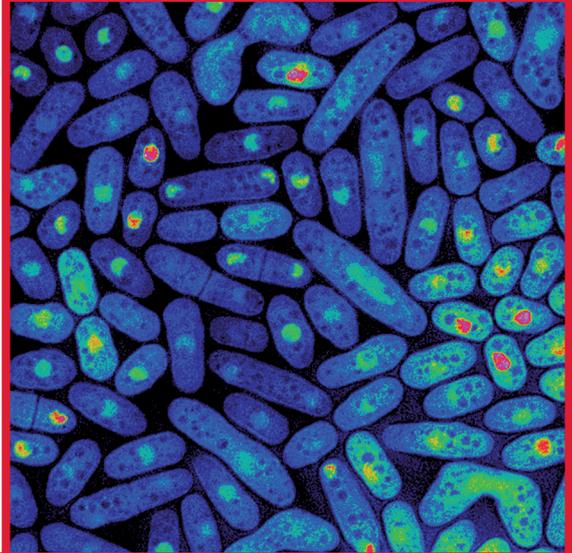




UNIVERSIDAD DE SALAMANCA
Departamento de Microbiología y Genética
Instituto de Biología Funcional y Genómica
(USAL / CSIC)



La GTPasa Cdc42 regula el tráfico intracelular necesario para el crecimiento polarizado de *Schizosaccharomyces pombe*



Miguel Estravís Sastre

Salamanca 2013

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



**La GTPasa Cdc42 regula el tráfico intracelular
necesario para el crecimiento polarizado de
*Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada por **Miguel Estravís Sastre** para
optar al Grado de Doctor en Biología

Salamanca, 2013

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**La GTPasa Cdc42 regula el tráfico intracelular necesario para el crecimiento polarizado de *Schizosaccharomyces pombe***”, presentada por el licenciado **Miguel Estravís Sastre** para optar al grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. M^a del Pilar Pérez González y Sergio Antonio Rincón Padilla, en el Instituto de Biología Funcional y Genómica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

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

Fdo. Dr. Luis Román Fernández Lago

LA Dra. M^a del PILAR PÉREZ GONZÁLEZ, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC Y EL Dr. SERGIO ANTONIO RINCÓN PADILLA, DOCTOR INVESTIGADOR DEL *INSTITUT CURIE* DE PARÍS.

CERTIFICAN:

Que el licenciado **Miguel Estravís Sastre** ha realizado el trabajo titulado “**La GTPasa Cdc42 regula el tráfico intracelular necesario para el crecimiento polarizado de *Schizosaccharomyces pombe***” bajo su dirección, en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC) / Departamento de Microbiología y Genética (USAL).

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmamos el presente certificado en Salamanca a ____ de _____ de 2012.

Fdo. Dra. M^a del Pilar Pérez González

Fdo. Dr. Sergio Antonio Rincón Padilla

LA Dra. **BEATRIZ SANTOS ROMERO**, PROFESORA TITULAR DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

CERTIFICA:

Que la memoria titulada titulado **“La GTPasa Cdc42 regula el tráfico intracelular necesario para el crecimiento polarizado de *Schizosaccharomyces pombe*”**, presentada por el licenciado **Miguel Estravís Sastre** para optar al grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección de los Dres. M^a del Pilar Pérez González y Sergio Antonio Rincón Padilla, en el centro mixto Instituto de Biología Funcional y Genómica (CSIC) / Departamento de Microbiología y Genética (USAL)

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firma el presente certificado en Salamanca, a ____ de _____ de 2012.

Fdo. Dra. Beatriz Santos Romero

Agradecimientos

Quiero comenzar agradeciendo a la Dra. M^a del Pilar Pérez González, que me brindó la oportunidad de trabajar en su laboratorio y participar en este proyecto sin apenas conocerme. Gracias por confiar en mí, por contribuir a mi formación científica y por la dedicación que siempre muestras. En segundo lugar agradecer al Dr. Sergio Antonio Rincón Padilla por aceptar la codirección de este trabajo, por enseñarme y transmitirme su pasión y conocimientos al llegar al laboratorio y por implicarse en este proyecto a pesar de la distancia. A la Dra. Beatriz Santos Romero por la ayuda prestada, siempre desinteresada, por sus notas al margen y consejos en el laboratorio.

Quiero agradecerle a mis compañeros de laboratorio la ayuda prestada, los consejos, los ánimos y el buen ambiente que han sabido crear en el laboratorio, muy especialmente a Rosa Sánchez Vicente por estar dispuesta siempre a ayudarme, por los momentos que pasamos juntos, por apoyarme y por su generosidad desbordante. A Raúl Alonso Viana por soportar mi humor acético, muchas veces discutimos porque tomamos caminos distintos (pero siempre paralelos). Al Dr. Pedro Miguel Coll Fresno, por resolver siempre mis dudas, aún en el momento más inoportuno, por sus acertijos musicales y por su perenne buen humor en el laboratorio. A las Dras. PPG porque siempre tienen una sonrisa: la Dra. Rebeca Martín porque es una *pombera* y por el titiritiri y la Dra. Nuria Pujol por transmitirnos su serenidad y buen rollo incluso en los momentos en los que el 223/1.4 parecía un frenopático. A Maite Revilla porque me recuerda a cuando llegué y porque no se calla una (lo cual siempre está bien). A los nuevos, Antonio de la T. y Miguel Z., por adaptarse, con lo que cuesta. A Elvira por aguantar estoicamente la vorágine cuando ruge la marabunta en el laboratorio. A los que se fueron, Mario y Toñi, por la ayuda prestada cuando me encontraba perdido. Por extensión, no puedo olvidarme de las Dionisias, Talía primero y Laura después, que han visto, oído y callado muy elegantemente (y por alimentar a los PPGs).

A la Dra. M^a Henar Valdivieso por sus consejos desinteresados, su amabilidad y por sus cepas. Asimismo quiero agradecer a todos los grupos de pared los consejos, comentarios y ayuda prestada y en general a todo aquel que haya mostrado interés por mi trabajo.

También quiero agradecerle a Ángel Durán su labor como director del IMB/IBFG durante estos años y al equipo técnico del IBFG el soporte vital que nos prestan, especialmente a Carmen Castro y Paco Alonso que se ocupan y preocupan por el equipamiento y que además nos tratan muy bien, a Carlos Belinchón por su ayuda con las muestras de microscopía electrónica y a las técnicas de cocina, que son muchas, con Encarna a la cabeza. A Paco Soriano y a Alegría porque hacen fácil lo difícil: la burocracia. Además, tengo que agradecer a la Junta de Castilla y León la concesión del contrato que me ha permitido desarrollar este trabajo.

No menos importante, la gente del café: Diana, Mariona, Nagore, Marta, Mari, Elvira, Irene y muy en especial a los pioneros, los fans, fans, fans Sofía M., Carlos S., José Ángel C., Charo V., Jacqui P. y a los que levantaron el vuelo, Patricia G., Alberto G. y Lorena V., el fan soy yo. No me

olvido de nadie, es que sois muchos, a Javi FRI por sus papers e ideas, a Sandra, a Pepín, a Alicia, a Cristina (HVM), Cristina C., Alejandro y un largo etcétera de excelentes compañeros que me han parado por los pasillos para hablar, con lo tímido que soy yo...

A mis excompañeros de laboratorio y amigos de Fisio de Santiago de Compostela, Cristian, Claudia, Milo, Vanesa, María, Pepe Pardo, Lola, Martita, Marta, Pili, Isa, Antía, Gonzalo, Miguel F., Gloria y Oscar “Navajas”, que merece mención especial, porque sin su guía no me habría acercado a la investigación. Y a muchos otros de allí, por lo que aprendí y lo bien que lo pasé esos años inolvidables e inigualables que guardo con mucho cariño y morriña. No os lo pude agradecer allí, pero lo hago aquí.

A todos mis “amigos de la vida real”, gracias por no tener ni idea de lo que hago y de cómo lo hago, por preguntarme por mis ratones, por haberos compadecido de mí en una o muchas ocasiones y por no entender nada de nada.

A mis padres, por hacer posible que haya llegado hasta aquí y por apoyarme siempre, incluso en los momentos más difíciles; a mis hermanos que me han hecho crecer y mejorar desde que existo; a mis tíos, por preocuparse también por mi futuro; a mis sabias abuelas, que están muy orgullosas de mí y a mis sabios abuelos, que sin duda lo estarían.

Y a Pablo A., gracias por estar ahí, por darme ánimos y por aguantarme una Tesis y pico.

A Pablo

Abreviaturas

3AT	3-aminotriazol
αGS	α -glucán sintasa
βGS	β -glucán sintasa
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
A.P.	Fosfatasa ácida (<i>Acid phosphatase</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina 5'-trifosfato (<i>Adenosine 5' triphosphate</i>)
ARF	Factor de ADP-ribosilación (<i>ADP-ribosylation factor</i>)
Arp	Proteínas relacionadas con la actina (<i>Actin-related protein</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
cdc	<i>cell division cycle</i>
CDCFDA	5, 6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato
CDK	Quinasa dependiente de ciclina (<i>Cyclin Dependent Kinase</i>)
CFP	Proteína azul fluorescente (<i>Cyan Fluorescent Protein</i>)
CRIB	Dominio de unión a Cdc42/Rac (<i>Cdc42/Rac Interactive Binding</i>)
CW	Calcoflúor white
DIC	Contraste diferencial
D.O.	Densidad óptica
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilén diamino tetra-acético
EGFP	Variante de la proteína verde fluorescente (<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>)
EGTA	Ácido etilén glicol bis tetra-acético
EMM	Medio mínimo para <i>S. pombe</i> (<i>Edinburgh Minimal Media</i>)
FM4-64	<i>N-(3-Triethylammoniumpropyl)-4-(6-(4-(Diethylamino) Phenyl) Hexatrienyl) Pyridinium Dibromide</i>
FRAP	Fluorescence recovery after photobleaching
GAP	Proteína activadora de la actividad GTPásica (<i>GTPase Activating Protein</i>)
GDI	Inhibidor de la disociación de GDP (<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>)

GDP	Guanosina 5'-difosfato (<i>Guanosine 5' diphosphate</i>)
GEF	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina (<i>Guanine Nucleotide Exchange Factor</i>)
GFP	Proteína verde fluorescente (<i>Green Fluorescent Protein</i>)
GST	Glutation S transferasa
GTP	Guanosina 5'-trifosfato (<i>Guanosine 5' triphosphate</i>)
GPI	Guanosil fosfatidil inositol (<i>Glycosyl phosphatidyl inositol</i>)
HA	Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe
HRP	Peroxidasa de rábano (<i>Horseradish Peroxidase</i>)
IQGAP	Familia de proteínas con dominios IQ (de unión a calmodulina) y GAP
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio rico para <i>E. coli</i> (<i>Luria-Bertani</i>)
MAP	Proteína activada por mitógeno
MAPK	Quinasa activada por mitógenos (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>)
MAPKK	quinasa de la MAPK (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase</i>)
MAPKKK	quinasa de la MAPKK (<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase</i>)
MEA	Medio agar extracto de malta (<i>Malt Extract Agar</i>)
min	Minutos
NETO	Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo (<i>New End Take Off</i>)
NP-40	Nonidet P-40
OE.	Sobreexpresión de un gen (<i>Over Expression</i>)
OETO	Comienzo del crecimiento por el polo celular antiguo (<i>Old End Take Off</i>)
ORF	Fase de lectura abierta (<i>Open Reading Frame</i>)
PAK	Proteína quinasa activadas por p-21 (<i>p21-Activated Kinase</i>)
PBS	Tampón fosfato salino (<i>Phosphate-Buffered Saline</i>)
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PH	Dominio con homología a Pleckstrina (<i>Pleckstrin Homology</i>)
PIPES	Piperazina bis (ácido 2-etanosulfónico)
PMSF	Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
PtdIns	Fosfatidil Inositol
PVDF	Fluoruro de polivinilideno

RFP	Proteína roja fluorescente (<i>Red Fluorescent Protein</i>)
rpm	revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SH3	Dominio con homología a Src3 (<i>Src3 Homology</i>)
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SPB	Cuerpo polar del huso (<i>Spindle Pole Body</i>)
T	Tiamina
TAE	Tampón Tris-Acético EDTA
TBST	Tampón Tris salino con Tween-20 (<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>)
TCA	Ácido Tricloroacético
TGN	Red de Trans Golgi (<i>Trans-Golgi Network</i>)
+TIPs	<i>plus end tracking proteins</i>
TOR	<i>Target of Rapamycin</i>
TRIS	Tris-(hidroximetilamino)-metano
UDP	Uridina 5'-difosfato
UV	Ultravioleta
WT	Estirpe silvestre (<i>Wild Type</i>)
YES	Medio rico para <i>S. pombe</i> (<i>Yeast Extract + Supplements</i>)
YEPD	Medio rico para <i>S. cerevisiae</i> (<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i>)
YFP	Proteína amarilla fluorescente (<i>Yellow Fluorescent Protein</i>)
YNB	Medio mínimo para <i>S. cerevisiae</i> (<i>Yeast Nitrogen Base</i>)

Índice

Introducción	1
La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	3
Crecimiento polarizado.....	5
• Establecimiento del crecimiento polarizado.....	5
• El citoesqueleto de actina en <i>S. pombe</i>	7
• Los parches de actina.....	8
• Los cables de actina.....	9
• El anillo de actomiosina.....	10
La secreción polarizada en <i>S. pombe</i>	10
La ruta endocítica.....	12
Las Vacuolas.....	14
Biosíntesis y composición de la pared celular de <i>S. pombe</i>	15
• Composición de la pared celular.....	15
• Biosíntesis y regulación de la pared celular.....	16
• β -glucano.....	16
• α -glucano.....	17
• Galactomanano.....	18
• Remodelación de la pared celular: glucanosil-transferasas, α y β glucanasas.....	18
Reproducción sexual y conjugación en <i>S. pombe</i>	19
• Formación del <i>shmoo</i> y fusión celular.....	22
• Cariogamia y meiosis.....	23
Las GTPasas de la familia Rho.....	23
• Modificaciones postraduccionales de las proteínas Rho.....	25
• Regulación de las proteínas Rho.....	25
• Las proteínas GEF (<u>G</u> uanine <u>N</u> ucleotide <u>E</u> xchange <u>F</u> actor).....	25
• Las proteínas GDI (<u>G</u> DP <u>D</u> issociation <u>I</u> nhibitor).....	26
• Las proteínas GAP (<u>G</u> TPase <u>A</u> ctivating <u>P</u> rotein).....	26

• Funciones de las GTPasas Rho.....	27
• Las GTPasas de la familia Rho en <i>S. pombe</i>	28
• Rho1.....	28
• Rho2.....	29
• Rho3.....	29
• Rho4.....	30
• Rho5.....	30
Cdc42.....	31
• Cdc42 en <i>S. cerevisiae</i>	33
• Cdc42 en <i>S. pombe</i>	35
Objetivos.....	39
Resultados.....	43
La cepa mutante termosensible <i>cdc42-L160S</i>	45
La proteína Cdc42-L160S unida a GTP se excluye de la membrana plasmática.....	46
Cdc42 y el tráfico intracelular.....	49
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> muestra defectos en la secreción.....	49
Pob1 restaura la localización del complejo del exocisto y la secreción en las células <i>cdc42-L160S</i>	52
Rho3 suprime la termosensibilidad de la cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> pero no restaura la formación de cables de actina.....	53
Interacciones de Cdc42 con el exocisto.....	55
La sobreexpresión de la t-SNARE syntaxina, pero no de la V-SNARE sinaptobrevina, suprime la termosensibilidad de <i>cdc42-L160S</i>	58
La sobreexpresión de <i>ypt2⁺</i> suprime la termosensibilidad de la cepa mutante <i>cdc42-L160S</i>	60
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> muestra defectos en la incorporación de FM4-64 y en la formación de vacuolas.....	62
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> tiene defectos en la llegada de la carboxipeptidasa Y a la vacuola.....	64

Los supresores de la termosensibilidad de la cepa <i>cdc42-L160S</i> identificados corrigen los defectos en el tráfico de membranas en diferente grado.....	65
<i>cdc42-L160S</i> tiene defectos en la fusión homotípica de vacuolas.....	69
Existe interacción genética entre la cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> y las GTPasas Rab de la vacuola.....	70
La termosensibilidad de la cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> se debe a defectos en la pared celular.....	73
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> tiene defectos en la localización de Bgs1.....	74
Cdc42 y la conjugación.....	76
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> muestra dificultad para conjuguar.....	76
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> activa la ruta de MAPK de respuesta a feromonas.....	77
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> muestra defectos de polaridad durante la conjugación..	78
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> muestra defectos en el citoesqueleto de actina durante la conjugación.....	80
La cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> muestra defectos de aglutinación.....	81
Estudio del exocisto en la cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> durante la conjugación.....	83
Remodelación y síntesis de pared en la cepa mutante <i>cdc42-L160S</i> durante la conjugación.....	84
La localización de la formina Fus1 no depende de Cdc42.....	85
Cdc42 interviene en la localización de las septinas durante la conjugación.....	86
Discusión.....	89
Cdc42-879.....	91
Cdc42 participa en la secreción polarizada.....	93
Cdc42 y el tráfico de membranas.....	96
Cdc42 y las vacuolas.....	98
Bgs1 y Bgs4 muestran diferentes rutas de tráfico intracelular.....	99
Cdc42 y la conjugación.....	100
Conclusiones.....	105

Materiales y Métodos..... 109

1. Microorganismos utilizados.....	111
2. Medios de cultivo.....	114
2.1 Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	114
2.2 Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	116
2.3 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	116
3. Condiciones y estimación del crecimiento.....	116
3.1 Condiciones de crecimiento para <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i>	116
3.2 Ensayos de crecimiento en gota.....	117
3.3 Detección de la actividad β -galactosidasa en placa.....	117
4. Métodos genéticos.....	117
4.1 Conjugación.....	117
4.2 Aislamiento de ascosporas.....	117
4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación.....	118
5. Procedimientos generales de biología molecular.....	118
5.1 Vectores utilizados.....	118
Vectores de <i>E. coli</i>	118
Vectores de <i>S. pombe</i>	119
Vectores de <i>S. cerevisiae</i>	120
5.2 Obtención de ADN.....	120
5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	121
5.4 Secuenciación de ADN.....	121
5.5 Manipulación de ADN.....	121
5.6 Transformación de <i>E. coli</i>	122
5.7 Transformación de levaduras.....	122
5.8 Construcción del módulo de integración de <i>cdc42</i>	122
5.9 Clonación de genes supresores.....	122
6. Análisis de proteínas.....	123
6.1 Obtención de extractos celulares.....	123
6.2 Precipitación e inmunoprecipitación.....	124

6.3 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	124
6.4 Inmunodetección de proteínas.....	124
6.5 Valoración de GTP-Cdc42.....	125
6.5.1. Producción de GST-CRIB.....	125
6.5.2. Ensayo de unión.....	126
6.6 Valoración de la secreción de fosfatasa ácida.....	126
6.7 Ensayo de inmunoblot de colonias.....	127
7. Técnicas Microscópicas y Tinciones.....	127
7.1 Microscopía de fluorescencia.....	127
7.1.1 Fluorescencia directa con GFP.....	127
7.1.2 Tinción de calcoflúor.....	128
7.1.3 Tinción de actina.....	128
7.1.4 Tinción de CDCFDA.....	128
7.1.5 Tinción de FM4-64.....	129
7.2 Microscopía electrónica.....	129
8. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular.....	129
9. Análisis bioinformático de los datos.....	130
Bibliografía.....	133

Introducción

La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

El organismo modelo utilizado para este trabajo es la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Este hongo unicelular, perteneciente al filo Ascomycota, es un organismo haplodiplobionte cuyo genoma de 13,8Mb contiene 4.824 genes repartidos en 3 cromosomas; I (5.7 Mb), II (4.6 Mb) y III (3.5 Mb).

S. pombe fue aislado por primera vez por Lindner en 1893 en África oriental a partir de una cerveza de mijo típica de la región (Figura 1). El nombre de la especie, *pombe*, significa cerveza en swahili. La mayoría de las cepas de *S. pombe* utilizadas hoy en día en los laboratorios no proceden de la cepa aislada originalmente por Lindner, sino de un cultivo aislado en el Sur de Francia por A. Osterwalder en 1921 a partir de un mosto rancio, con un alto contenido en sulfuros. Este cultivo fue utilizado por Urs Leupold para la primera caracterización genética de *S. pombe* y contenía, entre otras, células con el tipo sexual h^{90} (cepa 968), el tipo sexual h^- (cepa 972) y el tipo sexual h^+ (cepa 975) (Leupold, 1949).

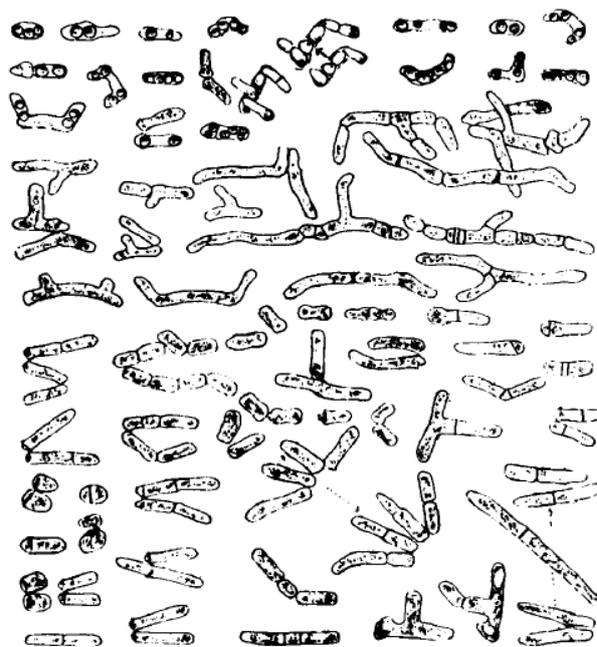


Figura 1. Ilustración de células de *S. pombe* según la descripción original de Paul Lindner (Lindner, 1893).

La levadura de fisión ha resultado ser un excelente organismo modelo por varios motivos. Es un hongo unicelular en el que es posible utilizar tanto métodos genéticos clásicos como moleculares y genómicos. Asimismo, es un excelente modelo para estudiar la morfogénesis celular debido a su forma cilíndrica bastante uniforme, presentando crecimiento polarizado por los extremos y dividiéndose por fisión media. La forma, tamaño y división celular son altamente reproducibles en el laboratorio, por lo que, de manera sencilla, se pueden identificar mutantes con morfología, tamaño o patrones de división aberrantes.

Ciclo de vida de *S. pombe*

Durante el crecimiento vegetativo *S. pombe* tiene forma cilíndrica, con un tamaño de unos 3-4 μm de diámetro y una longitud de 7-8 μm al comenzar el ciclo celular y de 12-15 μm en el momento de la división celular. Las células de *S. pombe* crecen apicalmente, activando el crecimiento en uno o los dos polos dependiendo del momento del ciclo celular en que se

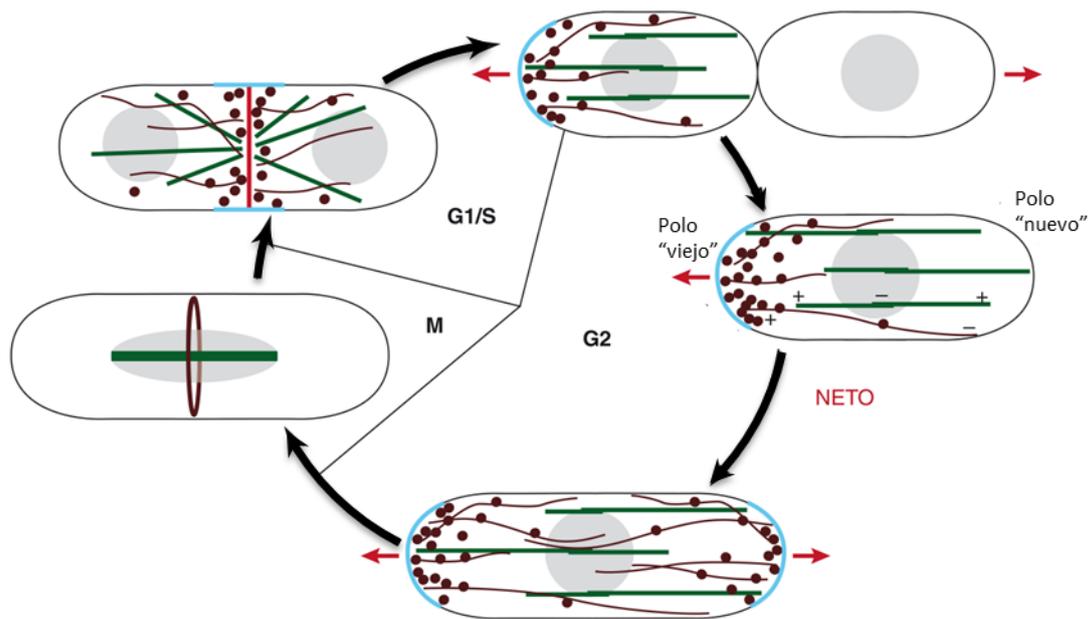


Figura 2. Organización del citoesqueleto de *S. pombe* a lo largo del ciclo celular. Ilustración adaptada de Chang y Martin, 2009.

encuentren (Figura 2). Tras la mitosis, las células activan el crecimiento únicamente por el polo heredado de la célula madre (polo "viejo"), proceso que se conoce como OETO (*Old End Take Off*). Posteriormente, después del inicio de la fase G2, se activa el crecimiento por el polo originado como consecuencia de la anterior separación celular (polo "nuevo"). Esta transición de crecimiento monopolar a crecimiento bipolar se denomina NETO (*New End Take Off*). Cuando la célula entra en mitosis, el crecimiento por los polos se detiene y la maquinaria de crecimiento se localiza en la zona central donde se ensambla un anillo de actomiosina. Al finalizar la mitosis los núcleos se separan y comienza la contracción del anillo de actomiosina, que está coordinada con la adición de nuevas membranas y la síntesis de material de pared celular que conducirá a la formación del septo y posterior separación de las células hijas.

Cuando las células agotan los nutrientes del medio, se produce una entrada en fase estacionaria. Las células paran su ciclo celular en fase G1, detienen su crecimiento polarizado típico de la fase exponencial del crecimiento vegetativo y adquieren una morfología más redondeada.

La fase predominante en el ciclo de vida de *S. pombe* es la haploide, en la cual presenta dos tipos sexuales diferenciados conocidos como h^+ y h^- (Figura 3). Las cepas de *S. pombe* silvestres son homotálicas, así en una colonia se encuentran homogéneamente mezcladas células de ambos tipos sexuales. Cuando dos células de tipos sexuales opuestos se encuentran en un medio pobre en nutrientes inician el proceso de conjugación. Mediante la formación de un *shmoo* o proyección de conjugación las células entran en contacto, lo que permite la fusión celular y la fusión de los núcleos o cariogamia, dando como resultado la formación de un cigoto diploide. El cigoto entra en meiosis, dando lugar a la formación de cuatro núcleos. Seguidamente ocurre la esporulación, en la que los cuatro núcleos son rodeados de membrana y pared celular originando las ascosporas

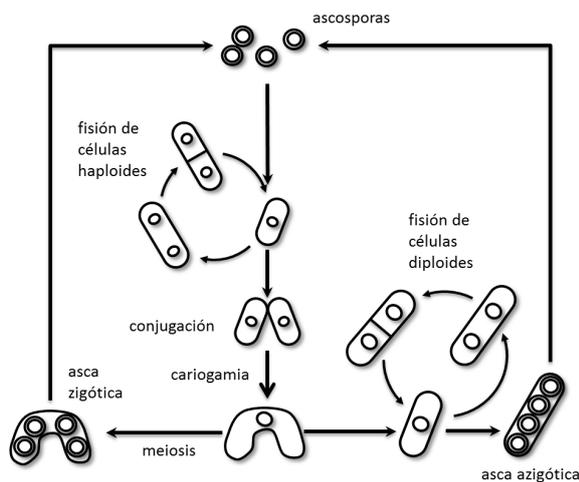


Figura 3. Ciclo de vida de *S. pombe*.

que son formas de resistencia y sólo germinarán cuando encuentren condiciones adecuadas para el crecimiento, cerrando el ciclo de vida de *S. pombe*.

En ocasiones es posible observar crecimiento vegetativo en células diploides, que pueden esporular en condiciones desfavorables, dando lugar a 4 esporas haploides.

Las cepas de *S. pombe* utilizadas en los laboratorios pueden ser heterotálicas, manteniendo el mismo tipo sexual en todas las células a lo largo de las generaciones. Esto

permite realizar deliberadamente cruces mezclando cepas de tipos sexual opuesto en un medio adecuado.

Crecimiento polarizado

El crecimiento polarizado se define como el tipo de crecimiento que ocurre en regiones confinadas y específicas de la célula. Este crecimiento es el que determina la morfología celular. En *S. pombe*, el crecimiento por dos zonas de dimensiones definidas y posicionadas en lados opuestos de la célula es lo que origina la forma cilíndrica típica de *S. pombe* durante el crecimiento vegetativo. El tipo de división mediante fisión media asegura que esta forma cilíndrica típica sea heredada por las células hijas.

Establecimiento del crecimiento polarizado

En *S. pombe* el establecimiento de las zonas de crecimiento está dirigido por los microtúbulos, siendo crítica la organización subcelular de éstos. Durante la interfase, los microtúbulos forman de 2 a 6 haces alineados a lo largo del eje longitudinal de la célula (Hagan, 1998; Hoog *et al.*, 2007). Estos haces están formados por 4 ó 5 microtúbulos dispuestos de forma antiparalela que solapan sus extremos (-) en los centros organizadores de microtúbulos de interfase o iMTOCs, localizados en el centro de la célula. Este solapamiento depende de la nucleación de nuevos microtúbulos en sentido antiparalelo a partir de microtúbulos preexistentes y de una sofisticada maquinaria que permite el deslizamiento de unos microtúbulos sobre otros (Hoog *et al.*, 2007; Janson *et al.*, 2007; Samejima *et al.*, 2010). Esta organización asegura que en cada haz de microtúbulos los extremos (+) crezcan hasta alcanzar ambos polos para posteriormente despolimerizarse rápidamente, proceso conocido como catástrofe (Brunner y Nurse, 2000). El control espacial y temporal de la catástrofe es crucial para la función de los microtúbulos, así el control espacial asegura que los microtúbulos entren en contacto con los polos de la célula, mientras que el control temporal de la catástrofe asegura que el núcleo permanezca centrado, ya que se halla unido a las regiones

solapadas de cada haz. La posición del núcleo a su vez determinará el lugar donde ocurrirá la división celular (Sohrmann *et al.*, 1996). El núcleo se mantiene en el centro de la célula gracias a las fuerzas de empuje de los extremos (+) de los microtúbulos al entrar en contacto con los polos de la célula (Tran *et al.*, 2001). Así, la regulación de la catástrofe debe permitir suficiente tensión para mantener el núcleo en el centro pero al mismo tiempo debe impedir que los microtúbulos crezcan demasiado y se curven al llegar a los polos.

En el extremo (+) de los microtúbulos se acumula un grupo de proteínas estructural y funcionalmente diverso que forman el complejo +TIP (*plus-end tracking proteins*). Estas proteínas controlan la dinámica de los microtúbulos permitiendo tanto el control espacial como temporal de la catástrofe. En *S. pombe* el papel principal de estas proteínas es permitir a los microtúbulos crecer lo suficiente como para alcanzar los polos de la célula. Los principales componentes de +TIP son Mal3, una proteína de la familia EB1; la kinesina Tea2; y Tip1, una proteína de la familia CLIP-170 (Bieling *et al.*, 2007; Brunner y Nurse, 2000; Busch *et al.*, 2004).

Aunque el control local por parte de la actividad de +TIP no es crítico para la regulación de la catástrofe, sí que permite un mayor ajuste de la misma. Así, por ejemplo, células que se enfrentan a problemas en la replicación del ADN activan la fosfatasa calcineurina cuya subunidad catalítica es Ppb1. La calcineurina desfosforila a Tip1 y esto produce un retraso en la catástrofe en el polo nuevo. Además estas células muestran un retraso en la entrada en NETO (Kume *et al.*, 2011). De forma similar, las proteínas Klp5 y Klp6, dos miembros de la familia de la kinesina-8, inducen la catástrofe en los microtúbulos (Grissom *et al.*, 2009; Tischer *et al.*, 2009; West *et al.*, 2001). Aun así, los microtúbulos sufren catástrofe al llegar a los polos independientemente de estos mecanismos de control, por lo que deben de existir mecanismos moleculares adicionales que regulen la catástrofe de microtúbulos.

El marcador de polaridad Tea1, con similitud a las proteínas Kelch de *Drosophila* y Ezrina de mamíferos, se acumula en los extremos (+) de los microtúbulos. Junto a Tea1 se encuentra formando un complejo la proteína Tea4 que posee un dominio SH3 (Martin *et al.*, 2005; Mata y Nurse, 1997). El complejo Tea1-Tea4 es transportado en los extremos (+) de los microtúbulos asociado al complejo +TIP y es anclado a la membrana celular de los polos mediante la interacción de Tea1 con las proteínas Mod5 y Tea3 (Arellano *et al.*, 2002; Snaith *et al.*, 2005; Snaith y Sawin, 2003). Mod5 es una proteína anclada a la membrana mediante prenilación y necesaria para el anclaje de Tea1 en ambos polos (Snaith y Sawin, 2003), mientras que Tea3, una proteína similar a Tea1, secuestra a Tea1 en el polo de no crecimiento antes de NETO (Snaith *et al.*, 2005). A su vez, Tea4 juega un papel en el anclaje del complejo Tea1-Tea4 en el polo de crecimiento (Martin *et al.*, 2005; Tatebe *et al.*, 2005). Así Tea3 y Tea4 promueven el anclaje de Tea1 cada una en un polo específico. A pesar de la aparente linealidad del proceso, este mecanismo es mucho más complejo, ya que Tea1 regula, a su vez, la localización de las proteínas previamente mencionadas (Figura 4).

En el polo de crecimiento, Tea4 se une directamente a For3, la formina responsable de la formación de cables de actina durante interfase, sirviendo como puente de unión entre Tea1

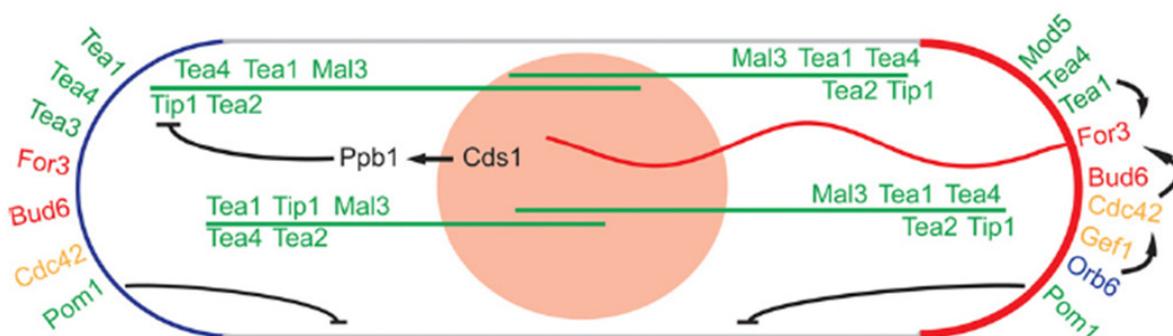


Figura 4. Esquema del establecimiento de la polaridad en *S. pombe*. Ilustración adaptada de Huisman y Brunner, 2011.

y For3 (Feierbach y Chang, 2001; Nakano *et al.*, 2002). Junto a For3 se unen sus activadores: la GTPasa de la familia Rho Cdc42, Bud6, que se une a actina y a For3, y Pob1 (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009), formando parte del complejo de Tea1-Tea4 en el polo de crecimiento (Feierbach *et al.*, 2004; Glynn *et al.*, 2001). La proteína de fusión Tea1-For3 permite localizar a For3 en los polos independientemente de Tea4 y es suficiente para promover el crecimiento bipolar en células retenidas en la fase G1, antes del proceso de NETO (Martin *et al.*, 2005). Esto indica que el ensamblaje de cables de actina en los polos sería suficiente para desencadenar el crecimiento polarizado en las células (Feierbach y Chang, 2001; Sawin, 2002).

Se ha sugerido que la quinasa Pom1 actúa por debajo de Tea1 conectando la señalización de microtúbulos y actina para asegurar la posición del crecimiento. Pom1 pertenece a la familia de quinasas DYRK (*dual specificity Yak-related kinase*) (Bahler y Pringle, 1998) y se localiza en los polos de forma dependiente de Tea4, y en menor medida de Tea1. Las células carentes de Pom1 tienen crecimiento monopolar y además presentan una localización asimétrica de los anillos de actomiosina, dando como resultado células de tamaño desigual. Pom1 se une directamente a fosfolípidos de la membrana plasmática cargados negativamente a través de un motivo con carga positiva. La autofosforilación de Pom1 en este dominio inhibe su localización en la membrana. La fosfatasa Dis2, que se localiza en los polos mediante su interacción con Tea4 (Álvarez-Tabares *et al.*, 2007; Ohkura *et al.*, 1989) desfosforila a Pom1 favoreciendo su asociación con la membrana plasmática. Cuando Pom1 difunde lateralmente por la membrana plasmática, Dis2 no puede desfosforilarla, disociándose gradualmente de la membrana y creándose un gradiente de Pom1 desde los polos de la célula (Hachet *et al.*, 2011). Este gradiente le permite a la célula integrar información espacial relativa al tamaño y la geometría celular de una manera que depende indirectamente de los microtúbulos (Bahler y Pringle, 1998; Padte *et al.*, 2006; Saunders *et al.*, 2012; Tatebe *et al.*, 2005).

El citoesqueleto de actina en *S. pombe*

El citoesqueleto de actina tiene un papel muy importante en el inicio del crecimiento polarizado. Se ha demostrado con ensayos de regeneración de protoplastos que el crecimiento



Figura 5. Citoesqueleto de actina. Esquema de las diferentes estructuras de actina durante el ciclo de vida de *S. pombe*. Ilustración adaptada de Kovar *et al.*, 2011.

se inhibe cuando se lleva a cabo el experimento en presencia de citocalasina D, que inhibe la polimerización de la actina (Kobori *et al.*, 1989).

En *S. pombe* la actina está codificada por un único gen, *act1⁺*, y existe en dos estados: la actina globular, G-actina, que es la forma minoritaria y la actina polimerizada o filamentosa, la F-actina. El citoesqueleto de actina de *S. pombe* es relativamente simple, formando durante el crecimiento vegetativo tres estructuras bien definidas: los parches de actina, los cables de actina y el anillo contráctil de actomiosina (Marks y Hyams, 1985). Durante la conjugación aparece una estructura de actina adicional de la que se desconoce la organización de los filamentos (Figura 5) (Petersen *et al.*, 1998a).

LOS PARCHES DE ACTINA

Los parches de actina son filamentos cortos y ramificados que llegan a constar de hasta 150 filamentos ramificados y alcanzan un tamaño de 100-200 nm de longitud (Berro *et al.*, 2010; Sirotkin *et al.*, 2010).

Los parches de actina se ensamblan en sitios de endocitosis que acompañan al crecimiento polarizado en los polos durante la interfase y en la zona media cuando las células se dividen (Arellano *et al.*, 1997; Balasubramanian *et al.*, 1998; Gachet y Hyams, 2005), lo que sugiere que la función endocítica de los parches de actina acompaña a la síntesis y remodelación de la pared celular. Se ha demostrado recientemente que los parches de actina son necesarios en el proceso de endocitosis para contrarrestar la elevada presión de turgencia de las células de levadura (Aghamohammadzadeh y Ayscough, 2009; Minc *et al.*, 2009). De todos modos, no se puede excluir una posible función de los parches de actina en exocitosis, ya que algunos mutantes con defectos en los componentes de los parches muestran acumulaciones de vesículas post-Golgi (Moseley y Goode, 2006).

La nucleación de los parches de actina es llevada a cabo por el complejo Arp2/3 (actin-related-protein), estimulada por tres factores promotores de nucleación: Pan1, similar a Eps15; Wsp1 de la familia WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein) y la miosina de tipo I Myo1 (Lee *et al.*, 2000; Sirotkin *et al.*, 2010; Toya *et al.*, 2001). Además en los parches hay otras proteínas implicadas en la estabilidad y en la regulación de la dinámica de los parches y de otras estructuras

de actina. Así la fimbrina, Fim1, da rigidez a la estructura del parche de actina (Skau y Kovar, 2010); la profilina, Cdc3, es una proteína de unión a actina implicada en nucleación y polimerización de filamentos de actina; la coronina, Crn1, está asociada a los parches y determina la extensión de los filamentos de actina; y las cofilinas, Adf1 y Gmf1 se unen a los filamentos e inducen su ruptura en fragmentos más cortos para que el parche de actina se desensamble más rápidamente una vez finalizado el proceso de endocitosis asociado a la internalización del parche (Figura 6) (Gandhi *et al.*, 2010; Humphries *et al.*, 2002; Moseley y Goode, 2006; Nakano *et al.*, 2010; Sirotkin *et al.*, 2005).

LOS CABLES DE ACTINA

Los cables de actina se extienden a lo largo del eje longitudinal de las células en interfase orientados de tal manera que la polimerización ocurre por el extremo más cercano a los polos (Kamasaki *et al.*, 2005). Esta orientación asegura el transporte a los polos del material requerido para el crecimiento polarizado.

Los cables de actina están compuestos de haces de filamentos cortos de actina paralelos que, durante interfase, son ensamblados por For3, de la familia de las forminas (Feierbach y Chang, 2001; Kamasaki *et al.*, 2005; Nakano *et al.*, 2002). Se han descrito pocas proteínas de unión a filamentos de actina que se unan a los cables, tan solo la tropomiosina Cdc8, una proteína estabilizadora de filamentos de actina y la coronina, Crn1 (Pelham y Chang, 2001).

Los cables de actina formados por For3 no son esenciales para la viabilidad celular, pero contribuyen al crecimiento polarizado ya que sirven como vías a través de las cuales las miosinas de tipo V, como Myo52, pueden transportar vesículas de secreción (Motegi *et al.*, 2001), y participan en el movimiento de los parches de actina (Figura 6) (Martin y Chang, 2006; Pelham y Chang, 2001).

Cuando se produce la transición a crecimiento bipolar, se establecen cables de actina en el polo nuevo y los parches de actina son redirigidos a dicho polo, aunque la distribución de los mismos no es completamente simétrica, ya que el polo viejo mantiene 1,5 veces más cantidad de parches que el nuevo (Gachet y Hyams, 2005).

Durante la mitosis, los cables se reorientan de tal manera que se polimerizan desde la

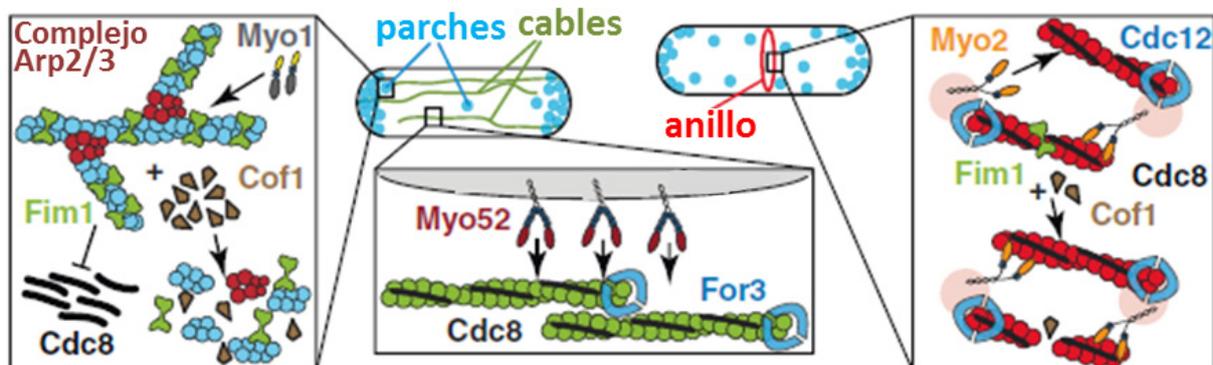


Figura 6. Organización de la F-actina en las diferentes estructuras del citoesqueleto de actina. Ilustración adaptada de Kovar *et al.*, 2011.

zona media, permitiendo el transporte de los materiales necesarios para la formación del anillo contráctil y el septo (Kamasaki *et al.*, 2005). La nucleación de estos cables depende de la formina Cdc12 y es esencial para la formación del anillo de actomiosina necesario para la división celular (Chang *et al.*, 1997).

Además de For3 y Cdc12, en *S. pombe* existe otra formina, Fus1, que está relacionada con el proceso de fusión celular durante la conjugación (Petersen *et al.*, 1998b).

EL ANILLO DE ACTOMIOSINA

Es una estructura esencial para la división celular que está formada por filamentos de actina y de miosina de tipo II (Figura 6) (Balasubramanian *et al.*, 2004). Se ensambla en la región media de la célula y su contracción se produce de forma coordinada con el depósito de nueva membrana y de material de pared celular.

La secreción polarizada en *S. pombe*

Para llevar a cabo el crecimiento polarizado es necesaria una secreción polarizada de nuevo material de membrana (lipídico y proteico) en las zonas de crecimiento activo de la célula.

Las vesículas exocíticas se generan en el Aparato de Golgi y son transportadas a través de los cables de actina por las miosinas de tipo V hasta la membrana plasmática de las zonas de crecimiento (Figura 7). La fusión de las vesículas a la membrana plasmática es facilitada por las proteínas SNARE (Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) presentes en la membrana de la vesícula (v-SNARE) y en la membrana plasmática (t-SNARE). En *Saccharomyces cerevisiae* se identificaron una serie de proteínas necesarias para el paso intermedio entre la llegada de las vesículas a la membrana y la fusión mediada por las proteínas SNARE. Mutaciones en estas proteínas producían acumulación de vesículas incapaces de fusionarse con la membrana plasmática que conducían a defectos de crecimiento y de secreción (Novick *et al.*, 1981; Novick *et al.*, 1980). Muchas de esas proteínas fueron posteriormente identificadas como componentes de un complejo evolutivamente conservado denominado exocisto (TerBush *et al.*, 1996). El complejo del exocisto pertenece a la familia de complejos CATCHR (Complex Associated with Tethering Containing Helical Rods). Se han propuesto muchas funciones para estos complejos, incluyendo el anclaje de vesículas a su membrana de destino, así como la regulación espacial

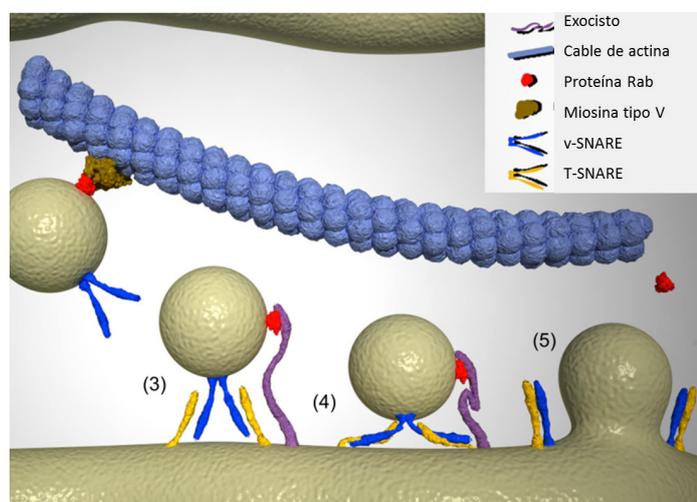


Figura 7. La secreción polarizada. Ilustración adaptada de Vázquez-Martínez y Malagón, 2011.

y temporal del ensamblaje de los complejos SNARE (Grote *et al.*, 2000; Pfeffer, 1996; Whyte y Munro, 2002).

Estudios bioquímicos y de microscopía electrónica en diferentes organismos predicen que las subunidades que forman el exocisto se empaquetan unas al lado de otras de manera que forman una estructura en forma de Y, lo que sugiere que, con sus dos brazos, el exocisto podría conectar los elementos que le permiten unirse a la membrana de la vesícula y a la membrana plasmática (Baek *et al.*, 2010; Dong *et al.*, 2005; Hsu *et al.*, 1998; Hutagalung *et al.*, 2009; Munson y Novick, 2006).

La composición del complejo del exocisto está muy conservada en los organismos eucariotas y consta de 8 subunidades únicas: Sec3, Sec5, Sec6, Sec8, Sec10, Sec15, Exo70 y Exo84. Mientras que en *S. cerevisiae* todas son esenciales excepto Sec3 (Finger y Novick, 1997; Novick *et al.*, 1980), en *S. pombe* todas son esenciales salvo Exo70 (Bendezu *et al.*, 2012; Jourdain *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2002). En la levadura de fisión, las cepas termosensibles con mutaciones en estas proteínas son defectuosas en la degradación del septo y la falta de actividad de este complejo provoca un defecto de secreción (Wang *et al.*, 2002). Al estar relacionado con la exocitosis polarizada de vesículas, el exocisto se localiza en las zonas de crecimiento activo, en los polos durante el crecimiento y en el septo durante la separación (Bendezu *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2002).

El tráfico de membranas en el interior celular está estrictamente regulado y coordinado en todas sus etapas desde la formación de las vesículas, su transporte a través del citoesqueleto y su anclaje y posterior fusión a la membrana. Las GTPasas de la familia Rab participan en esta regulación, permitiendo el tráfico de proteínas de membrana desde el Aparato de Golgi hasta la membrana plasmática y su posterior reciclado. Las GTPasas de la familia Rab son el grupo más numeroso de la superfamilia de GTPasas Ras, con 11 componentes en *S. cerevisiae*, 8 en *S. pombe* y más de 60 en humanos. Estas GTPasas no actúan como elementos individuales, sino de manera coordinada unas con otras a través de diferentes mecanismos para regular cada paso del transporte. Estos mecanismos incluyen activadores e inhibidores de las GTPasas, efectores que se unen a múltiples GTPasas y bucles de retroalimentación positiva generados por la interacción de efectores de una GTPasa con los activadores de otra. Ya que cada GTPasa recluta su propio grupo de efectores, las transiciones de unas GTPasas Rab a otras ayudan a definir cambios en la funcionalidad de los compartimentos de membrana con los que están asociadas (Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2012).

En *S. cerevisiae*, cuando las vesículas secretoras emergen del *Trans Golgi Network* (TGN) sus membranas contienen fosfatidil inositol 4-fosfato (PtdIns4P). En estas condiciones, las GTPasas de la familia Rab Ypt31/32, homólogas de Rab1, interaccionan con la quinasa de fosfatidil inositol 4-fosfato, PIK1, encargada de la formación de PtdIns(4,5)P₂, y juntas reclutan a Sec2, que es un factor activador de intercambio de nucleótidos de Guanina (GEF) de la GTPasa Rab Sec4, de forma que se produce un activación de GTPasas en cascada (Walch-Solimena *et al.*, 1997). A medida que la vesícula secretora se aleja del Golgi se va produciendo una transición en la activación de

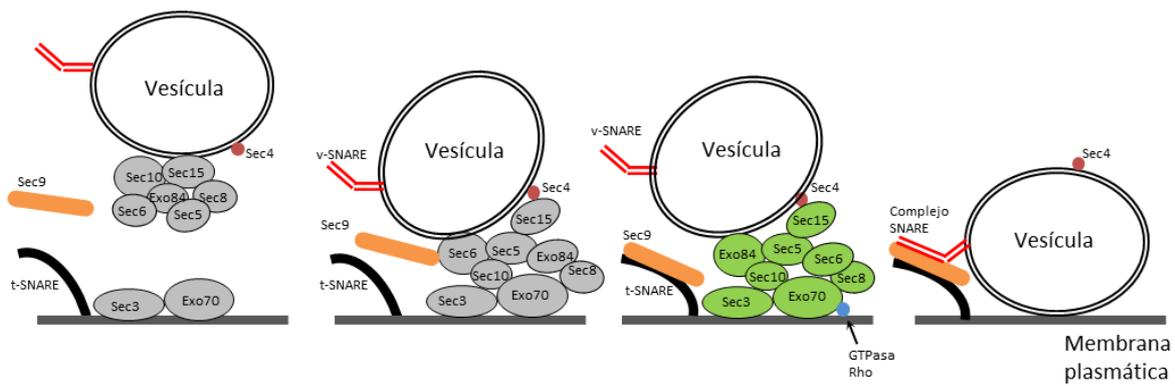


Figura 8. La activación del exocisto en *S. cerevisiae*. Ilustración adaptada de Wu *et al.*, 2008.

las GTPasas desde Ypt31/32 a Sec4. Concomitadamente, a medida que se va sustituyendo el PtdIns4P por PtdIns(4,5)P₂, la afinidad Ypt31/32 por Sec2 disminuye y aumenta la afinidad por el componente del exocisto Sec15 (Medkova *et al.*, 2006; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2010). De esta forma Sec4 es capaz de regular el ensamblaje del exocisto (Goud *et al.*, 1988; Guo *et al.*, 1999; TerBush y Novick, 1995). Además, cuando bajan los niveles de PtdIns4P en la membrana de la vesícula, la miosina de tipo V Myo2 es capaz de unirse con ayuda de las GTPasas Rab y la vesícula comienza a desplazarse hacia la zona de crecimiento (Santiago-Tirado *et al.*, 2011). En *S. pombe* se ha relacionado a las Rab GTPasas Ryh1, Ypt3 e Ypt2 con la ruta exocítica (Craighead *et al.*, 1993; Cheng *et al.*, 2002; He *et al.*, 2006).

En *S. cerevisiae* todas las subunidades del exocisto salvo Sec3 y Exo70 llegan a las zonas de crecimiento en vesículas, a través de los cables de actina (Boyd *et al.*, 2004), mientras que Sec3 parece llegar por otro mecanismo independiente y Exo70 parece llegar a los sitios de crecimiento polarizado tanto acompañando a las vesículas como de manera independiente (Figura 8) (Boyd *et al.*, 2004). De esta forma, Sec3 y Exo70 actuarían de manera redundante, indicando dónde se tiene que ensamblar el complejo del exocisto para permitir el anclaje de la vesícula (Hutagalung *et al.*, 2009). Las GTPasas de la familia Rho, Rho1, Rho3 y Cdc42 intervienen en la activación del exocisto a través de Exo70 y Sec3 (Adamo *et al.*, 2001; Adamo *et al.*, 1999; Baek *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2001; He *et al.*, 2007; Robinson *et al.*, 1999; Wu *et al.*, 2010; Yakir-Tamang y Gerst, 2009; Yamashita *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2001).

Además del anclaje de la vesícula, el exocisto también interviene en asegurar el correcto ensamblaje del complejo SNARE. Así, en *S. cerevisiae*, el componente del exocisto Sec6 interacciona con la t-SNARE Sec9 (Morgera *et al.*, 2012; Sivaram *et al.*, 2005). De esta forma el exocisto ejerce un control espacial y temporal de la activación del complejo SNARE de exocitosis.

La ruta endocítica

La endocitosis es el proceso mediante el cual materiales extracelulares o unidos a la membrana plasmática se transportan al interior celular incluidos en vesículas.

Se ha propuesto que la endocitosis es un proceso que compensa la exocitosis (Pruyne y

Bretscher, 2000). Por tanto, ambos procesos parecen estar relacionados y son necesarios para un crecimiento polarizado. El papel de la endocitosis en el crecimiento polarizado de *S. pombe* es menos evidente que en el crecimiento apical de hongos filamentosos (Abenza *et al.*, 2009). Sin embargo, es previsible que sea importante para el reciclado de proteínas y lípidos en las zonas de crecimiento activo (Gachet y Hyams, 2005).

Como se ha comentado anteriormente, la endocitosis en *S. pombe* está asociada al citoesqueleto de actina (Arasada y Pollard, 2011; Gachet y Hyams, 2005). Las vesículas endocíticas se forman como invaginaciones de la membrana plasmática que posteriormente se liberan de ésta y se desplazan hacia el interior celular. Estas vesículas se fusionan con otras vesículas endocíticas, formando el compartimento denominado *endosoma temprano*. En este compartimento, las proteínas endocitadas pueden continuar por dos rutas diferentes. Las proteínas que van a ser recicladas son dirigidas a los endosomas especializados en reciclaje y retornan a través de vesículas a la membrana plasmática. Por otra parte, las proteínas ubiquitinadas, que van a ser degradadas, son reconocidas por los complejos ESCRTs (Endosomal Sorting Complex Required for Transport), continúan en el endosoma temprano que madura hasta formar el *cuerpo multivesicular* (MVB) o *endosoma tardío*. En el endosoma tardío, las vesículas unidas a su carga se invaginan hacia el interior del orgánulo. Por último, el cuerpo multivesicular se une con vesículas derivadas del Aparato de Golgi pertenecientes a la ruta hidrolítica. De esta manera surgen las vacuolas, donde se produce la degradación de las proteínas. Aparte de esta ruta, otra procedente del Aparato de Golgi, denominada ruta AP-3, por el complejo adaptador de sus vesículas, transporta proteínas directamente a la vacuola para evitar su inclusión en las membranas de los cuerpos multivesiculares. En contraposición a la ruta hidrolítica que se dirige desde el Aparato de Golgi hacia los cuerpos multivesiculares, existe una de sentido opuesto, que permite el reciclaje de membranas y proteínas adaptadoras, denominada *ruta del retrómero* (Figura 9).

En levaduras, cada uno de los pasos de la ruta endocítica es regulado de manera independiente mediante la interacción de múltiples proteínas, como los complejos multiproteicos ESCRTs, CORVET (class C Core Vacuole / Endosome Tetherin) y HOPS (Homotypic Fusion and vacuole Protein Sorting); lípidos de membrana como el PtdIns3P y el PtdIns(3,5)P₂; y las GTPasas de la familia Rab (Armstrong *et al.*, 1993; Balderhaar *et al.*, 2010; Onishi *et al.*, 2003; Takegawa *et al.*, 1995).

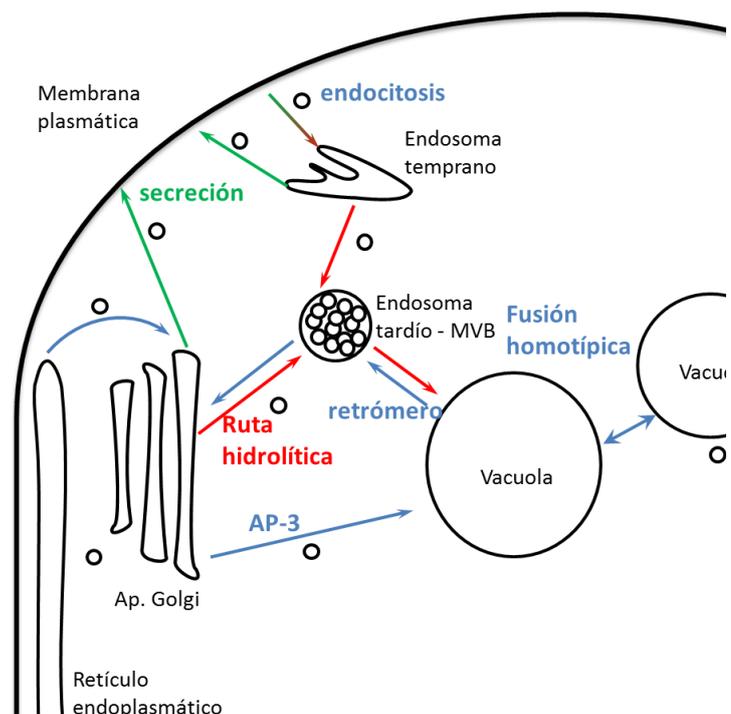


Figura 9. Tráfico interno de membranas.

Las Vacuolas

Aparte de intervenir en la degradación de proteínas de la superficie celular, las vacuolas intervienen en el reciclado de proteínas y el mantenimiento de los compartimentos subcelulares, juegan un papel esencial en la regulación de la osmolaridad y en la homeostasis de iones y son un importante reservorio de aminoácidos, iones y polifosfatos. En *S. cerevisiae* la vacuola es el orgánulo más prominente y morfológicamente es distinguible por su gran tamaño, que supone un cuarto del volumen total de la célula. En cada ciclo celular, las vacuolas de *S. cerevisiae* se dividen de forma activa entre las células madre e hija (Catlett y Weisman, 2000). La morfología de las vacuolas cambia rápidamente en respuesta a cambios osmóticos en el medio. Así la exposición a medios hipotónicos produce la rápida fusión de las vacuolas, mientras que los gradientes hipertónicos del medio causan su fragmentación (Bone *et al.*, 1998; Brett y Merz, 2008). Las vacuolas de *S. cerevisiae* se pueden aislar fácilmente por métodos bioquímicos y mediante su incubación con ATP, las vacuolas se unen y posteriormente se fusionan (Wickner, 2002; Wickner y Haas, 2000). En la fusión de las vacuolas intervienen una serie de proteínas que regulan y catalizan este proceso, entre las que destacan la GTPasa de la familia Rab Ypt7 (también conocida como Vam4) (Haas *et al.*, 1995), las cuatro proteínas SNARE de vacuola (Nyv1, Vti1, Vam3 y Vam7) y el complejo hexomérico HOPS (Seals *et al.*, 2000; Wurmser *et al.*, 2000). Aparte de estas proteínas y complejos existen otras proteínas que afectan a la fusión, entre las que cabe destacar la calmodulina (Peters y Mayer, 1998), la actina (Eitzen *et al.*, 2002), Bem1 (Xu y Wickner, 2006), la proteína fosfatasa I (PP1) (Peters *et al.*, 1999), el proteasoma (Kleijnen *et al.*, 2007), la dinamina Vps1 (Peters *et al.*, 2004), la V-ATPasa (Strasser *et al.*, 2011) y las GTPasas de la familia Rho, Cdc42 y Rho1 (Eitzen *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001). Aparte de estas proteínas, ciertos lípidos de las vacuolas son importantes para su fusión, entre los que se encuentran el ergosterol (ERG), el diacilglicerol (DAG), los fosfoinosítidos PtdIns3P y PtdIns(4,5)P₂, fosfatidil etanolamina (PE) y ácido fosfatídico (PA) (Fratti *et al.*, 2004; Kato y Wickner, 2001; Mayer *et al.*, 2000; Mima y Wickner, 2009a, b; Seeley *et al.*, 2002).

A diferencia de *S. cerevisiae*, *S. pombe* contiene entre 40 a 80 vacuolas de pequeño tamaño dispersas por toda la célula, lo que supone un menor problema para la célula a la hora de repartirlas entre las células hijas (Bone *et al.*, 1998). De la misma manera que en *S. cerevisiae*, la morfología de las vacuolas cambia rápidamente cuando las células son sometidas a estrés. Por ejemplo, la resuspensión de las células en un medio hipotónico causa que las vacuolas de pequeño tamaño se fusionen para formar dos grandes vacuolas. La regulación morfológica de las vacuolas también depende de otros tipos de estreses, como el nutricional a través de los complejos TORC1 y TORC2 de la ruta TOR (Tatebe *et al.*, 2010; Valbuena *et al.*, 2012). El hecho de que la levadura *S. pombe* posea tantas vacuolas y que éstas no se fusionen hasta formar grandes vacuolas hace que haya sido interesante estudiar en ella los mecanismos que impiden la fusión vacuolar y mantienen el equilibrio entre fisión y fusión. En *S. pombe*, además de la GTPasa de la familia Rab Ypt7 que interviene en la fusión de las vacuolas (Bone *et al.*, 1998), existe una segunda GTPasa Rab, Ypt71, cuya delección produce la formación de grandes vacuolas,

al contrario de los efectos de la delección de Ypt7. Ypt71 interacciona con el complejo HOPS de *S. pombe* impidiendo la fusión vacuolar, de tal manera que la competición entre Ypt7 e Ypt71 regula la tasa de fusión vacuolar y por tanto el tamaño y el número de vacuolas (Kashiwazaki *et al.*, 2009). Las GTPasas similares a la dinamina también regulan el equilibrio entre fisión y fusión vacuolar y la forma de las vacuolas. Una de ellas, Dnm1, interviene en las últimas etapas de la fisión vacuolar (Rothlisberger *et al.*, 2009).

Biosíntesis y composición de la pared celular de *S. pombe*

La pared celular es una estructura externa a la membrana plasmática que poseen las plantas, los hongos y las bacterias. Está compuesta fundamentalmente por polímeros de glucosa de estructura fibrilar y para estos organismos es vital ya que les permite soportar la presión osmótica intracelular y actúa como barrera protectora ante daños producidos por el medio externo. La pared celular es importante en estudios de morfogénesis y polaridad celular ya que, a pesar de su rigidez, es muy dinámica y sufre numerosos cambios de composición y estructura durante el crecimiento y las distintas etapas de vida de los hongos y levaduras. Durante el crecimiento polarizado, la pared celular debe ser modificada, manteniendo a la vez la integridad celular. Al igual que en otras levaduras, en *S. pombe* esta estructura juega un papel muy importante en el proceso de morfogénesis ya que al eliminar la pared mediante un tratamiento enzimático, las células pierden su forma y adquieren una morfología esférica (Osumi *et al.*, 1998).

Composición de la pared celular

La pared celular fúngica está constituida básicamente por un conjunto de polisacáridos cuya cantidad varía en las diferentes especies (Cabib *et al.*, 1988). La pared celular de *S. pombe* contiene cuatro tipos de glucano que constituyen el 85 % del total de la pared: β -(1,3)-glucano lineal, α -(1,3)-glucano con una pequeña proporción de enlaces α -(1,4), β -(1,3)-glucano ramificado y β -(1,6)-glucano muy ramificado. Además contiene alrededor de un 15 % de galactomanoproteínas (Humbel *et al.*, 2001; Magnelli *et al.*, 2005; Manners y Meyer, 1977; Sugawara *et al.*, 2003).

La pared celular de *S. pombe* se observa al microscopio electrónico de transmisión como una estructura trilaminar, con dos capas externas densas a los electrones y una capa interna menos densa compuesta principalmente por α y β -glucanos (Humbel *et al.*, 2001; Osumi, 1998). El galactomanano se localiza en las dos capas densas a los electrones (Horisberger y Rouvet-Vauthey, 1985). El septo de división está muy organizado y presenta una capa interna menos densa a los electrones denominada septo primario, que está compuesta fundamentalmente por β -(1,3)-glucano, a ambos lados se sitúan los dos septos secundarios de composición similar a la pared celular lateral (Humbel *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003).

Biosíntesis y regulación de la pared celular

β -GLUCANO

El término β -glucano engloba los polisacáridos formados por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β -(1,3) o β -(1,6). En esta levadura representa un 46-54 % del contenido total de la pared, siendo el principal componente de la misma y el responsable de la fuerza mecánica y del mantenimiento morfológico de la célula (Ishiguro, 1998). En *S. pombe* se distinguen tres tipos de β -glucano:

- A. β -(1,3)-glucano lineal: Lo componen monómeros lineales de β -(1,3)-glucano y es el componente fundamental del septo primario (Humbel *et al.*, 2001).
- B. β -(1,3)-glucano con ramificaciones β -(1,6): Es el componente más abundante y consta de cadenas lineales con residuos de glucosa unidos por enlace β -(1,3) y con ramificaciones laterales mediante enlaces β -(1,6). Este polímero es el primer polisacárido que se deposita en la nueva pared en formación durante la regeneración de protoplastos (Osumi *et al.*, 1998). Se extiende por toda la pared celular y se encuentra tanto en el septo primario como secundario (Humbel *et al.*, 2001).
- C. β -(1,6)-glucano muy ramificado: Está constituido por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β -(1,6) que contienen frecuentes ramificaciones en β -(1,3) (Manners y Meyer, 1977). Es un componente minoritario en la pared celular y se le ha denominado diglucano (Magnelli *et al.*, 2005). Este polisacárido se distribuye por toda la pared celular, situándose más próximo a la capa de galactomanano externa (Humbel *et al.*, 2001).

La enzima responsable de la biosíntesis del β -(1,3)-glucano de la pared celular es la denominada β -(1,3)-glucán sintasa (β GS) (UDP-glucosa: β -(1,3)-D-glucano-3- β -D-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.34). En *S. pombe* se han identificado cuatro genes que podrían codificar subunidades catalíticas del complejo β -glucán sintasa: *bgs1⁺*, *bgs2⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺* (β -glucan synthase). Todos ellos son esenciales en distintos momentos del ciclo de vida de la levadura de fisión (Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 1999; Martín *et al.*, 2003; Martín *et al.*, 2000). Las proteínas Bgs son proteínas transmembranales de elevado peso molecular (aproximadamente 200 kDa) y que presentan similitud con Fks1 y Fks2, las β -glucán sintasas descritas en *S. cerevisiae* (Mazur *et al.*, 1995). La β -(1,3)-glucán sintasa tiene además una subunidad reguladora, constituida por la GTPasa Rho1 (Arellano *et al.*, 1996). Tanto Bgs1 como Bgs3 y Bgs4 se localizan en el anillo medio y a lo largo del septo durante la división celular, en los polos en crecimiento y en todos los sitios donde se produce síntesis o remodelación de la pared celular durante la diferenciación sexual y la germinación de las esporas (Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2002; Martín *et al.*, 2003), mientras que Bgs2 es la hipotética subunidad catalítica β GS durante el proceso de esporulación, siendo imprescindible para la correcta maduración de las esporas (Liu *et al.*, 2000; Martín *et al.*, 2000).

Bgs1 (Cps1) es la responsable mayoritaria de la síntesis del β -(1,3)-glucano lineal, que a su vez es responsable de la formación de la estructura del septo primario (Cortés *et al.*, 2007). Sin

embargo, el hecho de que las células con una represión de *bgs1*⁺ muy drástica todavía presenten numerosas estructuras de septos primarios aberrantes y considerables cantidades de β -(1,3)-glucano lineal ha llevado a sugerir la participación de otras β GS en su síntesis, en la que Bgs1 tendría el papel principal (Cortés *et al.*, 2007). Por otra parte, Bgs3 es esencial para la viabilidad y la polaridad celular durante el crecimiento vegetativo. La represión de *bgs3*⁺ origina células redondeadas e hinchadas que dejan de crecer, sin embargo, la actividad β GS y el β -(1,3)-glucano de la pared celular de estas células carentes de Bgs3 son normales, mostrando una pared celular más gruesa y un notable aumento del α -glucano (Martín *et al.*, 2003). Bgs4 es esencial para el mantenimiento de la integridad celular, tanto durante el crecimiento polarizado como en la citocinesis, así como para la germinación de las esporas 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).

α -GLUCANO

El α -glucano es un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,3) con una pequeña proporción de enlaces α -(1,4) (Manners y Meyer, 1977). En *S. pombe* constituye casi un tercio de la pared (28 %) (Magnelli *et al.*, 2005) y es un polímero importante en la morfogénesis celular ya que existen mutantes con menor contenido de α -glucano que adquieren forma redonda (Grun *et al.*, 2005). Al igual que el β -glucano, el α -glucano desempeña una importante función en la generación de estructuras fibrilares, puesto que mutantes defectuosos en la biosíntesis del α -glucano son incapaces de desarrollar los haces de glucano durante la regeneración de protoplastos, aunque sí llegan a formar fibrillas (Horisberger y Rouvet-Vauthey, 1985; Konomi *et al.*, 2003).

La enzima responsable de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular se denomina α -glucán sintasa (α GS). Se han identificado varios genes en *S. pombe* que codifican posibles subunidades catalíticas de la α -glucán sintasa (α GS), denominados *mok1*⁺, *mok11*⁺, *mok12*⁺, *mok13*⁺ y *mok14*⁺. De todos ellos, solo *mok1*⁺ es esencial en crecimiento vegetativo. *mok11*⁺, *mok12*⁺, *mok13*⁺ y *mok14*⁺ no son esenciales pero están implicados en el proceso de esporulación, concretamente durante la maduración de las esporas (García *et al.*, 2006a). La proteína Mok1 es una proteína integral de membrana de 272 kDa y 2.410 aminoácidos. Mok1 se localiza en los polos de crecimiento y en el septo de una forma dependiente de actina (Katayama *et al.*, 1999; Konomi *et al.*, 2003). El α -glucano sintetizado por Mok1 es esencial para la integridad de la pared celular durante el crecimiento. Durante la septación interviene en la síntesis del septo secundario y la correcta formación del septo primario, confiriéndole la rigidez necesaria para soportar la presión de turgencia durante la separación celular (Cortés *et al.*, 2012). La GTPasa Rho2 y la quinasa Pck2 participan en la regulación y localización de Mok1 en los polos celulares (Calonge *et al.*, 2000; Durán y Pérez, 2004; Katayama *et al.*, 1999). Rho2 regula la biosíntesis del α -glucano exclusivamente a través de Pck2, a diferencia de Rho1 que regula la biosíntesis del β -glucano de manera dual, directamente y a través de Pck2 y Pck1 (Arellano *et al.*, 1999; Calonge *et al.*, 2000; Sayers *et al.*, 2000). Rho1 también regula la biosíntesis del α -glucano ya que la sobreexpresión

de esta GTPasa causa un aumento general de la pared (Arellano *et al.*, 1996). Sin embargo no se sabe nada sobre cómo ejerce esta regulación.

GALACTOMANANO

El galactomanano de la pared de *S. pombe* representa del 9 al 14 % del total de los azúcares de la pared celular. El galactomanano constituye el componente glucídico de las glicoproteínas de la pared. Está formado por un núcleo central de residuos de manosa unidos por enlaces α -(1,6) y con cadenas laterales de manosa con enlaces α -(1,2) terminadas por un resto de galactosa en los extremos no reductores (Bush *et al.*, 1974; Horisberger *et al.*, 1978; Magnelli *et al.*, 2005). También se ha encontrado una pequeña cantidad de galactosa situada en posición no terminal (Horisberger y Vonlanthen, 1977). La glicosilación de las proteínas de la pared celular se produce en el retículo endoplásmico (RE) y en el Aparato de Golgi. En el RE se añaden los polisacáridos de manosa, cadenas cortas unidas a residuos de serina o treonina mediante enlaces O-glicosídicos o cadenas más largas que se unen a residuos de asparragina mediante enlaces N-glicosídicos. La adición de galactosa y la modificación de las cadenas de manosa se producen posteriormente en el Aparato de Golgi (Gemmill y Trimble, 2004). Después, las glicoproteínas de la pared son secretadas y permanecen unidas a la membrana mediante grupos GPI o forman enlaces con la matriz de glucanos de la pared celular (Gemmill y Trimble, 2004). Los estudios con lectinas han permitido localizar el galactomanano en la superficie más externa y en las proximidades de la membrana plasmática (Horisberger y Rouvet-Vauthey, 1985).

Remodelación de la pared celular: glucanosil-transferasas, α y β glucanasas

La pared celular es una estructura muy dinámica ya que para que tenga lugar un correcto crecimiento celular se tiene que producir continuamente nueva síntesis y degradación de los componentes de la pared. Además, una vez sintetizados los polímeros, éstos deben unirse entre sí para aumentar la rigidez y cohesión de la pared. En este proceso de remodelación de la pared intervienen, entre otras, las proteínas Gas. Son proteínas modulares que poseen un dominio catalítico GluTD (Glucanosyl-Transferase Domain) y tienen actividad glucosiltransferasa implicada en la remodelación del β -glucano (Popolo y Vai, 1999). En *S. pombe* existen 4 genes denominados *gas1⁺*, *gas2⁺*, *gas4⁺* y *gas5⁺* que codifican este tipo de proteínas. Las proteínas Gas intervienen en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento vegetativo, en la maduración de la pared de la ascospora y en su viabilidad (de Medina-Redondo *et al.*, 2010; de Medina-Redondo *et al.*, 2008).

Respecto a las enzimas que participan en la degradación de la pared, en la levadura de fisión se han identificado dos tipos de actividades glucanásicas: una actividad endo- α -glucanasa llevada a cabo por las proteínas Agn1 y Agn2 y una actividad endo- β -glucanasa llevada a cabo por las proteínas Eng1 y Eng2. Agn1 es la glucanasa responsable de la digestión del α -glucano de la pared lateral necesaria para la separación de las células hijas al final de la división celular (Alonso-Nuñez *et al.*, 2005; Dekker *et al.*, 2004; García *et al.*, 2005) y Agn2 es necesaria para que las ascosporas se liberen del asca y se diseminen libremente (Dekker *et al.*, 2004; Dekker *et al.*,

2007). Por otro lado, Eng1 y Eng2 son endo- β -(1,3)-glucanasas que hidrolizan exclusivamente β -(1,3)-glucano lineal. Eng1 participa en la separación celular, degradando el septo primario, que contiene mayoritariamente este polímero (Martín-Cuadrado *et al.*, 2003; Martín-Cuadrado *et al.*, 2008; Martín-Cuadrado *et al.*, 2005). También se ha descrito que Eng2, junto con Agn2, está implicada en la degradación de la pared del asca, favoreciendo la liberación de las esporas (Encinar del Dedo *et al.*, 2009).

Reproducción sexual y conjugación en *S. pombe*

Las células de *S. pombe* en ausencia de nutrientes, especialmente en ausencia de nitrógeno, pueden llevar a cabo la reproducción sexual. Para ello, las células detienen la progresión del ciclo celular en la fase G1 y tiene lugar la conjugación entre células de tipo sexual opuesto. Así, dos células haploides h^- y h^+ se fusionan para formar un cigoto diploide. La conjugación es controlada por el intercambio recíproco de feromonas, que son péptidos específicos de cada tipo sexual, liberados al medio, y que inducen cambios morfológicos en células del tipo sexual opuesto (Figura 10).

El tipo sexual en *S. pombe* está determinado por la información contenida en el locus *mat1*⁺ (Kelly *et al.*, 1988). Las células haploides que posean el segmento *mat1-P*, que contiene los genes *mat1-Pc* y *mat1-Pi*, son de tipo sexual más (h^+ , P o plus), y aquéllas que contengan el segmento

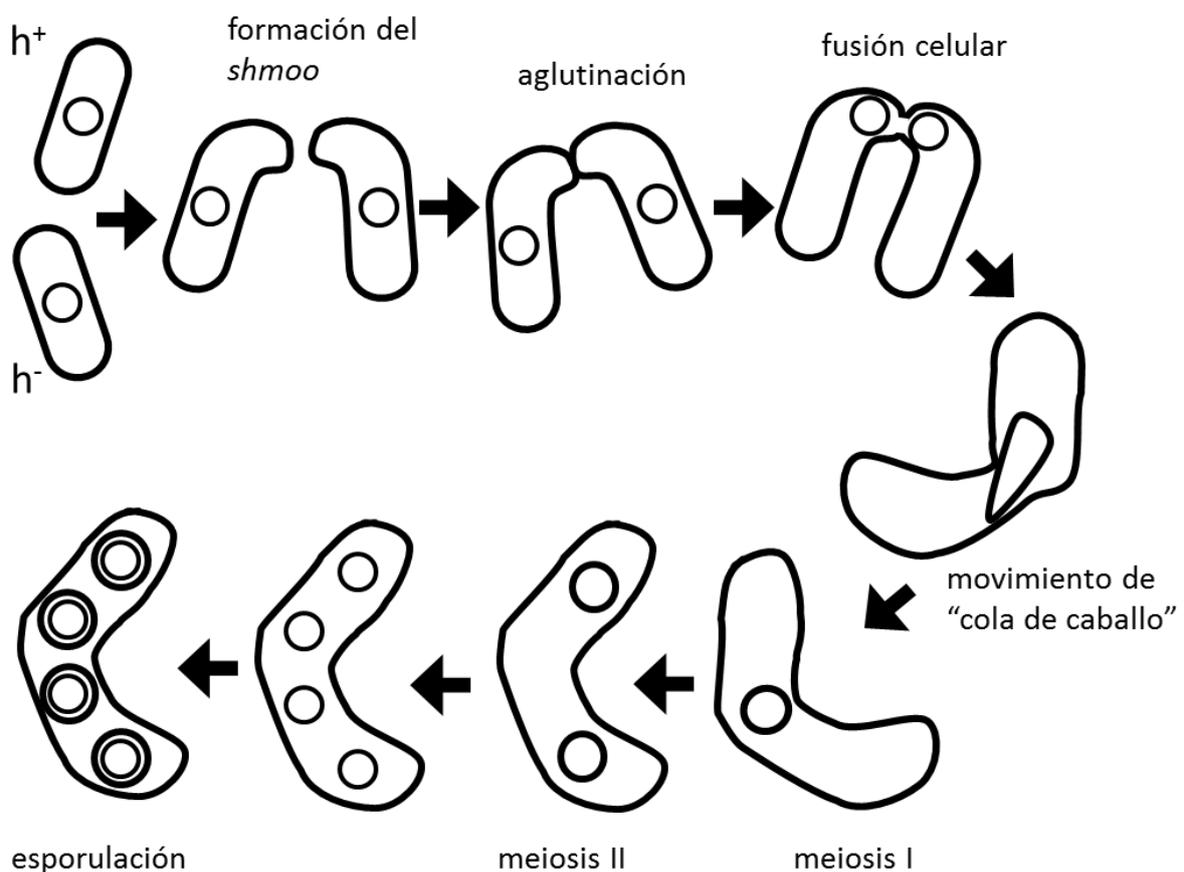


Figura 10. Pasos de la conjugación. Figura adaptada de Qin *et al.*, 2003.

mat1-M, que codifica los genes *mat1-Mc* y *mat1-Mi*, son de tipo sexual menos (h⁻, M o *minus*). *Mat1-Pc* y *Mat1-Mc* son necesarios para la expresión de las feromonas y sus receptores y, por lo tanto, para establecer el sistema de comunicación de feromonas. Los cuatro genes *mat1⁺* son necesarios para la meiosis (Willer *et al.*, 1995). Hay otros dos *loci* de conjugación, *mat2⁺* y *mat3⁺*, donde la información de los tipos sexuales P y M se almacena pero no se expresa (Allshire, 1995). En las cepas homotálicas, la información de *mat2⁺* y *mat3⁺* se transfiere al locus *mat1⁺* y las células cambian el tipo sexual aproximadamente una vez cada tres generaciones.

Para que la diferenciación sexual tenga lugar, tiene que producirse la regulación de manera ordenada de muchos genes. *Ste11* es un factor de transcripción que regula un gran número de genes que son necesarios para el proceso de conjugación y de meiosis. Los genes diana de *Ste11* identificados hasta la fecha, como *mei2⁺* y los genes del tipo sexual *mat1-P* y *mat1-M*, poseen antes de su región 5' motivos de diez bases casi idénticos, conocidos como caja TR (Mata y Bahler, 2006; Sugimoto *et al.*, 1991). El propio gen *ste11⁺* tiene una caja TR en su región 5', por lo que *Ste11* parece activar su propia transcripción (Kunitomo *et al.*, 2000). La disrupción de *ste11⁺* causa la completa esterilidad de las células (Sugimoto *et al.*, 1991), lo cual indica que es un factor de transcripción clave para la diferenciación sexual de *S. pombe*.

La función de *Ste11* es reprimida de múltiples maneras durante el crecimiento mitótico. La transcripción de *ste11⁺* se reduce en situaciones de abundancia de nutrientes (Sugimoto *et al.*, 1991). *Ste11* sólo es activa en la fase G1 del ciclo celular, en el resto de las fases del ciclo *Cdk1* fosforila a *Ste11*, lo cual impide su unión al ADN (Kjaerulff *et al.*, 2007). Además, la quinasa *Pat1* fosforila a *Ste11* en células en estado vegetativo (Li y McLeod, 1996). La proteína 14-3-3 *Rad24* se une a la forma fosforilada de *Ste11* e inhibe su acumulación en el núcleo (Kitamura *et al.*, 2001). Como *Ste11* estimula la expresión de su propio gen, esta exclusión nuclear contribuye a mantener reducidos dichos niveles de expresión (Qin *et al.*, 2003). Además *Ste11* está sometida a degradación a través de la ruta del proteasoma durante crecimiento vegetativo (Kitamura *et al.*, 2001; Kjaerulff *et al.*, 2007). Existe también un control negativo de *Ste11* a nivel traduccional por parte de la proteína de unión a ARN *Nrd1* (Oowatari *et al.*, 2011; Tsukahara *et al.*, 1998).

Bajo condiciones nutricionales adversas, en ausencia de nitrógeno, la expresión de *ste11⁺* aumenta de forma dramática (Sugimoto *et al.*, 1991). Este ascenso en la expresión se produce por la cooperación de cuatro rutas de señalización:

- A. LA RUTA DEL AMP CÍCLICO (cAMP). En *S. pombe*, el agotamiento de la fuente de carbono produce un rápido descenso en los niveles intracelulares de cAMP, lo cual conduce a la inactivación de la proteína quinasa dependiente de cAMP, *Pka* (Maeda *et al.*, 1990). El agotamiento de las fuentes de nitrógeno también reduce los niveles de cAMP, pero de una forma más lenta (Isshiki *et al.*, 1992; Mochizuki y Yamamoto, 1992). La inactivación de *Pka* induce la diferenciación sexual a través de *Rst2*, el factor de transcripción de *ste11⁺* y la gluconeogénesis (Hoffman y Winston, 1991; Yamamoto *et al.*, 1997). Además se ha observado que la ruta de *Pka* también inhibe la localización nuclear de *Ste11* (Valbuena y Moreno, 2010).

- B. LA RUTA DE TORC1. Al igual que la ruta del cAMP, la ruta TORC1 estimula el crecimiento vegetativo e inhibe la diferenciación sexual cuando está activa. Esta ruta inhibe la expresión de *ste11⁺* en presencia de nutrientes, especialmente en presencia de nitrógeno (Otsubo y Yamamoto, 2010). La ruta de TORC1, además, regula la localización nuclear de Ste11 mediante la interacción de la quinasa Tor2 con Ste11 (Álvarez y Moreno, 2006; Matsuo *et al.*, 2007; Uritani *et al.*, 2006; Valbuena y Moreno, 2010).
- C. LA RUTA DE MAPK DE RESPUESTA A FEROMONAS. En condiciones de ausencia de nitrógeno, Ste11 activa la transcripción de *mat1-Pc* en las células *h⁺* y de *mat1-Mc* en las células *h⁻*. Los productos de estos genes inducen la expresión de los genes específicos de cada tipo sexual. Los genes específicos del tipo P incluyen *map2⁺*, que codifica la feromona factor P, y *map3⁺*, que codifica el receptor del factor M. Los genes específicos del factor M incluyen *mfm1⁺*, *mfm2⁺* y *mfm3⁺*, que codifican la feromona factor M, y *mam2⁺*, que codifica el receptor del factor P (Davey, 1992; Imai y Yamamoto, 1994; Kitamura y Shimoda, 1991; Kjaerulff *et al.*, 1994; Tanaka *et al.*, 1993). De este modo, en las células *h⁺* se secreta el factor P, que es un péptido sencillo de 23 aminoácidos y en las células *h⁻* se secreta el factor M, que es un péptido de nueve aminoácidos farnesilado y carboximetilado en su extremo C terminal (Davey, 1992; Imai y Yamamoto, 1994). Tras la unión de las feromonas, el correspondiente receptor se acopla a Gpa1, subunidad G α de una proteína G trimérica, y la activa. Gpa1 a su vez activa la cascada de MAPKs (Mitogen-activated protein kinase) que comprende Byr2 (MAPKKK), Byr1 (MAPKK) y Spk1 (MAPK) (Gotoh *et al.*, 1993; Nadin-Davis y Nasim, 1988; Neiman *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1991). En respuesta a las feromonas, la cascada Byr2-Byr1-Spk1 aumenta la expresión de *ste11⁺* y de genes adicionales necesarios para la conjugación y la meiosis (Aono *et al.*, 1994; Kjaerulff *et al.*, 2005; Ozoe *et al.*, 2002; Xue-Franzen *et al.*, 2006). La MAPKKK Byr2 también es estimulada por Ras1, la proteína homóloga en *S. pombe* de la oncoproteína Ras (Fukui *et al.*, 1986; Nadin-Davis y Nasim, 1988; Nadin-Davis *et al.*, 1986; Wang *et al.*, 1991). Ras1 es activada por su GEF Ste6 y a su vez, Ste11 activa la transcripción de *ste6⁺*. Así la señalización mediante feromonas se ve reforzada por un mecanismo de retroalimentación positiva que implica la expresión de *ste11⁺*, la maquinaria encargada de detectar las feromonas y la activación de Ras1 (Hughes *et al.*, 1994).
- D. LA RUTA DE MAPK DE RESPUESTA A ESTRÉS. Sty1 es la MAPK de *S. pombe* homóloga a p38 de mamíferos. Esta MAPK responde a diversos estímulos, incluyendo los choques térmicos, la alta osmolaridad, el estrés oxidativo y el estrés nutricional (Degols *et al.*, 1996; Millar *et al.*, 1995; Shiozaki y Russell, 1995, 1996). Sty1 es esencial para la correcta parada del ciclo celular en G1 y el inicio de la diferenciación sexual en ausencia de nitrógeno (Kano *et al.*, 1996; Shiozaki y Russell, 1996), controlando la expresión de *ste11⁺* (Yamamoto *et al.*, 1997).

Formación del *shmoo* y fusión celular

En *S. pombe* las células continúan creciendo durante la parada de ciclo en G1 inducida por feromonas (Davey, 1991; Davey y Nielsen, 1994). El crecimiento ocurre en el polo de la célula que deja de ser paralelo al eje longitudinal de ésta y se alarga hacia la fuente de feromonas (Fukui *et al.*, 1986; Leupold, 1987). Esta elongación quimiotrópica de la célula en respuesta al gradiente de feromonas conduce a la formación del *shmoo*. La unión y fusión de las células que intervienen en la conjugación ocurre por las puntas de los *shmoos*.

La localización de la F-actina se ve alterada durante el proceso de conjugación. Mientras que su localización es monopolar en una fase G1 normal, cuando la célula es privada de nitrógeno la F-actina adquiere una localización bipolar antes de localizarse nuevamente en el extremo de la célula que se encuentra más próximo a la fuente de feromonas (Petersen *et al.*, 1998a).

Una vez que el crecimiento polarizado de los *shmoos* ha puesto en contacto a las células que van a conjugarse, tiene lugar la aglutinación que prepara a las células para su fusión (Calleja y Johnson, 1971; Egel, 1971; Miyata *et al.*, 1997). La aglutinación ocurre en las proyecciones de los *shmoos* y es, inicialmente, reversible ya que es mediada por puentes de hidrógeno (Calleja *et al.*, 1981), pero pronto se convierte en permanente. Map4 es la aglutinina presente en células P mientras que Mam3 es la aglutinina presente en las células M (Mata y Bahler, 2006; Sharifmoghadam *et al.*, 2006; Sharifmoghadam y Valdivieso, 2008).

La aglutinación es seguida por la disminución en el grosor de la pared celular que se inicia en el centro de la región de contacto y continúa hacia los extremos. La degradación de la pared celular y la posterior fusión de las membranas es un proceso estrechamente coordinado, para evitar comprometer osmóticamente la viabilidad de las células (Reichelt y Fleet, 1981). De acuerdo con esto, Dni1, proteína con cuatro dominios transmembrana parecida a Fig1 de *S. cerevisiae*, presenta un importante papel en la organización de la membrana y en la remodelación de la pared celular durante la conjugación (Clemente-Ramos *et al.*, 2009).

Posteriormente, tiene lugar la fusión celular, que requiere la función de la formina Fus1, que estabiliza la asociación de F-actina con la zona de fusión tras el contacto célula-célula (Bresch *et al.*, 1968; Petersen *et al.*, 1998a; Petersen *et al.*, 1995). En ausencia de Fus1 las células se aglutinan pero la pared celular que separa las células no es degradada y la fusión no tiene lugar (Bresch *et al.*, 1968; Egel, 1973; Petersen *et al.*, 1995). Fus1 se localiza en la punta de los *shmoos* tras la aglutinación (Petersen *et al.*, 1998b). La tropomiosina Cdc8, que estabiliza los filamentos de actina durante el crecimiento vegetativo, también es esencial para la fusión celular durante el proceso de conjugación (Kurahashi *et al.*, 2002). Se han descrito otras proteínas con papeles relevantes durante el proceso de conjugación, como Sec8, perteneciente al complejo del exocisto, o la proteína Cfr1, similar a Chs5 de *S. cerevisiae*, que interviene en el transporte de la proteína Fus1 en esta levadura (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006; Santos y Snyder, 2003; Sharifmoghadam *et al.*, 2010).

Cariogamia y meiosis

Casi inmediatamente después de la fusión citoplasmática ocurre la fusión de los núcleos o cariogamia en el cuello del tubo de conjugación, que se inicia con el acercamiento de los cuerpos polares del huso o SPBs que tiran de los núcleos, provocando que adquieran una peculiar forma de gota, hasta ponerlos en contacto (Calleja *et al.*, 1977; Hirata y Kanata, 1982).

El cigoto diploide resultante de la conjugación de dos células haploides puede ser mantenido si se transfiere inmediatamente a un medio rico en nutrientes pero normalmente los cigotos entran en meiosis tras la conjugación. La síntesis de ADN premeiótica dobla el contenido de ADN del cigoto a 4°C mientras los núcleos fusionados (Robinow, 1977) comienzan a moverse de un extremo de la célula al otro en el llamado movimiento de “cola de caballo”. Este movimiento de agitación, que es dirigido por el SPB y mediado por la dineína a través de los microtúbulos citoplasmáticos (Svoboda *et al.*, 1995), ayuda a la recombinación meiótica y a la segregación de los cromosomas homólogos. Posteriormente, dos divisiones meióticas consecutivas generan cuatro núcleos 1C que son encapsulados y forman las esporas haploides. La germinación de las esporas completa el proceso de reproducción sexual.

Las GTPasas de la familia Rho

La familia de proteínas Rho se encuentra englobada dentro de la gran superfamilia de proteínas G pequeñas. Las proteínas G pequeñas, también conocidas como proteínas de unión a GTP pequeñas o GTPasas pequeñas, son proteínas esenciales para múltiples procesos, como la proliferación celular, la dinámica del citoesqueleto, el tráfico de membranas y el transporte núcleo-citoplasma. Intervienen en numerosos procesos fisiológicos, incluyendo embriogénesis, establecimiento y mantenimiento de la polaridad, adhesión, migración y diferenciación de numerosos tipos celulares. Dado que su función es imprescindible en la fisiología celular, así como en el desarrollo de tejidos y órganos, no es de extrañar que estas GTPasas pequeñas estén también relacionadas con una gran variedad patologías, que no sólo incluyen la proliferación celular incontrolada, la metástasis y la angiogénesis durante el desarrollo tumoral sino también dolencias que van de la inflamación y enfermedades vasculares hasta el retraso mental o varias infecciones. Por estos motivos, el estudio de estas GTPasas pequeñas se ha convertido en un campo tan amplio de investigación (Williams y Rottner, 2010).

Las proteínas G pequeñas son moléculas de 20 a 40 kDa de masa molecular, presentes sólo en organismos eucariotas y que tienen similitud de función y bioquímica con la subunidad α de las proteínas G heterotriméricas (Hughes, 1983; Wennerberg *et al.*, 2005).

Las proteínas G pequeñas se denominan frecuentemente con el nombre de superfamilia Ras, ya que el miembro fundador de este grupo es el oncogén Ras humano (Parada *et al.*, 1982). Estas proteínas tienen la capacidad de unir nucleótidos de guanina (GDP o GTP) y, además, poseen actividad GTPásica intrínseca, lo que les permite hidrolizar el GTP al que se encuentran

unidas, dando lugar a GDP y fosfato inorgánico. Las GTPasas de la familia de Rho, como casi todos los miembros de la superfamilia de Ras, se comportan como interruptores moleculares, fluctúan entre los estados activo e inactivo que dependen de la conformación de la GTPasa al unir GTP o GDP, respectivamente.

Dentro de la superfamilia Ras se distinguen 5 familias de proteínas, agrupadas por similitudes de secuencia y funcionales:

- Ras (Rat sarcoma). Este grupo de proteínas participa en funciones importantes para la proliferación celular y su alteración puede conducir a la oncogénesis. Muchas de las proteínas pertenecientes a este grupo actúan como nodos en los que confluyen diversas señales extracelulares. En su estado activo, Ras interacciona con múltiples proteínas diana que poseen actividades catalíticas muy variadas, muchas de ellas relacionadas con el control de la expresión de genes que participan en la proliferación, la diferenciación o la supervivencia celulares (Wennerberg *et al.*, 2005).
- Rho (Ras homologous). Estas proteínas son importantes reguladores de las cascadas de señalización que afectan a la organización del citoesqueleto de actina, al tráfico de membranas, a la progresión del ciclo celular y a la expresión génica. Debido a la enorme variedad de procesos en los que participan, cada una de las proteínas Rho es regulada por un gran número de factores e interaccionan con un grupo diverso de proteínas efectoras (Wennerberg *et al.*, 2005). Dentro de esta familia, los miembros más estudiados han sido RhoA, implicada en la formación de fibras de estrés de actina y en el ensamblaje de focos de adhesión, Rac1, que estimula la formación de lamelipodios y el “*ruffling*” de la membrana, y Cdc42, que activa la formación de filopodios. Este tipo de observaciones ha permitido implicar a estas proteínas en el establecimiento de la polaridad, la motilidad celular y las interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular.
- Rab (Ras-like proteins in brain). Se describieron por primera vez en cerebro y constituyen el grupo más numeroso dentro de la superfamilia Ras. Realizan funciones relacionadas con el transporte vesicular dentro de la célula y el tráfico de proteínas entre diferentes orgánulos de las rutas endocítica y secretora.
- Ran (Ras-like nuclear proteins). Esta familia está constituida por un solo representante en humanos, aunque es la más abundante. Está implicada en la regulación del intercambio de proteínas y ARN entre el núcleo y el citoplasma.
- Arf (ADP ribosylation factor). Esta familia, como la familia Rab, regula el transporte intracelular de vesículas. El miembro más conocido es Arf1, que dirige la formación del revestimiento de coatómero de las vesículas en distintos pasos de las vías endocítica y exocítica.

Modificaciones postraduccionales de las proteínas Rho

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

- Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-X, siendo A un aminoácido alifático y X un aminoácido cualquiera, se produce la incorporación de un grupo farnesilo en la cisteína por la enzima farnesiltransferasa I, posteriormente se produce la proteólisis del grupo A-A-X y la carboximetilación de la cisteína (Wennerberg *et al.*, 2005).
- Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-Leu, la cisteína es geranilgeranilada por la geranilgeraniltransferasa I y posteriormente carboximetilada tras la proteólisis de los tres últimos aminoácidos (Wennerberg *et al.*, 2005).
- Si el extremo C-terminal es Cys-X-Cys o Cys-Cys, las dos cisteínas son geranilgeraniladas por la geranilgeraniltransferasa II. Esta modificación sucede en la subfamilia de las proteínas Rab (Wennerberg *et al.*, 2005).

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

Regulación de las proteínas Rho

Las proteínas Rho muestran una alta afinidad por la unión a GDP o GTP pero poseen una baja actividad GTPásica intrínseca e intercambian el GDP por GTP de manera poco eficiente. Por ello para que las GTPasas realicen sus funciones de manera adecuada es necesaria la existencia de un gran número de proteínas que regulen el ciclo GDP/GTP (Wennerberg *et al.*, 2005). Existen tres clases de proteínas reguladoras de las proteínas Rho:

LAS PROTEÍNAS GEF (GUANINE NUCLEOTIDE EXCHANGE FACTOR)

Son proteínas que al interactuar con las GTPasas provocan un cambio conformacional que favorece la unión del GTP (**Figura 11**). 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 y Wittinghofer, 2001). El sitio de unión de nucleótidos de guanina se sitúa entre las regiones denominadas *switch* I y *switch* II de las proteínas Rho. Estas regiones, junto con el *P-loop* (región de unión al fosfato), 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 y Wittinghofer, 2001). La unión del GEF a la proteína Rho induce cambios conformacionales

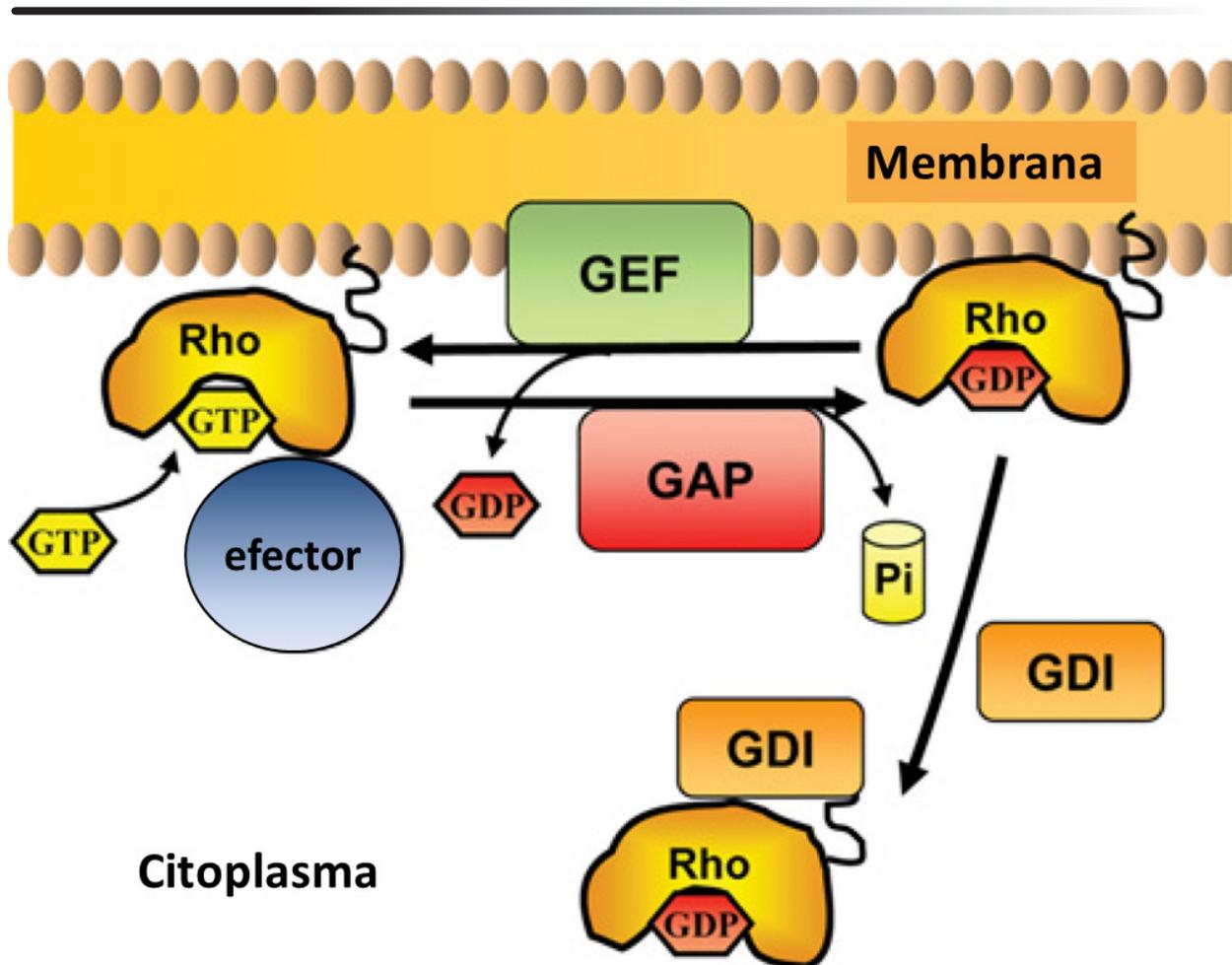


Figura 11. Regulación de las GTPasas Rho. Figura adaptada de Pérez y Rincón, 2010.

en las regiones *switch* y en el *P-loop* que bloquean el sitio de unión al magnesio. Esto hace que la interacción con los fosfatos se debilite y facilita que se libere el nucleótido permitiendo la entrada de otro nucleótido nuevo. En general, las proteínas Rho presentan una afinidad similar por el GDP y el GTP, y las proteínas GEF no favorecen la unión de uno o de otro. La unión del GTP se produce porque la concentración de este nucleótido en la célula es aproximadamente diez veces superior a la de GDP. Las proteínas GEF desplazan al nucleótido unido y posteriormente el nuevo nucleótido desplaza a las proteínas GEF (Bos *et al.*, 2007).

LAS PROTEÍNAS GDI (GDP DISSOCIATION INHIBITOR)

Son proteínas que inhiben la disociación del nucleótido GDP y tienden a mantener a la GTPasa en estado inactivo (Figura 11). Se unen a la GTPasa y enmascaran el grupo prenilo de la proteína G impidiendo que se ancle a la membrana e interaccione con proteínas GEF. Así, la proteína Rho permanece inactiva en el citosol (Wennerberg *et al.*, 2005). Estos reguladores negativos sólo actúan sobre proteínas de la familia Rho y Rab.

LAS PROTEÍNAS GAP (GTPASE ACTIVATING PROTEIN)

Son proteínas que promueven la actividad GTPásica intrínseca de la proteína G. Favorecen la hidrólisis del GTP a GDP provocando que la GTPasa se encuentre en estado inactivo (Figura 11).

Aunque las proteínas G son denominadas GTPasas, la reacción de hidrólisis del GTP es poco

eficiente y necesitan la interacción con una GAP que acelere dicha reacción varios órdenes de magnitud. Gracias a estudios estructurales y biofísicos se ha podido esclarecer el mecanismo de la reacción de catálisis de las proteínas con actividad GAP en la hidrólisis de GTP. Se ha observado una molécula de agua correctamente posicionada frente al fosfato y el GTP en la estructura cristalográfica del complejo Ras unido al análogo no hidrolizable del GTP GppNHp. Esta molécula de agua realiza un ataque nucleofílico al fosfato 3 del GTP que se transforma en GDP más fosfato inorgánico. La función de la proteína con actividad GAP en esta reacción es permitir la correcta orientación de la molécula de agua y estabilizar el estado de transición (Bos *et al.*, 2007). Las proteínas con actividad GAP para las diferentes proteínas G no están conservadas y aumentan la actividad GTPásica intrínseca de distintas maneras (Bos *et al.*, 2007). Las GAPs de las GTPasas Rho se definen por la presencia del dominio RhoGAP altamente conservado. Este dominio consta de unos 150 aminoácidos que forman nueve hélices α y contiene un residuo de Arginina altamente conservado. El dominio RhoGAP es diferente al módulo GAP de otros reguladores negativos para las GTPasas Ras, Ran o ARF (Moon y Zheng, 2003).

En general, existen más GEFs y GAPs que proteínas G a las que regulan. Una misma GTPasa puede ser regulada por varios GEFs y GAPs, lo que permite una gran especificidad en el control de las distintas rutas de señalización de las proteínas G. GEFs y GAPs suelen presentar varios dominios de interacción con proteínas o con lípidos que funcionan como señales de localización o de andamiaje para la formación de complejos proteicos y contribuyen, por tanto, a la regulación espacial y temporal de las GTPasas. Asimismo, los fosfoinosítidos y sus proteínas reguladoras se han asociado con la regulación de las GTPasas Rho y la polaridad celular (Shewan *et al.*, 2011). De hecho, algunos lípidos cargados negativamente, como el PtdIns(4,5) P_2 , PtdIns(3,4,5) P_3 y la fosfatidilserina, podrían actuar como plataformas de interacción electrostática para muchas proteínas con regiones cargadas positivamente (Goldenberg y Steinberg, 2010; Yeung *et al.*, 2008).

Funciones de las GTPasas Rho

Las GTPasas de la familia Rho realizan su función reguladora cuando se encuentran en estado activo a través de la interacción con sus proteínas diana o efectoras. Entre las proteínas efectoras descritas en diferentes sistemas se incluyen serina/treonina quininas, tirosina quininas, quininas de lípidos, lipinas, oxidasas y proteínas adaptadoras (Jaffe y Hall, 2005). El estudio estructural de estas proteínas efectoras indica que se encuentran en una conformación inactiva y que son activadas mediante la unión a la GTPasa (Bishop y Hall, 2000).

Entre las funciones descritas para las GTPasas Rho se hallan el ensamblaje de filamentos contráctiles de actomiosina y de lamelipodios y filopodios ricos en actina, mediante el control de la formación y la organización de filamentos de actina (Etienne-Manneville y Hall, 2002). También ejercen control sobre la dinámica de los microtúbulos, la unión de proteínas a los extremos (+) de los microtúbulos, la transducción de señales que conducen a cambios en la expresión génica y la regulación de actividades enzimáticas (Jaffe y Hall, 2005). Asimismo se han descrito funciones

de miembros de la familia relacionadas con la progresión a través del ciclo celular, la mitosis y la citocinesis. También regulan procesos de polaridad celular mediante el control del tráfico intracelular y la secreción polarizada, así como procesos de endocitosis.

Otros procesos más complejos como la migración celular, mediante el control del movimiento y de la percepción espacial de los estímulos, también son regulados por las GTPasas de la familia Rho (Jaffe y Hall, 2005).

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

Como en otros organismos eucariotas, muchos de los procesos morfogenéticos que tienen lugar en el ciclo de vida de *S. pombe* están regulados por GTPasas de la familia Rho. La publicación del genoma de *S. pombe* desveló la existencia de 6 miembros de la familia de GTPasas Rho en esta levadura, llamadas Rho1 a Rho5 y Cdc42, que muestran entre un 59% y un 91% de similitud entre ellas. Tan sólo Rho1 y Cdc42 son esenciales, tal y como ocurre con sus homólogos en *S. cerevisiae*. A continuación describiremos brevemente las GTPasas Rho1 a Rho5 y de forma más extensa Cdc42, objeto de estudio de este trabajo.

RHO1

Rho1 es la GTPasa fundamental en la regulación de la biosíntesis de la pared celular y por esto su eliminación es letal. *rho1⁺* fue aislado utilizando ADNc de RhoA como sonda frente a una genoteca de ADNc de *S. pombe* (Nakano y Mabuchi, 1995). SpRho1 muestra un 73% y un 67% de identidad frente a Rho1 de *S. cerevisiae* y RhoA de *Homo sapiens* respectivamente (Nakano y Mabuchi, 1995).

Rho1 se localiza en las zonas de crecimiento y en el septo, donde activa la síntesis de pared (Arellano *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997). Mediante experimentos realizados en cepas de *S. pombe* que tienen el crecimiento polarizado alterado, se ha demostrado que Rho1 funciona una vez que se ha definido el área de crecimiento, ya que su localización depende de los marcadores de polaridad Tea1 y Tea2 (Arellano *et al.*, 1997).

Al igual que en *S. cerevisiae*, en *S. pombe* Rho1 activa directamente a la enzima β -(1,3)-glucán sintasa (Arellano *et al.*, 1996). Las células que sobreexpresan *rho1⁺* poseen una pared celular más gruesa y cuando se elimina la expresión de *rho1⁺*, disminuye la actividad β -(1,3)-glucán sintasa, y las células se lisan (Arellano *et al.*, 1997). Además de su papel central en la biosíntesis de la pared celular, Rho1 puede estar implicada en el control de otros procesos morfogenéticos ya que su sobreexpresión produce una pérdida de la polaridad en la actina. La sobreexpresión del alelo *rho1-G15V*, que codifica la proteína constitutivamente activa, provoca la aparición de acúmulos de actina y la eliminación de la expresión de *rho1⁺* hace que desaparezca la actina cortical (Arellano *et al.*, 1997). Se han descrito otras dos proteínas diana de Rho1 en *S. pombe*, las proteínas quinasas C, Pck1 y Pck2 (Mazzei *et al.*, 1993; Toda *et al.*, 1993). La delección de cualquiera de los genes *pck1⁺* o *pck2⁺* no es letal, pero sí lo es la doble delección, lo que indica que comparten una función esencial (Toda *et al.*, 1993). Las células *pck1 Δ* presentan un leve fenotipo de lisis y la falta de Pck2

da lugar a células con menos pared celular (Arellano *et al.*, 1999; Shiozaki y Russell, 1995; Toda *et al.*, 1996). Rho1 activa la síntesis de pared celular directamente a través de las β -(1,3)-glucán sintasas e indirectamente a través de Pck1 y Pck2. Respecto a la regulación de Rho1, en *S. pombe* se han identificado 3 GEFs (Rgf1, Rgf2 y Rgf3) y 3 GAPs (Rga1, Rga5 y Rga8) que regulan positiva y negativamente a Rho1. Rgf1 activa la síntesis de pared celular y está implicada en NETO (García *et al.*, 2006b). Rgf2 es esencial en esporulación y coopera con Rgf1 en la regulación de la biosíntesis de la pared (García *et al.*, 2009). Rgf3 activa a Rho1 específicamente durante la citocinesis (Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004). Rga1 es el principal regulador negativo de Rho1. La carencia de Rga1 conduce a la formación de células morfológicamente aberrantes y con grandes acúmulos de pared celular (Nakano *et al.*, 2001). Rga5 tiene funciones en integridad celular y en citocinesis (Calonge *et al.*, 2003). Rga8 también regula negativamente a Rho1, y es fosforilada por Shk1, una proteína efectora de Cdc42, sugiriendo que existe una regulación antagónica entre estas GTPasas (Yang *et al.*, 2003).

La proteína Pxl1, que tiene un papel en la formación y contracción del anillo de actomiosina, modula también la actividad de Rho1 (Pinar *et al.*, 2008).

Rdi1, el único GDI de proteínas Rho en *S. pombe*, se une a Rho1, Rho4 y Cdc42, aunque se desconoce el proceso celular en el que participa (Nakano *et al.*, 2003) y si regula negativamente a estas GTPasas.

RHO2

Al igual que Rho1, Rho2 regula la biosíntesis de la pared celular (Hirata *et al.*, 1998). La delección del gen no es letal, pero conduce a alteraciones en la pared celular. Su sobreexpresión provoca un aumento en la cantidad de α -glucano de la pared celular (Calonge *et al.*, 2000). Se ha propuesto que aunque las funciones de Rho1 y Rho2 son diferentes, debe existir un solapamiento parcial, ya que, aunque la sobreexpresión de *rho2*⁺ no rescata la letalidad de la delección de Rho1, la sobreexpresión de *rho1*⁺ rescata parcialmente la sensibilidad de la cepa *rho2* Δ a aculeacina A (Hirata *et al.*, 1998). La síntesis del α -glucano durante el crecimiento vegetativo es llevada a cabo por Mok1 (Katayama *et al.*, 1999). La activación y localización de esta enzima es regulada por Rho2 a través de Pck2. La falta de Mok1 es letal; sin embargo, las cepas *rho2* Δ o *pck2* Δ son viables, lo que sugiere que debe existir otro activador de Mok1 (Calonge *et al.*, 2000). Rho2, a través de Pck2 activa también la ruta de MAPK formada por Mkh1- Pek1/Skh1- Spm1/Pmk1 (Loewith *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2006; Sengar *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997) y la falta de señal de esta ruta produce células encadenadas, lo que sugiere que esta vía participa en citocinesis. Pck1 también interacciona con Rho2 *in vitro*, pero se desconoce su papel *in vivo*. Esto sugiere que Pck1 y Pck2 regulan la integridad celular por vías diferentes (Arellano *et al.*, 1999; Ma *et al.*, 2006; Pérez y Calonge, 2002). Se han descrito tres proteínas GAP reguladoras de Rho2: Rga2, Rga4 y Rga7 (Soto *et al.*, 2010; Villar-Tajadura *et al.*, 2008).

RHO3

Rho3 no es esencial a temperatura ambiente, pero a 37°C las células carentes de Rho3 mueren presentando morfología aberrante y en algunos casos aparecen células multitabicadas.

En estas células los parches de actina están deslocalizados. La delección de *rho3⁺* es rescatada por la sobreexpresión de Rho3 de *S. cerevisiae*, pero no por la sobreexpresión de ninguna proteína de la familia Rho de *S. pombe*. Esto sugiere que Rho3 realiza una función exclusiva, compartida con Rho3 de *S. cerevisiae*. Rho3 se localiza en la membrana y está concentrada en las regiones de crecimiento y de división (Nakano *et al.*, 2002).

Rho3 se aisló como supresor multicopia de la estirpe mutante termosensible del exocisto *sec8-1* (Wang *et al.*, 2003) y existe interacción genética de *rho3Δ* con las cepas mutantes *sec8-1* y *exo70Δ*. Además, la cepa *rho3Δ* acumula vesículas a 37°C y muestra una secreción de fosfatasa ácida reducida (Wang *et al.*, 2003). Por ello, se ha propuesto que Rho3 es un modulador de la función del exocisto. Al igual que ocurre en *S. cerevisiae*, en *S. pombe* se ha descrito que las versiones constitutivamente activas de Rho3 y Cdc42 se unen a la formina For3 (Nakano *et al.*, 2002), aunque hasta ahora no se ha demostrado que Rho3 participe en su activación. Además, se ha sugerido que Rho3 podría regular a la miosina de tipo V, Myo52 (Nakano *et al.*, 2002). Todos estos datos sugieren que Rho3 en *S. pombe* funciona coordinando procesos necesarios para la secreción polarizada.

Recientemente se ha descrito un nuevo papel de Rho3 en la regulación del tráfico del Aparato de Golgi a endosomas, donde Rho3 coordinaría el tráfico de membranas interaccionando con la clatrina del complejo adaptador AP-1 (Kita *et al.*, 2011).

RHO4

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

RHO5

Rho5 es una proteína muy similar a Rho1 (86% de identidad). De hecho, su sobreexpresión rescata la letalidad de la delección de Rho1, lo que sugiere que, en estas condiciones, puede llegar a realizar las funciones de Rho1 (Nakano *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2006). Se ha demostrado que Rho5 se expresa en fase estacionaria, en condiciones de falta de nutrientes y en los procesos de reproducción sexual, lo que sugiere que Rho5 realiza funciones en estas condiciones (Rincón *et al.*, 2006). De hecho, la cepa con la GTPasa Rho5 constitutivamente inactiva, *rho5-T20N*, produce esporas inviables, mientras que las esporas de la cepa con Rho5 constitutivamente activa, *rho5-G15V*, poseen una morfología aberrante y una menor viabilidad. Esto implica a Rho5 en el proceso de esporulación (Rincón *et al.*, 2006).

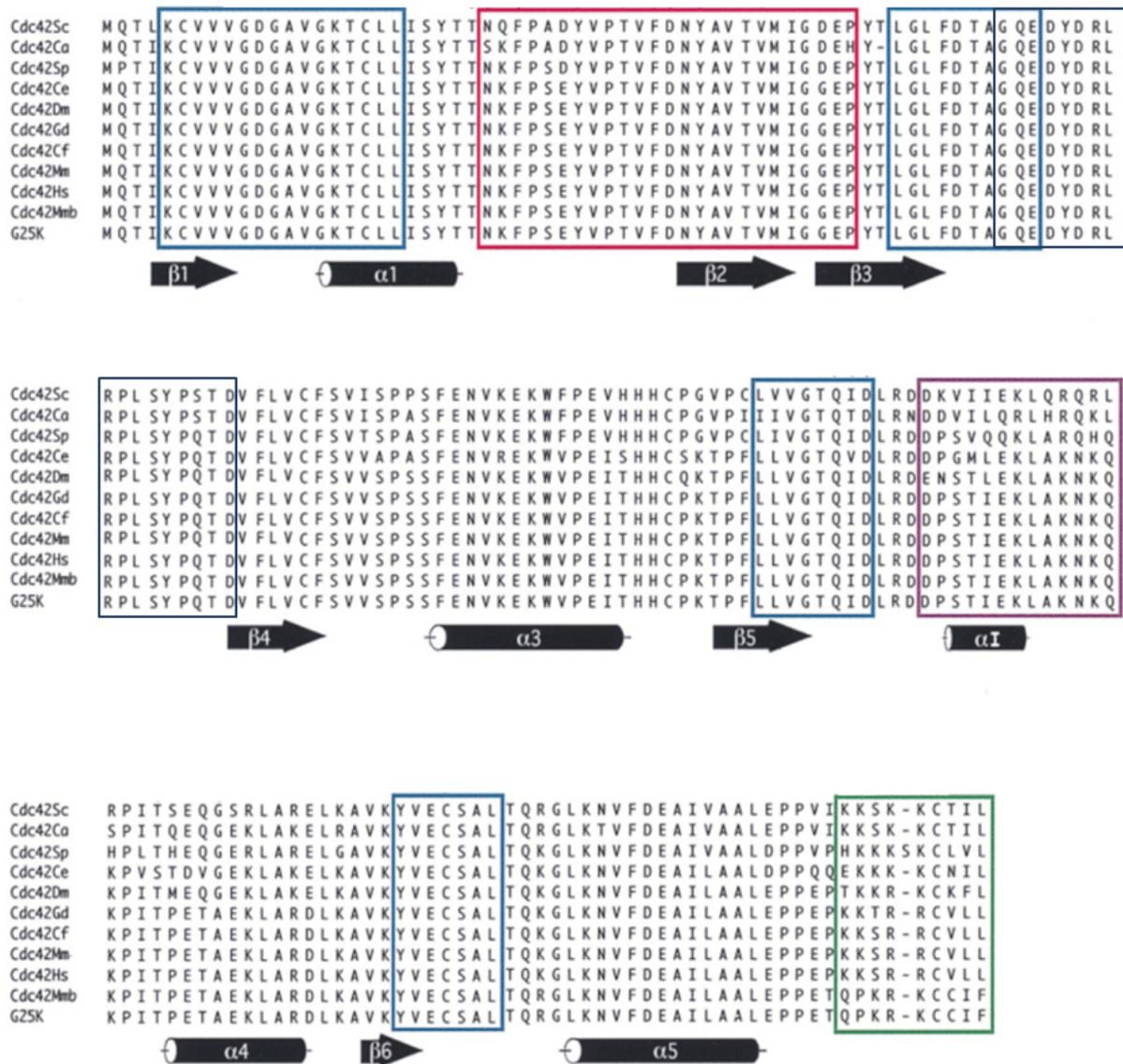


Figura 12. Comparación de la secuencia de aminoácidos de Cdc42 en diferentes organismos. Los dominios aparecen encuadrados: Azul, dominios de unión e hidrólisis de GTP; rosa, dominio *switch* I; negro, dominio *switch* II; morado, dominio *Rho insert*; verde, dominio de unión a membrana. Imagen adaptada de Johnson, 1999.

Cdc42

Cdc42 es la GTPasa Rho implicada en el establecimiento del crecimiento polarizado. Cdc42 se identificó por primera vez en una cepa termosensible de *S. cerevisiae*, que portaba la mutación *cdc42-1*. Esta cepa, a 37°C, tenía bloqueada la formación de yemas pero el crecimiento celular y la división nuclear no estaban bloqueados, lo que daba como resultado células grandes, multinucleadas y sin yemas (Adams *et al.*, 1990). Además, las células presentaban el citoesqueleto de actina desorganizado y la quitina uniformemente distribuida por la pared. Con estos datos, se implicó a Cdc42 en la organización de actina y se descartó un papel en la incorporación de nuevo material de pared. Poco después, se comprobó que *CDC42* es un gen esencial para la

viabilidad celular (Johnson y Pringle, 1990). Posteriormente, se identificó Cdc42 en cerebro de oveja y en placenta humana. En la especie humana existen 2 isoformas de Cdc42: HsCdc42 y G25K, presente sólo en cerebro. Ambas proteínas son productos del mismo gen, obtenidos por procesamiento alternativo de los transcritos (Munemitsu *et al.*, 1990). Las proteínas Cdc42 están muy conservadas en los distintos organismos eucariotas, llegando a existir un 75% de identidad entre Cdc42 de las levaduras y de *Homo sapiens* (Figura 12) (Johnson, 1999).

El estudio de la estructura cristalográfica de Cdc42 humano, junto con la información obtenida de las mutaciones caracterizadas en diversos organismos ha permitido

definir los dominios funcionales de la proteína, ayudando a entender el funcionamiento de las interacciones de Cdc42 con sus múltiples reguladores y efectores. La estructura de los cuatro dominios implicados en la unión e hidrólisis del GTP (aminoácidos 5-20, 53-62, 111-118 y 154-160) es similar a la encontrada en la estructura cristalográfica de Ras y Rac, poniendo de manifiesto que la estructura y función de las diferentes GTPasas está conservada.

Los cuatro dominios que caracterizan la estructura tridimensional de Cdc42 son el dominio *switch I*, el dominio *switch II*, el dominio *Rho insert* y el dominio de localización a membrana. El dominio *switch I* (residuos 26-50) junto con el dominio *switch II* (residuos 60-76) son las regiones de las GTPasas que más cambian de conformación al unirse a los diferentes nucleótidos de guanina, por lo que múltiples factores interaccionan con estas regiones. Aparte de estos cuatro dominios, existe una región denominada *switch III* que también sufre un importante cambio conformacional cuando la proteína se activa (Figura 13) (Feltham *et al.*, 1997).

Uno de los dominios más importantes por su función es el dominio efector o *switch I*, que abarca gran parte de una de las caras de la molécula. La extensión de este dominio explicaría cómo pueden unirse a la vez a Cdc42 diferentes efectores y reguladores, mediante su unión a diferentes subdominios de *switch I* (Johnson, 1999). Así, el dominio CRIB (Cdc42/Rac interactive binding), que se encuentra en algunas proteínas efectoras de Cdc42, como la familia de proteínas quinasas PAK (p21-Activated Kinase) y la proteína WASP (Wiscott-Aldrich Syndrome Protein), se

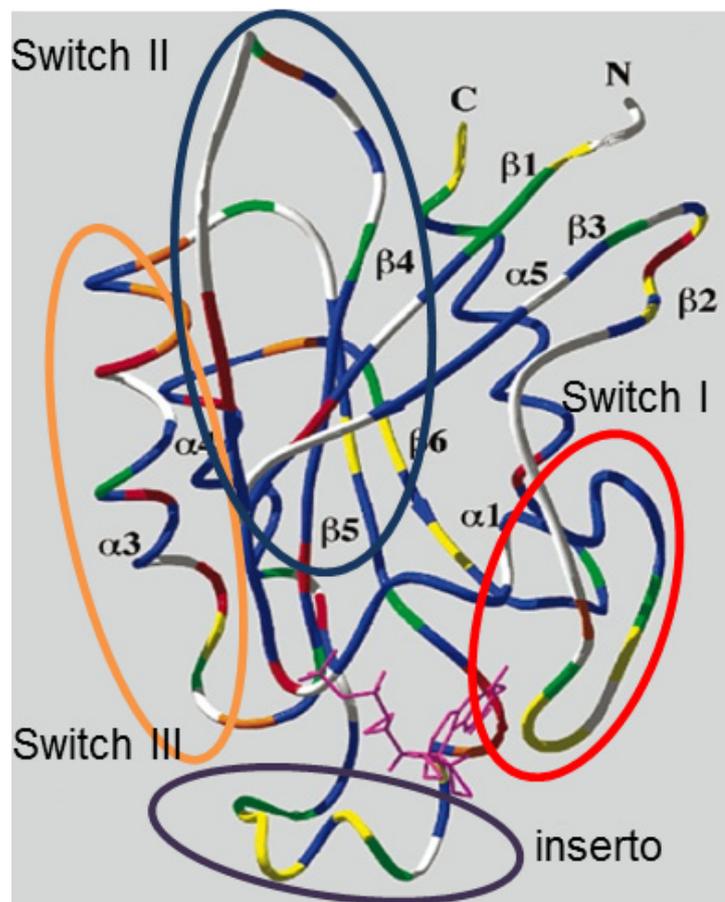


Figura 13. Representación tridimensional de HsCdc42 unido a GDP. Imagen adaptada de Feltham *et al.*, 1997.

une a la lámina $\beta 2$ del dominio *switch I* (Tan *et al.*, 1993).

El dominio *Rho insert* diferencia a las GTPasas de la familia Rho del resto de GTPasas de la superfamilia Ras. Consta de 13 aminoácidos que forman una hélice α y está implicado en la interacción de Cdc42 con algunos de sus efectores, como las proteínas IQGAPs (McCallum *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997b) y con los GDIs (Wu *et al.*, 1997b).

La región C-terminal constituye el dominio de localización a membrana. En este dominio se producen las modificaciones postraduccionales de Cdc42. El residuo de cisteína 188 localizado en la región C-terminal es prenilado con un isopreno geranylgeranilo (Finegold *et al.*, 1991). Esta modificación es necesaria para la unión de Cdc42 en la membrana. La prenilación es seguida por una ruptura proteolítica de los tres últimos aminoácidos y la metilación de la cisteína que pasa a ocupar la posición C-terminal.

Cdc42 en *S. cerevisiae*

S. cerevisiae es una levadura que se divide por gemación. Una vez en cada ciclo celular se produce la selección del sitio de gemación, la emergencia de la yema mediante crecimiento apical, el posterior crecimiento isodiamétrico de la yema y, finalmente, la separación celular.

En esta levadura, las células haploides geman de forma axial, mientras que las diploides geman de forma bipolar (Chant, 1999). La GTPasa Bud1/Rsr1, su GEF, Bud5, y su GAP, Bud2 son los elementos clave que conectan Cdc42 con el sitio elegido para la gemación (Chant, 1996). El paso fundamental en el establecimiento del crecimiento polarizado es la acumulación de Cdc42 activa en el sitio donde se va a producir la gemación. Cdc24 es el único GEF que controla la actividad de Cdc42 (Chang y Peter, 2003). El dominio PH (pleckstrin homology) de Cdc24, que se une a fosfoinosítidos, y la interacción de Cdc24 con otras proteínas, son necesarios para la correcta localización del GEF en el sitio de gemación (Park y Bi, 2007). Durante los estadios tempranos de la fase G1 del ciclo celular, Cdc24 permanece en el núcleo, secuestrado por Far1, impidiendo la activación de Cdc42. La fosforilación de Far1 al final de G1 por el complejo ciclina-Cdc28 de G1, provoca su degradación y la salida de Cdc24 del núcleo (Nern y Arkowitz, 2000; Shimada *et al.*, 2000). La localización de Cdc24 también es regulada mediante su oligomerización, que retrasa su salida del núcleo (Mionnet *et al.*, 2008). La interacción de Bud1/Rsr1 con Cdc24 induce la correcta localización del GEF al sitio seleccionado, lo cual conduce a la activación local de Cdc42.

Cdc42 regula la polimerización del citoesqueleto de actina y dirige la secreción hacia el sitio elegido para la gemación. Cdc24 y Cdc42 activa son capaces de concentrarse en un único punto cortical aleatorio en ausencia de un módulo funcional de Bud1/Rsr1. Esto indica que la acumulación de Cdc24 debe estar controlada por una ruta alternativa. Una posibilidad es que Bem1, una proteína adaptadora capaz de unirse a Cdc24, Cdc42 y a la quinasa Cla4, facilite la interacción de Cdc42 con otras proteínas, permitiendo su concentración cortical. La concentración de Cdc42 en el futuro sitio de gemación es independiente del citoesqueleto de actina, pero la F-actina influye en la distribución dinámica de Cdc42 a través de sus efectos en dos procesos antagónicos: la secreción polarizada y la endocitosis (Irazoqui *et al.*, 2005). La distribución de

Cdc42 es mantenida de manera estable mediante dos mecanismos de reciclaje asociados al ciclo de la GTPasa: un reciclado rápido, mediado por el GDI de Cdc42, Gdi1, y un reciclado lento mediado por la endocitosis (Slaughter *et al.*, 2009). Recientemente se ha descrito que la fosfatidilserina y los procesos asociados al mantenimiento y remodelación de la composición lipídica de la membrana plasmática contribuyen a la correcta localización y regulación de Cdc42 durante el crecimiento polarizado (Das *et al.*, 2012a; Fairn *et al.*, 2011; Saito *et al.*, 2007).

Cdc42 tiene cuatro GAPs en *S. cerevisiae*: Rga1, Rga2 y Bem3, que son específicas de Cdc42, y Bem2 que también es GAP de Rho1. Bem2 contribuye a restringir a un único punto la activación de Cdc42 (Knaus *et al.*, 2007). Rga1, Rga2 y Bem3, que tienen un papel secundario en la regulación del crecimiento polarizado, intervienen en la organización del anillo de septinas (Caviston *et al.*, 2003).

Una vez que Cdc42 se polariza en el futuro sitio de gemación, organiza el citoesqueleto de actina, las septinas y la secreción polarizada para llevar a cabo el crecimiento polarizado. Para controlar todos estos procesos, Cdc42 interactúa con una serie de proteínas efectoras, tales como las PAKs Ste20, Cla4 y Skm1, la formina Bni1, las proteínas Gic, Gic1 y Gic2, y la subunidad del exocisto Sec3.

Cdc42 interactúa con el dominio CRIB de Ste20, liberando a la quinasa de su estado de autoinhibición (Lamson *et al.*, 2002). Cdc42 también regula la localización de Ste20 en los sitios de crecimiento (Leberer *et al.*, 1997; Peter *et al.*, 1996). Ste20 y Cla4 fosforilan y activan las miosinas de tipo I Myo3 y Myo5, que son a su vez activadoras del complejo Arp2/3 que actúa como nucleador de los parches de actina (Lechler *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997a).

Los cables de actina son nucleados por las forminas Bni1 y Bnr1 en *S. cerevisiae*. Bni1 polimeriza los cables de actina desde la punta de la yema, mientras que Bnr1 ensambla los cables de actina hacia el cuello de la yema (Moseley y Goode, 2006). El principal papel de Cdc42 en la organización de los cables de actina es regular su localización polarizada ya que regula la localización de Bni1 (Lechler *et al.*, 2001) y tiene un papel secundario en la activación de las forminas (Dong *et al.*, 2003). Bni1 también es necesaria para que el activador del complejo Arp2/3, Las17/Bee1, se localice en el córtex celular (Lechler *et al.*, 2001), por lo que Cdc42 regula la activación del complejo Arp2/3 a través de Bni1 y de las PAKs.

Los efectores de Cdc42, Gic1 y Gic2, están relacionadas con la organización del citoesqueleto de actina, son importantes en la emergencia de la yema y en la respuesta a feromonas (Brown *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997). También participan en el reclutamiento de las septinas en la zona de la yema (Iwase *et al.*, 2006). La quinasa Cla4 también tiene un papel en la organización de las septinas ya que la cepa *cla4Δ* tiene defectos en el ensamblaje del anillo de septinas y en su posterior reorganización (Cvrckova *et al.*, 1995; Kadota *et al.*, 2004; Versele y Thorner, 2004).

Otro de los efectores de Cdc42 en *S. cerevisiae* es la subunidad Sec3 del complejo del exocisto (Zhang *et al.*, 2001). Cdc42 regula la exocitosis independientemente de la organización de los cables de actina (Adamo *et al.*, 2001; Roumanie *et al.*, 2005). Sec3 interactúa a través de

su dominio N-terminal con Rho1, Cdc42 y PtdIns(4,5) P_2 , mientras que Exo70 se une con Rho3, Cdc42 y PtdIns(4,5) P_2 . Cdc42, junto con PtdIns(4,5) P_2 regula la localización de Sec3 en la punta de la yema (Zhang *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2008). La interacción de Rho3 con Exo70 regula positivamente los últimos pasos de la secreción (Robinson *et al.*, 1999). Se ha propuesto un modelo de “activación localizada” para explicar la activación del exocisto por parte de las GTPasas Rho. En dicho modelo, Cdc42 y Rho3, en su estado activo, se unen a las subunidades del exocisto localizadas en el córtex, induciendo un cambio conformacional en el complejo del exocisto que conduce a la liberación de su estado autoinhibidor (Wu *et al.*, 2008).

Como ya se ha mencionado, los procesos de fusión y fisión vacuolar son importantes para la regulación de la homeostasis celular. Se ha descrito que Cdc42, junto con Rho1 interviene en el proceso de fusión vacuolar y su activación secuencial es necesaria para el proceso de fusión de las membranas (Eitzen *et al.*, 2001; Logan *et al.*, 2010; Muller *et al.*, 2001). Durante la fusión vacuolar, se produce polimerización de actina mediante la activación de la cascada de señalización de Cdc42- Cla4- Bee1 y Vpr1- Arp2/3 (Eitzen, 2003; Eitzen *et al.*, 2002; Isgandarova *et al.*, 2007; Tedrick *et al.*, 2004). Y dicha activación se produce en microdominios de la membrana vacuolar ricos en ergosterol (Jones *et al.*, 2010; Tedrick *et al.*, 2004).

En *S. cerevisiae*, también se han descrito funciones de Cdc42 en el proceso de conjugación. Tanto Cdc24 como Cdc42 son necesarias para la polimerización de los cables de actina y para la activación de la cascada de MAPK de respuesta a feromonas (Park y Bi, 2007). Bem1 y Ste20 tienen un papel importante en la señalización durante el proceso de conjugación y se ha sugerido que la interacción entre Cdc42, Bem1 y Ste20 permite la correcta señalización de la respuesta a feromonas (Yamaguchi *et al.*, 2007). Cla4 también podría tener una función en conjugación como regulador negativo de la cascada de MAP quinasas de respuesta a feromonas (Heinrich *et al.*, 2007). Aparte de intervenir en el control de la respuesta a feromonas, se han descrito funciones esenciales durante el proceso de fusión celular, regulando la secreción polarizada de enzimas degradativas de la pared y la fusión celular mediante la activación de Fus2 (Nelson *et al.*, 2004; Ydenberg *et al.*, 2012).

Cdc42 en *S. pombe*

La GTPasa Cdc42 es esencial y participa en el control del crecimiento celular polarizado y en el proceso de morfogénesis en *S. pombe* (Miller y Johnson, 1994). Cdc42 se localiza en las membranas internas y en la membrana plasmática, estando más concentrada en los polos de crecimiento y en el septo (Merla y Johnson, 2000).

En *S. pombe* Cdc42 interacciona en su forma activa con las quinasas Shk1, (Marcus *et al.*, 1995; Otilie *et al.*, 1995), y Shk2 (Sells *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998), con la formina For3 (Martin *et al.*, 2007; Nakano *et al.*, 2002) y con Pob1 (Rincón *et al.*, 2009).

Shk1 es una quinasa esencial de la familia PAK, similar a Ste20 y Cla4 de *S. cerevisiae*, y necesaria para el crecimiento polarizado, el control del ciclo celular y la citocinesis (Kim *et al.*, 2003; Marcus *et al.*, 1995; Otilie *et al.*, 1995; Verde *et al.*, 1995). Shk2 no es esencial y sus

funciones son parcialmente redundantes con las de Shk1 (Sells *et al.*, 1998; Yang *et al.*, 1998). Se ha descrito como función específica de Shk2 la activación de la ruta MAPK formada por el módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 ya que se detectó interacción mediante ensayo de doble híbrido entre Shk2 y Mkh1 (Merla y Johnson, 2001). Sin embargo, en estudios posteriores se observó que la activación de Pmk1 en respuesta a diferentes tipos de estrés es independiente de Shk2 (Madrid *et al.*, 2006).

Cdc42 juega un papel esencial en la regulación del ensamblaje de cables de actina ya que es necesaria para activar y localizar la formina For3, homóloga a Bni1 de *S. cerevisiae* (Feierbach y Chang, 2001; Nakano *et al.*, 2003; Sawin, 2002). La interacción de Cdc42 activa con For3 es facilitada por la proteína Pob1, homóloga a las proteínas Boi de *S. cerevisiae*, (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009). Pob1 es esencial y está implicada en el crecimiento polarizado y en la septación (Toya *et al.*, 1999). El gen que codifica Pob1 se aisló como un supresor de la cepa termosensible *cdc42-879*. Pob1 rescata los defectos de ausencia de cables de actina que tiene esta cepa mutante. Además, Pob1 interacciona con Cdc42 activa, lo que indica que puede ser una proteína efectora de esta GTPasa (Rincón *et al.*, 2009).

La GTPasa Cdc42 en *S. pombe* está regulada por dos GEFs, Ral1/Scd1 y Gef1, y una GAP, Rga4 (Coll *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 1994; Das *et al.*, 2007; Fukui y Yamamoto, 1988; Hirota *et al.*, 2003; Tatebe *et al.*, 2008). La eliminación simultánea de las dos proteínas GEF 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.

Scd1 es homóloga a Cdc24 de *S. cerevisiae* y está implicada en la regulación del crecimiento apical ya que la cepa *scd1Δ* presenta morfología redonda, es necesaria para la respuesta sexual, pues *scd1Δ* es incapaz de conjugarse (Chang *et al.*, 1994) y tiene defectos en endocitosis (Murray y Johnson, 2001). Scd1 pone en contacto a las GTPasas Ras1 y Cdc42 formando un complejo macromolecular que incluye, además, a la proteína adaptadora Scd2 y a la quinasa de la familia PAK Shk1, para regular la morfología celular y el proceso de conjugación mediante el control de la ruta MAPK de respuesta a feromonas (Chang *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1994; Fukui y Yamamoto, 1988; Tu *et al.*, 1997). Scd2 es una proteína adaptadora homóloga a Bem1 de *S. cerevisiae* que se une a GTP-Cdc42 y facilita la interacción con su proteína diana Shk1, activando a esta quinasa (Abenza *et al.*, 2009). Gef1 participa en el proceso de citocinesis y en la transición de crecimiento monopolar a bipolar. Se localiza fundamentalmente en la región de división como un anillo que se contrae durante la citocinesis, aunque también puede detectarse en los polos de crecimiento (Coll *et al.*, 2003). La proteína Hob3, que posee un dominio BAR (Bin/Anphiphysin/RVS), participa en la localización de Cdc42 en la zona media de la célula durante la citocinesis (Coll *et al.*, 2007). La quinasa NDR Orb6 regula la correcta localización de Gef1 en los polos restringiendo su localización en otras partes de la membrana (Das *et al.*, 2009). Gef1 no interacciona con los componentes de la ruta de Scd1 (Hirota *et al.*, 2003). Rga4 es la única proteína descrita con actividad GAP sobre Cdc42 (Tatebe *et al.*, 2008). Esta proteína contiene un dominio RhoGAP en su extremo C-terminal y un dominio LIM en su extremo N-terminal. Presenta homología con Rga1 y Rga2

de *S. cerevisiae*, ambas proteínas con actividad GAP sobre Cdc42 en esta levadura. Rga4 tiene un papel en el control del diámetro celular ya que las células carentes de *rga4*⁺ son más anchas y cortas que una cepa silvestre y la sobreproducción de esta proteína provoca estrechamiento en los polos celulares (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008). Rga4 tiene actividad GAP *in vivo* sobre Cdc42 e interacciona con esta GTPasa en ensayos de coinmunoprecipitación y de doble híbrido (Tatebe *et al.*, 2008). Rga4 se localiza en la membrana lateral de la célula, excluida de las zonas de crecimiento. Pom1 regula esta exclusión mediante la fosforilación de Rga4, permitiendo así la localización bipolar de Cdc42 activa. En las células *pom1*Δ que son monopolares, Rga4 se localiza en el polo de no crecimiento (Tatebe *et al.*, 2008). El diámetro celular de *S. pombe* está, por tanto, determinado por Cdc42. Las proteínas reguladoras de esta GTPasa Scd1, Scd2 y Rga4 participan en el control espacial de la activación de Cdc42 determinando la superficie de crecimiento polarizado. Se ha propuesto un modelo de fluctuación de la actividad de Cdc42 entre los polos de *S. pombe*, que permitiría alcanzar de una forma más rápida y eficaz el crecimiento bipolar (Das *et al.*, 2012b).

Objetivos

OBJETIVOS

Como se ha mencionado en la Introducción, la proteína Pob1 facilita la interacción de Cdc42 activa con For3. Sin embargo, la sobreexpresión de Pob1 corrige la termosensibilidad de la cepa *cdc42-879* mientras que la sobreexpresión de For3 no lo hace. Por tanto, es presumible que otras proteínas participen en la señalización esencial para el crecimiento celular de Cdc42 y del complejo Cdc42-Pob1. El objetivo principal de este trabajo, dentro del objetivo general del laboratorio, ha sido profundizar en las vías de señalización de Cdc42 e identificar nuevas proteínas efectoras de esta GTPasa. Para llevar a cabo este objetivo, nos planteamos:

1. Separar y caracterizar las dos mutaciones presentes en la cepa *cdc42-879* y caracterizar las cepas con cada una de las mutaciones.
2. Identificar nuevos genes supresores de la termosensibilidad de las cepas caracterizadas.
3. Estudiar las vías de señalización en las que participan las proteínas codificadas por los genes supresores.
4. Caracterizar los defectos causados por la proteína mutada Cdc42-L160S en el proceso de conjugación.

Resultados

Resultados

La cepa mutante termosensible *cdc42-L160S*

Como se menciona en la Introducción, en nuestro laboratorio se describió el mutante termosensible *cdc42-879*, que presenta defectos en la formación de cables de actina (Rincón *et al.*, 2009). La secuenciación del alelo mutante *cdc42-879* indicó que contenía dos mutaciones puntuales que causaban la sustitución del ácido aspártico del residuo aminoacídico 76 por glicina (D76G) y de la leucina del residuo aminoacídico 160 por serina (L160S) (Rincón *et al.*, 2009) (Figura 14). Estas dos mutaciones se clonaron por separado y se integraron en la cepa silvestre, reemplazando el gen *cdc42⁺* en el locus endógeno por *cdc42-L160S*, que contenía la sustitución T479C en la fase de lectura abierta (ORF) de *cdc42⁺* y por *cdc42-D76G*, que contenía la sustitución A194G de la ORF de *cdc42⁺*. Estas sustituciones dieron lugar a los cambios L160S y D76G, respectivamente, en la proteína Cdc42. El estudio del crecimiento de las cepas que llevaban estos alelos en comparación con la cepa *cdc42-879* indicó que la cepa mutante

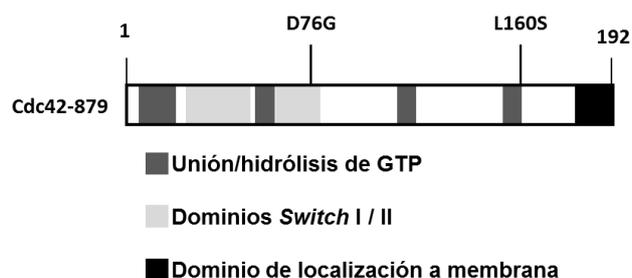


Figura 14. Localización de las mutaciones puntuales en Cdc42-879.

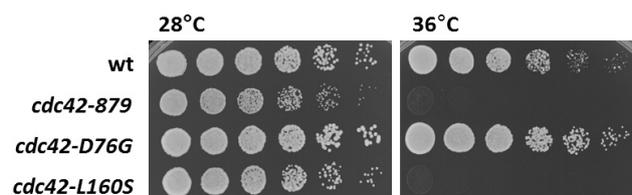


Figura 15. La cepa mutante *cdc42-L160S* es termosensible. Crecimiento de las cepas silvestre, *cdc42-879*, *cdc42-D76G* y *cdc42-L160S* en medio YES a 28°C y 36°C.

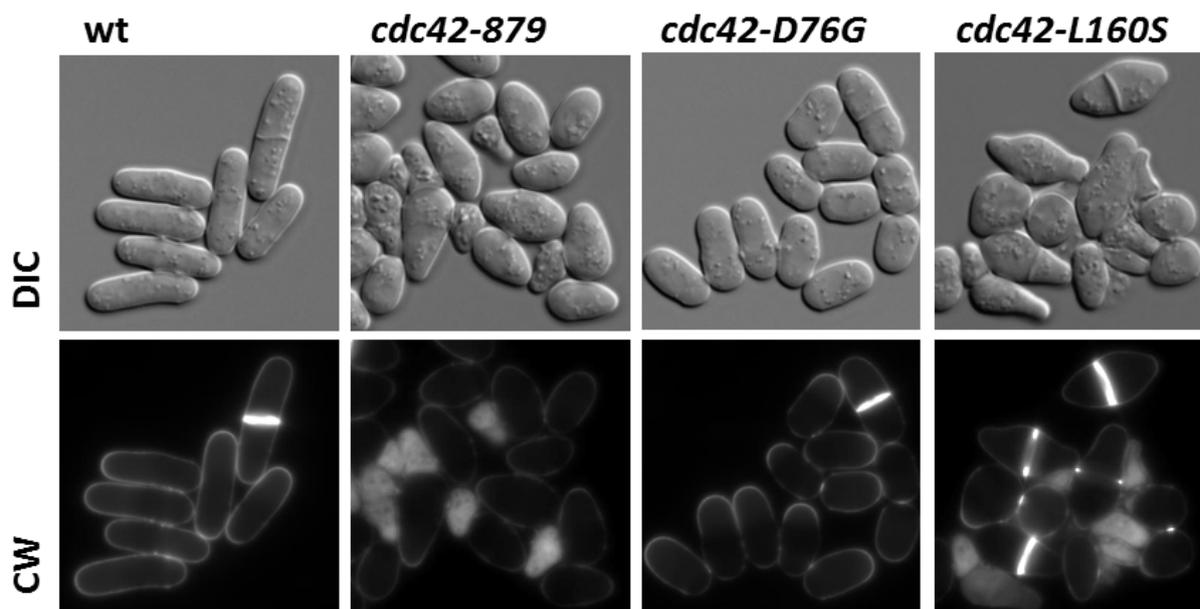


Figura 16. La morfología de las cepas mutantes *cdc42-879* y *cdc42-L160S* es similar. Micrografías de células de las cepas silvestre (wt), *cdc42-879*, *cdc42-D76G* y *cdc42-L160S*. Los paneles muestran imágenes de contraste de interferencia diferencial (DIC) y tinción con calcoflúor White (CW). Las células se incubaron en medio YES a 36°C durante 6 horas.

cdc42-L160S mostraba la misma termosensibilidad, mientras que la cepa mutante *cdc42-D76G* no era termosensible (Figura 15). El estudio comparativo de la morfología indicó que la cepa *cdc42-L160S* poseía la morfología de la cepa *cdc42-879*, mientras que la cepa mutante *cdc42-D76G* tenía una morfología menos severa, siendo las células más cortas y anchas que la cepa silvestre (Figura 16).

El estudio de los defectos de las cepas mutantes se continuó con el análisis del citoesqueleto de actina para comprobar si alguna de las cepas con las mutaciones puntuales recapitulaba los defectos en la formación de cables de la cepa mutante *cdc42-879*. Como muestra la Figura 17, la cepa mutante termosensible *cdc42-L160S* muestra un citoesqueleto de actina con los parches despolarizados y los cables de actina están ausentes o son muy cortos, mientras que la cepa mutante *cdc42-D76G* muestra los parches de actina polarizados y tiene cables de actina detectables mediante la tinción con AlexaFluor 488-Faloidina.

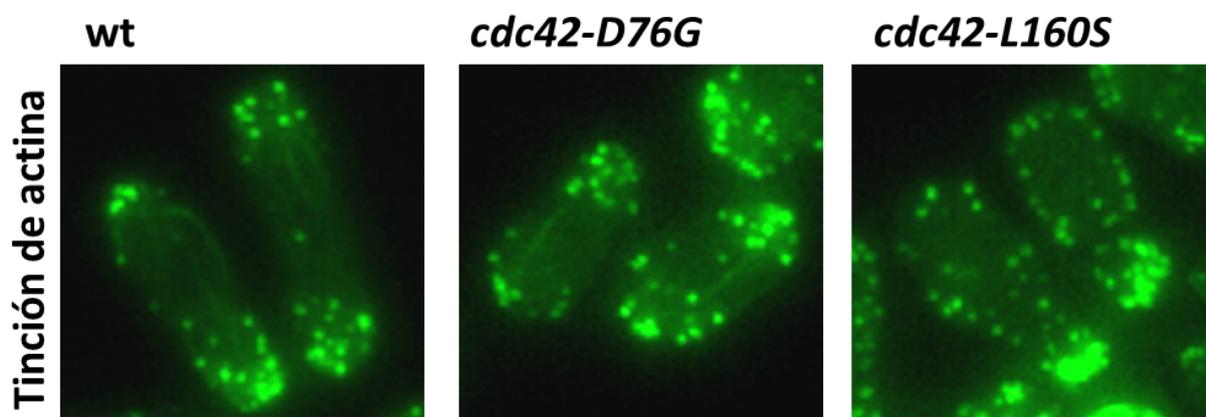


Figura 17. La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos en el citoesqueleto de actina. Las micrografías de fluorescencia muestran las estructuras que forma la actina unida a AlexaFluor 488-Faloidina en células de las cepas silvestre (*wt*), *cdc42-D76G* y *cdc42-L160S*. Previamente las células se incubaron en medio YES a 36°C durante 6 horas.

El hecho de que fuese difícil detectar los cables de actina en la cepa mutante *cdc42-L160S* motivó que se estudiase la localización de la formina For3 en las cepas de estudio. Mientras que For3-3GFP se localizaba en los polos en la cepa mutante *cdc42-D76G*, en la cepa *cdc42-L160S* no se detectó señal alguna (Figura 18). Asimismo, se estudió en las cepas mutantes la localización de la miosina de tipo V, Myo52-GFP, que se encarga del transporte de las vesículas secretoras a través de los cables de actina. En la cepa *cdc42-D76G* se observó Myo52 localizada en los polos, mientras que en la cepa mutante *cdc42-L160S* aparecía dispersa por toda la célula (Figura 18). Parece, por tanto, que la cepa mutante *cdc42-L160S* recapitula los defectos de la cepa mutante *cdc42-879*.

La proteína Cdc42-L160S unida a GTP se excluye de la membrana plasmática

A partir de aquí, centramos nuestro estudio en la cepa *cdc42-L160S*. En primer lugar analizamos la cantidad de GTPasa total y activa, es decir unida a GTP, que existe en esa cepa comparándola con una cepa silvestre. En ambos casos, la fase de lectura abierta del gen

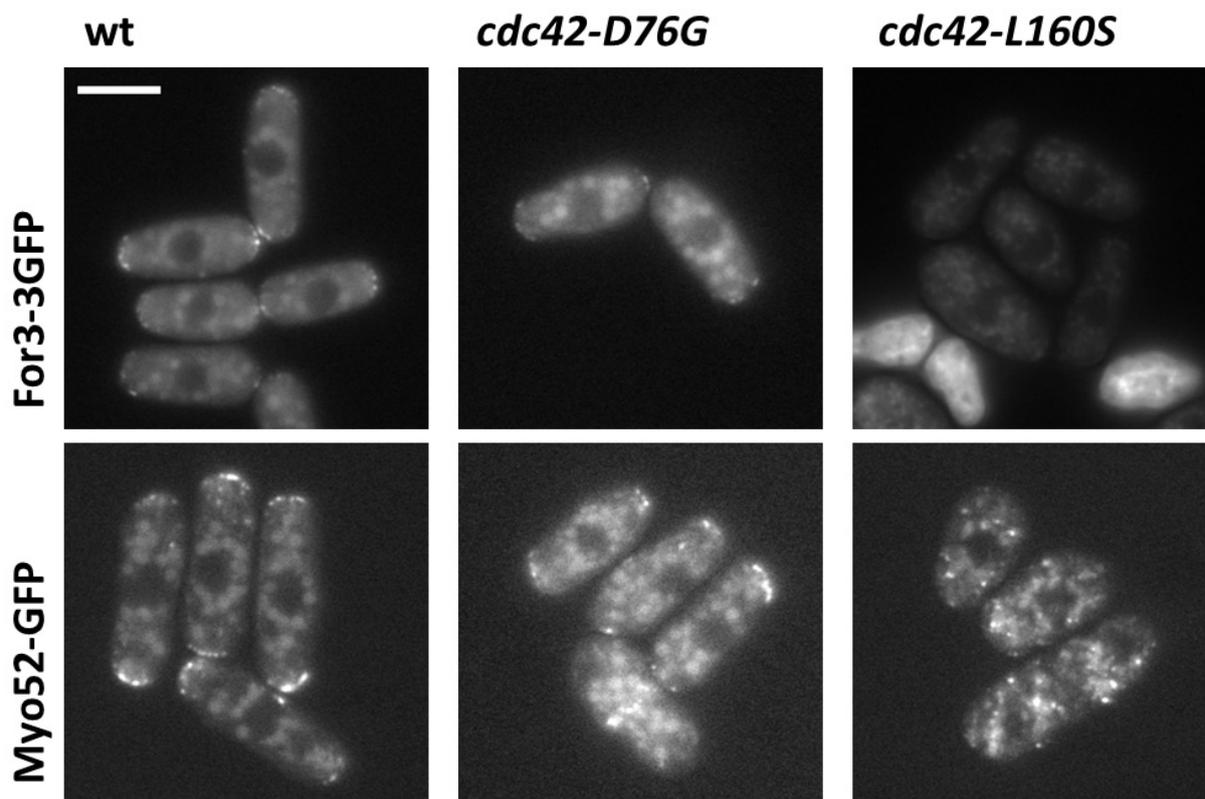


Figura 18. La formina For3 y la miosina de tipo V Myo52 no se localizan correctamente en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Micrográficas de fluorescencia de For3-3GFP y Myo52-GFP en las cepas silvestre (wt) y mutantes *cdc42-D76G* y *cdc42-L160S*. Las células se cultivaron en medio YES a 32°C. La barra de escala equivale a 5 μ m.

cdc42 lleva en su extremo 5' una secuencia en fase que codifica el epítipo HA. Las proteínas correspondientes se pueden detectar, por tanto, utilizando anticuerpos frente a dicho epítipo. Los niveles totales de HA-Cdc42 y HA-Cdc42-L160S en extractos celulares fueron similares tanto a 28°C como a 36°C (Figura 19). Para determinar los niveles de Cdc42 unida a GTP se realizó un ensayo de coprecipitación de Cdc42 con la proteína glutation S-transferasa unida al dominio CRIB de la proteína Pak2 de mamíferos producida en *E. coli*. Esta proteína se sedimenta mediante unión a bolas de Glutacion-sefarosa y en ese sedimento se detecta la presencia de HA-Cdc42

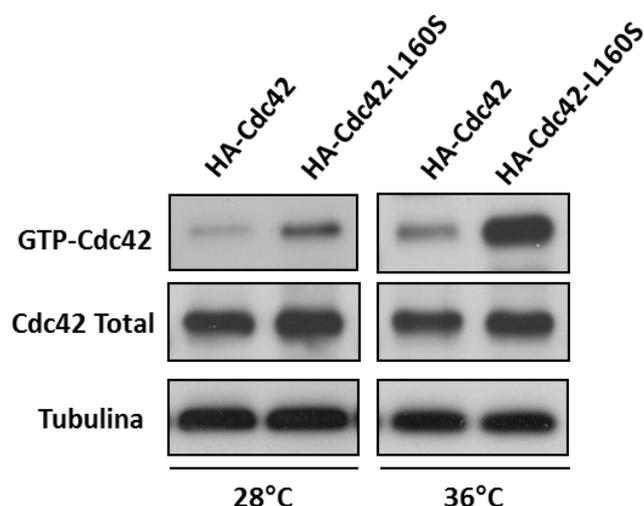


Figura 19 Niveles de activación de Cdc42 en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Se prepararon extractos celulares de las cepas HA-*cdc42* y HA-*cdc42-L160S* cultivadas a 28°C y posteriormente incubadas a 36°C durante 5 horas. Una parte de los extractos se analizó mediante Western blot usando el anticuerpo anti-HA para determinar la cantidad total de HA-Cdc42. Además se hibridó la membrana con un anticuerpo anti-tubulina como control de carga. Otra parte se precipitó con GST-CRIB de la proteína Pak2 y se analizó mediante Western blot usando el anticuerpo anti-HA para determinar los niveles de Cdc42 unido a GTP.

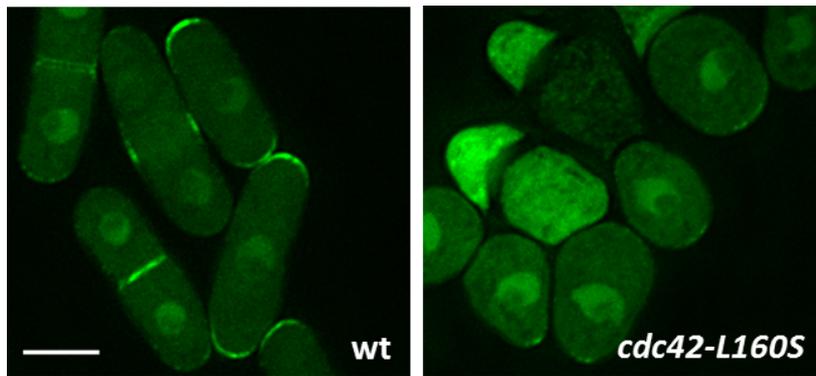


Figura 20. Localización de Cdc42 unido a GTP. Imágenes de fluorescencia de células de las cepas silvestre (wt) y *cdc42-L160S* que portaban Gic2-CRIB-GFP cultivadas en medio YES a 28°C que posteriormente se transfirieron a 36°C durante 5 horas. La barra de escala equivale a 5 µm.

unido a GTP ya que sólo la proteína activa es capaz de unirse al dominio CRIB. El ensayo indicó que había una mayor proporción de GTPasa unida a GTP en las células de la cepa *cdc42-L160S* respecto a la cepa silvestre a las temperaturas anteriormente indicadas (Figura 19). A continuación determinamos los niveles de Cdc42 activa en la membrana plasmática utilizando como marcador en este caso el dominio CRIB de la proteína Gic2 de *S. cerevisiae* fusionado a GFP (Tatebe *et al.*, 2008). Dicho dominio lleva además un dominio PH que hace que sólo se una a Cdc42-GTP en la membrana plasmática. Incluso a temperatura permisiva, en la cepa *cdc42-L160S* los niveles de GTP-Cdc42-L160S son considerablemente menores en la membrana plasmática que los niveles de GTP-Cdc42 observados en la cepa silvestre (Figura 20).

Estos dos resultados, aparentemente contradictorios, indican que Cdc42-L160S unido a GTP se encuentra mayoritariamente asociado a membranas internas de la célula. Para determinar si la cantidad total de Cdc42-L160S, tanto en su estado activo como inactivo, también era menor en la membrana plasmática, se integró una copia de *GFP-cdc42* o de *GFP-cdc42-L160S* bajo el control de su propio promotor, en el locus *leu1* de una cepa silvestre y de la cepa *cdc42-L160S*. En la cepa silvestre, GFP-Cdc42 se localiza a lo largo de toda la membrana plasmática, aunque en mayor proporción en los polos, y en las membranas vacuolares en el interior de la célula (Figura 21). En la cepa silvestre en la que se integró *GFP-cdc42-L160S*, se observa una localización similar a la de GFP-Cdc42 (Figura 21). Si bien la cuantificación de la intensidad de la fluorescencia

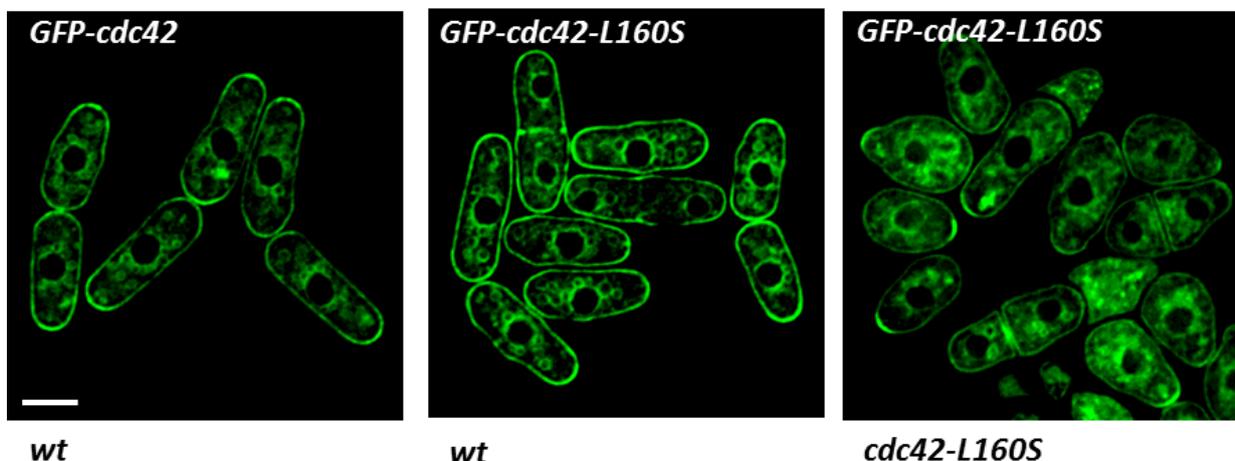


Figura 21. Localización de Cdc42. Micrográficas de fluorescencia de células de las cepas silvestre (wt) y mutante *cdc42-L160S* cultivadas a 28°C portando una copia de *GFP-cdc42* o *GFP-cdc42-L160S* integrada en el locus de *leu1*⁺. La barra de escala equivale a 5 µm.

a lo largo de la membrana indicó que la distribución de GFP-Cdc42-L160S en ésta es más uniforme y no se concentra en los polos, a diferencia de la de GFP-Cdc42 (Figura 22). Además GFP-Cdc42-L160S es más abundante que GFP-Cdc42 en la membrana de la vacuola (Figura 21). En el caso de la integración de GFP-Cdc42-L160S en el fondo genético *cdc42-L160S*, la señal es considerablemente más abundante en el interior de la célula aunque aún se detecta muy concentrada en algunas zonas de la membrana plasmática. En conjunto, estos datos sugieren que la mutación L160S no impide que Cdc42 se localice en la membrana plasmática pero sí impide su activación en esta estructura.

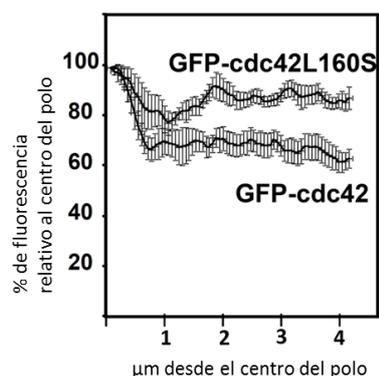


Figura 22. Distribución de la intensidad de la señal de GFP-Cdc42 y GFP-Cdc42-L160S en la cepa silvestre. El estudio de la distribución se realizó midiendo la intensidad de la señal desde el centro del polo de crecimiento a lo largo de la membrana celular. Las gráficas representan en cada punto el porcentaje de la intensidad relativo al máximo de fluorescencia del centro del polo de crecimiento. Cada línea es la media de la medida de 20 células y las barras de error representan la desviación típica.

Cdc42 y el tráfico intracelular

La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos en la secreción

Las células que carecen de cables de actina de interfase, como las de la cepa *for3Δ*, no son termosensibles. Puesto que la cepa *cdc42-L160S* no crece a altas temperaturas, además de la falta de cables de actina debe de ser defectuosa en algún proceso necesario para el crecimiento celular a temperatura elevada. Como ya se mencionó en la Introducción, la secreción polarizada es esencial para que se produzca el crecimiento polarizado y el fenotipo del mutante nulo de *cdc42* indica que la incorporación de nuevo material a la membrana plasmática está bloqueada (Miller y Johnson, 1994). Para determinar si los defectos en el crecimiento de la cepa *cdc42-L160S* eran causados por un defecto en secreción, se realizó un ensayo de valoración de la secreción de fosfatasa ácida (A.P.). Casi un 40% de la fosfatasa ácida es secretada al medio de cultivo en *S. pombe*, por lo que se trata de un buen indicador de la función secretora (Wang *et al.*, 2002). La actividad enzimática se midió en el sobrenadante de los cultivos celulares tanto de la cepa silvestre como de la cepa *cdc42-L160S*. Se observó que incluso a temperatura permisiva, las células *cdc42-L160S* secretaban menos A.P. que las células silvestres (Figura 23). Usando como control la cepa *for3Δ* se comprobó que la ausencia de cables no estaba causando este defecto de secreción (Figura 23).

Las cepas defectuosas en secreción suelen tener acumulación de vesículas en su interior. El análisis mediante microscopía electrónica de transmisión de células *cdc42-L160S* mostró acumulación de vesículas y de estructuras altamente densas a los electrones, que podrían ser compartimentos de membrana de las rutas biosintética o endocítica. Además de estos defectos,

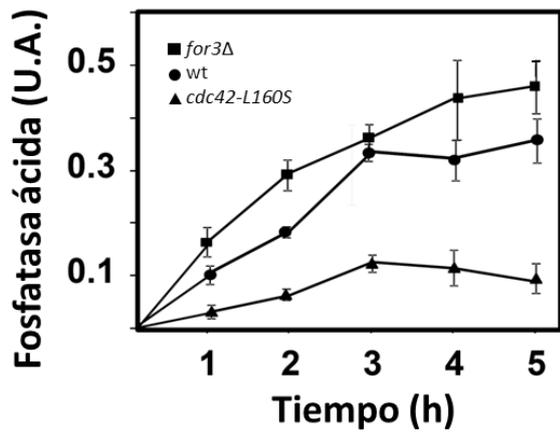


Figura 23. La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos de secreción. Secreción de fosfatasa ácida al medio de cultivo en cultivos en fase logarítmica de las cepas silvestre (wt), *cdc42-L160S* y *for3Δ* incubadas a 32°C durante 5 horas. Valores representados en unidades arbitrarias (U.A.). Las barras de error corresponden a la desviación típica de tres experimentos independientes.

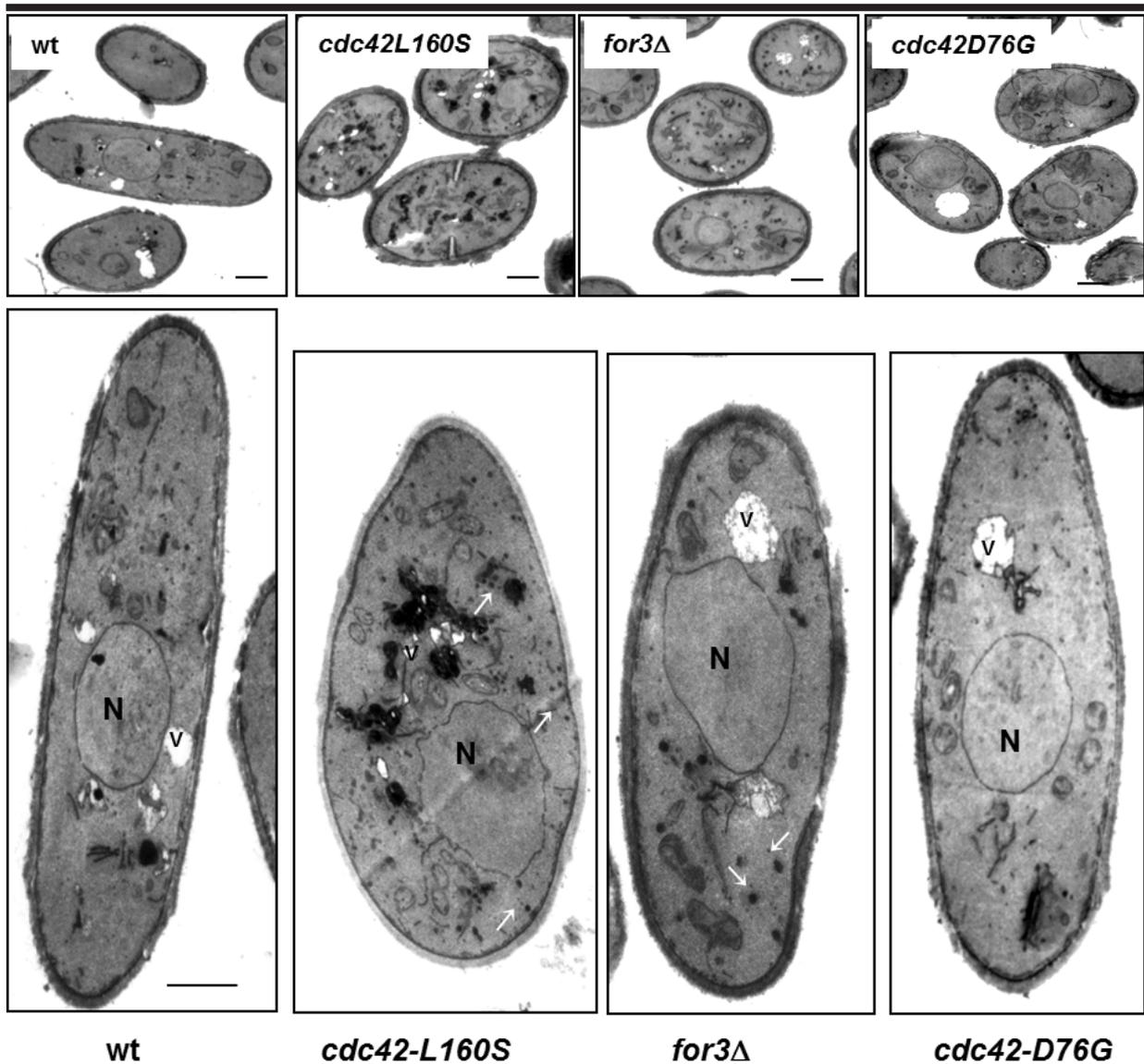


Figura 24. La cepa mutante *cdc42-L160S* presenta alteraciones intracelulares. Imágenes de microscopía electrónica de transmisión de células de las cepas silvestre (wt), *cdc42-L160S*, *for3Δ* y *cdc42-D76G* incubadas a 32°C. Las células fueron fijadas con permanganato potásico para resaltar las estructuras membranosas. En los paneles superiores se muestran varias células para documentar la especificidad de las alteraciones. En los paneles inferiores se muestran células a mayor aumento donde únicamente la cepa *cdc42-L160S* presenta estructuras densas a los electrones, mientras que las cepas *cdc42-L160S* y *for3Δ* presentan acumulación de vesículas grandes (100-150 nm) (flechas blancas); V, vacuolas, que aparecen fragmentadas en la cepa *cdc42-L160S*; N, núcleo. Las barras corresponden a 2 μm.

se observaron vacuolas fragmentadas (Figura 24). En las células de la cepa *for3Δ*, se observó acumulación de vesículas grandes, pero no se encontró ninguna estructura membranosa densa a los electrones ni vacuolas fragmentadas (Figura 24). También se analizaron mediante microscopía electrónica células silvestres y células *cdc42-D76G* y en ninguno de los casos se observó acumulación de estructuras membranosas densas a los electrones o vacuolas fragmentadas (Figura 24).

Estos resultados sugieren que Cdc42 en *S. pombe*, además de su papel en la regulación de los cables de actina que permiten el transporte polarizado de las vesículas a la membrana plasmática (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009), regula el tráfico de membranas y la secreción.

Para continuar explorando esta hipótesis, se llevó a cabo el análisis de la localización de los componentes del complejo del exocisto Sec8 y Exo70 unidos al epítipo GFP para determinar si el complejo se hallaba correctamente localizado en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Como era de esperar, en la cepa silvestre Sec8-GFP y Exo70-GFP se localizaban en las zonas de los polos y del septo. La localización de estos componentes del exocisto en la cepa mutante *for3Δ* también era correcta. Por el contrario, en la cepa mutante *cdc42-L160S* ambos componentes del exocisto apenas se veían en los polos, y aparecían dispersos por toda la célula o acumulados en el interior. Sorprendentemente, su localización en la zona de división permaneció inalterada incluso a la temperatura semipermissiva de 32°C (Figura 25), lo que sugiere que otro mecanismo de localización, independiente de Cdc42, actúa en la zona del septo.

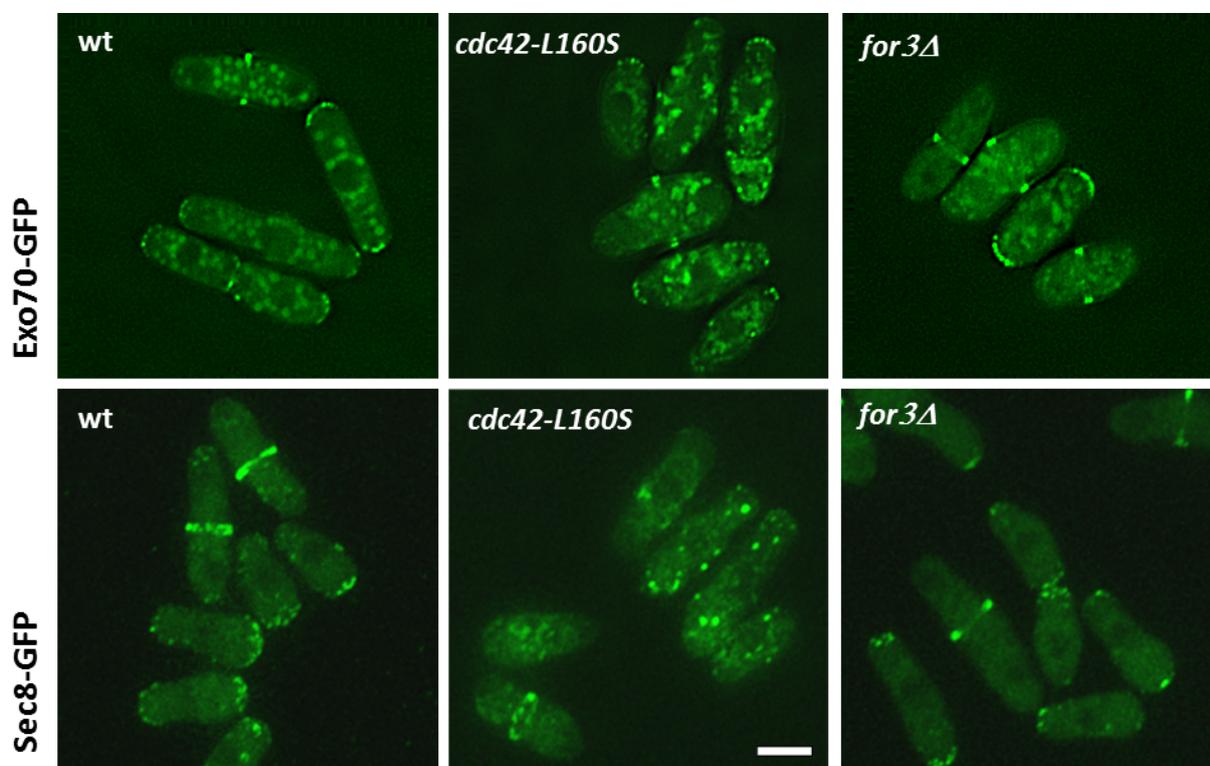


Figura 25. Localización del exocisto en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Imágenes de fluorescencia de Exo70-GFP y Sec8-GFP en células de las cepas silvestre (wt), *cdc42-L160S* y *for3Δ* incubadas en medio YES a 32°C. La barra corresponde a 5 μ m.

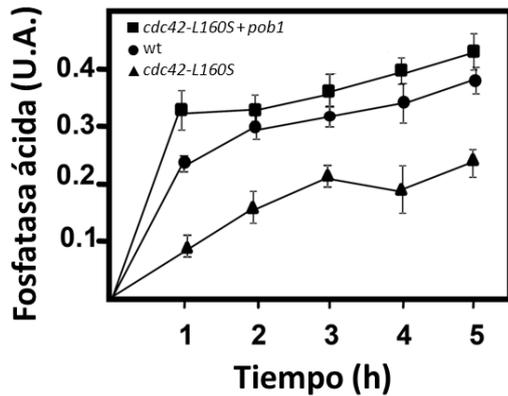


Figura 26. Pob1 suprime los defectos de secreción de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Secreción de fosfatasa ácida al medio de cultivo en cultivos en crecimiento logarítmico de las cepas silvestre (wt) y *cdc42-L160S* transformadas con pREP41X y *cdc42-L160S* transformada con pREP41X-*pob1*⁺. Las células fueron incubadas a 32°C en EMM sin tiamina durante 18 horas. Las barras de error corresponden a la desviación típica de 3 experimentos independientes.

Pob1 restaura la localización del complejo del exocisto y la secreción en las células *cdc42-L160S*

Investigaciones previas en el laboratorio demostraron que la sobreexpresión de *pob1*⁺ restauraba parcialmente los cables de actina y la correcta localización de la miosina de tipo V Myo52 y de la formina For3 en los polos de la cepa *cdc42-879* (Rincón *et al.*, 2009). Sin embargo, For3 no es esencial, por tanto Cdc42 debe de estar participando en algún otro proceso necesario para el crecimiento celular y dado que la sobreexpresión de *pob1*⁺ suprime parcialmente la termosensibilidad de *cdc42-879*, parecería que Pob1 participa también en dicho proceso. Por ese motivo se comprobó si la sobreexpresión de *pob1*⁺ era capaz de restaurar los defectos en la secreción de la cepa mutante *cdc42-L160S*. El análisis de la actividad A.P. indicó que la sobreexpresión de *pob1*⁺ incrementaba los niveles de secreción del mutante *cdc42-L160S*, incluso superaba los niveles de actividad de la cepa silvestre (Figura 26). También se estudió la localización de los componentes del complejo del exocisto Sec8-GFP y Exo70-GFP en células *cdc42-L160S* que sobreexpresaban *pob1*⁺ y se observó que en ambos casos se restauraba la localización del exocisto en los polos (Figura 27).

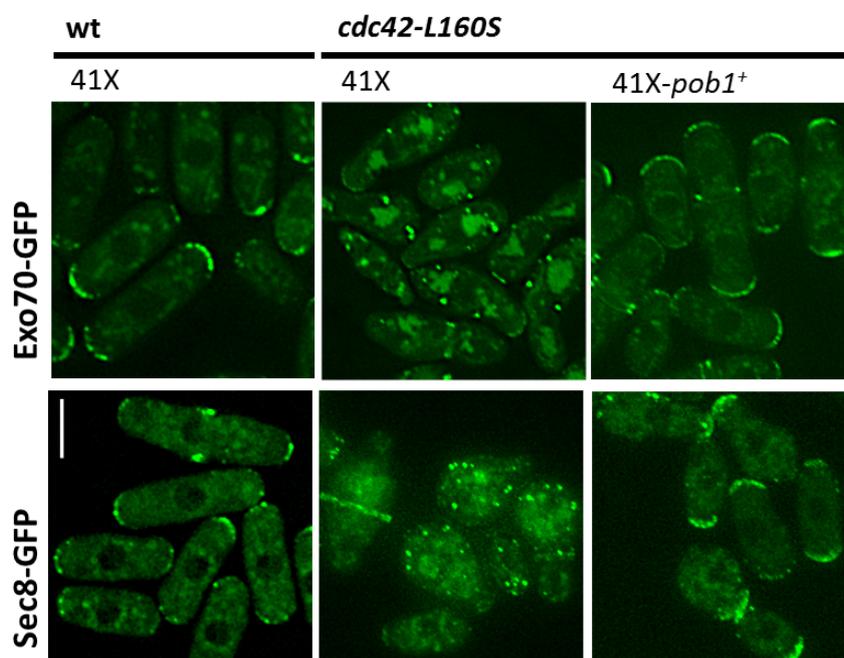


Figura 27. Pob1 suprime los defectos de localización del exocisto de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Localización de los componentes del exocisto Exo70-GFP y Sec8-GFP en las cepas silvestre (wt) y *cdc42-L160S* transformadas con pREP41X y *cdc42-L160S* transformada con pREP41X-*pob1*⁺. Las células fueron incubadas a 32°C en EMM sin tiamina durante 18 horas. La barra corresponde a 5 µm.

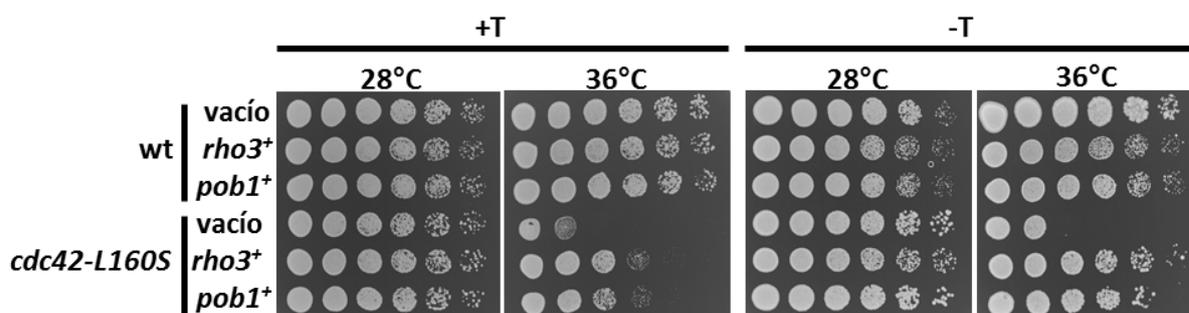


Figura 28. La sobreexpresión de *rho3*⁺ o *pob1*⁺ suprime la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Crecimiento de las cepas silvestre (wt) y *cdc42-L160S* transformadas con el plásmido pREP3X vacío o portando la ORF de *rho3*⁺ o *pob1*⁺. Las células se incubaron en EMM en presencia y en ausencia de tiamina (T) a 28°C y a 36°C.

Estos resultados indican que Pob1 interviene en la regulación de la localización del exocisto mediada por Cdc42.

Rho3 suprime la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* pero no restaura la formación de cables de actina

El gen que codifica a la GTPasa Rho3 de *S. pombe* fue aislado como supresor en multicopia de los defectos de secreción del mutante del exocisto *sec8-1* (Wang *et al.*, 2003). Además, se ha descrito que Rho3 interacciona con For3 y regula el citoesqueleto de actina (Nakano *et al.*, 2002). Basándonos en estos resultados decidimos analizar si la sobreexpresión de *rho3*⁺ era capaz de suprimir la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Utilizando el plásmido de expresión reprimible por tiamina pREP3X se comprobó que la sobreproducción de Rho3 en las células de la cepa mutante *cdc42-L160S* les permitía crecer a la temperatura restrictiva de la misma manera que lo hacía la sobreexpresión de *pob1*⁺ (Figura 28). Sin embargo, a diferencia de la sobreexpresión de *pob1*⁺, la sobreexpresión de *rho3*⁺ no corregía la morfología aberrante de las células *cdc42-L160S* (Figura 29) ni tampoco restauraba los cables de actina (Figura 30). De acuerdo con estas observaciones, ni la formina For3-3GFP ni GFP-Pob1 se localizaban correctamente en las células que sobreproducían Rho3 (Figura 31). Por otra parte, el análisis de la localización de los componentes del exocisto Sec8-GFP y Exo70-GFP en la cepa mutante *cdc42-L160S* que sobreproducía Rho3 mostró que el exocisto se localizaba correctamente en estas células (Figura 32). Además, la secreción de A.P. en las células mutantes *cdc42-L160S* que sobreexpresaban *rho3*⁺ se mejoraba considerablemente (Figura 33). Todos estos datos sugieren que Rho3 participa en la correcta localización del exocisto y en la secreción, pero no en la activación de la formina For3.

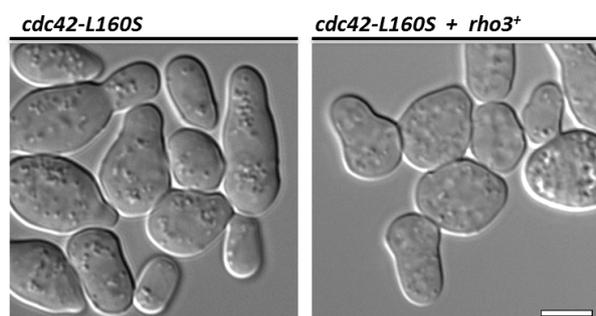


Figura 29. La sobreexpresión de *rho3*⁺ no corrige la morfología de las células *cdc42-L160S*. Imágenes de contraste por interferencia diferencial de la cepa *cdc42-L160S* transformada con el plásmido pREP41X vacío o portando la ORF de *rho3*⁺. Las células se incubaron en EMM sin tiamina durante 15 horas y se transfirieron a 36°C durante 5 horas. La barra corresponde a 5 µm.

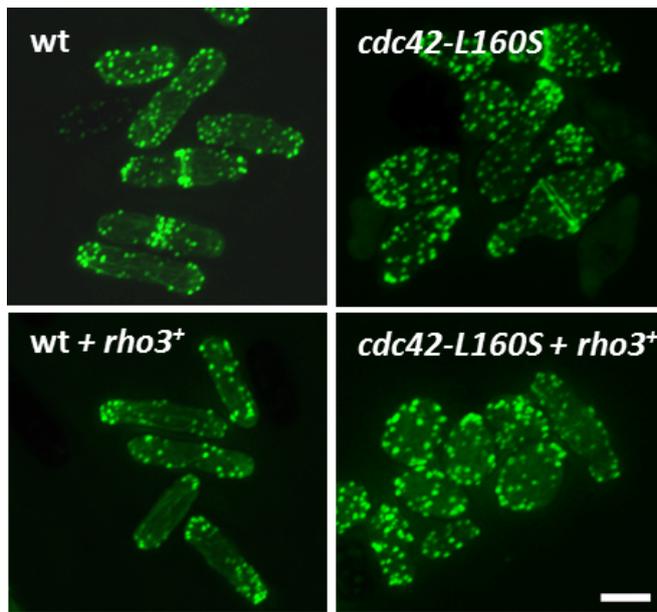


Figura 30. La sobreexpresión de *rho3+* no afecta al citoesqueleto de actina de *cdc42-L160S*. Tinción con AlexaFluor 488-faloidina de las cepas silvestre y *cdc42-L160S* transformadas con los plásmidos pREP41X y pREP41X-*rho3+*. Las células se incubaron en EMM sin tiamina durante 18 horas a 32°C. La barra corresponde a 5 μ m.

Figura 31. La sobreexpresión de *rho3+* no afecta a la localización de For3 ni Pob1 en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Localización de For3-3GFP y Pob1-GFP en las cepas silvestre y *cdc42-L160S* transformadas con los plásmidos pREP41X o pREP41X-*rho3+*. Las células se incubaron en EMM sin tiamina durante 18 horas a 32°C. La barra corresponde a 5 μ m.

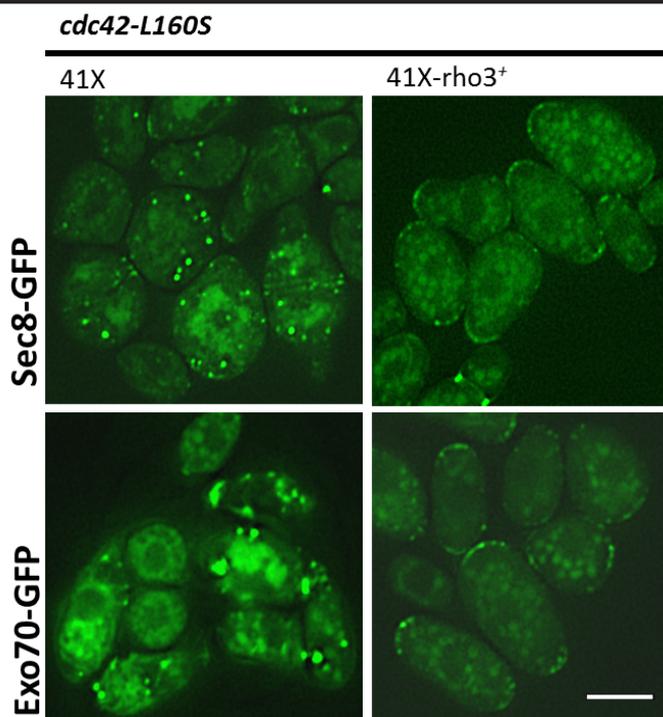
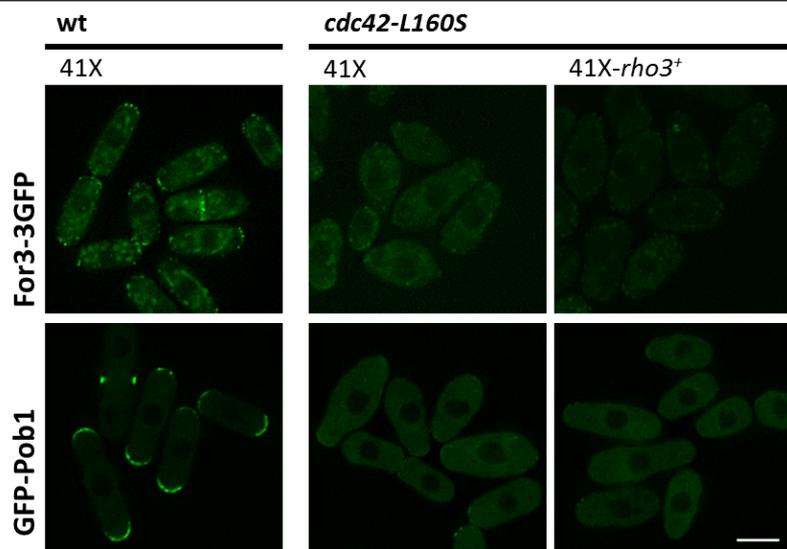


Figura 32. La sobreexpresión de *rho3+* relocaliza el exocisto en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Imágenes de fluorescencia de Exo70-GFP y Sec8-GFP en la cepa *cdc42-L160S* transformada con los plásmidos pREP41X o pREP41X-*rho3+*. Las células se incubaron en EMM sin tiamina durante 18 horas a 32°C. La barra corresponde a 5 μ m.

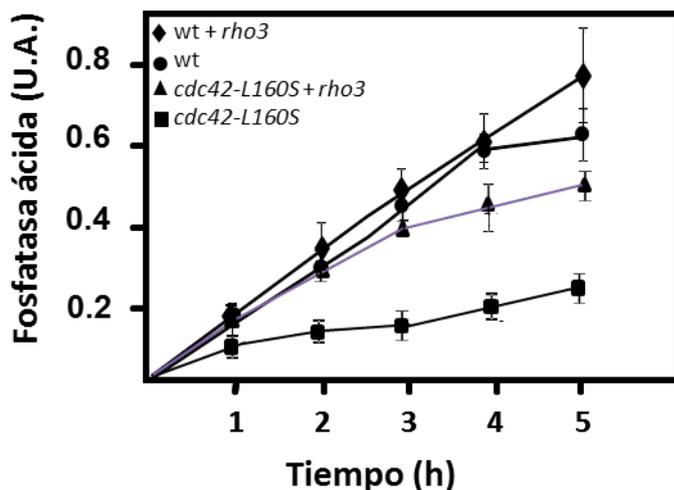


Figura 33. La sobreexpresión de *rho3⁺* mejora los defectos de secreción de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Secreción de fosfatasa ácida al medio en cultivos con crecimiento logarítmico de las cepas silvestre (wt) y *cdc42-L160S* transformadas con pREP41X vacío o con la ORF de *rho3⁺*. Las células fueron incubadas previamente a 32°C en EMM sin tiamina durante 18 horas. Las barras de error corresponden a la desviación típica de tres experimentos independientes. (U.A., unidades arbitrarias)

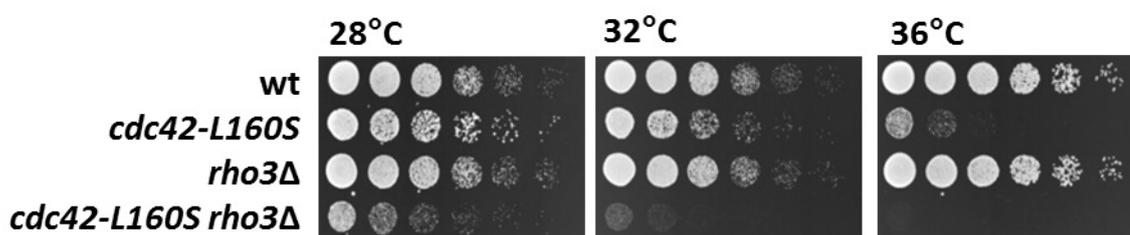


Figura 34. La ausencia de Rho3 incrementa los defectos de crecimiento de la cepa *cdc42-L160S*. Las cepas silvestre (wt), *cdc42-L160S*, *rho3Δ* y *cdc42-L160S rho3Δ* se incubaron a las temperaturas indicadas en medio YES durante tres días.

La cepa doble mutante *cdc42-L160S rho3Δ* tiene defectos de crecimiento mucho más severos que los mutantes sencillos (Figura 34) por lo que se deduce que ambas GTPasas participan en la regulación del proceso de secreción, pero podrían hacerlo a través de rutas diferentes.

Interacciones de Cdc42 con el exocisto

El hecho de que la cepa *cdc42-L160S* tuviera defectos en la localización del exocisto hizo que se estudiase la posible interacción física entre Cdc42 y el complejo del exocisto. Para ello se llevaron a cabo experimentos de coimmunoprecipitación usando una cepa que expresaba Exo70-Myc y HA-Cdc42 bajo el control de sus promotores endógenos. Como se muestra en la Figura 35, se detectó interacción entre Cdc42 y Exo70. Para determinar si la interacción de Cdc42 y Exo70 dependía del estado de activación de la GTPasa, se transformó la cepa Exo70-Myc con plásmidos pREP41 que contenían el alelo silvestre *HA-cdc42⁺*, el alelo hiperactivo *HA-cdc42-G12V* y el alelo dominante negativo *HA-cdc42-T17N*. Las células transformadas con estos plásmidos se cultivaron sin tiamina durante 18 horas para permitir la sobreexpresión de los diferentes alelos de *cdc42*. A continuación se realizó una inmunoprecipitación usando anticuerpos anti-HA y se analizó mediante Western blot con anticuerpos anti-Myc para detectar Exo70-Myc. Se detectó Exo70-Myc únicamente en la inmunoprecipitación de los extractos celulares que contenían HA-Cdc42-T17N, es decir, cuando Cdc42 se encuentra en su estado inactivo (Figura 36).

Estos resultados se corroboraron usando otro componente del exocisto. Aunque no se pudo

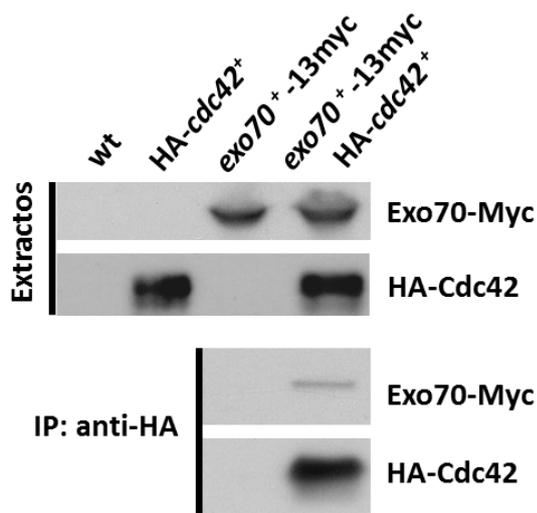


Figura 35. Cdc42 interacciona con Exo70. Extractos celulares de cepas que expresaban HA-*cdc42* y *exo70*-13Myc bajo el control de sus propios promotores fueron analizados mediante Western blot con anticuerpos anti-HA y anti-Myc. Alicuotas de los extractos se inmunoprecipitaron con anticuerpos anti-HA y se analizaron mediante Western blot con anticuerpos anti-HA y anti-Myc.

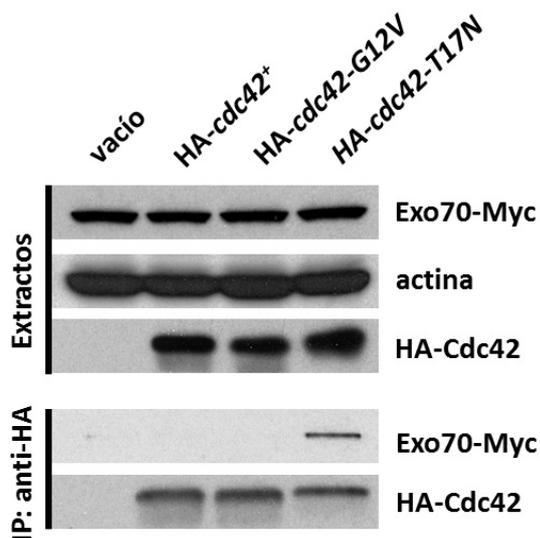


Figura 36. Exo70 interacciona con Cdc42 unido a GDP. Se transformó la cepa que expresa *exo70*-13Myc bajo el control de su propio promotor con los plásmidos pREP41-vacío, pREP41-HA-*cdc42*⁺, pREP41-HA-*cdc42*-G12V y pREP41-HA-*cdc42*-T17N. Las células en fase logarítmica se incubaron en ausencia de tiamina durante 18 horas y se obtuvieron extractos celulares. Una parte se utilizó para analizar la expresión de las proteínas mediante Western blot con anticuerpos anti-Myc y anti-HA. Con la otra parte se realizó una inmunoprecipitación con anticuerpos anti-HA que luego se analizó mediante Western blot con anticuerpos anti-Myc y anti-HA.

ver la coimmunoprecipitación de Cdc42 con Sec8 bajo el control de sus promotores endógenos, la sobreexpresión de los plásmidos pREP1 que contenían los alelos *GST-cdc42*⁺, *GST-cdc42*-G12V y *GST-cdc42*-T17N sí permitió detectar Sec8-GFP sólo en el precipitado de los extractos que contenían GST-Cdc42-T17N (Figura 37). Este resultado confirmó que la interacción de Cdc42 con el exocisto ocurre principalmente cuando Cdc42 está unido a GDP.

Para validar la interacción directa entre Cdc42 y el exocisto, se realizaron ensayos de doble híbrido usando Exo70 como cebo. Los resultados mostraron que Cdc42-T17N era capaz de interaccionar con Exo70, mientras que Cdc42-G12V o Cdc42 no (Figura 38). Además, no pudimos ver interacción entre Exo70 y la proteína Pob1, que interacciona principalmente con Cdc42 unido a GTP (Figura 39) (Rincón *et al.*, 2009).

Se utilizó también una aproximación genética para confirmar la interacción de Cdc42 con el exocisto. Así, se observó que la sobreexpresión de los alelos *cdc42*⁺ y *cdc42*-T17N, pero no la de *cdc42*-G12V, suprimían parcialmente la termosensibilidad de las células que portaban el alelo *sec8-1* (Figura 40). En conjunto, estos datos indican que el exocisto interacciona con Cdc42 unido a GDP a través de Exo70, por lo que Exo70 no es un efector *bona fide* de esta GTPasa en *S. pombe*. El hecho de que la sobreexpresión de *exo70*⁺ no sea capaz de suprimir la termosensibilidad de *cdc42*-L160S apoya estos resultados (Figura 41).

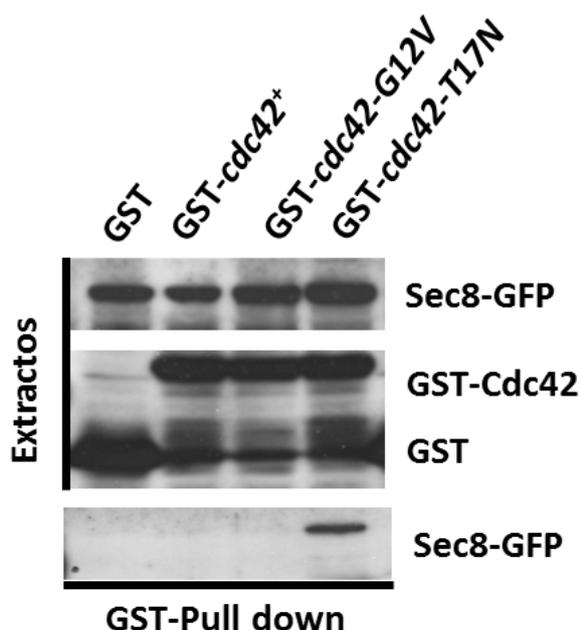


Figura 37. Sec8 interacta con Cdc42 unido a GDP. La cepa que expresa Sec8-GFP bajo el control de su propio promotor se transformó con los plásmidos pREP1-GST, pREP1-GST-*cdc42*, pREP1-GST-*cdc42-G12V* y pREP1-GST-*cdc42-T17N*. Estas células se incubaron en ausencia de tiamina durante 14 horas y se obtuvieron extractos celulares de ellas. Una parte se utilizó para analizar la expresión de las proteínas mediante Western blot con anticuerpos anti-GST y anti-GFP. Con la otra parte se realizó una precipitación con bolas de glutation-sefarosa y se analizó mediante Western blot con anticuerpos anti-GFP.

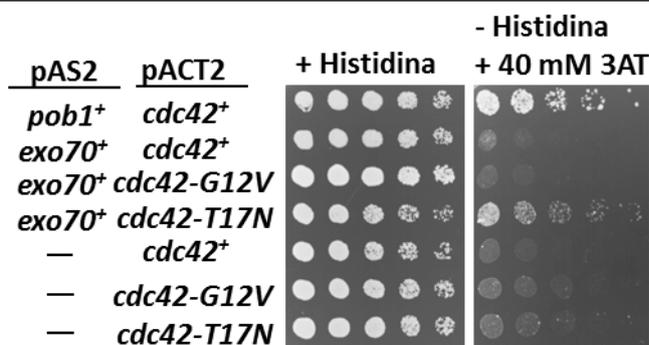


Figura 38. Exo70 interacta con GDP-Cdc42. Ensayo de doble híbrido para estudiar la interacción de Exo70 con diferentes formas de Cdc42. La ORF de *exo70+* se clonó en el plásmido pAS2 y se usó como cebo frente a las formas de *cdc42+*, *cdc42-G12V* o *cdc42-T17N* clonadas en el plásmido pACT2. La interacción de pAS2-*pob1+* con pACT2-*cdc42+* se utilizó como control positivo del ensayo.

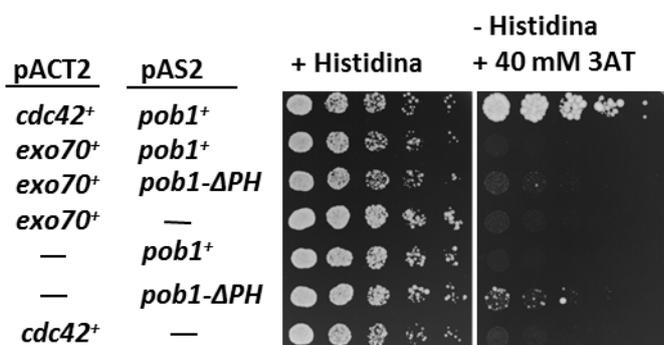


Figura 39. Exo70 no interacta con Pob1. Ensayo de doble híbrido para estudiar la interacción de Exo70 y diferentes formas de Pob1. La ORF de *exo70+* se clonó en el plásmido pACT2 y se usó como cebo frente a las formas de *pob1+* y *pob1-ΔPH* (que no interacta con *cdc42+*) clonadas en el plásmido pAS2. La interacción de pAS2-*pob1+* con pACT2-*cdc42+* se utilizó como control positivo del ensayo.

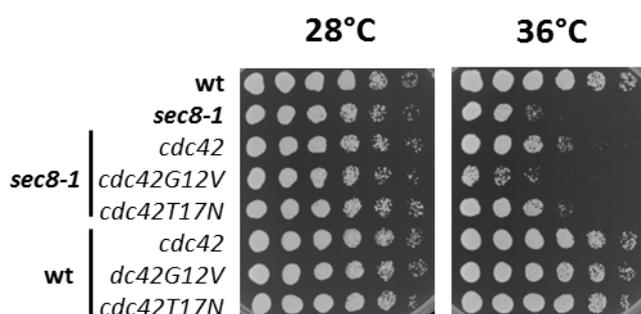


Figura 40. La sobreexpresión de *cdc42+* y *cdc42-T17N* suprimen parcialmente el fenotipo de termosensibilidad de la cepa mutante *sec8-1*. Crecimiento en EMM sin tiamina a las temperaturas indicadas de las cepas silvestre (wt) y *sec8-1* transformadas con pREP41 vacío, pREP41-*cdc42+*, pREP41-*cdc42-G12V* y pREP41-*cdc42-T17N*.

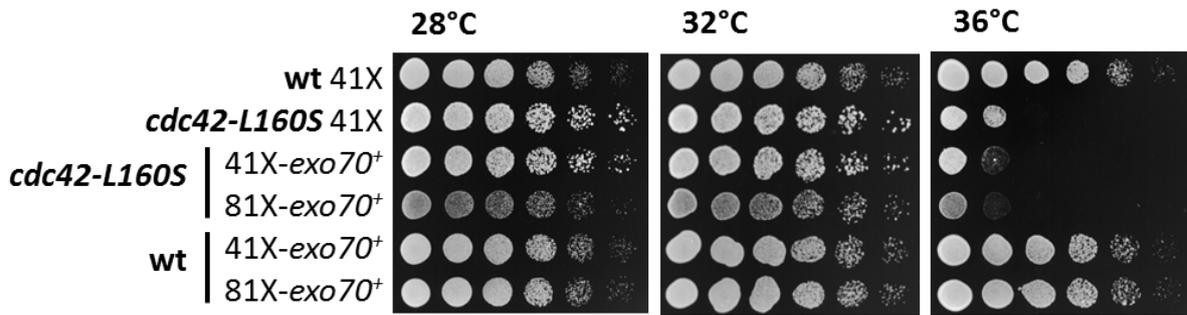


Figura 41. La sobreexpresión de *exo70+* no suprime la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Crecimiento de las cepas silvestre (wt) y *cdc42-L160S* transformadas con pREP41X vacío, pREP41X-*exo70+* y pREP81X-*exo70+* en EMM sin tiamina a las temperaturas indicadas.

La sobreexpresión de la t-SNARE sintaxina, pero no de la V-SNARE sinaptobrevina, suprime la termosensibilidad de *cdc42-L160S*

Las vesículas secretoras se anclan a la membrana plasmática mediante el complejo del excisto y posteriormente se fusionan con ella en un proceso que implica la acción de las proteínas SNARE. Además, en *S. cerevisiae* se ha descrito la regulación del complejo SNARE por el complejo del excisto (Sivaram *et al.*, 2005). Por consiguiente, la falta de complejos del excisto ensamblados en la zona de secreción debe conducir a un descenso de la formación o de la función de los complejos SNARE. Para analizar la posible conexión entre Cdc42 y el aparato excítico, se sobreexpresaron las SNAREs implicadas en el proceso de fusión a la membrana plasmática en la cepa mutante *cdc42-L160S* y se comprobó si se producía la supresión de la termosensibilidad. En *S. pombe*, el gen *psy1+* codifica una proteína esencial, homóloga a la sintaxina 1A (t-SNARE) de mamíferos, que se localiza en la membrana plasmática durante el crecimiento vegetativo (Nakamura *et al.*, 2001). La localización de GFP-Psy1 en la membrana plasmática de las células *cdc42-L160S* era correcta (Figura 42) y la sobreexpresión de esta proteína SNARE fue capaz de suprimir parcialmente la termosensibilidad de las células *cdc42-L160S* (Figura 43). Curiosamente, la sobreexpresión de *psy1+* en la cepa mutante *cdc42-L160S* no recuperaba los defectos de morfología, por el contrario, las células se volvían más redondas y no polarizadas y los cables de actina no se restablecían (Figura 44). El excisto no se polarizaba, pero Sec8-GFP se podía observar por toda la membrana plasmática (Figura 45).

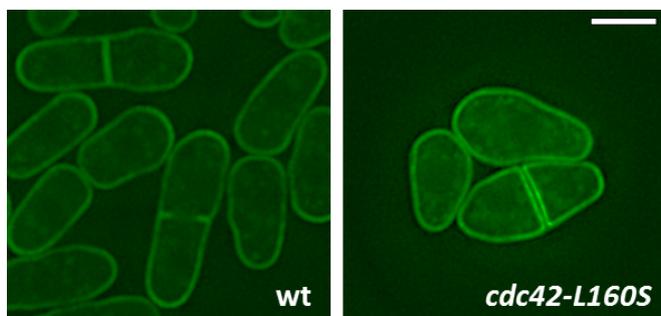


Figura 42. Localización de la sintaxina Psy1 en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Micrografías de fluorescencia de GFP-Psy1 en las cepas silvestre y mutante cultivadas en medio YES a 32°C. La barra corresponde a 5 μ m.

La v-SNARE del complejo SNARE de fusión a membrana plasmática en *S. pombe* es Syb1, de la familia sinaptobrevina/VAMP. Syb1 presenta una alta similitud con las proteínas Snc1 y Snc2 de *S. cerevisiae*, que están relacionadas con las rutas excítica y endocítica (Gurunathan *et al.*, 2000). Syb1 es esencial y se localiza en estructuras citoplasmáticas de tipo vesicular de varios

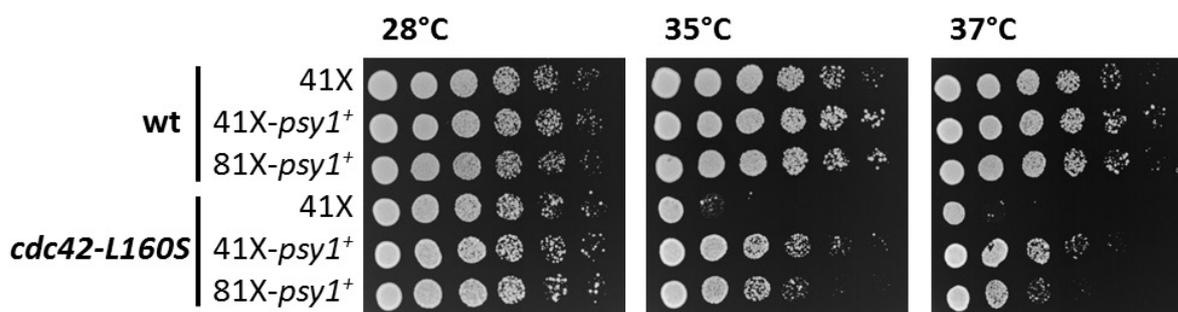


Figura 43. La sobreexpresión de *psy1*⁺ suprime la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Células de las cepas silvestre (wt) y mutante *cdc42-L160S* fueron transformadas con los plásmidos pREP41X , pREP41X-*psy1*⁺ o pREP81X-*psy1*⁺ e incubadas en EMM en ausencia de tiamina a las temperaturas indicadas.

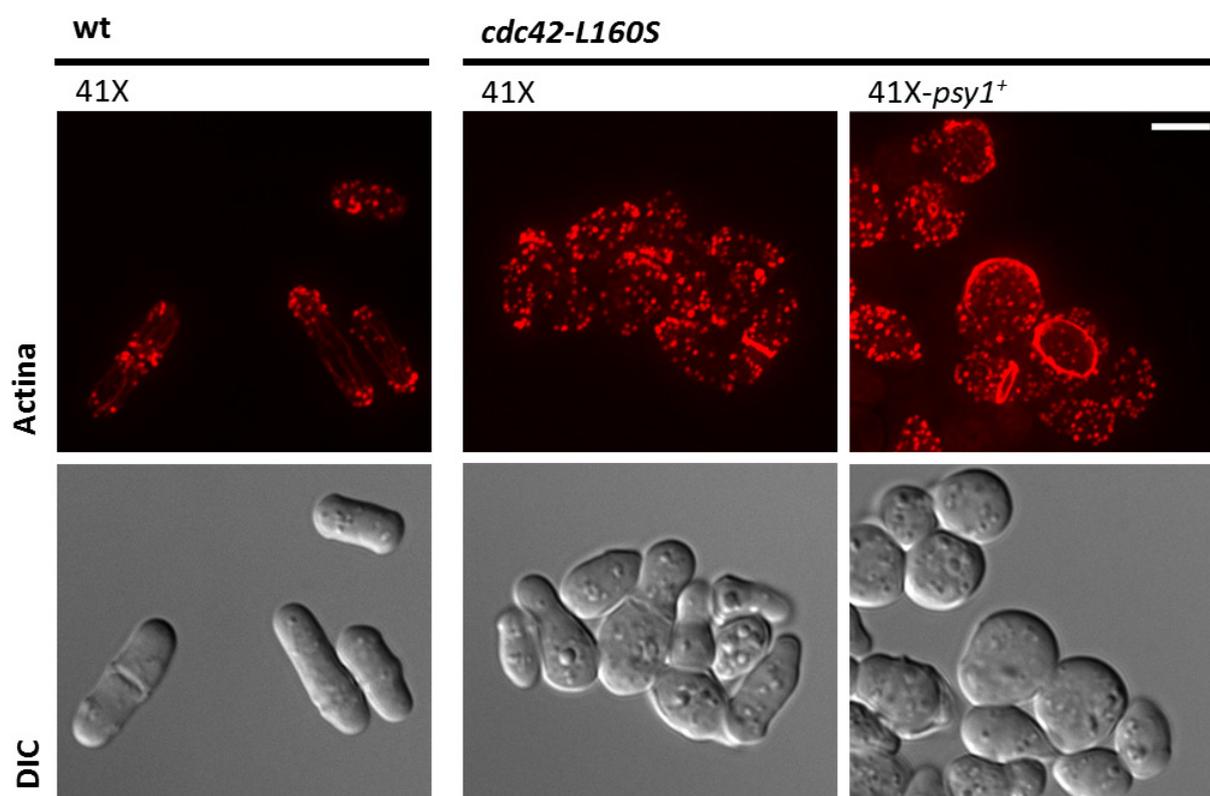


Figura 44. La sobreexpresión de *psy1*⁺ no restaura la organización de la actina de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Micrografías de la tinción con AlexaFluor 488-Faloidina de las cepas silvestre y mutante transformadas con los plásmidos pREP indicados. Las células se cultivaron a 32°C en EMM sin tiamina durante 15 horas antes de ser teñidas. La barra corresponde a 5 µm.

tamaños (Edamatsu y Toyoshima, 2003). Estas vesículas se concentran en la zona media y en los polos, donde GFP-Syb1 también se observa en la membrana plasmática (Figura 46). En las células de la cepa mutante *cdc42-L160S*, GFP-Syb1 se observaba por todo el citoplasma, acumulada en estructuras vesiculares heterogéneas que emitían una elevada fluorescencia y eran mucho más abundantes que en las células silvestres (Figura 46). Además, la sobreexpresión de Syb1 en la cepa *cdc42-L160S* no suprime su termosensibilidad, sino que ejerce un efecto perjudicial (Figura 47).

De acuerdo con estos resultados, la cepa mutante *cdc42-L160S* tiene defectos en tráfico de membranas y en fusión de vesículas a la membrana plasmática que pueden ser recuperados mediante la sobreexpresión de la t-SNARE de la membrana plasmática pero no de la v-SNARE.

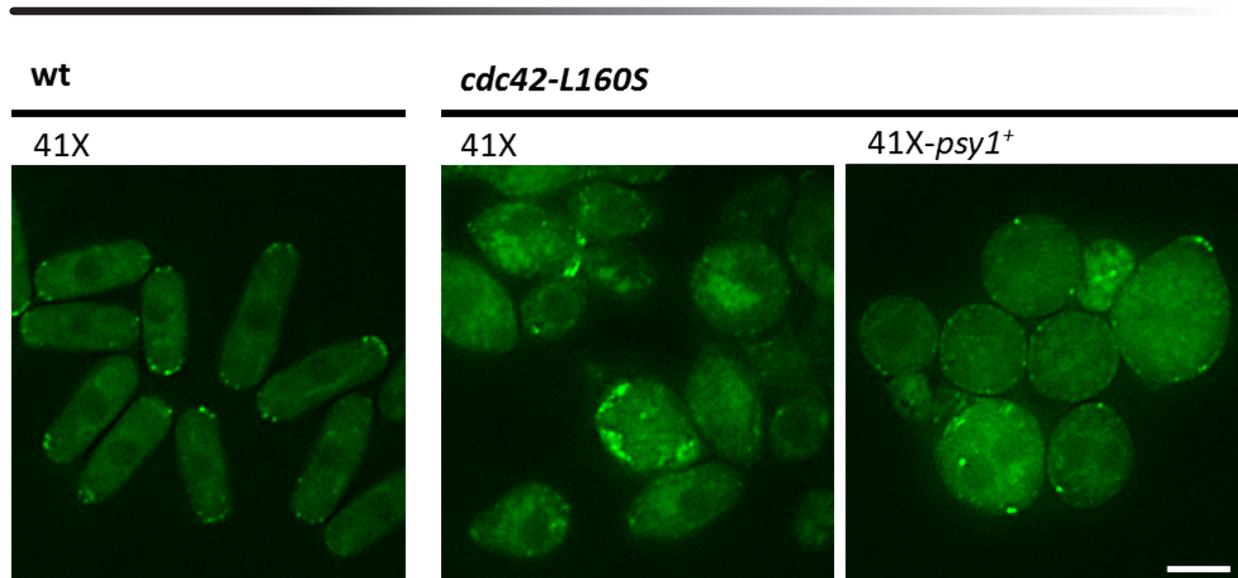


Figura 45. La sobreexpresión de *psy1*⁺ no polariza la localización de Sec8-GFP en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Imágenes de fluorescencia de la localización de Sec8-GFP en células de las cepas silvestre y mutante transformadas con los plásmidos pREP indicados. Las células se cultivaron a 32°C en EMM sin tiamina durante 15 horas. La barra corresponde a 5 µm.

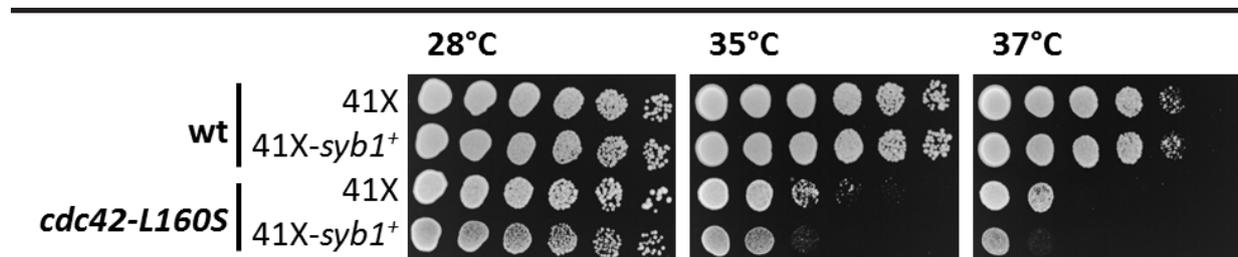
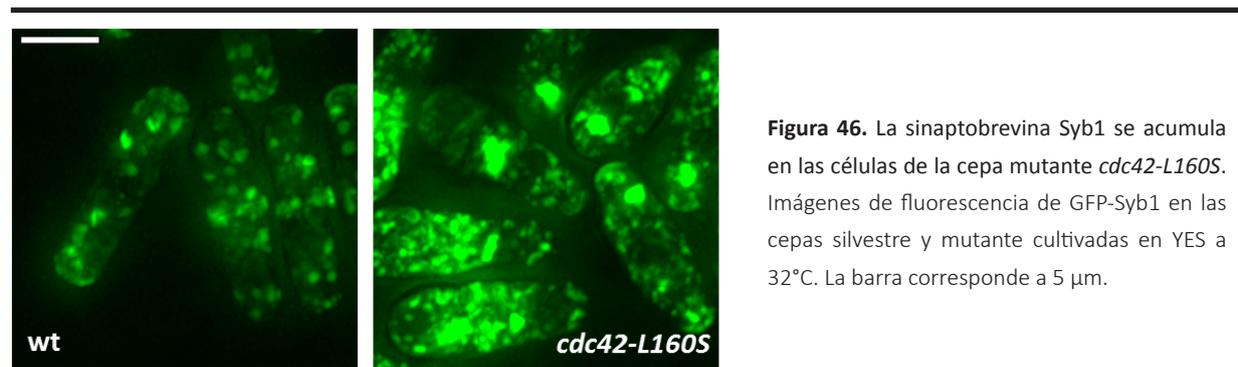


Figura 47. La sobreexpresión de la sinaptobrevina *syb1*⁺ agrava la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Las células de las cepas silvestre y mutante transformadas con los plásmidos pREP41X o pREP41X-*syb1*⁺ se incubaron en EMM sin tiamina a las temperaturas indicadas.

La sobreexpresión de *ypt2*⁺ suprime la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*

Como se mencionó en la Introducción, Sec4 es una GTPasa de la familia Rab que se encuentra altamente concentrada en vesículas secretoras destinadas a fusionarse con la membrana plasmática (Goud *et al.*, 1988). Se ha descrito que Sec4 es necesaria para la formación del complejo SNARE y para la fusión de vesículas con la membrana plasmática (Grosshans *et al.*, 2006) y que tanto la subunidad Sec15 del complejo del exocisto como la proteína de unión a la t-SNARE Sro7, son dianas de Sec4. La proteína ortóloga de Sec4 en *S. pombe* es Ypt2, que también participa en las últimas etapas de la ruta secretora (Craighead *et al.*, 1993). Para estudiar la posible

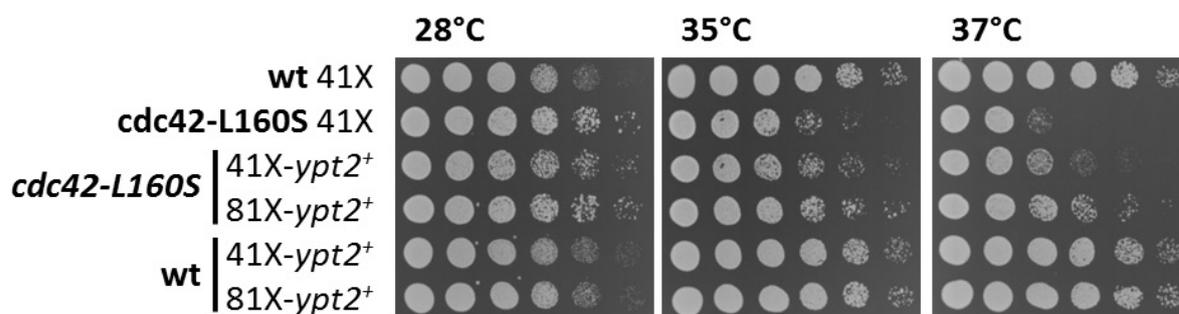


Figura 48. La sobreexpresión de *ypt2*⁺ suprime parcialmente la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Crecimiento de las cepas silvestre y mutante transformadas con los plásmidos pREP41X , pREP41X-*ypt2*⁺ o pREP81X-*ypt2*⁺ . Las células se incubaron en EMM sin tiamina a las temperaturas indicadas.

interacción funcional de Cdc42 y los reguladores de la fusión de membranas, se sobreexpresó *ypt2*⁺ en la cepa mutante *cdc42-L160S* y se analizó el crecimiento celular. La sobreproducción de Ypt2 fue capaz de recuperar el crecimiento de las células *cdc42-L160S* a la temperatura restrictiva de 36°C (Figura 48). Además, la sobreexpresión de *ypt2*⁺ también mejoró la morfología celular, apareciendo células más alargadas que en la cepa transformada con el plásmido control (Figura 49). A pesar de la mejora morfológica, la localización de Sec8-GFP no variaba significativamente en estas células (Figura 50). Tampoco se encontró mejoría en la formación de cables de actina, aunque los parches sí estaban más polarizados (Figura 51). Todos estos resultados indican que la sobreproducción de Ypt2 mejora parcialmente el crecimiento a temperaturas restrictivas y la morfología de las células *cdc42-L160S* independientemente de la localización del exocisto. Es posible que la polarización de los parches de actina se deba a un aumento en la secreción polarizada en las áreas donde previamente existía crecimiento polarizado (Gao *et al.*, 2003). Estos resultados también apoyan la hipótesis de que las células *cdc42-L160S* tienen defectos en la fusión de vesículas a la membrana plasmática que son mejorados al sobreexpresar Ypt2 o la t-SNARE Psy1.

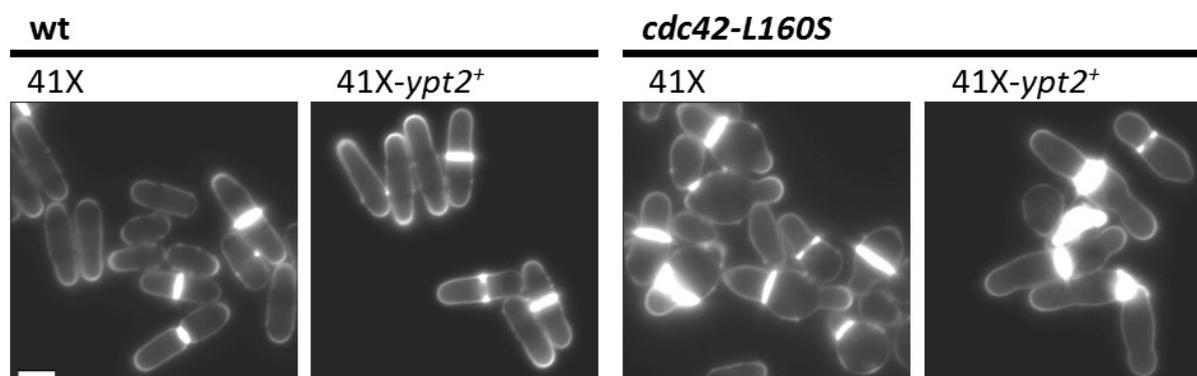


Figura 49. La sobreexpresión de *ypt2*⁺ mejora la morfología de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Imágenes de fluorescencia de células silvestres y mutantes transformadas con los plásmidos pREP41X y pREP41X-*ypt2*⁺ cultivadas e EMM sin tiamina durante 18 horas a 32°C y teñidas con calcoflúor white. La barra corresponde a 5 µm.

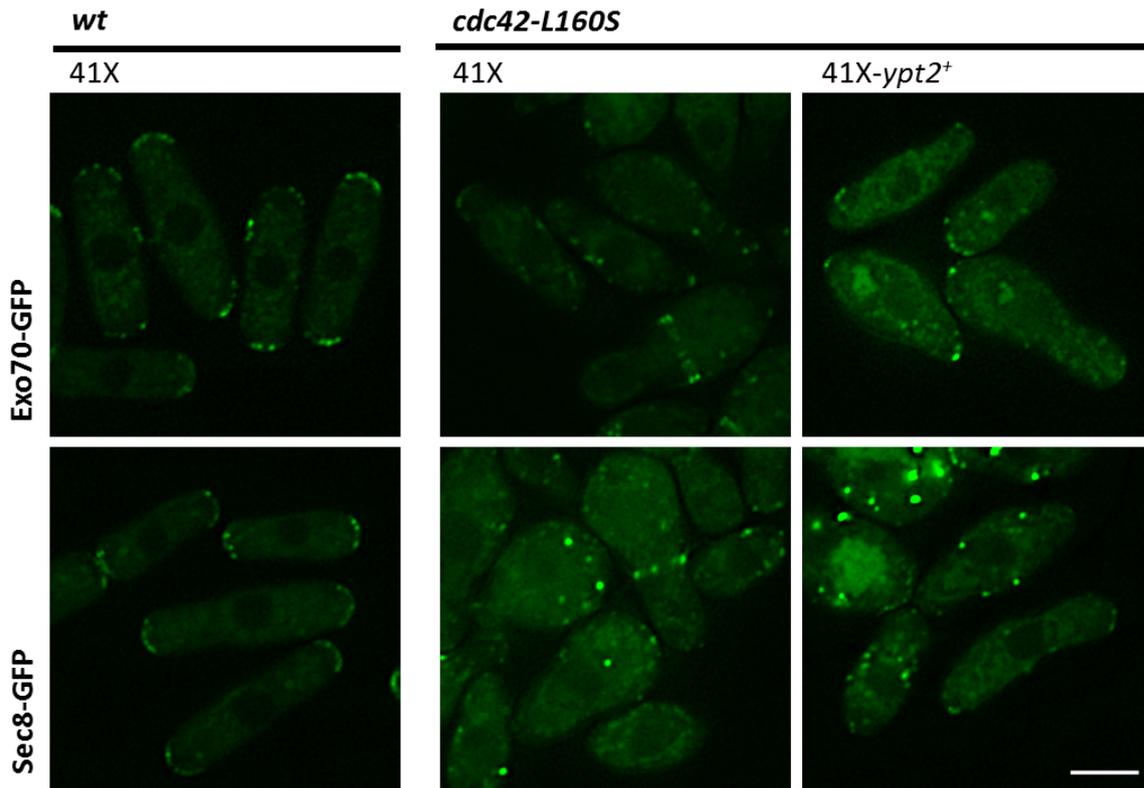


Figura 50. La sobreexpresión de *ypt2*⁺ no mejora la localización del exocisto en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Micrografías de fluorescencia de las proteínas Exo70-GFP y Sec8-GFP en las cepas silvestre y mutante transformadas con los plásmidos indicados. Las células se incubaron en EMM sin tiamina durante 18 horas a 32°C. La barra corresponde a 5 µm.

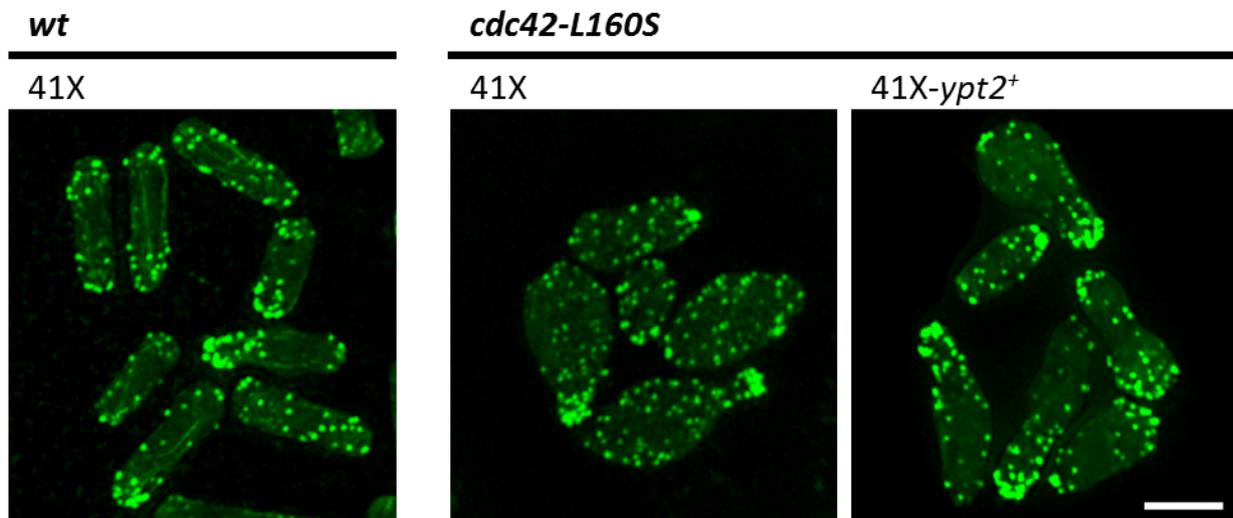


Figura 51. La sobreexpresión de *ypt2*⁺ repolariza los parches de actina en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Tinción de actina con AlexaFluor 488-Faloidina en células de la cepa silvestre y mutante transformadas con los plásmidos pREP41X o pREP41X-*ypt2*⁺. Las células se cultivaron en EMM sin tiamina a 32°C durante 18 horas antes de ser teñidas. La barra corresponde a 5 µm.

La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos en la incorporación de FM4-64 y en la formación de vacuolas

Una parte considerable de GFP-Cdc42 se localiza en la membrana de las vacuolas y la microscopía electrónica mostró que las células de la cepa mutante *cdc42-L160S* tienen las vacuolas fragmentadas (Figuras 21 y 24). Esto sugiere que Cdc42 podría participar en el proceso

de la fusión de membranas de endosomas a vacuolas en *S. pombe*, como ya se ha descrito en *S. cerevisiae* (Eitzen *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001). Para visualizar las vacuolas se utiliza el colorante CDCFDA (5,6-carboxi-2',7'-diclorofluoresceína diacetato) que es un compuesto derivado del diacetato de fluoresceína (FDA) que se hidroliza a pH ácido. En la vacuola, por tanto, se libera la fluoresceína y esto permite el marcaje específico de las mismas (Pringle *et al.*, 1989). La tinción con CDCFDA corroboró que en la cepa mutante *cdc42-L160S* existen defectos vacuolares y el número de vacuolas está aumentado. Estos defectos no son debidos a la falta cables de actina, puesto que la cepa *for3Δ* no los muestra (Figura 52).

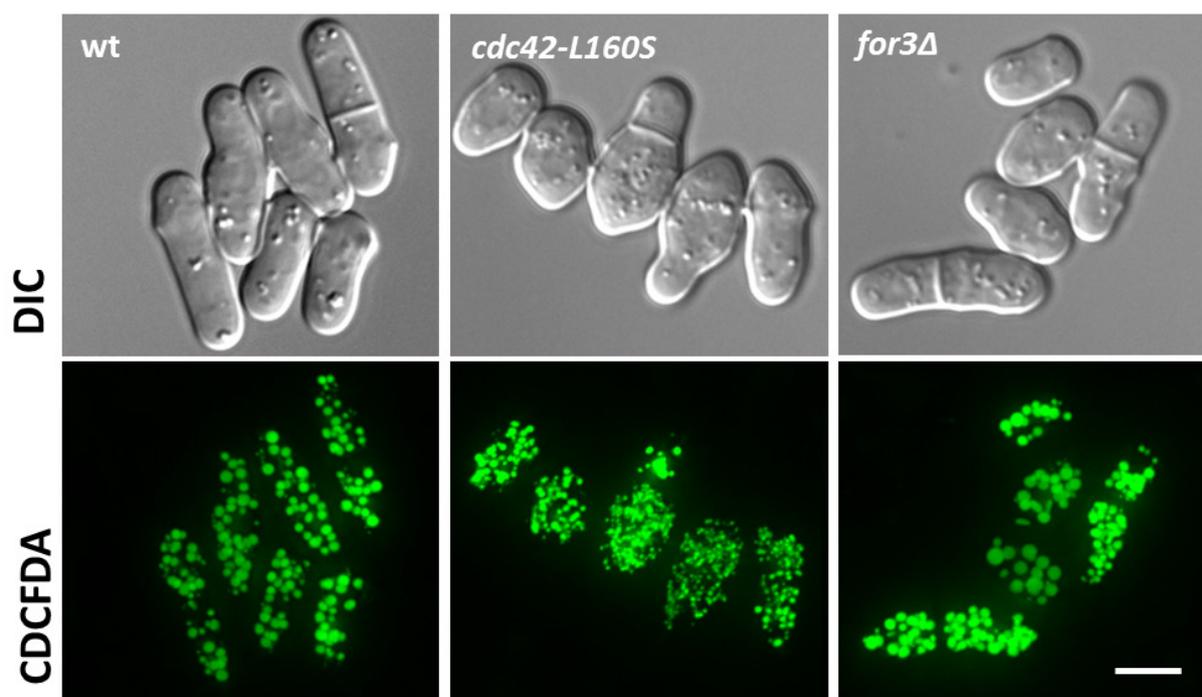


Figura 52. La cepa mutante *cdc42-L160S* tiene las vacuolas fragmentadas. Tinción de vacuolas de células de las cepas silvestre, *cdc42-L160S* y *for3Δ* mediante el colorante CDCFDA. La barra corresponde a 5 μ m.

El colorante de estirilo FM4-64 es un compuesto orgánico lipofílico con propiedades fluorescentes que se internaliza desde la membrana plasmática y se utiliza como marcador *in vivo* de la ruta endocítica y de las vacuolas (Betz *et al.*, 1992; Betz *et al.*, 1996). En *S. pombe*, la internalización del colorante FM4-64 ocurre en las zonas de crecimiento (Gachet y Hyams, 2005). Para ver si las células de la cepa mutante *cdc42-L160S* tenían defectos en endocitosis, realizamos un estudio del transporte de FM4-64 a las vacuolas en células de la cepa silvestre, *cdc42-L160S* y *for3Δ*. Tras incubar las células en hielo con FM4-64 durante 30 minutos, se lavaron y fueron examinadas a diferentes tiempos usando microscopía de fluorescencia (Figura 53). La incorporación de FM4-64 desde la membrana a los compartimentos intermedios tras 15 minutos fue similar en todas las cepas. Por el contrario, mientras que el colorante marcaba las vacuolas entre los 30 y 60 minutos en las cepas silvestre y *for3Δ*, las células de la cepa *cdc42-L160S* mostraban una tinción borrosa del citoplasma y de cuerpos vacuolares fragmentados y pequeños, incluso transcurridos 60 minutos desde el lavado del colorante. Este ensayo cinético indica que Cdc42 podría estar implicado en el tráfico de membranas desde los endosomas a las vacuolas.

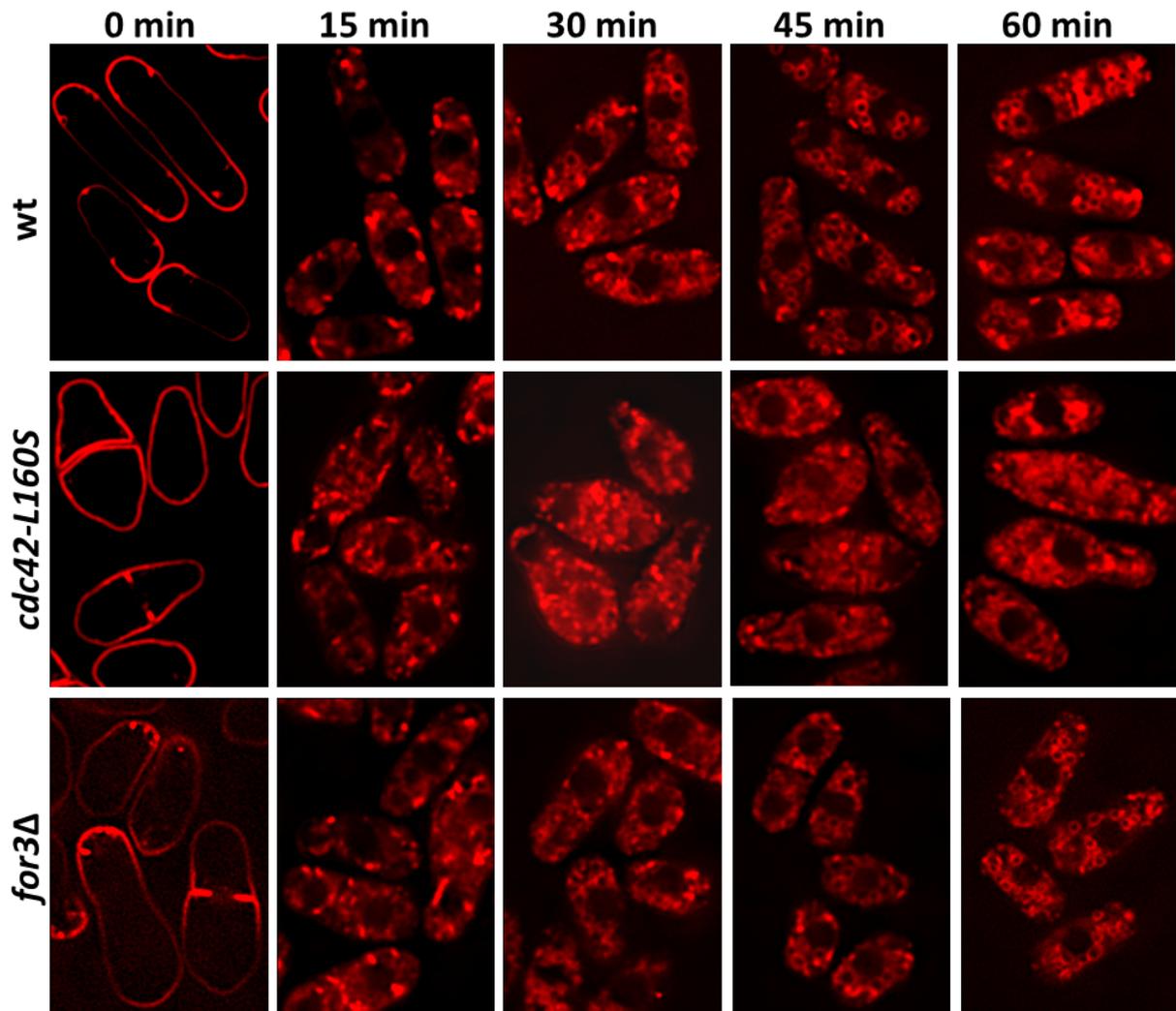


Figura 53. Cinética de internalización del colorante FM4-64 en células de las cepas silvestre, *cdc42-L160S* y *for3Δ*. Las células se cultivaron en medio YES a 32°C y posteriormente se realizó la tinción con FM4-64. Tras incubar las células en hielo durante 30 minutos, se lavaron y se tomaron imágenes a los tiempos mostrados.

La cepa mutante *cdc42-L160S* tiene defectos en la llegada de la carboxipeptidasa Y a la vacuola

Para estudiar el posible papel de Cdc42 en el tráfico de membranas desde los endosomas a las vacuolas, se examinó el efecto de la mutación *cdc42-L160S* en el transporte de la hidrolasa Cpy1 a la vacuola. Defectos en el transporte desde los endosomas tardíos hacia la vacuola o defectos en la biogénesis de las vacuolas pueden bloquear la llegada de la carboxipeptidasa a las vacuolas, provocando su secreción al exterior de la célula (Iwaki *et al.*, 2006; Miyatake *et al.*, 2007). La secreción de Cpy1 se evaluó utilizando un ensayo de inmunoblot de colonias (Conibear y Stevens, 2002) con un anticuerpo monoclonal anti-carboxipeptidasa desarrollado para *S. cerevisiae* que también reconoce la proteína Cpy1 de *S. pombe*. Como control negativo

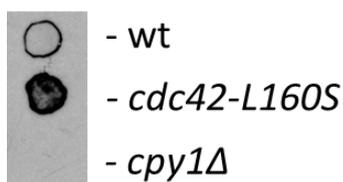


Figura 54. La cepa mutante *cdc42-L160S* tiene defecto en el tráfico de carboxipeptidasa Y. Inmunoblot de colonias de las cepas silvestre, *cdc42-L160S* y *cpy1Δ* utilizando el anticuerpo anti-Cpy1 de *S. cerevisiae*.

para el ensayo se utilizó la cepa mutante *cpy1Δ*. Como se indica en la Figura 54, las células de la cepa *cdc42-L160S* secretan Cpy1 de manera anormal, lo cual indica que Cdc42 es necesaria para que Cpy1 llegue a la vacuola.

Los supresores de la termosensibilidad de la cepa *cdc42-L160S* identificados corrigen los defectos en el tráfico de membranas en diferente grado

Para comprobar si los genes supresores de la termosensibilidad de *cdc42-L160S* también eran capaces de corregir los defectos en el tráfico de membranas observados en esta cepa, primero se analizó la localización de GFP-Syb1 en células *cdc42-L160S* transformadas con plásmidos de sobreexpresión pREP41X que contenían la ORF de los genes *pob1⁺*, *rho3⁺*, *psy1⁺* e *ypt2⁺*. En todos los casos se observó que la acumulación de estructuras marcadas con GFP-Syb1 disminuía en las células transformadas con los distintos supresores (Figura 55), aunque la localización de la señal en los polos es más evidente en las células transformadas con *pob1⁺* e *ypt2⁺*.

La tinción con CDCFDA reveló que la morfología y el tamaño de las vacuolas mejoraban también en las células que sobreexpresaban los genes supresores (Figura 56). Si bien, en la sobreexpresión de *ypt2⁺* sólo se producía un pequeño incremento en el tamaño de las vacuolas (Figura 57). La cinética del transporte de FM4-64 a las vacuolas en las células transformadas con los plásmidos de sobreexpresión de los genes anteriormente citados mostró que la membrana vacuolar estaba teñida con FM4-64 tras 60 minutos en todos los casos (Figura 58).

Por último, el ensayo de secreción de Cpy1 mediante inmunoblot de colonias mostró que la sobreexpresión de los genes *pob1⁺*, *rho3⁺*, *psy1⁺* e *ypt2⁺* era capaz de reducir, en distinto grado, la secreción de Cpy1 en la cepa *cdc42-L160S* (Figura 59).

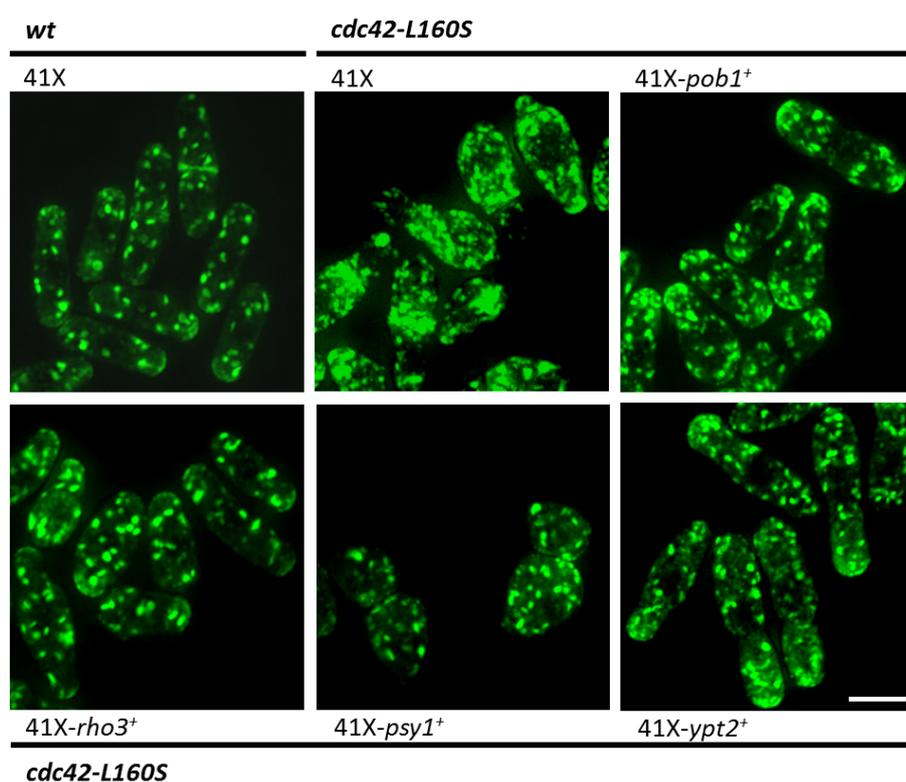


Figura 55. Los supresores de la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* mejoran la localización de GFP-Syb1. Micrografías de fluorescencia de la localización de GFP-Syb1 en células de la cepa silvestre transformadas con el plásmido pREP41X vacío y células de la cepa mutante transformadas con los plásmidos pREP41X vacío o conteniendo la ORF de *pob1⁺*, *rho3⁺*, *psy1⁺* o *ypt2⁺*. Las células se cultivaron en EMM sin tiamina durante 15 horas a 32°C. La barra corresponde a 5 μm.

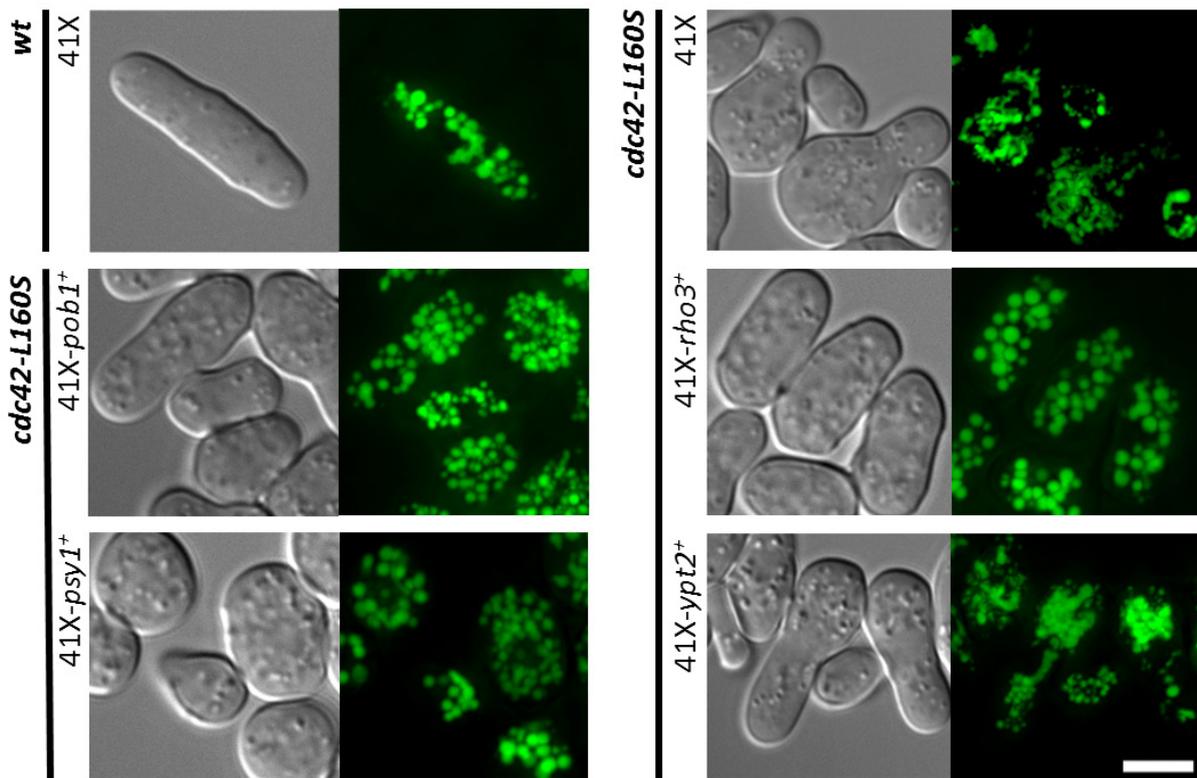


Figura 56. Los supresores de la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* mejoran la morfología de las vacuolas en diferente grado. Tinción de vacuolas con CDCFDA de células de las cepas silvestre y mutante transformadas con los plásmidos pREP41X o conteniendo la ORF de *pob1+*, *rho3+*, *psy1+* o *ypt2+*. Se muestran micrografías de fluorescencia y contraste de fases de células cultivadas en EMM sin tiamina durante 15 horas a 32°C. La barra corresponde a 5 μ m.

En conjunto, todos estos resultados indican que la sobreproducción de las proteínas Pob1, Rho3, Psy1 e Ypt2 aumenta, por diferentes mecanismos, el tráfico de membranas y la secreción de la cepa *cdc42-L160S*.

También se realizó el estudio mediante microscopía electrónica de transmisión de células de la cepa *cdc42-L160S* que sobreexpresaban *pob1+* o *rho3+*. Como se puede ver en la **Figura 60**, muchos de los agregados membranosos densos a los electrones que se observan en las células *cdc42-L160S* parecen estar dentro o conectados con las vacuolas fragmentadas. Las células que sobreexpresaban *pob1+* o *rho3+* carecen de estos agregados de membranas, aunque algunas

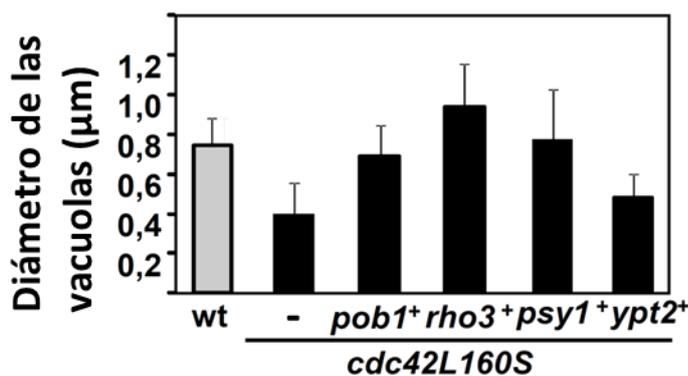


Figura 57. Los supresores de la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* mejoran el tamaño de las vacuolas en diferente grado. Medida del diámetro medio de las vacuolas en células de las cepas silvestre y mutante transformadas con plásmidos pREP41X portando la ORF de *pob1+*, *rho3+*, *psy1+* o *ypt2+*. Las medidas se realizaron en vacuolas teñidas con CDCFDA, de células cultivadas en EMM sin tiamina durante 16 horas a 32°C. Las barras de error corresponden a la desviación típica (n=200).

estructuras membranosas, parecidas a cuerpos de Berkeley (Kita *et al.*, 2011; Novick *et al.*, 1980) persisten dentro de las vacuolas, principalmente en las células que sobreexpresaban *pob1*⁺. Estas micrografías corroboran que la sobreexpresión de *pob1*⁺ o *rho3*⁺ supriman parcialmente los defectos en la fusión de vacuolas y el tráfico de membranas observados en las células *cdc42-L160S*.

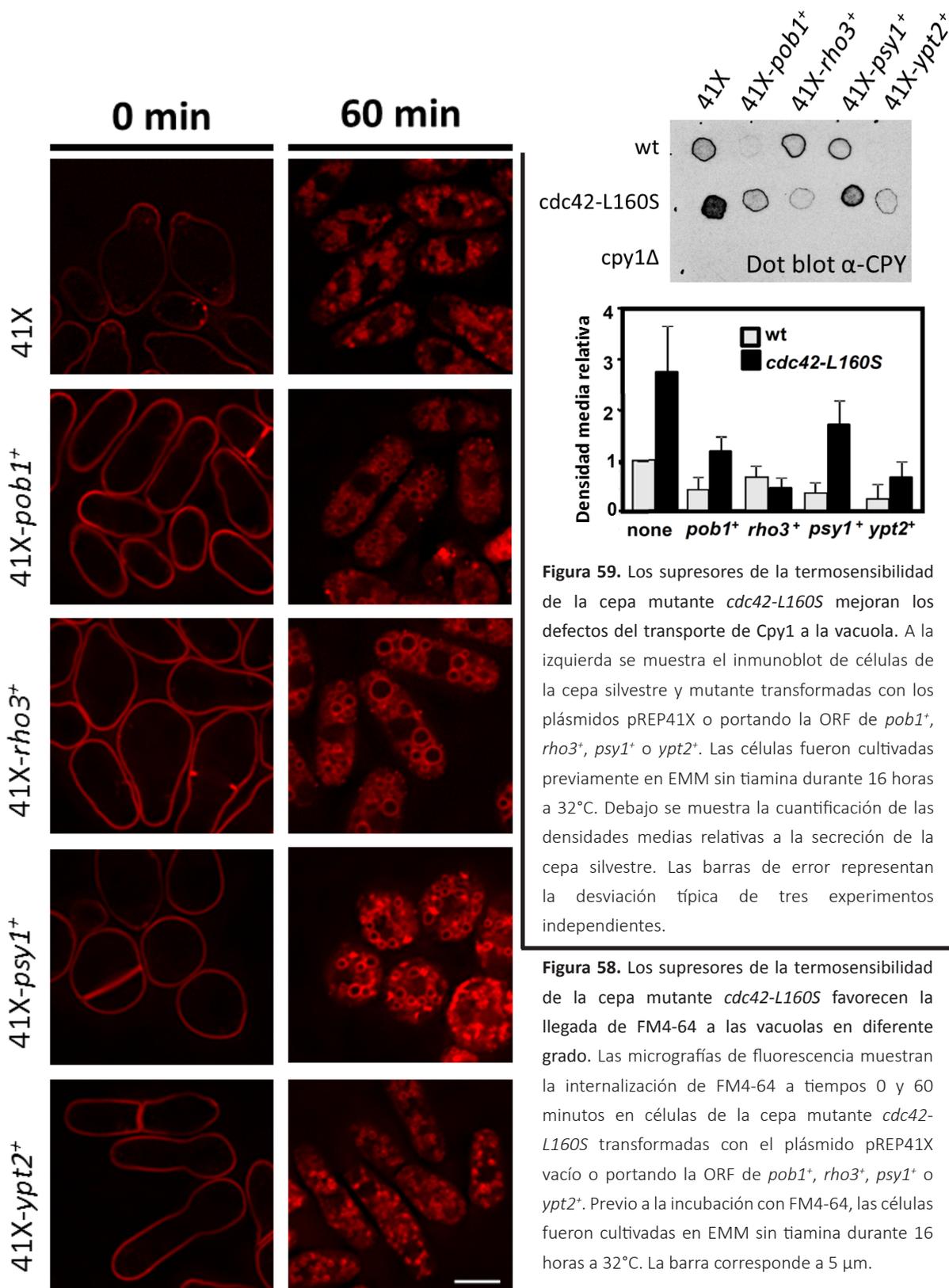


Figura 59. Los supresores de la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* mejoran los defectos del transporte de Cpy1 a la vacuola. A la izquierda se muestra el inmunoblot de células de la cepa silvestre y mutante transformadas con los plásmidos pREP41X o portando la ORF de *pob1*⁺, *rho3*⁺, *psy1*⁺ o *ypt2*⁺. Las células fueron cultivadas previamente en EMM sin tiamina durante 16 horas a 32°C. Debajo se muestra la cuantificación de las densidades medias relativas a la secreción de la cepa silvestre. Las barras de error representan la desviación típica de tres experimentos independientes.

Figura 58. Los supresores de la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* favorecen la llegada de FM4-64 a las vacuolas en diferente grado. Las micrografías de fluorescencia muestran la internalización de FM4-64 a tiempos 0 y 60 minutos en células de la cepa mutante *cdc42-L160S* transformadas con el plásmido pREP41X vacío o portando la ORF de *pob1*⁺, *rho3*⁺, *psy1*⁺ o *ypt2*⁺. Previo a la incubación con FM4-64, las células fueron cultivadas en EMM sin tiamina durante 16 horas a 32°C. La barra corresponde a 5 µm.

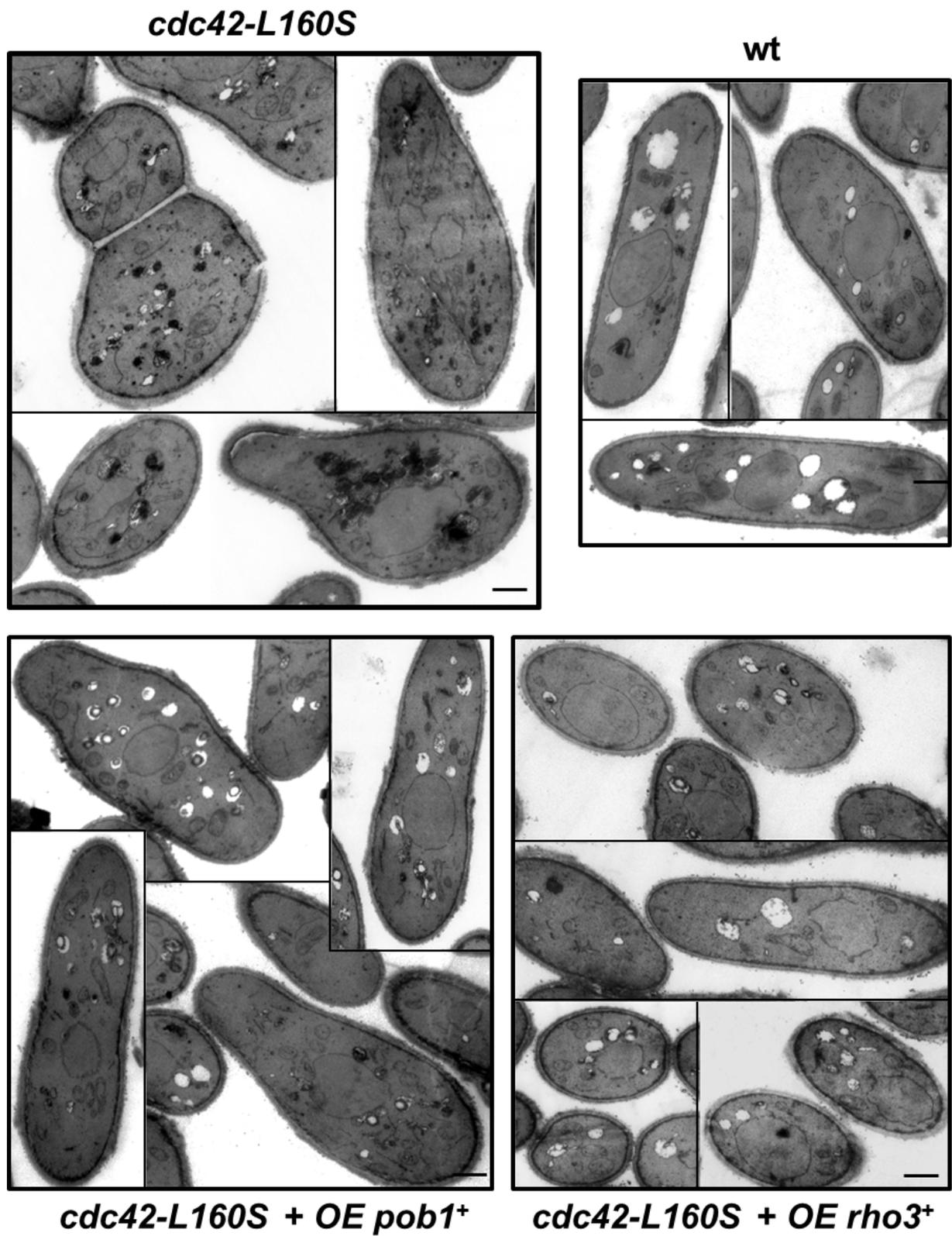


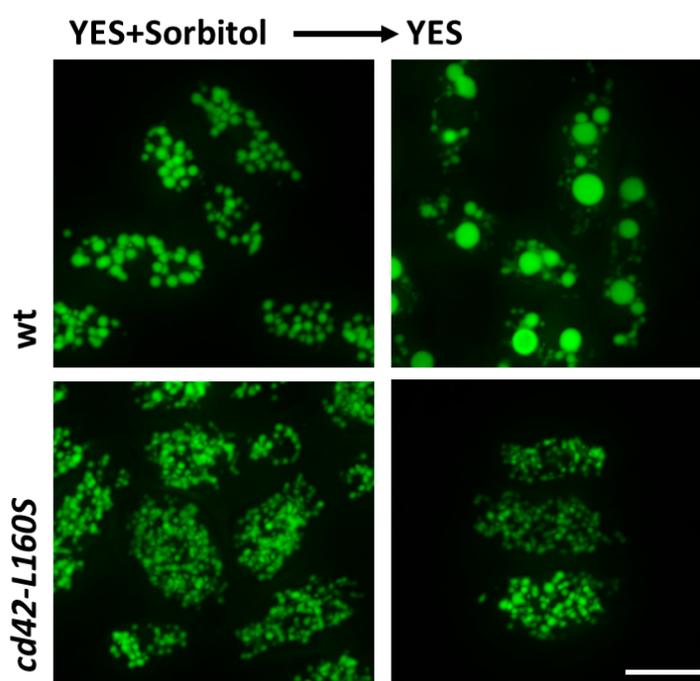
Figura 60. Microscopía electrónica de transmisión de célula de las cepas silvestre y mutante *cdc42-L160S* transformadas con pREP41X , pREP41X-*pob1*⁺ o pREP41X-*rho3*⁺. Las células se incubaron en EMM sin tiamina durante 15 horas a 32°C y posteriormente se fijaron con permanganato potásico para resaltar las estructuras membranas. Las barras corresponden a 2 μm. OE (*overexpression*, sobreexpresión)

***cdc42-L160S* tiene defectos en la fusión homotípica de vacuolas**

Como se indica en la Introducción, las levaduras, y en particular *S. pombe*, controlan la fusión y la fisión de las vacuolas como mecanismo regulador que les permite adaptarse a diversas situaciones de estrés, como el estrés osmótico (Bone *et al.*, 1998). Puesto que la cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos en la morfología y el tamaño de las vacuolas, se realizó una prueba para comprobar si las vacuolas de la cepa mutante eran capaces de responder a situaciones de estrés hipo-osmótico. Para ello se realizó una tinción de CDCFDA en células de las cepas silvestre y *cdc42-L160S* cultivadas en medio YES con sorbitol 1,2 M a temperatura semipermissiva y se transfirieron a medio YES sin sorbitol. Tras 10 minutos, en la cepa silvestre se pudo observar que las vacuolas se habían fusionado para formar pocas vacuolas de gran tamaño (Figura 61). Por el contrario, en las células de la cepa mutante *cdc42-L160S* no se observó ningún cambio en la morfología y tamaño de sus vacuolas (Figura 61).

En *S. cerevisiae* se ha demostrado que el estrés hiperosmótico estimula la producción de PtdIns(3,5) P_2 (Saunders *et al.*, 2012). En *S. pombe*, la PtdIns3P 5-quinasa Ste12/Fab1 se encarga de catalizar la formación de PtdIns(3,5) P_2 en la vacuola (McEwen *et al.*, 1999; Morishita *et al.*, 2002). En su ausencia, las vacuolas no son capaces de dividirse y ocupan la mayor parte del citoplasma. La cepa mutante *ste12-N9* muestra vacuolas de gran tamaño que pueden desplazar al núcleo del centro de la célula (Kitamura *et al.*, 1990). La ausencia de PtdIns(3,5) P_2 en estas células permite que sea un buen modelo para estudiar el estado de las vacuolas independientemente de los procesos que pudieran conducir a la fisión de las mismas. Así, en la cepa mutante *cdc42-L160S* con este fondo genético, el estado de las vacuolas dependería solo de los procesos de formación y fusión de las vacuolas. La tinción con CDCFDA mostró que la cepa doble mutante *cdc42-L160S ste12-N9* tiene vacuolas de gran tamaño, pero no tan grandes como las del mutante sencillo *ste12-N9* (Figura 62). Estos datos sugieren que la cepa mutante *cdc42-L160S* tiene defectos en la fusión homotípica de vacuolas.

Figura 61. Las vacuolas de la cepa mutante *cdc42-L160S* no responden al estrés hipoosmótico. Imágenes de fluorescencia de vacuolas teñidas con CDCFDA en células de las cepas silvestre y mutante cultivadas a 32°C en YES con sorbitol 1,2M (izquierda) y tras 10 minutos de ser transferidas a YES (derecha). La barra corresponde a 5 μ m.



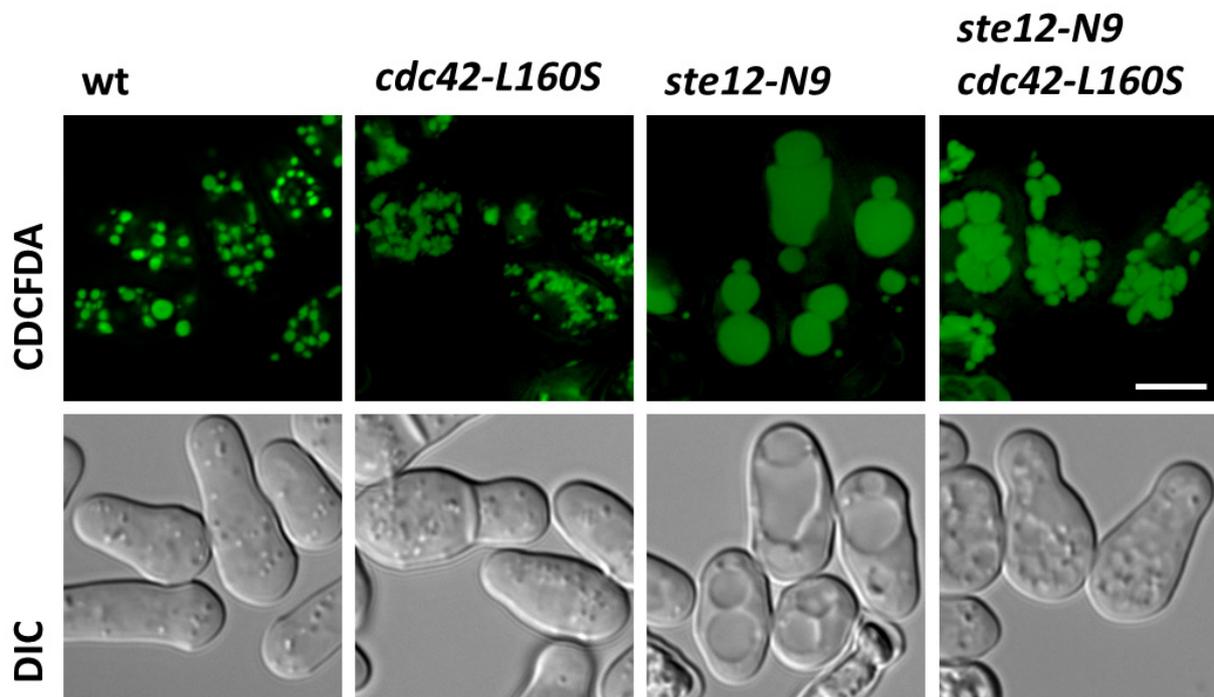


Figura 62. La cepa mutante *cdc42-L160S* presenta defectos de fusión vacuolar. Micrografías de fluorescencia de vacuolas teñidas con CDCFDA en las cepas indicadas. Las células se cultivaron a 32°C en medio YES. La barra corresponde a 5 μ m.

Existe interacción genética entre la cepa mutante *cdc42-L160S* y las GTPasas Rab de la vacuola

La fusión de las vacuolas en *S. pombe* está regulada directamente por la GTPasa de la familia Rab Ypt7 e indirectamente por la GTPasa de la familia Rab Ypt71 (Kashiwazaki *et al.*, 2009). Por ello se decidió estudiar la interacción genética entre estas GTPasas y *cdc42-L160S*.

La GTPasa homóloga de Rab7, Ypt7, regula la fusión de las vacuolas y en su ausencia las vacuolas se encuentran altamente fragmentadas y las células no pueden fusionar sus vacuolas en respuesta a estrés hipo-osmótico (Bone *et al.*, 1998). La sobreexpresión de *ypt7⁺* en la cepa mutante *cdc42-L160S* suprime parcialmente su termosensibilidad (Figura 63), mientras que el doble mutante *cdc42-L160S ypt7 Δ* presenta un fenotipo de termosensibilidad más severo que

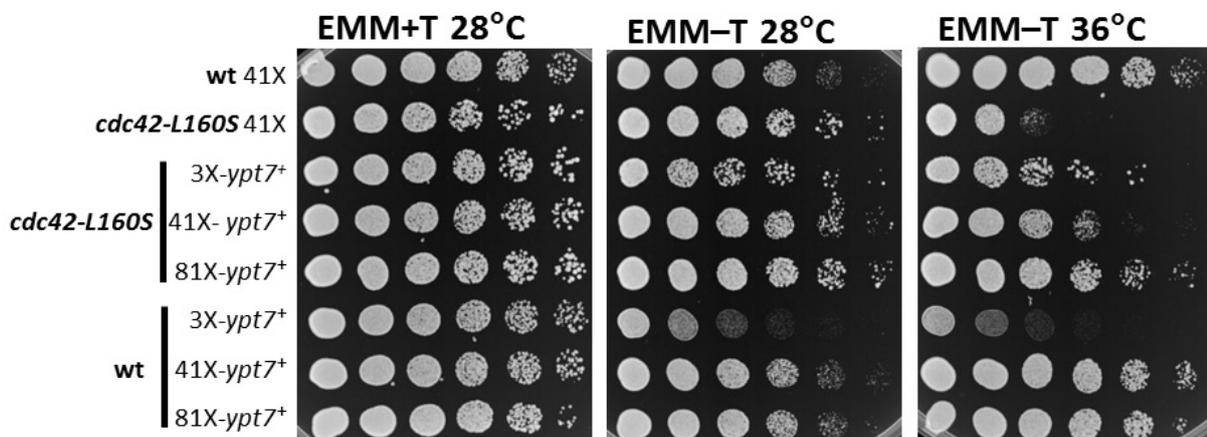


Figura 63. La sobreexpresión de *ypt7⁺* suprime la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Crecimiento de las cepas silvestre (wt) y mutante transformadas con los plásmidos pREP41X, pREP3X-*ypt7⁺*, pREP41X-*ypt7⁺* o pREP81X-*ypt7⁺* incubadas en EMM con y sin tiamina (T) a las temperaturas indicadas.

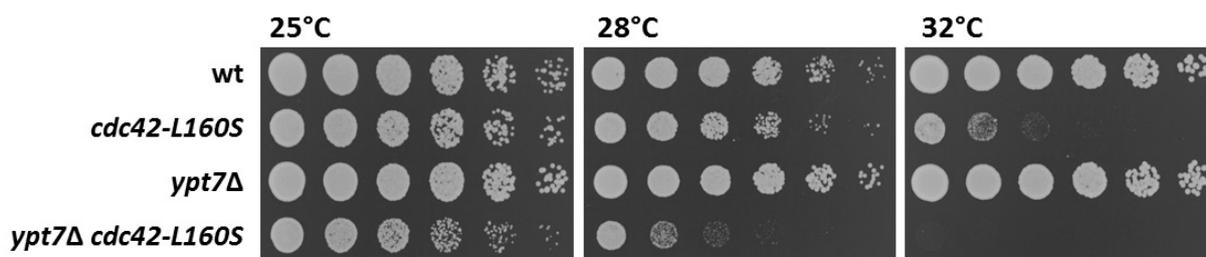


Figura 64. La delección de *ypt7⁺* agrava la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Crecimiento de células de las cepas silvestre (wt), *cdc42-L160S*, *ypt7Δ* y *cdc42-L160S ypt7Δ* en medio YES incubadas a las temperaturas indicadas.

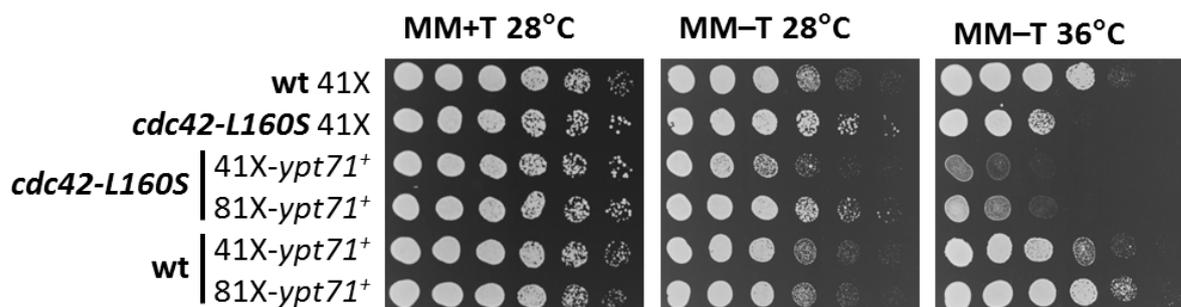


Figura 65. La sobreexpresión de *ypt71⁺* agrava la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Crecimiento de células de las cepas silvestre (wt) y mutante transformadas con el plásmido pREP41X, pREP41X-*ypt71⁺* y pREP81X-*ypt71⁺*. Las células se incubaron en EMM en presencia y en ausencia de tiamina (T) a las temperaturas indicadas.

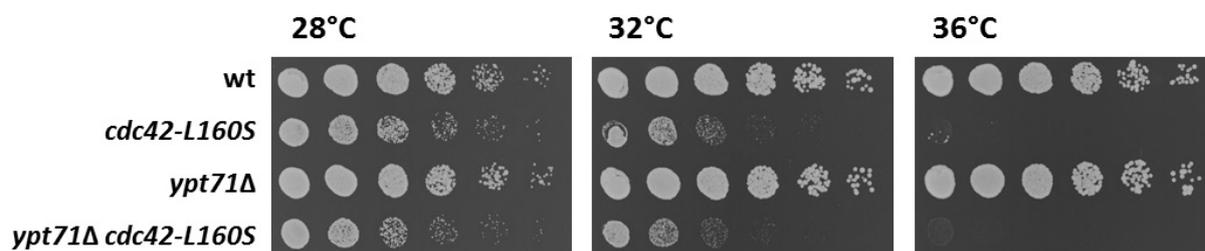


Figura 66. La delección de *ypt71⁺* no afecta a la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Crecimiento de células de las cepas silvestre (wt), *cdc42-L160S*, *ypt71Δ* y *cdc42-L160S ypt71Δ* en medio YES a las temperaturas indicadas.

los mutantes sencillos (Figura 64).

Se ha propuesto que la GTPasa Ypt71 actúa como regulador negativo de Ypt7, por lo que en ausencia de Ypt71, Ypt7 estaría más activa y por tanto las vacuolas son más grandes (Kashiwazaki *et al.*, 2009). Como era de esperar, la sobreexpresión de *ypt71⁺* en la cepa mutante *cdc42-L160S* no suprimió la termosensibilidad de las células *cdc42-L160S*, por el contrario, en dosis elevadas, esta proteína resulta más tóxica en *cdc42-L160S* que en la cepa silvestre (Figura 65). Por otro lado, el doble mutante *cdc42-L160S ypt71Δ* resultó ser tan termosensible como la cepa *cdc42-L160S* (Figura 66).

Mediante tinción de vacuolas con el colorante CDCFDA en células de la cepa *cdc42-L160S* que carecían o sobreproducían las GTPasas Ypt7 e Ypt71, se observó que en la cepa doble mutante *cdc42-L160S ypt71Δ* las células presentaban vacuolas similares a las de la cepa sencilla *ypt71Δ*, un poco más dispersas que en la cepa *cdc42-L160S* (Figura 67). Por el contrario, mientras que en las células *ypt71Δ* las vacuolas tienen un tamaño mayor que en las células silvestres, las vacuolas del

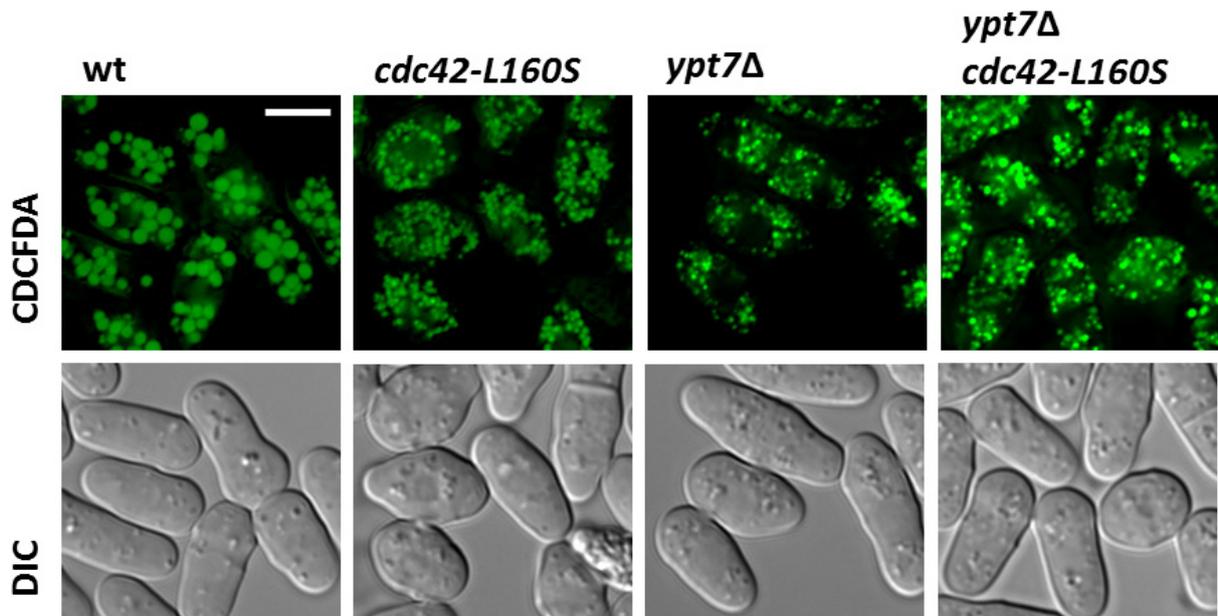


Figura 67. La delección de *ypt7⁺* afecta negativamente a la morfología de las vacuolas de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Tinción de vacuolas con CDCFDA de células de las cepas silvestre (wt), *cdc42-L160S*, *ypt7Δ* y *cdc42-L160S ypt7Δ* incubadas a 25°C en medio YES. La barra corresponde a 5 μm.

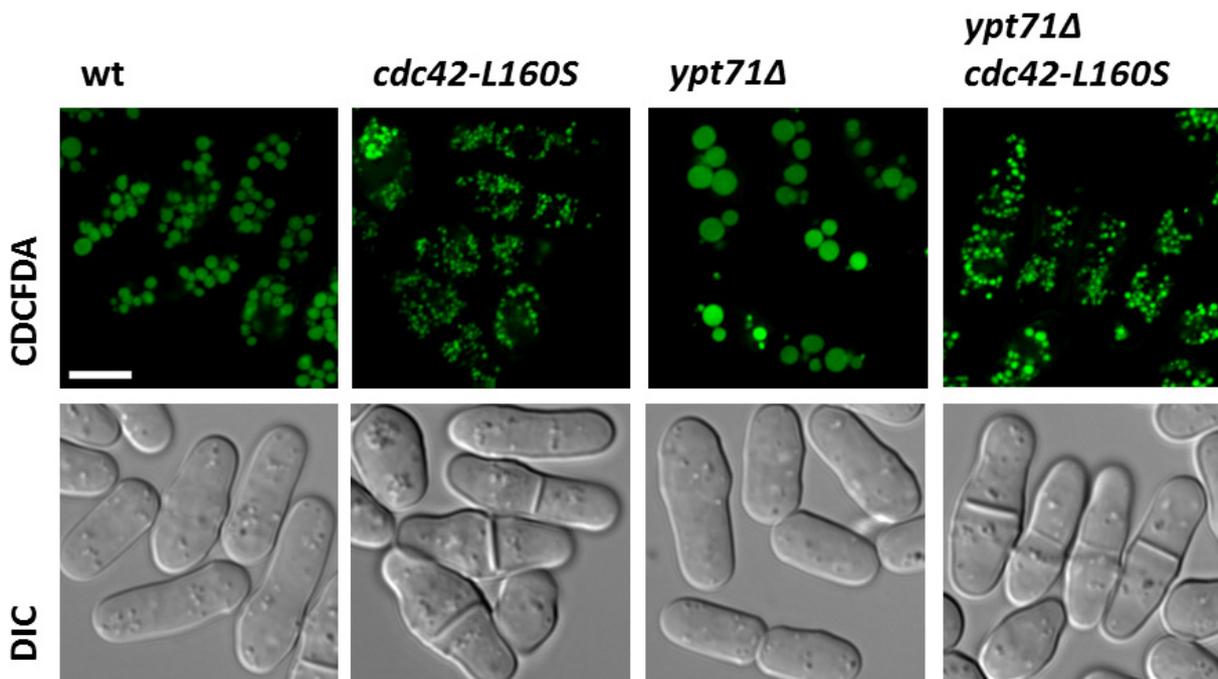


Figura 68. La delección de *ypt71⁺* no afecta a la morfología de las vacuolas de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Tinción de vacuolas con CDCFDA de células de las cepas silvestre, *cdc42-L160S*, *ypt71Δ* y *cdc42-L160S ypt71Δ* incubadas a 32°C en medio YES. La barra corresponde a 5 μm.

doble mutante *cdc42-L160S ypt71Δ* son idénticas a la del mutante sencillo *cdc42-L160S* (Figura 68). De la misma manera, la sobreexpresión de *ypt7⁺* produjo una ligera mejoría en el aspecto de las vacuolas de la cepa *cdc42-L160S* (Figura 69) mientras que la sobreexpresión de *ypt71⁺* no afectó al aspecto de las mismas (Figura 69).

Todos estos datos sugieren que Cdc42 participa en la fusión vacuolar y que su función está relacionada con las GTPasas Ypt7 e Ypt71, si bien aún desconocemos el mecanismo molecular de dicha relación.

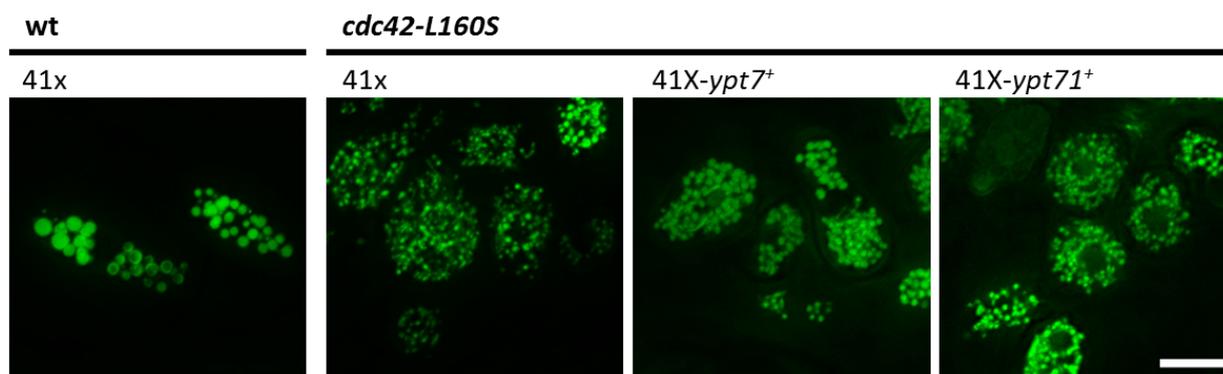


Figura 69. La sobreexpresión de *ypt7⁺* mejora ligeramente el fenotipo de las vacuolas en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Micrografía de fluorescencia de vacuolas teñidas con CDCFDA en células de la cepa silvestre y mutante transformadas con el plásmido pREP41X, pREP41X-*ypt7⁺* o pREP41X-*ypt71⁺*. Las células se incubaron en EMM sin tiamina durante 17 horas a 32°C antes de ser teñidas. La barra corresponde a 5 μ m.

La termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* se debe a defectos en la pared celular

Los defectos en el tráfico de membranas pueden causar problemas en la integridad celular ya que muchas proteínas presentes en la membrana plasmática son necesarias para mantener dicha integridad. De hecho, la cepa *cdc42-L160S* sufre lisis celular a temperaturas elevadas y su termosensibilidad desaparece en presencia de un estabilizador osmótico como el sorbitol 1,2M (Figura 70). La adición de sorbitol al medio también puede aliviar los defectos de endocitosis asociados con la internalización de la membrana plasmática (Padte *et al.*, 2006) pero en las células *cdc42-L160S* no se encontraron defectos en las primeras etapas de la internalización de FM4-64 (Figura 53). Por ese motivo, analizamos la composición de la pared celular de la cepa mutante *cdc42-L160S* para comprobar posibles anomalías. El fraccionamiento de los componentes de la pared celular indicó que las células de la cepa mutante mostraban defectos en la pared celular a 36°C, con un descenso significativo en la cantidad de β -(1,3)-D-glucano, el polímero estructural principal. Mientras que en las células de la cepa silvestre este polímero representa el $20,2 \pm 1,2\%$ de la glucosa total incorporada a 28°C y el $24,2 \pm 0,8\%$ a 36°C, en las células de la cepa mutante *cdc42-L160S* corresponde al $19,0 \pm 3,2\%$ de la glucosa total incorporada a 28°C y el $16,1 \pm 3,8\%$ a 36°C (Figura 71). Este defecto podría ser responsable de la lisis celular observada a 36°C.

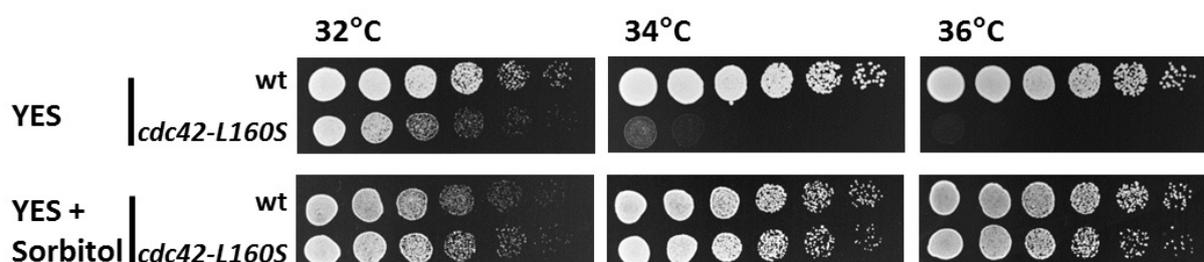


Figura 70. La termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* es suprimida por un estabilizador osmótico. Crecimiento de las cepas silvestre y mutante en medio YES y medio YES con sorbitol 1,2M a las temperaturas mostradas.

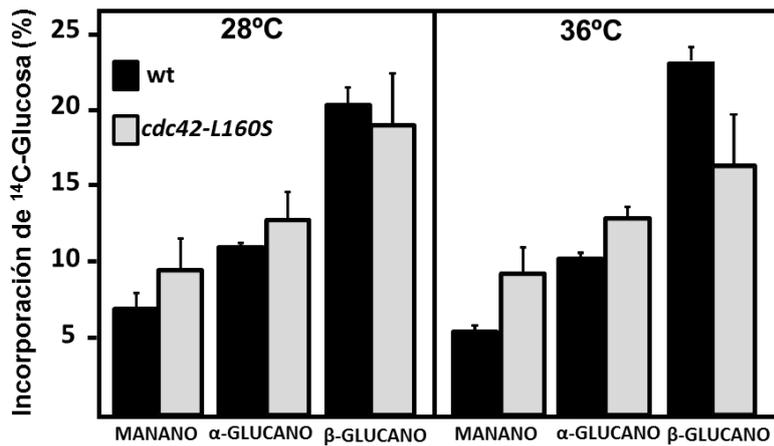


Figura 71. La cepa mutante *cdc42-L160S* tiene defectos en la composición de la pared celular. Incorporación de ¹⁴C-glucosa en cada componente de la pared celular de las cepas silvestre y mutante a 28°C y a 36°C. Los resultados son la media de tres experimentos independientes.

La cepa mutante *cdc42-L160S* tiene defectos en la localización de Bgs1

El β-(1,3)-D-glucano de *S. pombe* es sintetizado por Bgs1 y Bgs4 durante el ciclo vegetativo. Bgs1 es responsable de la síntesis del β-(1,3)-D-glucano que constituye el septo primario y de parte del β-(1,3)-D-glucano que se sintetiza en los polos durante el crecimiento apical (Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2007). Bgs4 sintetiza la mayor parte del β-(1,3)-D-glucano que forma la pared celular durante el crecimiento celular (Cortés *et al.*, 2005). Tanto Bgs1 como Bgs4 se pueden concentrar en los polos en ausencia de cables de actina o en ausencia del exocisto, pero no en ausencia de ambos. Aunque la presencia de F-actina no es necesaria para su mantenimiento en la membrana plasmática, estas proteínas necesitan la polimerización de actina para ser retiradas de la membrana (Cortés *et al.*, 2005; Cortés *et al.*, 2002; Cortés *et al.*, 2007). Para comprobar si los defectos observados en la composición de la pared de las células *cdc42-L160S* se debían a defectos en la localización de Bgs1 o Bgs4, se analizó la localización de estas proteínas fusionadas a GFP a la temperatura semipermissiva de 32°C. Como muestra la **Figura 72**, GFP-Bgs4 se localizaba

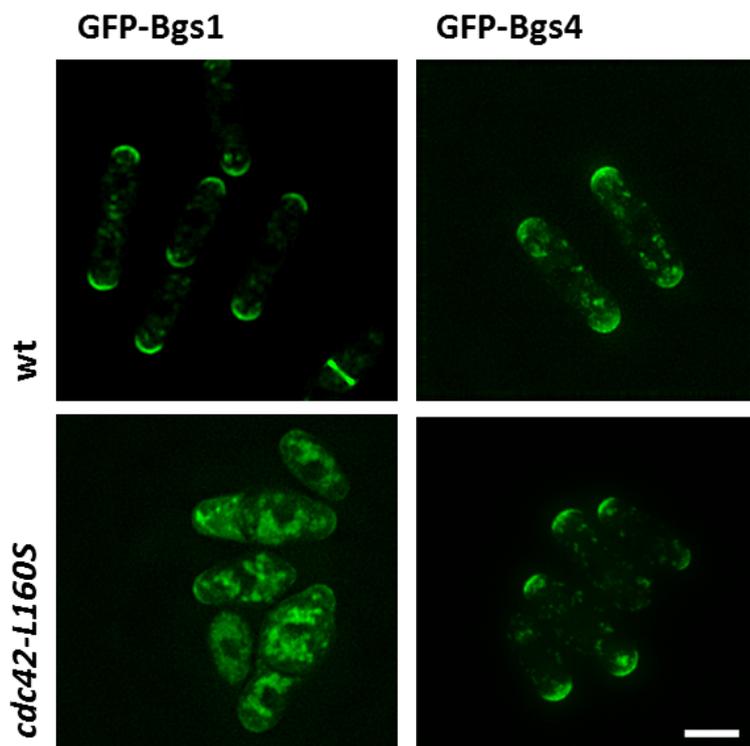


Figura 72. La localización de GFP-Bgs1 está afectada en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Micrografías de fluorescencia de la localización de las proteínas GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4 en células de las cepas silvestre y mutante. Las células fueron cultivadas en medio YES a 32°C. La barra corresponde a 5 μm.

en los polos y en la zona del septo en las células de la cepa silvestre. En la cepa mutante *cdc42-L160S*, la localización de GFP-Bgs4 era similar aunque se observó cierta acumulación interna de GFP-Bgs4 (Figura 72). Mediante experimentos de recuperación de la fluorescencia tras el fotoblanqueo (destrucción fotoquímica del fluoróforo) o FRAP en los que se eliminaba la señal de GFP-Bgs4 del polo de células silvestres y *cdc42-L160S*, no se encontraron diferencias significativas en la tasa de recuperación de la señal, ya se tratase del fotoblanqueo de una pequeña porción del polo (Figura 73), o bien de la eliminación de la señal en todo el polo (Figura 74). Estos resultados indican que la cepa mutante *cdc42-L160S* no tiene defectos importantes en el tráfico de Bgs4 y su difusión por la membrana.

GFP-Bgs1 se localiza en los polos y en la zona del septo en células de la cepa silvestre pero, a diferencia de GFP-Bgs4, en la cepa *cdc42-L160S* la localización en los polos es deficiente y GFP-Bgs1 se acumulaba masivamente en estructuras heterogéneas de aspecto vesicular por todo el citoplasma (Figura 72). Estos datos sugieren que los defectos de localización de Bgs1 en la membrana plasmática podrían ser los responsables de los defectos de pared celular en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Además, estos datos sugieren que hay diferentes mecanismos para el transporte de las proteínas Bgs1 y Bgs4.

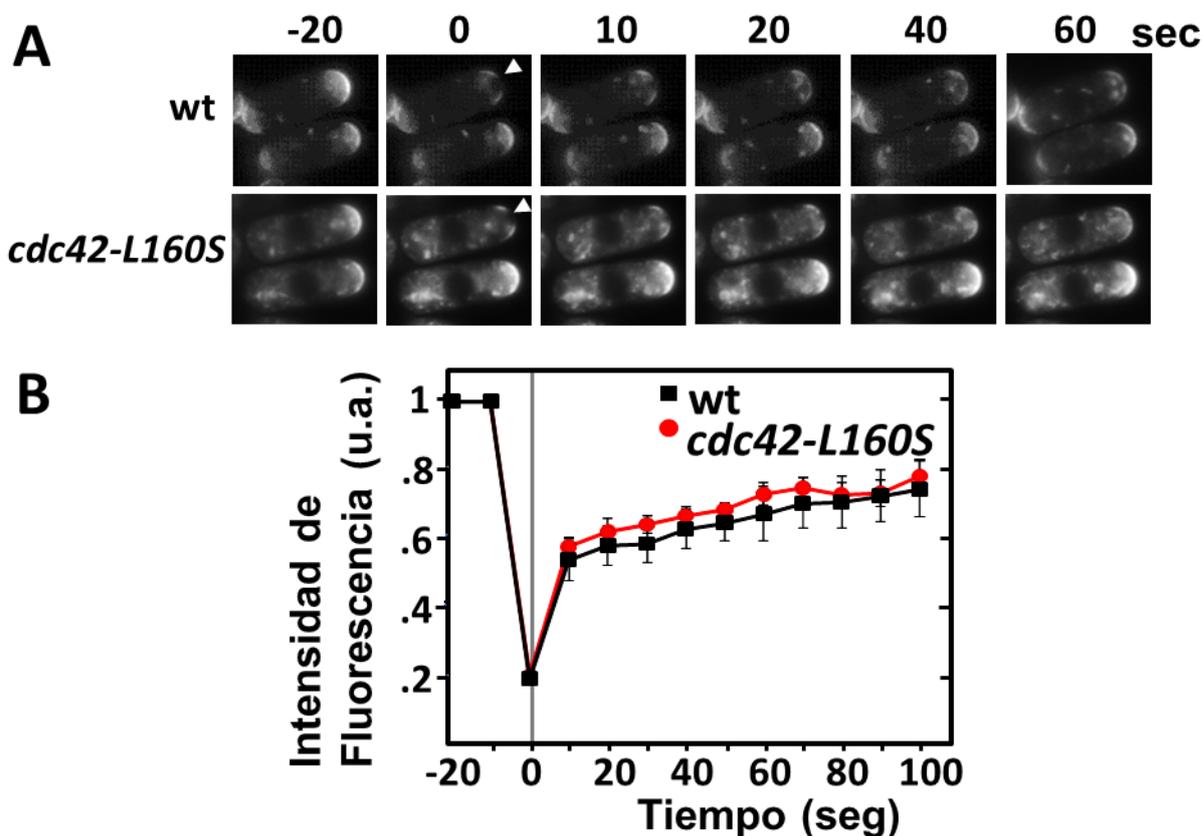


Figura 73. La cepa mutante *cdc42-L160S* no muestra defectos en la recuperación de la señal de GFP-Bgs4 en una pequeña región de la membrana. **A)** Micrografías de fluorescencia de la recuperación de la señal de GFP-Bgs4 tras el fotoblanqueo de una pequeña región del polo en las cepas silvestre y mutante *cdc42-L160S*. El fotoblanqueo se realizó aplicando un láser a 488 nm. Las imágenes se tomaron antes de aplicar el fotoblanqueo, inmediatamente después del fotoblanqueo y a intervalos de 10 segundos. **B)** El gráfico muestra la recuperación de GFP-Bgs4 (n=10) en las cepas silvestre y mutante en este experimento.

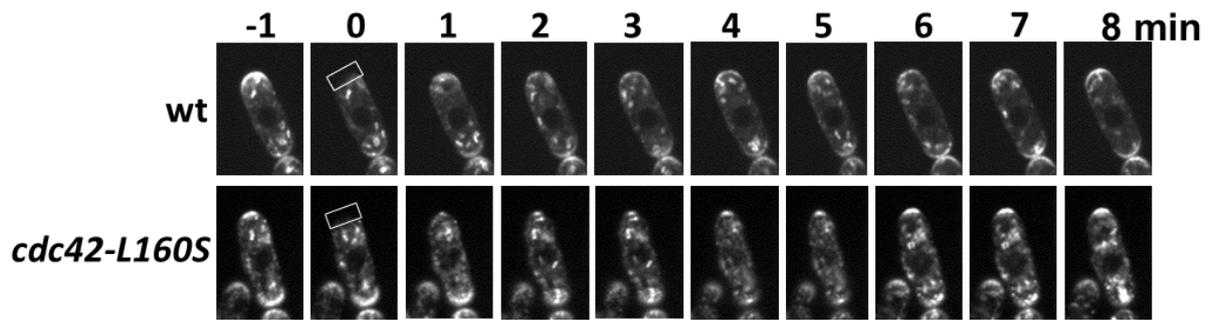


Figura 74. La cepa mutante *cdc42-L160S* no muestra defectos en el tráfico de GFP-Bgs4 a la membrana. Micrograffías de fluorescencia de la recuperación de la señal de GFP-Bgs4 tras el fotoblanqueo de la señal de todo un polo celular en células de las cepas silvestre y mutante *cdc42-L160S*. El fotoblanqueo se realizó aplicando un laser a 488 nm a una región de 40 x 10 píxeles. Las imágenes se tomaron antes de aplicar el fotoblanqueo, inmediatamente después del fotoblanqueo y a intervalos de 1 minuto.

Cdc42 y la conjugación

La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra dificultad para conjugar

En *S. cerevisiae* la GTPasa Cdc42 es un elemento clave en la regulación de varias etapas de la conjugación. En *S. pombe*, se ha sugerido que Cdc42 interviene en la regulación del crecimiento polarizado durante la conjugación ya que la eliminación del GEF Scd1 o del adaptador Scd2 hace a las células estériles (Medkova *et al.*, 2006). En nuestro laboratorio se han descrito diversos mutantes de *cdc42* que son estériles (Pérez y Rincón, 2010). La cepa mutante *cdc42-L160S* no lo es pero muestra defectos en el establecimiento del crecimiento polarizado y se han observado dificultades a la hora de realizar cruces con ella. La cepa *cdc42-L160S* no cruza de una forma tan eficiente como la cepa silvestre a la temperatura permisiva de 25°C (Figura 75). El análisis de la eficiencia de conjugación y de esporulación de las cepas homotéticas silvestre y *cdc42-L160S* indicó que existía un descenso significativo en la formación de cigotos y de esporas en la cepa *cdc42-L160S* tras 24 horas en medio mínimo sin nitrógeno (Figura 75). Estos hechos hicieron que nos decidiésemos a caracterizar los defectos de la cepa mutante *cdc42-L160S* durante el proceso de conjugación.

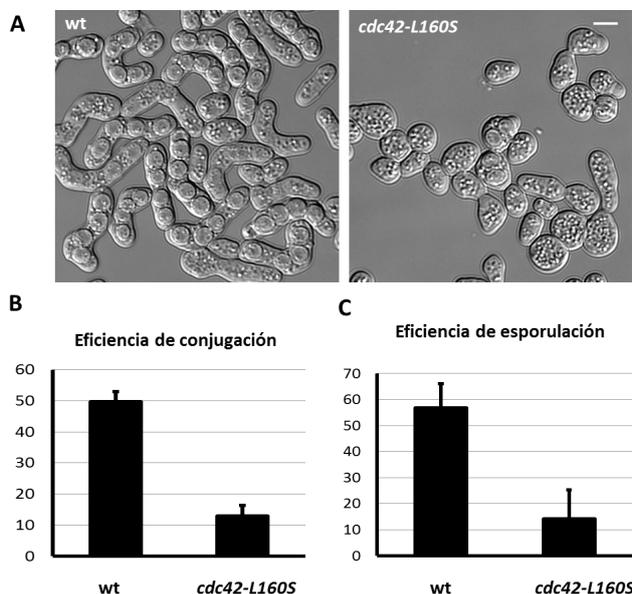


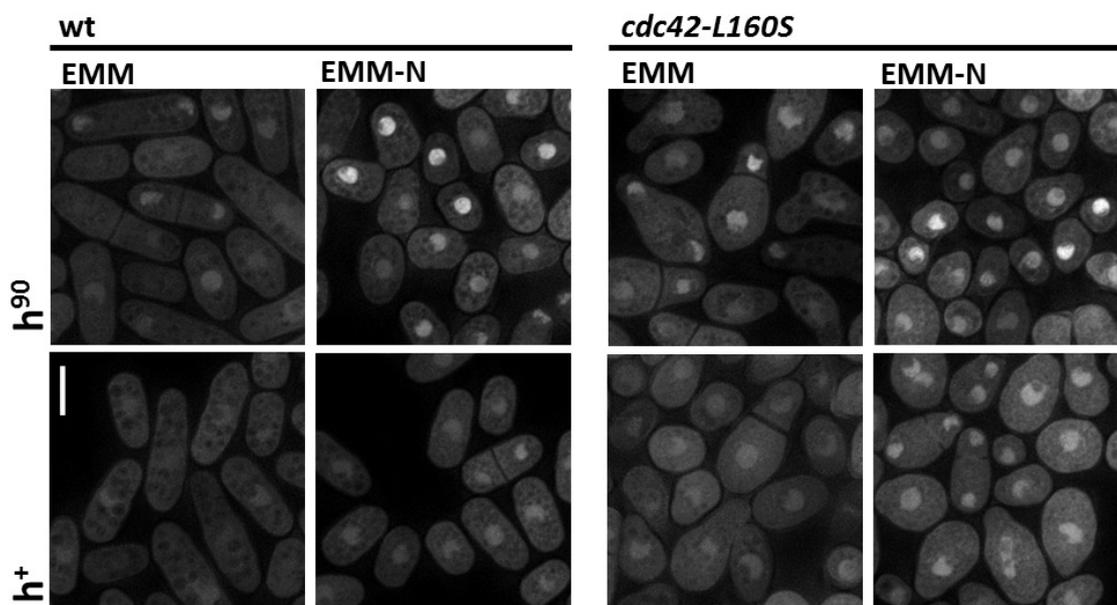
Figura 75. La cepa mutante muestra baja eficiencia de conjugación y de esporulación. **A)** Micrograffías de contraste de interferencia diferencial de células h⁹⁰ silvestres y *cdc42-L160S* tras ser incubadas en medio MEA durante 48 horas a 25°C. La barra corresponde a 5 µm. **B)** Eficiencia de conjugación de células (n>1000) de las cepas h⁹⁰ silvestre y mutante *cdc42-L160S* incubadas en EMM sin nitrógeno durante 24 horas a 25°C y agitación suave (75 rpm). **C)** Eficiencia de esporulación de las mismas. Las barras de error indican la desviación típica de 5 experimentos independientes.

Eficiencia de conjugación = $100 \times \frac{2 \times (\text{zigotos} + \text{ascas})}{\text{células} + 2 \times (\text{zigotos} + \text{ascas})}$; Eficiencia de esporulación = $100 \times \frac{\text{ascas}}{\text{zigotos} + \text{ascas}}$.

La cepa mutante *cdc42-L160S* activa la ruta de MAPK de respuesta a feromonas

La activación del factor de transcripción Ste11 es necesaria para que se inicie el proceso de conjugación. Diferentes señales extracelulares e intracelulares activan la transcripción del gen *ste11⁺* y la fosforilación de la proteína Ste11 que conduce a su localización nuclear (Qin *et al.*, 2003). La localización de la proteína de fusión Ste11-GFP en distintas cepas se puede correlacionar con su actividad transcripcional. En células de la cepa silvestre cultivadas en medio mínimo, la localización de Ste11-GFP en el núcleo es apenas apreciable, mientras que en la cepa mutante *cdc42-L160S* parecía haber mayor cantidad de Ste11-GFP en el núcleo tanto en fondo genético

A



B

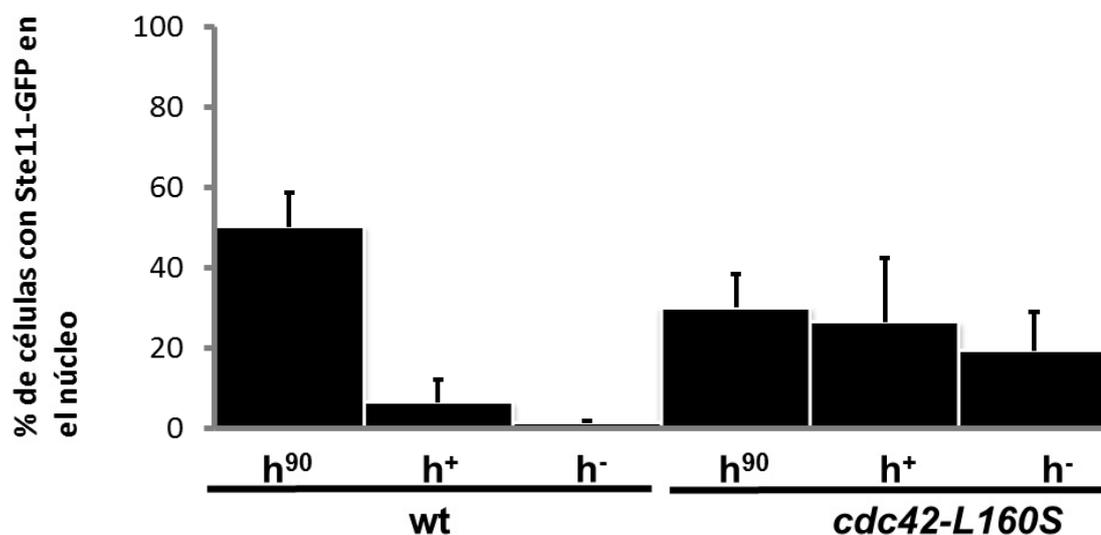


Figura 76. Localización nuclear de Ste11-GFP en la cepa mutante *cdc42-L160S*. **A)** Micrográficas de fluorescencia de la localización de Ste11-GFP en células homotáticas h^{90} y heterotáticas h^+ de las cepas silvestre y mutante incubadas en EMM y en EMM sin nitrógeno (N) durante 5 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μm . **B)** La gráfica muestra los porcentajes de células con Ste11-GFP nuclear en los cultivos de EMM sin nitrógeno. Las barras de error indican la desviación típica de tres experimentos independientes.

homotálico como heterotálico (Figura 76A). Tras 5 horas en medio mínimo sin nitrógeno, tanto la cepa silvestre como la mutante mostraban mayores niveles de localización de Ste11-GFP en el núcleo en el caso del fondo genético h^{90} (Figura 76A). Por tanto parece que *cdc42-L160S* es capaz de activar la transcripción de los genes necesarios para la conjugación. Sin embargo, el porcentaje de células de la cepa mutante con localización nuclear de Ste11-GFP es menor con respecto a la cepa silvestre (Figura 76B). En el caso de las cepas heterotálicas, tanto en la cepa h^+ como en la h^- de la cepa silvestre, el porcentaje de células con localización nuclear de Ste11-GFP era muy bajo ya que no se estaba activando la ruta de las MAP quinasas de respuesta a feromonas (Figura 76B). En la cepa mutante *cdc42-L160S* los niveles de localización nuclear de Ste11-GFP en las cepas heterotálicas h^+ y h^- eran más elevados, si bien no alcanzaban los valores de la cepa homotálica h^{90} (Figura 76B). Tanto en las células silvestres como en las mutantes, el porcentaje de células con altos niveles de Ste11-GFP nuclear era mayor en las células h^+ que en las h^- . Esto es debido, probablemente, a que las cepas h^+ son más propensas a la reversión del tipo sexual.

En resumen, estos datos indican que en la cepa mutante *cdc42-L160S* el factor de transcripción Ste11 podría estar parcialmente activo y aumenta su nivel de activación al estimularse la señalización de la ruta de MAP quinasas de respuesta a feromonas. Esta respuesta es, sin embargo, mucho menor que la detectada en la cepa silvestre.

La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos de polaridad durante la conjugación

En *S. pombe* las células continúan creciendo durante la parada de ciclo en G1 inducida por feromonas (Davey, 1991; Davey y Nielsen, 1994). El crecimiento continúa ocurriendo en el polo de la célula pero ya no se limita a ser paralelo al eje longitudinal de la célula y la célula se alarga hacia la fuente de feromonas (Fukui *et al.*, 1986; Leupold, 1987). Para continuar investigando el papel de Cdc42 en conjugación, se estudió la morfología de la cepa mutante *cdc42-L160S* en un fondo genético homotálico a lo largo del proceso. Para ello se visualizó la proteína de fusión GFP-Psy1 que marca la membrana plasmática de las células. Como muestra la Figura 77, las células

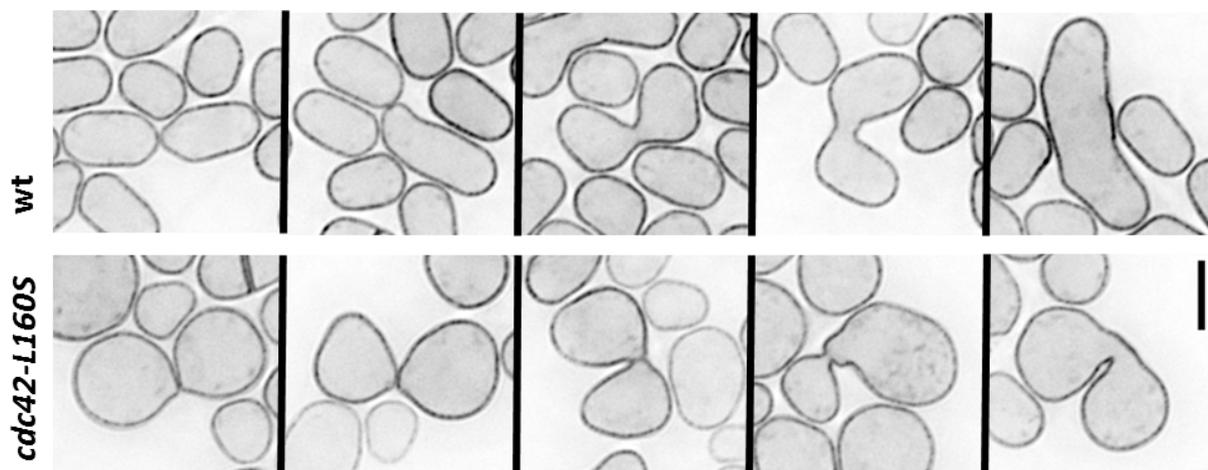


Figura 77. La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos morfológicos durante la conjugación. Micrografías de fluorescencia de GFP-Psy1 en células homotálicas de las cepas silvestre y mutante tras ser incubadas en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μ m.

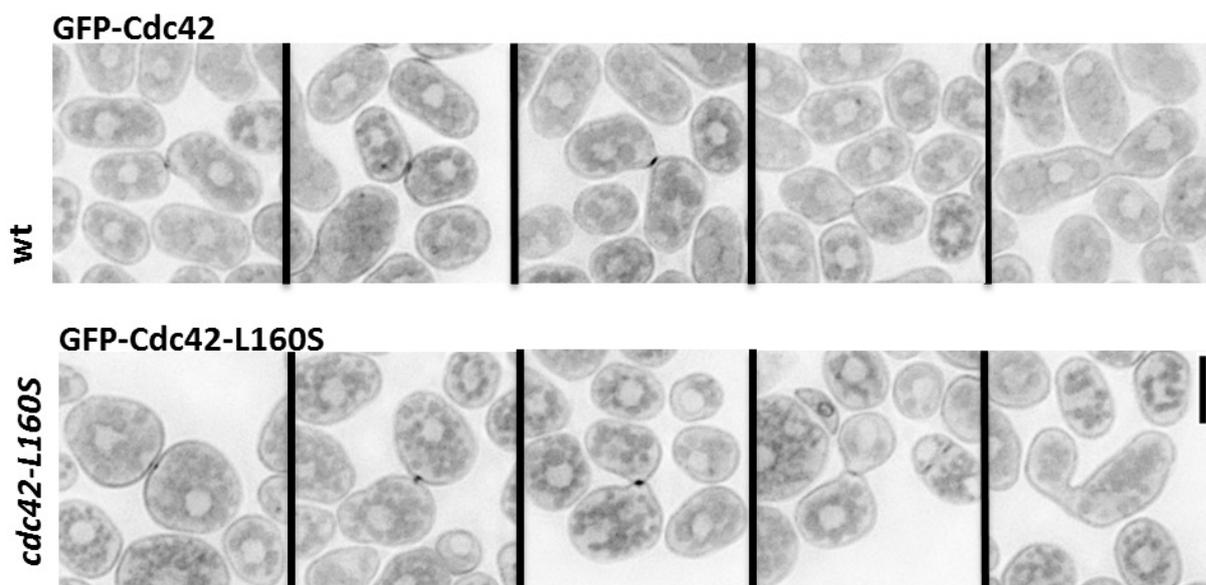


Figura 78. GFP-Cdc42-L160S se localiza correctamente durante la conjugación. Micrografías de fluorescencia de GFP-Cdc42 en la cepa silvestre y de GFP-Cdc42-L160S en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Los cultivos de células homotálicas se incubaron en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μm.

incubadas en EMM sin nitrógeno pierden la polaridad adquiriendo una morfología redondeada. El crecimiento de las proyecciones denominadas *shmoos* parecía deficiente, siendo más pequeños y cortos que en las células silvestres. Tras la fusión de las células los puentes de conjugación eran más estrechos que los de las células silvestres y no se ensanchaban posteriormente (**Figura 77**).

El hecho de que las células de la cepa *cdc42-L160S* adquirieran una morfología redondeada y los defectos de los *shmoos* hizo que se estudiara la localización de las proteínas de fusión GFP-Cdc42 y GFP-Cdc42-L160S expresadas bajo el control del promotor de *cdc42⁺* e integradas en un *locus* exógeno en un fondo genético homotálico. En la cepa silvestre GFP-Cdc42 se acumulaba en la zona de contacto entre las células antes y durante el crecimiento polarizado del *shmoos* (**Figura 78**). Tras la fusión de las células la señal de GFP-Cdc42 desaparecía. De forma similar, GFP-Cdc42-L160S se acumulaba en la zona de contacto de las células y en la proyección de *shmoos*, desapareciendo la señal tras la fusión celular (**Figura 78**).

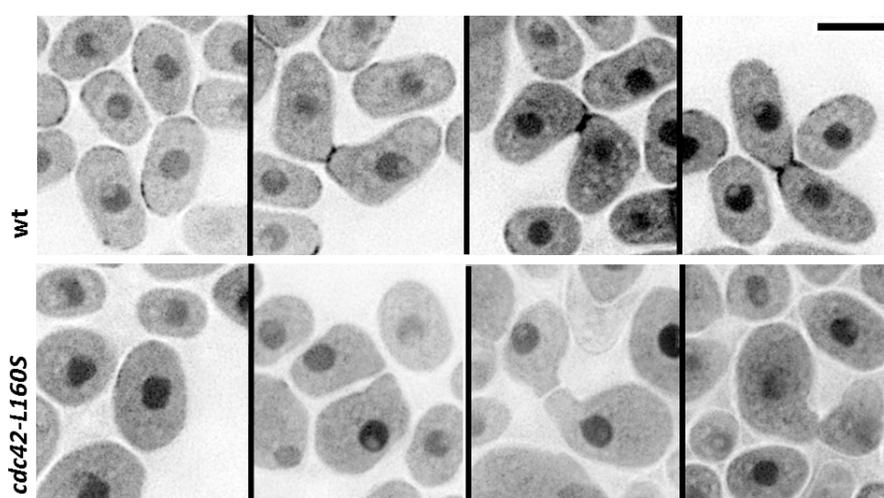


Figura 79. No se detecta Cdc42 activo en la membrana plasmática de la cepa *cdc42-L160S* durante la conjugación. Micrografías de fluorescencia de CRIB-GFP en células homotálicas de las cepas silvestre y mutante tras 6 horas de incubación en EMM sin nitrógeno a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μm.

La localización de la GTPasa unida a GTP durante el proceso de conjugación, se realizó mediante la visualización de CRIB-GFP. En la cepa mutante no se detectaba Cdc42-L160S activa en la membrana plasmática, mientras que en la cepa silvestre se observaba Cdc42 activa en la membrana incluso antes de que se produjera la polarización del *shmoo*, abarcando las regiones de la membrana plasmática más próximas a otras células, durante la proyección del *shmoo* y tras la fusión de las células en el puente de conjugación (Figura 79).

Estos datos nos indican que Cdc42-L160S es capaz de localizarse en la membrana plasmática pero no en su estado activo.

La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos en el citoesqueleto de actina durante la conjugación

Puesto que la cepa mutante presentaba defectos morfológicos durante el proceso de conjugación, se decidió estudiar cómo estaba estructurado el citoesqueleto de actina ya que es fundamental durante la diferenciación sexual (Petersen *et al.*, 1998a).

Tras cinco horas privadas de nitrógeno, las células de la cepa homotética silvestre presentaban los parches de actina distribuidos en los dos polos y en algunas células se encontraban distribuidos de forma asimétrica en las regiones más próximas a otras células sin ser visibles cables de actina. En las células que ya estaban proyectando *shmoos* o que estaban en proceso de fusión, los parches estaban totalmente polarizados hacia esa zona y ya se observaban cables de forma muy débil. Tras la fusión celular, los parches de actina aparecían dispersos por todo el cigoto (Figura 80). En el caso de la cepa *cdc42-L160S*, los parches de actina estaban totalmente despolarizados antes de que se observase cualquier tipo de contacto con otra célula. En algunos casos, cuando una célula se encontraba cerca de otra, los parches se concentraban en la zona más próxima a ésta, también se observaban células que polarizan los parches hacia más de una célula y además

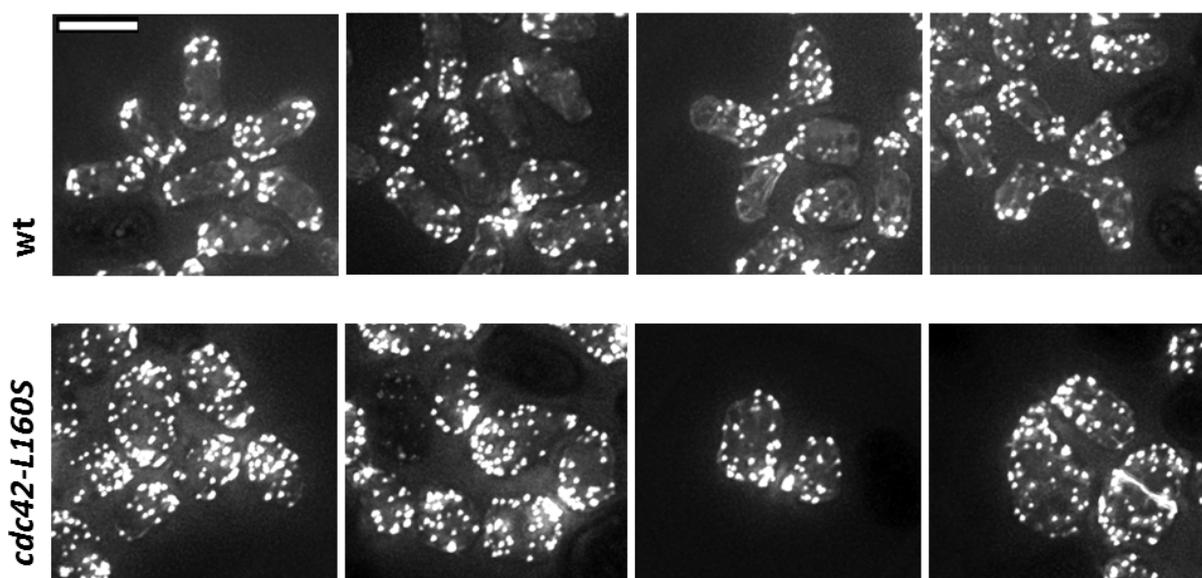


Figura 80. La cepa *cdc42-L160S* tiene el citoesqueleto de actina despolarizado durante la conjugación. Micrográficas de fluorescencia de la tinción con AlexaFluor 488-Faloidina de células h^{90} de las cepas silvestre y mutante fijadas tras ser incubadas en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 µm.

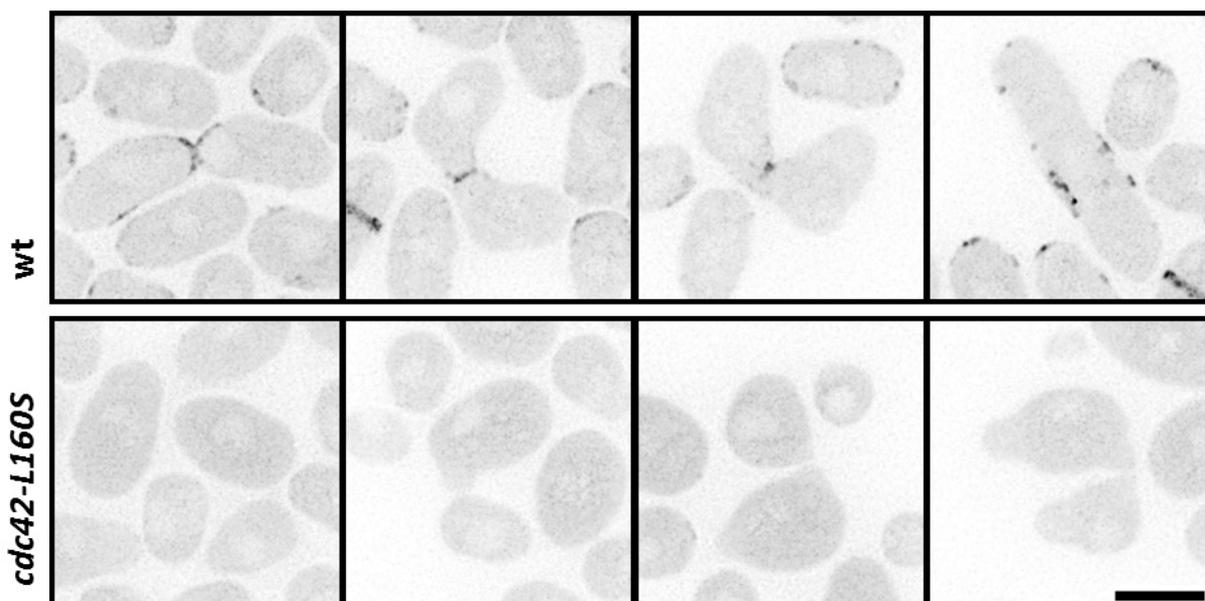


Figura 81. GFP-Pob1 no se localiza en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Las micrografías de fluorescencia muestran la localización de GFP-Pob1 en células h⁹⁰ de las cepas silvestre y mutante tras ser incubadas 6 horas en EMM sin nitrógeno a 25°C con agitación suave. La barra corresponde a 5 µm.

mantenían parches dispersos por todo el contorno celular. Las células que conseguían polarizar el crecimiento y desarrollar un *shmoo* hacia otra célula mostraban los parches dispersos por toda la célula pero más agrupados en la zona del pequeño *shmoo*. En estos estadios de la conjugación también se intuían cables de actina partiendo del *shmoo*, pero de manera más débil que en la cepa silvestre (Figura 80).

Puesto que la proteína adaptadora Pob1 interviene en la organización del citoesqueleto de actina durante el crecimiento vegetativo e interacciona con la GTPasa Cdc42 activa (Rincón *et al.*, 2009; Toya *et al.*, 1999) estudiamos su localización durante la conjugación y vimos que GFP-Pob1 seguía el mismo patrón de localización que la sonda CRIB-GFP en la cepa silvestre. De la misma manera, en la cepa mutante *cdc42-L160S* no se observaba ninguna señal en la membrana a la temperatura permisiva de 25°C (Figura 81).

La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos de aglutinación

Ste11 induce la expresión de numerosos genes necesarios para la conjugación entre los que se encuentran los genes de las aglutininas. Map4 es la aglutinina presente en células P mientras que Mam3 es la aglutinina presente en las células M (Mata y Bahler, 2006; Sharifmoghadam *et al.*, 2006; Sharifmoghadam y Valdivieso, 2008). Estas glicoproteínas favorecen la aglutinación celular que ocurre fundamentalmente en las proyecciones de los *shmoos* mediada por puentes de hidrógeno (Calleja *et al.*, 1981),

La aglutinación permite la unión de las células antes de que comiencen a degradar la pared celular para fusionarse. Facilita, por tanto, la fusión celular y la eficiencia de la conjugación puede disminuir debido a defectos en la aglutinación. Para determinar si la cepa mutante *cdc42-L160S* tenía defectos en la aglutinación, las cepas homotéticas silvestre y mutante se cultivaron en medio mínimo sin nitrógeno durante 24h y con agitación suave y, al cabo de ese

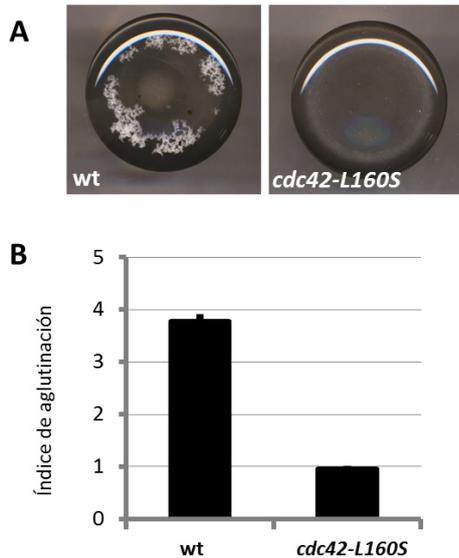


Figura 82. La cepa mutante *cdc42-L160S* presenta defectos de aglutinación. **A)** Aspecto de cultivos homotáticos de las cepas silvestre y mutante *cdc42-L160S* incubadas en EMM sin nitrógeno durante 24 horas a 25°C y agitación suave. **B)** Representación gráfica del índice de aglutinación (A.I.) calculado como $A.I. = D.O_{T_{final}} / D.O_{T_{inicial}}$ donde D.O. es la densidad óptica de la parte superior de los cultivos tras dejarlos reposar en tubos de ensayo durante 5 minutos, para permitir la sedimentación, medida a tiempo 0, al inocular los cultivos en EMM sin nitrógeno y a tiempo 24 horas tras ser incubados a 25°C y agitación suave. Las barras de error representan la desviación típica de tres experimentos independientes.

tiempo, se observó el aspecto que presentaban. El cultivo de la cepa silvestre mostraba grandes acúmulos bien diferenciados mientras que en la cepa mutante el aspecto del cultivo era muy homogéneo y sin grandes acúmulos (Figura 82A). Para cuantificar los defectos de aglutinación utilizamos un índice de aglutinación calculado tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Así se comprobó que la capacidad de aglutinación de la cepa *cdc42-L160S* era, aproximadamente, el 25% de la de la cepa silvestre (Figura 82B).

Para analizar la causa de los defectos de aglutinación, estudiamos mediante microscopía la localización de Map4-GFP, la aglutinina expresada en las células de tipo sexual h^+ (Sharifmoghadam *et al.*, 2006). Como se puede observar en la Figura 83, mientras que en las células de la cepa silvestre Map4-GFP aparece localizada en la zona de contacto entre las células desde donde se extiende por la pared de la célula h^+ , en las células de la cepa mutante *cdc42-L160S* la señal es mucho más tenue en la zona de contacto y no se llega a observar difusión lateral de la señal. Estos datos sugieren que en la cepa *cdc42-L160S* la aglutinina Map4-GFP podría estar expresándose menos a causa del descenso en los niveles de activación de Ste11 con respecto a la cepa silvestre.

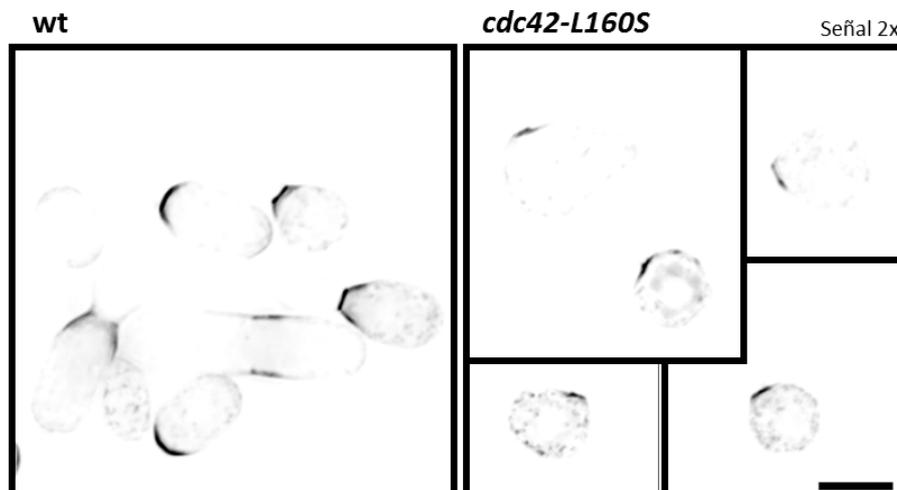


Figura 83. La aglutinina Map4-GFP no se localiza bien en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Micrografías de fluorescencia de Map4-GFP en células homotáticas de las cepas silvestre y mutante tras ser incubadas 6 horas en EMM sin nitrógeno a 25°C y en agitación suave. Se ha aumentado la señal en las imágenes de *cdc42-L160S* para permitir la visualización de Map4-GFP. La barra corresponde a 5 μ m.

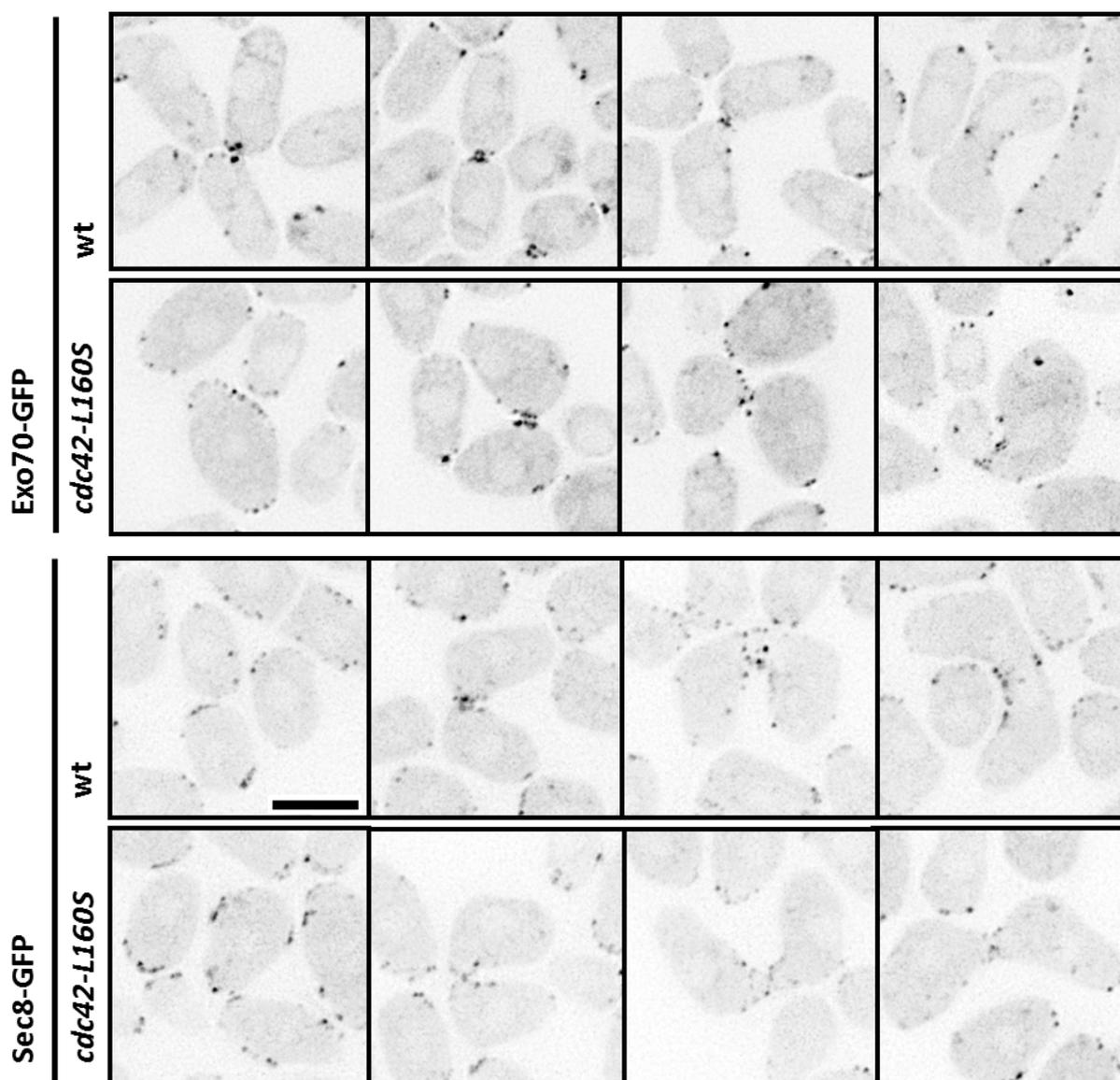


Figura 84. El exocisto de la cepa mutante *cdc42-L160S* se localiza correctamente durante la conjugación. Micrograffías de fluorescencia que muestran la localización de Exo70-GFP y Sec8-GFP en células h^{90} de las cepas silvestre y mutante. Las células se incubaron en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μ m.

Estudio del exocisto en la cepa mutante *cdc42-L160S* durante la conjugación

Una de las premisas del crecimiento polarizado es que tenga lugar el aporte de nuevo material de membrana que permita la remodelación y síntesis de nueva pared celular. Este aporte ocurre a través de la secreción, en la que el exocisto juega un papel clave. Se ha descrito que el exocisto desempeña su función en diferentes momentos de la diferenciación sexual en *S. pombe*, siendo esencial para la correcta secreción de las aglutininas (Sharifmoghadam *et al.*, 2010). Durante el crecimiento vegetativo, la localización del exocisto en el mutante *cdc42-L160S* es defectuosa, por lo que se estudió la localización de los componentes del exocisto Sec8-GFP y Exo70-GFP en la cepa mutante durante la diferenciación sexual. Como se muestra en la **Figura 84**, la localización de Sec8-GFP y de Exo70-GFP en la cepa silvestre sigue el mismo patrón observado en GFP-Pob1 y CRIB-GFP. Sorprendentemente, en la cepa mutante *cdc42-L160S*, a diferencia de lo que ocurría con GFP-Pob1 y CRIB-GFP, la localización de los componentes del exocisto era similar a la de la cepa silvestre. Por tanto, los defectos observados en *cdc42-L160S*, durante la

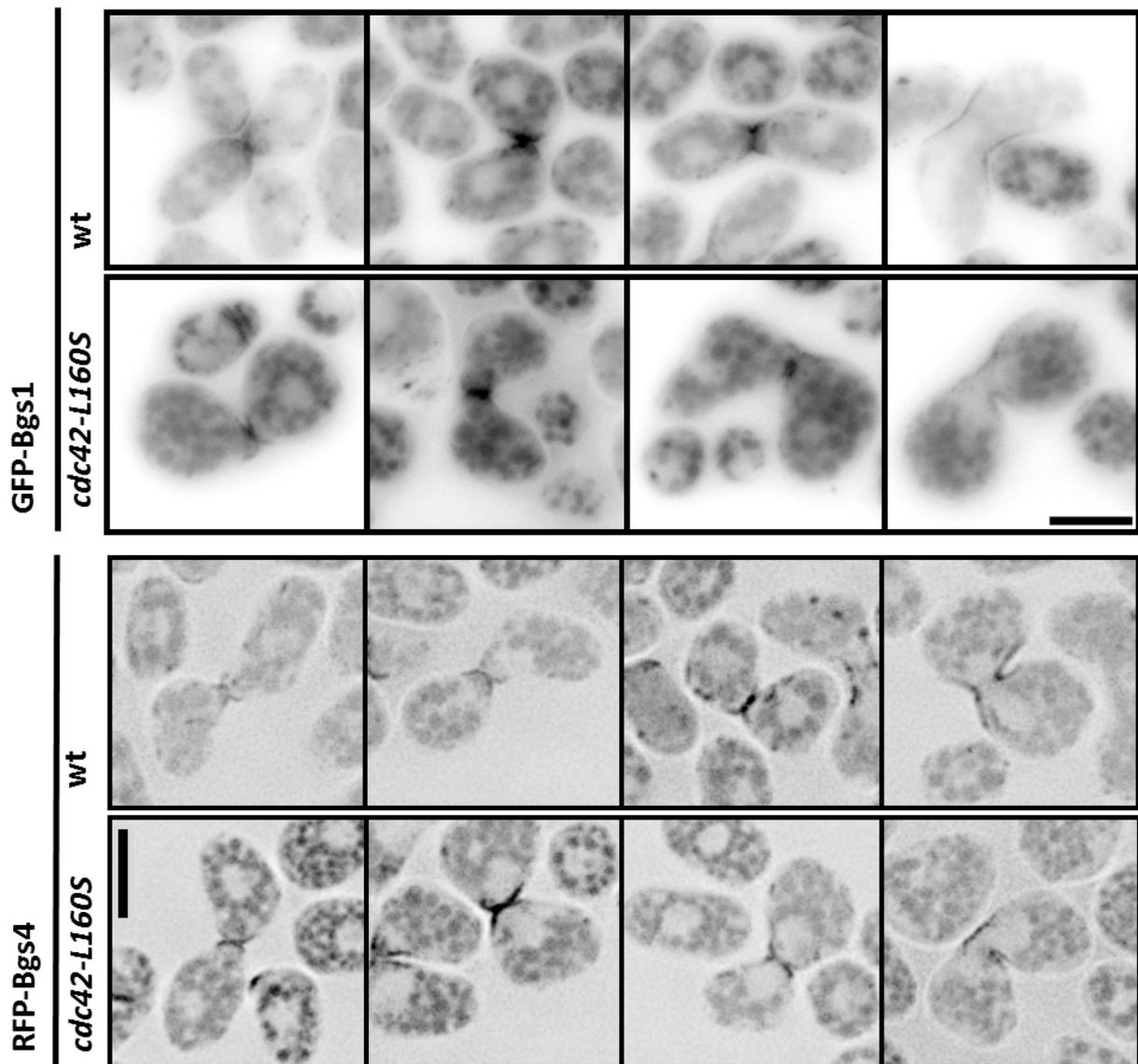


Figura 85. Bgs1 y Bgs4 se localizan correctamente en la cepa mutante *cdc42-L160S* durante la conjugación. Micrograffías de fluorescencia que muestran la localización de GFP-Bgs1 y RFP-Bgs4 en células h^{90} de las cepas silvestre y mutante. Las células se incubaron en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μ m.

conjugación, tanto morfológicos como de aglutinación, no son producidos por la deslocalización del exocisto.

Remodelación y síntesis de pared en la cepa mutante *cdc42-L160S* durante la conjugación

Durante el crecimiento vegetativo, la cepa *cdc42-L160S* mostraba defectos en la síntesis de la pared celular, posiblemente debidos a los problemas de localización de la β -glucán sintasa Bgs1. Por ello se analizó la localización de GFP-Bgs1 y RFP-Bgs4 durante la conjugación. Tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutante, GFP-Bgs1 y RFP-Bgs4 se localizaban de manera idéntica en las zonas de crecimiento polarizado, durante la fusión celular y posteriormente en el puente de conjugación (Figura 85).

Defectos en la remodelación de la pared celular también podrían causar problemas en la

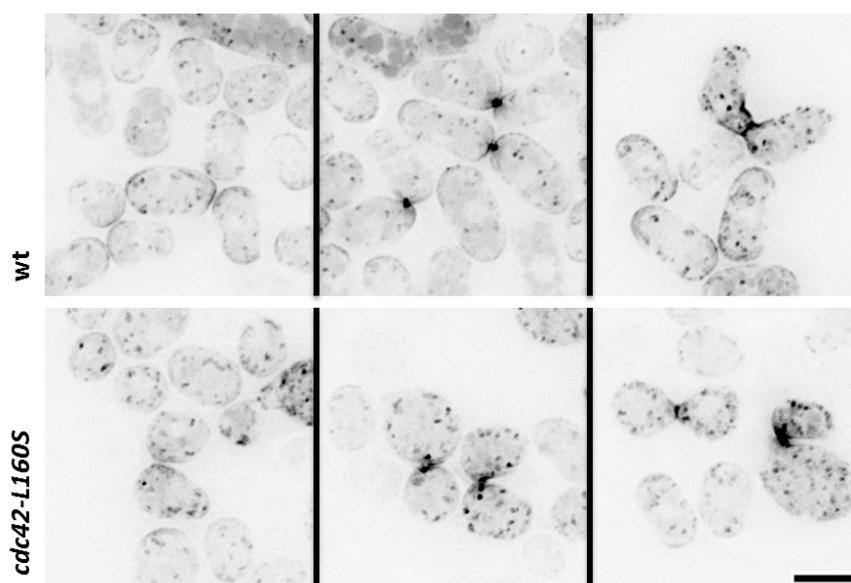


Figura 86. Dni1 se localiza correctamente en la cepa mutante *cdc42-L160S* durante la conjugación. Micrografías de fluorescencia de Dni1-GFP en células homotáticas de las cepas silvestre y mutante. Las células se incubaron en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y en agitación suave. La barra corresponde a 5 μ m.

fusión celular ya que la pared entre las células que se fusionan tiene que ser digerida. Dni1 es una proteína similar a las claudinas, con cuatro dominios transmembranales que se localiza en la punta de los *shmoos*, en la zona de contacto entre las células del prezigoto y en el puente de conjugación, y es necesaria para la reorganización de la pared celular y la fusión celular durante la conjugación (Clemente-Ramos *et al.*, 2009). Para investigar si la regulación de la remodelación de la pared celular estaba afectada, se estudió la localización de la proteína de fusión Dni1-GFP. Como se puede observar en la Figura 86, no se apreciaron defectos en la localización de Dni1-GFP en la cepa mutante *cdc42-L160S*.

La localización de la formina Fus1 no depende de Cdc42

Se ha descrito que la formina Fus1 es esencial para que se produzca la fusión celular, orquestando las modificaciones que han de ocurrir en la pared de la zona del *shmoo* (Petersen *et al.*, 1998b; Petersen *et al.*, 1995). Puesto que la cepa mutante *cdc42-L160S* tiene el citoesqueleto de actina desorganizado, se decidió estudiar la localización de Fus1-GFP en ésta. En la cepa silvestre Fus1-GFP se concentra en la punta de la proyección del *shmoo* en los momentos

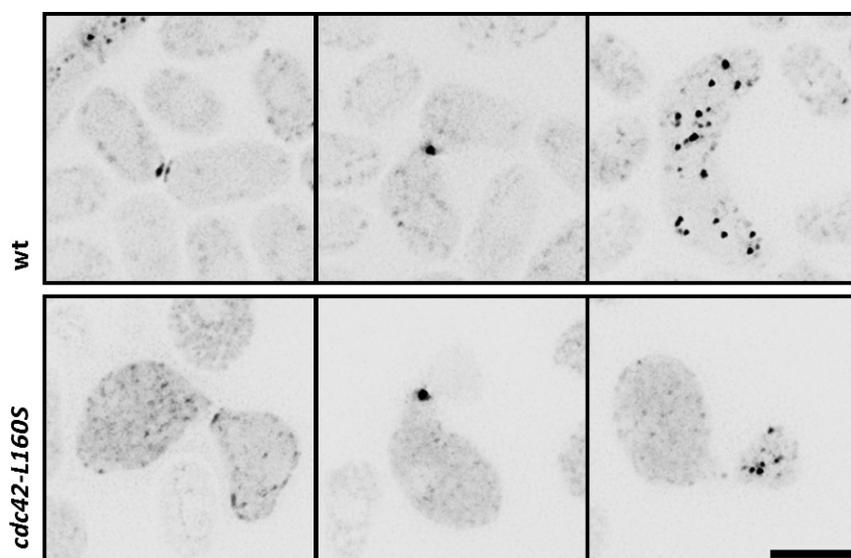


Figura 87. Fus1 se localiza correctamente en la cepa mutante *cdc42-L160S*. Imágenes de fluorescencia de Fus1-GFP en células h^{90} de las cepas silvestre y mutante incubadas en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μ m.

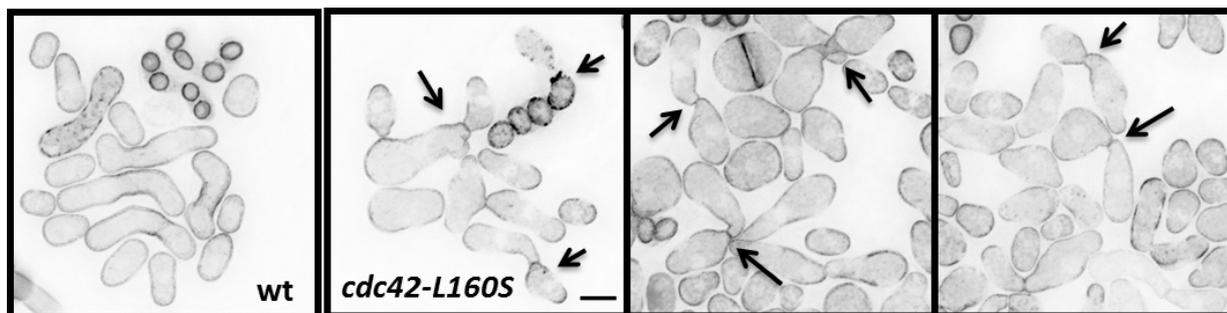


Figura 88 La cepa mutante *cdc42-L160S* presenta puentes de conjugación estrechos. Micrografías de células h^{90} de las cepas silvestre y *cdc42-L160S* incubadas en MEA durante 24 horas a 25°C.

anteriores a la fusión celular (Figura 87). De igual manera, en la cepa mutante *cdc42-L160S* se pudo observar la misma localización de Fus1-GFP (Figura 87).

Estos datos indican que Cdc42 interviene en la polarización del citoesqueleto de actina durante la diferenciación sexual de *S. pombe* pero no afecta a la localización de la formina Fus1.

Cdc42 interviene en la localización de las septinas durante la conjugación

Como ya se ha mencionado anteriormente, la cepa *cdc42-L160S* no es capaz de ensanchar la zona de fusión como lo hace la cepa silvestre y esta zona permanece muy estrecha incluso cuando el cigoto ya se ha formado. Se ha descrito, que cepas carentes de los genes de las septinas tienen un fenotipo similar al que muestra la cepa mutante *cdc42-L160S* durante la conjugación y no son capaces de remodelar la zona de conjugación (Figura 88) (Onishi *et al.*, 2010). Para comprobar si el defecto que se observaba en la remodelación del cuello del cigoto de la cepa mutante *cdc42-L160S* se debía a problemas en la localización del anillo de septinas durante la conjugación, se estudió la localización de la septina Spn1-GFP. En la cepa silvestre Spn1-GFP se comienza a acumular en la zona de contacto entre células del prezigoto hasta que se condensa

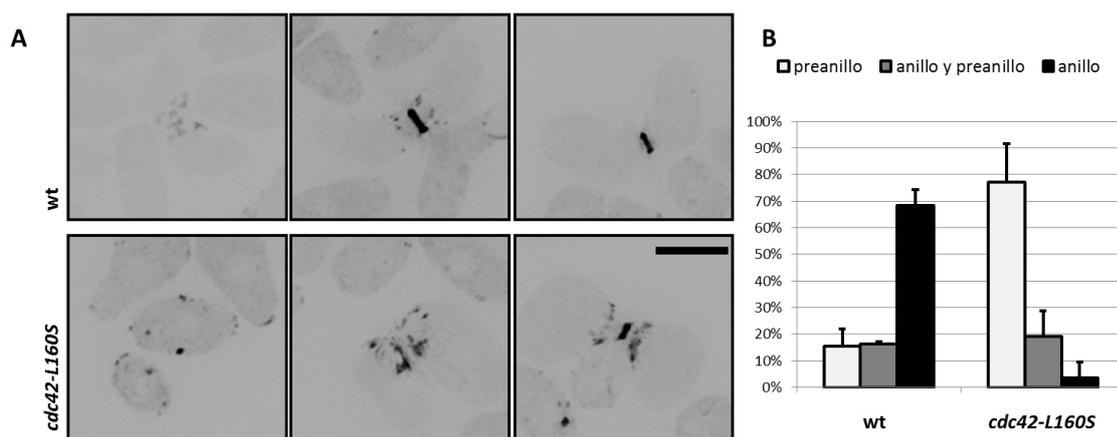


Figura 89 La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra un defecto en el ensamblaje del anillo de septinas durante la conjugación.

A) Micrografías de fluorescencia de Spn1-GFP en células h^{90} de las cepas silvestre y mutante tras ser incubadas en EMM sin nitrógeno durante 6 horas a 25°C y agitación suave. La barra corresponde a 5 μ m. **B)** En la gráfica se han cuantificado las células con los distintos estadios del ensamblaje del anillo. Se observan tres tipos de localización diferentes de las septinas: células con señal de Spn1-GFP en la zona donde ocurrirá la fusión celular (preanillo), células en las que ya se ha ensamblado el anillo y todavía queda señal de Spn1-GFP en la pared del *shmoo* (anillo y preanillo) y células que presentan un anillo de Spn1-GFP completamente condensado. Las barras de error representan la desviación típica de tres experimentos independientes. La barra corresponde a 5 μ m.

formando un anillo (**Figura 89A**). En la cepa mutante *cdc42-L160S*, se detectaron problemas en la condensación de Spn1-GFP para formar el anillo y en muchos casos se observó señal fluorescente en las proximidades del anillo (**Figura 89A**). La cuantificación de las diferentes fases de la condensación del anillo de septinas confirmó que la cepa mutante tiene dificultades para organizar el anillo de septinas durante la conjugación (**Figura 89B**). Así pues, los defectos en el ensanche del puente de conjugación de la cepa *cdc42-L160S* podrían deberse a un defecto en la organización del anillo de septinas.

Discusión

Discusión

El trabajo de investigación de nuestro laboratorio se centra en el estudio de las GTPasas de la familia Rho, tanto de su regulación como de los efectores a través de los cuales realizan sus funciones. El objetivo de este trabajo de Tesis Doctoral ha sido el estudio de nuevas funciones de la GTPasa Cdc42 en *S. pombe*. Puesto que Cdc42 es una proteína esencial (Miller y Johnson, 1994), el estudio de su función se ha llevado a cabo mediante la generación de mutantes termosensibles que muestran alteraciones en las interacciones funcionales de esta GTPasa y otras proteínas, y permiten caracterizar defectos en los procesos en los que interviene Cdc42. De este modo, en nuestro laboratorio se ha descrito ya el papel de Cdc42 en la localización y regulación de la formina For3 con la ayuda de la proteína Pob1 (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009).

Cdc42-879

La cepa mutante termosensible *cdc42-879*, utilizada para el escrutinio de supresores de termosensibilidad que permitió caracterizar la función de Pob1 en la activación de For3, posee dos mutaciones puntuales que provocan dos sustituciones, en los aminoácidos D76 y L160, conservados en las proteínas Cdc42 de diferentes especies (Johnson, 1999). El estudio de estas mutaciones por separado indicó que los defectos morfológicos, de termosensibilidad, de despolarización de los parches de actina, de cables débiles y de deslocalización de la formina For3 que mostraba la cepa mutante *cdc42-879* eran reproducidos por la cepa mutante *cdc42-L160S*, que contenía la sustitución L160S. Cabe destacar, que tanto en la cepa mutante *cdc42-879* como en la cepa *cdc42-L160S*, los fenotipos descritos no se deben a una alteración de los niveles totales de la GTPasa. El aminoácido L160 de la proteína Cdc42 se encuentra en uno de los dominios de unión e hidrólisis de GTP y se encuentra próximo a la hélice 5 α (Figuras 12-14), que está descrita en la proteína Cdc42 humana como una región de interacción con el dominio CRIB de las proteínas PAK, WASP y ACK (Abdul-Manan *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 1998; Mott *et al.*, 1999; Stevens *et al.*, 1999). La sustitución de la leucina, que es un aminoácido hidrofóbico, por serina, que es un aminoácido polar y de menor tamaño, supone la sustitución de un grupo propilo por un grupo hidroxilo. Posiblemente, este cambio provoque una alteración en la carga electrostática del entorno del bolsillo creado por el dominio de unión e hidrólisis de GTP y un aumento en su tamaño, que dificulte la función GTPásica de Cdc42. Este hecho explicaría el aumento en la cantidad de Cdc42 unida a GTP de la cepa *cdc42-L160S* con respecto a la cepa silvestre.

La habilidad de Cdc42 para ciclar entre sus estados activo e inactivo es importante para algunas funciones, incluyendo la organización de septinas, la transformación oncogénica y la polarización (Irazaqui *et al.*, 2003). El hecho de que en la cepa mutante *cdc42-L160S* la GTPasa se localice en la membrana plasmática pero no interaccione con CRIB-GFP, indica que la activación de la proteína está impedida en esta estructura. La mutación L160S podría estar afectando al

reciclaje de GDP-GTP de la GTPasa, o a la unión de ésta con los GEFs presentes en la membrana plasmática. De hecho, la sobreexpresión de los GEFs de Cdc42, Scd1 y Gef1, suprime parcialmente la termosensibilidad de la cepa *cdc42-879* (Rincón *et al.*, 2009). De este modo, el aumento de la activación de Cdc42 en la membrana plasmática, mejora el fenotipo de la cepa mutante *cdc42-879*.

El aminoácido D76 de la proteína Cdc42 se localiza en un extremo del dominio de interacción denominado *switch II*, según el modelo estructural propuesto para HsCdc42 (Feltham *et al.*, 1997), este aminoácido no se encuentra expuesto en la superficie de la proteína (Kozminski *et al.*, 2000). El modelo del complejo GAP-Cdc42 en humanos indica que el aminoácido aspártico en la posición 76 forma un puente de hidrógeno con la arginina 187, situada en la región polibásica del extremo C-terminal de la proteína, que estabilizaría esta región final (Nassar *et al.*, 1998). El cambio de ácido aspártico, que es un aminoácido polar de carga negativa, por glicina, que es un aminoácido neutro, provoca que la cepa mutante *cdc42-D76G* muestre una ligera disminución de la longitud celular y un ligero aumento en su anchura, sin que se observe ninguno de los defectos descritos en la cepa mutante *cdc42-879*. Este fenotipo morfológico es similar al encontrado en células *rga4Δ* (Das *et al.*, 2007) carentes de la proteína GAP de Cdc42. A pesar de compartir fenotipo con este mutante *rga4Δ*, la cepa mutante *cdc42-D76G* muestra un descenso en los niveles de GTP-Cdc42 (datos no mostrados) por lo que esta mutación, aparte de estar impidiendo la estabilización del extremo C terminal, podría estar impidiendo su correcta activación en la membrana mediante Scd1 o Gef1 y el reciclado a través del GDI, Rdi1. El estudio más detallado de esta cepa mutante se está realizando actualmente en el laboratorio y puede dar más información acerca de la proteína Cdc42 y su regulación.

En cualquier caso, con los datos de que disponemos, no se puede descartar que las mutaciones encontradas en la cepa mutante *cdc42-879* juntas o por separado, provoquen otro tipo de alteraciones en la GTPasa, ya sea en el procesamiento postraduccional de la proteína o en su estructura, que afecten a su correcto funcionamiento, localización o interacción con sus reguladores o sus efectores. Combinaciones de estas mutaciones con otras ya descritas como dominantes negativas o constitutivamente activas podrían dar más información acerca de sus efectos.

La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos en la organización del citoesqueleto de actina, presentando parches despolarizados, aparentemente en mayor número, y ausencia de cables de actina funcionales, así como defectos en la localización de la formina For3. Muchos de los cables de actina de la célula suelen estar asociados a parches de actina regulando el movimiento de estos últimos (Pelham y Chang, 2001). En ausencia de cables de actina los parches de actina se encuentran dispersos (Feierbach y Chang, 2001) y es posible que el aumento en el número de parches sea un efecto colateral de los defectos en la formación de cables, por un mero efecto compensador en la organización de la F-actina polarizada (Gao y Bretscher, 2008). La dispersión de los parches de actina también es común en cepas mutantes del complejo Arp2/3 de *S. pombe*, como *arc3Δ* y *arp2-1* (Cabrera *et al.*, 2011; Morrell *et al.*, 1999) que, además, comprometen la

endocitosis. Aunque la cepa mutante *cdc42-L160S* no muestra defectos en los pasos iniciales de la endocitosis, no se puede descartar que la desorganización de los parches de actina sea un efecto directo de la mutación en *cdc42⁺* ya que se ha demostrado, tanto en levaduras (Lechler *et al.*, 2001) como en células de mamíferos (Millard *et al.*, 2004), que Cdc42 regula la actividad y localización de las proteínas WASP, activadoras del complejo Arp2/3, que es el responsable del ensamblaje de los parches de actina (Winter *et al.*, 1999).

Cdc42 participa en la secreción polarizada

La composición de la membrana plasmática y el crecimiento están controlados por las rutas de tráfico de vesículas, que transportan proteínas y lípidos entre diferentes compartimentos celulares y la superficie celular. El aporte de material a la membrana plasmática es llevado a cabo por vesículas secretoras transportadas por miosinas de tipo V a través de cables de actina (Motegi *et al.*, 2001; Win *et al.*, 2001) y posteriormente ancladas a la membrana plasmática por el complejo del exocisto (Wang *et al.*, 2002). Sorprendentemente, el crecimiento polarizado continúa ocurriendo en cepas mutantes *for3Δ*, carentes de cables de actina, o *myo52Δ*. Por su parte, el exocisto, aunque es esencial para la viabilidad celular, es importante durante citocinesis y parece dispensable para el crecimiento polarizado (Wang *et al.*, 2002). Sin embargo, cuando el transporte vesicular por los cables de actina y el funcionamiento del complejo del exocisto se encuentran comprometidos simultáneamente, el crecimiento polarizado no es posible (Bendezu y Martin, 2011; Nakano *et al.*, 2011; Snaith *et al.*, 2011).

Además de los defectos en los cables de actina, la cepa mutante *cdc42-L160S* muestra comprometida su función secretora, con defectos en secreción de A.P., acumulación de vesículas y deslocalización de componentes del exocisto. La cepa carente de For3 no tiene defectos evidentes de secreción, por este motivo hemos propuesto que, en la levadura de fisión, Cdc42 tiene una función en secreción independiente de su papel en la formación de los cables de actina (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009) y los defectos en esta función podrían ser responsables de la termosensibilidad de la cepa *cdc42-L160S*.

Estudios realizados en *S. cerevisiae* han demostrado que algunos mutantes condicionales de *CDC42* muestran defectos en exocitosis independientes de la organización de la actina (Adamo *et al.*, 2001). A pesar de esto, hay que destacar que existen diferencias en los fenotipos de alelos de pérdida de función de *cdc42* en ambas levaduras. En *S. cerevisiae*, las células carentes de Cdc42 depositan membrana uniformemente y son incapaces de gemar, formando células grandes y redondas que detienen su crecimiento (Adams *et al.*, 1990; Ziman *et al.*, 1991). Por el contrario, en *S. pombe* se ha descrito que el fenotipo de ausencia de *cdc42⁺* produce células uninucleadas, pequeñas y densas, lo cual sugiere que la síntesis macromolecular continúa mientras que la incorporación de nuevo material para permitir el crecimiento de las células está inhibido en ausencia de Cdc42 (Miller y Johnson, 1994). En ambas levaduras la polaridad celular se pierde pero sólo en *S. pombe* el crecimiento celular también se inhibe. Una posible causa de estas

diferencias es que Cdc42 en *S. cerevisiae* parece ser necesaria para la exocitosis sólo durante la gemación (Wu y Brennwald, 2010), mientras que en *S. pombe* debe de ser requerida a lo largo de todo el crecimiento vegetativo.

La termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* es suprimida por la sobreexpresión de los genes *rho3⁺* y *pob1⁺*. Ambos restauran la localización del exocisto y la secreción de fosfatasa ácida y eliminan la acumulación de vesículas secretoras pero sólo *pob1⁺* restaura los cables de actina y recupera parcialmente la morfología de *cdc42-L160S*. Previamente en el laboratorio se había descrito ya la función reguladora de Pob1 sobre For3 (Rincón *et al.*, 2009). Sin embargo, el hecho de que Pob1 fuese una proteína esencial, al igual que Cdc42, sugería ya que Pob1 ejercía otras funciones. Parecería, por tanto, que Cdc42 regula, junto con Pob1, tanto la formación de los cables de actina como la localización del exocisto, ambos procesos necesarios para el crecimiento celular polarizado (Figura 90). De hecho, durante la realización de este trabajo, se describió que Pob1 es necesaria para la localización del exocisto y que *rho3⁺* en multicopia es un gen supresor de la cepa mutante termosensible *pob1-664* (Nakano *et al.*, 2011). La sobreproducción de Rho3 restaura indirectamente la localización de Pob1-Y719C, la proteína codificada por el alelo termosensible *pob1-664* (Nakano *et al.*, 2011). La sustitución Y719C en Pob1-664 se localiza en su dominio PH, encargado de la interacción de Pob1 con PtdIns(4,5) P_2 (Nakano *et al.*, 2011). En células mutantes *its3-1*, que muestran bajos niveles de PtdIns(4,5) P_2 a temperaturas restrictivas, Pob1 no se localiza en la membrana plasmática (Nakano *et al.*, 2011). Al no localizarse Pob1, el crecimiento celular se ve comprometido por su doble función sobre la polimerización de los cables de actina y la localización del exocisto. Es posible que la sobreproducción de Rho3 aumente los niveles de PtdIns(4,5) P_2 en la membrana plasmática, y esto pueda restaurar la localización de Pob1-664. Por el contrario, en la cepa *cdc42-L160S* la sobreproducción de Rho3 permite que el exocisto se localice de forma eficiente pero no mejora la localización de Pob1, probablemente porque Cdc42-L160S no se une a Pob1 (Rincón *et al.*, 2009) y la unión a Cdc42 es necesaria para la localización y estabilidad de esta proteína. Dos recientes trabajos que describen por primera vez en *S. pombe* la subunidad del exocisto denominada Sec3, arrojan luz sobre el funcionamiento del exocisto en esta levadura (Bendezu *et al.*, 2012; Jourdain *et al.*, 2012). Así, en *S. pombe*,

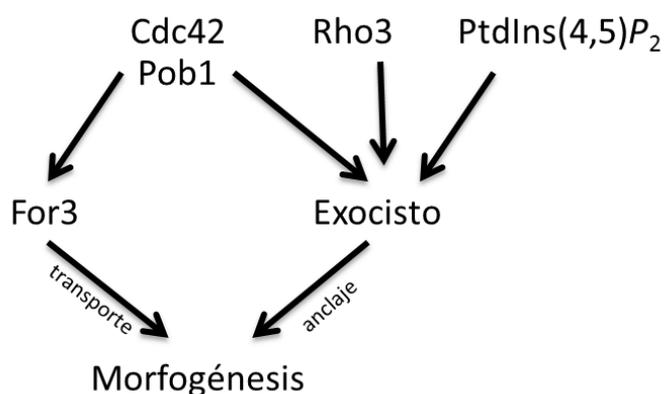


Figura 90 Modelo esquemático de las rutas de control de la morfogénesis por parte de Cdc42. Imagen adaptada de Bendezu y Martin, 2011.

todas las subunidades del exocisto son transportadas por las vesículas secretoras a través de los cables de actina y la presencia de Exo70 o de Sec3 es necesaria para la correcta localización del complejo (Bendezu *et al.*, 2012). Las cepas mutantes en *sec3* muestran a su vez defectos en la organización en el citoesqueleto de actina, poniendo de manifiesto la estrecha relación entre la función del exocisto y el aporte del material

necesario para el crecimiento celular, incluyendo la forma For3 (Jourdain *et al.*, 2012).

En *S. cerevisiae*, Rho3 y Cdc42 interactúan con Exo70 (Wu *et al.*, 2010). Por el contrario, los experimentos de inmunoprecipitación y de doble híbrido no han permitido encontrar ninguna interacción entre Rho3 y los componentes del exocisto Exo70, Sec8 o Sec10 en *S. pombe* (Wang *et al.*, 2003). En este trabajo hemos descrito que Exo70 se une a Cdc42 en su estado inactivo; además, los experimentos de coprecipitación con Sec8 muestran similares resultados sugiriendo que el complejo del exocisto no es un efector directo de Cdc42. Esta hipótesis es apoyada por el rescate parcial del crecimiento termosensible de la cepa mutante *sec8-1* que producen tanto la sobreexpresión de *cdc42⁺* como del alelo dominante negativo *cdc42-T17N*, mientras que la sobreexpresión de *cdc42-G12V*, constitutivamente activo, no produce ningún efecto.

Rho1 se encuentra unida a GDP antes de su llegada a la membrana plasmática (Abe *et al.*, 2003). Es posible que el exocisto interactúe con Cdc42 unida a GDP en la ruta secretora hacia la membrana plasmática. De hecho, en la cepa mutante *cdc42-L160S* el exocisto no se localiza en la membrana plasmática y, mediante experimentos de inmunoprecipitación, se ha visto que Cdc42-L160S interactúa más que Cdc42 con Exo70 (datos no mostrados). No obstante, la interacción de Cdc42 unido a GDP con el exocisto también podría ocurrir en la membrana plasmática donde Cdc42-L160S parece estar inactiva. El análisis mediante modelos matemáticos en *S. cerevisiae* de la dinámica de localización de Cdc42 en la membrana plasmática propone que el aporte de Cdc42 por parte de las vesículas secretoras no es necesario para explicar la localización polarizada de Cdc42 en la membrana plasmática (Savage *et al.*, 2012). El mantenimiento de Cdc42 en la membrana plasmática parece estar regulado por la proteína GDI de esta GTPasa y mediante endocitosis y reciclaje de esta proteína. Las proteínas GDI se unen principalmente a las GTPasas en su estado inactivo ya que en su estado activo suelen formar parte de complejos proteicos que impiden la interacción directa entre GDI y GTPasa. La endocitosis está condicionada por el cambio de unión GTP-GDP (Slaughter *et al.*, 2009). La interacción que vemos entre Cdc42 y el exocisto podría ocurrir durante la endocitosis y reciclado de Cdc42. Varios estudios realizados en diferentes organismos muestran la localización de componentes del exocisto en endosomas de reciclado y su regulación por GTPasas específicas de estos endosomas, como Arf6 y Rab11 (Fielding *et al.*, 2005; Langevin *et al.*, 2005; Oztan *et al.*, 2007; Prigent *et al.*, 2003; Sommer *et al.*, 2005; Takahashi *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2004). De la misma forma, en *S. pombe*, Mug33, cuya función es promover la exocitosis junto al exocisto, también se localiza en endosomas (Snaith *et al.*, 2011). Se ha descrito también que la supresión de la función del exocisto bloquea múltiples rutas de reciclado endocítico (Oztan *et al.*, 2007). Todos estos datos indican que Cdc42 regula el crecimiento celular por medio de la unión a Pob1, que ayuda a localizar el exocisto y promueve la formación de cables de actina. Ambos procesos, a su vez, favorecen la llegada y fusión con la membrana plasmática de las vesículas secretoras que aportan nuevo material de membrana y enriquecen la membrana plasmática en $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$, de la misma forma que ocurre en *S. cerevisiae* (Yakir-Tamang y Gerst, 2009). Se produce así un “feedback” positivo que conduciría a la ruptura de la simetría y al crecimiento polarizado ya que el incremento de $\text{PtdIns}(4,5)\text{P}_2$ favorece

la localización de Pob1 y del exocisto a través de la subunidad Sec3 que posee un dominio PH. Rho3 favorecería esta ruptura de la asimetría de alguna manera aún desconocida. La interacción genética que existe entre los mutantes del exocisto o *for3Δ* con *rho3Δ* indican que Rho3 tiene una función en la ruta exocítica capaz, por sí sola, de localizar al exocisto de forma independiente al módulo Cdc42-Pob1 (Nakano *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2002).

Cdc42 y el tráfico de membranas

Uno de los defectos detectados en la cepa mutante *cdc42-L160S* es la drástica fragmentación de las vacuolas y la acumulación de endosomas marcados con la v-SNARE Syb1 (Edamatsu y Toyoshima, 2003). Este defecto podría deberse a la anormal acumulación de Cdc42 en endomembranas. La fragmentación de vacuolas es suprimida por la sobreexpresión de *pob1⁺*, *rho3⁺* y la t-SNARE *psy1⁺* (Nakamura *et al.*, 2001). En los tres casos hay una mejora en la localización de Syb1. Se ha propuesto que la GTPasa Rho3 tiene también un papel en la regulación del tráfico entre el Aparato de Golgi y los endosomas en *S. pombe* (Kita *et al.*, 2011). El aumento de este tráfico contribuiría a un descenso en la acumulación de vesículas post-Golgi, lo que explicaría que la sobreexpresión de *rho3⁺*, además de mejorar la localización del exocisto, disminuya la acumulación de vesículas marcadas con GFP-Syb1, aumente el tamaño de las vacuolas y disminuya la secreción de Cpy1 causada por los defectos del transporte de la carboxipeptidasa Y a la vacuola. Además, la sobreproducción de Rho3 elimina las estructuras densas a los electrones observadas en *cdc42-L160S*.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que proteínas del complejo SNARE como Sro7, proteína homóloga a Lgl (Lethal giant larvae) y a la tomosina, o Sec9, la proteína homóloga a SNAP-25, son supresoras de cepas mutantes con defectos en el exocisto y de la cepa *rho3Δ* (Lehman *et al.*, 1999). En esta levadura, el componente del exocisto Exo84 interacciona directamente con Sro7 y Sro77 (Zhang *et al.*, 2005), que se unen a Sec9 y la activan (Hattendorf *et al.*, 2007). Sro7, a su vez, es un efector de la Rab GTPasa Sec4, Ypt2 en *S. pombe* (Grosshans *et al.*, 2006; Grosshans y Novick, 2008). También Sso1 y Sso2, las proteínas homólogas a la sintaxina, son supresoras en sobreexpresión de cepas mutantes del exocisto (Aalto *et al.*, 1993). El defecto en el crecimiento de la cepa *cdc42-L160S* es parcialmente rescatado por la sobreproducción de la t-SNARE de membrana plasmática Psy1, la sintaxina de *S. pombe*. Por el contrario, el aumento en los niveles de la v-SNARE Syb1 no causa una supresión similar, sino que provoca la acumulación de esta v-SNARE en estructuras similares a endosomas. Por tanto, la supresión de la termosensibilidad causada por la sobreproducción de Psy1, no parece deberse simplemente al aumento de la formación de complejos SNARE.

En *S. cerevisiae* se ha descrito que los SNAREs de exocitosis Sso1 y Sec9 intervienen en uno de los primeros pasos de la biogénesis de fagosomas mediante la interacción con otros SNAREs vesiculares (Nair y Klionsky, 2011). Del mismo modo Sec4 se ha aislado como una proteína esencial para el proceso de autofagia (Geng *et al.*, 2010) y las vesículas post-Golgi parecen ser

idóneas para este fin (Geng y Klionsky, 2010). También se ha descrito que la autofagia produce un aumento del tamaño de las vacuolas y un descenso en su número (Michaillat *et al.*, 2012). De acuerdo con esto, no se puede descartar que tanto la sobreexpresión de Psy1 como la de Ypt2 estén produciendo una mejora de la termosensibilidad en la cepa mutante mediante el desvío de vesículas secretoras hacia la vía de la autofagia. Psy1 tiene una función esencial en la formación de la membrana de las preesporas, desapareciendo de la membrana plasmática antes de empezar a depositar vesículas alrededor de los núcleos de las preesporas (Maeda *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2001). Esta capacidad de la syntaxina para unirse a la membrana de otras vesículas podría explicar que la sobreexpresión de la t-SNARE Psy1 en la cepa mutante *cdc42-L160S*, además de estar favoreciendo la exocitosis, esté favoreciendo la interacción de Psy1 con las membranas de otras vesículas y la fusión de éstas con las vacuolas, dando como resultado el restablecimiento de vacuolas funcionales.

La sobreproducción de Ypt2, la proteína Rab homóloga a Sec4 (Haubruck *et al.*, 1990), rescata parcialmente la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* y mejora la morfología. Sin embargo, no restaura la localización en la membrana de los componentes del exocisto y no produce un gran aumento en el tamaño de las vacuolas. Esto indica que la supresión podría ser causada por un aumento de la fusión de vesículas en la membrana en áreas en las que ya existía secreción polarizada. En *S. cerevisiae*, se ha descrito que Sec4 y PtdIns(4)*P* colaboran en el anclaje de la miosina de tipo V Myo2 a las vesículas secretoras (Santiago-Tirado *et al.*, 2011). Una posible explicación de las diferencias morfológicas observadas en la sobreproducción de Psy1 e Ypt2 en la cepa *cdc42-L160S*, puede ser, que aunque ambas proteínas intervienen en los últimos pasos de la secreción. Mientras que Psy1 favorece la fusión de vesículas desde la membrana plasmática, provocando una despolarización de la célula, Ypt2 podría estar favoreciendo la unión de Myo52 a las vesículas secretoras y este aumento en el reclutamiento de miosinas de tipo V podría favorecer la unión de vesículas a los restos de cables de actina que llegan a formarse en las zonas de crecimiento de la membrana plasmática de *cdc42-L160S*. Además, se ha descrito recientemente que Myo52 colabora con For3 en la formación de cables de actina (Presti *et al.*, 2012). De este modo Ypt2 mejoraría el fenotipo de la cepa mutante de una forma más localizada. Por otra parte, el hecho de que la sobreproducción de Ypt2 o Psy1 no consiga relocalizar los componentes del exocisto como lo hace la sobreproducción de Rho3 o Pob1, apoyaría la hipótesis ya mencionada de que los defectos observados en la localización del exocisto se deban a defectos en la ruta endocítica o en la ruta de Golgi a endosomas.

La acumulación de Syb1 en endosomas también ocurre en mutantes del complejo adaptador de proteínas AP-1 que muestran defectos en el transporte del Aparato de Golgi a endosomas y de endosomas a la membrana plasmática (Ma *et al.*, 2009). Las células *cdc42-L160S* podrían tener defectos similares en el tráfico de membranas. En células carentes de CDC42 en *Drosophila*, tanto la proteína de polaridad Crumbs como el FM4-64 endocitados se acumulan de forma anormal en grandes endosomas. Este fenotipo indica un defecto en el reciclaje o en el transporte de endosomas tempranos a tardíos (Harris y Tepass, 2008). De hecho, los fenotipos

de la cepa *cdc42-L160S* tales como defectos de secreción de A.P., crecimiento termosensible, fragmentación de vacuolas y secreción de la carboxipeptidasa Y son similares a los defectos encontrados en cepas mutantes del complejo AP-1 (Kita *et al.*, 2004) y también están presentes en mutantes del tráfico de membranas (Cheng *et al.*, 2002; Ma *et al.*, 2009). La maquinaria de fusión de la membrana plasmática, que fue inicialmente descrita en vesículas secretoras, también es usada por las vesículas derivadas de endosomas durante el reciclado de proteínas y membranas (Prigent *et al.*, 2003). Así, un defecto en la regulación de la fusión a membrana afectaría tanto a las vesículas secretoras generadas en el TGN como a los compartimentos endosomales.

Cdc42 y las vacuolas

Se han descrito numerosas localizaciones subcelulares de Cdc42, incluyendo el aparato de Golgi (Erickson *et al.*, 1996) y la membrana vacuolar, donde controla la polimerización de actina durante la fusión homotípica de vacuolas (Jones *et al.*, 2010). En *S. cerevisiae* se ha demostrado que la despolimerización de la actina es una sub-reacción temprana de la fusión de membranas vacuolares, mientras que la formación de F-actina es necesaria para la fusión y estaría catalizada por componentes activados por Cdc42 en la superficie de la membrana vacuolar (Eitzen *et al.*, 2002; Isgandarova *et al.*, 2007). En esta levadura, tanto la sobreexpresión de la forma constitutivamente activa de Cdc42 como la de la forma dominante negativa, producen fragmentación vacuolar (Jones *et al.*, 2010). Parece pues, que varios procesos de transporte y fusión vesicular requieren sub-reacciones de remodelado de actina reguladas por Cdc42. Puesto que la sobreexpresión de *pob1⁺* suprime los defectos de fragmentación vacuolar de la cepa mutante *cdc42-L160S*, no se puede descartar que Pob1 también participe en estos procesos. Por otra parte For3 no sería responsable de la nucleación de la actina que participa en la fusión vacuolar ya que la cepa *for3Δ* no presenta defectos aparentes en las vacuolas.

La interacción genética que muestra Cdc42 con las Rab GTPasas Ypt7 e Ypt71, que participan en la fusión vacuolar, también sugiere defectos en la ruta endocítica de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Al igual que *cdc42-L160S*, la cepa *ypt7Δ* muestra defectos en el procesado de la carboxipeptidasa Y. También presenta estos defectos la cepa *vps34Δ*, lo cual indica su implicación en la fusión de los cuerpos multivesiculares a la vacuola (Iwaki *et al.*, 2004; Tabuchi *et al.*, 1997) y la cepa *fsv1Δ*, carente de una SNARE de fusión vesicular (Takegawa *et al.*, 2003). La sobreexpresión de *ypt7⁺* suprime la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S* y mejora ligeramente la morfología vacuolar. En *S. cerevisiae* se ha descrito que Cdc42 y Rho1 actúan en la fusión vacuolar por debajo de Ypt7 (Eitzen *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2001). Es posible que la mejora observada con la sobreproducción de Ypt7 se deba, no tanto a la fusión vacuolar, sino más bien a la mejora en el tráfico hacia la vacuola.

Los defectos observados de fragmentación vacuolar en la cepa mutante *cdc42-L160S* podrían deberse al estado de hiperactividad de la GTPasa Cdc42-L160S en endomembranas. De hecho, se ha descrito que Nrf1 regula negativamente a Cdc42 en la vacuola en presencia

de Scd1 y como resultado de su sobreproducción se observan grandes vacuolas en la célula (Murray y Johnson, 2000, 2001). La fusión vacuolar en respuesta a estrés osmótico depende de la Rab GTPasa Ypt7 y de las rutas de señalización de MAPK de Sty1 y de Pmk1 (Bone *et al.*, 1998). La delección de Ypt7 o de las MAPK Sty1 o Mpk1 produce un severo defecto en la fusión vacuolar en respuesta a estrés hipotónico. La función de Nrf1 podría ser a través de Ypt7 ya que las células carentes de Ypt7 no muestran grandes vacuolas en la sobreproducción de Nrf1, mientras que sí se observan en células *pmk1Δ* (Murray y Johnson, 2001). También podría actuar después de Ypt7 de tal manera que en ausencia de esta proteína no tuviese ningún efecto. Es importante considerar que la proteína homóloga a Nrf1 en *S. cerevisiae*, Vtc1, pertenece a la familia de proteínas Vtc, con importantes funciones en la fusión vacuolar, interaccionando con la subunidad V_0 de la ATPasa vacuolar y los complejos SNARE, e interviniendo en el último paso de la fusión vacuolar (Muller *et al.*, 2002; Muller *et al.*, 2003). Estos datos indicarían una función de Cdc42 en los últimos estadios de la fusión vacuolar, que está impedida en la cepa mutante *cdc42-L160S* por estar anormalmente activa en este compartimento.

En *S. pombe* es complicado diferenciar entre los procesos del tráfico de vesículas que desembocan en la formación de vacuolas y los procesos de fusión vacuolar, que son principalmente estudiados mediante la respuesta a estrés osmótico (Bone *et al.*, 1998). Por el contrario, en *S. cerevisiae* los estudios *in vitro* han aportado mucha información adicional a los estudios *in vivo* en el proceso de fusión homotípica de vacuolas (Haas *et al.*, 1994; Wickner, 2010). Aunque nuestro trabajo deja patente la importancia de Cdc42 en la fusión vacuolar, hace falta un estudio más exhaustivo de los efectos e interacciones de Cdc42 en la regulación de dicha fusión. El estudio *in vitro* de las vacuolas en *S. pombe* permitiría avanzar sustancialmente en este campo.

Bgs1 y Bgs4 muestran diferentes rutas de tráfico intracelular

Las diferencias observadas en los defectos de localización de GFP-Bgs1 y GFP-Bgs4 en la cepa *cdc42-L160S* indican que existen diferencias en los mecanismos que regulan el tráfico de estas dos proteínas. Recientemente se ha descrito que Bgs1 precisa del complejo AP-1, que interviene en el tráfico vesicular entre el Aparato de Golgi y los endosomas, para localizarse en la membrana plasmática (Yu *et al.*, 2012), mientras que esta ruta no ha sido descrita como necesaria para la localización de Bgs4. Estas diferencias explicarían los defectos de localización de Bgs1 y no de Bgs4 en la cepa *cdc42-L160S* e indicaría que la cepa mutante *cdc42-L160S* muestra defectos en la regulación del tráfico del Aparato de Golgi a endosomas. También es posible que el tráfico de Bgs1 y Bgs4 diverja tras su endocitosis desde la membrana plasmática como ocurre en *S. cerevisiae* con Chs3 y Chs2 (Chuang y Schekman, 1996). Así, Bgs1, de la misma manera que Chs2, tras la endocitosis es dirigida a la vacuola mientras que, Bgs4, más abundante y más necesaria para la biosíntesis general de pared (Cortés *et al.*, 2005), principalmente se recicla a la membrana plasmática. En esta hipotética situación, Cdc42 regularía principalmente el transporte hacia la vacuola y no el reciclaje hacia la membrana plasmática.

En resumen, mediante la caracterización de la cepa mutante *cdc42-L160S* hemos descrito la importancia de Cdc42 en la exocitosis, en el tráfico de vesículas, en la formación de vacuolas y en la fusión homotípica de vacuolas durante el ciclo de vida vegetativo. La función de Cdc42 en estos procesos pone de manifiesto la importancia de una coordinación general de los procesos que intervienen en el crecimiento polarizado.

Cdc42 y la conjugación

La reproducción sexual de *S. pombe* es un proceso altamente coordinado en el que se desencadenan una serie de cambios morfológicos en respuesta a estímulos externos como la ausencia de nutrientes y la presencia de las feromonas. Estos cambios morfológicos están controlados a su vez por programas de expresión génica específicos.

En *S. cerevisiae* se han descrito diversas mutaciones de *CDC42* o de su GEF *CDC24* que han demostrado el papel de Cdc42 en diferentes procesos de la reproducción sexual. Así, en esta levadura, Cdc42 interviene en la activación de la respuesta a feromonas (Heinrich *et al.*, 2007; Lamson *et al.*, 2002; Moskow *et al.*, 2000), en el crecimiento polarizado en respuesta a feromonas (Nern y Arkowitz, 1998) y en la fusión celular (Barale *et al.*, 2006; Nelson *et al.*, 2004; Ydenberg *et al.*, 2012).

En *S. pombe* se ha descrito que la GTPasa Ras1 interviene en dos procesos independientes, la activación de la respuesta a feromonas a través de la MAP-KKK Byr2 durante la conjugación (Wang *et al.*, 1991) y en el control de la morfología celular a través de Scd1 durante el ciclo vegetativo (Chang *et al.*, 1994). De hecho, se ha propuesto que Ras regula la morfogénesis en las membranas de compartimentos intracelulares mientras que la activación de la respuesta a feromonas se desencadena en la membrana plasmática (Onken *et al.*, 2006). Además, se ha descrito que para que la activación de la ruta de respuesta a feromonas tenga lugar, es necesaria la activación de Byr2 por parte de la quinasa Shk1 de la familia PAK (Marcus *et al.*, 1995; Otilie *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 1997). Asimismo, las células que carecen de Scd1, como las que carecen de Ras1, son incapaces de conjugarse, aunque sí activan su respuesta a feromonas (Chang *et al.*, 1994), por lo que Scd1 estaría implicada en el crecimiento polarizado en respuesta a feromonas. También se ha descrito que la sobreexpresión de *cdc42-T17N*, el alelo dominante negativo de Cdc42, causa defectos de conjugación (Marcus *et al.*, 1995). Todos estos datos sugieren que, al igual que en *S. cerevisiae*, en *S. pombe* Cdc42 interviene en la activación de la respuesta a feromonas a través de Shk1 y en el crecimiento polarizado en respuesta a feromonas. De hecho, algunos mutantes de *cdc42* caracterizados en nuestro laboratorio son estériles y no responden a feromonas al cruzarlos con una cepa silvestre. La cepa mutante *cdc42-L160S*, aún a temperaturas permisivas, muestra una eficiencia de conjugación más baja que la de la cepa silvestre. Este descenso en la eficiencia de conjugación parece ser debido a la acumulación de defectos a lo largo del proceso de conjugación, defectos de activación de la respuesta a feromonas, defectos de polaridad y defectos de fusión celular.

El estudio de la activación de Ste11 en respuesta a feromonas indicó que en la cepa *cdc42-L160S*, el número de células que mostraban una marcada localización nuclear del factor de transcripción era menor que en la cepa silvestre. Sorprendentemente, en ausencia del estímulo de las feromonas, el número de células que muestra localización nuclear de Ste11 en la cepa mutante es claramente mayor que en el caso de las células silvestres. Este aumento puede ser debido al aumento de señalización de la ruta de estrés de la MAP quinasa Sty1 ya que la cepa mutante *cdc42-L160S*, debido a sus defectos en el tráfico vesicular y la homeostasis vacuolar, podría tener esta ruta de respuesta a estrés hiperactiva (Degols *et al.*, 1996). La localización nuclear de Ste11 en células heterotáticas de la cepa mutante también podría indicar que la ruta de respuesta a feromonas está constitutivamente activa. En *S. cerevisiae* se ha descrito que Cla4, una de las proteínas PAK de esta levadura, actúa como reguladora negativa en la señalización de la ruta de respuesta a feromonas (Heinrich *et al.*, 2007). Si ocurriese lo mismo en *S. pombe*, un defecto en la interacción de Cdc42-L160S con alguno de sus efectores podría estar impidiendo la correcta regulación de la ruta de señalización de respuesta a feromonas.

Otro de los defectos observados en la cepa mutante *cdc42-L160S* es que el número de células que se encuentran septando tras 5 horas en medio mínimo sin nitrógeno es mayor que en la cepa silvestre (dato no mostrado), lo que podría indicar que las células tienen problemas para detener el crecimiento en la fase G1 del ciclo celular en respuesta a las feromonas (Davey y Nielsen, 1994; Imai y Yamamoto, 1994). También podría indicar que las células *cdc42-L160S* tienen problemas de citocinesis y separación celular.

La cepa mutante *cdc42-L160S* también muestra defectos de polarización durante la conjugación. Las células pierden la polaridad en ausencia de nitrógeno y el citoesqueleto de actina se despolariza, sin que sea posible determinar la localización bipolar de los parches de actina típica del inicio de la diferenciación sexual (Petersen *et al.*, 1998a). Posiblemente, la ausencia de Cdc42-L160S unida a GTP en la membrana plasmática provoque estos defectos de polaridad. Antes de iniciar la proyección del *shmoo*, diversas proteínas como los componentes del exocisto, Bgs1, Bgs4, Cdc42 activa o Pob1 muestran una localización en forma de placas con distribución aleatoria en la membrana. En *S. cerevisiae* también se ha visto este tipo de localización en proteínas encargadas de la proyección del *shmoo* (Yu *et al.*, 2008). En la cepa mutante *cdc42-L160S* a temperatura permisiva se observan los mismos patrones de localización de Bgs1 y Bgs4 pero no en los casos de Cdc42 activa y Pob1. Una vez que las células comienzan a proyectar el *shmoo* hacia la fuente de feromonas, esta localización aleatoria desaparece y las proteínas mencionadas se concentran en el *shmoo*. Curiosamente, en la cepa mutante *cdc42-L160S* la localización aleatoria en placas se observa todavía cuando las células están iniciando la fusión celular. Este hecho también apoya la hipótesis de que Cdc42 juega un papel en el crecimiento polarizado en respuesta a feromonas.

Los defectos en la aglutinación y en la localización de la aglutinina Map4 observados en la cepa mutante podrían ser causados tanto por una baja transcripción de *map4⁺*, debida a defectos en la transducción de la señal de respuesta a feromonas, como por defectos en la polarización de

la secreción de esta proteína, que a su vez serían causados por un defecto en la regulación del crecimiento polarizado durante la conjugación.

Los defectos de polaridad y de transducción de la señal de respuesta a feromonas presentes en la cepa mutante *cdc42-L160S* sugieren que Cdc42 participa en la detección de la fuente de feromonas permitiendo un crecimiento polarizado quimiotrópico. Es posible, que el mecanismo de fluctuación de la actividad de Cdc42 observado durante el crecimiento vegetativo bipolar (Das *et al.*, 2012b), también ocurra durante los primeros momentos de la conjugación ya que este mecanismo permitiría a la célula una respuesta rápida a los estímulos externos en condiciones adversas, como son las condiciones en las que tiene lugar la reproducción sexual.

Curiosamente, cuando se estudia la conjugación de la cepa mutante *cdc42-L160S* en medio sólido se observan *shmoo*s muy alargados, típicos de células con problemas de fusión celular, como las cepas mutantes de *fus1⁺*, *cfr1⁺*, *dni1⁺*, *myo51⁺*, *cdc3⁺*, *cdc8⁺* (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006; Clemente-Ramos *et al.*, 2009; Doyle *et al.*, 2009; Kurahashi *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 1998a; Petersen *et al.*, 1995), lo que indica que Cdc42 podría estar también participando en el proceso de fusión celular.

La formina Fus1 es necesaria para que la fusión celular se lleve a cabo (Petersen *et al.*, 1995). La localización de Fus1 y la profilina Cdc3, es similar en la proyección del *shmoo* y se ha especulado que la formación de un anillo de actina en la zona de fusión permite la apertura del puente de conjugación (Petersen *et al.*, 1998a, b). Posteriormente, el puente de conjugación se agranda para permitir la formación del cigoto y la correcta cariogamia. Se ha propuesto que esta estructura de actina del *shmoo* se encargaría de coordinar la llegada de vesículas portadoras de endoglucanasas que permitieran la degradación y remodelación de la pared celular (Doyle *et al.*, 2009). A pesar de los defectos que muestra la cepa mutante *cdc42-L160S* durante la conjugación, Fus1 se localiza correctamente. En *S. pombe* se ha descrito además una ruta, independiente a Fus1, cuya función es esencial para la fusión celular y en la que participaría Cfr1 (Cartagena-Lirola *et al.*, 2006). Cfr1 está implicada en transporte vesicular durante la conjugación. En su ausencia no se han observado defectos en la localización de las glucán sintetas Bgs1, Bgs3 y Bgs4 ni de la α -glucanasa Agn1 pero las células muestran defectos en la degradación de la pared de los pre-zigotos. Estudios futuros determinarán si Cdc42 y Cfr1 se encuentran en la misma ruta funcional. En los organismos pluricelulares los procesos de fusión celular son comunes y en algunos casos, como en la fusión de mioblastos en *Drosophila*, se ha demostrado que las GTPasas Drac1 y Drac2, similares a Cdc42, son necesarias para que tenga lugar la fusión (Hakeda-Suzuki *et al.*, 2002), principalmente activadas por un GEF no convencional (Brugnera *et al.*, 2002; Erickson *et al.*, 1997). Además Cdc42 es necesaria para la fusión de mioblastos en ratón (Vasyutina *et al.*, 2009).

Aun cuando las células *cdc42-L160S* llegan a fusionarse, presentan también problemas para aumentar el tamaño del puente de conjugación. Las células con este tipo de problemas muestran asociados defectos en la segregación de las esporas, apareciendo cigotos con tres o cuatro esporas al mismo lado del puente de conjugación (Doyle *et al.*, 2009). La cepa mutante *cdc42-L160S* presenta estos defectos. Asimismo, las células con defectos en el anillo de septinas son incapaces

de aumentar el tamaño del puente de conjugación (Onishi *et al.*, 2010). El anillo de septinas, que durante el crecimiento vegetativo es importante para la correcta llegada de endoglucanasas a la zona de división (Martin-Cuadrado *et al.*, 2005), aparece durante la conjugación entre las dos células que forman el pre-zigoto (Onishi *et al.*, 2010). La cepa mutante *cdc42-L160S* muestra un retraso en la formación de los anillos de septinas que podría ser la causa de los defectos en la remodelación del puente de conjugación. Por ahora no sabemos si estos defectos en el anillo de septinas son causados indirectamente por un retraso en pasos previos de la fusión celular o se deben a que Cdc42 regula directamente la organización de esta estructura tal y como se ha descrito en *S. cerevisiae* (Cid *et al.*, 2001; Gladfelter *et al.*, 2001; Iwase *et al.*, 2006). Sin embargo, no se han observado defectos de citocinesis en ninguno de los mutantes de *cdc42* obtenidos hasta la fecha, por lo que *a priori* no hay razones para considerar una participación directa de Cdc42 en la organización de las septinas.

En *S. cerevisiae* se ha sugerido que la proteína Rvs161, junto con Rvs167, podrían ayudar a la apertura del puente de conjugación mediante el aporte de vesículas encargadas de la remodelación de la pared celular (Brizzio *et al.*, 1998; Paterson *et al.*, 2008; Sheltzer y Rose, 2009). En *S. pombe* se ha descrito que Hob3, la proteína homóloga de Rvs161, interacciona con Gef1 y Cdc42 (Coll *et al.*, 2007), por lo que pudiera ser que durante la formación del cigoto Hob3 participase en la remodelación del puente de conjugación y que la ausencia de Cdc42 activa en la membrana plasmática de la cepa mutante *cdc42-L160S* impidiese la función de Hob3. Sin embargo, no se han descrito defectos de la cepa *hob3Δ* en conjugación (Coll *et al.*, 2007; Routhier *et al.*, 2001).

Los defectos de la cepa mutante *cdc42-L160S* durante la conjugación aquí descritos permiten adjudicar nuevas funciones a la proteína Cdc42 de *S. pombe* en la regulación de la respuesta a feromonas, en el establecimiento de la polaridad celular en respuesta a estímulos externos y en la fusión celular aunque se necesitará realizar estudios más detallados de dichas funciones en el futuro.

Conclusiones

Conclusiones

1. Cdc42, junto con su proteína efectora Pob1, participa en la localización del exocisto y regula la secreción celular en *S. pombe*.
2. Cdc42 regula varios procesos del tráfico intracelular en *S. pombe*.
3. Rho3 y Cdc42 son parcialmente redundantes en la regulación de la exocitosis y del tráfico intracelular en *S. pombe*.
4. Cdc42 participa en la fusión vacuolar en *S. pombe*.
5. Cdc42 interviene en la señalización y en la diferenciación morfológica necesarias para la conjugación de *S. pombe*.
6. Cdc42 participa en la fusión celular durante la conjugación en *S. pombe*.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

1. Microorganismos utilizados

El presente trabajo se ha realizado principalmente con la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Todas las cepas se recogen en la **Tabla I**, donde se detalla su procedencia y su genotipo. Para la realización de los experimentos de interacción de proteínas mediante el sistema del doble híbrido se ha utilizado la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* Y190 (Durfée *et al.*, 1993).

Tabla I. Cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
Estirpe	Genotipo	Origen
PPG0371	h ⁻ leu1-32 ura4-D18	Colección laboratorio
PPG0103	h ⁺ leu1-32 ura4-D18	Colección laboratorio
PPG5658	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-879:ura4 ⁺	Colección laboratorio
PPG6521	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG6520	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-D76G:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG7423	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este trabajo
PPG6921	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-D76G:KanMX6	Este trabajo
PPG5660	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 for3-3GFP:ura4 ⁺	S. Martin
PPG9310	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-L160S:KanMX6 for3-3GFP:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG7046	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-D76G:KanMX6 for3-3GFP:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG5665	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 hys3-D1 myo52-GFP:KanMX6	Y. Sánchez
PPG6577	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 myo52-GFP:KanMX6 HA-cdc42-D76G:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG6579	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 myo52-GFP:KanMX6 HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG6555	h ⁻ leu1-32 ura4-294::(shk1 promoter:ScGIC2:3XGFP:ura4 ⁺)	K. Shiozaki
PPG9808	h ⁻ leu1-32 ura4-294::(shk1 promoter:ScGIC2:3XGFP:ura4 ⁺) HA-cdc42-L160S: KanMX6	Este Trabajo
PPG10544	h ⁻ leu1-32 ura4-294::(shk1 promoter:ScGIC2:3XGFP:ura4 ⁺) HA-cdc42-D76G: KanMX6	Este Trabajo
PPG9805	h ⁻ ura4-D18 leu1 ⁺ :GFP-A8-cdc42	Este Trabajo

Tabla I. Cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Origen
PPG9366	h ⁻ ura4-D18 leu1 ⁺ :GFP-A8-cdc42-L160S	Este Trabajo
PPG9368	h ⁻ ura4-D18 leu1 ⁺ :GFP-A8-cdc42-L160S HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG2567	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 ⁻ for3::KanMX6	B. Feierbach
PPG6469	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 exo70-GFP:KanMX6	Colección laboratorio
PPG7470	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 exo70-GFP:KanMX6 HA-cd42-L160S :ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG7472	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 exo70-GFP:KanMX6 for3::KanMX6	Este Trabajo
MBY856	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 sec8-GFP:ura4 ⁺	M. K. Balasubramanian
PPG7451	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 sec8-GFP:ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo
PPG8511	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 sec8-GFP:ura4 ⁺ for3::KanMX6	Este Trabajo
PPG5466	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 GFP-pob1:ura4 ⁺	Colección laboratorio
PPG9308	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 GFP-pob1:ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo
PPG8329	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 rho3::Nat	Colección laboratorio
PPG8571	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 rho3::Nat HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG4711	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 HA-cdc42:ura4 ⁺	Colección laboratorio
MBY866	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 exo70-13myc:KanMX6	M. K. Balasubramanian
PPG8539	h ⁻ leu1-32 ura4-D18 exo70-13myc:KanMX6 HA-cdc42 :ura4 ⁺	Este Trabajo
MBY887	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 sec8-1	M. K. Balasubramanian
PPG8513	h ⁹⁰ leu1 ⁺ :GFP-psy1	YCGR
PPG8515	h ⁹⁰ leu1 ⁺ :GFP-psy1 HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo
PPG8517	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 GFP-syb1:KanMX6	Masaki Edamatsu
PPG8536	h ⁻ leu1-32 GFP-syb1:KanMX6 HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG9381	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 cpy1::KanMX6	Colección laboratorio
PPG0727	h ⁹⁰ leu1-32 ste12-N9	C. Shimoda
PPG10519	h ⁹⁰ leu1-32 ste12-N9 HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo

Tabla I. Cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Origen
PPG10510	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 ypt7::ura4 ⁺	J. Armstrong
PPG10580	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 ypt7::ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo
PPG10501	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 ypt71::KanMX6	Colección laboratorio
PPG9880	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 ypt71::KanMX6 HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG6010	h ⁻ ura4-D18 hys3-D1 bgs1-GFP:leu1 bgs1::ura4 ⁺	J.C. Ribas
PPG7437	h ⁻ ura4-D18 hys3-D1 bgs1-GFP:leu1 bgs1::ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S :KanMX6	Este Trabajo
PPG6011	h ⁺ ura4-D18 hys3-D1 bgs4-GFP:leu1 ⁺ bgs4::ura4 ⁺	J.C. Ribas
PPG7439	h ⁺ ura4-D18 hys3-D1 bgs4-GFP:leu1 ⁺ bgs4::ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S :KanMX6	Este Trabajo
PPG7035	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18	Colección laboratorio
PPG11168	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este trabajo
PPP6557	h ⁹⁰ leu1-32 ade6 ⁻ ste11-GFP:ura4 ⁺	M. McLeod
PPP6558	h ⁺ leu1-32 ade6 ⁻ ste11-GFP:ura4 ⁺	M. McLeod
PPP6559	h ⁻ leu1-32 ade6 ⁻ ste11-GFP:ura4 ⁺	M. McLeod
PPP11163	h ⁹⁰ leu1-32 ade6 ⁻ ste11-GFP:ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este trabajo
PPP11161	h ⁺ leu1-32 ade6 ⁻ ste11-GFP:ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este trabajo
PPP11162	h ⁻ leu1-32 ade6 ⁻ ste11-GFP:ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este trabajo
PPG11154	h ⁹⁰ ura4-D18 leu1:GFP-A8-cdc42	Este Trabajo
PPG11173	h ⁹⁰ ura4-D18 leu1:GFP-A8-cdc42-L160S HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG11153	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-294::(shk1 promoter:ScGIC2:3XGFP:ura4 ⁺)	Este Trabajo
PPG111.57	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-294::(shk1 promoter:ScGIC2:3XGFP:ura4 ⁺) HA-cdc42-L160S: KanMX6	Este Trabajo
PPG11181	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 GFP-pob1:ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG11519	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 GFP-pob1:ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo
PPG11172	h ⁹⁰ ura4-D18 ade6-M216 map4::ura4 ⁺ leu1:map4-GFP	M.H.Valdivieso
PPG11503	h ⁹⁰ ura4-D18 ade6-M216 map4::ura4 ⁺ leu1:map4-GFP HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo

Tabla I. Cepas de *S. pombe* utilizadas en este trabajo.

Estirpe	Genotipo	Origen
PPG11152	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 exo70-GFP:KanMX6	Este Trabajo
PPG11164	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 exo70-GFP:KanMX6 HA-cdc42-L160S :ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG11180	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 sec8-GFP:ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG11505	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 sec8-GFP:ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S:KanMX6	Este Trabajo
PPG11156	h ⁹⁰ ura4-D18 bgs1-GFP:leu1 bgs1::ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG11159	h ⁹⁰ ura4-D18 bgs1-GFP:leu1 bgs1::ura4 ⁺ HA-cdc42-L160S :KanMX6	Este Trabajo
PPG11155	h ⁺ ura4-D18 leu1 ⁺ :REF-bgs4	Este Trabajo
PPG11160	h ⁺ ura4-D18 leu1 ⁺ :RFP-bgs4 HA-cdc42-L160S :KanMX6	Este Trabajo
PPG11171	h ⁹⁰ ura4-D18 ade6-M216 dni1::KanMX6 leu1:dni1-GFP	M.H.Valdivieso
PPG11501	h ⁹⁰ ura4-D18 ade6-M216 dni1::KanMX6 leu1:dni1-GFP HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este Trabajo
PPG6573	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 ade6 ⁻ fus1-GFP:KanMX6	M.H.Valdivieso
PPG11507	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 ade6 ⁻ fus1-GFP:KanMX6 HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este trabajo
PPG11521	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 spn1-GFP:KanMX6	Este trabajo
PPG11524	h ⁹⁰ leu1-32 ura4-D18 spn1-GFP:KanMX6 HA-cdc42-L160S:ura4 ⁺	Este trabajo
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>		
PPG0836	MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112 ura3::gal1→LacZ lys2::gal(UAS) →his3 cyh	S. Elledge
<i>Escherichia coli</i>		
DH5α	φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYAargF) U169 hsdR17 deoR recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1 phoA supE44λ ⁻	

Todas las cepas se conservaron a -78°C . Las cepas de *S. pombe* y la de *S. cerevisiae* en glicerol al 25 % y la de *E. coli* en glicerol al 50%.

2. Medios de cultivo

2.1 Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* han

sido descritos en (Moreno *et al.*, 1991). Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2 %. Todos los medios fueron preparados con agua destilada (Milli-Rho) y esterilizados en un autoclave.

- **Medio YES (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). En los casos en que era necesaria la presencia de un estabilizador osmótico, se añadió sorbitol, a una concentración de 1,2 M previamente a la esterilización del medio de cultivo.
- **Medio YES+G.** Se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* que llevaban el gen 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 (EMM, *Edinburgh Minimal Media*).** Se utilizó para la selección y/o cultivo de cepas de *S. pombe* auxótrofas y en experimentos de sobreexpresión de genes con el promotor del gen *nmt*. En estos experimentos las células se cultivaron en medio mínimo con los suplementos adecuados y tiamina (5 µg/l), consiguiendo la represión del promotor (Maundrell, 1990). Posteriormente, las células se lavaron 4 veces con agua estéril y se reinocularon en medio mínimo sin tiamina, provocando la inducción del promotor y la expresión del gen regulado por él. La composición del EMM es la siguiente: Glucosa al 2%, ftalato monopotásico 0,3%, Na₂HPO₄ al 0,22%, NH₄Cl al 0,5%. Esta disolución se esteriliza en el autoclave y posteriormente se le añaden diferentes cantidades de las soluciones concentradas de sales, minerales y vitaminas, que han sido esterilizadas previamente por filtración:
 - Solución concentrada de sales (50X): 0,26 M MgCl₂·6H₂O, 5 mM Cl₂Ca·2H₂O, 0,67 M KCl y 14 mM Na₂SO₄.
 - Solución concentrada de minerales (10.000X): 81 mM H₃BO₃, 23,7 mM MnSO₄, 14 mM ZnSO₄·7H₂O, 7,4 mM FeCl₃·6H₂O, 2,5 mM MoO₄·2H₂O, 6 mM KI, 1,6 mM CuSO₄·5H₂O y 47,6 mM ácido cítrico.
 - Solución concentrada de vitaminas (1000X): 81,2 mM ácido nicotínico, 55,5 mM inositol, 40,8 mM biotina y 4,2 mM ácido pantoténico.

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

- **Medio mínimo sin nitrógeno (EMM-N):** Utilizamos este medio para realizar los experimentos de conjugación en medio líquido. La composición del medio es la siguiente: Glucosa al 2%, ftalato monopotásico 0,3%, Na₂HPO₄ al 0,22%. Esta disolución se esteriliza en el autoclave y posteriormente se le añaden diferentes cantidades de las soluciones concentradas de sales, minerales y vitaminas.
- **Medio de esporulación (MEA).** Usado para la conjugación y la esporulación en *S.*

pombe. Su composición es: Extracto de malta al 3% suplementado con adenina, histidina, leucina y uracilo (225 mg/l).

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 protótrofos de histidina 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 la selección y/o cultivo de cepas auxótrofas se empleó una mezcla comercial de aminoácidos (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, 35°C, 36°C o 37°C. En el caso de los cultivos líquidos, los matraces se mantuvieron con una agitación de entre 200 y 250 rpm y el volumen de cultivo no superó ¼ del volumen del matraz, para permitir su correcta aireación.

El crecimiento en medio líquido se determinó mediante lectura de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro (BioRad Smart-Spec 3000). Se emplearon curvas de

calibración obtenidas previamente en el laboratorio según las cuales una densidad óptica de 0,8 equivale aproximadamente a 10^7 células/ml de *S. pombe*. El mantenimiento de las cepas se realizó por resiembra en placas de medio sólido.

3.2 Ensayos de crecimiento en gota

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

3.3 Detección de la actividad β -galactosidasa en placa

Además del crecimiento en YNB+3AT, en los ensayos de doble híbrido se analizó la actividad β -galactosidasa de las colonias capaces de crecer en medio sin leucina ni triptófano siguiendo el proceso descrito (Durfee *et al.*, 1993). Las colonias se transfirieron a filtros de nitrocelulosa, se permeabilizaron por inmersión de 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, 0,12 g/l MgSO_4 y 2,7 ml 2- β -mercaptoetanol) con 1 mg/ml de X-Gal (American Biorganics). Los filtros se incubaron a 36°C de 1 a 5 horas para verificar la coloración azulada de las colonias.

4. Métodos genéticos

4.1 Conjugación

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe*, se usaron estirpes heterotáticas de tipo sexual opuesto (h^+ o h^-) incubadas durante 24 horas en placas de medio YES. Se recogió aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa y se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (25 μ l). A continuación, se depositó la suspensión de células en una placa de MEA. Los cigotos se originan 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 25°C.

4.2 Aislamiento de ascosporas

Para obtener esporas, se hicieron suspensiones en agua estéril de la mezcla de conjugación incubadas durante 2 días a 25°C en placas de MEA y 3 días en el caso de los cruces con la cepa mutante *cdc42-L160S*, y se trataron con 20- 50 unidades de glucusasa (PerkinElmer Life Sciences Inc.) durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Este tratamiento destruye las

paredes celulares de las células vegetativas, sin afectar a las ascosporas, que poseen una pared más resistente. Se recogieron las esporas por centrifugación a 3.000 rpm durante 1 minuto. La mezcla de esporas fue lavada 4 veces con agua estéril y con la ayuda de una cámara Thoma se estimó el número de esporas por mililitro. Se realizaron diluciones apropiadas, para obtener entre 100 y 1.000 esporas por placa, y se extendieron en placas de YES. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C-28°C. Mediante réplica en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado.

4.3 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación

Con el fin de determinar los productos de la segregación meiótica se realizó el análisis de tétradas. El proceso se llevó a cabo con un micromanipulador automático (Singer MSM System Series 200) de la forma siguiente: se resuspendió una pequeña cantidad de cultivo esporulado en 200 μ l de agua estéril y se extendieron 5 μ l en un extremo de una placa de YES. Se recogieron ascas y se depositaron en una zona de la placa libre de células. Se incubó la placa durante 4-6 horas a 25°C o 32°C. Se depositaron las 4 esporas de cada asca en posiciones libres de células de la misma placa. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C o 28°C. Finalmente, para realizar el estudio genotípico de cada espora, se realizaron réplicas en medios selectivos o se incubaron a temperaturas permisiva y restrictiva para el aislamiento de las cepas termosensibles.

5. Procedimientos generales de biología molecular

5.1 Vectores utilizados

VECTORES DE *E. coli*

- pBluescript KS+ y SK+ (Stratagene). Son plásmidos autorreplicativos de 2,9 kb que llevan el gen de resistencia a ampicilina, el origen de replicación *colE1* y un fragmento del operón de lactosa de *E. coli* que codifica el péptido α de la β -galactosidasa (LacZ'). Los dos vectores se diferencian por la orientación del sitio de clonación múltiple y los promotores de las ARN-polimerasas T3 y T7 que los flanquean y que sirven para la síntesis *in vitro* del ARN. Llevan el origen de replicación del fago f1 que permite la obtención de ADN monocatenario tras infección de las células portadoras del plásmido con el fago auxiliar M13K07. En el laboratorio, se construyó una versión modificada del plásmido pBluescript SK+ cuyo sitio de clonación múltiple fue alterado introduciendo nuevos sitios de clonación y un epítipo de hemaglutinina del virus de la influenza. Este plásmido fue construido por el Dr. Manuel Arellano.
- pGEX (Pharmacia). Contiene el gen que codifica la proteína GST (de Glutathion-S Transferasa), el gen de resistencia a ampicilina y el promotor T7 junto con el operón de lactosa para inducir la expresión del gen clonado en presencia de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

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

VECTORES DE *S. pombe*

- pAU-KS+. Este vector de 6,5 kb fue obtenido por el Dr. J. Ishiguro (Konan University, Japón) a partir del plásmido pBluescript II KS+ al que se le ha añadido: un fragmento de ADN que incluye sitios de reconocimiento para 11 enzimas de restricción en la zona estructural que codifica el péptido α de la β -galactosidasa; el origen de replicación *ars1* de *S. pombe*; y el gen *URA4* de *S. cerevisiae*, capaz de complementar la mutación *ura4* 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 y 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 auxotroffas de *S. pombe* y el promotor del gen *nmt1* (no messenger with thiamine) fusionado a un sitio de clonación múltiple, que permite sobreexpresar los insertos clonados cuando se incuban las células en ausencia de tiamina. Todos los vectores pREPX proceden del vector pREP1 (Maundrell, 1990), de elevada expresión, al que se le incorporó un sitio *XhoI* en el sitio de clonación múltiple (Forsburg, 1993). Los distintos vectores pREPX se diferencian entre sí por:
 - *El marcador de selección: LEU2* de *S. cerevisiae* (que complementa estirpes *leu1-32*), en el caso de los vectores denominados con número impar, pREP1, pREP3X,

pREP41X y pREP81X; y *ura4⁺* (que complementa estirpes *ura4-D18*), en el caso de los vectores denominados con número par, pREP4X, pREP42X y pREP82X.

- *El promotor*: para poder inducir niveles de expresión intermedios, se modificó el promotor *nmt* original introduciendo una serie de mutaciones en su secuencia TATA, que disminuyen la fortaleza de éste. Así, los vectores de expresión fuerte son los plásmidos pREP1, pREP3X y pREP4X, los de expresión intermedia son pREP41X y pREP42X; y los de expresión baja son pREP81X y pREP82X (Basi *et al.*, 1993).

Existe una versión de plásmidos pREP denominados pJR3X, pJR41X y pJR81X (Moreno *et al.*, 2000), que derivan de los plásmidos pREP3X, pREP41X y pREP81X (Forsburg, 1993). Estos plásmidos contienen la misma estructura base de los plásmidos pREP, y se diferencian en que contienen tres marcadores de selección distintos (*LEU2* de *S. cerevisiae* que complementa *leu1-32* de *S. pombe*, *ura4⁺* e *his3⁺*) y dos sitios de clonación múltiple diferentes (cada uno con 12 sitios de restricción únicos) (Moreno *et al.*, 2000).

Dentro de la familia de plásmidos pREP se encuentra también el vector pREP-KZ o pREP1-GST (Shiozaki y Russell, 1995). Se trata de un vector pREP1 que contiene en el extremo 5' del sitio de clonación múltiple, la secuencia codificante de la proteína GST y un sitio de corte para la trombina, y en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple, la secuencia codificante de dos epítomos de la hemaglutinina. 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 epítopo HA de la hemaglutinina (Craven *et al.*, 1998).

VECTORES DE *S. CEREVISIAE*

- pAS2 y pACT2. Estos vectores de expresión de *S. cerevisiae* se emplean para el ensayo 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 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 epítomos 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 *cyhr*.
 - El vector pACT2, por su parte, posee el dominio de activación transcripcional del gen *GAL4* en fase con la secuencia de dos epítomos de la hemaglutinina y un sitio de clonación múltiple. Como marcador auxotrófico en *S. cerevisiae*, lleva el gen *LEU2*.

5.2 Obtención de ADN

La extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias se efectuó por el método de lisis

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

5.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se llevó a cabo en los termocicladores GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems y MyCycler™ Thermal Cycler de BioRad. Las mezclas de reacción contenían: tampón de reacción suministrado por el proveedor, 1,5 mM MgCl₂, los 4 desoxinucleótidos trifosfato precursores a una concentración final de 0,2 mM cada uno, 0'40 μM de cada oligonucleótido utilizado como cebador, 0,5 U/μl de polimerasa Taq (EcoTaq, Ecogen) y una cantidad de ADN molde variable, dependiendo de si se trataba de ADN genómico o plasmídico. Para la comprobación rutinaria de cepas mutantes de *S. pombe*, se utilizaron células directamente, sin necesidad de extraer el ADN. La reacción requiere la desnaturalización del ADN molde, el anillamiento de los cebadores u oligonucleótidos incorporados a la reacción y, finalmente, la extensión de las hebras sintetizadas. En cada momento se requiere que la reacción se encuentre a una temperatura determinada. El número de ciclos, la temperatura de anillamiento y el tiempo de extensión se modificó dependiendo de las características del experimento. La purificación de los productos de PCR se realizó mediante el sistema GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit de GE Healthcare.

5.4 Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN se realizó en el servicio de secuenciación de la Universidad de Salamanca que utiliza un secuenciador automático Abi prism 3100 Genetic analyzer (Applied Biosystems). La técnica usada se basa en el protocolo descrito (Sanger *et al.*, 1977), pero en este caso, se emplearon 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.

5.5 Manipulación de ADN

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

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

(UltraPure, Life Technologies) de distinto porcentaje (0,7-1,5 %), según el tamaño de los fragmentos a analizar. Los geles de agarosa llevaban bromuro de etidio a una concentración final de 0,1 µg/ml, para localizar el ADN mediante iluminación con una fuente de luz ultravioleta. El tampón utilizado, tanto para preparar la agarosa como para realizar la electroforesis, fue TAE (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA (ácido etilén diamino tetra-acético), pH 8,0).

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

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

5.6 Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* con plásmidos o con mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado por Kushner, 1978, basado en el choque térmico. En algunos casos, la transformación con plásmidos purificados se realizó por un método simplificado conocido como “transformación del minuto” (Golub, 1988).

5.7 Transformación de levaduras

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

5.8 Construcción del módulo de integración de *cdc42*

Para poder intercambiar las ORF de *cdc42*⁺ por las versiones mutadas de la misma, se construyó un módulo de integración. Este módulo contenía 500 pares de bases de la región promotora de *cdc42*, la secuencia del gen que codifica el epítipo HA, las ORFs de *cdc42* mutadas, la secuencia 3' del gen *adh*, el módulo de resistencia a geneticina (*KanMX6*) o el gen *ura4*⁺ y 500 pares de bases de la región 3' de *cdc42*⁺. El módulo de integración se construyó mediante clonación secuencial de cada una de las partes en el plásmido SK-HA (Figura 91).

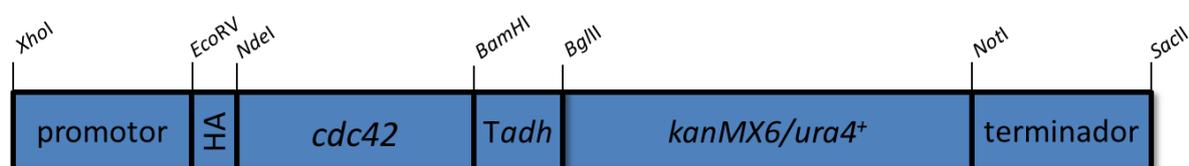


Figura 91 Módulo de integración de *cdc42* utilizado en las cepas *cdc42-879*, *cdc42-D76G* y *cdc42-L160S*.

5.9 Clonación de genes supresores

Determinados genes de *S. pombe* se utilizaron para ver si eran capaces de suprimir en

sobreexpresión la termosensibilidad de la cepa mutante *cdc42-L160S*. Dichos genes se clonaron llevando a cabo una PCR de alta fidelidad a partir de una genoteca de ADN codificante. Se utilizaron los oligonucleótidos F (Forward) de los distintos genes, que incorporan los sitios *Bam*HI y *Nde*I, y R (reverse) que incorporan el sitio *Bam*HI (Tabla II). Los productos de la PCR de alta fidelidad se clonaron en el plásmido pGEM-T para permitir la secuenciación de diferentes clones. Una vez comprobado que la secuencia era correcta, se clonaron en los plásmidos pREP3X, pREP41X y pREP81X en el sitio *Bam*HI de su secuencia de clonación múltiple.

Tabla II. Lista de oligonucleótidos utilizados para la clonación de genes.

Gen	Nombre	Secuencia
<i>psy1</i> ⁺	<i>psy1</i> F	5'-atatatggatccATGAATAAAGCAAACGATTATACAC-3' <i>Bam</i> HI
<i>psy1</i> ⁺	<i>psy1</i> R	5'-atatatggatccTCAATGTCTATTGCCAAGAACAG-3' <i>Bam</i> HI
<i>syb1</i> ⁺	<i>syb1</i> -F	5'-atatatggatccATGTCTGAGCCATATGACCCA-3' <i>Bam</i> HI
<i>syb1</i> ⁺	<i>syb1</i> -R	5'-atatatggatccTACTTGCCATGAAATTTTGTTC-3' <i>Bam</i> HI
<i>exo70</i> ⁺	<i>exo70</i> -F	5'-atatatggatccatATGAGTGGTGGTATTTTGATGA-3' <i>Bam</i> HI <i>Nde</i> I
<i>exo70</i> ⁺	<i>exo70</i> -R	5'-atatatggatccTCATAGGGAAGGAGCAAACGC-3' <i>Bam</i> HI
<i>ypt2</i> ⁺	<i>ypt2</i> -F	5'-atatatggatccatATGTCTACAAAATCCTACGATTA-3' <i>Bam</i> HI <i>Nde</i> I
<i>ypt2</i> ⁺	<i>ypt2</i> -R	5'-atatatggatccCTAACAACACCTCTTCACCG-3' <i>Bam</i> HI
<i>ypt7</i> ⁺	<i>ypt7</i> -F	5'-atatatggatccatATGCGCGCAAAAAGAAGCAT-3' <i>Bam</i> HI <i>Nde</i> I
<i>ypt7</i> ⁺	<i>ypt7</i> -R	5'-atatatggatccTTAACAGTAACATGAAGTTTTTTGAC-3' <i>Bam</i> HI
<i>ypt71</i> ⁺	<i>ypt71</i> -F	5'-atatatggatccatATGTCCGGCTCAGAAAAGGGTG-3' <i>Bam</i> HI <i>Nde</i> I
<i>ypt71</i> ⁺	<i>ypt71</i> -R	5'-atatatggatccCTAGCAATTACAAGAAGATGTAT-3' <i>Bam</i> HI

6. Análisis de proteínas

6.1 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 x 10⁸ células en 200 µl del tampón de lisis correspondiente con inhibidores de proteasas (2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml peptatina y 1 mM PMSF). Las células se lisaron con bolitas de vidrio (v/v) (G8772, Sigma), en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6,0.

Se comprobó la rotura celular por observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito (Bradford, 1976).

6.2 Precipitación e inmunoprecipitación

Para realizar los ensayos de precipitación e inmunoprecipitación, obtuvimos extractos de 5×10^8 células que expresaban las diferentes proteínas marcadas con epítomos HA y Myc o con la proteína GST. El tampón de lisis utilizado en estas coprecipitaciones consta de 20 mM Tris·HCl pH 8, 100 mM NaCl, 0,5 % NP-40 e inhibidores de proteasas (2 µg/ml aprotinina, 2 µg/ml leupeptina, 2 µg/ml pestatina y 1 mM PMSF). En el caso de las proteínas marcadas con GST, se incubaron los extractos (2 mg de proteína total) en presencia de 30 µl de bolitas de glutationsefarosa (Glutathione Sepharose 4B, GE Healthcare) al 50 % (v/v) durante 2-4 horas en agitación a 4°C. En el caso de proteínas marcadas con otros epítomos, se incubaron los extractos (2-4mg) con anticuerpos policlonales frente al epítomo de interés durante 2 horas, posteriormente se incubaron con 30 µl de proteína A-sefarosa (Protein A sepharose CL-4B, GE Healthcare) al 50 % en tampón de lisis durante 2-4 horas a 4°C. 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, los complejos se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X (SDS al 4 %, glicerol al 20 %, 100 mM DTT y azul de bromofenol al 0,08 %) para proceder a la electroforesis en geles de poliacrilamida.

Los anticuerpos utilizados fueron:

- Anticuerpo policlonal frente al epítomo HA (*Abcam*), 2 µg.
- Anticuerpo policlonal frente al epítomo Myc (*Santa Cruz Biotechnology*), 2 µg.

6.3 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Las muestras de extracto total o de los precipitados se desnaturalizaron durante 5 minutos a 100°C y se centrifugaron a 12.000 rpm durante otros 5 minutos.

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

6.4 Inmunodetección de proteínas

En primer lugar, las membranas se bloquearon en TBST (20 mM Tris·HCl pH 7,6, 137 mM NaCl 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 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 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal frente a tubulina (*Sigma*) a una dilución de 1:10.000.
- Anticuerpo monoclonal frente a la proteína GFP, JL-8 (*BD Biosciences*), a una dilución 1:2.000.
- Anticuerpo monoclonal frente al epítipo Myc (*Santa Cruz Biotechnology*), a una dilución de 1:1.000.
- Anticuerpo policlonal anti-GST conjugado a HRP (*Amersham*) a una dilución 1:5000.
- 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.

6.5 Valoración de GTP-Cdc42

6.5.1. PRODUCCIÓN DE GST-CRIB

La cantidad de Cdc42 activa se determinó mediante el ensayo de precipitación con GST-CRIB. Este dominio sólo se asocia a Cdc42 cuando está unida a GTP. La proteína recombinante GST-CRIB se obtuvo en una cepa DH5 α de *E. coli* transformada con el plásmido pGEX-CRIB. Este plásmido lleva el fragmento de ADN que codifica el dominio CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding) de la proteína Pak2 de células humanas (Manser *et al.*, 1998). Las bacterias transformadas se incubaron a 28°C en 400 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) hasta que alcanzaron una 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 masiva del gen que codifica la proteína de fusión y se incubaron a 28°C durante 3 horas más. Se recogieron las células por centrifugación a 5000 rpm y se resuspendieron en 20 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino: Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂HPO₄ 2 mM, NaCl 137 mM y KCl 2,7 mM) frío, con inhibidores de proteasas (2 μ g/ml de peptatina, 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 7800 x g durante 1 hora a 4°C.

Posteriormente, se recogió el sobrenadante, se añadieron 600 µl 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 unidas a la proteína de fusión GST-CRIB, se lavaron 3 veces con 40 ml de PBS, recogiéndose por centrifugación a 3000 rpm. Por último, se resuspendieron en solución de lisis B: NP-40 0,5%, NaCl 20 mM, glicerol 10%, MgCl₂ 2mM, DTT 0,1 mM y Tris-HCl 50 mM pH 7,6 con inhibidores de proteasas a la misma concentración que la descrita anteriormente.

La cantidad de proteína se cuantificó por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12,5% teñido con azul de Coomasie, comparándola con diferentes cantidades de seroalbúmina bovina.

6.5.2. ENSAYO DE UNIÓN

Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio que expresaban HA-Cdc42, tal y como se describió en el apartado 6.1 de Materiales y Métodos, pero utilizando tampón de lisis B. Se tomaron 2 mg de proteína de los extractos, se llevaron a 500 µl con tampón de lisis B y se añadieron 10 µg de GST-CRIB asociado a bolas de glutación sefarosa. La mezcla se incubó 2 horas a 4°C y se lavó 4 veces con 1 ml de tampón de lisis B. Finalmente, el precipitado se resuspendió en 30 µl de tampón de carga 2X y se sometió a SDS-PAGE en un gel al 12,5%. Después se transfirió a una membrana, que se incubó con el anticuerpo monoclonal 12CA5, para detectar la fracción de la proteína HA-Cdc42 unida a GTP, que había precipitado al unirse al dominio CRIB de Pak2.

6.6 Valoración de la secreción de fosfatasa ácida

Esta técnica se utilizó para valorar la secreción celular. Debido a que hasta un 40% de la fosfatasa ácida es secretada al medio en *S. pombe*, la actividad enzimática fue valorada en el sobrenadante del cultivo. Las células fueron incubadas en medio rico a 25°C hasta fase logarítmica. Posteriormente, se recogieron, se lavaron 3 veces con medio fresco y se preparó un cultivo de D.O. a 600nm de 0,3 que se incubó a 25°C o a 37°C. Para cada muestra tomada, se centrifugó 1 ml de cultivo, se recogieron 0,5 ml de sobrenadante, se mezclaron con 0,5 ml de la solución del sustrato (paranitrofenilfosfato 2 mM en tampón acetato sódico 0,1 M pH 4.0) precalentada a 30°C y la mezcla se incubó a esta temperatura durante 5 minutos. Tras este tiempo, la reacción se detuvo añadiendo 0,5 ml de hidróxido de sodio 1 M. Se analizó la absorbancia a 405 nm de cada muestra, para cuantificar la cantidad de nitrofenol liberado, utilizando la muestra del tiempo 0 como blanco. Además, a cada tiempo de toma de muestra se analizó la densidad óptica del cultivo a 600 nm, para poder referir la actividad fosfatásica (absorbancia a 405 nm) al número de células (absorbancia a 600 nm). Para realizar este ensayo en medio mínimo, modificamos ligeramente la receta del medio, añadiendo un 75% menos de Na₂HPO₄ (0,55 g/l), ya que al incubar las células en un medio bajo en fosfatos aumenta la expresión del gen que codifica la enzima fosfatasa ácida (Elliott *et al.*, 1986).

6.7 Ensayo de inmunoblot de colonias

El ensayo de inmunoblot de colonias para detectar la proteína Cpy1 secretada se realizó como lo describió (Iwaki *et al.*, 2006) con las modificaciones utilizadas por (Codlin y Mole, 2009). Células creciendo en fase exponencial se concentraron hasta una D.O. de 2 y se depositaron 5µl de células sobre una membrana de nitrocelulosa colocada sobre placas de YES o EMM y se incubaron durante 6 horas a 32°C. Tras lavar la membrana con TBST para eliminar las células, se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-CPY de *S. cerevisiae* 10A5 (1:100) (Molecular Probes, Invitrogen). La densimetría de las colonias se realizó usando el programa Quantity One (Bio-Rad).

7. Técnicas Microscópicas y Tinciones

Para llevar a cabo estas técnicas, se emplearon diversos microscopios: Leica DM RXA y Nikon Eclipse TE-2000U, ambos controlados mediante el software MetaMorph® (MDS Analytical Technologies). Además, se utilizó el equipo Personal Deltavision Microscope (*Applied Precision*), que incluye un microscopio invertido Olympus IX-70 controlado mediante el software softWoRx Resolve3D. Las imágenes obtenidas fueron capturadas con una cámara CoolSNAP HQ2 (PHOTOMETRICS) y se procesaron posteriormente con los programas MetaMorph® (MDS Analytical Technologies), Image-J (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) y Adobe Photoshop CS4 (*Adobe System, Inc*). Los experimentos de FRAP se realizaron utilizando equipos Deltavision y confocal Leika, pertenecientes a la Universidad Rockefeller (Nueva York) y el Institut Curie (París) respectivamente.

7.1 Microscopía de fluorescencia

Para la observación de muestras fluorescentes, se utilizaron los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Siempre se realizaron como referencia imágenes de contraste interferencial (Nomarsky) o de contraste de fases.

7.1.1 FLUORESCENCIA DIRECTA CON GFP

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria*, que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz ultravioleta de longitud de onda de 488 nm. La GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariotas. Por ello, suele usarse como sistema de detección de la expresión y localización subcelular de proteínas *in vivo*. Para ello, es necesario fusionar la secuencia de ADN que codifica esta proteína en fase con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la muestra en el microscopio de fluorescencia. Existen variantes de la proteína verde fluorescente, como la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), más brillante que la original, que emite luz de 507 nm de longitud de onda cuando es

excitada con luz de 488 nm; la proteína azul fluorescente o CFP (Cian Fluorescent Protein), que emite luz de 475 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 433 nm; o la proteína amarilla fluorescente o YFP (Yellow Fluorescent Protein), que emite luz de 527 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 514 nm.

7.1.2 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 (1-3)- β -glucano lineal del septo y de los polos en crecimiento (Cortés *et al.*, 2007) ya que *S. pombe* carece de quitina. El calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul. El calcoflúor (*Blankophor BBH*, Bayer Corporation) se preparó en agua a una concentración de 1 mg/ml. Para conseguir la completa disolución, se añadieron gotas de KOH 10 N. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

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

7.1.3 TINCIÓN DE ACTINA

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

La tinción de actina se realizó a partir del protocolo inicial, descrito por Marks y Hyams, 1985, siguiendo las indicaciones y modificaciones realizadas por F. Chang. Partiendo de un cultivo en fase exponencial, se tomaron 5 ml de células y se fijaron añadiendo 1 ml (1/5 del volumen del cultivo) de formaldehído al 16% (EM-grade MeOH Free, Polysciences) y 500 μ l (1/10 del volumen del cultivo) de tampón PEM (PIPES 100 mM, EGTA 1 mM, Mg2SO4 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 fluorescente. 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 agitador orbital a temperatura ambiente. Las muestras así teñidas pueden guardarse durante 1 ó 2 días a 4°C.

7.1.4 TINCIÓN DE CDCFDA

La tinción se realizó como describieron por Roberts *et al.*, 1991. Las células en crecimiento exponencial se recogieron, se lavaron con medio suplementado con ácido cítrico 10mM y se incubaron a 30°C durante 30 minutos en medio con ácido cítrico 10mM y CDCFDA 2,5 μ m. Posteriormente las células se lavaron con medio con ácido cítrico 10mM y se realizaron micrografías de fluorescencia con una longitud de onda de excitación de 488nm.

7.1.5 TINCIÓN DE FM4-64

Las células en crecimiento exponencial se recogieron y se lavaron con medio. Posteriormente, se enfriaron en hielo y se incubaron durante 10 minutos con FM4-64 80 μ M en frío y oscuridad. A continuación se lavaron las células con medio frío tres veces y se realizaron micrografías que se consideraron el tiempo 0 minutos. Las células se incubaron a 32°C en oscuridad para realizar las micrografías a los tiempos restantes. Las micrografías de fluorescencia se realizaron utilizando una longitud de onda de excitación de 553nm.

7.2 Microscopía electrónica

La preparación de muestras para su observación al microscopio electrónico de transmisión se llevó a cabo tal y como se describe a continuación: Se tomaron células que alcanzaban una densidad óptica de 0,5. A continuación se realizaron tres lavados con agua y estas células se fijaron con permanganato potásico al 2 % durante una hora a temperatura ambiente. El exceso de permanganato fue retirado tras sucesivos lavados con agua. Posteriormente, las células se deshidrataron empleando concentraciones crecientes de etanol (50 %, 70 %, 80%, 90% y 95%), 95% etanol:95% acetona y posteriormente acetona (95% y 100%). Las muestras se incluyeron en resina mediante el kit Super Resin Embedding de TAAB, a través de varios pasos con concentraciones de resina crecientes hasta incluir las muestras en resina pura. A continuación se encapsularon las diferentes muestras y se incubaron en una estufa a 70°C durante 16 horas para que la resina polimerizara. Se cortaron secciones ultrafinas de las muestras empleando un ultramicrotomo LKB Ultratome III. Posteriormente se fijaron con acetato de uranilo al 2 % y citrato de plomo para darles contraste y se observaron bajo el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900.

8. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular

Se utilizó el método descrito por Arellano *et al.*, 1996. Las células se incubaron en medio rico, antes de añadir el precursor radiactivo. Cuando los cultivos alcanzaron una densidad óptica entre 0,5-0,8 se llevó a cabo el marcaje de las mismos. Se realizó en cultivos de 10 ml durante un periodo de 6 horas a 28°C y con 0,5 μ Ci/ml de 14 C-glucosa. Se tomaron dos muestras de 50 μ l al comenzar y dos al terminar la incubación para calcular la incorporación total de glucosa radiactiva en las células. El resto de cultivo se recogió, se lavó tres veces con 1 mM EDTA y se sometió a rotura mecánica mediante agitación con bolas de vidrio en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant). La rotura se comprobó por observación al microscopio de contraste de fases. El extracto obtenido se diluyó hasta 1 ml con 1 mM EDTA, se decantaron las bolas de vidrio y se centrifugó a 1000 x g para recoger las paredes. Estas se lavaron tres veces con 2 M NaCl y otras dos veces con 1 mM EDTA y se tomaron dos alícuotas de 20 μ l para determinar la incorporación total de 14 C-glucosa en las paredes. Después, las paredes se hirvieron 5 minutos para inactivar las posibles glucanasas incluidas en la pared y se resuspendieron en 500 μ l de 1 mM EDTA. Se hicieron alícuotas de 100

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

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

9. Análisis bioinformático de los datos

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

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

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

Bibliografía

- Aalto, M.K., Ronne, H. y Keranen, S.** (1993). Yeast syntaxins Sso1p and Sso2p belong to a family of related membrane proteins that function in vesicular transport. *EMBO J* 12, 4095-4104.
- Abdul-Manan, N., Aghazadeh, B., Liu, G.A., Majumdar, A., Ouerfelli, O., Siminovitch, K.A. y Rosen, M.K.** (1999). Structure of Cdc42 in complex with the GTPase-binding domain of the *Wiskott-Aldrich syndrome* protein. *Nature* 399, 379-383.
- Abe, M., Qadota, H., Hirata, A. y Ohya, Y.** (2003). Lack of GTP-bound Rho1p in secretory vesicles of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 162, 85-97.
- Abenza, J.F., Pantazopoulou, A., Rodriguez, J.M., Galindo, A. y Penalva, M.A.** (2009). Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* 10, 57-75.
- Adamo, J.E., Moskow, J.J., Gladfelter, A.S., Viterbo, D., Lew, D.J. y Brennwald, P.J.** (2001). Yeast Cdc42 functions at a late step in exocytosis, specifically during polarized growth of the emerging bud. *J Cell Biol* 155, 581-592.
- Adamo, J.E., Rossi, G. y 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, 4121-4133.
- Adams, A.E., Johnson, D.I., Longnecker, R.M., Sloat, B.F. y Pringle, J.R.** (1990). CDC42 and CDC43, two additional genes involved in budding and the establishment of cell polarity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 111, 131-142.
- Aghamohammadzadeh, S. y Ayscough, K.R.** (2009). Differential requirements for actin during yeast and mammalian endocytosis. *Nat Cell Biol* 11, 1039-1042.
- Alonso-Nuñez, M.L., An, H., Martín-Cuadrado, A.B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., del Rey, F., Gould, K.L. y de Aldana, C.R.** (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 16, 2003-2017.
- Álvarez-Tabares, I., Grallert, A., Ortiz, J.M. y Hagan, I.M.** (2007). *Schizosaccharomyces pombe* protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *J Cell Sci* 120, 3589-3601.
- Álvarez, B. y Moreno, S.** (2006). Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *J Cell Sci* 119, 4475-4485.
- Allshire, R.C.** (1995). Elements of chromosome structure and function in fission yeast. *Semin Cell Biol* 6, 55-64.
- Aono, T., Yanai, H., Miki, F., Davey, J. y Shimoda, C.** (1994). Mating pheromone-induced expression of the mat1-Pm gene of *Schizosaccharomyces pombe*: identification of signalling components and characterization of upstream controlling elements. *Yeast* 10, 757-770.
- Arasada, R. y Pollard, T.D.** (2011). Distinct roles for F-BAR proteins Cdc15p and Bzz1p in actin polymerization at sites of endocytosis in fission yeast. *Curr Biol* 21, 1450-1459.
- Arellano, M., Durán, A. y Pérez, P.** (1996). Rho 1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan

-
- synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J* 15, 4584-4591.
- Arellano, M., Durán, A. y 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), 2547-2555.
- Arellano, M., Niccoli, T. y Nurse, P.** (2002). Tea3p is a cell end marker activating polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol* 12, 751-756.
- Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Durán, A. y Pérez, P.** (1999). *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), 3569-3578.
- Armstrong, J., Craighead, M.W., Watson, R., Ponnambalam, S. y Bowden, S.** (1993). *Schizosaccharomyces pombe* ypt5: a homologue of the rab5 endosome fusion regulator. *Mol Biol Cell* 4, 583-592.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. y Struhl, K.** (1995). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley and Sons, New York.
- Baek, K., Knodler, A., Lee, S.H., Zhang, X., Orlando, K., Zhang, J., Foskett, T.J., Guo, W. y Dominguez, R.** (2010). Structure-function study of the N-terminal domain of exocyst subunit Sec3. *J Biol Chem* 285, 10424-10433.
- Bahler, J. y Pringle, J.R.** (1998). Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* 12, 1356-1370.
- Bahler, J., Wu, J.Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P. y Pringle, J.R.** (1998). Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943-951.
- Balasubramanian, M.K., Bi, E. y Glotzer, M.** (2004). Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* 14, R806-818.
- Balasubramanian, M.K., McCollum, D., Chang, L., Wong, K.C., Naqvi, N.I., He, X., Sazer, S. y Gould, K.L.** (1998). Isolation and characterization of new fission yeast cytokinesis mutants. *Genetics* 149, 1265-1275.
- Balderhaar, H.J., Arlt, H., Ostrowicz, C., Brocker, C., Sundermann, F., Brandt, R., Babst, M. y Ungermann, C.** (2010). The Rab GTPase Ypt7 is linked to retromer-mediated receptor recycling and fusion at the yeast late endosome. *J Cell Sci* 123, 4085-4094.
- Barale, S., McCusker, D. y Arkowitz, R.A.** (2006). Cdc42p GDP/GTP cycling is necessary for efficient cell fusion during yeast mating. *Mol Biol Cell* 17, 2824-2838.
- Basi, G., Schmid, E. y Maundrell, K.** (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* 123, 131-136.

- Bendezu, F.O. y Martin, S.G.** (2011). Actin cables and the exocyst form two independent morphogenesis pathways in the fission yeast. *Mol Biol Cell* 22, 44-53.
- Bendezu, F.O., Vincenzetti, V. y Martin, S.G.** (2012). Fission yeast sec3 and exo70 are transported on actin cables and localize the exocyst complex to cell poles. *PLoS One* 7, e40248.
- Berro, J., Sirotkin, V. y Pollard, T.D.** (2010). Mathematical modeling of endocytic actin patch kinetics in fission yeast: disassembly requires release of actin filament fragments. *Mol Biol Cell* 21, 2905-2915.
- Betz, W.J., Mao, F. y Bewick, G.S.** (1992). Activity-dependent fluorescent staining and destaining of living vertebrate motor nerve terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 12, 363-375.
- Betz, W.J., Mao, F. y Smith, C.B.** (1996). Imaging exocytosis and endocytosis. *Current opinion in Neurobiology* 6, 365-371.
- Bieling, P., Laan, L., Schek, H., Munteanu, E.L., Sandblad, L., Dogterom, M., Brunner, D. y Surrey, T.** (2007). Reconstitution of a microtubule plus-end tracking system in vitro. *Nature* 450, 1100-1105.
- Bishop, A.L. y Hall, A.** (2000). Rho GTPases and their effector proteins. *The Biochemical journal* 348 Pt 2, 241-255.
- Bone, N., Millar, J.B., Toda, T. y Armstrong, J.** (1998). Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol* 8, 135-144.
- Bos, J.L., Rehmann, H. y Wittinghofer, A.** (2007). GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-877.
- Boyd, C., Hughes, T., Pypaert, M. y Novick, P.** (2004). Vesicles carry most exocyst subunits to exocytic sites marked by the remaining two subunits, Sec3p and Exo70p. *J Cell Biol* 167, 889-901.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bresch, C., Muller, G. y Egel, R.** (1968). Genes involved in meiosis and sporulation of a yeast. *Mol Gen Genet* 102, 301-306.
- Brett, C.L. y Merz, A.J.** (2008). Osmotic regulation of Rab-mediated organelle docking. *Curr Biol* 18, 1072-1077.
- Brizzio, V., Gammie, A.E. y Rose, M.D.** (1998). Rvs161p interacts with Fus2p to promote cell fusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 141, 567-584.
- Brown, J.L., Jaquenoud, M., Gulli, M.P., Chant, J. y Peter, M.** (1997). Novel Cdc42-binding proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev* 11, 2972-2982.

-
- Brugnera, E., Haney, L., Grimsley, C., Lu, M., Walk, S.F., Tosello-Tramont, A.C., Macara, I.G., Madhani, H., Fink, G.R. y Ravichandran, K.S.** (2002). Unconventional Rac-GEF activity is mediated through the Dock180-ELMO complex. *Nat Cell Biol* 4, 574-582.
- Brunner, D. y Nurse, P.** (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102, 695-704.
- Busch, K.E., Hayles, J., Nurse, P. y Brunner, D.** (2004). Tea2p kinesin is involved in spatial microtubule organization by transporting tip1p on microtubules. *Dev Cell* 6, 831-843.
- Bush, D.A., Horisberger, M., Horman, I. y Wursch, P.** (1974). The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol* 81, 199-206.
- Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A. y Silverman, S.J.** (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol Sci* 5, 370-375.
- Cabrera, R., Suo, J., Young, E. y Chang, E.C.** (2011). *Schizosaccharomyces pombe* Arc3 is a conserved subunit of the Arp2/3 complex required for polarity, actin organization, and endocytosis. *Yeast* 28, 495-503.
- Calonge, T.M., Arellano, M., Coll, P.M. y Pérez, P.** (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 47, 507-518.
- Calonge, T.M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I. y Pérez, P.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol Biol Cell* 11, 4393-4401.
- Calleja, G.B. y Johnson, B.F.** (1971). Flocculation in a fission yeast: an initial step in the conjugation process. *Can J Microbiol* 17, 1175-1177.
- Calleja, G.B., Johnson, B.F. y Yoo, B.Y.** (1981). The cell wall as sex organelle in fission yeast, in: Day, D.H., Horgen, P.A. (Eds.), *Sexual Interactions in Eukaryotic Microbes*. Academic Press, New York, pp. 225-259.
- Calleja, G.B., Yoo, B.Y. y Johnson, B.F.** (1977). Fusion and erosion of cell walls during conjugation in the fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*). *J Cell Sci* 25, 139-155.
- Cartagena-Lirola, H., Durán, A. y Valdivieso, M.H.** (2006). The *Schizosaccharomyces pombe* *cfr1⁺* gene participates in mating through a new pathway that is independent of *fus1⁺*. *Yeast* 23, 375-388.
- Casey, P.J.** (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 219-225.
- Catlett, N.L. y Weisman, L.S.** (2000). Divide and multiply: organelle partitioning in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 12, 509-516.
- Caviston, J.P., Longtine, M., Pringle, J.R. y Bi, E.** (2003). The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 4051-4066.

- Cid, V.J., Adamikova, L., Sánchez, M., Molina, M. y Nombela, C.** (2001). Cell cycle control of septin ring dynamics in the budding yeast. *Microbiology* 147, 1437-1450.
- Clemente-Ramos, J.A., Martín-García, R., Sharifmoghadam, M.R., Konomi, M., Osumi, M. y Valdivieso, M.H.** (2009). The tetraspan protein Dni1p is required for correct membrane organization and cell wall remodelling during mating in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 73, 695-709.
- Codlin, S. y Mole, S.E.** (2009). *S. pombe btn1⁺*, the orthologue of the Batten disease gene CLN3, is required for vacuole protein sorting of Cpy1p and Golgi exit of Vps10p. *J Cell Sci* 122, 1163-1173.
- Coll, P.M., Rincón, S.A., Izquierdo, R.A. y Pérez, P.** (2007). Hob3p, the fission yeast ortholog of human BIN3, localizes Cdc42p to the division site and regulates cytokinesis. *EMBO J* 26, 1865-1877.
- Coll, P.M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. y Pérez, P.** (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 14, 313-323.
- Conibear, E. y Stevens, T.H.** (2002). Studying yeast vacuoles. *Methods Enzymol* 351, 408-432.
- Cortés, J.C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A. y Ribas, J.C.** (2005). The novel fission yeast (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci* 118, 157-174.
- Cortés, J.C., Ishiguro, J., Durán, A. y Ribas, J.C.** (2002). Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* 115, 4081-4096.
- Cortés, J.C., Konomi, M., Martins, I.M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Osumi, M., Durán, A. y Ribas, J.C.** (2007). The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol* 65, 201-217.
- Cortés, J.C., Sato, M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Clemente-Ramos, J.A., Ramos, M., Okada, H., Osumi, M., Durán, A. y Ribas, J.C.** (2012). Fission yeast Ags1 confers the essential septum strength needed for safe gradual cell abscission. *J Cell Biol* 198, 637-656.
- Craighead, M.W., Bowden, S., Watson, R. y Armstrong, J.** (1993). Function of the ypt2 gene in the exocytic pathway of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 4, 1069-1076.
- Craven, R.A., Griffiths, D.J., Sheldrick, K.S., Randall, R.E., Hagan, I.M. y Carr, A.M.** (1998). Vectors for the expression of tagged proteins in *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 221, 59-68.
- Cvrckova, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J.R. y Nasmyth, K.** (1995). Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast.

Genes Dev 9, 1817-1830.

- Chang, E., Bartholomeusz, G., Pimental, R., Chen, J., Lai, H., Wang, L., Yang, P. y Marcus, S.** (1999). Direct binding and *in vivo* regulation of the fission yeast p21-activated kinase Shk1 by the SH3 domain protein Scd2. *Mol Cell Biol* 19, 8066-8074.
- Chang, E.C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H.P. y Wigler, M.H.** (1994). Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* 79, 131-141.
- Chang, F., Drubin, D. y 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, 169-182.
- Chang, F. y Martin, S.G.** (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 1, a001347.
- Chang, F. y Peter, M.** (2003). Yeasts make their mark. *Nat Cell Biol* 5, 294-299.
- Chant, J.** (1996). Generation of cell polarity in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 8, 557-565.
- Chant, J.** (1999). Cell polarity in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15, 365-391.
- Chen, G.C., Kim, Y.J. y Chan, C.S.** (1997). The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11, 2958-2971.
- Cheng, H., Sugiura, R., Wu, W., Fujita, M., Lu, Y., Sio, S.O., Kawai, R., Takegawa, K., Shuntoh, H. y Kuno, T.** (2002). Role of the Rab GTP-binding protein Ypt3 in the fission yeast exocytic pathway and its connection to calcineurin function. *Mol Biol Cell* 13, 2963-2976.
- Chuang, J.S. y Schekman, R.W.** (1996). Differential trafficking and timed localization of two chitin synthase proteins, Chs2p and Chs3p. *J Cell Biol* 135, 597-610.
- Das, A., Slaughter, B.D., Unruh, J.R., Bradford, W.D., Alexander, R., Rubinstein, B. y Li, R.** (2012a). Flippase-mediated phospholipid asymmetry promotes fast Cdc42 recycling in dynamic maintenance of cell polarity. *Nat Cell Biol* 14, 304-310.
- Das, M., Drake, T., Wiley, D.J., Buchwald, P., Vavylonis, D. y Verde, F.** (2012b). Oscillatory dynamics of Cdc42 GTPase in the control of polarized growth. *Science* 337, 239-243.
- Das, M., Wiley, D.J., Chen, X., Shah, K. y Verde, F.** (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol* 19, 1314-1319.
- Das, M., Wiley, D.J., Medina, S., Vincent, H.A., Larrea, M., Oriolo, A. y Verde, F.** (2007). Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Mol Biol Cell* 18, 2090-2101.
- Davey, J.** (1991). Isolation and quantitation of M-factor, a diffusible mating factor from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 7, 357-366.
- Davey, J.** (1992). Mating pheromones of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*:

- purification and structural characterization of M-factor and isolation and analysis of two genes encoding the pheromone. *EMBO J* 11, 951-960.
- Davey, J. y Nielsen, O.** (1994). Mutations in *cyr1⁺* and *pat1⁺* reveal pheromone-induced G1 arrest in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Genet* 26, 105-112.
- de Medina-Redondo, M., Arnaiz-Pita, Y., Clavud, C., Fontaine, T., del Rey, F., Latge, J.P. y Vazquez de Aldana, C.R.** (2010). $\beta(1,3)$ -glucanosyl-transferase activity is essential for cell wall integrity and viability of *Schizosaccharomyces pombe*. *PLoS One* 5, e14046.
- de Medina-Redondo, M., Arnaiz-Pita, Y., Fontaine, T., Del Rey, F., Latge, J.P. y Vázquez de Aldana, C.R.** (2008). The beta-1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 68, 1283-1299.
- Degols, G., Shiozaki, K. y Russell, P.** (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 16, 2870-2877.
- Dekker, N., Speijer, D., Grun, C.H., van den Berg, M., de Haan, A. y Hochstenbach, F.** (2004). Role of the alpha-glucanase Agn1p in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 15, 3903-3914.
- Dekker, N., van Rijssel, J., Distel, B. y Hochstenbach, F.** (2007). Role of the alpha-glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast* 24, 279-288.
- Dong, G., Hutagalung, A.H., Fu, C., Novick, P. y Reinisch, K.M.** (2005). The structures of exocyst subunit Exo70p and the Exo84p C-terminal domains reveal a common motif. *Nat Struct Mol Biol* 12, 1094-1100.
- Dong, Y., Pruyne, D. y Bretscher, A.** (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol* 161, 1081-1092.
- Doyle, A., Martín-García, R., Coulton, A.T., Bagley, S. y Mulvihill, D.P.** (2009). Fission yeast Myo51 is a meiotic spindle pole body component with discrete roles during cell fusion and spore formation. *J Cell Sci* 122, 4330-4340.
- Durán, A. y Pérez, P.** (2004). Cell Wall Synthesis, en: Egel, R. (Ed.), *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer, New York, pp. 269-279.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P.L., Yeh, S.H., Yang, Y., Kilburn, A.E., Lee, W.H. y Elledge, S.J.** (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7, 555-569.
- Edamatsu, M. y Toyoshima, Y.Y.** (2003). Fission yeast synaptobrevin is involved in cytokinesis and cell elongation. *Biochem Biophys Res Commun* 301, 641-645.
- Egel, R.** (1971). Physiological aspects of conjugation in fission yeast. *Planta* 98, 89-96.
- Egel, R.** (1973). Commitment to meiosis in fission yeast. *Molecular and General Genetics MGG* 121, 277-284.

-
- Eitzen, G.** (2003). Actin remodeling to facilitate membrane fusion. *Biochim Biophys Acta* 1641, 175-181.
- Eitzen, G., Thorngren, N. y Wickner, W.** (2001). Rho1p and Cdc42p act after Ypt7p to regulate vacuole docking. *EMBO J* 20, 5650-5656.
- Eitzen, G., Wang, L., Thorngren, N. y Wickner, W.** (2002). Remodeling of organelle-bound actin is required for yeast vacuole fusion. *J Cell Biol* 158, 669-679.
- Elliott, S., Chang, C.W., Schweingruber, M.E., Schaller, J., Rickli, E.E. y Carbon, J.** (1986). Isolation and characterization of the structural gene for secreted acid phosphatase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 261, 2936-2941.
- Encinar del Dedo, J., Dueñas, E., Arnaiz, Y., del Rey, F. y Vázquez de Aldana, C.R.** (2009). β -glucanase Eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 8, 1278-1286.
- Erickson, J.W., Zhang, C., Kahn, R.A., Evans, T. y Cerione, R.A.** (1996). Mammalian Cdc42 is a brefeldin A-sensitive component of the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 271, 26850-26854.
- Erickson, M.R., Galletta, B.J. y Abmayr, S.M.** (1997). *Drosophila* myoblast city encodes a conserved protein that is essential for myoblast fusion, dorsal closure, and cytoskeletal organization. *J Cell Biol* 138, 589-603.
- Etienne-Manneville, S. y Hall, A.** (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* 420, 629-635.
- Fairn, G.D., Hermansson, M., Somerharju, P. y Grinstein, S.** (2011). Phosphatidylserine is polarized and required for proper Cdc42 localization and for development of cell polarity. *Nat Cell Biol* 13, 1424-1430.
- Feierbach, B. y Chang, F.** (2001). Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* 11, 1656-1665.
- Feierbach, B., Verde, F. y Chang, F.** (2004). Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol* 165, 697-707.
- Feltham, J.L., Dotsch, V., Raza, S., Manor, D., Cerione, R.A., Sutcliffe, M.J., Wagner, G. y Oswald, R.E.** (1997). Definition of the switch surface in the solution structure of Cdc42Hs. *Biochemistry* 36, 8755-8766.
- Fielding, A.B., Schonteich, E., Matheson, J., Wilson, G., Yu, X., Hickson, G.R., Srivastava, S., Baldwin, S.A., Prekeris, R. y Gould, G.W.** (2005). Rab11-FIP3 and FIP4 interact with Arf6 and the exocyst to control membrane traffic in cytokinesis. *EMBO J* 24, 3389-3399.
- Finegold, A.A., Johnson, D.I., Farnsworth, C.C., Gelb, M.H., Judd, S.R., Glomset, J.A. y Tamanoi, F.** (1991). Protein geranylgeranyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae* is specific for Cys-Xaa-Xaa-Leu motif proteins and requires the CDC43 gene product but not the DPR1 gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 4448-4452.
- Finger, F.P. y Novick, P.** (1997). Sec3p is involved in secretion and morphogenesis in *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 8, 647-662.
- Forsburg, S.L.** (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic acids research* 21, 2955-2956.
- Fratti, R.A., Jun, Y., Merz, A.J., Margolis, N. y Wickner, W.** (2004). Interdependent assembly of specific regulatory lipids and membrane fusion proteins into the vertex ring domain of docked vacuoles. *J Cell Biol* 167, 1087-1098.
- Fukui, Y., Kaziro, Y. y Yamamoto, M.** (1986). Mating pheromone-like diffusible factor released by *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J* 5, 1991-1993.
- Fukui, Y. y Yamamoto, M.** (1988). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to ras1. *Mol Gen Genet* 215, 26-31.
- Gachet, Y. y Hyams, J.S.** (2005). Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci* 118, 4231-4242.
- Gandhi, M., Smith, B.A., Bovellan, M., Paavilainen, V., Daugherty-Clarke, K., Gelles, J., Lappalainen, P. y Goode, B.L.** (2010). GMF is a cofilin homolog that binds Arp2/3 complex to stimulate filament debranching and inhibit actin nucleation. *Curr Biol* 20, 861-867.
- Gao, L. y Bretscher, A.** (2008). Analysis of unregulated formin activity reveals how yeast can balance F-actin assembly between different microfilament-based organizations. *Mol Biol Cell* 19, 1474-1484.
- Gao, X.D., Albert, S., Tcheperegine, S.E., Burd, C.G., Gallwitz, D. y Bi, E.** (2003). The GAP activity of Msb3p and Msb4p for the Rab GTPase Sec4p is required for efficient exocytosis and actin organization. *J Cell Biol* 162, 635-646.
- García, I., Jiménez, D., Martín, V., Durán, A. y Sánchez, Y.** (2005). The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* 97, 569-576.
- García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T. y Sánchez, Y.** (2006a). Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol* 59, 836-853.
- García, P., García, I., Marcos, F., de Garibay, G.R. y Sánchez, Y.** (2009). Fission yeast rgf2p is a rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of rgf1p. *Genetics* 181, 1321-1334.
- García, P., Tajadura, V., García, I. y Sánchez, Y.** (2006b). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17, 1620-1631.
- Gemmill, T.R. y Trimble, R.B.** (2004). Protein glycosylation, in: Egel, R. (Ed.), *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Springer, New York, pp. 405-515.
- Geng, J. y Klionsky, D.J.** (2010). The Golgi as a potential membrane source for autophagy. *Autophagy* 6, 950-951.

-
- Geng, J., Nair, U., Yasumura-Yorimitsu, K. y Klionsky, D.J.** (2010). Post-Golgi Sec proteins are required for autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 21, 2257-2269.
- Gladfelter, A.S., Moskow, J.J., Zyla, T.R. y Lew, D.J.** (2001). Isolation and characterization of effector-loop mutants of CDC42 in yeast. *Mol Biol Cell* 12, 1239-1255.
- Glynn, J.M., Lustig, R.J., Berlin, A. y Chang, F.** (2001). Role of bud6p and tea1p in the interaction between actin and microtubules for the establishment of cell polarity in fission yeast. *Curr Biol* 11, 836-845.
- Goldenberg, N.M. y Steinberg, B.E.** (2010). Surface Charge: A Key Determinant of Protein Localization and Function. *Cancer Research* 70, 1277-1280.
- Golub, E.I.** (1988). 'One minute' transformation of competent E. coli by plasmid DNA. *Nucleic acids research* 16, 1641.
- Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y. y Yamamoto, M.** (1993). *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 13, 6427-6434.
- Goud, B., Salminen, A., Walworth, N.C. y Novick, P.J.** (1988). A GTP-binding protein required for secretion rapidly associates with secretory vesicles and the plasma membrane in yeast. *Cell* 53, 753-768.
- Grissom, P.M., Fiedler, T., Grishchuk, E.L., Nicastro, D., West, R.R. y McIntosh, J.R.** (2009). Kinesin-8 from fission yeast: a heterodimeric, plus-end-directed motor that can couple microtubule depolymerization to cargo movement. *Mol Biol Cell* 20, 963-972.
- Grosshans, B.L., Andreeva, A., Gangar, A., Niessen, S., Yates, J.R., 3rd, Brennwald, P. y Novick, P.** (2006). The yeast Igl family member Sro7p is an effector of the secretory Rab GTPase Sec4p. *J Cell Biol* 172, 55-66.
- Grosshans, B.L. y Novick, P.** (2008). Identification and verification of Sro7p as an effector of the Sec4p Rab GTPase. *Methods Enzymol* 438, 95-108.
- Grote, E., Carr, C.M. y Novick, P.J.** (2000). Ordering the final events in yeast exocytosis. *J Cell Biol* 151, 439-452.
- Grun, C.H., Hochstenbach, F., Humbel, B.M., Verkleij, A.J., Sietsma, J.H., Klis, F.M., Kamerling, J.P. y Vliegthart, J.F.** (2005). The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology* 15, 245-257.
- Guo, W., Roth, D., Walch-Solimena, C. y Novick, P.** (1999). The exocyst is an effector for Sec4p, targeting secretory vesicles to sites of exocytosis. *EMBO J* 18, 1071-1080.
- Guo, W., Sutcliffe, M.J., Cerione, R.A. y Oswald, R.E.** (1998). Identification of the Binding Surface on Cdc42Hs for p21-Activated Kinase[†]. *Biochemistry* 37, 14030-14037.
- Guo, W., Tamanoi, F. y Novick, P.** (2001). Spatial regulation of the exocyst complex by Rho1 GTPase. *Nat Cell Biol* 3, 353-360.

- Gurunathan, S., Chapman-Shimshoni, D., Trajkovic, S. y Gerst, J.E.** (2000). Yeast exocytic v-SNAREs confer endocytosis. *Mol Biol Cell* 11, 3629-3643.
- Haas, A., Conradt, B. y Wickner, W.** (1994). G-protein ligands inhibit in vitro reactions of vacuole inheritance. *J Cell Biol* 126, 87-97.
- Haas, A., Scheglmann, D., Lazar, T., Gallwitz, D. y Wickner, W.** (1995). The GTPase Ypt7p of *Saccharomyces cerevisiae* is required on both partner vacuoles for the homotypic fusion step of vacuole inheritance. *EMBO J* 14, 5258-5270.
- Hachet, O., Berthelot-Grosjean, M., Kokkoris, K., Vincenzetti, V., Moosbrugger, J. y Martin, S.G.** (2011). A phosphorylation cycle shapes gradients of the DYRK family kinase Pom1 at the plasma membrane. *Cell* 145, 1116-1128.
- Hagan, I.M.** (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci* 111 (Pt 12), 1603-1612.
- Hakeda-Suzuki, S., Ng, J., Tzu, J., Dietzl, G., Sun, Y., Harms, M., Nardine, T., Luo, L. y Dickson, B.J.** (2002). Rac function and regulation during *Drosophila* development. *Nature* 416, 438-442.
- Harris, K.P. y Tepass, U.** (2008). Cdc42 and Par proteins stabilize dynamic adherens junctions in the *Drosophila* neuroectoderm through regulation of apical endocytosis. *J Cell Biol* 183, 1129-1143.
- Hattendorf, D.A., Andreeva, A., Gangar, A., Brennwald, P.J. y Weis, W.I.** (2007). Structure of the yeast polarity protein Sro7 reveals a SNARE regulatory mechanism. *Nature* 446, 567-571.
- Haubruck, H., Engelke, U., Mertins, P. y Gallwitz, D.** (1990). Structural and functional analysis of ypt2, an essential ras-related gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encoding a Sec4 protein homologue. *EMBO J* 9, 1957-1962.
- He, B., Xi, F., Zhang, J., TerBush, D., Zhang, X. y Guo, W.** (2007). Exo70p mediates the secretion of specific exocytic vesicles at early stages of the cell cycle for polarized cell growth. *J Cell Biol* 176, 771-777.
- He, Y., Sugiura, R., Ma, Y., Kita, A., Deng, L., Takegawa, K., Matsuoka, K., Shuntoh, H. y Kuno, T.** (2006). Genetic and functional interaction between Ryh1 and Ypt3: two Rab GTPases that function in *S. pombe* secretory pathway. *Genes Cells* 11, 207-221.
- Heinrich, M., Kohler, T. y Mosch, H.U.** (2007). Role of Cdc42-Cla4 interaction in the pheromone response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 6, 317-327.
- Hirata, A. y Kanata, K.** (1982). Nuclear behavior during conjugation and meiosis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 28, 263-274.
- Hirata, D., Nakano, K., Fukui, M., Takenaka, H., Miyakawa, T. y Mabuchi, I.** (1998). Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role of a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *J Cell Sci* 111 (Pt 2), 149-159.
- Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. y Yamamoto, M.** (2003). Gef1p and Scd1p, the two GDP-

-
- GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 14, 3617-3627.
- Hoffman, C.S. y Winston, F.** (1991). Glucose repression of transcription of the *Schizosaccharomyces pombe* *fbp1⁺* gene occurs by a cAMP signaling pathway. *Genes Dev* 5, 561-571.
- Hoog, J.L., Schwartz, C., Noon, A.T., O'Toole, E.T., Mastronarde, D.N., McIntosh, J.R. y Antony, C.** (2007). Organization of interphase microtubules in fission yeast analyzed by electron tomography. *Dev Cell* 12, 349-361.
- Horisberger, M. y Rouvet-Vauthey, M.** (1985). Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cellular and Molecular Life Sciences* 41, 748-750.
- Horisberger, M. y Vonlanthen, M.** (1977). Location of mannan and chitin on thin sections of budding yeasts with gold markers. *Arch Microbiol* 115, 1-7.
- Horisberger, M., Vonlanthen, M. y Rosset, J.** (1978). Localization of alpha-galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* 119, 107-111.
- Hsu, S.C., Hazuka, C.D., Roth, R., Foletti, D.L., Heuser, J. y Scheller, R.H.** (1998). Subunit composition, protein interactions, and structures of the mammalian brain sec6/8 complex and septin filaments. *Neuron* 20, 1111-1122.
- Hughes, D.A., Yabana, N. y Yamamoto, M.** (1994). Transcriptional regulation of a Ras nucleotide-exchange factor gene by extracellular signals in fission yeast. *J Cell Sci* 107 (Pt 12), 3635-3642.
- Hughes, S.M.** (1983). Are guanine nucleotide binding proteins a distinct class of regulatory proteins? *FEBS Lett* 164, 1-8.
- Huisman, S.M. y Brunner, D.** (2011). Cell polarity in fission yeast: a matter of confining, positioning, and switching growth zones. *Seminars in cell & developmental biology* 22, 799-805.
- Humbel, B.M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S.A. y Osumi, M.** (2001). In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 433-444.
- Humphries, C.L., Balcer, H.I., D'Agostino, J.L., Winsor, B., Drubin, D.G., Barnes, G., Andrews, B.J. y Goode, B.L.** (2002). Direct regulation of Arp2/3 complex activity and function by the actin binding protein coronin. *J Cell Biol* 159, 993-1004.
- Hutagalung, A.H., Coleman, J., Pypaert, M. y Novick, P.J.** (2009). An internal domain of Exo70p is required for actin-independent localization and mediates assembly of specific exocyst components. *Mol Biol Cell* 20, 153-163.
- Imai, Y. y Yamamoto, M.** (1994). The fission yeast mating pheromone P-factor: its molecular structure, gene structure, and ability to induce gene expression and G1 arrest in the mating partner. *Genes Dev* 8, 328-338.
- Irazoqui, J.E., Gladfelter, A.S. y Lew, D.J.** (2003). Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat Cell Biol* 5, 1062-1070.

- Irazoqui, J.E., Howell, A.S., Theesfeld, C.L. y Lew, D.J.** (2005). Opposing roles for actin in Cdc42p polarization. *Mol Biol Cell* 16, 1296-1304.
- Isgandarova, S., Jones, L., Forsberg, D., Loncar, A., Dawson, J., Tedrick, K. y Eitzen, G.** (2007). Stimulation of actin polymerization by vacuoles via Cdc42p-dependent signaling. *J Biol Chem* 282, 30466-30475.
- Ishiguro, J.** (1998). Genetic control of fission yeast cell wall synthesis: the genes involved in wall biogenesis and their interactions in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Genet Syst* 73, 181-191.
- Isshiki, T., Mochizuki, N., Maeda, T. y Yamamoto, M.** (1992). Characterization of a fission yeast gene, *gpa2⁺*, that encodes a G alpha subunit involved in the monitoring of nutrition. *Genes Dev* 6, 2455-2462.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A.** (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-168.
- Iwaki, T., Hosomi, A., Tokudomi, S., Kusunoki, Y., Fujita, Y., Giga-Hama, Y., Tanaka, N. y Takegawa, K.** (2006). Vacuolar protein sorting receptor in *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* 152, 1523-1532.
- Iwaki, T., Tanaka, N., Takagi, H., Giga-Hama, Y. y Takegawa, K.** (2004). Characterization of *end4⁺*, a gene required for endocytosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 21, 867-881.
- Iwase, M., Luo, J., Nagaraj, S., Longtine, M., Kim, H.B., Haarer, B.K., Caruso, C., Tong, Z., Pringle, J.R. y Bi, E.** (2006). Role of a Cdc42p effector pathway in recruitment of the yeast septins to the presumptive bud site. *Mol Biol Cell* 17, 1110-1125.
- Jaffe, A.B. y Hall, A.** (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.
- Janson, M.E., Loughlin, R., Liodice, I., Fu, C., Brunner, D., Nedelec, F.J. y Tran, P.T.** (2007). Crosslinkers and motors organize dynamic microtubules to form stable bipolar arrays in fission yeast. *Cell* 128, 357-368.
- Johnson, D.I.** (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol Mol Biol Rev* 63, 54-105.
- Johnson, D.I. y Pringle, J.R.** (1990). Molecular characterization of CDC42, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in the development of cell polarity. *J Cell Biol* 111, 143-152.
- Jones, L., Tedrick, K., Baier, A., Logan, M.R. y Eitzen, G.** (2010). Cdc42p is activated during vacuole membrane fusion in a sterol-dependent subreaction of priming. *J Biol Chem* 285, 4298-4306.
- Jourdain, I., Dooley, H. C. y Toda, T.** (2012). Fission yeast Sec3 bridges the exocyst complex to the actin cytoskeleton. *Traffic*. 13, 1481-1495.
- Kadota, J., Yamamoto, T., Yoshiuchi, S., Bi, E. y Tanaka, K.** (2004). Septin ring assembly requires

-
- concerted action of polarisome components, a PAK kinase Cla4p, and the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 15, 5329-5345.
- Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M. y Mabuchi, I.** (2005). Directionality of F-actin cables changes during the fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol* 7, 916-917.
- Kanoh, J., Watanabe, Y., Ohsugi, M., Iino, Y. y Yamamoto, M.** (1996). *Schizosaccharomyces pombe gad7⁺* encodes a phosphoprotein with a bZIP domain, which is required for proper G1 arrest and gene expression under nitrogen starvation. *Genes Cells* 1, 391-408.
- Kashiwazaki, J., Iwaki, T., Takegawa, K., Shimoda, C. y Nakamura, T.** (2009). Two fission yeast rab7 homologs, ypt7 and ypt71, play antagonistic roles in the regulation of vacuolar morphology. *Traffic* 10, 912-924.
- Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P. y Toda, T.** (1999). Fission yeast α -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, 1173-1186.
- Kato, M. y Wickner, W.** (2001). Ergosterol is required for the Sec18/ATP-dependent priming step of homotypic vacuole fusion. *EMBO J* 20, 4035-4040.
- Keeney, J.B. y Boeke, J.D.** (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136, 849-856.
- Kelly, M., Burke, J., Smith, M., Klar, A. y Beach, D.** (1988). Four mating-type genes control sexual differentiation in the fission yeast. *EMBO J* 7, 1537-1547.
- Kim, H., Yang, P., Catanuto, P., Verde, F., Lai, H., Du, H., Chang, F. y Marcus, S.** (2003). The kelch repeat protein, Tea1, is a potential substrate target of the p21-activated kinase, Shk1, in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 278, 30074-30082.
- Kita, A., Li, C., Yu, Y., Umeda, N., Doi, A., Yasuda, M., Ishiwata, S., Taga, A., Horiuchi, Y. y Sugiura, R.** (2011). Role of the Small GTPase Rho3 in Golgi/Endosome trafficking through functional interaction with adaptin in Fission Yeast. *PLoS One* 6, e16842.
- Kita, A., Sugiura, R., Shoji, H., He, Y., Deng, L., Lu, Y., Sio, S.O., Takegawa, K., Sakaue, M., Shuntoh, H. y Kuno, T.** (2004). Loss of Apm1, the micro1 subunit of the clathrin-associated adaptor-protein-1 complex, causes distinct phenotypes and synthetic lethality with calcineurin deletion in fission yeast. *Mol Biol Cell* 15, 2920-2931.
- Kitamura, K., Katayama, S., Dhut, S., Sato, M., Watanabe, Y., Yamamoto, M. y Toda, T.** (2001). Phosphorylation of Mei2 and Ste11 by Pat1 kinase inhibits sexual differentiation via ubiquitin proteolysis and 14-3-3 protein in fission yeast. *Dev Cell* 1, 389-399.
- Kitamura, K., Nakagawa, T. y Shimoda, C.** (1990). Novel sterile mutants of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* which are defective in their response to starvation. *Current Genetics* 18, 315-321.
- Kitamura, K. y Shimoda, C.** (1991). The *Schizosaccharomyces pombe mam2⁺* gene encodes a

- putative pheromone receptor which has a significant homology with the *Saccharomyces cerevisiae* Ste2 protein. *EMBO J* 10, 3743-3751.
- Kjaerulff, S., Andersen, N.R., Borup, M.T. y Nielsen, O.** (2007). Cdk phosphorylation of the Ste11 transcription factor constrains differentiation-specific transcription to G1. *Genes Dev* 21, 347-359.
- Kjaerulff, S., Davey, J. y Nielsen, O.** (1994). Analysis of the structural genes encoding M-factor in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: identification of a third gene, mfm3. *Mol Cell Biol* 14, 3895-3905.
- Kjaerulff, S., Lautrup-Larsen, I., Truelsen, S., Pedersen, M. y Nielsen, O.** (2005). Constitutive activation of the fission yeast pheromone-responsive pathway induces ectopic meiosis and reveals ste11 as a mitogen-activated protein kinase target. *Mol Cell Biol* 25, 2045-2059.
- Kleijnen, M.F., Kirkpatrick, D.S. y Gygi, S.P.** (2007). The ubiquitin-proteasome system regulates membrane fusion of yeast vacuoles. *EMBO J* 26, 275-287.
- Knaus, M., Pelli-Gulli, M.P., van Drogen, F., Springer, S., Jaquenoud, M. y Peter, M.** (2007). Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergence. *EMBO J* 26, 4501-4513.
- Kobori, H., Yamada, N., Taki, A. y Osumi, M.** (1989). Actin is associated with the formation of the cell wall in reverting protoplasts of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 94, 635-646.
- Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T. y Osumi, M.** (2003). Characterization and behaviour of alpha-glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast* 20, 427-438.
- Kovar, D.R., Sirotkin, V. y Lord, M.** (2011). Three's company: the fission yeast actin cytoskeleton. *Trends in cell biology* 21, 177-187.
- Kozminski, K.G., Chen, A.J., Rodal, A.A. y Drubin, D.G.** (2000). Functions and Functional Domains of the GTPase Cdc42p. *Molecular Biology of the Cell* 11, 339-354.
- Kume, K., Koyano, T., Kanai, M., Toda, T. y Hirata, D.** (2011). Calcineurin ensures a link between the DNA replication checkpoint and microtubule-dependent polarized growth. *Nat Cell Biol* 13, 234-242.
- Kunitomo, H., Higuchi, T., Iino, Y. y Yamamoto, M.** (2000). A zinc-finger protein, Rst2p, regulates transcription of the fission yeast *ste11⁺* gene, which encodes a pivotal transcription factor for sexual development. *Mol Biol Cell* 11, 3205-3217.
- Kurahashi, H., Imai, Y. y Yamamoto, M.** (2002). Tropomyosin is required for the cell fusion process during conjugation in fission yeast. *Genes to Cells* 7, 375-384.
- Kushner, S.R.** (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColEI-derived plasmids. Elsevier, North Holland, Amsterdam.

-
- Lamson, R.E., Winters, M.J. y Pryciak, P.M.** (2002). Cdc42 regulation of kinase activity and signaling by the yeast p21-activated kinase Ste20. *Mol Cell Biol* 22, 2939-2951.
- Langevin, J., Morgan, M.J., Sibarita, J.B., Aresta, S., Murthy, M., Schwarz, T., Camonis, J. y Bellaiche, Y.** (2005). *Drosophila* exocyst components Sec5, Sec6, and Sec15 regulate DE-Cadherin trafficking from recycling endosomes to the plasma membrane. *Dev Cell* 9, 365-376.
- Leberer, E., Wu, C., Leeuw, T., Fourest-Lieuvin, A., Segall, J.E. y Thomas, D.Y.** (1997). Functional characterization of the Cdc42p binding domain of yeast Ste20p protein kinase. *EMBO J* 16, 83-97.
- Lechler, T., Jonsdottir, G.A., Klee, S.K., Pellman, D. y Li, R.** (2001). A two-tiered mechanism by which Cdc42 controls the localization and activation of an Arp2/3-activating motor complex in yeast. *J Cell Biol* 155, 261-270.
- Lee, W.L., Bezanilla, M. y 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.
- Lehman, K., Rossi, G., Adamo, J.E. y Brennwald, P.** (1999). Yeast homologues of tomosyn and lethal giant larvae function in exocytosis and are associated with the plasma membrane SNARE, Sec9. *J Cell Biol* 146, 125-140.
- Leupold, U.** (1949). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *Ctes. rend Lab. Carlsberg, Sér. Physiol.*, 381-480.
- Leupold, U.** (1987). Sex appeal in fission yeast. *Current Genetics* 12, 543-545.
- Li, P. y McLeod, M.** (1996). Molecular mimicry in development: identification of *ste11⁺* as a substrate and *mei3⁺* as a pseudosubstrate inhibitor of Ran1 kinase. *Cell* 87, 869-880.
- Lindner, P.** (1893). *Schizosaccharomyces pombe* n. sp., ein neuer Gärungserreger. *Wochenschrift für Brauerei* 10, 1298-1300.
- Liu, J., Tang, X., Wang, H. y Balasubramanian, M.** (2000). Bgs2p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 478, 105-108.
- Liu, J., Tang, X., Wang, H., Oliferenko, S. y 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., McCollum, D. y Balasubramanian, M.K.** (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3- β -glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 153, 1193-1203.
- Loewith, R., Hubberstey, A. y Young, D.** (2000). Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113 (Pt 1), 153-160.
- Logan, M.R., Jones, L. y Eitzen, G.** (2010). Cdc42p and Rho1p are sequentially activated and

- mechanistically linked to vacuole membrane fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 394, 64-69.
- Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y. y Sugiura, R.** (2006). Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17, 5028-5037.
- Ma, Y., Takeuchi, M., Sugiura, R., Sio, S.O. y Kuno, T.** (2009). Deletion mutants of AP-1 adaptin subunits display distinct phenotypes in fission yeast. *Genes Cells* 14, 1015-1028.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M. y Cansado, J.** (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 281, 2033-2043.
- Maeda, T., Mochizuki, N. y Yamamoto, M.** (1990). Adenylyl cyclase is dispensable for vegetative cell growth in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 7814-7818.
- Maeda, Y., Kashiwazaki, J., Shimoda, C. y Nakamura, T.** (2009). The *Schizosaccharomyces pombe* syntaxin 1 homolog, Psy1, is essential in the development of the forespore membrane. *Biosci Biotechnol Biochem* 73, 339-345.
- Magnelli, P.E., Cipollo, J.F. y Robbins, P.W.** (2005). A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Anal Biochem* 336, 202-212.
- Manners, D.J. y Meyer, M.T.** (1977). The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydrate Research* 57, 189-203.
- Manser, E., Loo, T.H., Koh, C.G., Zhao, Z.S., Chen, X.Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. y Lim, L.** (1998). PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Molecular cell* 1, 183-192.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M.H. y Wigler, M.H.** (1995). Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6180-6184.
- Marks, J. y Hyams, J.S.** (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *European journal of cell biology* 39, 27-32.
- Martín-Cuadrado, A.B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Vázquez de Aldana, C.R. y 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, 1689-1698.
- Martín-Cuadrado, A.B., Encinar del Dedo, J., de Medina-Redondo, M., Fontaine, T., del Rey, F., Latge, J.P. y Vázquez de Aldana, C.R.** (2008). The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3- β -glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum

localization. *Mol Microbiol* 69, 188-200.

Martín-Cuadrado, A.B., Morrell, J.L., Konomi, M., An, H., Petit, C., Osumi, M., Balasubramanian, M., Gould, K.L., Del Rey, F. y 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, 4867-4881.

Martin, S.G. y Chang, F. (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol* 16, 1161-1170.

Martin, S.G., McDonald, W.H., Yates, J.R., 3rd y Chang, F. (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell* 8, 479-491.

Martin, S.G., Rincón, S.A., Basu, R., Pérez, P. y Chang, F. (2007). Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell* 18, 4155-4167.

Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A. y Sánchez, Y. (2003). Bgs3p, a putative 1,3- β -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 2, 159-169.

Martín, V., Ribas, J.C., Carnero, E., Durán, A. y Sánchez, Y. (2000). Bgs2, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* 38, 308-321.

Mata, J. y Bahler, J. (2006). Global roles of Ste11p, cell type, and pheromone in the control of gene expression during early sexual differentiation in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 15517-15522.

Mata, J. y Nurse, P. (1997). tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* 89, 939-949.

Matsuo, T., Otsubo, Y., Urano, J., Tamanoi, F. y Yamamoto, M. (2007). Loss of the TOR kinase Tor2 mimics nitrogen starvation and activates the sexual development pathway in fission yeast. *Mol Cell Biol* 27, 3154-3164.

Maundrell, K. (1990). nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* 265, 10857-10864.

Mayer, A., Scheglmann, D., Dove, S., Glatz, A., Wickner, W. y Haas, A. (2000). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates two steps of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell* 11, 807-817.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen, J.B. y Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3- β -D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 15, 5671-5681.

Mazzei, G.J., Schmid, E.M., Knowles, J.K., Payton, M.A. y Maundrell, K.G. (1993). A Ca²⁺-independent protein kinase C from fission yeast. *J Biol Chem* 268, 7401-7406.

McCallum, S.J., Wu, W.J. y Cerione, R.A. (1996). Identification of a putative effector for Cdc42Hs with high sequence similarity to the RasGAP-related protein IQGAP1 and a Cdc42Hs binding

- partner with similarity to IQGAP2. *J Biol Chem* 271, 21732-21737.
- McEwen, R.K., Dove, S.K., Cooke, F.T., Painter, G.F., Holmes, A.B., Shisheva, A., Ohya, Y., Parker, P.J. y Michell, R.H.** (1999). Complementation analysis in PtdInsP kinase-deficient yeast mutants demonstrates that *Schizosaccharomyces pombe* and murine Fab1p homologues are phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinases. *J Biol Chem* 274, 33905-33912.
- Medkova, M., France, Y.E., Coleman, J. y Novick, P.** (2006). The rab exchange factor Sec2p reversibly associates with the exocyst. *Mol Biol Cell* 17, 2757-2769.
- Merla, A. y Johnson, D.I.** (2000). The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 79, 469-477.
- Merla, A. y Johnson, D.I.** (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr Genet* 39, 205-209.
- Michaillat, L., Baars, T.L. y Mayer, A.** (2012). Cell-free reconstitution of vacuole membrane fragmentation reveals regulation of vacuole size and number by TORC1. *Mol Biol Cell* 23, 881-895.
- Millar, J.B., Buck, V. y Wilkinson, M.G.** (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev* 9, 2117-2130.
- Millard, T.H., Sharp, S.J. y Machesky, L.M.** (2004). Signalling to actin assembly via the WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein)-family proteins and the Arp2/3 complex. *Biochem. J.* 380, 1-17.
- Miller, P.J. y Johnson, D.I.** (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 14, 1075-1083.
- Mima, J. y Wickner, W.** (2009a). Complex lipid requirements for SNARE- and SNARE chaperone-dependent membrane fusion. *J Biol Chem* 284, 27114-27122.
- Mima, J. y Wickner, W.** (2009b). Phosphoinositides and SNARE chaperones synergistically assemble and remodel SNARE complexes for membrane fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 16191-16196.
- Minc, N., Boudaoud, A. y Chang, F.** (2009). Mechanical forces of fission yeast growth. *Curr Biol* 19, 1096-1101.
- Mionnet, C., Bogliolo, S. y Arkowitz, R.A.** (2008). Oligomerization regulates the localization of Cdc24, the Cdc42 activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 283, 17515-17530.
- Miyata, M., Matsuoka, M. y Inada, T.** (1997). Induction of sexual co-flocculation of heterothallic fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*) cells by mating pheromones. *J Gen Appl Microbiol* 43, 169-174.
- Miyatake, M., Kuno, T., Kita, A., Katsura, K., Takegawa, K., Uno, S., Nabata, T. y Sugiura, R.** (2007). Valproic acid affects membrane trafficking and cell-wall integrity in fission yeast.

Genetics 175, 1695-1705.

- Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J. y Novick, P.** (2010). Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Dev Cell* 18, 828-840.
- Mizuno-Yamasaki, E., Rivera-Molina, F. y Novick, P.** (2012). GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem* 81, 637-659.
- Mochizuki, N. y Yamamoto, M.** (1992). Reduction in the intracellular cAMP level triggers initiation of sexual development in fission yeast. *Mol Gen Genet* 233, 17-24.
- Moon, S.Y. y Zheng, Y.** (2003). Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends in cell biology* 13, 13-22.
- Moreno, M.B., Durán, A. y Ribas, J.C.** (2000). A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* 16, 861-872.
- Moreno, S., Klar, A. y Nurse, P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194, 795-823.
- Morgera, F., Sallah, M.R., Dubuke, M.L., Gandhi, P., Brewer, D.N., Carr, C.M. y Munson, M.** (2012). Regulation of exocytosis by the exocyst subunit Sec6 and the SM protein Sec1. *Mol Biol Cell* 23, 337-346.
- Morishita, M., Morimoto, F., Kitamura, K., Koga, T., Fukui, Y., Maekawa, H., Yamashita, I. y Shimoda, C.** (2002). Phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase is required for the cellular response to nutritional starvation and mating pheromone signals in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 7, 199-215.
- Morrell-Falvey, J.L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G.D. y Gould, K.L.** (2005). Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J Cell Sci* 118, 5563-5573.
- Morrell, J.L., Morphew, M. y 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, 4201-4215.
- Moseley, J.B. y Goode, B.L.** (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 605-645.
- Moskow, J.J., Gladfelter, A.S., Lamson, R.E., Pryciak, P.M. y Lew, D.J.** (2000). Role of Cdc42p in pheromone-stimulated signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 7559-7571.
- Motegi, F., Arai, R. y Mabuchi, I.** (2001). Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell* 12, 1367-1380.
- Mott, H.R., Owen, D., Nietlispach, D., Lowe, P.N., Manser, E., Lim, L. y Laue, E.D.** (1999). Structure of the small G protein Cdc42 bound to the GTPase-binding domain of ACK. *Nature*

399, 384-388.

- Muller, O., Bayer, M.J., Peters, C., Andersen, J.S., Mann, M. y Mayer, A.** (2002). The Vtc proteins in vacuole fusion: coupling NSF activity to V(0) trans-complex formation. *EMBO J* 21, 259-269.
- Muller, O., Johnson, D.I. y Mayer, A.** (2001). Cdc42p functions at the docking stage of yeast vacuole membrane fusion. *EMBO J* 20, 5657-5665.
- Muller, O., Neumann, H., Bayer, M.J. y Mayer, A.** (2003). Role of the Vtc proteins in V-ATPase stability and membrane trafficking. *J Cell Sci* 116, 1107-1115.
- Munemitsu, S., Innis, M.A., Clark, R., McCormick, F., Ullrich, A. y Polakis, P.** (1990). Molecular cloning and expression of a G25K cDNA, the human homolog of the yeast cell cycle gene CDC42. *Mol Cell Biol* 10, 5977-5982.
- Munson, M. y Novick, P.** (2006). The exocyst defrocked, a framework of rods revealed. *Nat Struct Mol Biol* 13, 577-581.
- Murray, J.M. y Johnson, D.I.** (2000). Isolation and characterization of Nrf1p, a novel negative regulator of the Cdc42p GTPase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 154, 155-165.
- Murray, J.M. y Johnson, D.I.** (2001). The Cdc42p GTPase and its regulators Nrf1p and Scd1p are involved in endocytic trafficking in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 276, 3004-3009.
- Mutoh, T., Nakano, K. y Mabuchi, I.** (2005). Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* 10, 1189-1202.
- Nadin-Davis, S.A. y Nasim, A.** (1988). A gene which encodes a predicted protein kinase can restore some functions of the ras gene in fission yeast. *EMBO J* 7, 985-993.
- Nadin-Davis, S.A., Nasim, A. y Beach, D.** (1986). Involvement of ras in sexual differentiation but not in growth control in fission yeast. *EMBO J* 5, 2963-2971.
- Nair, U. y Klionsky, D.J.** (2011). Autophagosome biogenesis requires SNAREs. *Autophagy* 7, 1570-1572.
- Nakamura, T., Nakamura-Kubo, M., Hirata, A. y Shimoda, C.** (2001). The *Schizosaccharomyces pombe spo3⁺* gene is required for assembly of the forespore membrane and genetically interacts with *psy1⁺*-encoding syntaxin-like protein. *Mol Biol Cell* 12, 3955-3972.
- Nakano, K., Arai, R. y Mabuchi, I.** (1997). The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 2, 679-694.
- Nakano, K., Arai, R. y Mabuchi, I.** (2005). Small GTPase Rho5 is a functional homologue of Rho1, which controls cell shape and septation in fission yeast. *FEBS Lett* 579, 5181-5186.
- Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh, E.A., Matsui, Y. y Mabuchi, I.** (2002). The small GTPase Rho3

-
- and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J Cell Sci* 115, 4629-4639.
- Nakano, K., Kuwayama, H., Kawasaki, M., Numata, O. y Takaine, M.** (2010). GMF is an evolutionarily developed Adf/cofilin-super family protein involved in the Arp2/3 complex-mediated organization of the actin cytoskeleton. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 373-382.
- Nakano, K. y Mabuchi, I.** (1995). Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding Rho proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 155, 119-122.
- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. y Mabuchi, I.** (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* 8, 357-370.
- Nakano, K., Mutoh, T. y Mabuchi, I.** (2001). Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 6, 1031-1042.
- Nakano, K., Toya, M., Yoneda, A., Asami, Y., Yamashita, A., Kamasawa, N., Osumi, M. y Yamamoto, M.** (2011). Pob1 ensures cylindrical cell shape by coupling two distinct rho signaling events during secretory vesicle targeting. *Traffic* 12, 726-739.
- Nassar, N., Hoffman, G.R., Manor, D., Clardy, J.C. y Cerione, R.A.** (1998). Structures of Cdc42 bound to the active and catalytically compromised forms of Cdc42GAP. *Nat Struct Mol Biol* 5, 1047-1052.
- Neiman, A.M., Stevenson, B.J., Xu, H.P., Sprague, G.F., Jr., Herskowitz, I., Wigler, M. y Marcus, S.** (1993). Functional homology of protein kinases required for sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae* suggests a conserved signal transduction module in eukaryotic organisms. *Mol Biol Cell* 4, 107-120.
- Nelson, B., Parsons, A.B., Evangelista, M., Schaefer, K., Kennedy, K., Ritchie, S., Petryshen, T.L. y Boone, C.** (2004). Fus1p interacts with components of the Hog1p mitogen-activated protein kinase and Cdc42p morphogenesis signaling pathways to control cell fusion during yeast mating. *Genetics* 166, 67-77.
- Nern, A. y Arkowitz, R.A.** (1998). A GTP-exchange factor required for cell orientation. *Nature* 391, 195-198.
- Nern, A. y Arkowitz, R.A.** (2000). Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J Cell Biol* 148, 1115-1122.
- Novick, P., Ferro, S. y Schekman, R.** (1981). Order of events in the yeast secretory pathway. *Cell* 25, 461-469.
- Novick, P., Field, C. y Schekman, R.** (1980). Identification of 23 complementation groups required for post-translational events in the yeast secretory pathway. *Cell* 21, 205-215.
- Ohkura, H., Kinoshita, N., Miyatani, S., Toda, T. y Yanagida, M.** (1989). The fission yeast *dis2⁺* gene required for chromosome disjoining encodes one of two putative type 1 protein

- phosphatases. *Cell* 57, 997-1007.
- Onishi, M., Koga, T., Hirata, A., Nakamura, T., Asakawa, H., Shimoda, C., Bahler, J., Wu, J.Q., Takegawa, K., Tachikawa, H., Pringle, J.R. y Fukui, Y.** (2010). Role of septins in the orientation of forespore membrane extension during sporulation in fission yeast. *Mol Cell Biol* 30, 2057-2074.
- Onishi, M., Nakamura, Y., Koga, T., Takegawa, K. y Fukui, Y.** (2003). Isolation of suppressor mutants of phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase deficient cells in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem* 67, 1772-1779.
- Onken, B., Wiener, H., Philips, M.R. y Chang, E.C.** (2006). Compartmentalized signaling of Ras in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9045-9050.
- Oowatari, Y., Jeong, H., Tanae, K., Nakagawa, T. y Kawamukai, M.** (2011). Regulation and role of an RNA-binding protein Msa2 in controlling the sexual differentiation of fission yeast. *Curr Genet* 57, 191-200.
- Osumi, M.** (1998). The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29, 207-233.
- Osumi, M., Sato, M., Ishijima, S.A., Konomi, M., Takagi, T. y Yaguchi, H.** (1998). Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet Biol* 24, 178-206.
- Otsubo, Y. y Yamamoto, M.** (2010). 12- TOR and Sexual Development in Fission Yeast, in: Michael, N.H., Fuyuhiko, T. (Eds.), *The Enzymes*. Academic Press, pp. 229-250.
- Ottillie, S., Miller, P.J., Johnson, D.I., Creasy, C.L., Sells, M.A., Bagrodia, S., Forsburg, S.L. y Chernoff, J.** (1995). Fission yeast *pak1⁺* encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *EMBO J* 14, 5908-5919.
- Ozoe, F., Kurokawa, R., Kobayashi, Y., Jeong, H.T., Tanaka, K., Sen, K., Nakagawa, T., Matsuda, H. y Kawamukai, M.** (2002). The 14-3-3 proteins Rad24 and Rad25 negatively regulate Byr2 by affecting its localization in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 22, 7105-7119.
- Oztan, A., Silvis, M., Weisz, O.A., Bradbury, N.A., Hsu, S.C., Goldenring, J.R., Yeaman, C. y Apodaca, G.** (2007). Exocyst requirement for endocytic traffic directed toward the apical and basolateral poles of polarized MDCK cells. *Mol Biol Cell* 18, 3978-3992.
- Padte, N.N., Martin, S.G., Howard, M. y Chang, F.** (2006). The cell-end factor pom1p inhibits mid1p in specification of the cell division plane in fission yeast. *Curr Biol* 16, 2480-2487.
- Parada, L.F., Tabin, C.J., Shih, C. y Weinberg, R.A.** (1982). Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature* 297, 474-478.
- Park, H.O. y 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.
- Paterson, J.M., Ydenberg, C.A. y Rose, M.D.** (2008). Dynamic localization of yeast Fus2p to an expanding ring at the cell fusion junction during mating. *J Cell Biol* 181, 697-709.

-
- Pelham, R.J., Jr. y Chang, F.** (2001). Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* 3, 235-244.
- Pérez, P. y Calonge, T.M.** (2002). Yeast protein kinase C. *Journal of biochemistry* 132, 513-517.
- Pérez, P. y Rincón, S.A.** (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *The Biochemical journal* 426, 243-253.
- Peter, M., Neiman, A.M., Park, H.O., van Lohuizen, M. y Herskowitz, I.** (1996). Functional analysis of the interaction between the small GTP binding protein Cdc42 and the Ste20 protein kinase in yeast. *EMBO J* 15, 7046-7059.
- Peters, C., Andrews, P.D., Stark, M.J., Cesaro-Tadic, S., Glatz, A., Podtelejnikov, A., Mann, M. y Mayer, A.** (1999). Control of the terminal step of intracellular membrane fusion by protein phosphatase 1. *Science* 285, 1084-1087.
- Peters, C., Baars, T.L., Buhler, S. y Mayer, A.** (2004). Mutual control of membrane fission and fusion proteins. *Cell* 119, 667-678.
- Peters, C. y Mayer, A.** (1998). Ca²⁺/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. *Nature* 396, 575-580.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R. y Hagan, I.M.** (1998a). F-actin distribution and function during sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 111 (Pt 7), 867-876.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R. y Hagan, I.M.** (1998b). FH3, a domain found in formins, targets the fission yeast formin Fus1 to the projection tip during conjugation. *J Cell Biol* 141, 1217-1228.
- Petersen, J., Weilguny, D., Egel, R. y Nielsen, O.** (1995). Characterization of fus1 of *Schizosaccharomyces pombe*: a developmentally controlled function needed for conjugation. *Mol Cell Biol* 15, 3697-3707.
- Pfeffer, S.R.** (1996). Transport vesicle docking: SNAREs and associates. *Annu Rev Cell Dev Biol* 12, 441-461.
- Pinar, M., Coll, P.M., Rincón, S.A. y Pérez, P.** (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 19, 1727-1738.
- Popolo, L. y Vai, M.** (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* 1426, 385-400.
- Presti, L.L., Chang, F. y Martin, S.G.** (2012). Myosin Vs organize actin cables in fission yeast. *Mol Biol Cell*.
- Prigent, M., Dubois, T., Raposo, G., Derrien, V., Tenza, D., Rosse, C., Camonis, J. y Chavrier, P.** (2003). ARF6 controls post-endocytic recycling through its downstream exocyst complex effector. *J Cell Biol* 163, 1111-1121.

- Pringle, J.R., Preston, R.A., Adams, A.E., Stearns, T., Drubin, D.G., Haarer, B.K. y Jones, E.W.** (1989). Fluorescence microscopy methods for yeast. *Methods Cell Biol* 31, 357-435.
- Pruyne, D. y Bretscher, A.** (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* 113 (Pt 4), 571-585.
- Qin, J., Kang, W., Leung, B. y McLeod, M.** (2003). Ste11p, a high-mobility-group box DNA-binding protein, undergoes pheromone- and nutrient-regulated nuclear-cytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol* 23, 3253-3264.
- Reichelt, B.Y. y Fleet, G.H.** (1981). Isolation, properties, function, and regulation of endo-(1 leads to 3)-beta-glucanases in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 147, 1085-1094.
- Rincón, S.A., Santos, B. y 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, 435-446.
- Rincón, S.A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M.A., Santos, B., Martin, S.G. y Pérez, P.** (2009). Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* 20, 4390-4399.
- Roberts, C.J., Raymond, C.K., Yamashiro, C.T. y Stevens, T.H.** (1991). Methods for studying the yeast vacuole. *Methods Enzymol* 194, 644-661.
- Robinow, C.F.** (1977). The Number of Chromosomes in *Schizosaccharomyces pombe*: Light Microscopy of Stained Preparations. *Genetics* 87, 491-497.
- Robinson, N.G., Guo, L., Imai, J., Toh, E.A., Matsui, Y. y Tamanoi, F.** (1999). Rho3 of *Saccharomyces cerevisiae*, which regulates the actin cytoskeleton and exocytosis, is a GTPase which interacts with Myo2 and Exo70. *Mol Cell Biol* 19, 3580-3587.
- Rothlisberger, S., Jourdain, I., Johnson, C., Takegawa, K. y Hyams, J.S.** (2009). The dynamin-related protein Vps1 regulates vacuole fission, fusion and tubulation in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genet Biol* 46, 927-935.
- Roumanie, O., Wu, H., Molk, J.N., Rossi, G., Bloom, K. y 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, 583-594.
- Routhier, E.L., Burn, T.C., Abbaszade, I., Summers, M., Albright, C.F. y 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, 21670-21677.
- Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Hanamatsu, H., Kato, U., Umeda, M., Kozminski, K.G. y Tanaka, K.** (2007). Transbilayer phospholipid flipping regulates Cdc42p signaling during polarized cell growth via Rga GTPase-activating proteins. *Dev Cell* 13, 743-751.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T.** (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

-
- Samejima, I., Miller, V.J., Rincón, S.A. y Sawin, K.E.** (2010). Fission yeast Mto1 regulates diversity of cytoplasmic microtubule organizing centers. *Curr Biol* 20, 1959-1965.
- Santiago-Tirado, F.H., Legesse-Miller, A., Schott, D. y Bretscher, A.** (2011). PI4P and Rab inputs collaborate in myosin-V-dependent transport of secretory compartments in yeast. *Dev Cell* 20, 47-59.
- Santos, B., Gutiérrez, J., Calonge, T.M. y Pérez, P.** (2003). Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 2, 521-533.
- Santos, B., Martín-Cuadrado, A.B., Vázquez de Aldana, C.R., del Rey, F. y Pérez, P.** (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell* 4, 1639-1645.
- Santos, B. y Snyder, M.** (2003). Specific protein targeting during cell differentiation: polarized localization of Fus1p during mating depends on Chs5p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* 2, 821-825.
- Saunders, T.E., Pan, K.Z., Angel, A., Guan, Y., Shah, J.V., Howard, M. y Chang, F.** (2012). Noise reduction in the intracellular pom1p gradient by a dynamic clustering mechanism. *Dev Cell* 22, 558-572.
- Savage, N.S., Layton, A.T. y Lew, D.J.** (2012). Mechanistic mathematical model of polarity in yeast. *Mol Biol Cell* 23, 1998-2013.
- Sawin, K.E.** (2002). Cell polarity: following formin function. *Curr Biol* 12, R6-8.
- Sayers, L.G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T. y Parker, P.J.** (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells* 5, 17-27.
- Seals, D.F., Eitzen, G., Margolis, N., Wickner, W.T. y Price, A.** (2000). A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 9402-9407.
- Seeley, E.S., Kato, M., Margolis, N., Wickner, W. y Eitzen, G.** (2002). Genomic analysis of homotypic vacuole fusion. *Mol Biol Cell* 13, 782-794.
- Sells, M.A., Barratt, J.T., Caviston, J., Otilie, S., Leberer, E. y Chernoff, J.** (1998). Characterization of Pak2p, a pleckstrin homology domain-containing, p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* 273, 18490-18498.
- Sengar, A.S., Markley, N.A., Marini, N.J. y Young, D.** (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 17, 3508-3519.
- Sharifmoghadam, M.R., Bustos-Sanmamed, P. y Valdivieso, M.H.** (2006). The fission yeast Map4 protein is a novel adhesin required for mating. *FEBS Lett* 580, 4457-4462.
- Sharifmoghadam, M.R., De Leon, N., Hoya, M., Curto, M.-Á. y Valdivieso, M.-H.** (2010).

- Different steps of sexual development are differentially regulated by the Sec8p and Exo70p exocyst subunits. *FEMS Microbiology Letters* 305, 71-80.
- Sharifmoghadam, M.R. y Valdivieso, M.H.** (2008). The *Schizosaccharomyces pombe* Map4 adhesin is a glycoprotein that can be extracted from the cell wall with alkali but not with beta-glucanases and requires the C-terminal DIPSY domain for function. *Mol Microbiol* 69, 1476-1490.
- Sheltzer, J.M. y Rose, M.D.** (2009). The class V myosin Myo2p is required for Fus2p transport and actin polarization during the yeast mating response. *Mol Biol Cell* 20, 2909-2919.
- Shewan, A., Eastburn, D.J. y Mostov, K.** (2011). Phosphoinositides in cell architecture. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 3, a004796.
- Shimada, Y., Gulli, M.P. y Peter, M.** (2000). Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* 2, 117-124.
- Shiozaki, K. y Russell, P.** (1995). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378, 739-743.
- Shiozaki, K. y Russell, P.** (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2276-2288.
- Sirotkin, V., Beltzner, C.C., Marchand, J.B. y 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, 637-648.
- Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L. y Pollard, T.D.** (2010). Quantitative analysis of the mechanism of endocytic actin patch assembly and disassembly in fission yeast. *Mol Biol Cell* 21, 2894-2904.
- Sivaram, M.V., Saporita, J.A., Furgason, M.L., Boettcher, A.J. y Munson, M.** (2005). Dimerization of the exocyst protein Sec6p and its interaction with the t-SNARE Sec9p. *Biochemistry* 44, 6302-6311.
- Skau, C.T. y Kovar, D.R.** (2010). Fimbrin and tropomyosin competition regulates endocytosis and cytokinesis kinetics in fission yeast. *Curr Biol* 20, 1415-1422.
- Slaughter, B.D., Das, A., Schwartz, J.W., Rubinstein, B. y Li, R.** (2009). Dual modes of cdc42 recycling fine-tune polarized morphogenesis. *Dev Cell* 17, 823-835.
- Snaith, H.A., Samejima, I. y Sawin, K.E.** (2005). Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J* 24, 3690-3699.
- Snaith, H.A. y Sawin, K.E.** (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* 423, 647-651.
- Snaith, H.A., Thompson, J., Yates, J.R., 3rd y Sawin, K.E.** (2011). Characterization of Mug33 reveals complementary roles for actin cable-dependent transport and exocyst regulators in

-
- fission yeast exocytosis. *J Cell Sci* 124, 2187-2199.
- Sohrmann, M., Fankhauser, C., Brodbeck, C. y Simanis, V.** (1996). The *dmf1/mid1* gene is essential for correct positioning of the division septum in fission yeast. *Genes Dev* 10, 2707-2719.
- Sommer, B., Oprins, A., Rabouille, C. y Munro, S.** (2005). The exocyst component Sec5 is present on endocytic vesicles in the oocyte of *Drosophila melanogaster*. *J Cell Biol* 169, 953-963.
- Soto, T., Villar-Tajadura, M.A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Pérez, P. y Cansado, J.** (2010). Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 285, 11516-11525.
- Stevens, W.K., Vranken, W., Goudreau, N., Xiang, H., Xu, P. y Ni, F.** (1999). Conformation of a Cdc42/Rac Interactive Binding Peptide in Complex with Cdc42 and Analysis of the Binding Interface[†]. *Biochemistry* 38, 5968-5975.
- Strasser, B., Iwaszkiewicz, J., Michielin, O. y Mayer, A.** (2011). The V-ATPase proteolipid cylinder promotes the lipid-mixing stage of SNARE-dependent fusion of yeast vacuoles. *EMBO J* 30, 4126-4141.
- Sugawara, T., Sato, M., Takagi, T., Kamasaki, T., Ohno, N. y Osumi, M.** (2003). In situ localization of cell wall α -1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc (Tokyo)* 52, 237-242.
- Sugimoto, A., Iino, Y., Maeda, T., Watanabe, Y. y Yamamoto, M.** (1991). *Schizosaccharomyces pombe ste11⁺* encodes a transcription factor with an HMG motif that is a critical regulator of sexual development. *Genes Dev* 5, 1990-1999.
- Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H. y Kuno, T.** (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* 399, 479-483.
- Svoboda, A., Bahler, J. y Kohli, J.** (1995). Microtubule-driven nuclear movements and linear elements as meiosis-specific characteristics of the fission yeasts *Schizosaccharomyces versatilis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Chromosoma* 104, 203-214.
- Tabuchi, M., Iwaihara, O., Ohtani, Y., Ohuchi, N., Sakurai, J., Morita, T., Iwahara, S. y Takegawa, K.** (1997). Vacuolar protein sorting in fission yeast: cloning, biosynthesis, transport, and processing of carboxypeptidase Y from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Bacteriol* 179, 4179-4189.
- Tajadura, V., García, B., García, I., García, P. y 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, 6163-6174.
- Takahashi, S., Kubo, K., Waguri, S., Yabashi, A., Shin, H.W., Katoh, Y. y Nakayama, K.** (2012). Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci*.
- Takegawa, K., DeWald, D.B. y Emr, S.D.** (1995). *Schizosaccharomyces pombe* Vps34p, a

- phosphatidylinositol-specific PI 3-kinase essential for normal cell growth and vacuole morphology. *J Cell Sci* 108 (Pt 12), 3745-3756.
- Takegawa, K., Hosomi, A., Iwaki, T., Fujita, Y., Morita, T. y Tanaka, N.** (2003). Identification of a SNARE protein required for vacuolar protein transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 77-82.
- Tan, E.C., Leung, T., Manser, E. y Lim, L.** (1993). The human active breakpoint cluster region-related gene encodes a brain protein with homology to guanine nucleotide exchange proteins and GTPase-activating proteins. *J Biol Chem* 268, 27291-27298.
- Tanaka, K., Davey, J., Imai, Y. y Yamamoto, M.** (1993). *Schizosaccharomyces pombe map3⁺* encodes the putative M-factor receptor. *Mol Cell Biol* 13, 80-88.
- Tatebe, H., Morigasaki, S., Murayama, S., Zeng, C.T. y Shiozaki, K.** (2010). Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Curr Biol* 20, 1975-1982.
- Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R. y Shiozaki, K.** (2008). Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr Biol* 18, 322-330.
- Tatebe, H., Shimada, K., Uzawa, S., Morigasaki, S. y Shiozaki, K.** (2005). Wsh3/Tea4 is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of Tea1 and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr Biol* 15, 1006-1015.
- Tedrick, K., Trischuk, T., Lehner, R. y Eitzen, G.** (2004). Enhanced membrane fusion in sterol-enriched vacuoles bypasses the Vrp1p requirement. *Mol Biol Cell* 15, 4609-4621.
- TerBush, D.R., Maurice, T., Roth, D. y Novick, P.** (1996). The Exocyst is a multiprotein complex required for exocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 6483-6494.
- TerBush, D.R. y Novick, P.** (1995). Sec6, Sec8, and Sec15 are components of a multisubunit complex which localizes to small bud tips in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 130, 299-312.
- Tischer, C., Brunner, D. y Dogterom, M.** (2009). Force- and kinesin-8-dependent effects in the spatial regulation of fission yeast microtubule dynamics. *Mol Syst Biol* 5, 250.
- Toda, T., Niwa, H., Nemoto, T., Dhut, S., Eddison, M., Matsusaka, T., Yanagida, M. y Hirata, D.** (1996). The fission yeast *sts5⁺* gene is required for maintenance of growth polarity and functionally interacts with protein kinase C and an osmosensing MAP-kinase pathway. *J Cell Sci* 109 (Pt 9), 2331-2342.
- Toda, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M.** (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J* 12, 1987-1995.
- Toya, M., Lino, Y. y Yamamoto, M.** (1999). Fission yeast Pob1p, which is homologous to budding yeast Boi proteins and exhibits subcellular localization close to actin patches, is essential for cell elongation and separation. *Mol Biol Cell* 10, 2745-2757.

-
- Toya, M., Motegi, F., Nakano, K., Mabuchi, I. y Yamamoto, M.** (2001). Identification and functional analysis of the gene for type I myosin in fission yeast. *Genes Cells* 6, 187-199.
- Tran, P.T., Marsh, L., Doye, V., Inoue, S. y Chang, F.** (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing. *J Cell Biol* 153, 397-411.
- Tsukahara, K., Yamamoto, H. y Okayama, H.** (1998). An RNA binding protein negatively controlling differentiation in fission yeast. *Mol Cell Biol* 18, 4488-4498.
- Tu, H., Barr, M., Dong, D.L. y Wigler, M.** (1997). Multiple regulatory domains on the Byr2 protein kinase. *Mol Cell Biol* 17, 5876-5887.
- Uritani, M., Hidaka, H., Hotta, Y., Ueno, M., Ushimaru, T. y Toda, T.** (2006). Fission yeast Tor2 links nitrogen signals to cell proliferation and acts downstream of the Rheb GTPase. *Genes Cells* 11, 1367-1379.
- Valbuena, N., Guan, K.L. y Moreno, S.** (2012). The Vam6 and Gtr1-Gtr2 pathway activates TORC1 in response to amino acids in fission yeast. *J Cell Sci* 125, 1920-1928.
- Valbuena, N. y Moreno, S.** (2010). TOR and PKA pathways synergize at the level of the Ste11 transcription factor to prevent mating and meiosis in fission yeast. *PLoS One* 5, e11514.
- Vasyutina, E., Martarelli, B., Brakebusch, C., Wende, H. y Birchmeier, C.** (2009). The small G-proteins Rac1 and Cdc42 are essential for myoblast fusion in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 8935-8940.
- Vázquez-Martínez, R. y Malagón, M.M.** (2011). Rab proteins and the secretory pathway: the case of rab18 in neuroendocrine cells. *Frontiers in Endocrinology* 2, 1.
- Verde, F., Mata, J. y Nurse, P.** (1995). Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *J Cell Biol* 131, 1529-1538.
- Versele, M. y Thorner, J.** (2004). Septin collar formation in budding yeast requires GTP binding and direct phosphorylation by the PAK, Cla4. *J Cell Biol* 164, 701-715.
- Vetter, I.R. y Wittinghofer, A.** (2001). The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions. *Science* 294, 1299-1304.
- Villar-Tajadura, M.A., Coll, P.M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B. y Pérez, P.** (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol Microbiol* 70, 867-881.
- Walch-Solimena, C., Collins, R.N. y Novick, P.J.** (1997). Sec2p mediates nucleotide exchange on Sec4p and is involved in polarized delivery of post-Golgi vesicles. *J Cell Biol* 137, 1495-1509.
- Wang, H., Tang, X. y Balasubramanian, M.K.** (2003). Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 164, 1323-1331.
- Wang, H., Tang, X., Liu, J., Trautmann, S., Balasundaram, D., McCollum, D. y Balasubramanian, M.K.** (2002). The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in

- Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13, 515-529.
- Wang, Y., Xu, H.P., Riggs, M., Rodgers, L. y Wigler, M.** (1991). *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol Cell Biol* 11, 3554-3563.
- Wennerberg, K., Rossman, K.L. y Der, C.J.** (2005). The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci* 118, 843-846.
- West, R.R., Malmstrom, T., Troxell, C.L. y McIntosh, J.R.** (2001). Two related kinesins, Klp5 and Klp6, foster microtubule disassembly and are required for meiosis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 12, 3919-3932.
- Whyte, J.R. y Munro, S.** (2002). Vesicle tethering complexes in membrane traffic. *J Cell Sci* 115, 2627-2637.
- Wickner, W.** (2002). Yeast vacuoles and membrane fusion pathways. *EMBO J* 21, 1241-1247.
- Wickner, W.** (2010). Membrane fusion: five lipids, four SNAREs, three chaperones, two nucleotides, and a Rab, all dancing in a ring on yeast vacuoles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 26, 115-136.
- Wickner, W. y Haas, A.** (2000). Yeast homotypic vacuole fusion: a window on organelle trafficking mechanisms. *Annu Rev Biochem* 69, 247-275.
- Willer, M., Hoffmann, L., Stykarsdottir, U., Egel, R., Davey, J. y Nielsen, O.** (1995). Two-step activation of meiosis by the *mat1* locus in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 15, 4964-4970.
- Williams, M.J. y Rottner, K.** (2010). Introduction to Small GTPases. *Small GTPases* 1, 1.
- Win, T.Z., Gachet, Y., Mulvihill, D.P., May, K.M. y 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.
- Winter, D.C., Choe, E.Y. y Li, R.** (1999). Genetic dissection of the budding yeast Arp2/3 complex: a comparison of the in vivo and structural roles of individual subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7288-7293.
- Wu, C., Lee, S.F., Furmaniak-Kazmierczak, E., Cote, G.P., Thomas, D.Y. y Leberer, E.** (1996). Activation of myosin-I by members of the Ste20p protein kinase family. *J Biol Chem* 271, 31787-31790.
- Wu, C., Lytvyn, V., Thomas, D.Y. y Leberer, E.** (1997a). The phosphorylation site for Ste20p-like protein kinases is essential for the function of myosin-I in yeast. *J Biol Chem* 272, 30623-30626.
- Wu, H. y Brennwald, P.** (2010). The function of two Rho family GTPases is determined by distinct patterns of cell surface localization. *Mol Cell Biol* 30, 5207-5217.

-
- Wu, H., Rossi, G. y Brennwald, P.** (2008). The ghost in the machine: small GTPases as spatial regulators of exocytosis. *Trends in Cell Biology* 18, 397-404.
- Wu, H., Turner, C., Gardner, J., Temple, B. y Brennwald, P.** (2010). The Exo70 subunit of the exocyst is an effector for both Cdc42 and Rho3 function in polarized exocytosis. *Mol Biol Cell* 21, 430-442.
- Wu, W.J., Leonard, D.A., R, A.C. y Manor, D.** (1997b). Interaction between Cdc42Hs and RhoGDI is mediated through the Rho insert region. *J Biol Chem* 272, 26153-26158.
- Wurmser, A.E., Sato, T.K. y Emr, S.D.** (2000). New component of the vacuolar class C-Vps complex couples nucleotide exchange on the Ypt7 GTPase to SNARE-dependent docking and fusion. *J Cell Biol* 151, 551-562.
- Xu, H. y Wickner, W.** (2006). Bem1p is a positive regulator of the homotypic fusion of yeast vacuoles. *J Biol Chem* 281, 27158-27166.
- Xue-Franzen, Y., Kjaerulff, S., Holmberg, C., Wright, A. y Nielsen, O.** (2006). Genomewide identification of pheromone-targeted transcription in fission yeast. *BMC Genomics* 7, 303.
- Yakir-Tamang, L. y Gerst, J.E.** (2009). A phosphatidylinositol-transfer protein and phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase control Cdc42 to regulate the actin cytoskeleton and secretory pathway in yeast. *Mol Biol Cell* 20, 3583-3597.
- Yamaguchi, Y., Ota, K. y Ito, T.** (2007). A novel Cdc42-interacting domain of the yeast polarity establishment protein Bem1. Implications for modulation of mating pheromone signaling. *J Biol Chem* 282, 29-38.
- Yamamoto, M., Imai, Y. y Watanabe, Y.** (1997). Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*, in: Pringle, J.R., Broach, J., Jones, E.W. (Eds.), *The Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, pp. 1037-1106.
- Yamashita, M., Kurokawa, K., Sato, Y., Yamagata, A., Mimura, H., Yoshikawa, A., Sato, K., Nakano, A. y Fukai, S.** (2010). Structural basis for the Rho- and phosphoinositide-dependent localization of the exocyst subunit Sec3. *Nat Struct Mol Biol* 17, 180-186.
- Yang, P., Kansra, S., Pimental, R.A., Gilbreth, M. y Marcus, S.** (1998). Cloning and characterization of *shk2⁺*, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* 273, 18481-18489.
- Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X. y Marcus, S.** (2003). The novel Rho GTPase-activating protein family protein, Rga8, provides a potential link between Cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 278, 48821-48830.
- Ydenberg, C.A., Stein, R.A. y Rose, M.D.** (2012). Cdc42p and Fus2p act together late in yeast cell fusion. *Mol Biol Cell* 23, 1208-1218.

- Yeung, T., Gilbert, G.E., Shi, J., Silvius, J., Kapus, A. y Grinstein, S.** (2008). Membrane Phosphatidylserine Regulates Surface Charge and Protein Localization. *Science* 319, 210-213.
- Yu, L., Qi, M., Sheff, M.A. y Elion, E.A.** (2008). Counteractive control of polarized morphogenesis during mating by mitogen-activated protein kinase Fus3 and G1 cyclin-dependent kinase. *Mol Biol Cell* 19, 1739-1752.
- Yu, Y., Kita, A., Udo, M., Katayama, Y., Shintani, M., Park, K., Hagihara, K., Umeda, N. y Sugiura, R.** (2012). Sip1, a Conserved AP-1 Accessory Protein, Is Important for Golgi/Endosome Trafficking in Fission Yeast. *PLoS One* 7, e45324.
- Zaitsevskaya-Carter, T. y Cooper, J.A.** (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J* 16, 1318-1331.
- Zhang, X., Bi, E., Novick, P., Du, L., Kozminski, K.G., Lipschutz, J.H. y Guo, W.** (2001). Cdc42 interacts with the exocyst and regulates polarized secretion. *J Biol Chem* 276, 46745-46750.
- Zhang, X., Orlando, K., He, B., Xi, F., Zhang, J., Zajac, A. y Guo, W.** (2008). Membrane association and functional regulation of Sec3 by phospholipids and Cdc42. *J Cell Biol* 180, 145-158.
- Zhang, X., Wang, P., Gangar, A., Zhang, J., Brennwald, P., TerBush, D. y Guo, W.** (2005). Lethal giant larvae proteins interact with the exocyst complex and are involved in polarized exocytosis. *J Cell Biol* 170, 273-283.
- Zhang, X.M., Ellis, S., Sriratana, A., Mitchell, C.A. y Rowe, T.** (2004). Sec15 is an effector for the Rab11 GTPase in mammalian cells. *J Biol Chem* 279, 43027-43034.
- Zhou, C., Yang, Y. y Jong, A.Y.** (1990). Mini-prep in ten minutes. *BioTechniques* 8, 172-173.
- Ziman, M., O'Brien, J.M., Ouellette, L.A., Church, W.R. y Johnson, D.I.** (1991). Mutational analysis of CDC42Sc, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that encodes a putative GTP-binding protein involved in the control of cell polarity. *Mol Cell Biol* 11, 3537-3544.

No acudieron buitres pues también habían muerto

Sr. Chinarro