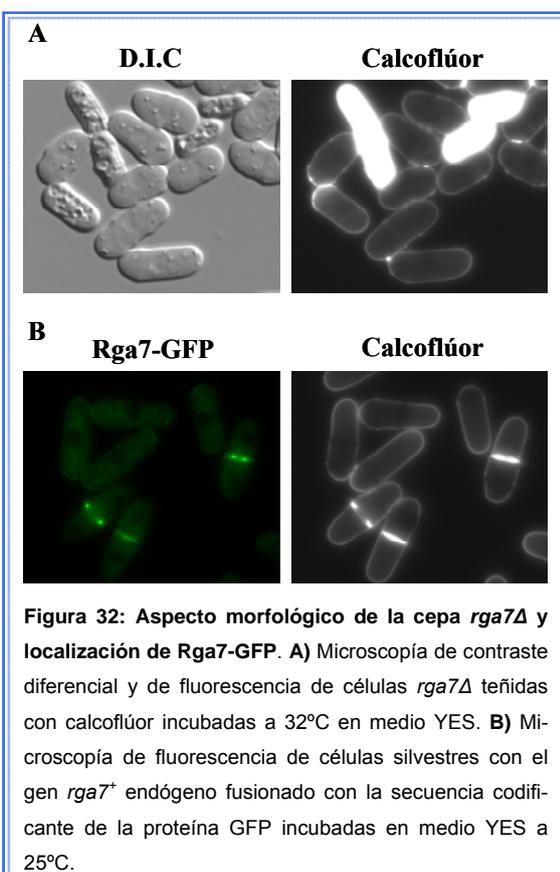
Rga4 es una proteína GAP de Cdc42 localizada en las zonas de no crecimiento de la célula. La delección de *rga4⁺* origina células más cortas y gruesas que un silvestre (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008). Aún no se ha descrito la función de Rga7. Las células *rga7Δ* presentan un cierto porcentaje de lisis celular en el medio de cultivo y la proteína se localiza

en los polos celulares y en la región de división formando un anillo contráctil (resultados no publicados) (Figura 32). Los datos preliminares de los que disponemos en la actualidad indican que probablemente esta proteína GAP ejerza su acción sobre Rho4 y Rho2 (datos no mostrados), si bien no se ha estudiado todavía si pudiera tener alguna relación con Rho1 o Cdc42. Para estudiar la posible relación funcional de *pxl1⁺* con los GAPs *rga4⁺* y *rga7⁺* quisimos ver si existía interacción genética entre estos genes.

Con este objetivo se intentó la construcción de las cepas dobles mutantes *pxl1Δ rga4Δ* y *pxl1Δ rga7Δ* para comparar su fenotipo con el de las cepas mutantes simples. No fuimos capaces de obtener cepas dobles mutantes *pxl1Δ rga7Δ*, lo que indica que ambos genes son sintéticos letales. Sí que obtu-

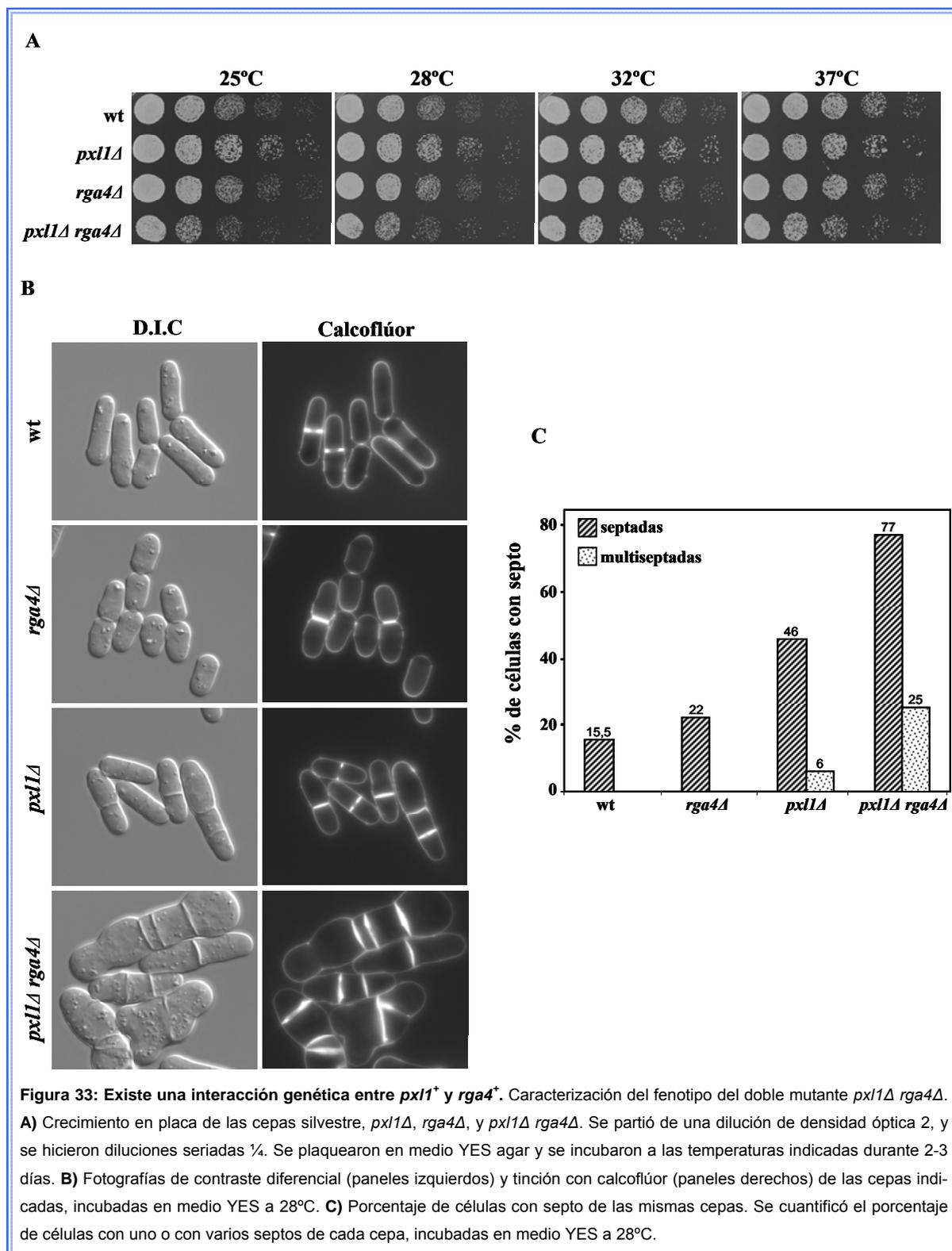
vimos cepas dobles mutantes *pxl1Δ rga4Δ* viables, por lo que lo primero que hicimos fue comparar el crecimiento de estas cepas con el crecimiento de las parentales en medio YES agar a diferentes temperaturas. Como se observa en la figura 33A la cepa doble mutante presenta un ligero defecto de crecimiento respecto a las cepas *pxl1Δ* o *rga4Δ* a todas las temperaturas ensayadas.

Cuando analizamos el fenotipo de la cepa *pxl1Δ rga4Δ* al microscopio, vimos que los defectos morfológicos que presentaba eran más acusados que los de las cepas *pxl1Δ* o



rga4Δ: Se observó un incremento en el porcentaje de células con defectos en citocinesis (células multiseptadas) y también se observaron células muy gruesas y células ramificadas (figura 33B).

Realizamos un recuento de células septadas mediante tinción con calcoflúor y como se puede ver en la figura 33C el número de células con uno o varios septos fue muy superior



en la cepa *pxl1Δ rga4Δ* comparado con las cepas *pxl1Δ* o *rga4Δ*.

Por tanto, estos resultados y los obtenidos mediante coimmunoprecipitaciones nos indican una posible relación entre las funciones de Pxl1 y las de las proteínas GAP Rga4 y Rga7, sin embargo desconocemos si dicha relación tiene que ver con la regulación negativa que ejerce Pxl1 sobre la GTPasa Rho1.

1.12. Rga7 presenta defectos de localización en la cepa *pxl1Δ*

Puesto que vimos que existía interacción física entre Pxl1 y los GAPs Rga7 y Rga4, quisimos comprobar si estas dos proteínas se localizaban de forma correcta en la cepa *pxl1Δ* o si por el contrario, presentaban defectos de localización que pudieran ser los responsables del aumento en los niveles de Rho1 activa que se produce en ausencia de Pxl1.

Como hemos mencionado en el apartado anterior, Rga4 se localiza formando una especie de banda en la región central de la célula, encontrándose excluida de los polos de crecimiento y Rga7 se localiza en los polos celulares y en la región de división en forma de anillo contráctil.

Al analizar la localización de estas dos proteínas en *pxl1Δ*, vimos que Rga4-GFP se localiza correctamente en esta cepa mutante, con el mismo patrón que en las células silvestres. Sin embargo, al observar Rga7-GFP en la delección de *pxl1⁺*, vimos que aunque se encuentra correctamente localizada en el ecuador celular formando un anillo, en ocasiones esta estructura aparece duplicada (figura 34). Se podría, por tanto, concluir que Pxl1 solamente es necesaria para la correcta localización de Rga7.

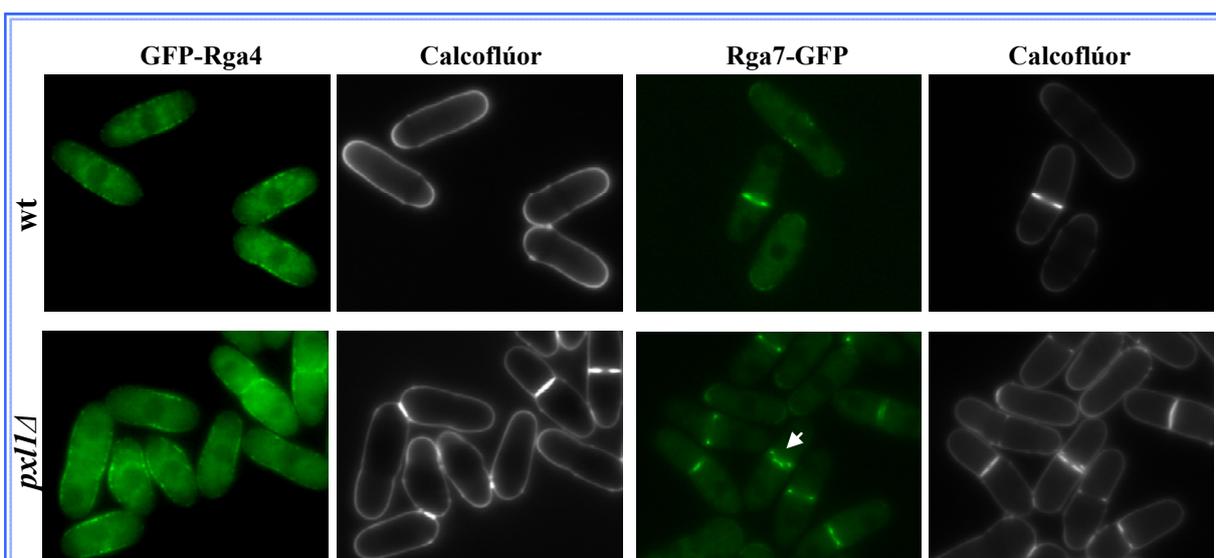


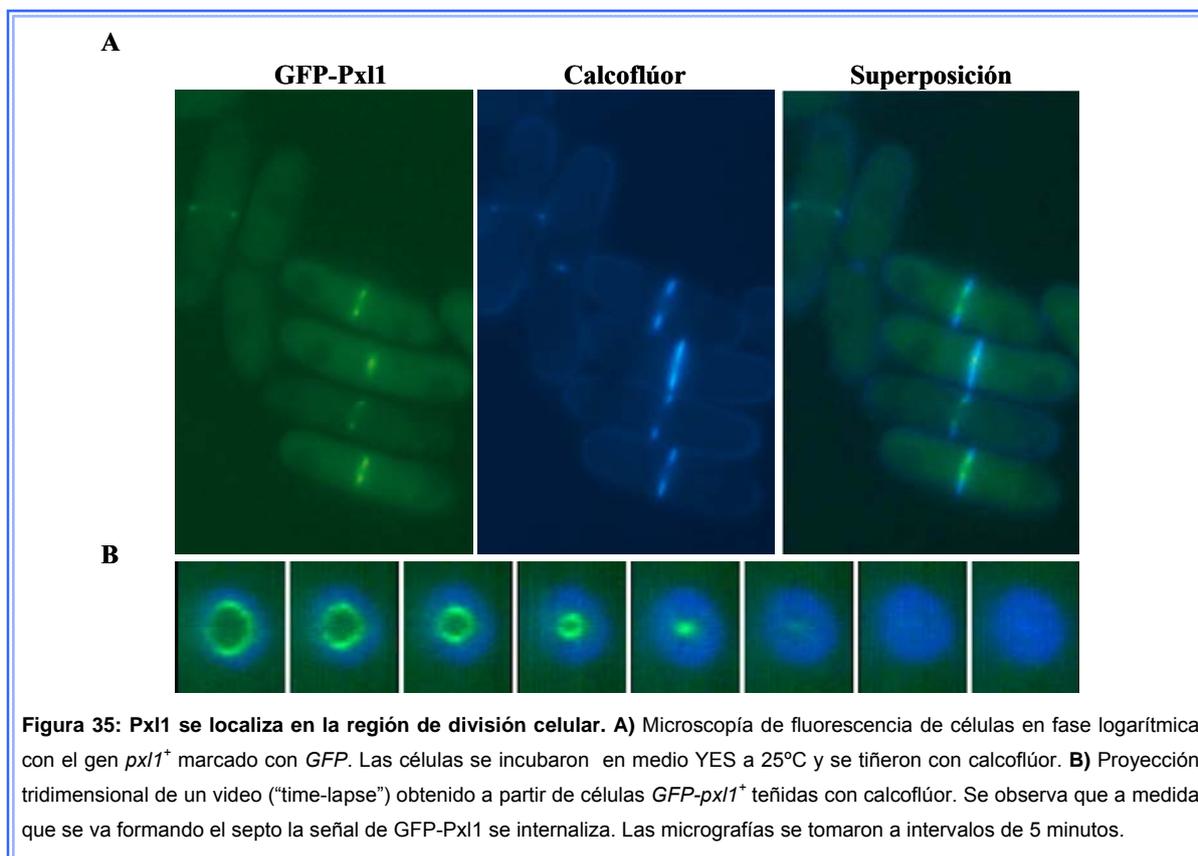
Figura 34: En ausencia de Pxl1, Rga7 presenta defectos de localización mientras que Rga4 se localiza correctamente. Micrografías de fluorescencia de células silvestres o *pxl1Δ* con los genes *rga4⁺* (A) o *rga7⁺* (B) endógenos fusionados con la secuencia codificante de la proteína GFP incubadas en medio YES a 25°C. La flecha en B marca un anillo donde la localización de Rga7-GFP es anormal.

APARTADO 2: RELACIÓN DE PXL1 CON EL PROCESO DE CITOCINESIS en *S. pombe*.

2.1. La proteína Pxl1 se localiza en la región de división celular

Para conocer la localización subcelular de Pxl1 se construyeron cepas con la proteína Pxl1 fusionada a la proteína GFP en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. Para ello clonamos el gen *pxl1*⁺ fusionado con la secuencia que codifica para la proteína verde fluorescente bajo el control de su propio promotor en el plásmido pJK148. Los plásmidos pJK148-*GFP-pxl1*⁺ o pJK148-*pxl1*⁺-*GFP*, se linearizaron con la enzima NruI y con ellos se transformó una cepa *pxl1*Δ, de tal manera que cada construcción se integró en el locus *leu1*⁺ y la cepa resultante únicamente tenía una copia del gen *pxl1*⁺. Una vez obtenidos los transformantes, comprobamos la funcionalidad de ambas proteínas de fusión analizando su capacidad para suprimir los defectos de citocinesis de la cepa *pxl1*Δ. Se observó que sólo la proteína GFP-Pxl1 corrige estos defectos lo que indica que esta proteína de fusión es funcional. Por el contrario la proteína Pxl1-GFP resultó ser no funcional probablemente por la proximidad de la proteína GFP a los dominios LIM.

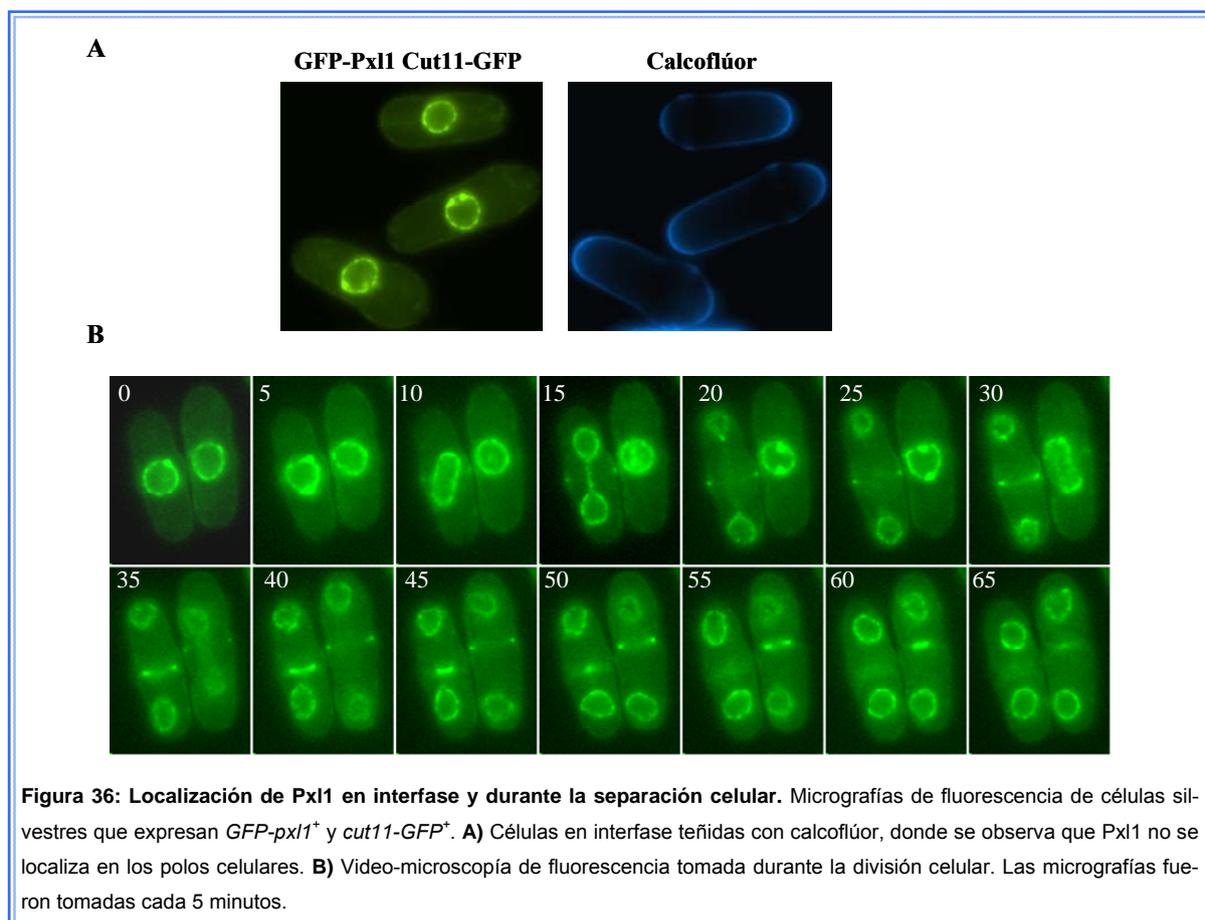
A continuación se analizó mediante microscopía de fluorescencia la localización de GFP-Pxl1. Para ello, esta cepa se cultivó en medio YES líquido y las células se tiñeron con



calcoflúor, que tiñe preferentemente el septo y los polos, lugares donde se está produciendo la síntesis activa de pared celular. Como se muestra en la [figura 35A](#), GFP-Pxl1 se localiza exclusivamente en la zona de división celular formando un anillo. La señal de fluorescencia verde aparece siempre más interna que la señal de fluorescencia azul que produce la tinción con calcoflúor, que tiñe el septo en formación, lo que indica que el anillo de GFP-Pxl1 es contráctil y precede a la síntesis del septo ([figura 35B](#)).

2.2. Estudio detallado de la localización de Pxl1 durante el proceso de citocinesis

Una vez visto que Pxl1 únicamente se localiza en la región de división, quisimos estudiar en detalle su localización en esta zona. Para ello realizamos un ensayo de microscopía en tiempo real de células individuales. Para saber en qué punto del ciclo se encontraban las células, utilizamos cepas que junto con GFP-Pxl1 presentan Cut11-GFP, que marca la membrana nuclear y se concentra en el cuerpo polar del huso mitótico (SPB) (West *et al.*, 1998). Aunque tanto Pxl1 como Cut11 se encuentran marcadas con GFP, su señal en la célula no se solapa. Comprobamos que en células que se encuentran en interfase, creciendo por uno o los dos polos, no se detecta señal de GFP-Pxl1 en la célula ([figura 36A](#) y [figura 36B tiempo 0](#)). Al comenzar la mitosis, las células duplican el cuerpo polar del huso mitó-



tico (SPB) y este se dirige a los extremos de la envuelta nuclear, a continuación la morfología del núcleo se ve modificada por acción del huso mitótico intranuclear. En este punto ya se puede observar la señal de GFP-Pxl1 en la región del córtex perinuclear como una banda difusa (figura 36B tiempo 5 y 10 célula de la izquierda), lo que indica que GFP-Pxl1 se dirige a esta región en torno a la anafase B. A medida que los núcleos se van separando, la señal de GFP-Pxl1 se va compactando hasta formar un anillo en la región de división (minutos 15-25). Cuando comienza la formación del septo, el anillo de GFP-Pxl1 empieza a contraerse al mismo tiempo que se produce la síntesis del septo, hasta convertirse en un punto que desaparece al finalizar la contracción y antes de la separación celular (minutos 30-60).

Por tanto, con estos experimentos podemos decir que Pxl1 se localiza de la siguiente manera durante el ciclo celular: 1) En interfase no se localiza en ninguna estructura de la célula ni se encuentra localizada en los polos de crecimiento. 2) Cuando la célula entra en mitosis y los SPB se duplican, Pxl1 se localiza de forma muy tenue en la región media de la célula. 3) Cuando los núcleos se encuentran separados, la proteína forma un anillo en esta región. Este anillo va contrayéndose a medida que tiene lugar la formación del septo. 4) Una vez el septo se ha formado la señal de Pxl1 desaparece.

2.3. La concentración de Pxl1 aumenta durante el proceso de citocinesis

Hemos visto que Pxl1 se localiza exclusivamente en la región de división durante el proceso de citocinesis. Además se sabe que *pxl1*⁺ forma parte del grupo de genes que se encuentran regulados por los factores de transcripción Sep1 y Ace2 que activan el programa de división celular (Alonso-Núñez *et al.*, 2005; Rustici *et al.*, 2004). La expresión de los genes regulados por estos factores de transcripción experimenta un pico en mitosis. Por ello, decidimos evaluar si los niveles de la proteína Pxl1 variaban a lo largo del ciclo celular o si por el contrario, como ocurre con la proteína Rho4, su concentración se mantiene constante durante todo el ciclo de vida de la levadura (Santos *et al.*, 2005). Para realizar el experimento, empleamos una cepa que expresa *HA-pxl1*⁺ bajo el control de su propio promotor, en un cultivo sincronizado empleando la estirpe *cdc25-22*, que detiene el ciclo en G2 cuando se incuba a 37°C (Mitchison and Creanor, 1971). Por tanto, para sincronizar las células incubamos el cultivo a 37°C durante 4 horas. Liberamos las células del bloqueo en G2 pasando el cultivo a 25°C y cada 25 minutos tomamos muestras, de las que se obtuvieron extractos celulares para analizar los niveles de HA-Pxl1 mediante "Western-blot". Como se ve en la figura 37, los niveles de HA-Pxl1 varían a lo largo del ciclo celular, presentando un máximo de expresión momentos antes del pico máximo de células con septo, hacia el minuto 50 después de liberar el cultivo del bloqueo. Cuando el número de células septando

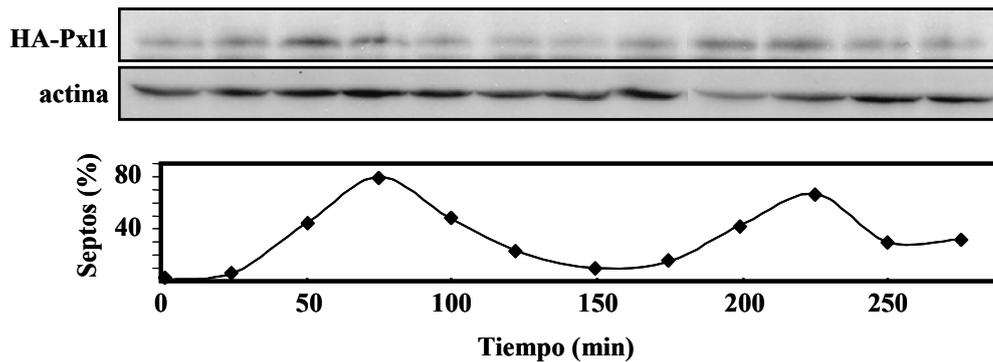


Figura 37: Niveles de Pxl1 a lo largo de ciclo celular. Los niveles de Pxl1 se determinaron mediante “Western-blot” a partir de muestras tomadas de un cultivo sincrónico de la cepa *cdc25-22* que expresa *HA-pxl1⁺* a niveles endógenos. Las células se sincronizaron incubando los cultivos a 37°C durante 4 horas y pasándolos después a 25°C. Las muestras se tomaron cada 25 minutos durante dos ciclos celulares consecutivos tras liberar los cultivos a 25°C. El blot se incubó con anticuerpos anti-HA, para detectar HA-Pxl1. Como control de carga se cuantificó la cantidad de actina. La progresión del ciclo celular se determinó mediante el porcentaje de células con septo (panel inferior).

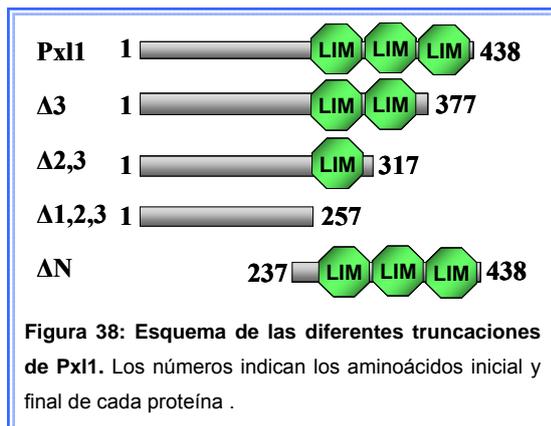
disminuye, también la señal de HA-pxl1 va desapareciendo, alcanzándose un mínimo en torno a los 150 minutos después de la liberación del cultivo. Sin embargo, la proteína no desaparece completamente durante la interfase, ya que la detectamos a niveles bajos durante esta fase del ciclo celular.

El aumento de la concentración de Pxl1 durante la fase de división celular coincide con los datos de localización obtenidos anteriormente, sin embargo, la proteína detectada en interfase mediante “Western-blot” no se observa en células *in-vivo*, posiblemente por su escasa concentración en la célula. Este patrón de expresión coincide con el de otras proteínas reguladas por los factores de transcripción Sep1 y Ace2, que presentan su máximo nivel de expresión durante la citocinesis y su concentración disminuye al finalizar la división. En el caso de Pxl1 sus niveles en interfase disminuyen pero no desaparecen por completo, lo que podría indicar que la proteína es degradada parcialmente.

2.4. El extremo amino de Pxl1 es necesario para su localización, mientras que los dominios LIM son necesarios para que la proteína realice su función

En el apartado 1.1 describimos que Pxl1 presenta 3 dominios LIM en su extremo carboxilo y un extremo amino sin ningún dominio aparente. Para determinar qué región de la proteína es necesaria para su localización en la zona de división, eliminamos el extremo N-terminal (Pxl1 Δ N) o uno (Pxl1 Δ 3), dos (Pxl1 Δ 2,3) o los tres dominios LIM (Pxl1 Δ 1,2,3) de Pxl1. En la [figura 38](#) se muestra un esquema que representa las proteínas truncadas.

La secuencia codificante de la proteína GFP se fusionó a cada una de las deleciones parciales de la secuencia codificante de *pxl1⁺* en el extremo 5', bajo el control del promotor



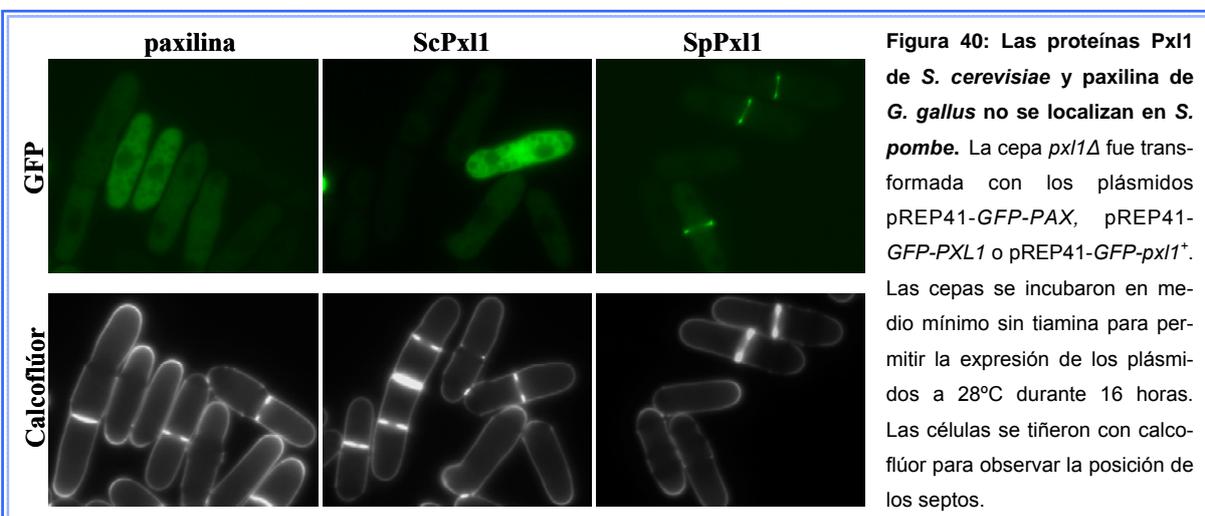
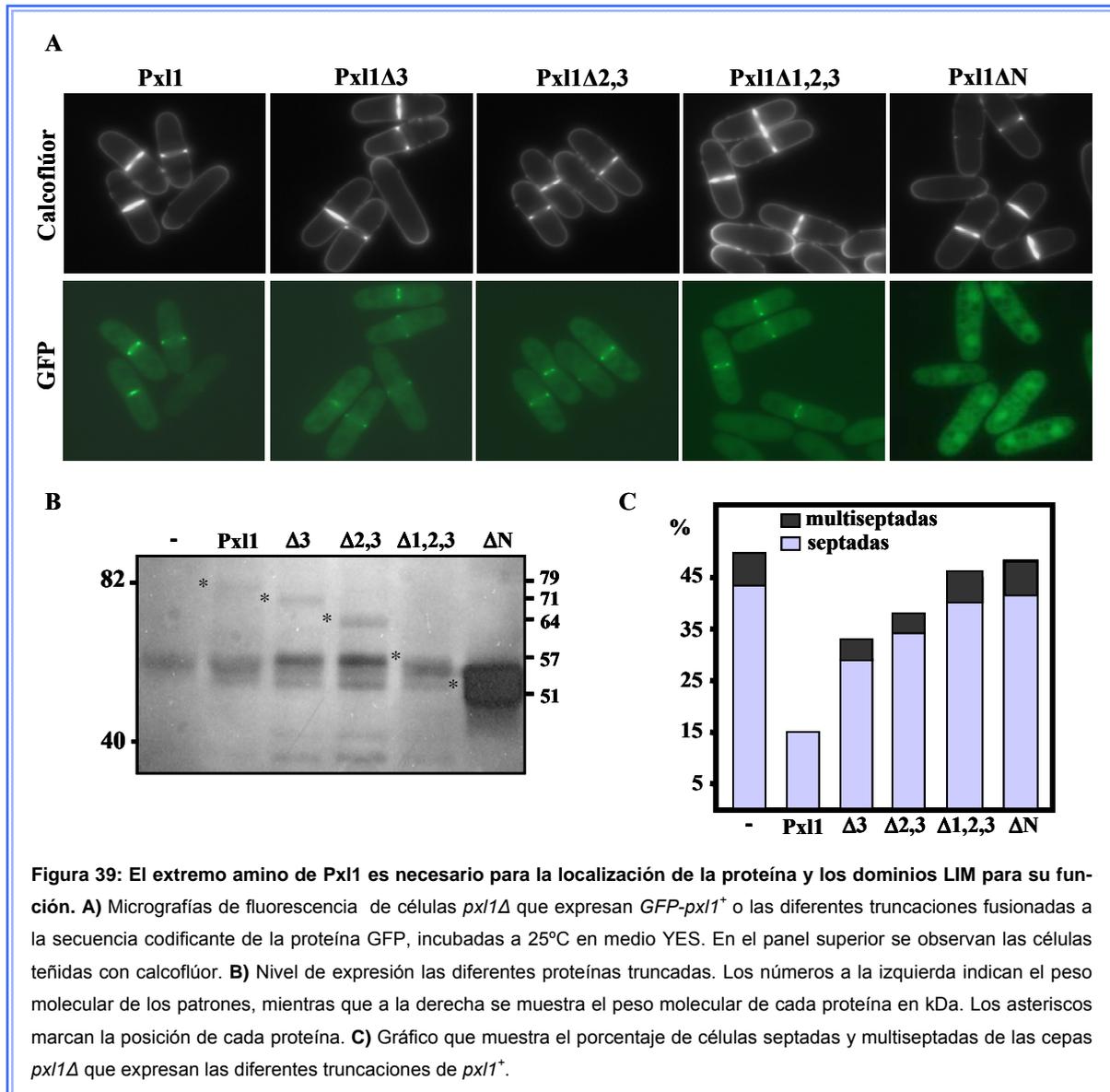
de *pxl1*⁺. Estas fusiones se clonaron en el plásmido integrativo pJK148 y se integraron en el locus *leu1*⁺ de la cepa mutante *pxl1Δ*, para ver la localización de cada una de las truncaciones en la célula y para examinar la capacidad de cada alelo de *pxl1*⁺ de rescatar los defectos de citocinesis de la cepa *pxl1Δ*. Al observar la localización de las diferentes proteínas truncadas, vimos que todas ellas se localizaban de forma correcta en la zona media de la célula, excepto aquella proteína a la que le falta el extremo amino (Pxl1ΔN), que aparece dispersa por todo el citoplasma y también en el núcleo celular (figura 39A). Además, se comprobaron los niveles de las diferentes proteínas truncadas en la célula y se vio que todas ellas presentan una concentración similar a la de la proteína silvestre, salvo Pxl1ΔN, cuya cantidad en la célula es mayor que la del resto, a pesar de que todas se expresan bajo el control del promotor de *pxl1*⁺ (figura 39B). Esta diferencia sugiere que el extremo N-terminal de Pxl1 podría actuar regulando los niveles de proteína o que los niveles de Pxl1 se regulan cuando la proteína se encuentra correctamente localizada. Por tanto podemos decir que el extremo amino de Pxl1 es necesario para su adecuada localización.

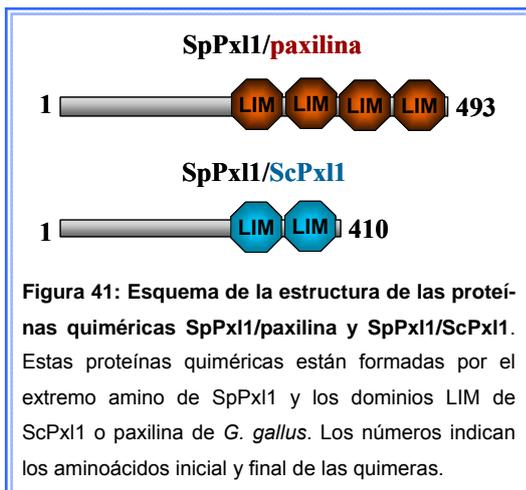
Por otra parte, para determinar si estas proteínas son capaces de realizar las funciones de Pxl1, realizamos un recuento de células septando mediante tinción con calcoflúor en cada una de las cepas que expresan los diferentes truncaciones. Observamos que sólo GFP-Pxl1 suprime completamente los defectos de citocinesis de la cepa *pxl1Δ*, mientras que ninguna de las truncaciones es completamente funcional. Sólo observamos una complementación parcial del fenotipo por parte de la truncación a la que le falta el dominio LIM C-terminal (Pxl1Δ3) (figura 39C). La proteína Pxl1Δ1,2,3 a pesar de localizarse correctamente, no corrige el fenotipo de *pxl1Δ*, lo que indica que los dominios LIM son esenciales para que la proteína realice su función en la célula.

Por otra parte, para determinar si estas proteínas son capaces de realizar las funciones de Pxl1, realizamos un recuento de células septando mediante tinción con calcoflúor en cada una de las cepas que expresan los diferentes truncaciones. Observamos que sólo GFP-Pxl1 suprime completamente los defectos de citocinesis de la cepa *pxl1Δ*, mientras que ninguna de las truncaciones es completamente funcional. Sólo observamos una complementación parcial del fenotipo por parte de la truncación a la que le falta el dominio LIM C-terminal (Pxl1Δ3) (figura 39C). La proteína Pxl1Δ1,2,3 a pesar de localizarse correctamente, no corrige el fenotipo de *pxl1Δ*, lo que indica que los dominios LIM son esenciales para que la proteína realice su función en la célula.

2.5. Las proteínas Pxl1 de *S. cerevisiae* y paxilina de *G. gallus* no se localizan en *S. pombe*

Como se ha mencionado anteriormente, el extremo amino de Pxl1 es necesario para su correcta localización en la región de división, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, donde la localización de Pxl1 en la zona del cuello y área de crecimiento depende de los dominios LIM C-terminales (Gao *et al.*, 2004; Mackin *et al.*, 2004). Para comprobar si ScPxl1 y paxilina eran capaces de localizarse y de realizar las funciones de SpPxl1 en *S.*

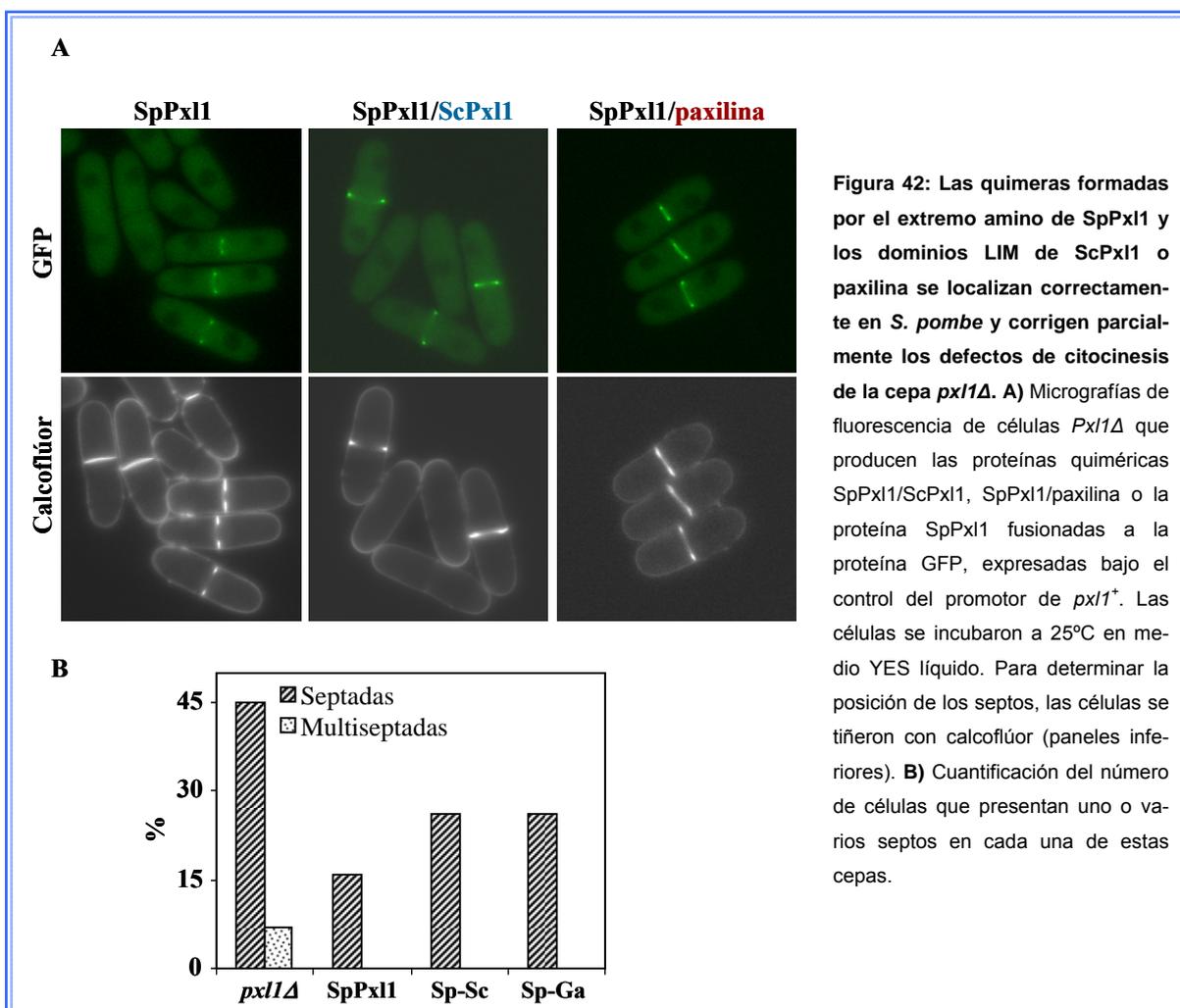




pombe, clonamos en el plásmido de sobreexpresión pREP41X, los genes *PXL1* de *S. cerevisiae* y *PAX* de *G. gallus* fusionados a la secuencia codificante de la proteína GFP en su extremo 5'. Transformamos con ellos la cepa *pxl1Δ* y observamos que ninguna de las proteínas se localiza de forma adecuada en este organismo y por tanto, tampoco son capaces de corregir los defectos de esta estirpe (figura 40). Esto puede ser debido a que la parte N-terminal de las tres proteínas es muy diferente entre sí y, como se ha

mencionado anteriormente, esta región se requiere para que SpPx11 se localice correctamente en *S. pombe*.

Para determinar si los dominios LIM de las proteínas de *S. cerevisiae* y de células animales son capaces de realizar las funciones de los dominios de la proteína de *S. pombe* generamos proteínas quiméricas formadas por el extremo amino de SpPx11 (aminoácidos 1



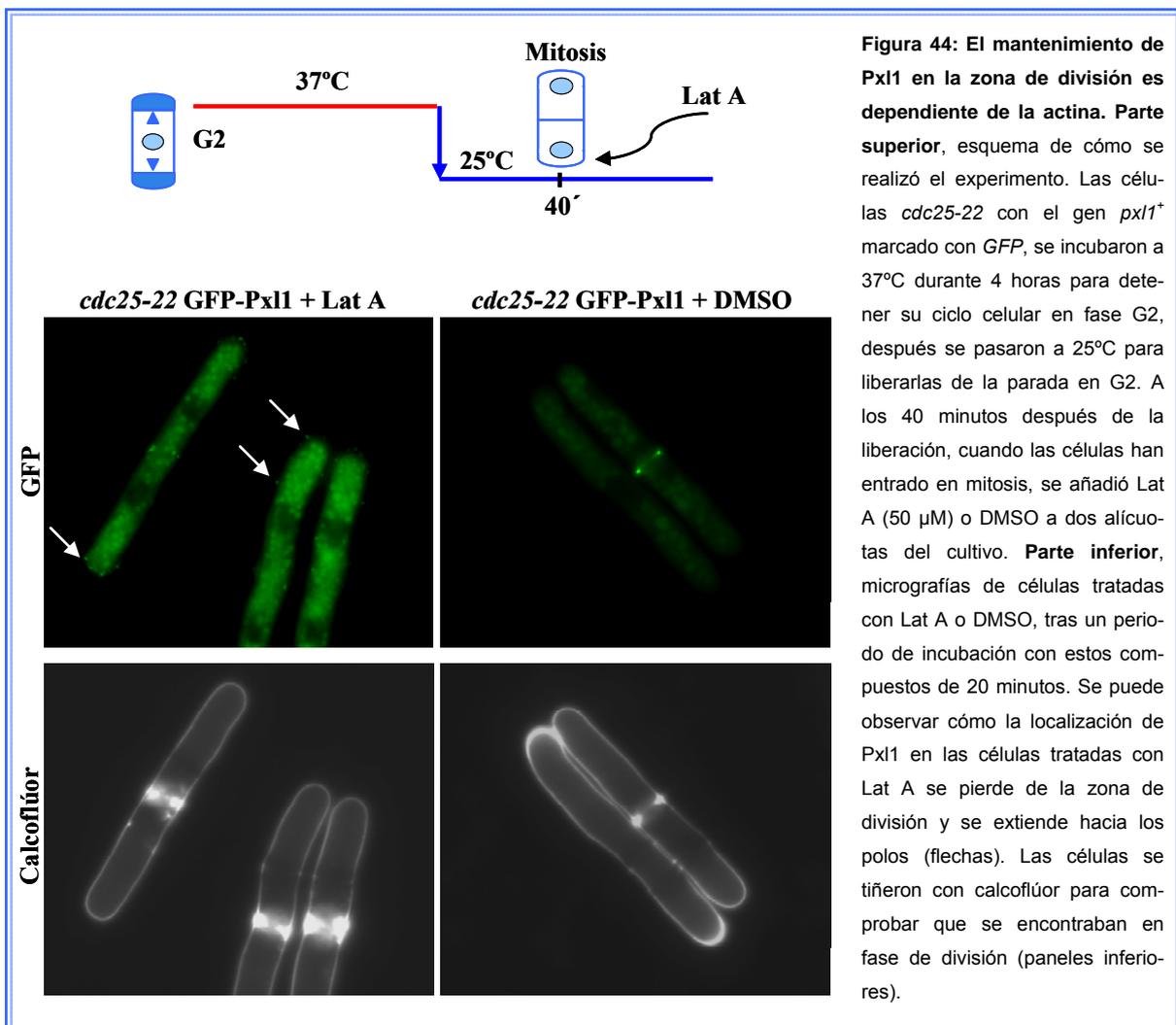
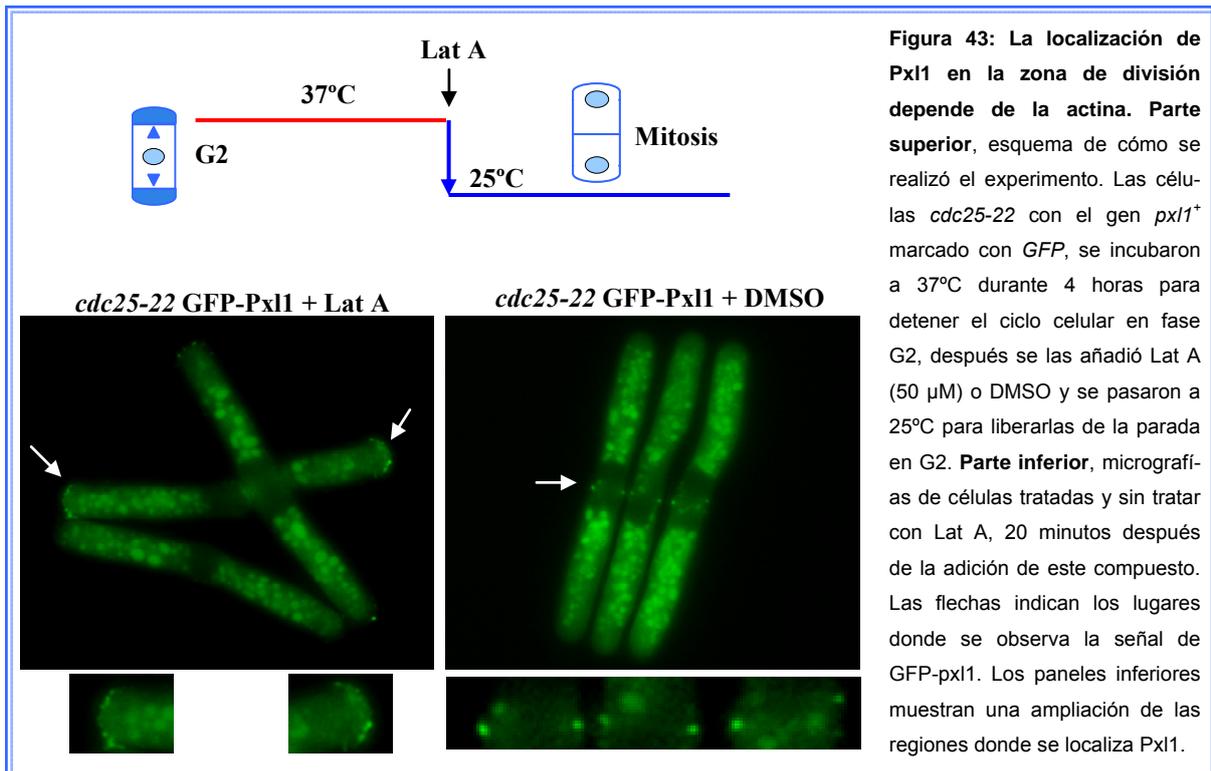
al 257) y los 4 dominios LIM de la paxilina (aminoácidos 325 a 560) o los 2 dominios LIM de ScPxl1 (aminoácidos 555 a 707) (figura 41). De esta manera esperábamos que fueran capaces de localizarse correctamente en *S. pombe*. Se fusionó la secuencia codificante de la proteína GFP al extremo 5' de cada quimera, bajo el control del promotor de *pxl1*⁺ y se clonaron en el plásmido integrativo pJK148. Estas construcciones se integraron en el locus *leu1*⁺ de la cepa *pxl1Δ*. Como era de esperar, ambas quimeras se localizan en la región de división de forma adecuada (figura 42A). Además, son capaces de complementar parcialmente el fenotipo de la cepa *pxl1Δ*, produciéndose una disminución del número de células con septo (de un 42% a un 26%; n=200) y desapareciendo las células multiseptadas (figura 42B). Por tanto esto nos indica que los dominios LIM de las proteínas de *S. cerevisiae* y *G. gallus* son capaces de realizar una función similar a los dominios LIM de Pxl1 y nos confirma que el extremo amino es necesario y suficiente para la localización de SpPxl1.

2.6. La localización de Pxl1 depende de la correcta formación del anillo de actomiosina y es independiente de la activación de la ruta SIN

Puesto que Pxl1 se localiza en la zona del ecuador celular formando un anillo que se contrae a medida que avanza el proceso de citocinesis como ocurre con el anillo contráctil de actomiosina (CAR), decidimos analizar si la localización de Pxl1 depende de la correcta formación del CAR y de la activación de la ruta SIN, necesaria para su contracción.

2.6.1. La localización de Pxl1 en la zona de división depende de la actina

El anillo contráctil de actomiosina está compuesto principalmente por actina polimerizada en forma de filamentos y por proteínas reguladoras como las miosinas de tipo II. En el proceso de citocinesis, la actina no sólo es necesaria para la contracción del anillo, sino que también se requiere para que muchas proteínas se localicen de forma correcta en esta región. Con el fin de comprobar si la actina es necesaria para la localización y/o mantenimiento de la localización de Pxl1 en la zona media de la célula, se añadió Latrunculina A (Lat A), una droga que despolimeriza la actina, a cultivos sincrónicos de la estirpe *cdc25-22 GFP-pxl1*⁺. Para determinar si la llegada de Pxl1 a la región de división y su posterior ensamblaje en forma de anillo son dependientes de actina, el cultivo de la cepa *cdc25-22* que expresa *GFP-pxl1*⁺ se paró en fase G2, incubándolo durante 4 horas a 37°C. Posteriormente al efectuar la liberación de los cultivos de la parada del ciclo celular en G2 se añadieron Lat A (50µM) o el solvente DMSO utilizado como control. Tras 20 minutos de incubación con estos compuestos a temperatura permisiva, en las células tratadas con DMSO ya pudimos observar anillos de Pxl1 en el ecuador celular, mientras que en las células tratadas con Lat A no se observó GFP-Pxl1 en la zona media, y se vio en regiones donde normal-



mente no se detecta; su señal se extendió hacia los polos celulares observándose como estructuras punteadas en esta región (figura 43). A la vista de este resultado se puede concluir que Pxl1 depende de la actina para su correcta localización en la zona de división celular.

Con el fin de comprobar si la actina también es necesaria para que Pxl1 se mantenga formando un anillo en la zona media una vez que se ha localizado, la estirpe *cdc25-22* que expresa *GFP-pxl1⁺* se paró en G2 incubándola a 37°C durante 4 horas. Posteriormente el cultivo se liberó de su parada en ciclo pasándolo a 25°C. A los 40 minutos después de la liberación, cuando Pxl1 ya se puede ver formando anillos, el cultivo se dividió en dos alícuotas a las que se añadió Lat A (a una concentración de 50µM) o DMSO. Se tomaron muestras de estos cultivos, observándose que tras 20 minutos de incubación con Lat A, la señal de Pxl1 se perdió en la zona de división y volvió a extenderse hacia los polos de la célula (figura 44).

Por tanto, con estos resultados se puede afirmar que la actina es necesaria tanto para la localización de Pxl1 en la región de división como para su mantenimiento en dicha zona formando un anillo.

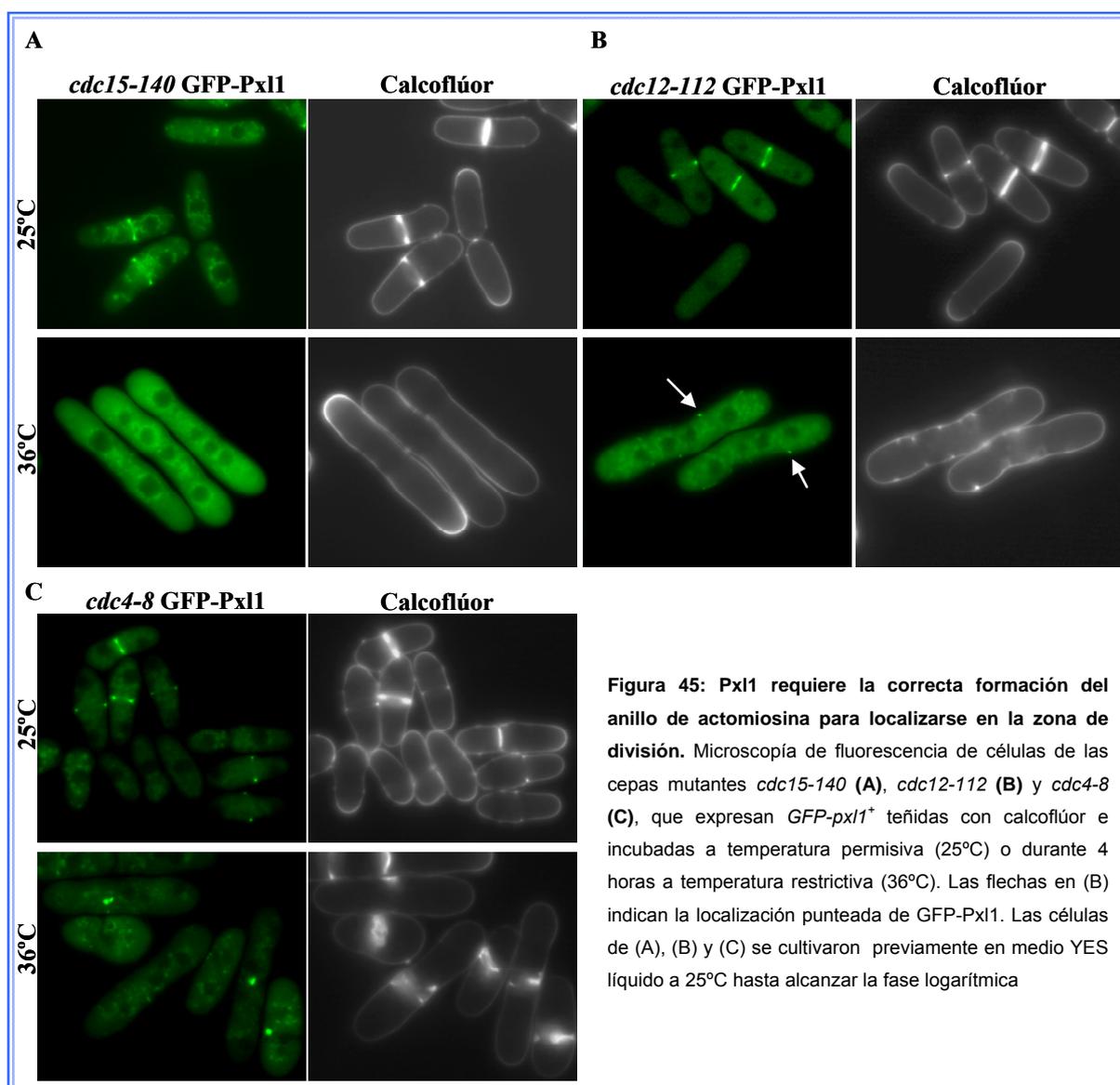
2.6.2. La correcta localización de Pxl1 depende de proteínas implicadas en la polimerización y ensamblaje del anillo contráctil de actomiosina

Para investigar más en detalle cómo se encuentra regulada la localización de Pxl1, analizamos GFP-Pxl1 en diferentes mutantes que presentan defectos en la polimerización y/o en el ensamblaje del CAR. En concreto examinamos la localización de Pxl1 en los mutantes *cdc15-140*, *cdc12-112* y *cdc4-8*. Cdc15 es una proteína esencial, necesaria para la correcta formación del anillo de actomiosina (Carnahan and Gould, 2003; Fankhauser *et al.*, 1995). La cepa *cdc15-140* presenta una mutación puntual en el gen *cdc15⁺* que la hace termosensible, de manera que a temperatura permisiva, 25°C, las células de esta cepa mutante presentan un aspecto normal, sin embargo a temperatura restrictiva, 36°C, la cepa mutante es incapaz de dividirse, aunque el ciclo mitótico y el crecimiento prosiguen normalmente, por lo que estas células presentan un aspecto alargado, sin septos y con varios núcleos. Esto se debe a que esta cepa a 36°C es capaz de formar anillos, pero estos anillos son inestables y no se mantienen hasta el inicio de la contracción del mismo (Balasubramanian *et al.*, 1998). Este defecto acaba provocando la muerte celular ya que las células son incapaces de dividirse.

Cuando analizamos la localización de Pxl1 en esta cepa observamos que GFP-Pxl1 se localiza correctamente en la zona media a temperatura permisiva. Sin embargo, cuando incubamos la cepa a temperatura restrictiva vimos que la fluorescencia correspondiente a

GFP-Pxl1 se encontraba difusa por el citoplasma en el 100% de las células (figura 45A). Este defecto de localización no se debe a la inestabilidad de GFP-Pxl1 a alta temperatura, ya que en una cepa silvestre, Pxl1 se localiza correctamente en la región media a 36°C (datos no mostrados).

La proteína Cdc12 es una formina esencial que se requiere para la polimerización de los filamentos de actina que forman parte del anillo contráctil (Chang *et al.*, 1997). La cepa *cdc12-112* es un mutante termosensible de esta proteína, incapaz de formar anillos a temperatura restrictiva, de tal manera que a esta temperatura las células son incapaces de dividirse, adquiriendo un aspecto similar al de las células *cdc15-140*. Cuando observamos la localización de Pxl1 en esta cepa a 36°C vimos que Pxl1 no formaba anillos, apareciendo su señal dispersa por el citoplasma y en ocasiones en puntos en zonas de la membrana donde debería haberse producido la división celular (Figura 45B).



Las miosinas de tipo II, otro de los componentes del anillo contráctil, son necesarias para su ensamblaje. En *S. pombe* existen dos cadenas pesadas de miosinas de tipo II, codificadas por los genes *myo2⁺* y *myo2⁺*, y dos cadenas ligeras codificadas por los genes *cdc4⁺* y *rlc1⁺*. Para determinar si la localización de Pxl1 depende de las miosinas del anillo observamos su localización en la cepa mutante termosensible *cdc4-8*. Esta cepa, incubada a la temperatura restrictiva, forma anillos de actomiosina anormales que dan lugar a septos más gruesos e irregulares que los de una cepa silvestre (McCollum *et al.*, 1995). Observamos que en esta estirpe a temperatura restrictiva, GFP-Pxl1 no se localiza de forma correcta sino que forma un punto brillante en el citoplasma en la zona donde se debería formar el anillo (figura 45C). Se ha descrito que Cdc12 se localiza de la misma forma en la estirpe *cdc4-377*, otro mutante termosensible afectado en *cdc4⁺* (Chang *et al.*, 1997). En estas células, la actina en vez de formar un anillo se acumula en un punto donde además se localiza Cdc12. Esta podría ser la causa de que Pxl1 se localice de esta forma.

Por tanto, el hecho de que Pxl1 requiera por un lado de actina, tanto para poder localizarse en la zona de división como para mantenerse en esta región, y por otro, de proteínas que participan en la polimerización y en el ensamblaje del anillo contráctil, como son Cdc15, Cdc12 y las miosinas de tipo II, nos indica que la existencia de un anillo de actomiosina correctamente formado y funcional es esencial para que Pxl1 se localice de forma adecuada en la región donde se va a producir la división celular.

2.6.3. La localización de Pxl1 es independiente de la señal generada por la ruta SIN

Una vez se ha formado el anillo de actomiosina, éste ha de contraerse a la vez que tiene lugar la síntesis del septo para que se produzca la correcta división de la célula. Esta sincronización depende de la activación de la ruta de inicio de septación (SIN). Como se ha descrito en la introducción, el complejo SIN consta de una serie de proteínas que forman parte de una cascada de señalización que provoca la contracción del anillo y el inicio de la síntesis del septo. Para determinar si la localización de Pxl1 requiere que la contracción del anillo y/o la síntesis del septo hayan comenzado, se emplearon cepas que portan mutaciones termosensibles en genes que forman parte de la ruta SIN, como son las cepas mutantes *cdc11-119* y *cdc16-116*.

Cdc11 es una proteína adaptadora necesaria para la localización de los componentes de la ruta SIN (excepto Sid4) en el cuerpo polar del huso mitótico. La cepa mutante termosensible *cdc11-119*, a temperatura restrictiva es capaz de formar anillos de actomiosina, sin embargo estos anillos no se contraen y no se forma el septo de división (Krapp *et al.*, 2004), de tal manera que se originan células alargadas sin septo y con múltiples núcleos. Cuando observamos la localización de GFP-Pxl1 en esta cepa mutante a temperatura res-

trictiva, vimos que se localiza de forma correcta en la región de división (figura 46A). Este resultado nos indica que no es necesario que se active la contracción del anillo y la síntesis del septo para que Pxl1 se localice de forma adecuada.

Cdc16 es un regulador negativo de la GTPasa Spg1, que activa la ruta SIN. La cepa mutante *cdc16-116* a temperatura restrictiva forma múltiples septos en una sola célula debido a un defecto en la inactivación de la ruta (Furge *et al.*, 1998; Minet *et al.*, 1979). Se ha descrito que proteínas como Chs2 y Bgs1, relacionadas con la contracción del anillo y con la síntesis del septo, requieren que la ruta SIN se inactive para desaparecer de la región media, de tal manera que en la cepa *cdc16-116* permanecen en los múltiples septos que se forman (Cortés *et al.*, 2002; Martín-García and Valdivieso, 2006). Cuando analizamos la localización de GFP-Pxl1 en la cepa mutante *cdc16-116* a temperatura restrictiva, vimos que Pxl1 se localiza únicamente en los septos en formación y no en los que ya se encuentran completamente formados (figura 46B). Por tanto, este resultado y el anterior nos indican que la señal generada por la ruta SIN no es necesaria para que Pxl1 se localice en la zona de división, y que tampoco se requiere que la ruta SIN se inactive para que Pxl1 abandone esta zona una vez el septo se ha sintetizado.

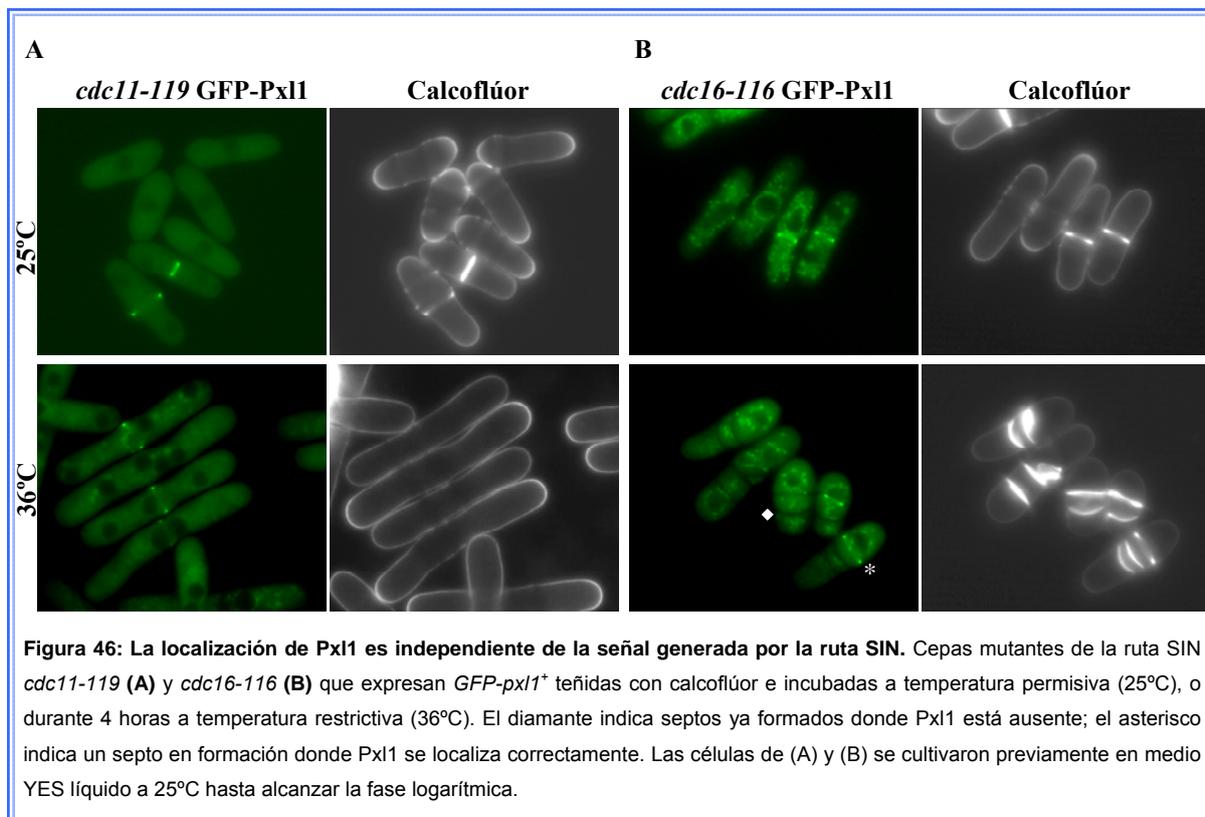
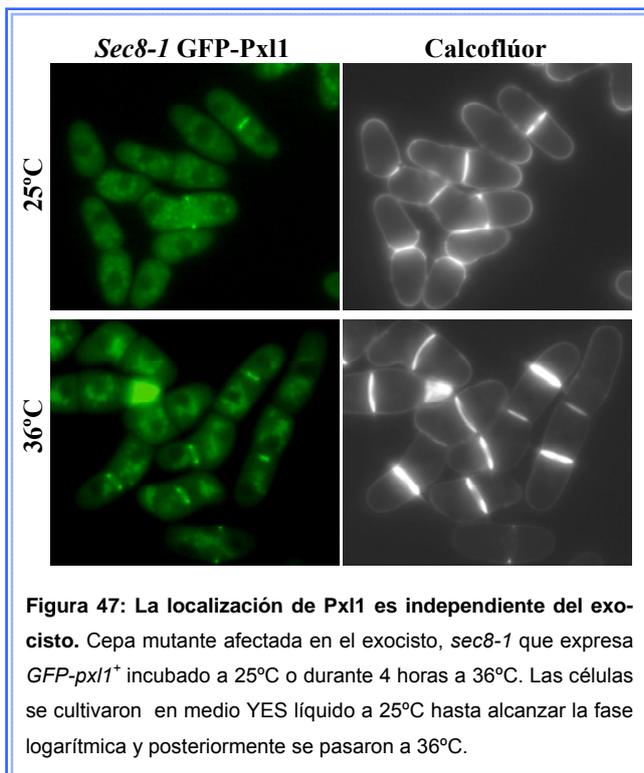


Figura 46: La localización de Pxl1 es independiente de la señal generada por la ruta SIN. Cepas mutantes de la ruta SIN *cdc11-119* (A) y *cdc16-116* (B) que expresan *GFP-pxl1⁺* teñidas con calcoflúor e incubadas a temperatura permisiva (25°C), o durante 4 horas a temperatura restrictiva (36°C). El diamante indica septos ya formados donde Pxl1 está ausente; el asterisco indica un septo en formación donde Pxl1 se localiza correctamente. Las células de (A) y (B) se cultivaron previamente en medio YES líquido a 25°C hasta alcanzar la fase logarítmica.

2.6.4. La localización de Pxl1 es independiente del exocisto



El exocisto es un complejo multiproteico importante para el transporte y fusión de vesículas derivadas del aparato de Golgi a la membrana plasmática en diferentes organismos. En *S. pombe* está formado por, al menos, cinco proteínas que interaccionan entre sí, Sec6, Sec8, Sep10, Sep15 y Exo70, y se ha relacionado con el proceso de separación celular (Wang *et al.*, 2002). Para analizar si la localización de Pxl1 depende de este complejo se utilizó el mutante puntual *sec8-1*, alterado en el componente del exocisto Sec8. Esta cepa mutante presenta defectos en separación celular que originan células multiseptadas a todas

las temperaturas, siendo más acusados a 36°C. GFP-pxl1 se localiza correctamente en esta cepa tanto a 25°C como a 36°C, por lo que su localización tampoco depende de este complejo (figura 47).

2.7. La cepa mutante *pxl1Δ* presenta interacción genética con diversas cepas mutantes afectadas en el proceso de citocinesis

La observación del fenotipo que presenta la cepa mutante *pxl1Δ* nos sugiere que Pxl1 pueda ejercer alguna función durante el proceso de citocinesis de *S. pombe*. Para determinar la posible función de Pxl1 en este proceso, una de las estrategias utilizadas fue la búsqueda de interacciones genéticas entre la cepa mutante *pxl1Δ* y cepas mutantes afectadas en diferentes pasos del proceso de citocinesis. Para ello se analizó el crecimiento y la morfología a diferentes temperaturas de cepas dobles mutantes carentes del gen *pxl1⁺* y afectadas en diferentes componentes de la maquinaria de citocinesis: Mid1, componentes del anillo de actomiosina, glucán sintetas y componentes del anillo de septinas. En la [tabla II](#) se muestra gráficamente todas las interacciones genéticas analizadas.

Mid1 es una anilina que interacciona con Myo2 y actúa posicionando el anillo en la zona media de la célula (Paoletti and Chang, 2000). La cepa doble mutante *pxl1Δ mid1Δ* no es

Tabla II: Interacciones genéticas de *pxl1Δ* con mutantes de citocinesis. En rojo se resaltan las interacciones genéticas encontradas.

Mutante	Temperatura (°C)	25	28	32	35	37
<i>mid1Δ</i>		++	++	++	--	--
<i>pxl1Δ mid1Δ</i>		--	±	+	--	--
<i>cdc15-140</i>		++	++	++	--	--
<i>pxl1Δ cdc15-140</i>		++	--	--	--	--
<i>cdc12-112</i>		++	++	++	--	--
<i>pxl1Δ cdc12-112</i>		++	++	++	--	--
<i>rlc1Δ</i>		±±	±±	++	++	++
<i>pxl1Δ rlc1Δ</i>		--	±	+	±±	±±
<i>myo2-E1</i>		++	++	++	--	--
<i>pxl1Δ myo2-E1</i>		+	--	--	--	--
<i>cdc4-8</i>		++	++	++	--	--
<i>pxl1Δ cdc4-8</i>		--	--	--	--	--
<i>rng2-D5</i>		++	++	++	--	--
<i>pxl1Δ rng2-D5</i>		--	--	--	--	--
<i>myp2Δ</i>		++	++	++	++	++
<i>pxl1Δ myp2Δ</i>		++	++	++	++	++
<i>cps1-12</i>		++	++	++	±±	--
<i>pxl1Δ cps1-12</i>		--	--	--	--	--
<i>cps1-191</i>		++	++	++	±±	--
<i>pxl1Δ cps1-191</i>		--	--	--	--	--
<i>cps1-N12</i>		++	++	++	±±	--
<i>pxl1Δ cps1-N12</i>		--	--	--	--	--
<i>cwg1-1</i>		++	++	++	±±	--
<i>pxl1Δ cwg1-1</i>		++	++	++	±±	--
<i>mid2Δ</i>		++	++	++	++	++
<i>pxl1Δ mid2Δ</i>		++	++	++	++	++
<i>spn3Δ</i>		++	++	++	++	++
<i>spx1Δ spn3Δ</i>		++	++	++	++	++

++ Crecimiento normal ±± Crecimiento moderado + Crecimiento lento
 ± Crecimiento muy lento -- No crecimiento

viable a 25°C y crece lentamente a 28°C y 32°C (figura 48A).

Dentro de los componentes del anillo de actomiosina, en primer lugar analizamos la interacción genética entre *pxl1*⁺ y los genes que codifican para las miosinas de tipo II: *myo2*⁺, *rlc1*⁺, *cdc4*⁺ y *myp2*⁺. La cepa mutante *myo2-E1* presenta una mutación termosensible en la cadena pesada de la miosina de tipo II, Myo2, esencial en *S. pombe* (Balasubramanian *et al.*, 1998). A temperatura restrictiva, esta cepa, da lugar a células multiseptadas con septos anormales. La cepa doble mutante *pxl1Δ myo2-E1* crece lentamente a 25°C y es inviable a partir de 28°C (figura 48B). *rlc1*⁺ codifica la cadena reguladora de miosinas de tipo II. La cepa mutante *rlc1Δ* es viable, sin embargo, a bajas temperaturas presenta células multiseptadas con anillos de actomiosina aberrantes (Le Goff *et al.*, 2000). La cepa doble mutante *pxl1Δ rlc1Δ* es inviable a 25°C y crece menos que las parentales al resto de temperaturas (figura 48C). *cdc4*⁺ codifica la cadena esencial de miosinas de tipo II. No fuimos capaces de obtener cepas dobles mutantes viables *pxl1Δ cdc4-8*. Las esporas *pxl1Δ cdc4-8*

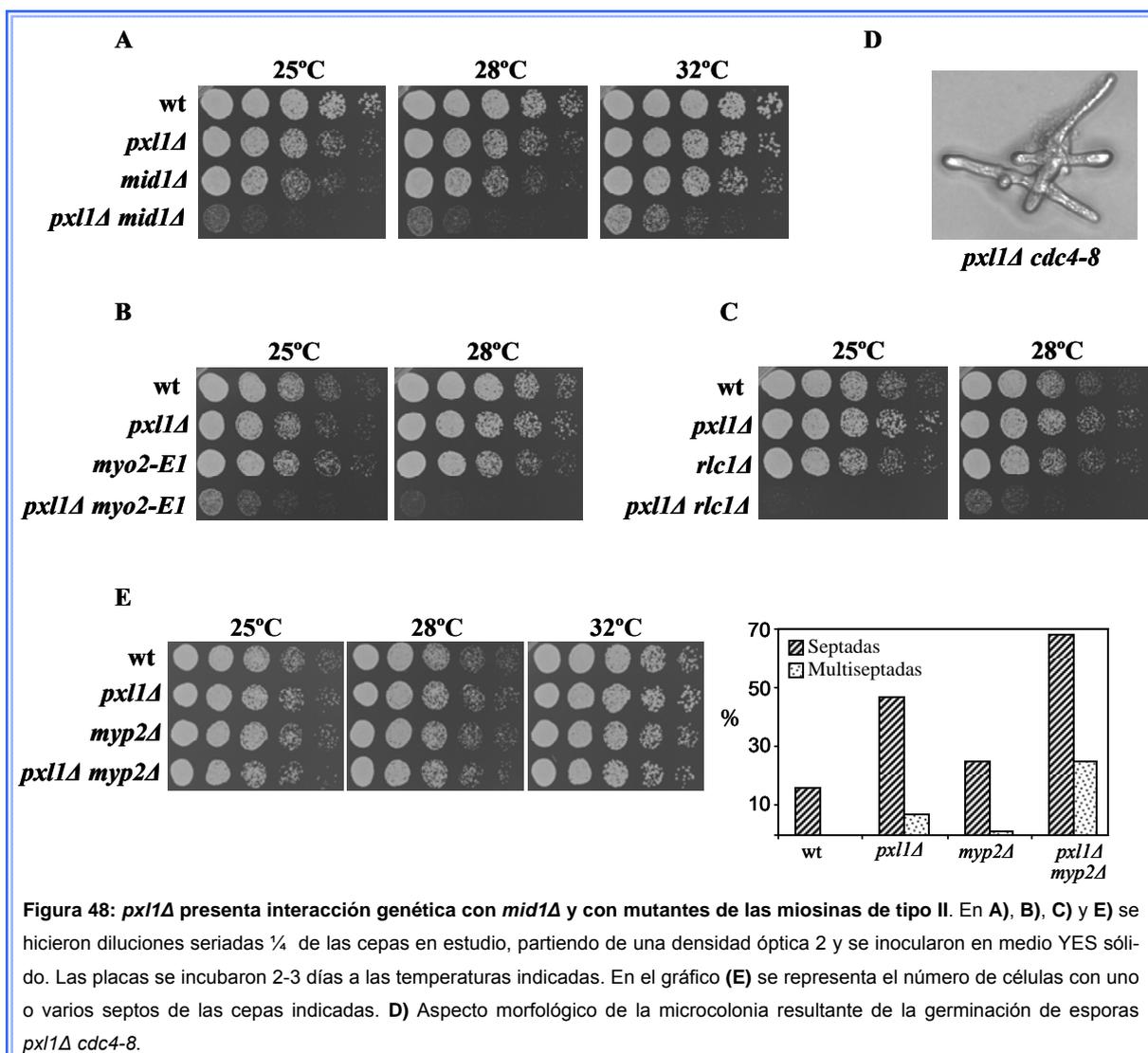
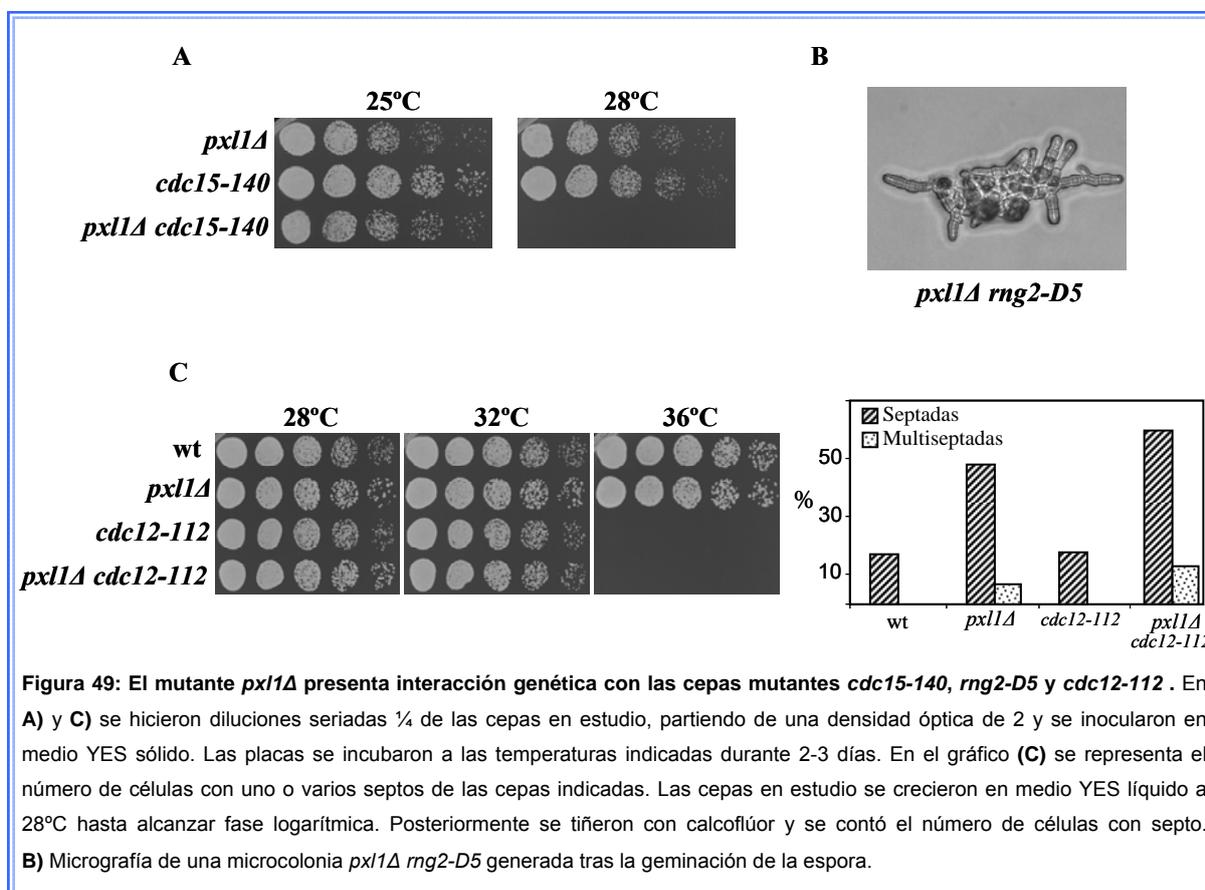


Figura 48: *pxl1Δ* presenta interacción genética con *mid1Δ* y con mutantes de las miosinas de tipo II. En A), B), C) y E) se hicieron diluciones seriadas ¼ de las cepas en estudio, partiendo de una densidad óptica 2 y se inocularon en medio YES sólido. Las placas se incubaron 2-3 días a las temperaturas indicadas. En el gráfico (E) se representa el número de células con uno o varios septos de las cepas indicadas. D) Aspecto morfológico de la microcolonia resultante de la germinación de esporas *pxl1Δ cdc4-8*.

germinan originando células multiseptadas y ramificadas que son incapaces de formar una colonia (figura 48D). *myp2⁺* codifica una cadena pesada de miosina de tipo II no esencial para el proceso de citocinesis. Las células *pxl1Δ myp2Δ* no presentan defectos de crecimiento, sin embargo el índice de septación es mayor (figura 48E).

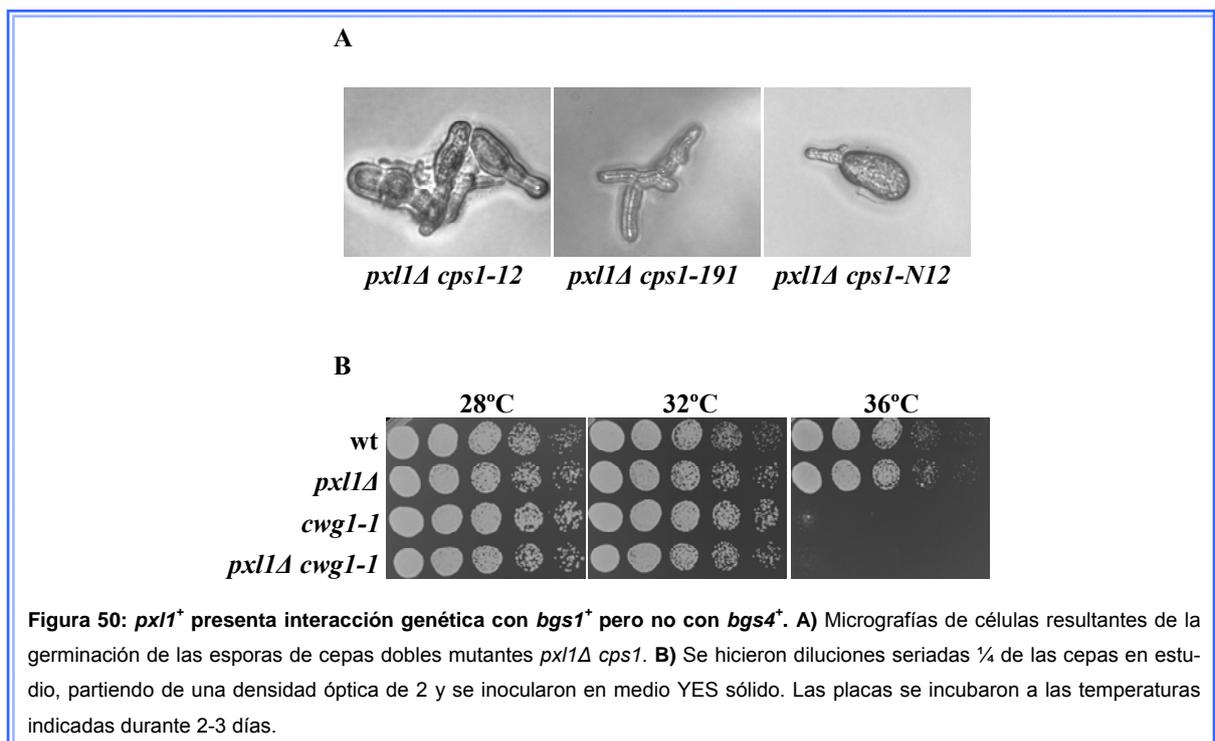
Otros genes relacionados con la formación del CAR con los que analizamos si *pxl1⁺* presentaba interacción genética fueron: *cdc15⁺*, *rng2⁺* y *cdc12⁺*. La proteína Cdc15 interviene en la estabilización de anillo. La cepa doble mutante *pxl1Δ cdc15-140* crece de forma similar a las parentales a 25°C, sin embargo, es incapaz de crecer a 28°C (figura 49A). Rng2 es un componente esencial del anillo de actomiosina necesario para la formación del anillo después del ensamblaje de la actina en el ecuador celular. La cepa mutante termosensible *rng2-D5* es incapaz de ensamblar la actina en forma de anillo en la zona de división (Eng et al., 1998). La cepa doble mutante *pxl1Δ rng2-D5* resultó ser inviable, las esporas germinan y dan lugar a células similares a las de la cepa *pxl1Δ cdc4-8* (figura 49B).

Cdc12 es la formina implicada en la polimerización de la actina del CAR (Chang et al., 1997). Mediante análisis del crecimiento de la cepa doble mutante *pxl1Δ cdc12-112* no vimos diferencias con respecto a las cepas parentales aunque sí un ligero incremento en el número de células septando (figura 49C).



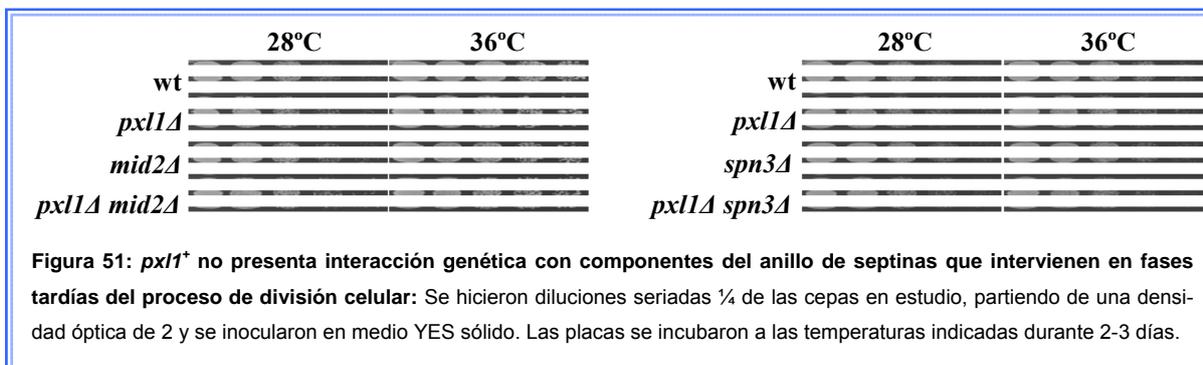
Todas estas interacciones con genes que participan en la formación del anillo de actomiosina sugieren que Pxl1 podría realizar alguna función en este proceso.

A continuación analizamos también la interacción genética entre *pxl1*⁺ y los genes *bgs1*⁺ y *bgs4*⁺ que codifican las subunidades catalíticas de la β-(1,3)-glucán sintasa responsables de la formación del septo primario y de la pared celular respectivamente (Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2007). Observamos letalidad sintética de *pxl1Δ* con cualquiera de los alelos termosensibles de *bgs1*⁺: *cps1-12*, *cps1-N12* y *cps1-191*. Las esporas de estos dobles mutantes son capaces de germinar, sin embargo las células que originan son incapaces de formar una colonia (figura 50A). Por el contrario, la falta de *pxl1*⁺ no agrava los defectos de la cepa *cwg1-1*, una cepa mutante termosensible de *bgs4*⁺ (figura 50B). Este resultado sugiere que Pxl1 y Bgs1 podrían estar colaborando en algún proceso esencial de la citocinesis, que estaría relacionado con la síntesis del septo primario, puesto que esta es la función de Bgs1 (Cortés *et al.*, 2007), o con la coordinación entre la síntesis del septo y el proceso de contracción del anillo.



Finalmente analizamos la relación de Pxl1 con algunos componentes del anillo de septinas, como la septina Spn3 o Mid2. Las septinas son proteínas necesarias para la que se produzca la separación celular al final del proceso de división. Spn3 participa, al igual que el resto de septinas, en las últimas etapas del proceso de división celular. Mid2 es una anillina encargada de estabilizar el anillo de septinas cuya delección genera defectos en las últimas etapas del proceso de citocinesis (Berlin *et al.*, 2003). Ninguna de las cepas dobles

mutantes *pxl1Δ mid2Δ* y *pxl1Δ spn3Δ* muestra defectos de crecimiento a las diferentes temperaturas analizadas (figura 51). En conjunto, estos datos indican que Pxl1 actuaría colaborando con proteínas que participan en la formación del anillo de actomiosina y del septo primario pero no con proteínas que ejercen su actividad en las últimas fases del proceso de división celular como, por ejemplo, Mid2 o las septinas.



2.8. Pxl1 forma parte del anillo de actomiosina

Ya que Pxl1 se localiza formando un anillo contráctil en la región de división de forma similar al anillo contráctil de actomiosina, que su localización depende de la correcta formación de este anillo y que, además, *pxl1*⁺ presenta interacción con genes que codifican los componentes del anillo, nos preguntamos si Pxl1 podría formar parte de esta estructura. Para intentar responder esta pregunta se llevaron a cabo dos aproximaciones experimentales: 1) Analizar de manera simultánea la localización de Pxl1 y de proteínas que forman parte del CAR, 2) Realizar ensayos de coimmunoprecipitación entre Pxl1 y proteínas del CAR.

Para realizar los experimentos de colocalización, construimos una cepa que lleva marcada la proteína Pxl1 con la proteína cherryRFP en el extremo N-terminal bajo el control de su promotor, y observamos su localización de manera simultánea con proteínas del anillo marcadas con GFP. Las proteínas del CAR utilizadas fueron: GFP-Myo2, GFP-Cdc15, Cdc12-3YFP y Myp2-GFP.

Observamos colocalización de cherryRFP-Pxl1 con GFP-Myo2 durante la contracción del anillo contráctil (figura 52A). Según el estudio espacio-temporal de la formación y contracción del anillo de actomiosina, realizado por Wu y colaboradores (Wu *et al.*, 2003), Myo2 es una de las primeras proteínas que se localiza en la zona de división celular. En las primeras etapas del proceso de citocinesis, unos 10 minutos antes de que se produzca la separación de los SPB, Myo2 aparece en la zona del ecuador celular formando una especie de “nodos” que posteriormente se compactan formando un anillo antes de que finalice la anafase B (Wu *et al.*, 2006). En esta fase, Pxl1 no aparece en la zona de división for-

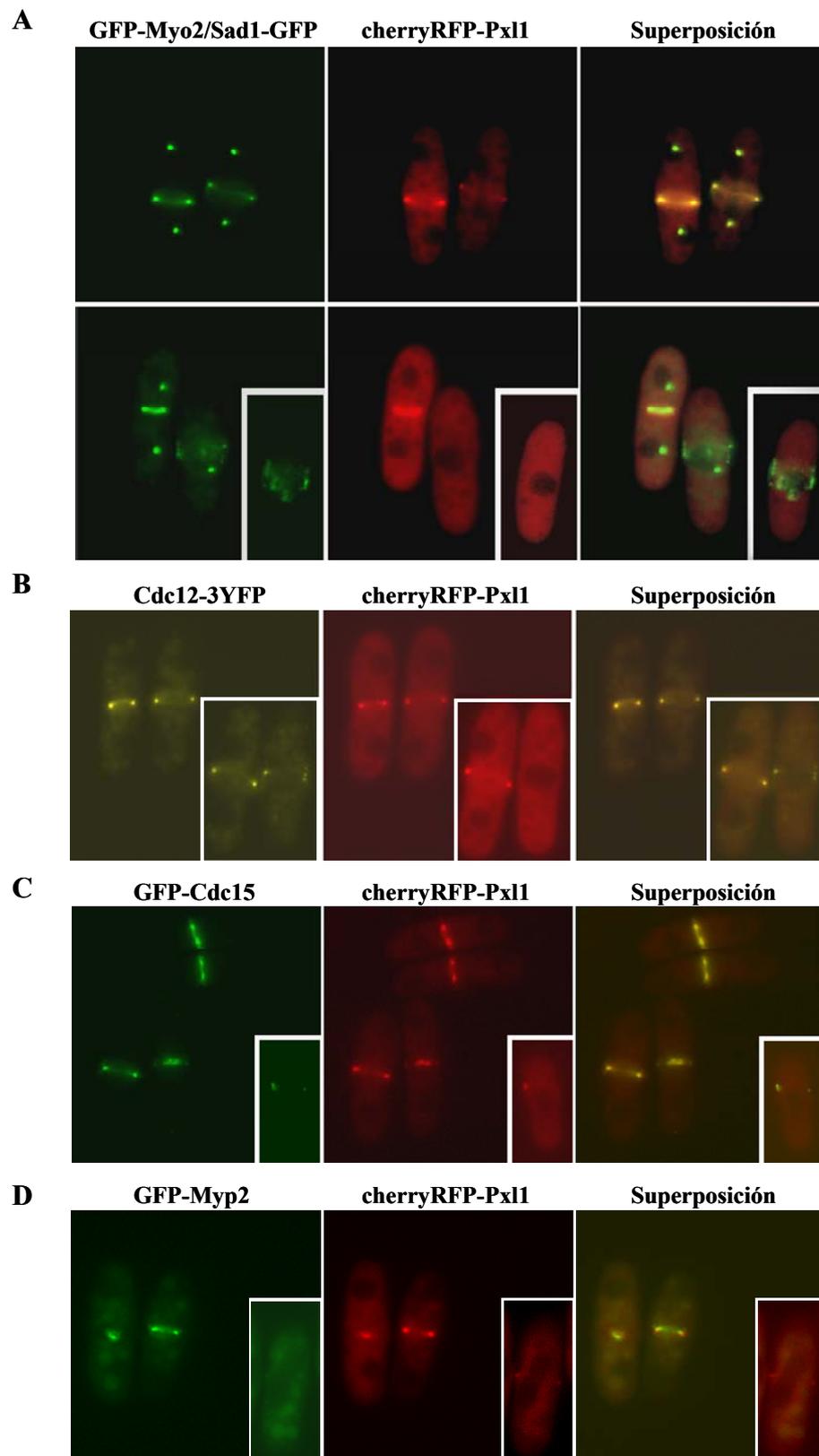


Figura 52: Pxl1 colocaliza con proteínas que forman parte del anillo de actomiosina. Micrografías de fluorescencia de células *CherryRFP-pxl1*⁺ que expresan *GFP-myo2*⁺/*sad1*⁺-*GFP* (**A**), *cdc12*⁺-*3YFP* (**B**), *GFP-cdc15*⁺ (**C**) o *myp2*⁺-*GFP* (**D**), incubadas a 25°C en medio YES líquido hasta alcanzar la fase logarítmica. Se puede observar que Pxl1 colocaliza con todas estas proteínas durante la contracción del anillo. El recuadro en cada figura muestra en detalle una célula en la fase inicial de la formación del anillo.

mando “nodos”, lo que nos indica que llega a la zona de división más tarde que Myo2.

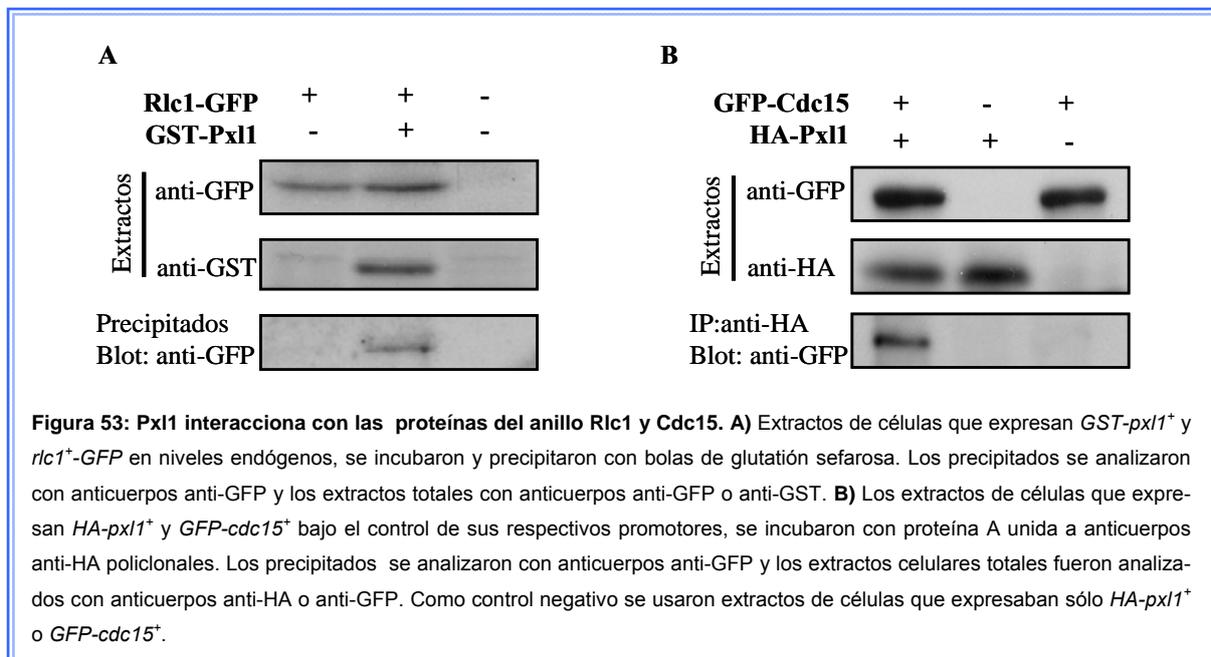
También observamos colocalización entre cherryRFP-Pxl1 con GFP-Cdc15 y con Cdc12-3YFP durante el proceso de contracción del anillo (figuras 52B y C). Estas dos proteínas, al igual que ocurre con Myo2, se concentran en la zona de división formando “nodos” alrededor del núcleo en las primeras etapas del proceso de citocinesis. Cdc15 y Cdc12 llegan a esta zona unos 5 minutos después que Myo2. Pudimos observar células en las primeras etapas del proceso de división que presentan señal de Cdc12-3YFP y no de cherryRFP-Pxl1. También vimos que cuando GFP-Cdc15 se encuentra formando los “nodos”, Pxl1 aparece formando un solo punto en esta zona de división, lo que indica que Pxl1 llega a esta región de forma casi simultánea a Cdc15.

Otra miosina de tipo II presente en *S. pombe* es la codificada por el gen *myp2*⁺. Esta miosina de tipo II, al contrario que *myo2*⁺, no es esencial y parece estar implicada en el proceso de citocinesis cuando ésta tiene lugar en condiciones de estrés, por ejemplo, con altas concentraciones de sales en el medio o a baja temperatura (Bezanilla *et al.*, 1997). Myp2 también se localiza formando un anillo en la zona de división. A diferencia de Myo2, no forma “nodos” en las primeras etapas de la citocinesis ya que llega a esta zona unos 10 minutos después de la formación del anillo contráctil en el que ya se encuentran las proteínas Myo2, Cdc15 y Cdc12. Observamos colocalización entre Myp2-GFP y cherryRFP-Pxl1 durante la contracción del anillo (figura 52D), sin embargo hay células que presentan señal de Pxl1 y no de Myp2, lo que indica que Pxl1 llega a esta zona antes que esta miosina.

Por tanto, Pxl1 parece localizarse en el anillo de actomiosina ya que colocaliza con varias proteínas que forman parte de esta estructura como son Myo2, Cdc15, Cdc12 y Myp2. Pxl1 llegaría a esta zona más tarde que Myo2 y antes que Myp2, en un periodo de tiempo similar a la aparición de Cdc15 en esta región.

Con objeto de profundizar en la posible relación de Pxl1 con el CAR quisimos ver si Pxl1 era capaz de interactuar con alguna de las proteínas que forman parte de esta estructura. En primer lugar llevamos a cabo un ensayo de “pull-down” usando cepas que expresaban *GST-pxl1*⁺, *rlc1*⁺-GFP o ambos genes bajo el control de sus respectivos promotores. Los extractos de estas estirpes se incubaron con bolas de glutatión sefarosa y posteriormente los precipitados celulares se analizaron con anticuerpos anti-GFP. Como se ve en la figura 53A, Pxl1 interactúa con Rlc1. También quisimos determinar si Pxl1 era capaz de interactuar con Cdc15. En este caso, para ver si hay interacción entre estas dos proteínas realizamos un ensayo de coimmunoprecipitación usando una cepa que expresa *HA-pxl1*⁺ y *GFP-cdc15*⁺ a niveles endógenos. Los extractos celulares de esta cepa y de los respectivos controles se incubaron con proteína A unida a anticuerpos anti-HA. Los precipitados y extractos se analizaron con anticuerpos anti-HA o anti-GFP para detectar la presen-

cia de Pxl1 y Cdc15 respectivamente. Como se muestra en la [figura 53B](#), Pxl1 interacciona también con Cdc15. Por tanto los resultados obtenidos con los experimentos de colocalización y los ensayos de interacción entre proteínas, nos indican que Pxl1 forma parte de la estructura del anillo de actomiosina.



2.9. Pxl1 se requiere para la organización correcta de las miosinas de tipo II en el anillo contráctil

Hemos visto que Pxl1 presenta interacción genética con múltiples genes implicados en el proceso de citocinesis y que forma parte del anillo contráctil de actomiosina. Teniendo en cuenta los datos anteriores se podría pensar que los defectos de *pxl1Δ* en el proceso de citocinesis fueran consecuencia de la existencia de defectos en la formación, la contracción y/o el desensamblaje del anillo contráctil. Con el fin de determinar si esta hipótesis era correcta quisimos comparar el comportamiento de las miosinas de tipo II y de otras proteínas implicadas en la citocinesis en una cepa silvestre y en la cepa mutante *pxl1Δ*, analizando su localización mediante microscopía de fluorescencia.

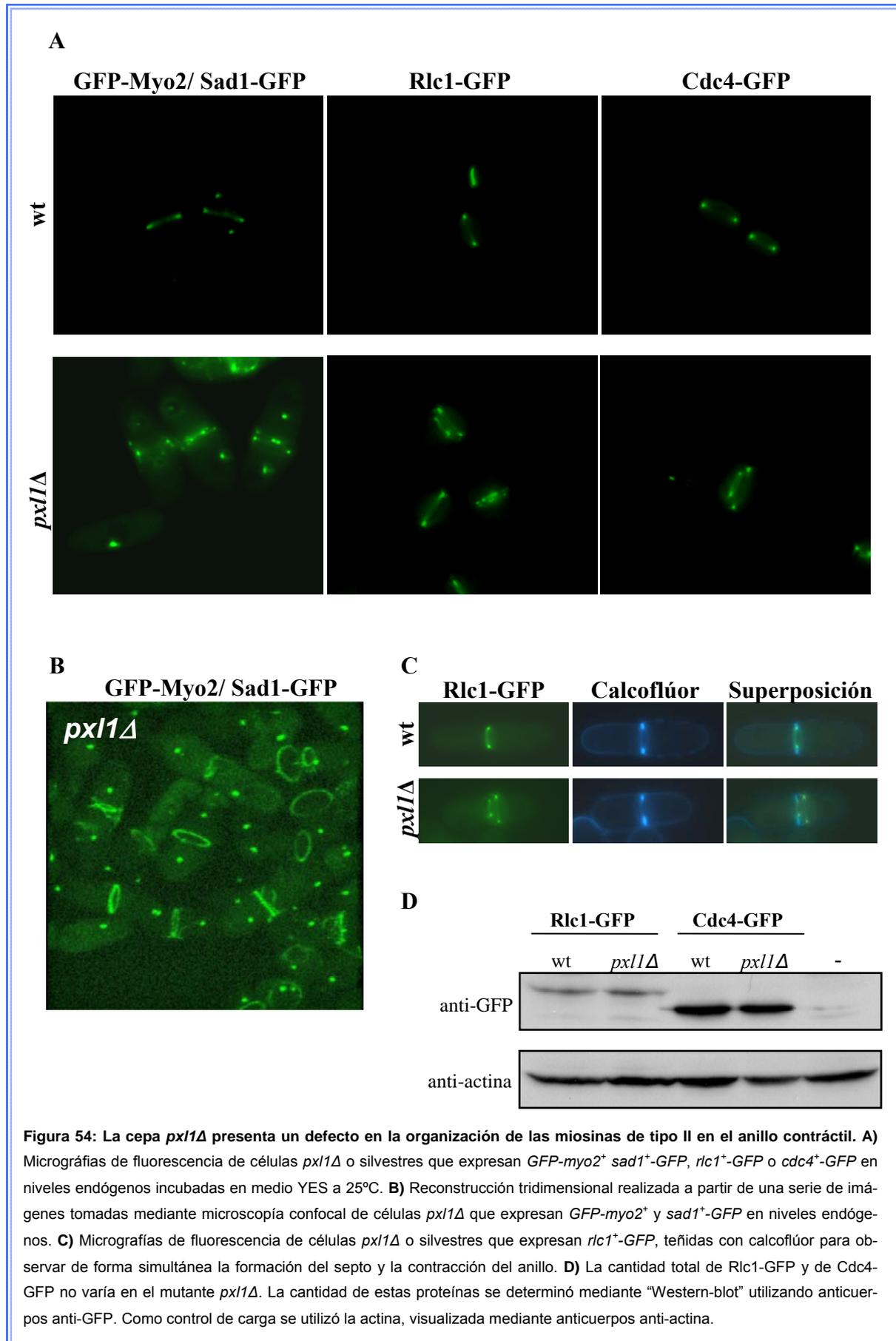
Analizamos la localización de GFP-Myo2, en una cepa con Sad1-GFP que marca el SPB, de Rlc1-GFP y de Cdc4-GFP. Estas tres proteínas se localizan en la zona de división en la cepa *pxl1Δ*, sin embargo la formación del anillo no siempre es correcta ([figura 54](#)). Cuando observamos cualquiera de estas tres proteínas vemos células que presentan anillos irregulares (47%, 50% y 51% con GFP-Myo2, Rlc1-GFP y Cdc4-GFP, respectivamente; n = 125) que no aparecen en la estirpe silvestre ([figura 54A](#) y [vídeos 1, 2 y 3](#)). En muchos de estos anillos irregulares se observan filamentos desorganizados conectados a esta es-

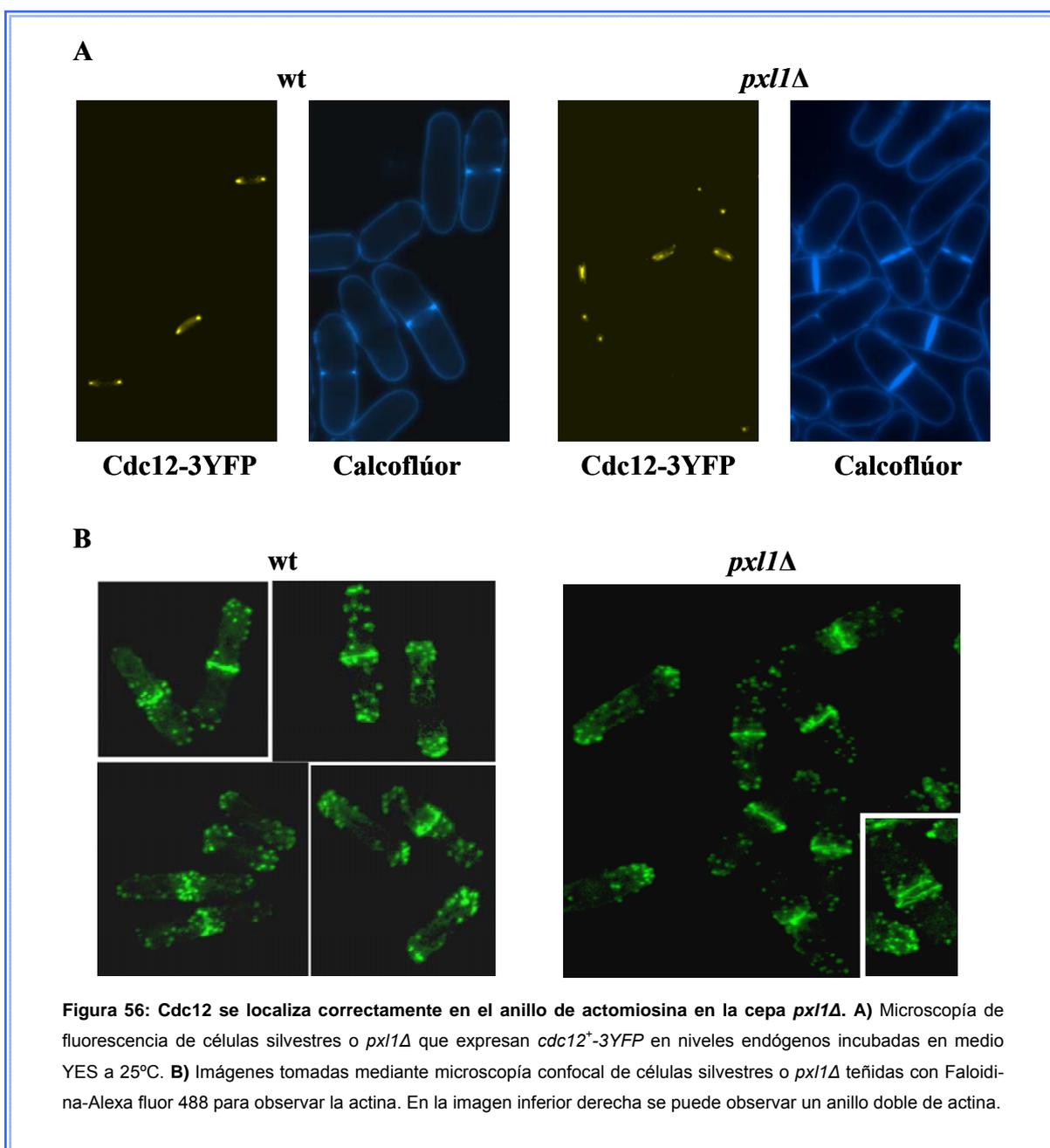
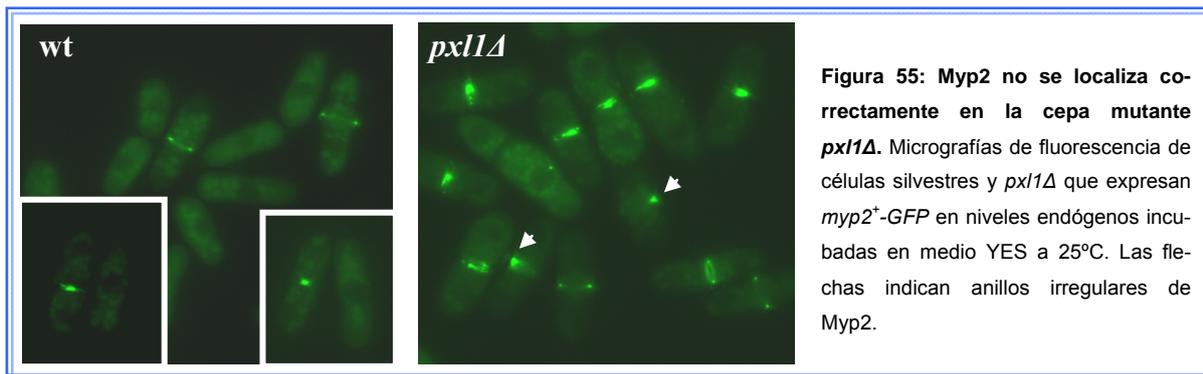
estructura o flotando a su alrededor (figura 54B). Además en algunas células observamos que la señal de fluorescencia de estas tres miosinas no solapa con el material de pared del septo teñido con calcoflúor (19, 18 y 22% en GFP-Myo2, Rlc1-GFP y Cdc4-GFP, respectivamente; n = 125) y se observa la presencia de dos anillos próximos entre sí (figura 54C y vídeos 1, 2 y 3). En estas células con más de un anillo sólo uno se contrae y forma septo, el otro anillo permanece sin contraerse hasta su desaparición. Este defecto de la cepa *pxl1Δ* podría ser debido a un aumento en la cantidad total de miosinas en la célula. Para comprobarlo obtuvimos extractos en una estirpe silvestre y en una cepa mutante *pxl1Δ* que presentan Rlc1-GFP y Cdc4-GFP y analizamos los niveles de estas proteínas mediante un ensayo de tipo “Western-blot” empleando anticuerpos anti-GFP, comparando así la cantidad de estas dos proteínas en ambas estirpes. Como se aprecia en la figura 54D, la cantidad de Rlc1-GFP o de Cdc4-GFP es la misma en ambas cepas, lo que indica que el fenotipo observado en el mutante *pxl1Δ* no se debe a un aumento en la cantidad total de estas proteínas en la célula y que, probablemente, sea debido a un defecto en la organización de las miosinas en el anillo contráctil.

La otra miosina de tipo II que está presente en *S. pombe* y forma parte del anillo es Myp2. Puesto que hemos observado un aumento del número de células septando en el doble mutante *pxl1Δ myp2Δ* y que Myp2 también participa en citocinesis, analizamos la localización de Myp2-GFP en el mutante *pxl1Δ*. Vimos que en la cepa mutante aparecen bastantes anillos de Myp2-GFP irregulares (41%; n = 90). Sin embargo, nunca observamos anillos dobles de esta proteína. También vimos un alto número de células que acumulan Myp2-GFP en las fases finales del proceso de división, lo que podría ser debido al retraso en la finalización de estas etapas finales (figura 55). Por tanto hay un claro defecto en la organización de las miosinas de tipo II cuando Pxl1 esta ausente.

Otras proteínas que forman parte del anillo contráctil son Cdc15 y la formina Cdc12. No conseguimos ver la localización de Cdc15 en *pxl1Δ* ya que tanto la cepa con GFP-Cdc15 como la que lleva Cdc15-GFP en combinación con *pxl1Δ* resultaron ser inviables, lo que sugiere que la proteína Cdc15 fusionada con la proteína GFP no es completamente funcional y que en ausencia de Pxl1 esta disfunción es letal.

Cuando observamos la localización de Cdc12-3YFP en la cepa mutante *pxl1Δ* y la comparamos con una cepa silvestre, vimos que se localiza correctamente, no observando diferencias de localización entre ambas cepas (figura 56A). Cdc12 se encarga de la polimerización de la actina del anillo. Ya que esta formina se localiza de forma correcta en la cepa *pxl1Δ*, realizamos una tinción de actina con Faloidina-Alexa fluor 488 para ver si el anillo presentaba defectos en la organización de la actina. En la mayoría de células *pxl1Δ* los anillos de actina son similares a los de una cepa silvestre y sólo en una pocas células (<1%)



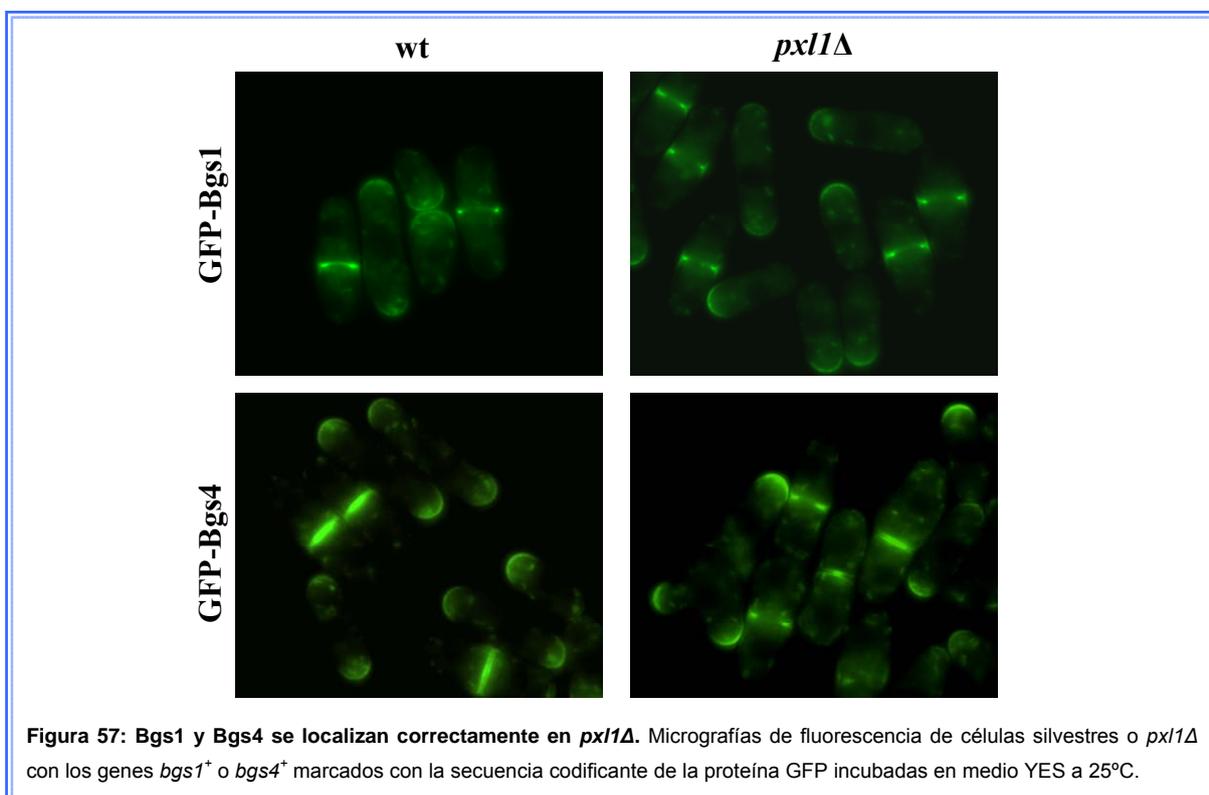


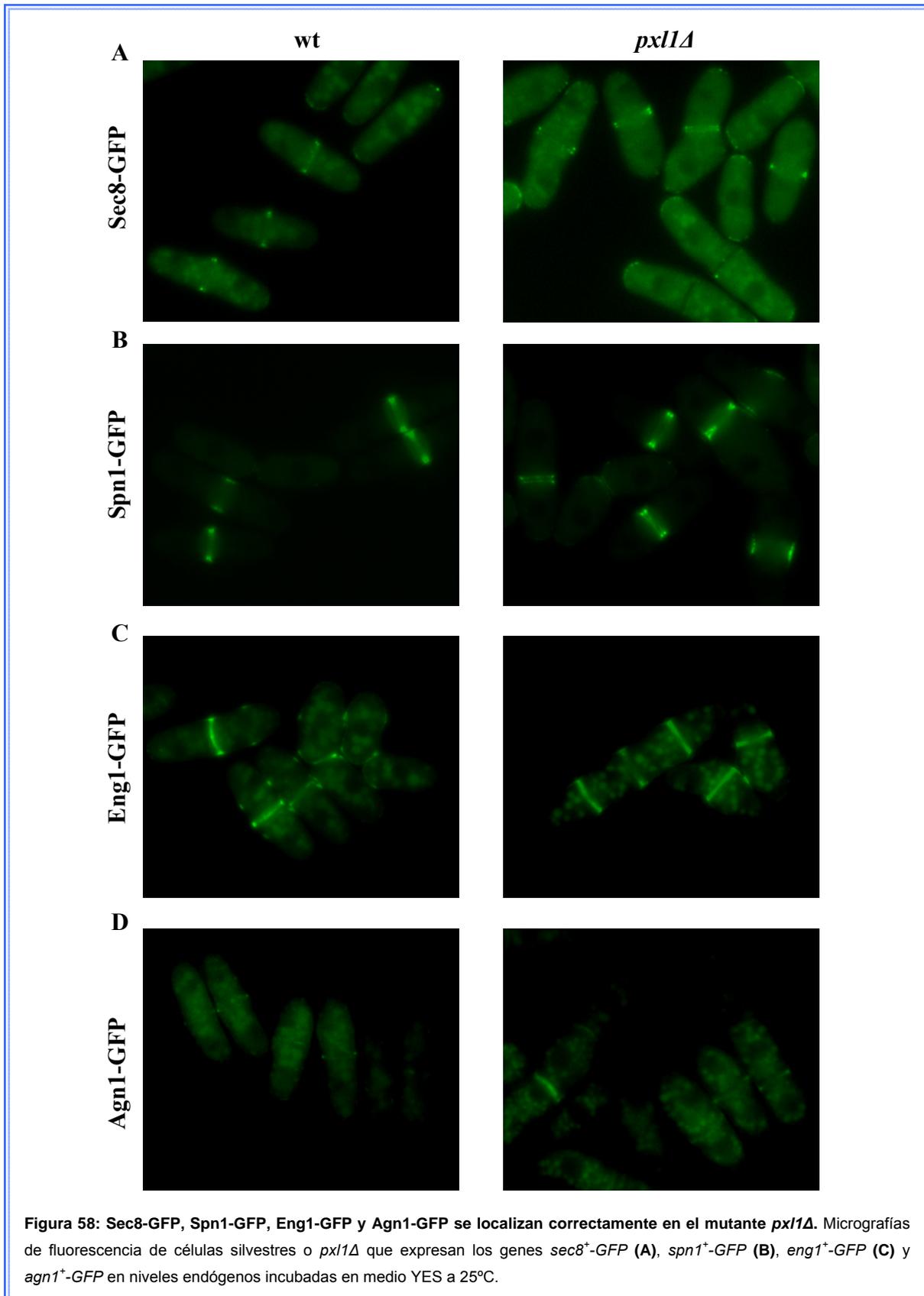
se detectan anillos dobles (figura 56B).

Una vez analizada la localización de proteínas del CAR en el mutante nulo *pxl1Δ*, también quisimos analizar la localización de otras proteínas que no forman parte de esta estructura, pero que realizan su función durante el proceso de división celular. En concreto, observamos la localización de Bgs1 y Bgs4, subunidades catalíticas de la β -(1,3)-glucán sintasa, viendo que ambas moléculas se localizan de forma correcta en *pxl1Δ* (figura 57).

También analizamos la localización de Spn1-GFP, una septina de *S. pombe* esencial para la formación del anillo de septinas en este organismo (An *et al.*, 2004), de Sec8-GFP, un componente del exocisto involucrado en el transporte de las proteínas implicadas en la degradación del septo de división (Wang *et al.*, 2002) y de las glucanasas Eng1-GFP y Agn1-GFP, responsables de la degradación del septo primario y de la pared celular lateral respectivamente (García *et al.*, 2005; Martín-Cuadrado *et al.*, 2003). Como se puede apreciar en la figura 58, estas cuatro proteínas se localizan correctamente en la zona del septo en la cepa *pxl1Δ*.

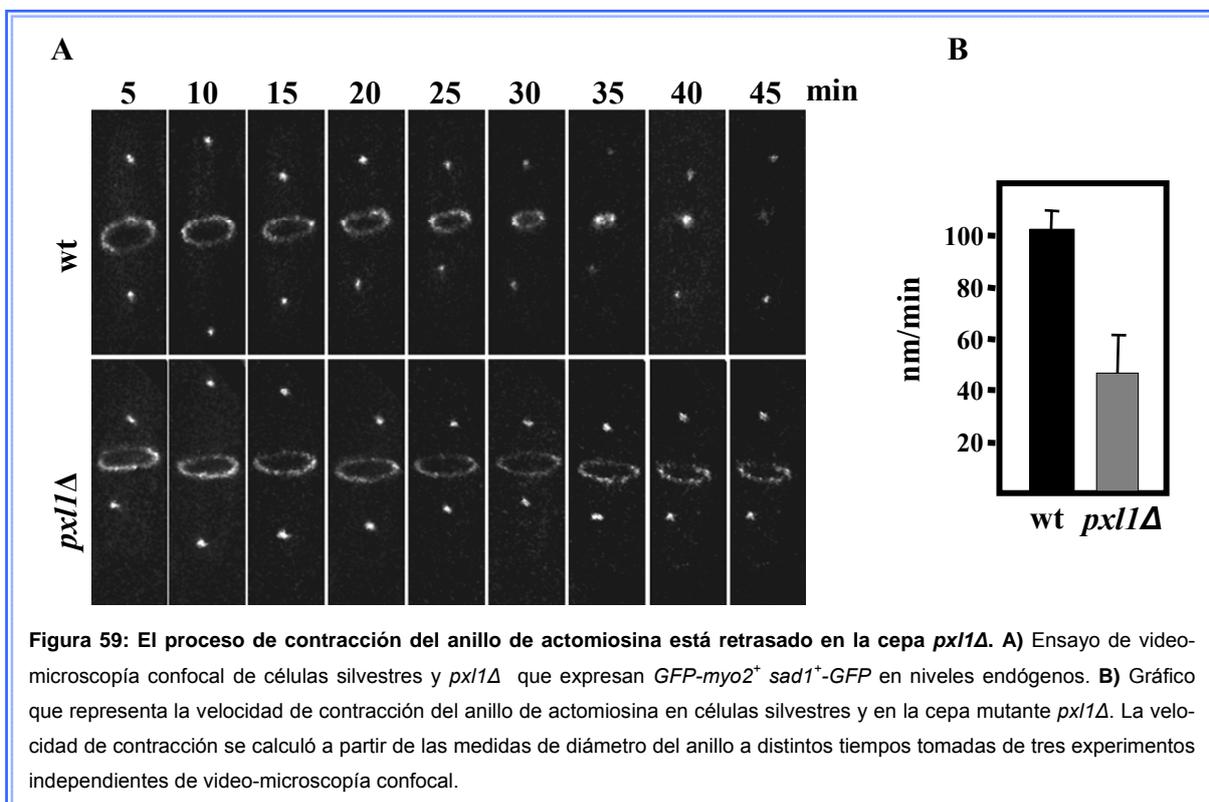
Por tanto, el principal defecto que se origina debido a la falta de Pxl1 es la alteración en la organización de las miosinas de tipo II en el anillo contráctil, lo que indicaría que Pxl1 actúa de forma específica en la organización de estas moléculas ya que la localización del resto de componentes del anillo o de proteínas necesarias para la citocinesis no se ve alterada en su ausencia.





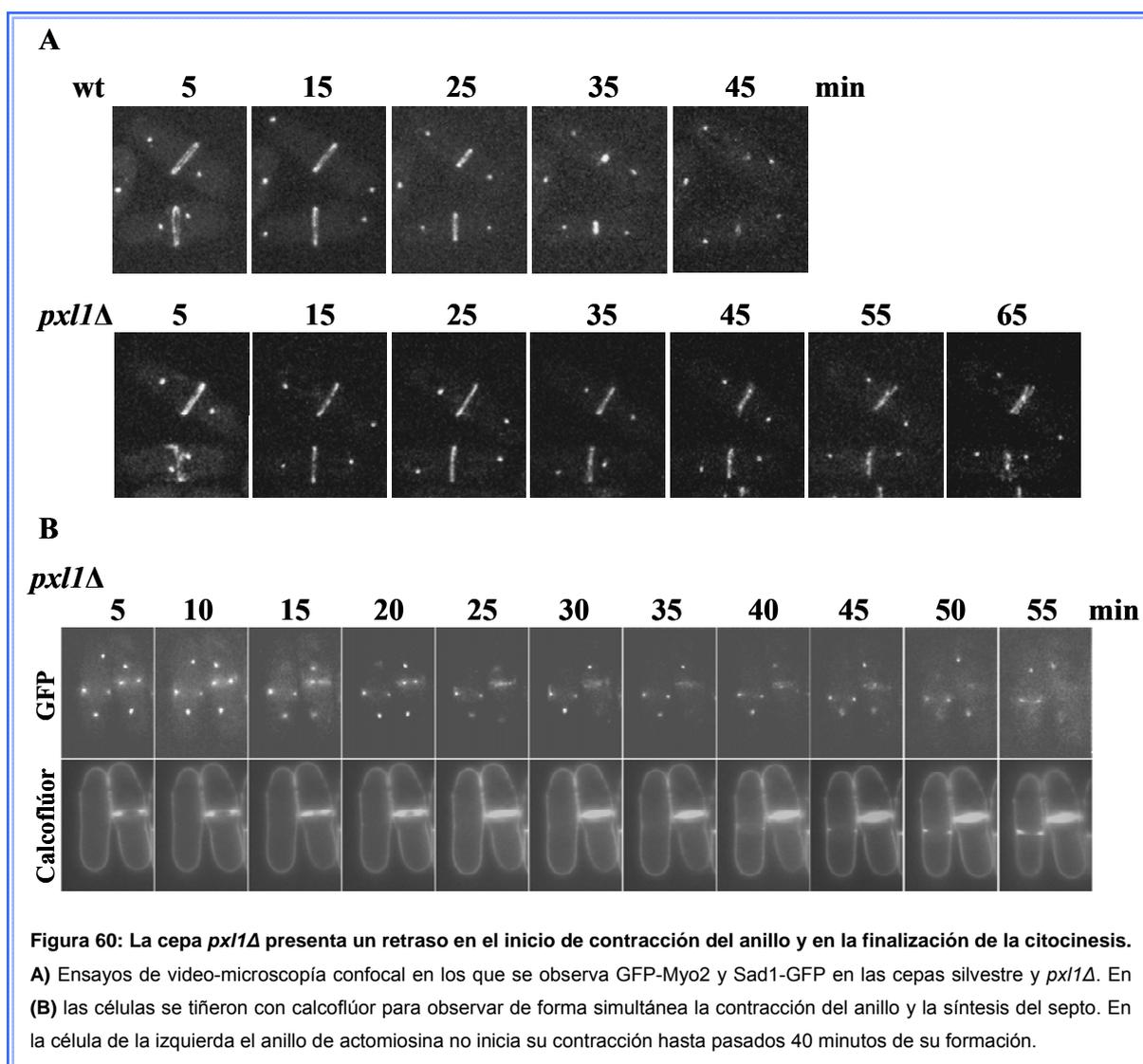
2.10. La cepa mutante *pxl1Δ* presenta un retraso en el proceso de contracción del anillo de actomiosina

Nuestros resultados nos indican que la función de Pxl1 podría estar relacionada específicamente con la organización de las miosinas de tipo II en el anillo contráctil. Para determinar si los defectos de organización de estas moléculas en la cepa *pxl1Δ* dan lugar a alteraciones en el ensamblaje y/o contracción del anillo de actomiosina, analizamos el proceso de contracción de esta estructura llevando a cabo experimentos de video-microscopía de fluorescencia convencional y confocal. Empleamos una cepa que lleva la proteína de fusión GFP-Myo2 como marcador del anillo y la proteína Sad1-GFP que se localiza en el SPB como marcador temporal del proceso de división. Como se puede ver en la [figura 59A](#), el anillo de GFP-Myo2 en el mutante *pxl1Δ* sí se contrae, pero su velocidad de contracción es mucho más lenta que en la estirpe silvestre. Hemos tenido en cuenta el tiempo transcurrido desde que el anillo se ha formado y los núcleos se han separado, hasta que el anillo desaparece. Calculamos el promedio de la velocidad de contracción del anillo a 25°C usando células de varios experimentos independientes, y observamos que en la cepa *pxl1Δ* la velocidad de contracción es de 45 ± 10 nm / min. ($n = 20$) frente a 92 ± 10 nm / min. ($n = 10$) de una cepa silvestre ([figura 59B](#)). Además, se puede ver que los anillos permanecen mucho más tiempo en las últimas etapas de la citocinesis en las células *pxl1Δ* ([figura 60A](#)). Para realizar el cálculo de la velocidad de contracción se tuvieron en cuenta solamente aquellas



células en las que el anillo formado inicia su contracción ya que en ocasiones, en la cepa *pxl1Δ* el anillo de actomiosina se forma pero no empieza a contraerse hasta pasados 40 minutos (figura 60B, célula de la izquierda).

Con este dato podemos concluir que el defecto que presenta la cepa mutante *pxl1Δ* en la organización de las miosinas del anillo de actomiosina provoca un retraso en su velocidad de contracción, y este retraso podría ser la causa del incremento en el porcentaje de septación que se observa en las células carentes de Pxl1.



DISCUSIÓN

El proyecto de investigación de nuestro laboratorio es el estudio de las GTPasas de la familia Rho, tanto de su regulación como de posibles moléculas efectoras a través de las cuales estas GTPasas realizan sus funciones. El objetivo del presente trabajo es el estudio de proteínas que pudieran participar en la regulación y/o en las vías de señalización de las GTPasas Rho.

1. Pxl1 regula negativamente a la GTPasa Rho1

En *S. cerevisiae* se ha descrito que la sobreexpresión de la proteína ScPxl1 es capaz de suprimir el fenotipo de termosensibilidad de cepas mutantes de *CDC42* (Gao *et al.*, 2004; Mackin *et al.*, 2004). ScPxl1, es homóloga a la proteína paxilina de células animales, una proteína de andamiaje localizada en la superficie intracelular, en las zonas donde se produce la unión de las células con la matriz extracelular. Entre sus múltiples funciones, la paxilina tiene un papel central en la coordinación espacio-temporal de la acción de GTPasas de la familia Rho, las cuales intervienen en la regulación del citoesqueleto de actina. También participa en el reclutamiento de reguladores positivos, negativos y efectores de las GTPasas en los lugares de contacto célula-matriz extracelular (Deakin and Turner, 2008).

Por todo ello, clonamos la ORF SPBC4F6.12 y comprobamos que su sobreexpresión era capaz de suprimir el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-1625*. Esta ORF codifica una proteína homóloga a la proteína Pxl1 de *S. cerevisiae* y a la paxilina de células animales, por ello la denominamos SpPxl1.

Una interpretación a la interacción genética que observamos entre Pxl1 y Cdc42, es que Pxl1 pudiera actuar como regulador de esta GTPasa o como un posible efector de la misma, sin embargo no fuimos capaces de detectar interacción física entre Pxl1 y Cdc42. Sí detectamos en cambio, que Pxl1 interacciona con Rho1, a la cual además regula negativamente, ya que la ausencia de Pxl1 induce un aumento en los niveles de Rho1 activa *in vivo*. El hecho de que Pxl1 no interaccione con Cdc42 indicaría que la supresión de la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-1625* podría deberse, no a una activación directa por parte de Pxl1 de las rutas de señalización de esta GTPasa, sino a un efecto indirecto causado por la posible acción de Pxl1 sobre la actividad de Rho1. Aunque no se ha detectado una disminución de la cantidad de GTP-Rho1 al sobreexpresar *pxl1*⁺, se ha visto que esta sobreexpresión es letal en la cepa mutante *rho1C17R*, que se caracteriza por presentar una menor cantidad de Rho1 activa (datos no publicados). Esto podría deberse a que un aumento de Pxl1 en las células mutantes provocaría una disminución aun más acusada en sus niveles de GTP-Rho1, y esto sería inviable para estas células.

Estos datos sugieren que Pxl1 podría actuar coordinando las rutas de señalización de Rho1 y Cdc42, ejerciendo efectos opuestos sobre ellas, o que Rho1 y Cdc42 desempeñan

funciones antagónicas durante el ciclo de vida de la levadura. De hecho este antagonismo ya se ha descrito en células animales (Sander *et al.*, 1999) y se ha propuesto tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe* (Gao *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2003).

Pxl1 regula negativamente a Rho1, sin embargo en su estructura no presenta ningún dominio RhoGAP. En células animales se ha visto que la paxilina juega un papel importante en la inhibición espacio-temporal de RhoA mediante su unión a la proteína p120RasGAP (Tsubouchi *et al.*, 2002). Esto provoca una disminución de la interacción de p120RasGAP con p190RhoGAP en la membrana plasmática. De esta forma, se libera p190RhoGAP que inhibe a RhoA de forma localizada en los focos de adhesión, impidiendo la prematura formación de fibras de estrés. Las mutaciones en la paxilina que impiden su unión a p120RasGAP provocan una activación prematura de RhoA, lo que conlleva una pérdida de eficiencia en los procesos de adhesión y migración celular. Estos fenotipos son suprimidos por la sobreexpresión del alelo constitutivamente activo de Rac1, *rac1G12V*, lo que representa un ejemplo más de funciones antagónicas entre diferentes GTPasas (Tsubouchi *et al.*, 2002).

De forma similar, podría ser que la regulación que ejerce Pxl1 sobre Rho1 en *S. pombe* se realizara a través de una proteína GAP. De hecho, los ensayos de dos híbridos realizados entre Pxl1 y las proteínas RhoGAP presentes en *S. pombe* muestran una interacción tenue de Pxl1 con Rga1, y más clara con Rga4. Además mediante experimentos de coinmunoprecipitación se ha visto que Pxl1 interacciona con las proteínas GAP Rga4 y Rga7. También existe interacción genética entre *pxl1*⁺ y *rga4*⁺ o *rga7*⁺. El hecho de que el doble mutante *pxl1Δ rga7Δ* sea inviable y que la cepa *pxl1Δ rga4Δ* presente un fenotipo que puede considerarse como aditivo al de los parentales, sugiere que, o bien estas proteínas actúan en diferentes vías que regulan el mismo proceso, o que actúan en diferentes procesos que juntos son necesarios para la supervivencia de la célula. Esto indicaría que probablemente Pxl1 no se encuentra en la misma ruta de señalización de Rga4 y Rga7, por lo que es posible que no ejerza su acción sobre Rho1 a través de estas proteínas GAP.

En cuanto a Rga1 observamos una interacción débil con Pxl1 mediante ensayo de dos híbridos. Rga1 es un GAP de Rho1 cuya delección tiene efectos drásticos dando lugar a células muy enfermas, multitabicadas, con septos aberrantes y engrosamiento de la pared celular, un fenotipo que recuerda a la sobreexpresión del alelo constitutivamente activo de Rho1, *rho1G15V* (Nakano *et al.*, 2001). Este fenotipo tan drástico impidió construir la cepa doble mutante *pxl1Δ rga1Δ*, por lo que será necesario obtener una cepa mutante afectada en esta proteína GAP de forma más leve, para así poder analizar su fenotipo e intentar determinar si Pxl1 regula negativamente a Rho1 a través de Rga1.

Otra opción podría ser que Pxl1 regulase a Rho1 mediante interacción e inhibición de reguladores positivos o GEFs. Nuestros resultados demuestran que *pxl1*⁺ presenta interac-

ción genética con *rgf3*⁺, pero no con *rgf1*⁺. Rgf3 es un GEF de Rho1 que realiza su función durante la citocinesis (Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004). La delección de Pxl1 corrige los fenotipos de termosensibilidad y sensibilidad a NaF de la cepa mutante *ehs2-1*, que porta un alelo con una mutación puntual en el dominio RhoGEF de *rgf3*⁺. Estos datos sugieren que Pxl1 podría ejercer su regulación sobre Rho1 a través de Rgf3. Esta regulación podría llevarse a cabo de distintas maneras. Por ejemplo, Pxl1 podría regular la localización de Rgf3 en la región de división. Sin embargo, este GEF se localiza correctamente en la cepa *pxl1Δ* (datos no mostrados). Otra opción sería que Pxl1 actuara impidiendo que Rgf3 interaccionase con Rho1, secuestrando a este GEF o compitiendo con él por la unión a la GTPasa. Para confirmar esta hipótesis son necesarios más experimentos que pasan por determinar si Pxl1 interacciona con Rgf3, si la interacción entre Rgf3 y Rho1 se ve alterada en presencia o en ausencia de Pxl1 o si los niveles de Rgf3 en la región de división varían en la cepa *pxl1Δ*.

La interacción funcional observada entre Pxl1 y Rgf3, un GEF que participa únicamente durante la citocinesis, indica un papel de Pxl1 en este proceso. Este papel está indicado también por el hecho de que la expresión de *pxl1*⁺ es cíclica y está regulada por el factor de transcripción Ace2, que controla la expresión de genes relacionados con el proceso de citocinesis (Rustici *et al.*, 2004). Además, Pxl1 se localiza exclusivamente en la región de división. Todos estos datos nos muestran que esta proteína podría regular determinadas funciones controladas por Rho1 exclusivamente durante el proceso de citocinesis.

El defecto más evidente de las células carentes de Pxl1 es un aumento de células en fase de septación y la aparición de células multiseptadas. Rho1 participa en el proceso de septación favoreciendo la síntesis del septo mediante la activación del complejo β-glucán sintasa, por lo que es lógico pensar que en la región de división esta GTPasa se encuentre activa, aunque hasta la fecha no existe ninguna forma de observar la localización de GTP-Rho1 en *S. pombe*. En este punto cabe plantearse la siguiente pregunta: ¿Es el incremento del número de células en fase de septación la causa de que los niveles de GTP-Rho1 aumenten en la cepa *pxl1Δ*, o es el aumento de estos niveles lo que hace que el número de células septando sea mayor? Hob3 es una proteína con dominio BAR necesaria para localizar Cdc42 en la región de división (Coll *et al.*, 2007). En una cepa *hob3Δ*, que también presenta un mayor número de células en fase de septación y células multiseptadas (Coll *et al.*, 2007; Routhier *et al.*, 2001), hemos comprobado que los niveles de Rho1 activa no son superiores a los de células silvestres (datos no mostrados). Por lo tanto, el incremento de células en fase de septación no parece ser la causa del aumento en los niveles de Rho1 activa. Además, se ha descrito que la sobreexpresión de *rho1*⁺ induce la aparición de células multiseptadas (Arellano *et al.*, 1996). Por lo tanto, estos datos indicarían que el aumento

de la cantidad de Rho1 activa podría ser la causa del aumento del número de células separando que presenta la cepa *pxl1Δ*.

Una de las funciones de Rho1 en *S. pombe* es regular la síntesis de pared celular a través del complejo β -glucán sintasa. El aumento en los niveles de GTP-Rho1 en la cepa *pxl1Δ* induce un aumento simultáneo de la cantidad de α y β -glucano de la pared. Este aumento proporcional de ambos polímeros se produce también al sobreexpresar Rho1 o su efector Pck2 (Arellano *et al.*, 1996; Arellano *et al.*, 1999b). Podría ser que el defecto observado en separación celular sea debido simplemente a un aumento de la pared celular del septo, de tal manera que las glucanasas sean menos eficientes en su digestión y esto causaría la aparición de células encadenadas en los cultivos de la cepa *Pxl1Δ*. Rho1 se localiza formando un disco en la zona de división (P. Coll, resultados no publicados). Sin embargo, experimentos de localización de Pxl1 indican que se localiza antes de la formación del septo en la región de división y se mueve a la vez que el anillo contráctil de actomiosina. Por tanto es poco probable que Pxl1 actúe inhibiendo la activación de Rho1 para la formación del septo secundario.

2. Pxl1 forma parte del anillo contráctil de actomiosina

Mediante experimentos de colocalización e interacción física con proteínas del CAR se ha visto que Pxl1 es un componente de esta estructura, que se ensambla durante la mitosis y es esencial para la división celular. Al contrario de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, *Dictyostelium* o células animales, SpPxl1 no se detecta en los lugares de crecimiento polarizado, localizándose exclusivamente en la región de división. Esto indicaría que esta proteína realiza su función únicamente durante el proceso de división celular de *S. pombe*, lo que está de acuerdo con el hecho de que la cepa *pxl1Δ* presenta defectos en citocinesis, pero no en crecimiento polarizado. Cabe destacar que en células animales recientemente se ha descrito que la proteína paxilina y otros componentes de los focos de adhesión participan en el proceso de citocinesis favoreciendo el reclutamiento de las proteínas necesarias para que se produzca la división celular (Shafikhani *et al.*, 2008).

En *S. pombe* el ensamblaje del anillo de actomiosina se produce en diferentes fases (Wu *et al.*, 2003). La primera proteína que se observa en la región de división es Mid1 que marca la zona donde se va a formar el anillo. Posteriormente, en fase G2 tardía, otras proteínas se ensamblan en estructuras punteadas (“nodos”) en la región perinuclear, entre las que se encuentran los componentes de miosinas de tipo II, Myo2, Rlc1 y Cdc4, la proteína Cdc15 y la formina Cdc12. Cuando la célula entra en mitosis, los “nodos” formados por las proteínas anteriormente mencionadas y por actina se compactan formando el anillo de actomiosina, el cual se contrae al término de anafase (Wu *et al.*, 2006). Mediante los experi-

mentos de localización realizados no ha sido posible detectar Pxl1 formando parte de las estructuras “nodulares” en células en fase G2, por lo que parece que esta proteína es reclutada a la zona de división en una fase más tardía, probablemente inmediatamente después de la compactación de los “nodos” en forma de anillo. ¿Cómo se regula que Pxl1 se localice en la zona de división en un momento determinado? Es posible que esta regulación se lleve a cabo por fosforilación ya que la localización de algunas proteínas del anillo como Cdc15 o Myo2 se encuentra regulada por eventos de fosforilación y desfosforilación (Fankhauser *et al.*, 1995; Motegi *et al.*, 2004). Además, en la regulación de la proteína paxilina de células animales la fosforilación juega un papel muy importante (Brown and Turner, 2004). También hay que tener en cuenta que entre las proteínas que son reclutadas a la región de división hay muchas que intervienen en la modificación de la actividad y estabilidad de las proteínas, incluyendo algunas que participan en procesos de ubiquitinación y desubiquitinación (Hermand *et al.*, 2003; Matsuyama *et al.*, 2006), por lo que estas modificaciones podrían también regular la localización y/o estabilidad de Pxl1.

¿Cómo se recluta Pxl1 a la región de división? Se ha determinado que la localización de Pxl1 depende del citoesqueleto de actina y de la correcta formación del anillo contráctil y que es independiente del exocisto y de la señal de la ruta SIN. Es posible que la polimerización de la actina por parte de las forminas durante la mitosis temprana ayude al reclutamiento de Pxl1 en la zona de división. De hecho Pxl1 no se localiza correctamente en la cepa mutante *cdc12-112*.

Se ha descrito que los dominios LIM de la paxilina son capaces de localizarse por sí solos en los focos de adhesión (Brown and Turner, 2004). Además en *S. cerevisiae* estos dominios son también necesarios para la correcta localización de ScPxl1 en las zonas de crecimiento polarizado (Gao *et al.*, 2004), lo que indica que los dominios LIM de estas proteínas son importantes para su localización.

De acuerdo con esto, otro grupo de investigación ha descrito que en *S. pombe* los dominios LIM de Pxl1 son capaces de localizarse débilmente en la región de división (Ge and Balasubramanian, 2008). Sin embargo, nuestros datos nos indican que la región C-terminal de Pxl1, que comprende los dominios LIM, no se localiza en la zona media de la célula. Por el contrario, ambos grupos hemos observado que la región N-terminal de Pxl1 es suficiente para la correcta localización de la proteína. Estas diferencias pueden ser debidas a que los experimentos de localización llevados a cabo por (Ge and Balasubramanian, 2008) fueron realizados en condiciones de sobreexpresión. Resultados posteriores han confirmado que la región N-terminal de Pxl1 es suficiente para el anclaje de esta proteína en la región de división a través de su interacción con el dominio SH3 de Cdc15 (Roberts-Galbraith *et al.*, 2009).

Nuestra demostración de que las proteínas ScPxl1 y la paxilina de *G. gallus* no se localizan en la región de división cuando se expresan en *S. pombe*, apoyan el hecho de que la región N-terminal de Pxl1 es necesaria para su localización en la zona de división. Una posible explicación de este dato podría ser que, a pesar de que estas proteínas presentan un extremo C-terminal similar, donde se encuentran los dominios LIM, su extremo N-terminal es muy diferente al de SpPxl1. Esto fue confirmado al expresar proteínas quiméricas formadas por el extremo N-terminal de SpPxl1 y los dominios LIM de ScPxl1 o paxilina, las cuales son capaces de localizarse correctamente.

Así pues, teniendo en cuenta nuestros resultados, es posible que ScPxl1 y SpPxl1 regulen a la GTPasa Rho1 de forma similar, pero su diferente regulación espacial nos podría indicar que estas moléculas desempeñan funciones diferentes.

Los dominios LIM de Pxl1 por sí solos no son capaces de localizarse en la zona de división, apareciendo su señal difusa por el citoplasma y con una fuerte localización en el núcleo de la célula. Estudios previos han mostrado que algunas proteínas que presentan dominios LIM en su estructura, entre las que se encuentra la paxilina, son capaces de desplazarse entre el núcleo y el citoplasma y podrían desempeñar un papel en la regulación de la transcripción (Brown and Turner, 2004). De acuerdo con esto, se ha propuesto que los dominios LIM de Pxl1 podrían desempeñar funciones de regulación de la transcripción en *S. pombe* (Ge and Balasubramanian, 2008). Sin embargo, esto parece poco probable ya que la proteína completa no muestra localización nuclear, al contrario de lo que ocurre en células animales donde un 10% de la paxilina se encuentra en la matriz nuclear (Kasai *et al.*, 2003). La localización en el núcleo de la truncación de Pxl1 formada únicamente por los dominios LIM (Pxl1 Δ N), podría deberse a que estos dominios además de participar en uniones proteína-proteína también son capaces de interaccionar con el ADN (Dawid *et al.*, 1998), de tal manera que es posible que al no poder anclarse en la zona de división, esta proteína truncada se acumule en el núcleo debido a su afinidad por el ADN.

Por tanto, estos datos permiten concluir que el extremo amino de Pxl1 es suficiente y necesario para su localización en la región de división. Un posible candidato al cual se une Pxl1 para anclarse en el anillo es la proteína Cdc15. En *S. pombe*, Cdc15 participa en el ensamblaje del anillo de actomiosina durante la citocinesis, y se ha descrito que recluta tanto a la formina Cdc12 como al activador del complejo Arp2/3, Myo1, en la región ecuatorial de las células (Carnahan and Gould, 2003). Cdc15 es necesaria para la localización de Pxl1 y ambas proteínas colocalizan durante la citocinesis. Además, mediante experimentos de coimmunoprecipitación se ha detectado que existe interacción física entre ambas. Estos datos apoyan la teoría de que Cdc15 recluta directamente a Pxl1 en la zona de división. De hecho, recientemente se ha descrito que el dominio SH3 de Cdc15, y en menor medida el

dominio SH3 de Imp2, interaccionan con el extremo N-terminal de Pxl1 y que esta unión es necesaria para que Pxl1 se localice en el anillo durante la división celular (Roberts-Galbraith *et al.*, 2009). El extremo N-terminal de Pxl1 podría ser también necesario para la regulación de la estabilidad de la proteína ya que cuando se expresan las diferentes truncaciones de *pxl1*⁺, a pesar de que todas ellas se encuentran bajo el control del promotor de *pxl1*⁺, los niveles de Pxl1ΔN son superiores a los del resto de truncaciones. Este dato podría indicar que el extremo amino de Pxl1 es necesario para la regulación temporal de esta proteína mediante degradación. De hecho, los niveles de Pxl1 disminuyen una vez que la citocinesis ha finalizado, por lo que es probable que la proteína sea degradada tras la finalización de este proceso, cosa que no ocurriría en la cepa Pxl1ΔN.

Por otra parte, los dominios LIM de Pxl1 son necesarios para que la proteína realice su función ya que la truncación a la que le faltan estos dominios a pesar de localizarse en la zona de división, presenta los mismos defectos de citocinesis que la cepa *pxl1*Δ. De hecho, hemos visto que la interacción de Pxl1 con Rlc1, la cadena ligera reguladora de las miosinas de tipo II, se lleva a cabo a través de estos dominios (datos no publicados).

Por tanto, el análisis de proteínas truncadas de Pxl1 indica que el extremo N-terminal interviene en la localización y regulación de la estabilidad de la proteína y los dominios LIM son necesarios para que Pxl1 realice sus funciones, probablemente a través de su interacción con las miosinas de tipo II.

3. Pxl1 interviene en la estabilización y contracción del anillo de actomiosina durante la citocinesis

¿Cuál es la función que ejerce Pxl1 en el anillo de actomiosina? Las células *pxl1*Δ son viables y no presentan defectos de crecimiento. Sin embargo, los cultivos asincrónicos de esta cepa presentan un elevado número de células en fase de septación y algunas células multiseptadas. Curiosamente algunos de los componentes de la maquinaria de separación celular, como las glucanasas y los componentes del exocisto analizados presentan un patrón de localización normal en ausencia de Pxl1, lo que indicaría que los defectos en separación de la cepa *pxl1*Δ, no se deben a una incorrecta organización de la maquinaria de separación celular.

La localización de Pxl1 y las interacciones genéticas detectadas entre *pxl1*Δ y las cepas mutantes *myo2-E1*, *rng2-D5*, *rlc1*Δ y *cdc4-8*, indican que Pxl1 podría realizar funciones en la organización del anillo de actomiosina. Esta hipótesis se corroboró mediante la observación de los componentes de la miosina de tipo II marcados con GFP en la cepa *pxl1*Δ. Se observaron fibras desorganizadas de GFP-Myo2 conectadas al anillo, lo que podría indicar que éste no se encuentra compactado correctamente, o que hay un exceso de miosina de

tipo II en el anillo. Sin embargo, los niveles de miosina II no varían en la cepa *pxl1Δ* en comparación con los de células silvestres. En algunas células *pxl1Δ* se puede ver la presencia de un anillo de miosina adicional. Este anillo no es contráctil, lo que sugiere que las miosinas no se encuentran correctamente asociadas a la actina. De hecho, no se observa la presencia ni de actina ni de la formina Cdc12 en este segundo anillo. Por lo tanto, Pxl1 podría actuar previniendo la liberación de las miosinas del CAR, estabilizando de alguna manera su unión con la actina.

Se ha descrito que la interacción entre las miosinas de tipo II y la actina del CAR genera la fuerza necesaria para que se produzca la división celular (Matsumura, 2005). Probablemente el anillo contráctil de la cepa *pxl1Δ* presenta una menor proporción de miosinas correctamente organizadas y unidas a la actina, lo que a su vez provocaría una disminución en la fuerza de contracción. La reducción de la fuerza que ejercen las miosinas en el CAR podría ser la causa de la disminución de la velocidad de contracción del anillo que se observa en las células *pxl1Δ* mediante experimentos de video-microscopía de fluorescencia confocal. Este defecto sería el responsable del aumento del número de células en fase de septación. Diferentes cepas mutantes afectadas en las miosinas de tipo II, como son *rlc1Δ*, *myo2-E1* y *rng2-D5* presentan un defecto similar de disminución en la velocidad de contracción del anillo (Balasubramanian *et al.*, 1998; Le Goff *et al.*, 2000; Mulvihill and Hyams, 2003), lo que sugiere que la actividad de las miosinas es necesaria para que se produzca correctamente la citocinesis.

Otra alteración que muestra la cepa *pxl1Δ* es que el desensamblaje del CAR al final del proceso de citocinesis es más lento, lo que conlleva una gran acumulación de la miosina de tipo II, Myp2, en esta zona. Este defecto podría causar un retraso adicional en el proceso de septación y en la separación celular. De hecho, los embriones de pez cebra con una actividad reducida de las miosinas de tipo II presentan un anillo de actomiosina mucho más estable en las últimas etapas del proceso de citocinesis, lo que indica que las miosinas de tipo II podrían participar en el desensamblaje del anillo de actomiosina además de en su contracción (Urven *et al.*, 2006).

Otro modo de actuación de Pxl1 en la regulación de la estabilidad del anillo de actomiosina podría ser a través de las proteínas de la familia PCH Cdc15 e Imp2. Como se ha mencionado anteriormente los dominios SH3 de Cdc15 e Imp2 intervienen en el reclutamiento de Pxl1 en la zona de división. Además estos dominios reclutan a Fic1, una proteína con un dominio C2 homóloga a Inn1 de *S. cerevisiae* (Roberts-Galbraith *et al.*, 2009). Inn1 es esencial y participa en el anclaje del anillo de actomiosina a la membrana plasmática (Sánchez-Díaz *et al.*, 2008). Por el contrario, Fic1 no es esencial y realiza un papel menor durante el proceso de citocinesis de *S. pombe*. La cepa doble mutante *pxl1Δ fic1Δ* es invia-

ble, lo que podría indicar que ambas proteínas intervienen en procesos diferentes pero esenciales para el anclaje y/o la estabilidad del anillo de actomiosina. Una posible hipótesis es que Fic1 podría intervenir aumentando la fuerza de anclaje del anillo a la membrana a través de Cdc15, que a su vez estaría unida a la membrana por su dominio FCH. Además de interactuar con Cdc15, Pxl1 interactúa con las miosinas de tipo II a través de los dominios LIM. Pxl1 podría actuar favoreciendo el anclaje de las miosinas al complejo Cdc15-Fic1, que se encuentra unido a la membrana plasmática, de tal manera que en ausencia de Pxl1 el anillo de miosina no se encontrara correctamente anclado, observándose de esta forma anillos desorganizados. Por tanto, Pxl1 podría actuar como nexo de unión entre el anillo de actomiosina y la membrana plasmática a través de Cdc15. Sin embargo, la delección de Pxl1 no es letal, por lo que es posible que existan otras proteínas que participan en la unión del anillo a la membrana a través de Cdc15 o de otras proteínas.

4. Interdependencia de la contracción del anillo y la síntesis del septo

En células fúngicas se ha propuesto que la contracción del anillo depende directamente de la formación del septo. Esto es debido probablemente a que la fuerza mecánica producida por la contracción del anillo no es capaz de contrarrestar la presión de turgencia de la célula sin la ayuda que proporciona la formación de pared del septo. En *S. cerevisiae* aunque existe una interdependencia entre la contracción del anillo y la síntesis del septo, la cepa mutante *chs2Δ*, que carecen de septo primario, y la cepa *myo1Δ*, que no tiene un anillo contráctil funcional por carecer de la miosina de tipo II Myo1, son capaces de completar el proceso de citocinesis mediante la formación de septos aberrantes constituidos por quitina sintetizada por Chs3 y por glucano generado por Fks1 (Bi *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2002). Incluso el doble mutante *chs2Δ myo1Δ* presenta el mismo fenotipo que los mutantes simples, sugiriendo que ambas proteínas participan en el mismo proceso (Schmidt *et al.*, 2002). Rho1 es esencial para que se produzca la citocinesis en ausencia de anillo de actomiosina ya que interviene en el reclutamiento de Chs3 en la zona de división. Además dos de sus efectores, Fks1 y Bni1, son necesarios para que la citocinesis tenga lugar en estas condiciones (Yoshida *et al.*, 2009).

Por otra parte, en la cepa mutante *inn1Δ*, el anillo de actomiosina es incapaz de anclarse a la membrana plasmática, pero es capaz de contraerse, sin embargo el septo de división no se sintetiza (Sánchez-Díaz *et al.*, 2008). Todo este conjunto de datos indicaría que tanto la síntesis del septo como la contracción del anillo actuarían colaborando para que la citocinesis se produzca de forma correcta en *S. cerevisiae*.

En *S. pombe* aún no se ha determinado si la contracción del anillo genera la fuerza que permite la síntesis del septo, o si es la formación del septo lo que induce que el anillo se

contraiga. Algunos autores han descrito que la citocinesis requiere tanto la contracción del anillo medio como la síntesis del septo (Le Goff *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000b). Por el contrario, otros autores han propuesto que la membrana plasmática es empujada hacia el interior simplemente como consecuencia de la expansión centrípeta que ocasiona la síntesis y el ensamblaje del septo en crecimiento, sin necesidad de una contracción del anillo medio (Johnson *et al.*, 2005).

Existen datos que indican que ambos procesos son necesarios para que la citocinesis y la separación celular tengan lugar de forma correcta. *myo2⁺* es un gen esencial, sin embargo las esporas *myo2Δ* son capaces de germinar y formar septos (Kitayama *et al.*, 1997; May *et al.*, 1997) y la represión de este gen da lugar a células multiseptadas que presentan septos defectuosos (Kitayama *et al.*, 1997). Esto indicaría que en ausencia de miosina los septos se forman pero son aberrantes y las células son incapaces de dividirse y sobrevivir. Además el anillo medio es necesario para la localización de la maquinaria de formación del septo en la región de división, ya que en cepas mutantes afectadas en componentes del anillo, las enzimas responsables de la síntesis del β-glucano del septo, Bgs1 y Bgs4, no se localizan correctamente (Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2005).

Por otra parte, la eliminación de la proteína encargada de la formación del septo primario, Bgs1, o su represión no afecta ni a la localización del anillo medio ni a su ensamblaje, sin embargo, sí que afecta a la estabilidad de anillo durante su contracción, observándose una cierta cantidad de septos en crecimiento en los que el anillo medio aparece alterado (Cortés, 2006). Por tanto la correcta formación del septo es también necesaria para la contracción del anillo.

La delección de Pxl1 es letal en combinación con varias cepas mutantes afectadas en *bgs1⁺*. Este dato también sugiere que tanto la correcta organización y contracción del anillo en la que interviene Pxl1, como la adecuada formación del septo primario por Bgs1 son necesarias durante el proceso de citocinesis en *S. pombe*.

5. Posible relación de Rho1 en la regulación de la estabilidad y contracción del anillo de actomiosina a través de Pxl1

Con los datos presentados en este trabajo podemos concluir que Pxl1 tiene al menos dos funciones:

- Actuar como un regulador negativo de la señalización de la GTPasa Rho1 durante la citocinesis.
- Regular la estabilidad y contracción del anillo de actomiosina.

Sin embargo, se desconoce si ambas funciones están relacionadas entre sí o si son independientes.

Es posible que el aumento en la actividad de Rho1 en la cepa *pxl1Δ* se traduzca en una desestabilización del anillo de actomiosina. En células animales RhoA interviene en la regulación de la actividad motora de las miosinas de tipo II del anillo contráctil regulando su fosforilación a través de la quinasa ROCK y en la regulación de la polimerización de actina mediante la activación de las forminas (Glotzer, 2005). En *S. pombe* las miosinas de tipo II del anillo también se encuentran reguladas por fosforilación. Se sabe que la desfosforilación de la serina 1.144 de Myo2 es necesaria para que la proteína se acumule en la región de división mediante su interacción con Mid1 (Motegi *et al.*, 2004). También se propuso que la fosforilación de la serina 1.518 de Myo2 por acción de la quinasa de la ruta SIN, Cdc7, es necesaria para que esta miosina se localice correctamente (Mulvihill *et al.*, 2001a). Sin embargo, posteriormente se ha demostrado que la ruta SIN no interviene en la regulación de la localización de Myo2 (Wu *et al.*, 2003). Podría ser que Rho1 interviniera de alguna forma en la regulación de la actividad de las miosinas a través de alguna quinasa o fosfatasa, sin embargo en *S. pombe* no existen homólogos de la quinasa ROCK. En *S. cerevisiae* Rho1 participa en el ensamblaje del anillo mediante la activación de las forminas encargadas de la formación de filamentos de actina del anillo. En esta activación son necesarios los GEFs Tus1 y Rom2 que activan y localizan a Rho1 en el cuello de la yema (Yoshida *et al.*, 2006). En *S. pombe* no se ha visto hasta la fecha interacción de Rho1 con forminas y ninguno de los GEFs descritos parece afectar significativamente a la contracción del anillo (García *et al.*, 2009a; García *et al.*, 2006a; Tajadura *et al.*, 2004).

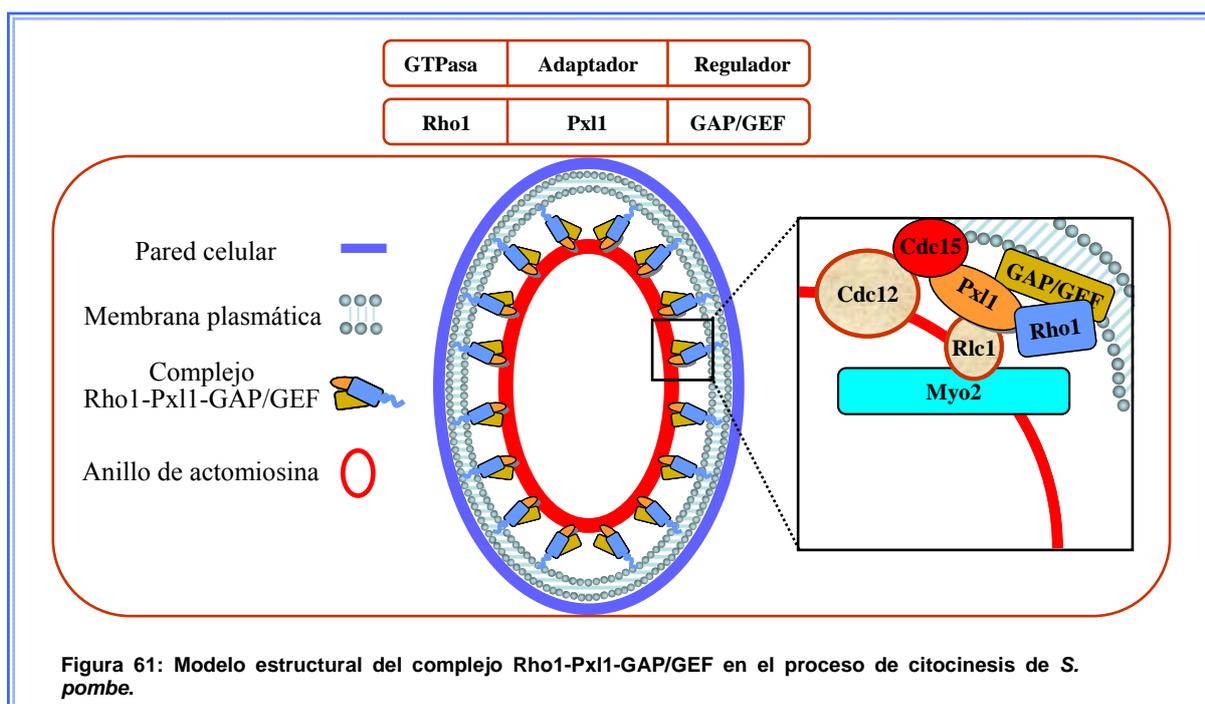
Se ha descrito recientemente que en *S. cerevisiae* Rho1 requiere dos mecanismos independientes para concentrarse en la región de división. Uno durante la anafase, que necesita la unión de la GTPasa a los GEFs Tus1 y Rom2, y otro tras la salida de mitosis, que consiste en la unión de la región polibásica situada en el extremo C-terminal de Rho1 a zonas de la membrana plasmática ricas en fosfolípidos. Estos dos mecanismos de reclutamiento de Rho1 son necesarios para el correcto ensamblaje del anillo de actomiosina y en las etapas tardías de la citocinesis (Yoshida *et al.*, 2009).

En *S. pombe* ninguno de los GEFs descritos hasta la fecha afecta a la localización de Rho1 en la región de división (comunicación personal de la Dra Y. Sánchez), por lo que es posible que esta GTPasa se ancle a esta zona mediante otros mecanismos. Uno podría ser a través de la unión de la zona polibásica que presenta Rho1 en la región C-terminal a los dominios lipídicos de la membrana, denominados “lipid rafts” que se concentran en la zona media durante la anafase (Wachtler and Balasubramanian, 2006). En la formación de “lipid rafts” interviene la proteína Cdc15 (Takeda and Chang, 2005) y Pxl1 se encuentra unida a esta proteína, por lo que es posible que la interacción de Rho1 con Pxl1 se produzca en estas zonas de la membrana. De esta forma Pxl1 podría regular espacial y temporalmente

a la GTPasa en estas regiones facilitando su interacción con alguna proteína GAP, o impidiendo su unión a un GEF, permitiendo así que Rho1 participe en el proceso de ensamblaje y contracción del anillo de actomiosina.

Con el conjunto de nuestros datos y lo que se conoce de otros organismos se puede proponer un modelo según el cual Rho1 regula la estabilidad y contracción del anillo a través de Pxl1. Esta molécula no ejercería su función de modulador negativo directamente, sino a través de reguladores de Rho1, de tipo GAP o GEF. Según este modelo se formaría un complejo de GTPasa-adaptador-regulador, (Rho1-Pxl1-GAP/GEF), donde el adaptador podría desempeñar distintas funciones: Localizar a la GTPasa, facilitar o competir por la interacción del regulador con la GTPasa o permitir la unión de moléculas efectoras. Este complejo proteico estaría unido al anillo de actomiosina a través de Cdc15, que a su vez interacciona con la formina Cdc12 y con la membrana. Por otra parte, Rho1 estaría en conexión con las miosinas de tipo II, que interaccionan con Pxl1, y podría regular la unión de la miosina a la actina y la contracción del anillo. Al mismo tiempo, Rho1 ejercería sus funciones de activador directo de la β -glucán sintasa para la síntesis del septo (Figura 61).

Este modelo sería similar al modelo GTPasa-adaptador-regulador descrito para otra GTPasa de la familia Rho, Cdc42, que se une al adaptador Hob3. Este adaptador actúa facilitando la localización de la GTPasa en la zona de división y su interacción con el regulador positivo Gef1. Hob3 es necesario para una correcta localización de Cdc42 en la zona media de división. Curiosamente, Hob3 también interacciona con Cdc15 (Coll *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2007).



La regulación de la contracción del anillo de actomiosina por Rho1 podría producirse en el ensamblaje, estabilización y/o desensamblaje de sus componentes, mediante la activación o desactivación de moléculas efectoras, quinasas o fosfatasas, que utilizarían como sustrato algunos componentes del anillo que pueden presentar distintos estados de fosforilación. Recientemente se ha descrito que la fosforilación de Rlc1 por la quinasa Pak1 regula negativamente la actividad de las miosinas, induciendo un retraso en la contracción del anillo e impidiendo de esta forma que ésta tenga lugar antes de que la mitosis concluya (Loo and Balasubramanian, 2008). Pak1 se localiza en la región de división e interacciona con la proteína GAP de Rho1, Rga8, que también se localiza en la zona media de la célula. Además, la delección de Rga8 corrige parcialmente los defectos de cepas con pérdida de función de Pak1 (Yang *et al.*, 2003). Estos datos pueden sugerir la idea de que un aumento en los niveles de Rho1 activa podría provocar un aumento en la actividad de Pak1. Por tanto podría plantearse la hipótesis de que la mayor cantidad de Rho1 activa que presenta la cepa *pxl1Δ* pudiera inducir un aumento de actividad de la quinasa Pak1, de tal manera que la fosforilación de Rlc1 se mantuviera durante más tiempo. Esto provocaría una disminución en la velocidad de contracción del anillo y tal vez una inestabilidad de su estructura. Sin embargo, para la confirmación de esta hipótesis y poder determinar el posible papel de Rho1 en la formación y contracción del anillo de actomiosina en *S. pombe*, se necesitará el desarrollo de estudios más detallados.

En resumen, hemos identificado a Pxl1 como una proteína que se une a Rho1 y regula negativamente a esta GTPasa. Las células que carecen de Pxl1 presentan un anillo de actomiosina inestable y un retraso en su velocidad de contracción, lo que probablemente causa el aumento del número de células septando observado en los cultivos de estas células. Pxl1 intervendría, por tanto, en la estabilización del anillo de actomiosina, posiblemente sirviendo como nexo de unión entre las proteínas PCH, Cdc15 e Imp2, y las miosinas de tipo II que forman parte del anillo de actomiosina. Sin embargo, serán necesarios más estudios para determinar si la modulación que ejerce Pxl1 sobre Rho1 está relacionada con la estabilización y contracción del anillo de actomiosina.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Pxl1 es una proteína con dominios LIM que interacciona con la GTPasa Rho1 y la regula negativamente de forma específica durante el proceso de citocinesis.
2. Los dominios LIM de Pxl1 son necesarios para que la proteína realice su función, mientras que la región N-terminal es necesaria para su correcta localización en la región de división.
3. Pxl1 forma parte del anillo contráctil de actomiosina y participa en la organización de las miosinas de tipo II del anillo contráctil.
4. Las células que carecen de Pxl1 presentan un retraso en la contracción del anillo de actomiosina, que probablemente es debido a la desorganización de las miosinas de tipo II en esta estructura.

*MATERIALES Y
MÉTODOS*

1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS

El presente trabajo se ha realizado principalmente con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, aunque también se ha empleado la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y190 para la realización del escrutinio con el sistema del “doble híbrido” (Durfee *et al.*, 1993). Para realizar los trabajos de clonación molecular se utilizó la estirpe DH5 α de *Escherichia coli*. Todas las cepas se recogen en la [Tabla III](#), donde se detalla su procedencia y su genotipo. Tanto las cepas de *S. pombe* como las cepas de *S. cerevisiae* se conservaron en glicerol al 25% a -78°C . Las cepas de *E. coli* se conservaron a -78°C en glicerol al 50%.

Tabla III: Cepas de utilizadas en este trabajo.

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
PPG0102	h ⁻ <i>leu1-32</i>	Colección laboratorio
PPG0103	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18</i>	Colección laboratorio
PPG5660	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 cdc42-1625:kanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG0160	h ⁻ <i>leu1-32 ade6 HA-rho1</i>	Colección laboratorio
PPG5730	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 HA-rho1 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5026	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 ade6 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG5059	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5066	h ⁻ <i>leu1-32 ade6 HA-rho1 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG6003	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 ehs2-1</i>	Y. Sánchez (Tajadura <i>et al.</i> , 2004)
PPG5172	h ⁻ <i>leu1-32 ehs2-1 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG0754	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 HA-rho1 rga5::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG6151	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga7::kanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG6027	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::kanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG6848	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga4::kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5079	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga5::ura4⁺ pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG6036	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rgf1::kanMX6</i>	Y. Sánchez (García <i>et al.</i> , 2006a)
PPG6037	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 his3-D1 rgf1::kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5054	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5165	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺ cut11⁺-GFP::ura4⁺</i>	Este trabajo

Tabla III: Cepas utilizadas en este trabajo (continuación).

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
PPG5156	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cut11⁺-GFP:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG0148	<i>h⁻ ura4-D18 cdc25-22</i>	Colección laboratorio
PPG5069	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5714	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺Δ3:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5715	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺Δ1,2,3:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5718	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺Δ2,3:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5719	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺ΔN:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5738	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺-PAX:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5740	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺-PXL1:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG1720	<i>h⁺ leu1-32 cdc15-140</i>	V. Simanis
PPG5062	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc15-140 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5115	<i>h⁺ leu1-32 cdc4-8</i>	K. Gould (McCollum <i>et al.</i> , 1995)
PPG5116	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc4-8 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5114	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc12-112</i>	P. Nurse (Chang <i>et al.</i> , 1997)
PPG5123	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cdc12-112 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG0305	<i>h⁻ leu1-32 cdc11-119</i>	V. Simanis
PPB5075	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc11-119 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG1721	<i>h⁻ leu1-32 cdc16-116</i>	M. Balasubramanian
PPG5112	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc16-116 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG6018	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG6015	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG6024	<i>h⁻ ura4-D18 GFP- myo2⁺:kanMX6 sad1⁺-GFP:kanMX6 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5161	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 GFP-cdc15⁺:kanMX6</i>	T. Pollard (Wu <i>et al.</i> , 2006)
PPG6026	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 GFP-cdc15⁺:kanMX6 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5160	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 cdc12⁺-3YFP:kanMX6 sad1⁺-CFP:kanMX6</i>	T. Pollard (Wu <i>et al.</i> , 2006)
PPG6045	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 cdc12⁺-3YFP:kanMX6 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5110	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 pxl1::kanMX6 HA-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5118	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 GFP-cdc15⁺:kanMX6 pxl1::KamMX6 HA-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo

Tabla III: Cepas utilizadas en este trabajo (continuación).

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
PPG2457	<i>h⁻ ura4-D18 mid1::ura4⁺</i>	V. Simanis (Sohrman <i>et al.</i> , 1996)
PPG6039	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 mid1::ura4⁺ pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG5131	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 rlc1::kanMX6</i>	V. Simanis (Le Goff <i>et al.</i> , 2000)
PPG5148	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rlc1::kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG1081	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 myo2-E1</i>	M. Balasubramanian (Balasubramanian <i>et al.</i> , 1998)
PPG6030	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 myo2-E1 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG5129	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 myp2::ADE2</i>	I. Mabuchi (Motegui <i>et al.</i> , 1997)
PPG5144	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 myp2::ADE2 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG3739	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rng2-D5</i>	M. Balasubramanian (Balasubramanian <i>et al.</i> , 1998)
PPG5107	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc15-140 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG6049	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cdc12-112 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG3826	<i>h⁺ leu1-32 cps1-N12</i>	JC. Ribas (Le Goff <i>et al.</i> , 1999)
PPG0234	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cps1-12</i>	JC. Ribas
PPG3824	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cps1-191</i>	JC. Ribas
PPG0142	<i>h⁺ leu1-32 cwg1-1</i>	Colección laboratorio
PPG5179	<i>h⁻ leu1-32 cwg1-1 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG3326	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 spn3::ura4⁺</i>	J. Pringle (An <i>et al.</i> , 2004)
PPG5125	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 spn3::ura4⁺ pxl1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG3120	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 mid2::ura4⁺</i>	K. Gould (Tasto <i>et al.</i> , 2003)
PPG5127	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 mid2::ura4⁺ pxl1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG5162	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 GFP-myo2⁺::kanMX6 sad1⁻-GFP::kanMX6</i>	T. Pollard (Wu <i>et al.</i> , 2006)
PPG5168	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 GFP-myo2⁺::kanMX6 sad1⁻-GFP::kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG2620	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rlc1⁺-GFP::kanMX6</i>	V. Simanis (Le Goff <i>et al.</i> , 2000)
PPG5152	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rlc1⁺-GFP::kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG4141	<i>h⁻ leu1-32 ura4D-1 cdc4⁺-GFP::ura4⁺</i>	F. Chang
PPG5155	<i>h⁻ leu1-32 ade6 cdc4⁺-GFP::ura4⁺ pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG6021	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 myp2⁺-GFP::kanMX6</i>	T. Pollard (Wu <i>et al.</i> , 2006)
PPG6022	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 myp2⁺-GFP::kanMX6 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺::leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG6019	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 myp2⁺-GFP::kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5170	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 cdc12⁺-3YFP::kanMX6 sad1⁻-CFP::kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo

Tabla III: Cepas utilizadas en este trabajo (continuación).

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
PPG6110	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 his3-D1 bgs1::ura4⁺ bgs1⁺-GFP:leu1⁺</i>	JC. Ribas
PPG6007	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 his3-D1 bgs1::ura4⁺ bgs1⁺-GFP:leu1⁺ pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG6011	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 his3-D1 bgs4::ura4⁺ bgs4⁺-GFP:leu1⁺</i>	JC. Ribas
PPG5177	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 bgs4::ura4⁺ bgs4⁺-GFP:leu1⁺ pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG3819	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 spn1⁺-GFP:kanMX6</i>	K. Gould (An <i>et al.</i> , 2004)
PPG5103	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 spn1⁺-GFP:kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG3709	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 sec8⁺-GFP:ura4⁺</i>	M. Balasubramanian
PPG5105	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 sec8⁺-GFP:ura4⁺ pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG3749	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 eng1⁺-GFP:kanMX6</i>	F. del Rey (Martín-Cuadrado <i>et al.</i> , 2003)
PPG3781	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 agn1⁺-GFP:kanMX6</i>	Y. Sánchez (García <i>et al.</i> , 2005)
PPG5171	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 eng1⁺-GFP:kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5073	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 agn1⁺-GFP:kanMX6 pxl1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG6041	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rlc1⁺-GFP:kanMX6 pxl1::ura4⁺ GST-pxl1:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5711	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 pxl1::kanMX6 GFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo
PPG5705	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 HA-rho1⁺</i>	Este trabajo
PPG1751	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga7⁺-GFP:kanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG6868	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga7⁺-GFP:kanMX6 pxl1::kanMX6 HA-pxl1⁺:leu11⁺</i>	Este trabajo
PPG6866	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga7⁺-GFP:kanMX6 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG1811	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4⁺-GFP:kanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG6849	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4⁺-GFP:kanMX6 pxl1::kanMX6 HA-pxl1⁺:leu11⁺</i>	Este trabajo
PPG6847	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga7⁺-GFP:kanMX6 pxl1::kanMX6</i>	Este trabajo
PPG1752	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga1⁺-GFP:kanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG6856	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga4⁺-GFP:kanMX6 pxl1::kanMX6 HA-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Este trabajo

Saccharomyces cerevisiae

Y190	MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112 ura3::gal1→LacZ lys2::gal(UAS) →his3 cyhr	Colección laboratorio
------	--	-----------------------

Escherichia coli

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

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* han sido descritos por (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 por calor 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).
- **Medio YES+G.** Se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* transformadas con el marcador de resistencia a geneticina. Su composición es la del medio YES más 100 µg/ml de sulfato de geneticina (G-418, Life Technologies).
- **Medio mínimo (MM).** Se utilizó como medio de selección en los experimentos de transformación de cepas de *S. pombe* auxótrofas para leucina o uracilo. También se usó para el crecimiento rutinario de cepas transformadas con plásmidos. Para llevar a cabo los experimentos de sobreexpresión con el promotor del gen *nmt*, las células se cultivaron en medio mínimo con los suplementos adecuados y tiamina (5 µg/l), consiguiendo la represión del promotor (Maundrell, 1990). Posteriormente, las células se lavaron 4 veces con 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 medio es la siguiente: Glucosa al 2%, ftalato monopotásico al 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 esterilizados previamente por filtración:
 - **Solución concentrada de sales (50X):** MgCl₂ 6H₂O 0,26 M, CaCl₂ 2H₂O 5 mM, KCl 0,67 M y Na₂SO₄ 14 mM.
 - **Solución concentrada de minerales (10.000X):** H₃BO₃ 81 mM, MnSO₄ 23,7 mM, ZnSO₄ 7H₂O 14 mM, FeCl₃ 6H₂O 7,4 mM, MoO₄ 2H₂O 2,5 mM, KI 6 mM, CuSO₄ 5H₂O 1,6 mM y Ácido cítrico 47,6 mM.

- **Solución concentrada de vitaminas (1000X):** Ácido nicotínico 81,2 mM, Inositol 55,5 mM, Biotina 40,8 mM y Ácido Pantoténico 4,2 mM.

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

- **Medio de esporulación (MEA).** Usado para inducir 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. El calcoflúor y la caspofungina se añadieron al medio esterilizado hasta conseguir la concentración final deseada. Para los ensayos de dependencia de la localización de proteínas con respecto a la actina se usó la droga Latrunculina A a una concentración de 50 μ M en cultivos de medio YES líquido, partiendo de una solución madre preparada en DMSO a una concentración de 5 mM.

2.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

Para el crecimiento de las cepas de *S. cerevisiae* se utilizaron los siguientes medios:

- **Medio rico (YEPD).** Usado para el crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*. Su composición es: Extracto de levadura al 1%, peptona al 2% y glucosa al 2%.
- **Medio mínimo (YNB).** Su composición es: Base nitrogenada sin aminoácidos al 0,67%, glucosa al 2%. Para seleccionar los clones his⁺ en el ensayo de doble híbrido, se utilizó el medio YNB suplementado con 3AT (3-aminotriazol, Sigma A8056) a una concentración de 40 mM. Para mantener la presión selectiva en las estirpes transformadas con plásmidos, se empleó una mezcla comercial de aminoácidos sin el suplemento correspondiente (BIO 101 Systems).

2.3. 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* y *S. cerevisiae*

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de cepas de *S. pombe* o *S. cerevisiae* cuyas características genéticas se habían comprobado anteriormente. Normalmente se preparaba un preinóculo en medio líquido, al que se dejaba alcanzar la fase exponencial; posteriormente se preparaba 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 ó 36-37°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 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 1 equivale aproximadamente a 2×10^7 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 (37°C) detiene el ciclo celular en fase G2 (Mitchison and Creanor, 1971). Esta propiedad se puede aprovechar para conseguir cultivos sincrónicos. Inicialmente, esta cepa mutante se cultivó en medio YES a 25°C durante toda la noche. A la mañana siguiente se diluyó el medio YES a una D.O. a 600 nm de 0,3 y se incubó a 37°C durante 4 horas para provocar la parada del ciclo celular, al cabo de las cuales se hizo descender la temperatura a 25°C sumergiendo el fondo de los matraces en un baño de agua y hielo. A continuación, los cultivos se incubaron a 25°C, que es cuando las células empiezan a crecer de forma sincrónica (aproximadamente en un 90%), y se tomaron muestras a lo largo del tiempo. Esta sincronía se mantiene durante uno o dos ciclos mitóticos tras la liberación de la parada.

3.3. Condiciones de crecimiento para *E. coli*

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

4. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD β -GALACTOSIDASA EN PLACA

Durante el escrutinio realizado con el sistema del doble híbrido se analizó la actividad β -galactosidasa de las colonias capaces de crecer en medio sin leucina ni triptófano siguiendo el proceso descrito por (Durfee *et al.*, 1993). Las colonias se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, se permeabilizaron por inmersión en nitrógeno líquido durante 5 segundos y se depositaron sobre un papel Whatman 3MM humedecido en solución Z (Na_2HPO_4 8,53 g/l, NaH_2PO_4 5,08 g/l, KCl 0,75 g/l, MgSO_4 0,12 g/l y 2,7 ml 2- β -mercaptoetanol) con 1 mg/ml de X-Gal (American Biorganics). Los filtros se incubaron a 37°C de 1 a 5 horas para verificar la coloración azulada de las colonias.

5. MÉTODOS GENÉTICOS

5.1. Conjugación y obtención de diploides

Para inducir la conjugación entre 2 cepas de *S. pombe*, se usaron estirpes heterotálicas de tipo sexual opuesto (h^+ o h^-) incubadas durante 24 horas en placa 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. Los cigotos se forman al cabo de 12-20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 1-2 días de incubación a 28°C.

Aunque la forma diploide de *S. pombe* no es estable de forma natural, es posible conseguir cepas diploides de manera experimental. Para obtener células diploides, se realizaron cruces entre cepas haploides h^+ y h^- con requerimientos nutricionales complementarios. Por ejemplo, usando cepas que portan los alelos *ade6-M210* y *ade6-M216* se pueden seleccionar diploides en medios carentes de adenina, por complementación intragénica. A las 10-12 horas después de haber preparado el cruce, cuando la conjugación ya ha tenido lugar pero no se detectan esporas dentro de los cigotos, se extiende la mezcla de células del cruce en MM con los suplementos necesarios, pero sin adenina, de modo que sólo las células diploides puedan crecer. Tan pronto como se aprecian las colonias a simple vista, éstas se transfieren a placas de medio YES para evitar que los diploides esporulen. Los di-

ploides así aislados se mantienen en YES para inhibir su esporulación, reestriéndolos cada 2-3 días en medio fresco. Antes de realizar cualquier experimento con ellos, se comprobó su genotipo mediante réplicas en medio mínimo selectivo, y su capacidad para esporular en medio MEA, para evitar seleccionar diploides estériles.

5.2. Aislamiento de ascosporas al azar

Para separar las esporas de cada cruce, se hicieron suspensiones en agua estéril de las mezclas de conjugación incubadas durante 2 días a 28°C en placas de MEA, y se trataron con 20-50 unidades de NEE-154 glusulasa (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 prepararon 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. Las estirpes con el genotipo deseado se seleccionaron por réplica en diferentes medios selectivos o a distinta temperatura.

5.3. Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: Análisis de tétradas

El análisis de tétradas se realiza sobre cruces o diploides esporulados con el fin de determinar los productos de la segregación meiótica. El proceso se llevó a cabo con un micromanipulador automático (Singer MSM System Series 200) de la forma siguiente: Se resuspendió una pequeña cantidad de cultivo esporulado en 200 µl de agua estéril y se extendieron 5 µl en un extremo de una placa de YES. Se recogieron ascas y se depositaron en una zona de la placa libre de células. Se incubó la placa durante 2-3 horas a 25°C ó 32°C. Se depositaron las 4 esporas de cada asca en posiciones libres de células de la misma placa. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C ó 28°C. Finalmente, para realizar el estudio genotípico de cada espora, se realizaron réplicas en medio selectivo y se incubaron a temperaturas permisiva y restrictiva para el aislamiento de las cepas termosensibles.

6. PROCEDIMIENTOS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR

6.1. Vectores utilizados

6.1.1. 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 Glutation-S Transferasa), el gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7 junto con el operón de lactosa para inducir la expresión del gen clonado en presencia de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

- **pGEM-T** (Promega).

Es un vector de 3 Kb que contiene 13 sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción y se comercializa linearizado con una timidina adicional en sus extremos, lo que facilita la inserción de fragmentos generados por PCR. Contiene el gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7. Al igual que el vector pBluescript SK+ permite la selección de clones recombinantes por alfa complementación (azul-blanco).

6.1.2. 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 que lo linearice. Normalmente se utiliza el sitio de restricción de NruI, que se encuentra en el gen *leu1*⁺. El plásmido linearizado se introduce en una cepa *leu1-32*, de modo que, tras la recombinación, en el genoma de *S. pombe* se reconstituyen 2 copias del gen *leu1*⁺, una mutada y otra silvestre, recuperándose así la capacidad de crecer en un medio sin leucina. Este plásmido descrito por (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 pREP 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 pREP 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 expe-

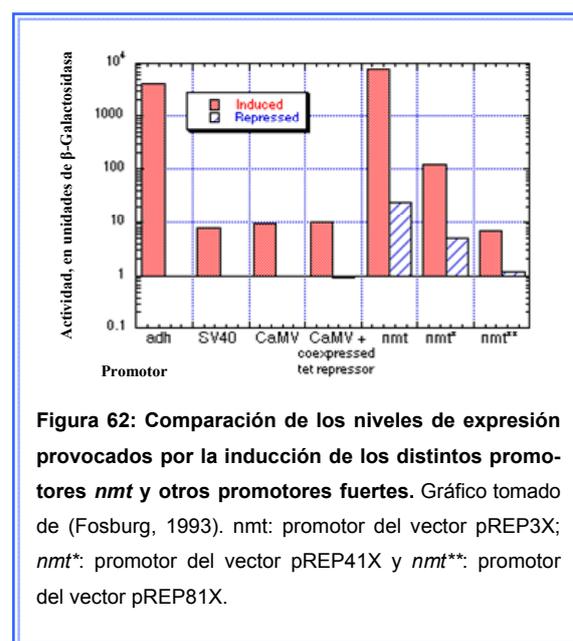


Figura 62: Comparación de los niveles de expresión provocados por la inducción de los distintos promotores *nmt* y otros promotores fuertes. Gráfico tomado de (Fosburg, 1993). *nmt*: promotor del vector pREP3X; *nmt**: promotor del vector pREP41X y *nmt***: promotor del vector pREP81X.

sión intermedia son pREP41X y pREP42X; y los de expresión baja son pREP81X y pREP82X (Basi *et al.*, 1993) (Figura 62). Dentro de esta familia de plásmidos 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 epítopos de la hemaglutinina. Se ha utilizado también una serie de vectores pREP, amablemente cedidos por el Dr. Ian Hagan, en los que se puede clonar el gen deseado en fase con la secuencia del epítipo HA de la hemaglutinina o con la del gen de la proteína verde EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein) (Craven *et al.*, 1998).

6.1.3. Vectores de *S. cerevisiae*

- **pAS2 y pACT2**

Estos vectores de expresión de *S. cerevisiae* se emplean para el ensayo denominado de doble híbrido (Durfee *et al.*, 1993). Ambos vectores contienen el origen de replicación de *E. coli*, el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación del fago f1 y el origen de replicación de 2 μ de *S. cerevisiae*.

El vector pAS2 posee además el dominio de unión a ADN del gen *GAL4* en fase con la secuencia de dos epítopos de la hemaglutinina bajo el control del promotor constitutivo del gen *ADH* y un sitio de clonación múltiple. Como marcador auxotrófico en *S. cerevisiae*, lleva el gen *TRP1*. También lleva el gen *CYH2*, que confiere sensibilidad a cicloheximida en cepas *cyh^r*.

El vector pACT2, por su parte, posee el dominio de activación transcripcional del gen *GAL4* en fase con la secuencia de dos epítopos de la hemaglutinina y un sitio de clonación múltiple. Como marcador auxotrófico en *S. cerevisiae*, lleva el gen *LEU2*.

6.2. 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).

6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se llevó a cabo en un termocicla-

GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems. Las mezclas de reacción contenían: Tampón de reacción suministrado por el proveedor, $MgCl_2$ 1,5 mM, los 4 desoxinucleótidos trifosfatos precursores a una concentración final de 0,2 mM cada uno, 40 pmoles de cada oligonucleótido utilizado como cebador, 0,25 unidades de Taq polimerasa (EcoTaq, Ecogen) y una cantidad de ADN molde variable, dependiendo si se trataba de ADN genómico o plasmídico. Para la comprobación rutinaria de cepas mutantes de *S. pombe*, se diluyeron células directamente en la mezcla de reacción, sin necesidad de extraer el ADN.

La reacción requiere la desnaturalización del ADN molde, el anillamiento de los cebadores u oligonucleótidos incorporados a la reacción y, finalmente, la extensión de las hebras sintetizadas. En cada momento se requiere que la reacción se encuentre a una temperatura determinada. El número de ciclos, la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión se modificó dependiendo de las características del experimento.

La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de GE Healthcare.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Isogen o Thermo y sus secuencias y utilidad se describen en la [tabla IV](#).

6.4. 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 por (Sanger *et al.*, 1977), pero en este caso, se emplearon didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos y un láser capaz de reconocer los distintos colores (longitudes de onda de emisión) de los fluorocromos, que corresponden a cada una de las bases del ADN. El fundamento de este sistema es una reacción de PCR en la cual la extensión de una cadena de ADN a partir de un oligonucleótido iniciador, empleando ADN bicatenario como molde, es interrumpida por la incorporación de didesoxinucleótidos.

6.5. Manipulación del ADN

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

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o por amplificación mediante PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de

Tabla IV: Oligonucleótidos usados en este trabajo

NOMBRE	SECUENCIA	UTILIDAD
pax-1	5'-CGC <u>GGATCC</u> ATATG CATTACCAATTCCAGATT-3' BamHI NdeI	Clonación de <i>px11</i> ⁺
pax-2	5'-CGC <u>GGATCC</u> TTAATCCAAATTAACCTTGACTGA-3' BamHI	Clonación de <i>px11</i> ⁺
pax promo1	5'-AAAA <u>CTGCAG</u> AGCGAAATGCTGTATGCCTG-3' PstI	Clonación del promotor de <i>px11</i> ⁺
pax promo2	5'-GGGAATTC <u>CATATG</u> CTGATATGCTTCTCAACTATC-3' NdeI	Clonación del promotor de <i>px11</i> ⁺
pax termi1	5'-CGC <u>GGATCC</u> CTCAGACTTACTCATCACTTTC-3' BamHI	Clonación del terminador de <i>px11</i> ⁺
pax termi2	5'-ATATCCC <u>CCGCGG</u> TGTTTGGTAGTGTACTGCA-3' SacII	Clonación del terminador de <i>px11</i> ⁺
pax Dlim123	5'-CGC <u>GGATCC</u> TTAGGATTTTTCAGAATTGCCTCTAT-3' BamHI	Clonación de <i>px11Δ123</i> ⁺
pax Dlim23	5'-CGC <u>GGATCC</u> TTAGCGAGGACTGAACTGTTTCATG-3' BamHI	Clonación de <i>px11Δ23</i> ⁺
pax Dlim3	5'-CGC <u>GGATCC</u> TTACTIONACAGCATACTTATTATCATAAC-3' BamHI	Clonación de <i>px11Δ3</i> ⁺
pax DN	5'-CGC <u>GGATCC</u> ATATG GTATCTTCTCATACATCTAC-3' BamHI	Clonación de <i>px11ΔN</i> ⁺
pax10NheI	5'-ATATAT <u>GCTAGC</u> TTTTTCAGAATTGCCTCTATAAAG-3' NheI	Clonación extremo 5' de <i>px11</i> ⁺
px SC3	5'-ATATAT <u>GCTAGC</u> TGCAGAGCATGCGGCTTGGAA-3' NheI	Clonación del extremo 3' de <i>PXL1</i>
px SC4	5'-ATATAT <u>AAGCTT</u> <u>GGATCC</u> CTAGTTGAAGTTGATGAGCCTC-3' HimDIII BamHI	Clonación del extremo 3' de <i>PXL1</i>
galPx7	5'-ATATAT <u>GCTAGC</u> TGCGGAGCCTGCAAGAAGC-3' NheI	Clonación del extremo 3' de <i>PAX</i> de <i>G. gallus</i>
galPx8	5'-ATATAT <u>AAGCTT</u> <u>GGATCC</u> TTAACAGAAGAGTTTGAGAAAGCAG-3' HimDIII BamHI	Clonación del extremo 3' de <i>PAX</i> de <i>G. gallus</i>
cherry-1	5'-ATATATAT <u>CATATG</u> GTGAGCAAGGGCGAGG-3' NdeI	Clonación de cherryRFP
cherry-2	5'-ATATATAT <u>CATATG</u> CTTGTACAGCTCGTCCATGC-3' NdeI	Clonación de cherryRFP

agarosa (UltraPure, Life Technologies) de distinto porcentaje, según el tamaño de los fragmentos a analizar. Los geles de agarosa llevaban bromuro de etidio a una concentración final de 0,1 µg/ml, para localizar el ADN tras iluminarlos con una fuente de luz ultravioleta. El tampón utilizado, tanto para preparar la agarosa como para realizar la electroforesis fue TAE [40mM Tris-HCl, 1mM EDTA (ácido etilén diamino tetra-acético), pH 7,5].

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).

6.6. 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.

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

6.7. Transformación de levaduras

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

6.8. Deleción de *pxl1*⁺

La eliminación de la ORF correspondiente a *pxl1*⁺ se llevó a cabo mediante la técnica de reemplazamiento génico en un solo paso descrita por Rothstein (Rothstein, 1983; Rothstein, 1991).

Para llevar a cabo este proceso, se construyó un “módulo de deleción”. Este módulo contenía 700 pares de bases de la región promotora de *pxl1*⁺, el gen de resistencia a geneticina (*KanMX6*) o de prototrofia para uracilo (*ura4*⁺) y 500 pares de bases del terminador de *pxl1*⁺. El “módulo de deleción” se construyó mediante clonación secuencial de cada una de las partes en el plásmido KS (figura 63).

En primer lugar, se obtuvieron las distintas regiones que conforman el módulo de integración mediante PCR de alta fidelidad. La región promotora se clonó, usando los oligonucleótidos “pax promo1”, que incorpora el sitio de restricción PstI, y “pax promo2”, que anilla



por detrás del sitio EcoRI que posee la secuencia del promotor de *pxl1*⁺, usando como molde ADN genómico extraído de una cepa silvestre. El módulo de resistencia a la geneticina o el marcador *ura4*⁺ se obtuvieron mediante digestión del plásmido pFA6a-kanMX6 o pFA6a-ura4 con las enzimas EcoR1 y BamH1. La región terminadora se clonó utilizando los oligonucleótidos “pax termi1”, que incorpora el sitio BamH1, y “pax termi2”, que incorpora el sitio SacII, usando como molde ADN genómico,

El plásmido obtenido con el módulo de delección, se cortó con las enzimas PstI y SacII, generando un fragmento de DNA que se purificó y se utilizó para transformar una cepa diploide de *S. pombe* e inducir el intercambio de la ORF del gen *pxl1*⁺ por el marcador de selección mediante recombinación homóloga.

6.9. Clonación de *pxl1*⁺

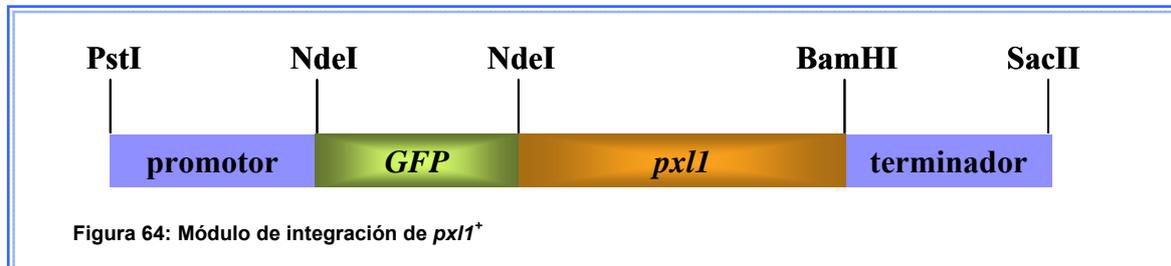
El gen *pxl1*⁺ se clonó llevando a cabo una PCR de alta fidelidad a partir de ADN genómico obtenido de una cepa silvestre de *S. pombe*, utilizando los oligonucleótidos “pax-1”, que incorpora los sitios BamHI y NdeI, y “pax-2”, que incorpora el sitio BamHI. El producto de la PCR se cortó con la enzima BamHI y se clonó en un plásmido KS (KS-*pxl1*⁺). Secuenciamos la ORF de *pxl1*⁺, y una vez comprobado que la secuencia era correcta, este gen se clonó en los plásmidos pREP3X, pREP41X y pREP81X en el sitio BamHI de su secuencia de clonación múltiple.

6.10. Construcción del módulo de integración de *pxl1*⁺

Para poder fusionar al extremo 5' de la ORF de *pxl1*⁺ las secuencias de ADN que codifican el epítipo HA, la proteína GFP, la proteína cherryRFP o la proteína GST, construimos un módulo de integración de *pxl1*⁺ (Figura 64).

El módulo se construyó por clonación secuencial de cada de sus elementos en el plásmido KS. En primer lugar, se clonó un fragmento de 0,7 Kb de la región promotora de *pxl1*⁺ utilizando los oligonucleótidos “pax promo1”, que incluye el sitio PstI, y “pax promo2”, que incluye el sitio NdeI. La ORF de *pxl1*⁺ se obtuvo del plásmido KS-*pxl1*⁺ cortado con NdeI-BamHI. Las secuencias que codifican la proteína GFP, la proteína GST, la proteína cherryRFP o el epítipo HA se clonaron como NdeI-NdeI. La región terminadora de *pxl1*⁺ se

obtuvo a partir del “módulo de delección” de este gen cortando con las enzimas BamHI y SacII. Finalmente el módulo de integración se clonó en el plásmido integrativo pJK148. El plásmido generado se linearizó cortando con NruI y el ADN purificado se usó para transformar la cepa PPG5026.



6.11. Obtención de las cepas mutantes *pxi1Δ123*, *pxi1Δ23*, *pxi1Δ3* y *pxi1ΔN*

Las diferentes delecciones parciales de *pxi1*⁺, en las que eliminamos uno (*pxi1Δ3*⁺), dos (*pxi1Δ23*⁺) o los tres dominios LIM (*pxi1Δ123*⁺), o el extremo 5' (*pxi1ΔN*⁺), se obtuvieron mediante PCR de alta fidelidad empleando como molde el plásmido KS-*pxi1*⁺ y usando los siguientes pares de oligonucleótidos:

- ***pxi1Δ123*⁺**: “pax-1”, que incluye el sitio NdeI, y “pax Dlim123”, que incluye un sitio BamHI.
- ***pxi1Δ23*⁺**: “pax-1”, que porta el sitio NdeI, y “pax Dlim23”, que incluye un sitio BamHI.
- ***pxi1Δ3*⁺**: “pax-1”, que incluye el sitio NdeI, y “pax Dlim3”, que incluye un sitio BamHI.
- ***pxi1ΔN*⁺**: “pax DN” que incorpora el sitio NdeI, y “pax-2”, que incorpora un sitio BamHI.

A continuación la ORF original de *pxi1*⁺ se sustituyó por las diferentes ORFs truncadas en el plásmido pJK148 con el inserto de *GFP-pxi1*⁺. Los diferentes plásmidos se linearizaron con la enzima NruI y los fragmentos de ADN obtenidos se usaron para transformar la cepa PPG5026.

6.12. Obtención de las cepas que expresan las proteínas quiméricas SpPxl1/ScPxl1 y SpPxl1/paxilina fusionadas a la proteína GFP

Para construir estas cepas lo primero que se hizo fue obtener mediante PCR cada una de los fragmentos correspondientes de los genes *pxi1*⁺ de *S. pombe*, *PXL1* de *S. cerevisiae* y *PAX* de *G. gallus*. Los pares de oligonucleótidos y los moldes utilizados para llevar a cabo las PCRs son los siguientes:

- **Extremo 5' de *pxl1*⁺**: Se empleó como molde el plásmido KS- *pxl1*⁺ y se utilizaron los oligonucleótidos “pax-1”, que incorpora los sitios NdeI y BamHI, y “pax10NheI”, que porta un sitio NheI.
- **Extremo 3' de *PXL1***: Como molde se usó el plásmido BSE 352, que porta la ORF del gen *PXL1* de *S. cerevisiae*, cedido amablemente por el Dr. E. Erdman (Mackin *et al.*, 2004). Se usaron los oligonucleótidos “pxSc3”, que incluye un sitio NheI, y “pxSc4”, que porta un sitio BamHI.
- **Extremo 3' de *PAX***: Como molde se utilizó un plásmido que contenía la ORF del gen que codifica la proteína paxilina de *G. gallus* cedido por el Dr. E. Erdman. Se emplearon los oligonucleótidos “galPx7”, que incluye un sitio NheI, y “galPx8”, que añade un sitio BamHI.

A continuación, el extremo 5' de *pxl1*⁺ se clonó en fase con el extremo 3' de *PXL1* o con el extremo 3' de *PAX* en un plásmido KS. Una vez secuenciadas las construcciones, las diferentes ORFs quiméricas se cortaron como NdeI-BamHI y se sustituyó la ORF original de *pxl1*⁺ en el plásmido pJK148, que contiene el módulo de integración *GFP-pxl1*⁺, por los genes quiméricos. Los plásmidos se linearizaron con NruI y con el ADN obtenido se transformó la cepa PPG5026.

7. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

7.1. Obtención de extractos celulares

Los ensayos de “Western-blot” y precipitación se realizaron a partir de extractos celulares obtenidos de la siguiente manera: Se resuspendieron 1×10^8 células en 100 μ l de tampón de lisis A (Tris HCl 20 mM pH 8, EDTA 2 mM, NaCl 100 mM y NP-40 al 0,5%) con inhibidores de proteasas (aprotinina 2 μ g/ml, leupeptina 2 μ g/ml, pepstatina 2 μ g/ml y PMSF 1 mM). Las células se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, Sigma) en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6,0. 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 de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito por (Bradford, 1976).

7.2 Precipitación e inmunoprecipitación

Para realizar los ensayos de precipitación e inmunoprecipitación, obtuvimos extractos de

1×10^8 células que expresaban las diferentes proteínas marcadas con epítomos HA, con la proteína GFP, o con la proteína GST. En el caso de que alguna de las proteínas en estudio estuviera marcada con GST, se siguió con el siguiente protocolo: Se incuban 2 mg de proteína en presencia de 30 μ l de bolitas de glutation sefarosa (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare) al 50% durante 2-4 horas en agitación a 4°C. En el caso de que ninguna proteína estuviera marcada con GST, se utilizaron anticuerpos frente al epítomo HA o frente a la proteína GFP, previamente incubados con 30 μ l de proteína A-sefarosa (Protein A sepharose CL-4B, GE Healthcare) al 50%, en tampón de lisis durante 2-4 horas a 4°C y se añadió a 2 mg de extractos proteicos. Posteriormente, los complejos unidos a la matriz de sefarosa se sedimentaron por centrifugación y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis. Finalmente, las bolitas de glutation-sefarosa o proteína A-sefarosa se resuspendieron en 30 μ l de tampón de carga 2X (SDS al 4%, glicerol al 20%, DTT 100 mM y azul de bromofenol al 0,08%) para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

7.3. 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 16.000 x g durante otros 5 minutos.

Las proteínas se separaron según su tamaño mediante electroforesis en geles de distinto porcentaje de poliacrilamida, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) como se describe en (Laemmli, 1970), a una intensidad de 30 mA por cada gel. El tampón de carrera utilizado fue Tris/Glicina (24,8 mM/192mM), SDS al 0,1% pH 8,3. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore) utilizando el sistema Mini Protean III de BioRad, usando como tampón Tris/Glicina (24,8 mM/192mM), metanol al 10%, pH 8,3, durante 90 minutos a 100 V.

7.4. Inmunodetección de proteínas

En primer lugar, las membranas se bloquearon en TBST (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM y 0,1% de Tween 20 de Sigma) con seroalbúmina bovina al 1% o con leche desnatada al 5%, durante toda la noche a 4°C o durante 45 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se incubaron con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en solución de bloqueo durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C. Se lavaron 4 veces durante 5 minutos con abundante TBST y se incubaron después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa (HRP, horseradish peroxidase) durante 45 minutos a temperatura ambiente. Las membranas se volvieron a lavar 4 veces con TBST y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia. Se empleó el kit ECL (RPN2106 Amersham Corporation). Las proteínas reconocidas

por los anticuerpos se detectaron usando películas X Ray Film 100NIF (Fujifilm).

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo monoclonal frente al epítipo HA, 12CA5 (Boehringer), a una dilución 1:6.000.
- Anticuerpo monoclonal frente a actina, C4 (ICN Biomedicals) a una dilución 1:5.000.
- Anticuerpo monoclonal frente a la proteína GFP, JL-8 (BD Biosciences), a una dilución 1:2.000.
- Anticuerpo policlonal anti-GFP a una dilución 1:5.000 (Invitrogen).
- Anticuerpo policlonal anti-GST conjugado a HRP a una dilución 1:5.000 (Amersham).
- Anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón unido a HRP (BioRad) a una dilución 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo unido a HRP (BioRad) a una dilución 1:10.000.

7.5. Valoración de GTP-Rho1

7.5.1. Producción de GST-RBD

La cantidad de Rho1 activa se determinó mediante el ensayo de precipitación con GST-RBD. Este dominio sólo se asocia a Rho1 cuando está unida a GTP. La proteína recombinante GST-RBD se obtuvo en una cepa DH5 α de *E. coli* transformada con el plásmido pGEX-RBD. Este plásmido lleva el fragmento de ADN que codifica el péptido C21 que contiene el dominio de unión a RhoA (RBD, de Rho binding domain) de la proteína rotequina fusionada a la secuencia que codifica la proteína GST (Reid *et al.*, 1996). Las bacterias transformadas se incubaron a 28°C en 400 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,6. En este momento, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión del gen que codifica la proteína de fusión y se incubaron 3 horas más a 28°C.

Se recogieron las células por centrifugación a 5.000 rpm y se resuspendieron en 20 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂HPO₄ 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM) frío al que se añadieron previamente inhibidores de proteasas (2 μ g/ml de pepstatina, 2 μ g/ml de leupeptina, 2 μ g/ml de aprotinina y 1mM de PMSF) y lisozima (2 mg/ml). Tras 30 minutos de incubación en hielo, las células se sonicaron 4 veces a una potencia de 14 μ m de amplitud de onda durante 1 minuto. Se añadió Tritón TX-100 a una concentración final del 1% y se centrifugaron las células lisadas a 7.800 x g durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se añadieron 600 μ l de glutation-sefarosa

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

La cantidad de proteína se cuantificó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% teñido con azul de Coomasie, comparándola con diferentes cantidades de seroalbúmina bovina.

7.5.2. Ensayo de unión

Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio que expresaban HA-Rho1, tal y como se describió en el apartado 7.1. de Materiales y Métodos, pero utilizando tampón de lisis B (ver apartado 7.5.1. de Materiales y Métodos). Los extractos (2 mg de proteína total), se llevaron a 500 µl con tampón de lisis B y se añadieron 10 µg de GST-RBD asociado a bolas de glutation sefarosa. Se incubaron 2-4 horas a 4°C y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis B. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X y se sometieron a SDS-PAGE en un gel al 12%, luego se transfirieron a una membrana de PVDF y se incubaron con anticuerpos monoclonales anti-HA 12CA5 para detectar la fracción de la proteína HA-Rho1 unida a GTP que había precipitado al unirse al dominio RBD.

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

Se utilizó el método descrito por (Arellano *et al.*, 1996). El marcaje radiactivo de las paredes de las células se llevó a cabo tras la inducción del promotor del gen *nmt1*, por lo que las células se incubaron en medio mínimo sin tiamina durante 16 horas a 28°C antes de añadir el precursor radiactivo. El marcaje se realizó en cultivos de 10 ml durante un periodo de 6 horas a 28°C y con 0,5 µCi/ml de D-¹⁴C-glucosa.

Se tomaron dos muestras de 50 µl al comenzar y dos al terminar la incubación para calcular la incorporación total de glucosa radiactiva en las células. El resto de cultivo se recogió, se lavó dos veces con EDTA 1 mM y se sometió a rotura mecánica mediante agitación con bolas de vidrio en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant). La rotura se comprobó por observación al microscopio de contraste de fases. A continuación se eliminaron las bolitas de vidrio y se centrifugó el extracto 5 minutos a 1.000 x g para recoger las paredes. Estas se lavaron tres veces con NaCl 5M y otras tres con EDTA 1 mM pH 7 y se tomaron dos alícuotas de 20 µl para determinar la incorporación total de ¹⁴C-glucosa en las paredes.

Las paredes se hirvieron 5 minutos para inactivar las posibles glucanasas de la pared y se resuspendieron en 500 μ l de EDTA 1 mM. Se hicieron alícuotas de 100 μ l, de las cuales una se incubó con 100 μ l de tampón citrato-fosfato 50 mM pH 5,6; dos alícuotas se incubaron en el mismo tampón en presencia de 10 μ g de Zimoliasa 100T (Seikagaku Kogio) y otras dos en el mismo tampón con 100 unidades de Quantazima (Quantum, Biotechnologies ING) que es una β (1-3)-glucanasa recombinante. Todas las muestras se incubaron a 28°C durante 36 horas, tras lo cual se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y de los precipitados.

Todas las alícuotas (excepto los sobrenadantes que se valoraron directamente) se diluyeron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10%, manteniéndose a 4°C hasta ser filtradas sobre papel Whatman GF/C. Estos filtros se lavaron 3 veces con 1 ml de TCA y 2 veces con 1 ml de etanol. Después se secaron y se determinó su radiactividad en un contador de centelleo Wallac 1409, añadiendo líquido de centelleo Optiphase "Hisafe" (Wallace).

El precipitado correspondiente a la incubación con Zimoliasa 100T corresponde al α -D-glucano presente en la pared. El sobrenadante de la incubación con Quantazima corresponde al β (1,3)-glucano. La diferencia entre los precipitados de Quantazima y Zimoliasa 100T corresponde a galactomanano y β (1,6)-glucano.

9. TÉCNICAS MICROSCÓPICA Y TINCIONES

Para llevar a cabo estas técnicas, se emplearon un microscopio Zeiss Axioskop 2 plus y un microscopio Leica DM RXA, ambos equipados con sistemas de iluminación halógena y equipos de fotografía digital. Además, se utilizó un microscopio confocal con láser espectral Leica TCS-SL.

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

Las muestras se tomaron directamente de los cultivos incubados en medio líquido o en placas para su observación. Las muestras se observaron en un microscopio Leica DM RXA con un sistema de filtros para microscopía de contraste diferencial.

9.2. Microscopía de fluorescencia

Para la observación de muestras fluorescentes, se usó el microscopio Leica DM RXA con los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Las imágenes obtenidas se procesaron posteriormente con los progra-

mas Adobe Photoshop CS e Image J.

9.2.1. Fluorescencia directa con GFP

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz ultravioleta de longitud de onda de 488 nm. La GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariontes. Por ello, suele usarse como sistema de detección de la expresión y localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para ello, es necesario fusionar la secuencia de ADN que codifica esta proteína en fase con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la muestra en el microscopio de fluorescencia.

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 (Cyan 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 556 nm. Se han realizado modificaciones de la proteína RFP, como la mCherry, cuya luz de emisión es más brillante y estable, que emite luz de 610 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 587 nm. El marcaje de parejas de proteínas con diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes permiten la realización de experimentos de colocalización (Shaner *et al.*, 2005).

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

9.2.2. Tinción de calcoflúor

El calcoflúor es un fluorocromo que, en *S. cerevisiae* tiñe las zonas de pared celular ricas en quitina, pero que en *S. pombe* se une fundamentalmente al $\beta(1-3)$ -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 15 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 partiendo de cultivos líquidos creciendo en fase loga-

rítmica. Las células se recogieron por centrifugación (1 minuto a 3.000 rpm), se resuspendieron en 50 μ l de agua con calcoflúor a una dilución 1:50 y posteriormente se lavaron con PBS y se concentraron para observar la fluorescencia.

9.2.3. Tinción de actina

Aprovechando la propiedad de la faloidina, una toxina extraída del hongo *Amanita phalloides*, de unirse con alta afinidad a la actina F (actina polimerizada), se puede usar conjugada a un compuesto fluorescente, en este caso, Alexa-fluor 448 como sonda para detectar y teñir la actina en el interior celular.

La tinción de actina se realizó siguiendo las indicaciones y modificaciones realizadas por F. Chang a partir del protocolo inicial descrito por (Marks and Hyams, 1985). Partiendo de un cultivo en fase exponencial, se tomaron 5 ml de células y se fijaron añadiendo 1 ml (1/5 del volumen del cultivo) de formaldehído al 16% (EM-grade MeOH Free, Polysciences) y 500 μ l (1/10 del volumen del cultivo) de tampón PEM (PIPES 100 mM, EGTA 1 mM, Mg₂SO₄ 1mM 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 fluorocromo. Finalmente, se lavaron tres veces con PEM, se tomó 1 μ l de células permeabilizadas y se mezclaron con 8 μ l de Alexa-fluor 448-faloidina (Molecular Probes), resuspendida en PEM. Estas muestras se incubaron en oscuridad durante 1 hora en un agitador orbital a temperatura ambiente. Las muestras así teñidas pueden guardarse durante 1 ó 2 días a 4°C.

9.2.4. Microscopía en tiempo real

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

9.2.5. Microscopía confocal

El seguimiento de determinadas estructuras a lo largo del tiempo se llevó a cabo mediante experimentos de video-microscopía confocal. En estos experimentos es necesario mantener las células en un medio con los nutrientes necesarios para garantizar su crecimiento, y es imprescindible que las células no se muevan en el portaobjetos para obtener una imagen en cada tiempo y poder comparar la evolución de dichos procesos o estructuras celulares.

Las muestras se prepararon utilizando portaobjetos excavados en los que se añadieron 50 μl de medio sólido fundido. Tras solidificar el medio, se añadieron 2 μl de la suspensión de células, se colocó el cubreobjetos y se selló para evitar que las células se movieran.

Utilizamos un microscopio confocal con láser espectral, Leica TCS-SL para observar con más detalle determinadas estructuras celulares como el anillo contráctil y/o obtener composiciones en 3 dimensiones que nos den una idea más ajustada de lo que podría ocurrir realmente en la célula. En cada experimento obtuvimos de 20 a 30 imágenes de secciones transversales de todo el volumen celular (series en Z) con un grosor de 0,2 μm cada una. Dichas imágenes se procesaron utilizando el programa asociado a este microscopio, denominado Leica Confocal Software (LCS), con el que se obtiene la proyección ortogonal máxima o media (según los casos) de dichas secciones, así como la reconstrucción en 3 dimensiones de las mismas.

10. 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/>)

El análisis de los dominios de las proteínas se realizó a través de la base de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>). Las búsquedas bibliográficas se realizaron a través de la base de datos de MedLine (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>).

BIBLIOGRAFÍA

Abruzzo, G. K., Gill, C. J., Flattery, A. M., Kong, L., Leighton, C., Smith, J. G., Pikounis, V. B., Bartizal, K. and Rosen, H. (2000). Efficacy of the echinocandin caspofungin against disseminated aspergillosis and candidiasis in cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. *Antimicrob Agents Chemother* 44, 2310-8.

Adamo, J. E., Rossi, G. and Brennwald, P. (1999). The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol Biol Cell* 10, 4121-33.

Almonacid, M., Moseley, J. B., Janvore, J., Mayeux, A., Fraasier, V., Nurse, P. and Paoletti, A. (2009). Spatial control of cytokinesis by Cdr2 kinase and Mid1/anillin nuclear export. *Curr Biol* 19, 961-6.

Alonso-Núñez, M. L., An, H., Martín-Cuadrado, A. B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., del Rey, F., Gould, K. L. and de Aldana, C. R. (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 16, 2003-17.

Amberg, D. C., Zahner, J. E., Mulholland, J. W., Pringle, J. R. and Botstein, D. (1997). Aip3p/Bud6p, a yeast actin-interacting protein that is involved in morphogenesis and the selection of bipolar budding sites. *Mol Biol Cell* 8, 729-53.

An, H., Morrell, J. L., Jennings, J. L., Link, A. J. and Gould, K. L. (2004). Requirements of fission yeast septins for complex formation, localization, and function. *Mol Biol Cell* 15, 5551-64.

Arellano, M., Coll, P. M. and Pérez, P. (1999a). RHO GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. *Microsc Res Tech* 47, 51-60.

Arellano, M., Coll, P. M., Yang, W., Durán, A., Tamanoi, F. and Pérez, P. (1998). Characterization of the geranylgeranyl transferase type I from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 29, 1357-67.

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, 4584-91.

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. *J Cell Sci* 110 (Pt 20), 2547-55.

Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Durán, A. and Pérez, P. (1999b). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, Pck1p and Pck2p, are targets of Rho1p and Rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci* 112 (Pt 20), 3569-78.

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. *Jonh Wiley and Sons, New York*.

Bähler, J. (2005). Cell-cycle control of gene expression in budding and fission yeast. *Annu Rev Genet* 39, 69-94.

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, 1356-70.

Bähler, J., Steever, A. B., Wheatley, S., Wang, Y., Pringle, J. R., Gould, K. L. and McCollum, D. (1998a). Role of polo kinase and Mid1p in determining the site of cell division in fission yeast. *J Cell Biol* 143, 1603-16.

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. (1998b). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943-51.

Balasubramanian, M. K., Bi, E. and Glotzer, M. (2004). Comparative analysis of cytokinesis in

budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* 14, R806-18.

Balasubramanian, M. K., Helfman, D. M. and Hemmingsen, S. M. (1992). A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast *S. pombe*. *Nature* 360, 84-7.

Balasubramanian, M. K. and McCollum, D. (2004). Regulation of Cytokinesis. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond.*, (ed. R.Egel), 243-254: Springer.

Balasubramanian, M. K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K. C., Naqvi, N. I., He, X., Sazer, S. and Gould, K. L. (1998). Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* 149, 1265-75.

Ballou, C. E., Ballou, L. and Ball, G. (1994). *Schizosaccharomyces pombe* glycosylation mutant with altered cell surface properties. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 9327-31.

Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Nunez, A., Vicente, J., Gacto, M. and Cansado, J. (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* 20, 748-57.

Barral, Y., Mermall, V., Mooseker, M. S. and Snyder, M. (2000). Compartmentalization of the cell cortex by septins is required for maintenance of cell polarity in yeast. *Mol Cell* 5, 841-51.

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, 131-6.

Berg, J. S., Powell, B. C. and Cheney, R. E. (2001). A millennial myosin census. *Mol Biol Cell* 12, 780-94.

Berlin, A., Paoletti, A. and Chang, F. (2003). Mid2p stabilizes septin rings during cytokinesis in fission yeast. *J Cell Biol* 160, 1083-92.

Bezanilla, M., Forsburg, S. L. and Pollard, T. D. (1997). Identification of a second myosin-II in *Schizosaccharomyces pombe*: Myp2p is conditionally required for cytokinesis. *Mol Biol Cell* 8, 2693-705.

Bezanilla, M. and Pollard, T. D. (2000). Myosin-II tails confer unique functions in *Schizosaccharomyces pombe*: characterization of a novel myosin-II tail. *Mol Biol Cell* 11, 79-91.

Bi, E., Maddox, P., Lew, D. J., Salmon, E. D., McMillan, J. N., Yeh, E. and Pringle, J. R. (1998). Involvement of an actomyosin contractile ring in *Saccharomyces cerevisiae* cytokinesis. *J Cell Biol* 142, 1301-12.

Bishop, A. L. and Hall, A. (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *Biochem J* 348 Pt 2, 241-55.

Bos, J. L., Rehmann, H. and Wittinghofer, A. (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-77.

Boueux, A., Vignal, E., Faure, S. and Fort, P. (2007). Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* 24, 203-16.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.

Breeding, C. S., Hudson, J., Balasubramanian, M. K., Hemmingsen, S. M., Young, P. G. and Gould, K. L. (1998). The *cdr2(+)* gene encodes a regulator of G2/M progression and cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 9, 3399-415.

- Brennwald, P. and Rossi, G. (2007).** Spatial regulation of exocytosis and cell polarity: yeast as a model for animal cells. *FEBS Lett* 581, 2119-24.
- Brown, M. C. and Turner, C. E. (2004).** Paxillin: adapting to change. *Physiol Rev* 84, 1315-39.
- Browning, H., Hackney, D. D. and Nurse, P. (2003).** Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat Cell Biol* 5, 812-8.
- Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P. and McIntosh, J. R. (2000).** Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *J Cell Biol* 151, 15-28.
- Brunner, D. and Nurse, P. (2000).** CLIP170-like Tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102, 695-704.
- Bush, D. A., Horisberger, M., Horman, I. and Wursch, P. (1974).** The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol* 81, 199-206.
- Bustelo, X. R., Sauzeau, V. and Berenjano, I. M. (2007).** GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356-70.
- Cabib, E., Drgonova, J. and Drgon, T. (1998).** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 67, 307-33.
- 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*. *Mol Microbiol* 47, 507-18.
- 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. *Mol Biol Cell* 11, 4393-401.
- Carnahan, R. H. and Gould, K. L. (2003).** The PCH family protein, Cdc15p, recruits two F-actin nucleation pathways to coordinate cytokinetic actin ring formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* 162, 851-62.
- Casamayor, A. and Snyder, M. (2002).** Bud-site selection and cell polarity in budding yeast. *Curr Opin Microbiol* 5, 179-86.
- Celton-Morizur, S., Racine, V., Sibarita, J. B. and Paoletti, A. (2006).** Pom1 kinase links division plane position to cell polarity by regulating Mid1p cortical distribution. *J Cell Sci* 119, 4710-8.
- 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, 1865-77.
- 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*. *Mol Biol Cell* 14, 313-23.
- Cortés, J. C. (2006).** Estudio de Bgs1p y Bgs4p: dos proteínas esenciales implicadas en la biosíntesis del $\beta(1-3)$ -D-glucano de *Schizosaccharomyces pombe*. In *Departamento de Microbiología y Genética/Instituto de Microbiología Bioquímica*.
- 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. *J Cell Sci* 118, 157-74.
- Cortés, J. C., Ishiguro, J., Durán, A. and Ribas, J. C. (2002).** Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell*

Sci 115, 4081-96.

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. *Mol Microbiol* 65, 201-17.

Cortés, J. C. and McCollum, D. (2009). Proper timing of cytokinesis is regulated by *Schizosaccharomyces pombe* Etd1. *J Cell Biol* 186, 739-53.

Craven, R. A., Griffiths, D. J., Sheldrick, K. S., Randall, R. E., Hagan, I. M. and Carr, A. M. (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 221, 59-68.

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* 79, 131-41.

Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P. (1997). Cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* 137, 169-82.

Chang, F. and Peter, M. (2003). Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol* 5, 294-9.

Chang, F. and Verde, F. (2004). Control of cell polarity and morphogenesis in fission yeast. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond.*, (ed. R.Egel), 255-268: Springer

Chang, F., Woollard, A. and Nurse, P. (1996). Isolation and characterization of fission yeast mutants defective in the assembly and placement of the contractile actin ring. *J Cell Sci* 109 (Pt 1), 131-42.

Daga, R. R., Lahoz, A., Muñoz, M. J., Moreno, S. and Jiménez, J. (2005). Etd1p is a novel protein that links the SIN cascade with cytokinesis. *EMBO J* 24, 2436-46.

Daga, R. R., Yonetani, A. and Chang, F. (2006). Asymmetric microtubule pushing forces in nuclear centering. *Curr Biol* 16, 1544-50.

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. *Mol Biol Cell* 18, 2090-101.

Dawid, I. B., Breen, J. J. and Toyama, R. (1998). LIM domains: multiple roles as adapters and functional modifiers in protein interactions. *Trends Genet* 14, 156-62.

De Virgilio, C., DeMarini, D. J. and Pringle, J. R. (1996). SPR28, a sixth member of the septin gene family in *Saccharomyces cerevisiae* that is expressed specifically in sporulating cells. *Microbiology* 142 (Pt 10), 2897-905.

Deakin, N. O. and Turner, C. E. (2008). Paxillin comes of age. *J Cell Sci* 121, 2435-44.

Dekker, N., Speijer, D., Grün, C. H., van den Berg, M., de Haan, A. and Hochstenbach, F. (2004). Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 15, 3903-14.

DerMardirossian, C. and Bokoch, G. M. (2005). GDIs: central regulatory molecules in Rho GTPase activation. *Trends Cell Biol* 15, 356-63.

Díaz, M., Sánchez, Y., Bennett, T., Sun, C. R., Godoy, C., Tamanoi, F., Durán, A. and Pérez, P. (1993). The *Schizosaccharomyces pombe* *cwg2⁺* gene codes for the beta subunit of a geranylgeranyltransferase type I required for beta-glucan synthesis. *EMBO J* 12, 5245-54.

Dobbelaere, J. and Barral, Y. (2004). Spatial coordination of cytokinetic events by

compartmentalization of the cell cortex. *Science* 305, 393-6.

Douglas, C. M., Marrinan, J. A., Li, W. and Kurtz, M. B. (1994). A *Saccharomyces cerevisiae* mutant with echinocandin-resistant 1,3-beta-D-glucan synthase. *J Bacteriol* 176, 5686-96.

Drummond, D. R. and Cross, R. A. (2000). Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol* 10, 766-75.

Durán, A. and Pérez, P. (2004). Cell wall synthesis. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond.*, (ed. R.Egel), 255-268: Springer.

Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. and Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7, 555-69.

Egel, R. and Egel-Mitani, M. (1974). Premeiotic DNA synthesis in fission yeast. *Exp Cell Res* 88, 127-34.

Eng, K., Naqvi, N. I., Wong, K. C. and Balasubramanian, M. K. (1998). Rng2p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the actomyosin ring and the spindle pole body. *Curr Biol* 8, 611-21.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-35.

Fankhauser, C., Reymond, A., Cerutti, L., Utzig, S., Hofmann, K. and Simanis, V. (1995). The *S. pombe* *cdc15* gene is a key element in the reorganization of F-actin at mitosis. *Cell* 82, 435-44.

Fares, H., Goetsch, L. and Pringle, J. R. (1996). Identification of a developmentally regulated septin and involvement of the septins in spore formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 132, 399-411.

Faty, M., Fink, M. and Barral, Y. (2002). Septins: a ring to part mother and daughter. *Curr Genet* 41, 123-31.

Feierbach, B. and Chang, F. (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* 11, 1656-65.

Field, C. M. and Kellogg, D. (1999). Septins: cytoskeletal polymers or signalling GTPases? *Trends Cell Biol* 9, 387-94.

Flynn, P., Mellor, H., Casamassima, A. and Parker, P. J. (2000). Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 275, 11064-70.

Forsburg, S. L. (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* 21, 2955-6.

Frazier, J. A., Wong, M. L., Longtine, M. S., Pringle, J. R., Mann, M., Mitchison, T. J. and Field, C. (1998). Polymerization of purified yeast septins: evidence that organized filament arrays may not be required for septin function. *J Cell Biol* 143, 737-49.

Freyd, G., Kim, S. K. and Horvitz, H. R. (1990). Novel cysteine-rich motif and homeodomain in the product of the *Caenorhabditis elegans* cell lineage gene *lin-11*. *Nature* 344, 876-9.

Fukui, Y. and Yamamoto, M. (1988). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to *ras1*. *Mol Gen Genet* 215, 26-31.

Furge, K. A., Wong, K., Armstrong, J., Balasubramanian, M. and Albright, C. F. (1998). Byr4 and Cdc16 form a two-component GTPase-activating protein for the Spg1 GTPase that controls septation

in fission yeast. *Curr Biol* 8, 947-54.

Gachet, Y. and Hyams, J. S. (2005). Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci* 118, 4231-42.

Gachet, Y., Mullvihill, D. P. and Hyams, J. S. (2004). The fission yeast actomyosin cytoskeleton. *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe. Genetics, genomics and beyond.*, (ed. R.Egel), 225-242: Springer

Gao, X. D., Caviston, J. P., Tcheperegine, S. E. and Bi, E. (2004). Pxl1p, a paxillin-like protein in *Saccharomyces cerevisiae*, may coordinate Cdc42p and Rho1p functions during polarized growth. *Mol Biol Cell* 15, 3977-85.

García, I., Jiménez, D., Martín, V., Durán, A. and Sánchez, Y. (2005). The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* 97, 569-76.

García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T. and Sánchez, Y. (2006). Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol* 59, 836-53.

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, 1321-34.

García, P., Tajadura, V., García, I. and Sánchez, Y. (2006a). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17, 1620-31.

García, P., Tajadura, V., García, I. and Sánchez, Y. (2006b). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* 23, 1031-43.

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. *Mol Biol Cell* 20, 721-31.

Ge, W. and Balasubramanian, M. K. (2008). Pxl1p, a paxillin-related protein, stabilizes the actomyosin ring during cytokinesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19, 1680-92.

Gemmill, T. R. and Trimble, R. B. (1999). *Schizosaccharomyces pombe* produces novel Gal0-2Man1-3 O-linked oligosaccharides. *Glycobiology* 9, 507-15.

Gladfelter, A. S., Pringle, J. R. and Lew, D. J. (2001). The septin cortex at the yeast mother-bud neck. *Curr Opin Microbiol* 4, 681-9.

Glotzer, M. (2004). Cleavage furrow positioning. *J Cell Biol* 164, 347-51.

Glotzer, M. (2005). The molecular requirements for cytokinesis. *Science* 307, 1735-9.

Golub, E. I. (1988). 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 16, 1641.

Gould, K. L. and Simanis, V. (1997). The control of septum formation in fission yeast. *Genes Dev* 11, 2939-51.

Guertin, D. A., Chang, L., Irshad, F., Gould, K. L. and McCollum, D. (2000). The role of the sid1p kinase and Cdc14p in regulating the onset of cytokinesis in fission yeast. *EMBO J* 19, 1803-15.

Guertin, D. A., Trautmann, S. and McCollum, D. (2002a). Cytokinesis in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* 66, 155-78.

- Guertin, D. A., Venkatram, S., Gould, K. L. and McCollum, D. (2002b).** Dma1 prevents mitotic exit and cytokinesis by inhibiting the septation initiation network (SIN). *Dev Cell* 3, 779-90.
- Hachet, O. and Simanis, V. (2008).** Mid1p/anillin and the septation initiation network orchestrate contractile ring assembly for cytokinesis. *Genes Dev* 22, 3205-16.
- Hagan, I. M. (1998).** The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci* 111 (Pt 12), 1603-12.
- Hartwell, L. H. (1971).** Genetic control of the cell division cycle in yeast. IV. Genes controlling bud emergence and cytokinesis. *Exp Cell Res* 69, 265-76.
- Hayles, J. and Nurse, P. (2001).** A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 647-56.
- Heasman, S. J. and Ridley, A. J. (2008).** Mammalian Rho GTPases: new insights into their functions from in vivo studies. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 690-701.
- Heckman, D. S., Geiser, D. M., Eidell, B. R., Stauffer, R. L., Kardos, N. L. and Hedges, S. B. (2001).** Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293, 1129-33.
- Heitz, M. J., Petersen, J., Valovin, S. and Hagan, I. M. (2001).** MTOC formation during mitotic exit in fission yeast. *J Cell Sci* 114, 4521-32.
- Herland, D., Bamps, S., Tafforeau, L., Vandenhaute, J. and Makela, T. P. (2003).** Skp1 and the F-box protein Pof6 are essential for cell separation in fission yeast. *J Biol Chem* 278, 9671-7.
- 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. *J Cell Sci* 111 (Pt 2), 149-59.
- 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*. *Mol Biol Cell* 14, 3617-27.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J. and Klausner, R. D. (1998).** Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9161-6.
- Hou, M. C. and McCollum, D. (2002).** Cytokinesis: myosin spots the ring. *Curr Biol* 12, R334-6.
- Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Foletti, D. L. and Scheller, R. H. (1999).** Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol* 9, 150-3.
- Hsu, S. C., TerBush, D., Abraham, M. and Guo, W. (2004).** The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol* 233, 243-65.
- Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S. A. and Osumi, M. (2001).** In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 433-44.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983).** Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-8.
- Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005).** Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-69.
- Jin, Q. W., Zhou, M., Bimbo, A., Balasubramanian, M. K. and McCollum, D. (2006).** A role for the septation initiation network in septum assembly revealed by genetic analysis of sid2-250 suppressors. *Genetics* 172, 2101-12.

- Johnson, B. F., Yoo, B. Y., Calleja, G. B. and Kozela, C. P. (2005).** Second thoughts on septation by the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*: pull vs. push mechanisms with an appendix--dimensional modelling of the flat and variable septa. *Antonie Van Leeuwenhoek* 88, 1-12.
- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. and Mabuchi, I. (2005).** Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol* 7, 916-7.
- Kamasaki, T., Osumi, M. and Mabuchi, I. (2007).** Three-dimensional arrangement of F-actin in the contractile ring of fission yeast. *J Cell Biol* 178, 765-71.
- Kang, M. S. and Cabib, E. (1986).** Regulation of fungal cell wall growth: a guanine nucleotide-binding, proteinaceous component required for activity of (1----3)-beta-D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83, 5808-12.
- Kanoh, J. and Russell, P. (1998).** The protein kinase Cdr2, related to Nim1/Cdr1 mitotic inducer, regulates the onset of mitosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 9, 3321-34.
- Karagiannis, J., Oulton, R. and Young, P. G. (2002).** The Scw1 RNA-binding domain protein regulates septation and cell-wall structure in fission yeast. *Genetics* 162, 45-58.
- Kasai, M., Guerrero-Santoro, J., Friedman, R., Leman, E. S., Getzenberg, R. H. and DeFranco, D. B. (2003).** The Group 3 LIM domain protein paxillin potentiates androgen receptor transactivation in prostate cancer cell lines. *Cancer Res* 63, 4927-35.
- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Perez, 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. *J Cell Biol* 144, 1173-86.
- Keeney, J. B. and Boeke, J. D. (1994).** Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136, 849-56.
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A. and Beach, D. (1988).** Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J* 7, 1537-47.
- Kitayama, C., Sugimoto, A. and Yamamoto, M. (1997).** Type II myosin heavy chain encoded by the *myo2* gene composes the contractile ring during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* 137, 1309-19.
- Kopecka, M., Fleet, G. H. and Phaff, H. J. (1995).** Ultrastructure of the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe* following treatment with various glucanases. *J Struct Biol* 114, 140-52.
- Krapp, A., Gulli, M. P. and Simanis, V. (2004).** SIN and the art of splitting the fission yeast cell. *Curr Biol* 14, R722-30.
- 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 the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.
- Le Goff, X., Motegi, F., Salimova, E., Mabuchi, I. and Simanis, V. (2000).** The *S. pombe* *rlc1* gene encodes a putative myosin regulatory light chain that binds the type II myosins Myo3p and Myo2p. *J Cell Sci* 113 Pt 23, 4157-63.
- Le Goff, X., Woollard, A. and Simanis, V. (1999).** Analysis of the *cps1* gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 262, 163-72.
- Lee, K. S. and Levin, D. E. (1992).** Dominant mutations in a gene encoding a putative protein kinase

(BCK1) bypass the requirement for a *Saccharomyces cerevisiae* protein kinase C homolog. *Mol Cell Biol* 12, 172-82.

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. *J Cell Biol* 151, 789-800.

Lesage, G. and Bussey, H. (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 317-43.

Leupold, U. (1950). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C. R. Lab. Carlsberg, Sér. Physiol.* 24, 381-480.

Levin, D. E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 262-91.

Levin, D. E., Bowers, B., Chen, C. Y., Kamada, Y. and Watanabe, M. (1994). Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 40, 229-39.

Lippincott, J. and Li, R. (2000). Involvement of PCH family proteins in cytokinesis and actin distribution. *Microsc Res Tech* 49, 168-72.

Liu, J., Tang, X., Wang, H. and Balasubramanian, M. (2000a). Bgs2p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 478, 105-8.

Liu, J., Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S. and Balasubramanian, M. K. (2002). The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13, 989-1000.

Liu, J., Wang, H. and Balasubramanian, M. K. (2000b). A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113 (Pt 7), 1223-30.

Loewith, R., Hubberstey, A. and Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113 (Pt 1), 153-60.

Longtine, M. S. and Bi, E. (2003). Regulation of septin organization and function in yeast. *Trends Cell Biol* 13, 403-9.

Loo, T. H. and Balasubramanian, M. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pak-related protein, Pak1p/Orb2p, phosphorylates myosin regulatory light chain to inhibit cytokinesis. *J Cell Biol* 183, 785-93.

Lord, M., Laves, E. and Pollard, T. D. (2005). Cytokinesis depends on the motor domains of myosin-II in fission yeast but not in budding yeast. *Mol Biol Cell* 16, 5346-55.

Lord, M., Sladewski, T. E. and Pollard, T. D. (2008). Yeast UCS proteins promote actomyosin interactions and limit myosin turnover in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 8014-9.

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. *Mol Biol Cell* 17, 5028-37.

Mackin, N. A., Sousou, T. J. and Erdman, S. E. (2004). The PXL1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes a paxillin-like protein functioning in polarized cell growth. *Mol Biol Cell* 15, 1904-17.

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. *J Biol Chem* 281, 2033-43.

Manners, D. J. and Meyer, M. T. (1977). The molecular structures of some glucans from the cell wall of *S. pombe*. *Carbohydr. Res.* 57, 189-203.

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*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6180-4.

Marks, J. and Hyams, J. S. (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 39, 27-32.

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*. *J Cell Sci* 116, 1689-98.

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. *Mol Biol Cell* 16, 4867-81.

Martín-García, R. and Valdivieso, M. H. (2006). The fission yeast Chs2 protein interacts with the type-II myosin Myo3p and is required for the integrity of the actomyosin ring. *J Cell Sci* 119, 2768-79.

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, 852-6.

Martin, S. G. and Chang, F. (2005). New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle* 4, 1046-9.

Martin, S. G. and Chang, F. (2006). Dynamics of the formin For3p in actin cable assembly. *Curr Biol* 16, 1161-70.

Martin, S. G., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd and Chang, F. (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell* 8, 479-91.

Martin, S. G., Rincón, S. A., Basu, R., Pérez, P. and Chang, F. (2007). Regulation of the formin For3p by Cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell* 18, 4155-67.

Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A. and Sánchez, Y. (2003). Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 2, 159-69.

Martín, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Durán, A. and Sánchez, Y. (2000). *bgs2⁺*, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* 38, 308-21.

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, 939-49.

Matsumura, F. (2005). Regulation of myosin II during cytokinesis in higher eukaryotes. *Trends Cell Biol* 15, 371-7.

Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y. et al. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 24, 841-7.

Maudrell, K. (1990). *nmt1* of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by

thiamine. *J Biol Chem* 265, 10857-64.

May, K. M., Watts, F. Z., Jones, N. and Hyams, J. S. (1997). Type II myosin involved in cytokinesis in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton* 38, 385-96.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. and Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 15, 5671-81.

McCollum, D. (2005). Cytokinesis: breaking the ties that bind. *Curr Biol* 15, R998-1000.

McCollum, D., Balasubramanian, M. K., Pelcher, L. E., Hemmingsen, S. M. and Gould, K. L. (1995). *Schizosaccharomyces pombe cdc4⁺* gene encodes a novel EF-hand protein essential for cytokinesis. *J Cell Biol* 130, 651-60.

McCollum, D., Feoktistova, A., Morphew, M., Balasubramanian, M. and Gould, K. L. (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *EMBO J* 15, 6438-46.

Merla, A. and Johnson, D. I. (2000). The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 79, 469-77.

Merla, A. and Johnson, D. I. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr Genet* 39, 205-9.

Michelsen, J. W., Schmeichel, K. L., Beckerle, M. C. and Winge, D. R. (1993). The LIM motif defines a specific zinc-binding protein domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 4404-8.

Milburn, M. V., Tong, L., deVos, A. M., Brunger, A., Yamaizumi, Z., Nishimura, S. and Kim, S. H. (1990). Molecular switch for signal transduction: structural differences between active and inactive forms of protooncogenic ras proteins. *Science* 247, 939-45.

Miller, P. J. and Johnson, D. I. (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 14, 1075-83.

Minet, M., Nurse, P., Thuriaux, P. and Mitchison, J. M. (1979). Uncontrolled septation in a cell division cycle mutant of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 137, 440-6.

Mishra, M., Karagiannis, J., Trautmann, S., Wang, H., McCollum, D. and Balasubramanian, M. K. (2004). The Clp1p/Flp1p phosphatase ensures completion of cytokinesis in response to minor perturbation of the cell division machinery in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 117, 3897-910.

Mishra, M. and Oliferenko, S. (2008). Cytokinesis: catch and drag. *Curr Biol* 18, R247-50.

Mitchison, J. M. and Creanor, J. (1971). Induction synchrony in the fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res* 67, 368-74.

Mitchison, J. M. and Nurse, P. (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 75, 357-76.

Moon, S. Y. and Zheng, Y. (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13, 13-22.

Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 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. *J Cell Sci* 118, 5563-73.

Morrell, J. L., Morphew, M. and Gould, K. L. (1999). A mutant of Arp2p causes partial disassembly of the Arp2/3 complex and loss of cortical actin function in fission yeast. *Mol Biol Cell* 10, 4201-15.

Morrell, J. L., Nichols, C. B. and Gould, K. L. (2004a). The GIN4 family kinase, Cdr2p, acts independently of septins in fission yeast. *J Cell Sci* 117, 5293-302.

Morrell, J. L., Tomlin, G. C., Rajagopalan, S., Venkatram, S., Feoktistova, A. S., Tasto, J. J., Mehta, S., Jennings, J. L., Link, A., Balasubramanian, M. K. et al. (2004b). Sid4p-Cdc11p assembles the septation initiation network and its regulators at the *S. pombe* SPB. *Curr Biol* 14, 579-84.

Moseley, J. B. and Goode, B. L. (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 605-45.

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, 857-60.

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. *Mol Biol Cell* 12, 1367-80.

Motegi, F., Mishra, M., Balasubramanian, M. K. and Mabuchi, I. (2004). Myosin-II reorganization during mitosis is controlled temporally by its dephosphorylation and spatially by Mid1 in fission yeast. *J Cell Biol* 165, 685-95.

Motegi, F., Nakano, K., Kitayama, C., Yamamoto, M. and Mabuchi, I. (1997). Identification of Myo3, a second type-II myosin heavy chain in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 420, 161-6.

Motegi, F., Nakano, K. and Mabuchi, I. (2000). Molecular mechanism of myosin-II assembly at the division site in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113 (Pt 10), 1813-25.

Mulvihill, D. P., Barretto, C. and Hyams, J. S. (2001a). Localization of fission yeast type II myosin, Myo2, to the cytokinetic actin ring is regulated by phosphorylation of a C-terminal coiled-coil domain and requires a functional septation initiation network. *Mol Biol Cell* 12, 4044-53.

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 Motil Cytoskeleton* 63, 149-61.

Mulvihill, D. P. and Hyams, J. S. (2003). Role of the two type II myosins, Myo2 and Myp2, in cytokinetic actomyosin ring formation and function in fission yeast. *Cell Motil Cytoskeleton* 54, 208-16.

Mulvihill, D. P., Pollard, P. J., Win, T. Z. and Hyams, J. S. (2001b). Myosin V-mediated vacuole distribution and fusion in fission yeast. *Curr Biol* 11, 1124-7.

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, 1189-202.

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, 679-94.

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 Lett* 579, 5181-6.

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. *J Cell Sci*

115, 4629-39.

Nakano, K. and Mabuchi, I. (1995). Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding Rho proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 155, 119-22.

Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. and Mabuchi, I. (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* 8, 357-70.

Nakano, K., Mutoh, T. 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, 1031-42.

Naqvi, N. I., Wong, K. C., Tang, X. and Balasubramanian, M. K. (2000). Type II myosin regulatory light chain relieves auto-inhibition of myosin-heavy-chain function. *Nat Cell Biol* 2, 855-8.

Nicholas, R. O., Williams, D. W. and Hunter, P. A. (1994). Investigation of the value of β -glucan-specific fluorochromes for predicting the β -glucans content of the cell wall of zoopathogenic fungi. *Mycol. Res.* 98, 694-698.

Nurse, P., Thuriaux, P. and Nasmyth, K. (1976). Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146, 167-78.

Olofsson, B. (1999). Rho guanine dissociation inhibitors: pivotal molecules in cellular signalling. *Cell Signal* 11, 545-54.

Osumi, M. (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29, 207-33.

Ottillie, 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, 5908-19.

Padte, N. N., Martin, S. G., Howard, M. and Chang, F. (2006). The cell-end factor pom1p inhibits mid1p in specification of the cell division plane in fission yeast. *Curr Biol* 16, 2480-7.

Paoletti, A. and Chang, F. (2000). Analysis of Mid1p, a protein required for placement of the cell division site, reveals a link between the nucleus and the cell surface in fission yeast. *Mol Biol Cell* 11, 2757-73.

Paravicini, G. and Friedli, L. (1996). Protein-protein interactions in the yeast PKC1 pathway: Pkc1p interacts with a component of the MAP kinase cascade. *Mol Gen Genet* 251, 682-91.

Park, H. O. and Bi, E. (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 48-96.

Pelham, R. J. and Chang, F. (2002). Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* 419, 82-6.

Pelham, R. J., Jr. and Chang, F. (2001). Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* 3, 235-44.

Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R. and Hagan, I. M. (1998). F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 111 (Pt 7), 867-76.

Piekny, A., Werner, M. and Glotzer, M. (2005). Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* 15, 651-8.

Rajagopalan, S., Wachtler, V. and Balasubramanian, M. (2003). Cytokinesis in fission yeast: a story of rings, rafts and walls. *Trends Genet* 19, 403-8.

- Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. and Narumiya, S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and raphilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* 271, 13556-60.
- Ribas, J. C., Roncero, C., Rico, H. and Durán, A. (1991). Characterization of a *Schizosaccharomyces pombe* morphological mutant altered in the galactomannan content. *FEMS Microbiol Lett* 63, 263-7.
- Rincón, S., Coll, P. M. and Pérez, P. (2007). Spatial regulation of Cdc42 during cytokinesis. *Cell Cycle* 6, 1687-91.
- 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. *Eukaryot Cell* 5, 435-46.
- 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. *Mol Biol Cell*.
- Roberts-Galbraith, R. H., Chen, J. S., Wang, J. and Gould, K. L. (2009). The SH3 domains of two PCH family members cooperate in assembly of the *Schizosaccharomyces pombe* contractile ring. *J Cell Biol* 184, 113-27.
- Rossman, K. L., Der, C. J. and Sondek, J. (2005). GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6, 167-80.
- Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101, 202-11.
- Rothstein, R. J. (1991). Targeting, disruption, replacement and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast. in Gurthrie, C. and Fink, G. R. (Eds), *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, 281-301.
- Roumanie, O., Wu, H., Molk, J. N., Rossi, G., Bloom, K. and Brennwald, P. (2005). Rho GTPase regulation of exocytosis in yeast is independent of GTP hydrolysis and polarization of the exocyst complex. *J Cell Biol* 170, 583-94.
- Routhier, E. L., Burn, T. C., Abbaszade, I., Summers, M., Albright, C. F. and Prendergast, G. C. (2001). Human BIN3 complements the F-actin localization defects caused by loss of Hob3p, the fission yeast homolog of Rvs161p. *J Biol Chem* 276, 21670-7.
- Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lio, P., Penkett, C. J., Burns, G., Hayles, J., Brazma, A., Nurse, P. and Bähler, J. (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* 36, 809-17.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring harbor Laboratory Press.
- Sánchez-Díaz, A., Marchesi, V., Murray, S., Jones, R., Pereira, G., Edmondson, R., Allen, T. and Labib, K. (2008). Inn1 couples contraction of the actomyosin ring to membrane ingression during cytokinesis in budding yeast. *Nat Cell Biol* 10, 395-406.
- Sander, E. E., ten Klooster, J. P., van Delft, S., van der Kammen, R. A. and Collard, J. G. (1999). Rac downregulates Rho activity: reciprocal balance between both GTPases determines cellular morphology and migratory behavior. *J Cell Biol* 147, 1009-22.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.
- 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*. *Eukaryot Cell* 2,

521-33.

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. *Eukaryot Cell* 4, 1639-45.

Sawin, K. E. and Tran, P. T. (2006). Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast* 23, 1001-14.

Schmidt, A. and Hall, A. (2002). Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes Dev* 16, 1587-609.

Schmidt, K. and Nichols, B. J. (2004). A barrier to lateral diffusion in the cleavage furrow of dividing mammalian cells. *Curr Biol* 14, 1002-6.

Schmidt, M., Bowers, B., Varma, A., Roh, D. H. and Cabib, E. (2002). In budding yeast, contraction of the actomyosin ring and formation of the primary septum at cytokinesis depend on each other. *J Cell Sci* 115, 293-302.

Schmidt, S., Sohrmann, M., Hofmann, K., Woollard, A. and Simanis, V. (1997). The Spg1p GTPase is an essential, dosage-dependent inducer of septum formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Dev* 11, 1519-34.

Schroeder, T. E. (1972). The contractile ring. II. Determining its brief existence, volumetric changes, and vital role in cleaving *Arbacia* eggs. *J Cell Biol* 53, 419-34.

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. *J Biol Chem* 273, 18490-8.

Sengar, A. S., Markley, N. A., Marini, N. J. and Young, D. (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 17, 3508-19.

Shafikhani, S. H., Mostov, K. and Engel, J. (2008). Focal adhesion components are essential for mammalian cell cytokinesis. *Cell Cycle* 7, 2868-76.

Shaner, N. C., Steinbach, P. A. and Tsien, R. Y. (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nat Methods* 2, 905-9.

Sharifmoghadam, M. R. and Valdivieso, M. H. (2009). The fission yeast SEL1 domain protein Cfh3p: a novel regulator of the glucan synthase Bgs1p whose function is more relevant under stress conditions. *J Biol Chem* 284, 11070-9.

Shiozaki, K. and Russell, P. (1995). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J* 14, 492-502.

Simanis, V. (2003). Events at the end of mitosis in the budding and fission yeasts. *J Cell Sci* 116, 4263-75.

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. *J Cell Biol* 170, 637-48.

Skoumpla, K., Coulton, A. T., Lehman, W., Geeves, M. A. and Mulvihill, D. P. (2007). Acetylation regulates tropomyosin function in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 120, 1635-45.

Snaith, H. A. and Sawin, K. E. (2003). Fission yeast Mod5p regulates polarized growth through

anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* 423, 647-51.

Snaith, H. A. and Sawin, K. E. (2005). Tea for three: control of fission yeast polarity. *Nat Cell Biol* 7, 450-1.

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, 2707-19.

Streiblova, E. and Girbardt, M. (1980). Microfilaments and cytoplasmic microtubules in cell division cycle mutants of *Schizosaccharomyces pombe*. *Can J Microbiol* 26, 250-4.

Tajadura, V. (2007). Estudio de la función de Rgf3p y de su regulación durante la citoquinesis en *Schizosaccharomyces pombe*. In *Departamento de Microbiología y Genética/Instituto de Microbiología Bioquímica*.

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. *J Cell Sci* 117, 6163-74.

Takagi, T., Ishijima, S. A., Ochi, H. and Osumi, M. (2003). Ultrastructure and behavior of actin cytoskeleton during cell wall formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microscop* (Tokyo) 52, 161-74.

Takeda, T. and Chang, F. (2005). Role of fission yeast myosin I in organization of sterol-rich membrane domains. *Curr Biol* 15, 1331-6.

Tanaka, K., Petersen, J., Maclver, F., Mulvihill, D. P., Glover, D. M. and Hagan, I. M. (2001). The role of Plo1 kinase in mitotic commitment and septation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 20, 1259-70.

Tasto, J. J., Morrell, J. L. and Gould, K. L. (2003). An anillin homologue, Mid2p, acts during fission yeast cytokinesis to organize the septin ring and promote cell separation. *J Cell Biol* 160, 1093-103.

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. *Curr Biol* 18, 322-30.

ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J. and Hordijk, P. L. (2006). Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* 172, 759-69.

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

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

Tran, P. T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. and Chang, F. (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol* 153, 397-411.

Trautmann, S., Wolfe, B. A., Jorgensen, P., Tyers, M., Gould, K. L. and McCollum, D. (2001). Fission yeast Clp1p phosphatase regulates G2/M transition and coordination of cytokinesis with cell cycle progression. *Curr Biol* 11, 931-40.

Tsubouchi, A., Sakakura, J., Yagi, R., Mazaki, Y., Schaefer, E., Yano, H. and Sabe, H. (2002). Localized suppression of RhoA activity by Tyr31/118-phosphorylated paxillin in cell adhesion and migration. *J Cell Biol* 159, 673-83.

Umeda, K., Yoko-o, T., Nakayama, K., Suzuki, T. and Jigami, Y. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* *gmd3(+)/alg11(+)* is a functional homologue of *Saccharomyces cerevisiae* ALG11 which is

involved in N-linked oligosaccharide synthesis. *Yeast* 16, 1261-71.

Urven, L. E., Yabe, T. and Pelegri, F. (2006). A role for non-muscle myosin II function in furrow maturation in the early zebrafish embryo. *J Cell Sci* 119, 4342-52.

Vavylonis, D., Wu, J. Q., Hao, S., O'Shaughnessy, B. and Pollard, T. D. (2008). Assembly mechanism of the contractile ring for cytokinesis by fission yeast. *Science* 319, 97-100.

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. *J Cell Biol* 131, 1529-38.

Verma, D. P. and Hong, Z. (2001). Plant callose synthase complexes. *Plant Mol Biol* 47, 693-701.

Versele, M., Gullbrand, B., Shulewitz, M. J., Cid, V. J., Bahmanyar, S., Chen, R. E., Barth, P., Alber, T. and Thorner, J. (2004). Protein-protein interactions governing septin heteropentamer assembly and septin filament organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15, 4568-83.

Versele, M. and Thorner, J. (2005). Some assembly required: yeast septins provide the instruction manual. *Trends Cell Biol* 15, 414-24.

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

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*. *Mol Microbiol* 70, 867-81.

Wachtler, V. and Balasubramanian, M. K. (2006). Yeast lipid rafts?--an emerging view. *Trends Cell Biol* 16, 1-4.

Wachtler, V., Rajagopalan, S. and Balasubramanian, M. K. (2003). Sterol-rich plasma membrane domains in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 116, 867-74.

Wang, H., Tang, X. and Balasubramanian, M. K. (2003). Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 164, 1323-31.

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*. *Mol Biol Cell* 13, 515-29.

Wennerberg, K., Rossman, K. L. and Der, C. J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-6.

West, R. R., Vaisberg, E. V., Ding, R., Nurse, P. and McIntosh, J. R. (1998). cut11(+): A gene required for cell cycle-dependent spindle pole body anchoring in the nuclear envelope and bipolar spindle formation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 9, 2839-55.

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. *J Cell Sci* 114, 69-79.

Wolfe, B. A. and Gould, K. L. (2004). Fission yeast Clp1p phosphatase affects G2/M transition and mitotic exit through Cdc25p inactivation. *EMBO J* 23, 919-29.

Wolfe, B. A. and Gould, K. L. (2005). Split decisions: coordinating cytokinesis in yeast. *Trends Cell Biol* 15, 10-8.

Wong, K. C., D'Souza V, M., Naqvi, N. I., Motegi, F., Mabuchi, I. and Balasubramanian, M. K.

(2002). Importance of a myosin II-containing progenitor for actomyosin ring assembly in fission yeast. *Curr Biol* 12, 724-9.

Wood, V. Gwilliam, R. Rajandream, M. A. Lyne, M. Lyne, R. Stewart, A. Sgouros, J. Peat, N. Hayles, J. Baker, S. *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* 415, 871-80.

Wu, J. Q., Kuhn, J. R., Kovar, D. R. and Pollard, T. D. (2003). Spatial and temporal pathway for assembly and constriction of the contractile ring in fission yeast cytokinesis. *Dev Cell* 5, 723-34.

Wu, J. Q. and Pollard, T. D. (2005). Counting cytokinesis proteins globally and locally in fission yeast. *Science* 310, 310-4.

Wu, J. Q., Sirotkin, V., Kovar, D. R., Lord, M., Beltzner, C. C., Kuhn, J. R. and Pollard, T. D. (2006). Assembly of the cytokinetic contractile ring from a broad band of nodes in fission yeast. *J Cell Biol* 174, 391-402.

Yanagida, M. (2002). The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol* 3, COMMENT2003.

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. *J Biol Chem* 273, 18481-9.

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*. *J Biol Chem* 278, 48821-30.

Yonetani, A., Lustig, R. J., Moseley, J. B., Takeda, T., Goode, B. L. and Chang, F. (2008). Regulation and targeting of the fission yeast formin Cdc12p in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 19, 2208-19.

Yoshida, S., Bartolini, S. and Pellman, D. (2009). Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev* 23, 810-23.

Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D. M., Bartolini, S., Yaffe, M. B., Ohya, Y. and Pellman, D. (2006). Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* 313, 108-11.

Yoshida, T., Toda, T. and Yanagida, M. (1994). A calcineurin-like gene *ppb1⁺* in fission yeast: mutant defects in cytokinesis, cell polarity, mating and spindle pole body positioning. *J Cell Sci* 107 (Pt 7), 1725-35.

Zaitsevskaya-Carter, T. and Cooper, J. A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *EMBO J* 16, 1318-31.

Zhou, C., Yang, Y. and Jong, A. Y. (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8, 172-3.