



UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

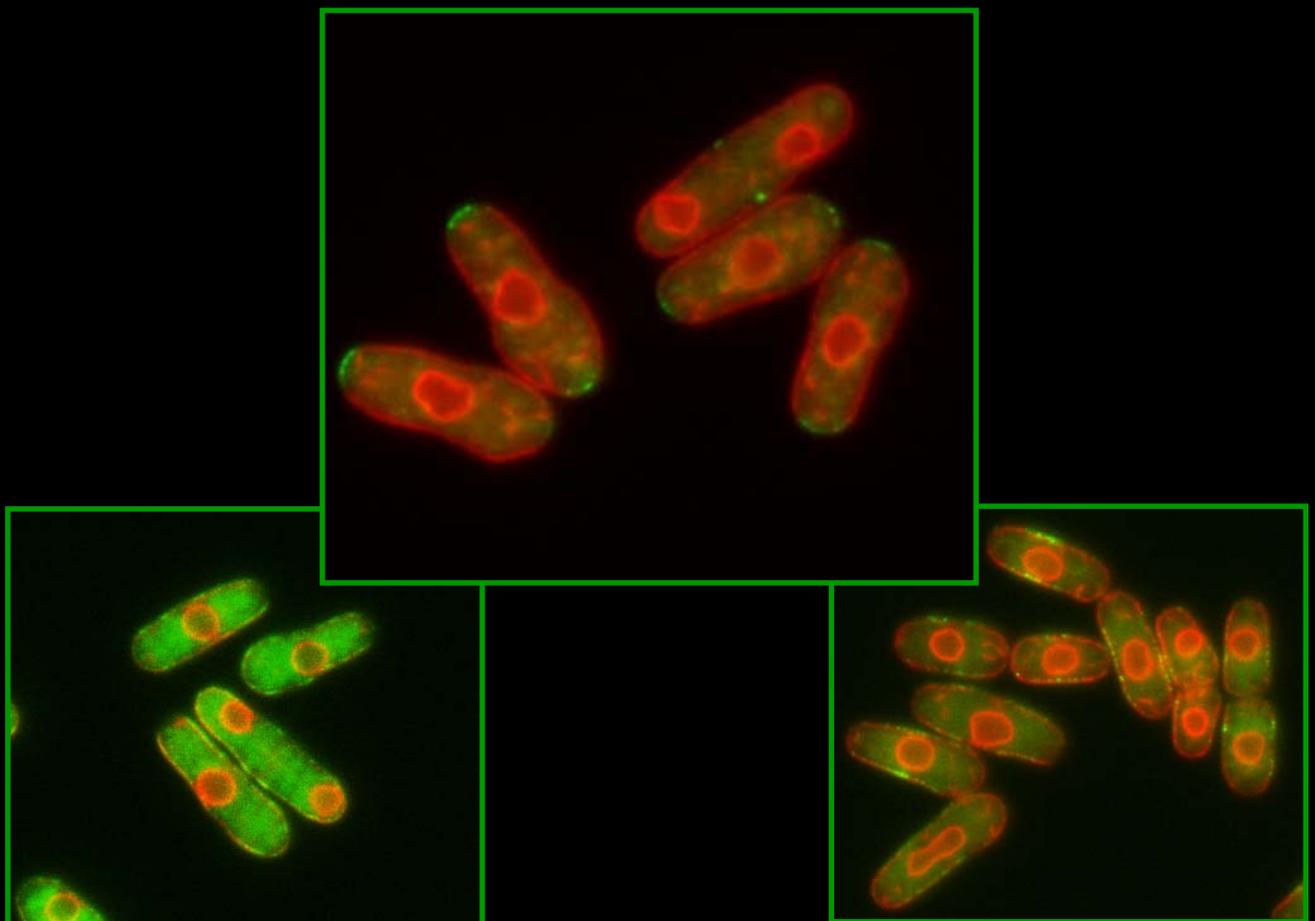
Departamento de Microbiología y Genética

Instituto de Microbiología Bioquímica

(USAL/CSIC)



**Rga2 es un regulador de las GTPasas de la familia Rho
que participa en la morfogénesis y la integridad celular
de *Schizosaccharomyces pombe***



María Antonia Villar Tajadura

2009

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



imb



**Rga2 es un regulador de las GTPasas de la familia
Rho que participa en la morfogénesis y la integridad
celular de *Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada por **María Antonia Villar Tajadura** para
optar al Grado de Doctora en Bioquímica

Salamanca, 2009

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

CERTIFICA:

Que la memoria titulada “**Rga2 es un regulador de las GTPasas de la familia Rho que participa en la morfogénesis y la integridad celular de *Schizosaccharomyces pombe***” presentada por la licenciada **María Antonia Villar Tajadura**, para optar al Grado de **Doctora en Bioquímica**, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. M^a del Pilar Pérez González y la Dra. Beatriz Santos Romero en el centro mixto Instituto de Microbiología Bioquímica (CSIC) / Departamento de Microbiología y Genética (USAL).

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

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri

LA Dra. M^a del PILAR PÉREZ GONZÁLEZ, PROFESORA DE INVESTIGACIÓN DEL CSIC Y LA Dra. BEATRIZ SANTOS ROMERO, PROFESORA CONTRATADA DOCTORA PERMANENTE DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GÉNÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

CERTIFICAN:

Que la licenciada **María Antonia Villar Tajadura** ha realizado el trabajo titulado “**Rga2 es un regulador de las GTPasas de la familia Rho que participa en la morfogénesis y la integridad celular de *Schizosaccharomyces pombe***”, bajo su dirección, en el centro mixto Instituto de Microbiología Bioquímica (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 2009.

Fdo. Dra. M^a del Pilar Pérez González

Fdo. Dra. Beatriz Santos Romero

Gracias a todas las personas que me han ayudado para la realización de este trabajo. En especial, a la Dra. Pilar Pérez por haberme dado la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por dirigir este proyecto, muchas veces complicado, por iniciarme en el mundo científico y por adquirir una formación académica y profesional para mi futuro. A la Dra. Beatriz Santos, le agradezco sus consejos, sus correcciones y su disposición y generosidad en todo lo que le he pedido. Al Dr. Pedro Coll, le tengo que dar todas las gracias por su dedicación hacia mi, su infinita paciencia, su apoyo, sus enseñanzas... Si sé ligar es por ti!! Te debo mucho!!

Realmente ha sido un lujo contar con compañeros como vosotros. Los "PPG" sois inigualables y el ambiente de laboratorio ha sido perfecto. Sergio, te doy mil gracias por las geniales ideas que siempre has aportado al trabajo y por todo lo que he aprendido de ti. Elvira, que íbamos hacer sin tus células competentes! Y calabacines..! A la recién llegada Rosa, gracias por el orden que has puesto a todas mis cepas. Me quedan los babies del grupo, Raúl, gracias por todos los pequeños detalles, aunque pienses que no me doy cuenta y a Miguel, esa música tuya me ha hecho pasar ratos muy divertidos!

A todas las personas que forman parte del IMB y en especial al grupo de Pared (YSM, HVM, CRM, FRI y JRC), muchas gracias por vuestra amabilidad cada día y por la ayuda brindada en momentos de apuros. Al Dr. Ángel Durán, director de este centro, le agradezco su dedicación para que todo funcione bien y su preocupación por nuestra formación científica. Al Dr. Paco Rey, le doy las gracias por ayudarme desinteresadamente en la búsqueda de mi futuro. A la Dra. Henar Valdivieso sólo puedo decirle que gracias por todo! Entre los compañeros quiero nombrar en especial a Patricia, mi prima GEF, por estar siempre dispuesta a enseñarme algún protocolo. A Abi, por todos los conocimientos sobre gradientes de sacarosa. A Talía, eres una PPG más, gracias por esa alegría que impregnas en el laboratorio! A Yoli, por ser como eres. A Laura por ser auténtica. A José Ángel, por su compañía en los momentos de la comida. A todos los "Sing Starleros", por los buenos ratos que me habéis hecho pasar. A los que ya se han ido (Virginia, María, Eva, Inma, Rebeca, Ivone etc.) gracias por vuestros ánimos.

Cada problema que he tenido con algún aparato, Paco Alonso lo ha solucionado al segundo, así que muchas gracias por tu eficacia! A Carmen Castro, eres una gran profesional y mejor persona, mis agradecimientos por tu ayuda. A Carlos Belinchón, sin ti esas muestras de microscopía electrónica no serían lo mismo. A Alegría y Paco Soriano, sin vosotros, los asuntos burocráticos serían demasiado pesados. Al informático loco, Miguel, gracias por ponerme a punto el portátil! A Encarna, sin ti, mis "pombes" no me comerían tan bien!

Indudablemente le tengo que agradecer al Dr. José Cansado su colaboración en este trabajo y su interés por las proteínas con actividad GAP.

A mi familia (Fernando, Gloria, Benita, Mari, M^a Jose, Txema, Paco, Pilar, Pili, Fran, Begoña, Abel, Nerea, Jon y a los que ya se fueron Antonia, Francisco y Víctor) y a mis cinco deditos (Cris, Lore, Leti, Ana y Tomás), les digo que este trabajo es para ellos y que sois lo mejor que tengo.

Seguro que sin vosotros yo no hubiera hecho esta tesis. Gracias a mi padre por apoyarme siempre en todo lo que he hecho, incluido meterme en este mundo. A mi madre, perdón por los malos ratos que te he hecho pasar y gracias por estar ahí SIEMPRE!! Tu apoyo es vida!! Por último, me quedas tú, Mario, esta tesis es igual tuya que mía. Gracias por ser el mejor de los compañeros!!!

A la gente que quiero

ABREVIATURAS

¹⁴C Isótopo radiactivo carbono 14

AA Aminoácido

3AT 3-amino**triazol**

ADN Ácido desoxirribo**n**ucleico

AGS α-glucán sintasa

ARN Ácido ribo**n**ucleico

ATP Adenosina 5'-tri**f**osfato

ARF Factor de ADP-ribosilación (ADP-ribosylat**ion** factor)

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

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

βGS β-glucán sintasa

bp pares de bases

BSA Albúmina sérica bovina (Bovine Seric Albumin)

CDK Quinasa dependiente de ciclina (Cyclin Dependent Kinase)

CFP Proteína azul fluorescente (Cyan Fluorescent Protein)

Ci Curio

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

CWI Ruta MAPK de integridad de pared celular (Cell Wall Integrity)

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

DEP Dominio con homología a Disheveled, EGL-10 y Plecstrina (Disheveled, EGL-10, Pleckstrin)

DH Dominio con homología a Dbl (Dbl Homology)

DIC Contraste diferencial

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

DMSO Dimetil Sulfó**xido**

D.O. Densidad óptica

DTT Ditioneitol

EDTA Ácido etilén diamino tetra-acético

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

EGTA Ácido etilén glicol bis tetra-acético

ENTH Dominio con homología a la región N-terminal de la proteína epsina (epsin N-terminal homology)

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

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

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

GDP Guanosina 5'-difosfato (Guanosine 5' diphosphate)

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

GFP Proteína verde fluorescente (Green Fluorescent Protein)

GST Glutation S transferasa

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

GluTD Dominio glucanosil-transferasa (Glucanosyl-Tranferase-Domain)

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

Abreviaturas

HRP Peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase)
IQGAP Familia de proteínas con dominios IQ (de unión a calmodulina) y GAP
IPTG Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb Kilobase
kDa Kilodalton
Lat A Latrunculina A
LB Medio rico para *E. coli* (Luria-Bertani)
MAP Proteína activada por mitógeno
MAPK Quinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase)
MAPKK MAPK quinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase)
MAPKKK MAPKK quinasa activada por mitógenos (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase)
MBC Metil Benzimidazol Carbamato
Mb Megabase
MEA Medio agar extracto de malta (Malt Extract Agar)
min Minutos
MM Medio mínimo para *S. pombe*
MTOC Centro Organizador de Miotúbulos (Microtubule Organizer Centre)
NETO Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo (New End Take Off)
NP-40 Nonidet P-40
OE. Sobreexpresión de un gen (OverExpression)
OETO Comienzo del crecimiento por el polo celular antiguo (Old End Take Off)
ORF Fase de lectura abierta (Open ReadinG Frame)
PAK Proteína quinasa activadas por p-21 (p21-Activated Kinase)
PBS Tampón fosfato salino (Phosphate-Buffered Saline)
PCR Reacción en cadena de la polimerasa (Polymerase Chain Reaction)
PH Dominio con homología a Plecstrina (Pleckstrin Homology)
PIPES Piperazina bis (ácido 2-etanosulfónico)
PMSF Fluoruro de ortometil fenil sulfonilo
PVDF Fluoruro de polivinilideno
PX Dominio PhoX (PhoX domain)
RBD Dominio de unión a RhoA (RhoA Binding Domain)
RE Retículo Endoplasmático
RFP Proteína roja fluorescente (Red Fluorescent Protein)
rpm revoluciones por minuto
SAPK Proteína quinasa activada por estrés (Stress-activated protein kinase)
SDS Dodecil sulfato sódico
SDS-PAGE Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes
SH3 Dominio con homología a Src3 (Sr3 Homology)
SNARE Soluble N-ethylmaleimide -sensitive fusion attachment protein receptors
SP Septo primario
SPB Cuerpo polar del huso (Spindle Pole Body)
SS Septo secundario
SYN Dominio Sintasa (Synthase)
TAE Tampón Tris-Acético EDTA
TBST Tampón Tris salino con Tween-20 (Tris-Buffered Saline Tween-20)

TCA Ácido Tricloroacético

TGL Dominio Transglicosidasa (Transglycosylase)

TRIS Tris-(hidroximetilamino)-metano

UDP Uridina 5'-difosfato

UV Ultravioleta

vic Viable en presencia de inmunosupresor e ión cloro(Viable in the presence of Immunosuppressant and Chloride ion)

WT Estirpe silvestre (Wild Type)

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

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

YFP Proteína amarilla fluorescente (Yellow Fluorescent Protein)

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

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Morfología y crecimiento polarizado	1
1.1. La levadura de fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
1.2. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	1
1.3. Citoesqueleto y morfogénesis.....	3
1.3.1. El citoesqueleto de microtúbulos.....	3
1.3.2. El citoesqueleto de actina.....	5
1.3.2.1. Los parches de actina.....	5
1.3.2.2. Los cables de actina.....	6
1.3.2.3. El anillo de actomiosina.....	7
1.4. Secreción polarizada.....	7
1.4.1. El exocisto.....	7
1.5. Endocitosis.....	8
2. La pared celular.....	8
2.1. Composición de la pared celular.....	9
2.2. Biosíntesis y regulación de la pared celular.....	10
2.2.1. β -glucano.....	10
2.2.2. α -glucano.....	11
2.2.3. galactomanano.....	13
2.3. Remodelación de la pared celular: glucanosil-transferasas, α y β glucanasas.....	14
3. Las GTPasas de la familia Rho.....	15
3.1. Modificaciones postraduccionales de las proteínas Rho.....	15
3.2. Regulación de las proteínas Rho.....	16
3.3. Funciones de las RhoGAPs.....	19
3.3.1. Morfogénesis y polaridad.....	20
3.3.2. Crecimiento celular y diferenciación.....	20
3.3.3. Endocitosis.....	20
3.3.4. Supresión de tumores.....	21
3.4. Mecanismos de regulación de las RhoGAPs.....	21
3.4.1. Regulación por fosforilación.....	21
3.4.2. Regulación por la unión a lípidos.....	22
3.4.3. Regulación por interacción proteína-proteína.....	22
4. GTPasas de la familia Rho, polaridad y biosíntesis de pared celular en levaduras.....	23

4.1. Las proteínas Rho en <i>S. cerevisiae</i>	23
4.1.1. La GTPasa Rho1.....	23
4.1.2. La GTPasa Cdc42.....	26
4.1.3. La GTPasa Rho2.....	29
4.1.4. Las GTPasas Rho3 y Rho4.....	29
4.1.5. La GTPasa Rho5.....	30
4.2. Las proteínas Rho en <i>S. pombe</i>	30
4.2.1. La GTPasa Rho1.....	30
4.2.1.1. Reguladores de la GTPasa Rho1.....	32
4.2.2. La GTPasa Rho3.....	34
4.2.3. La GTPasa Rho4.....	34
4.2.4. La GTPasa Rho5.....	35
4.2.5. La GTPasa Cdc42.....	35
4.2.5.1. Los reguladores de la GTPasa Cdc42.....	36
4.2.6. La GTPasa Rho2.....	37
4.2.6.1 La ruta MAPK de mantenimiento de la integridad celular	39
OBJETIVOS	43
RESULTADOS	44
APARTADO I: Estudio de la función de la proteína Rga2.....	44
1. Análisis estructural de la proteína Rga2.....	44
2. Rga2 participa en la regulación morfológica y en la integridad celular en <i>S. pombe</i>	45
3. La proteína Rga2 se localiza en las zonas de crecimiento y en el septo	47
4. Análisis del papel de los distintos dominios de la proteína Rga2 en su función y localización.....	49
5. La localización de Rga2 depende de marcadores de polaridad.....	50
6. La localización de Rga2 depende del citoesqueleto de actina.....	51
7. Rga2 se localiza en una fracción subcelular que solapa con la proteína de membrana plasmática Pma1	53
8. Rga2 tiene actividad GAP específica para la GTPasa Rho2.....	54
8.1. Rga2 tiene actividad GAP <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> específica para la GTPasa Rho2.....	54
8.2. Rga2 interacciona físicamente con la GTPasa Rho2.....	58
9. Rga2 regula negativamente la biosíntesis de la pared celular.....	59
9.1. Análisis del papel de Rga2 en la integridad de la pared celular....	59
9.2. Las células <i>rga2Δ</i> presentan defectos en la composición de la pared celular.....	59

9.3. La delección del gen <i>rga2</i> ⁺ suprime parcialmente los defectos de la cepa mutante termosensible <i>mok1-664</i>	61
9.4. Papel de Rga2 en la interacción de Rho2 con la quinasa Pck2....	62
10. Rga2 regula negativamente a la GTPasa Rho2 en la ruta MAPK de integridad celular (Mkh1-Pek1-Pmk1).....	63
10.1. Los genes <i>rho2</i> ⁺ y <i>mkh1</i> ⁺ son epistáticos sobre <i>rga2</i> ⁺	63
10.2. El dominio GAP de Rga2 es necesario para la función de esta proteína en la homeostasis del Cl ⁻	64
10.3. La sobreexpresión de <i>rga2</i> ⁺ causa un descenso en la activación de Pmk1 en respuesta a estrés hiperosmótico.....	66
11. Efectos de otras GAPs sobre la GTPasa Rho2.....	67
12. Rga2 regula la morfología celular independientemente de la GTPasa Rho2.....	68
12.1. Análisis del citoesqueleto de actina en células que sobreexpresan <i>rga2</i> ⁺ y en células <i>rga2</i> Δ.....	68
12.2. Relación de las proteínas For3 y Rga2.....	70
12.3. Rga2 y Rga4 son proteínas con funciones opuestas en la regulación de la morfología celular.....	73
APARTADO II: Estudio de la función de la proteína Rga4.....	75
13. Rga4 es también una proteína con actividad GAP sobre la GTPasa Rho2.....	75
13.1. Rga4 interacciona físicamente y mediante ensayo de doble híbrido con la GTPasa Rho2.....	75
13.2. La proteína Rga4 tiene actividad GAP <i>in vivo</i> sobre la GTPasa Rho2.....	77
13.3. Rga4 regula negativamente la activación de la MAPK de integridad, Pmk1, actuando como GAP de la GTPasa Rho2.....	77
13.4. Rga4 no está involucrada en la regulación de la biosíntesis de la pared celular realizada por la GTPasa Rho2.....	79
APARTADO III: Estudio de la función de la proteína Rga6.....	80
14. Análisis estructural de la proteína Rga6.....	80
15. Rga6 participa en la regulación de la morfología y la integridad celular en <i>S. pombe</i>	81
16. Rga6 se localiza en las zonas de no crecimiento de la célula.....	81
17. Rga6 se localiza en una fracción subcelular que solapa con la proteína de Golgi Pep12.....	83

18. Rga6 es una proteína con actividad GAP para las GTPasas Rho2 y Cdc42.....	84
18.1. Rga6 interacciona con las GTPasas Rho2, Rho3 y Cdc42 mediante el ensayo de doble híbrido.....	84
18.2. Rga6 interacciona físicamente con las GTPasas Rho2 y Rho3	85
18.3. Rga6 tiene actividad GAP <i>in vivo</i> sobre la GTPasa Rho2.....	86
19. Estudio de Rga6 como GAP de Rho2.....	87
19.1. Rga6 regula negativamente a Rho2 en la biosíntesis de la pared celular.....	87
20. Papel de Rga6 en la morfología de <i>S. pombe</i>	89
DISCUSIÓN	93
CONCLUSIONES	105
MATERIALES Y MÉTODOS	106
1. Microorganismos utilizados.....	106
2. Medios de cultivo.....	110
2.1. Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>	110
2.2. Medios de cultivo para <i>S. cerevisiae</i>	111
2.3. Medios de cultivo para <i>E. coli</i>	112
3. Condiciones y estimación de crecimiento.....	112
3.1. Condiciones de crecimiento para <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i>	112
3.2. Condiciones de crecimiento para <i>E. coli</i>	113
4. Detección de la actividad β -galactosidasa en placa.....	113
5. Métodos genéticos.....	113
5.1. Conjugación y obtención de diploides.....	113
5.2. Aislamiento de ascosporas.....	114
5.3. Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: Análisis de tétradas.....	114
6. Procedimientos generales de biología molecular.....	115
6.1. Vectores utilizados.....	115
6.1.1. Vectores de <i>E. coli</i>	115
6.1.2. Vectores de <i>S. pombe</i>	115
6.1.3. Vectores de <i>S. cerevisiae</i>	117
6.2. Obtención de ADN.....	117
6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	117
6.4. Secuenciación de ADN.....	118
6.5. Manipulación de ADN.....	118

6.6. Transformación de <i>E. coli</i>	120
6.7. Transformación de levaduras.....	120
6.8. Deleción de <i>rga2</i> ⁺	120
6.9. Clonación de <i>rga2</i> ⁺	121
6.10. Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo.....	123
6.11. Obtención de las cepas mutantes Rga2 Δ N-GFP, Rga2 Δ PH-GFP, Rga2 Δ GAP-GFP y Rga2 Δ PH Δ GAP-GFP.....	124
7. Análisis de proteínas.....	126
7.1. Obtención de extractos celulares.....	126
7.2. Precipitación e inmunoprecipitación.....	126
7.3. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas.....	126
7.4. Inmunodetección de proteínas.....	127
7.5. Valoración de GTP-Rho.....	128
7.5.1. Producción de GST-C21RBD o GST-CRIB.....	128
7.5.2. Ensayo de unión.....	129
8. Ensayo de la actividad GTPásica.....	129
8.1. Purificación de proteínas fusionadas a GST.....	129
8.2. Medida de la actividad GTPásica.....	130
9. Marcaje y fraccionamiento de los polímeros de la pared celular.....	130
10. Fraccionamiento subcelular por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa.....	131
11. Ensayo de sensibilidad a β -glucanasas.....	132
12. Ensayo de determinación de la actividad de Pmk1 bajo condiciones de estrés hiperosmótico.....	133
13. Técnicas microscópicas y tinciones.....	133
13.1. Microscopía de campo claro: contraste de fases y contraste diferencial (Nomarski).....	134
13.2. Microscopía de fluorescencia.....	134
13.2.1. Fluorescencia directa con GFP.....	134
13.2.2. Tinción de calcoflúor.....	135
13.2.3. Tinción de actina.....	135
13.3. Microscopía electrónica.....	136
14. Análisis bioinformático de los datos.....	136
BIBLIOGRAFÍA	137

INTRODUCCIÓN

1. Morfología y crecimiento polarizado

1.1. La levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*

El organismo modelo utilizado para este trabajo ha sido la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*. Esta levadura, aislada a partir de la cerveza que se fabricaba en el Este de África, fue descrita por primera vez por Lindner en 1893. De hecho, el término *pombe* en swahili significa cerveza (Figura 1). No obstante, la mayoría de las cepas usadas en el laboratorio derivan de una cepa aislada a partir de un zumo de uva con elevadas cantidades de sulfuro, en el sur de Francia en 1921 por A. Osterwalder. Posteriormente, en los años cuarenta, fue Urs Leupold quien caracterizó esta levadura y utilizó este organismo para estudios genéticos.

En las últimas décadas, esta levadura se ha utilizado en investigación básica como modelo para la realización de estudios de polaridad, morfogénesis, citoquinesis y ciclo celular ya que su forma, tamaño y división celular son extremadamente reproducibles en el laboratorio, lo cual permite la identificación de mutantes con defectos morfológicos, con tamaño celular aberrante o con patrón de división diferente al de la cepa silvestre (Chang, 2001).

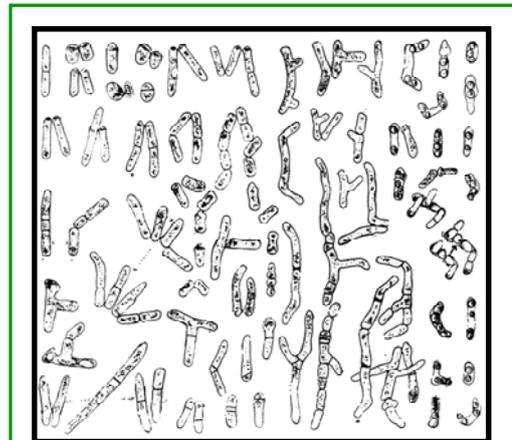


Figura 1. Dibujo descriptivo de la morfología de *S. pombe* realizado por Lindner. Tomado de <http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/history/lindner2.html>.

1.2. Ciclo de vida de *S. pombe*

S. pombe es un microorganismo haplodiplobionte con 13,8 Mb de ADN, que codifica 4.824 genes englobados en tres cromosomas.

Las células de *S. pombe* en crecimiento vegetativo tienen morfología 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 antes del proceso de división celular. Estas células crecen apicalmente, activando el crecimiento de uno o de los dos polos, dependiendo del momento del ciclo en el que se encuentren. Al comienzo del ciclo celular, las células activan el crecimiento únicamente en el polo heredado de la célula madre (polo antiguo; OETO, Old End Take Off). Posteriormente, al inicio de la fase G2, se activa el crecimiento del polo originado como consecuencia de la división celular anterior (polo nuevo), en el proceso denominado NETO (New End Take Off) y, como consecuencia de ello, las células adquieren un patrón de cre-

cimiento bipolar. Este proceso es dependiente del tamaño celular (Mitchison and Nurse, 1985). Cuando la célula entra en mitosis, se detiene el crecimiento de los polos, y se dirige a la región central de la célula, donde se ensambla un anillo de actomiosina. Al final de la mitosis, los núcleos se separan. Tras este proceso, tiene lugar la contracción del anillo de actomiosina, que está coordinada con la adición de nuevas membranas y síntesis de material de pared celular, que permitirá la formación de un septo. Seguidamente por acción de enzimas degradativas se produce la separación física de las dos células hijas (Figura 2).

La fase haploide es la que normalmente predomina en el ciclo biológico de *S. pombe* y presenta dos tipos sexuales denominados h^+ y h^- . Cuando dos células haploides de tipo sexual opuesto se encuentran en un medio pobre en nutrientes, comienza el proceso de conjugación. Primero tiene lugar la formación del *shmoo* o proyección de conjugación, posteriormente la fusión de las células y por último se forma el cigoto mediante la fusión de los núcleos o cariogamia. Normalmente, los cigotos diploides sufren meiosis, y los cuatro núcleos resultantes son rodeados de membrana y pared celular dando lugar a un asca con cuatro ascosporas (Figura 2). Cuando las condiciones del medio son las adecuadas, la espora forma un tubo germinativo, y, finalmente, da lugar a una célula haploide. El cigoto puede mantener un ciclo vegetativo diploide si se transfiere a un medio rico en nutrientes (Figura 2).

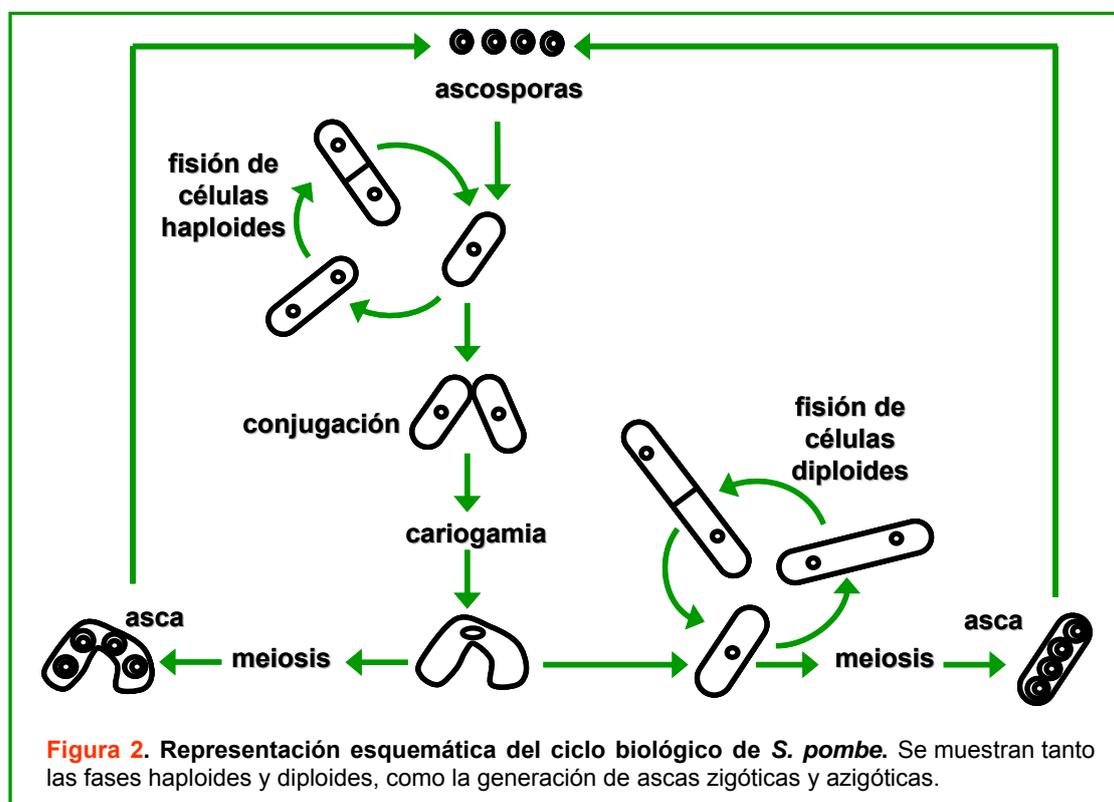


Figura 2. Representación esquemática del ciclo biológico de *S. pombe*. Se muestran tanto las fases haploides y diploides, como la generación de ascas zigóticas y azigóticas.

1.3. Citoesqueleto y morfogénesis

A lo largo del ciclo de vida de *S. pombe*, se producen una serie de cambios en el citoesqueleto de microtúbulos y de actina, importantes para llevar a cabo los procesos de crecimiento polarizado, mitosis, citoquinesis y pared celular. Además estos cambios están íntimamente ligados a la progresión del ciclo celular (Figura 3).

1.3.1. El citoesqueleto de microtúbulos

El citoesqueleto de microtúbulos es imprescindible para el mantenimiento de la polaridad y para el control de la posición del núcleo (Chang, 2001; Hayles and Nurse, 2001; Verde, 1998).

Los microtúbulos durante la mitosis forman el huso mitótico intranuclear y en células en interfase se organizan en 4 o 5 haces anti-paralelos que recorren el eje longitudinal de la célula (Hagan, 1998; Hagan and Hyams, 1988). Estos haces presentan dos extremos: el positivo (+) y el negativo (-). El extremo (+) se sitúa próximo al polo celular y el (-) hacia el núcleo. Estos haces de microtúbulos comienzan en la membrana nuclear y cre-

cen por su extremo (+) hasta contactar con el córtex de la célula, sufriendo posteriormente catástrofe (Drummond and Cross, 2000; Tran *et al.*, 2001).

En *S. pombe* los microtúbulos son necesarios para mantener la forma celular y establecer el eje longitudinal de crecimiento. El tratamiento con compuestos inhibidores de los microtúbulos o mutaciones en los genes de la tubulina, causan defectos en la localización del crecimiento dando lugar a células curvadas o ramificadas (Hirata *et al.*, 1998; Radcliffe *et al.*, 1998; Sawin and Nurse, 1998).

El estudio de cepas afectadas en la forma celular ha permitido la identificación de varias moléculas necesarias para el establecimiento del crecimiento polarizado y manteni-

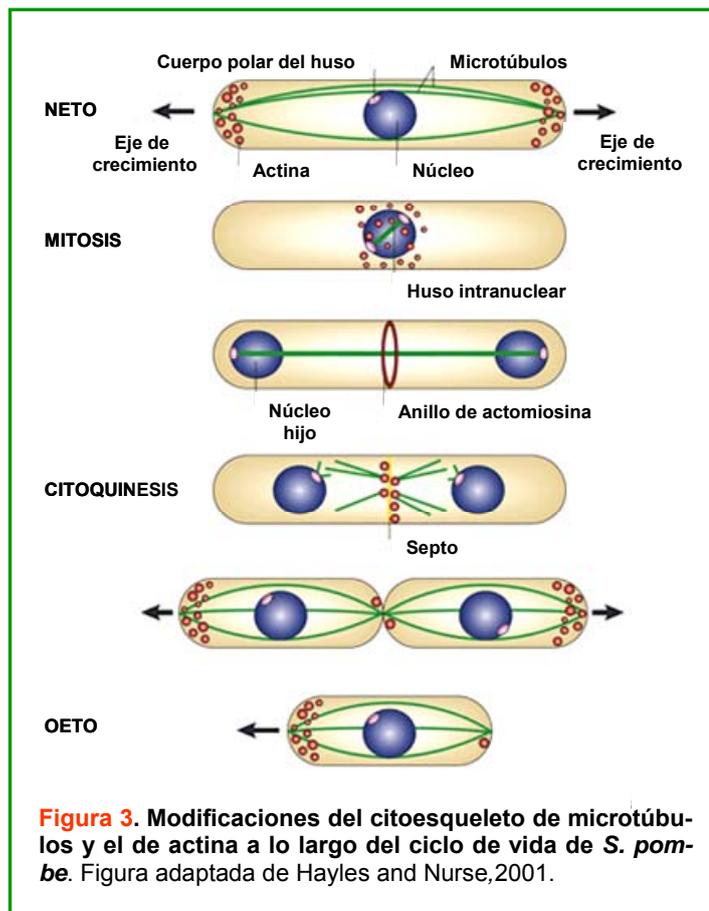
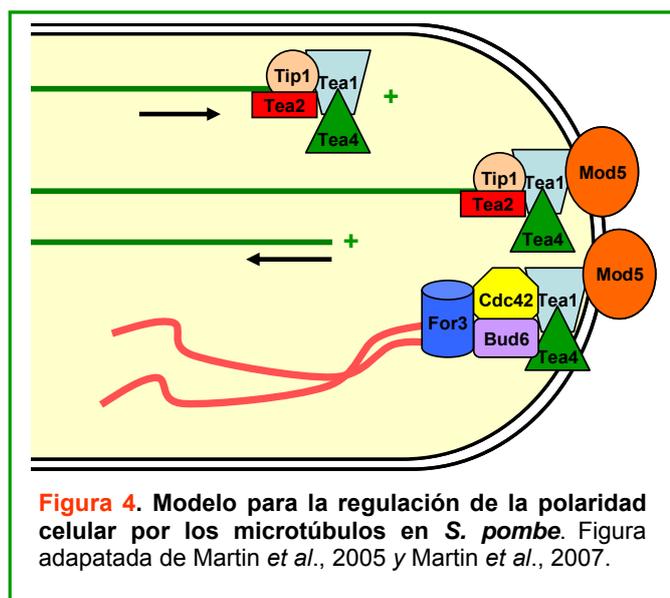


Figura 3. Modificaciones del citoesqueleto de microtúbulos y el de actina a lo largo del ciclo de vida de *S. pombe*. Figura adaptada de Hayles and Nurse, 2001.

miento del eje longitudinal de crecimiento en *S. pombe* (Hayles and Nurse, 2001). Se ha descrito que los microtúbulos transportan de manera polarizada estas proteínas implicadas en el marcaje de los puntos de crecimiento activos de la célula, como son Tea1, Tea2, Tea3, Tea4, Tip1, o Pom1 (Mata and Nurse, 1997; Browning *et al.*, 2000; Arellano *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2005; Brunner and Nurse, 2000; Bähler and Pringle, 1998b). Tea1, es una proteína con similitud a las proteínas Kelch de *Drosophila* y Ezrina de mamíferos y fundamental para marcar los sitios de crecimiento de la célula en *S. pombe*. Las células carentes de *tea1*⁺ tienen defectos en NETO por lo que son mayoritariamente monopolares. Si bien, en determinadas circunstancias estas células adquieren forma de “T” estableciendo nuevos puntos de crecimiento (Mata and Nurse, 1997). Tea2, es una quinesina que participa en el transporte de Tea1 a lo largo de los microtúbulos hacia el extremo (+) de los mismos (Browning *et al.*, 2003; Browning *et al.*, 2000). Tip1 es una proteína similar a CLIP-170 que viaja junto con Tea1 por los microtúbulos y es necesaria para que éstos no sufran catástrofe en zonas del córtex inadecuadas (Brunner and Nurse, 2000). Para depositar correctamente a Tea1 en los polos celulares, además de las proteínas Tea2 y Tip1 es necesaria una molécula denominada Mod5. Esta proteína está asociada a la membrana mediante un grupo farnesilo e interacciona con Tea1 para que ésta se localice de manera adecuada en los extremos celulares al soltarse de los microtúbulos (Snaith and Sawin, 2003). En células silvestres, Tea1 se encuentra localizada en ambos polos de la célula de manera independiente al patrón de crecimiento celular (monopolar o bipolar). Se han propuesto dos mecanismos distintos de regulación de la localización de Tea1 en el polo de crecimiento o en el polo que no está creciendo. Cuando Tea1 se localiza en el polo de no crecimiento, Tea3, una proteína relacionada estructuralmente con Tea1, mantiene la localización de Tea1 en este extremo (Arellano *et al.*, 2002; Snaith and Sawin, 2003). En el polo de crecimiento, Tea3 no ejercería esta regulación y sería Tea4, una proteína con un dominio SH3, la que además de interactuar con Tea1 serviría de puente para poner en contacto a Tea1 y For3, la formina responsable de la formación de cables de actina y en definitiva del crecimiento polarizado (Martin *et al.*, 2005) (Figura 4).



El mecanismo por el cual Tea1 activa el crecimiento polarizado actualmente se desconoce, pero se ha sugerido que la unión de Tea1 con Tea4 y For3 podría facilitar la formación de un complejo con un activador para la formina que podría ser Cdc42 (Martin *et al.*, 2007). Se ha propuesto que Pom1 podría actuar por debajo de Tea1, conectando la señalización de los microtúbulos con la actina y así emprender el crecimiento polarizado. Pom1 es una quinasa necesaria para el mantenimiento de simetría durante el crecimiento y la división celular (Bähler and Pringle, 1998b). Es transportada a los polos por los microtúbulos y necesita a Tea1 y Tea4 para localizarse correctamente. Las células *pom1*Δ son monopolares y además tienen mal posicionado el septo de división (Celton-Morizur *et al.*, 2006; Padte *et al.*, 2006). (Figura 4)

Otra proteína que participa en la localización del crecimiento polarizado y es transportada por los microtúbulos es Bud6, una proteína que interacciona con la actina, con Tea1 y con For3 (Feierbach *et al.*, 2004; Glynn *et al.*, 2001). La cepa *bud6*Δ es parcialmente monopolar, presenta una deslocalización parcial de For3 y tiene un citoesqueleto de actina con cables más débiles que las células silvestres (Feierbach *et al.*, 2004).

1.3.2. El citoesqueleto de actina

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 este proceso se inhibe cuando llevamos a cabo el experimento en presencia de citocalasina D (un inhibidor de la polimerización de la actina) (Kobori *et al.*, 1989).

En *S. pombe* el citoesqueleto de actina se organiza en tres estructuras bien definidas: parches de actina y cables de actina durante interfase y anillo contráctil de actomiosina durante la división celular.

1.3.2.1. Los parches de actina

Los parches de actina son filamentos cortos y ramificados de actina (Moseley and Goode, 2006). El complejo Arp2/3 (actin-related-protein) junto con las proteínas activadoras Wsp1 y la miosina Myo1 (Sirotkin *et al.*, 2005), son los encargados de regular la polimerización de los parches, y son fundamentales para la integridad y movilidad de los mismos. Además de estas proteínas existen otros factores implicados en la regulación de los parches de actina: la profilina, que es una proteína de unión a actina implicada en la polimerización y nucleación de los filamentos de actina; la coronina, que está asociada a los parches, y determina la extensión de los filamentos de actina; y la cofilina, que se une a estos filamentos e induce la ruptura de los mismos (Humphries *et al.*, 2002; Moseley and Goode, 2006).

Los parches de actina se han relacionado con procesos endocíticos, ya que muchos componentes de los parches fueron identificados en *screenings* de mutantes deficientes en endocitosis (Moseley and Goode, 2006) y colocalizan con componentes de vesículas endocíticas (Liu *et al.*, 2006). De todos modos, no se puede excluir una posible función de los parches de actina en exocitosis, ya que algunos mutantes de componentes de los parches muestran acumulaciones de vesículas post-Golgi (Moseley and Goode, 2006).

1.3.2.2. Los cables de actina

Los cables de actina están formados por filamentos cortos de actina que se organizan en haces polarizados a lo largo de la célula. La polimerización de los cables es independiente del complejo Arp2/3 (Moseley and Goode, 2006) y depende de la formina For3 y de la tropomiosina Cdc8 (Feierbach and Chang, 2001; Martin and Chang, 2006), una proteína que estabiliza los filamentos de actina e influye en su interacción con las miosinas (Balasubramanian *et al.*, 1992; Skoumpla *et al.*, 2007).

For3 es la formina de *S. pombe* responsable de la formación de cables de actina en interfase (Feierbach and Chang, 2001; Sawin, 2002). Al igual que otras forminas, For3 posee un mecanismo de autoinhibición a través de la interacción de sus dominios DID y DAD (Martin *et al.*, 2007). Recientemente se ha demostrado que la GTPasa Cdc42 y la proteína Bud6 son necesarias para eliminar esta autoinhibición y conseguir que la formina se localice y se active correctamente en los polos celulares (Martin *et al.*, 2007).

Los cables que sintetiza For3 no son esenciales para la célula, ya que la cepa *for3Δ* es viable. Sin embargo, estos cables son importantes para el crecimiento polarizado, porque promueven junto con las miosinas de clase V, los movimientos de las vesículas secretoras que proporcionan los materiales necesarios para las zonas de crecimiento activo (Motegi *et al.*, 2001; Mulvihill *et al.*, 2006).

Las miosinas de clase V son proteínas motoras que se asocian a los filamentos de actina y están implicadas en el transporte de vesículas. En *S. pombe* existen dos miosinas de clase V, denominadas Myo51 y Myo52. Esta última está implicada en la localización y anclaje a la membrana de las vesículas que transportan material para la síntesis de la pared celular (Mulvihill *et al.*, 2006).

Además de For3, en la levadura de fisión existen otras dos forminas, Fus1 y Cdc12. Fus1 está relacionada con el proceso de fusión celular durante la conjugación (Petersen *et al.*, 1998) y Cdc12 es esencial en la nucleación de actina del anillo de actomiosina durante la división celular (Chang *et al.*, 1997).

1.3.2.3. El anillo de actomiosina

Es una estructura esencial para la división celular que esta formada por filamentos de actina y miosina de tipo II (Balasubramanian *et al.*, 2004). Se ensambla en la región media de la célula y tiene la capacidad de contraerse coordinadamente con el proceso de citoquinesis.

1.4. Secreción polarizada

Para llevar a cabo el crecimiento polarizado es necesaria una secreción polarizada y bien regulada para que a través de las vesículas de secreción se incorpore nuevo material de membrana (lipídico y proteico) en las zonas de crecimiento activo de la célula. Este proceso se denomina exocitosis e implica varios pasos:

- A. Generación de vesículas en el retículo endoplasmático que contienen proteínas que, cuando alcanzan el plegamiento correcto, son transportadas al aparato de Golgi donde tiene lugar la maduración de las mismas.
- B. Transporte de las vesículas desde el aparato de Golgi a la membrana plasmática. Se produce a través de los cables de actina y las miosinas de clase V que actúan como motor. Las vesículas se transportan hacia las regiones de membrana donde se produce el crecimiento activo de la célula.
- C. Interacción de las vesículas de secreción con la membrana plasmática. En este proceso interviene el complejo del exocisto que se describirá a continuación.
- D. Fusión de las membranas de las vesículas con la membrana plasmática y exportación de los materiales necesarios para el crecimiento activo. En este proceso participan las proteínas que forman el complejo SNARE (Jahn and Scheller, 2006). Estos complejos se denominan v-SNAREs (proteínas localizadas en la membrana de las vesículas) y t-SNARE (proteínas localizadas en la membrana plasmática). La interacción específica de v-SNARE con t-SNARE permite que cada clase de vesícula se fusione específicamente al lugar adecuado de la membrana.

1.4.1. El exocisto

Es un complejo multiproteico, conservado a lo largo de la evolución e involucrado en el transporte y fusión de vesículas procedentes del aparato de Golgi en sitios concretos de la membrana plasmática (Hsu *et al.*, 1999; Hsu *et al.*, 2004). La actividad de este complejo la

controlan GTPasas de la familia Ral, Rab y Rho (Lipschutz and Mostov, 2002; Novick and Guo, 2002). En *S. pombe* el exocisto está formado por cinco subunidades que interaccionan físicamente entre sí: Sec6, Sec8, Sec10, Sec15 y Exo70 (Wang *et al.*, 2002). Todas, excepto la subunidad Exo70, son esenciales. Las cepas mutantes termosensibles en estas proteínas son defectuosos en la degradación del septo y la falta de actividad de este complejo provoca un defecto de secreción.

1.5. Endocitosis

Se ha propuesto que la endocitosis es un proceso que compensa la exocitosis (Pruyne and 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 reciclaje de proteínas y lípidos en las zonas de crecimiento activo (Gachet and Hyams, 2005).

2. La pared celular

La pared celular es una estructura externa a la membrana plasmática que poseen las plantas, los hongos y las bacterias. Esta compuesta fundamentalmente por polímeros de glucosa de estructura fibrilar y para estos organismos es vital ya que les permite soportar la presión osmótica originada por la elevada concentración de sustancias disueltas en el interior celular y actúa de barrera protectora ante daños producidos por el medio externo. Además, 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, 1998a).

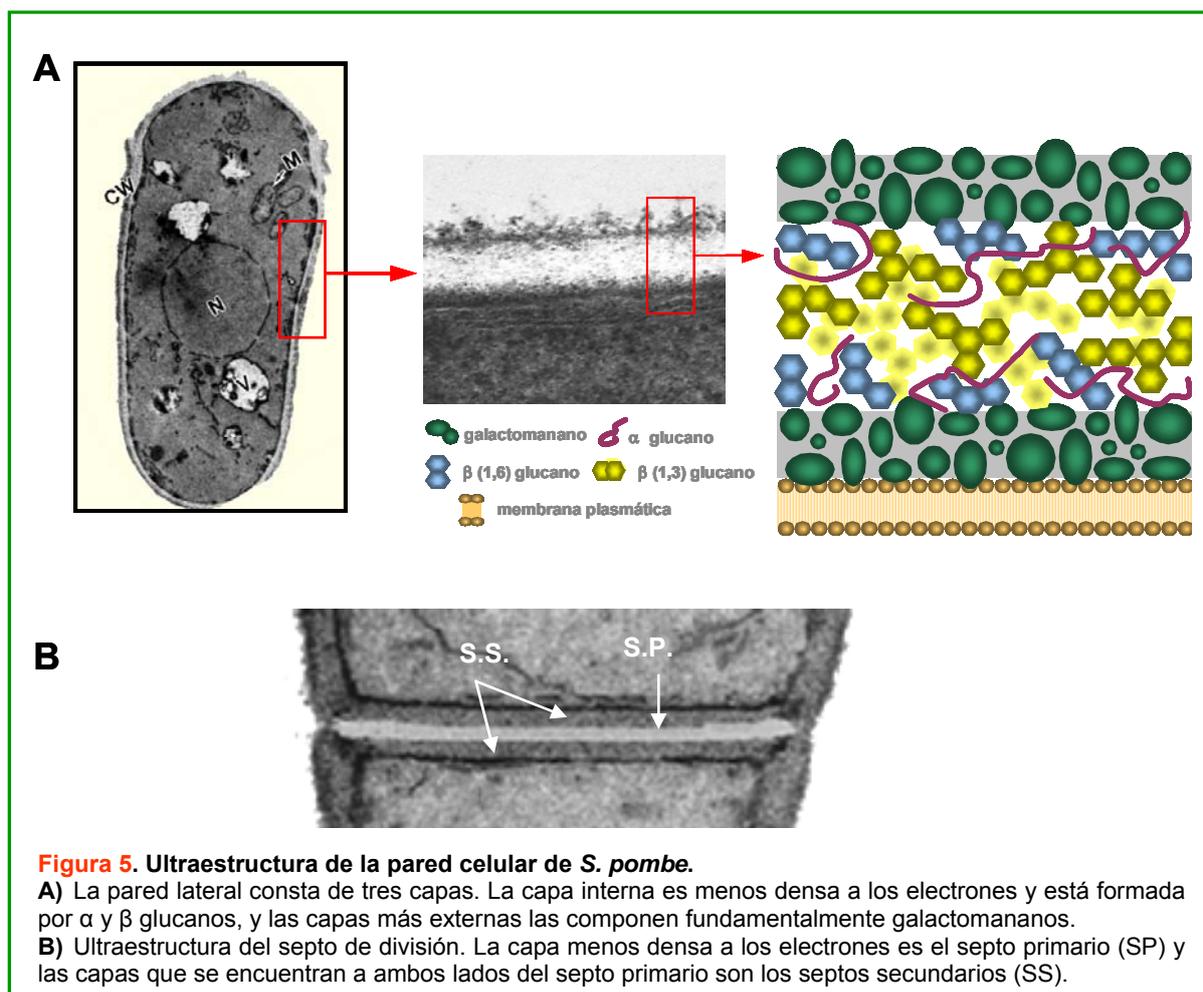
El estudio de la pared celular fúngica es importante a nivel terapéutico, para la búsqueda de nuevas dianas que permitan el desarrollo de fármacos con actividad antifúngica. La gran importancia de la pared en este campo reside en que está ausente en células superiores y es vital para los hongos y levaduras. El conocimiento detallado de esta estructura permitiría utilizar nuevas vías terapéuticas en el campo de las infecciones fúngicas.

Además, la pared celular es importante en estudios de morfogénesis y polaridad celular ya que, a pesar de la rigidez causada por los polímeros fibrilares, 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. Para que se puedan llevar a cabo las modificaciones de la pared, manteniendo la integridad celular, es necesaria una coordinación fina entre el ciclo celular, el crecimiento y la biosíntesis/degradación de la pared celular.

2.1. 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 y alrededor de un 15 % de galactomanoproteínas (Humbel *et al.*, 2001; Magnelli *et al.*, 2005; Manners and Meyer, 1977; Sugawara *et al.*, 2003).

La pared celular de *S. pombe*, al microscopio electrónico de transmisión, se observa como una estructura trilaminar, con dos capas externas densas a los electrones y una capa interna menos densa compuesta principalmente por α y β -glucanos (Humbel *et al.*, 2001; Osumi, 1998b) (Figura 5A). El α -(1,3)-glucano se ha situado en regiones adyacentes a la membrana celular (Sugawara *et al.*, 2003). Usando lectinas específicas, el galactomanano se localizó en las dos capas más densas a los electrones (Horisberger and Rouvet-Vauthey, 1985). El septo de división está muy organizado y presenta una capa interna me-



nos densa a los electrones denominada septo primario, que está compuesta fundamentalmente por β -(1,3)-glucano y a ambos lados se sitúan los dos septos secundarios de composición similar a la pared celular (Humbel *et al.*, 2001; Sugawara *et al.*, 2003) (Figura 5B).

2.2. Biosíntesis y regulación de la pared celular

2.2.1. 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 exclusivo del septo primario (Humbel *et al.*, 2001). (Figura 6)

B. *β -(1,3)-glucano con ramificaciones β -(1,6)*: Es el componente más abundante de los β -glucanos y lo componen cadenas lineales con residuos de glucosa unidos por enlaces 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, 1998a). Su localización se extiende por toda la pared celular y en el septo tanto primario como secundario (Humbel *et al.*, 2001). (Figura 6)

C. *β -(1,6)-glucano muy ramificado*: Está constituido por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces β -(1,6) que contienen frecuentes ramificaciones en β -(1,3) (Manners and Meyer, 1977). Es un componente minoritario en la pared celular y recientemente 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). (Figura 6)

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⁺* (*bgs* de 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.*, 2000a). 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).

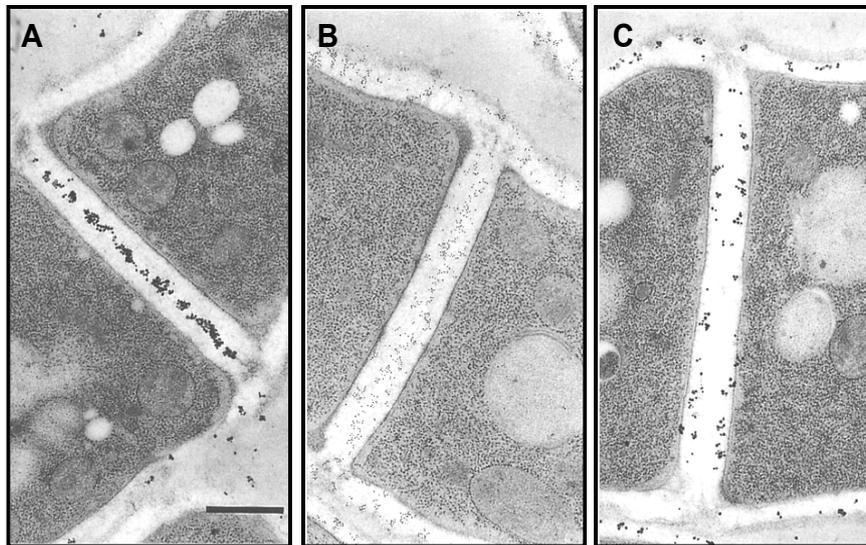


Figura 6. Inmunolocalización de los distintos tipos de β -glucano de la pared celular de *S. pombe*. Se desarrollaron anticuerpos específicos contra β -(1,3)-glucano lineal (A), β -(1,3)-glucano ramificado en β -(1,6) (B) y β -(1,6)-glucano muy ramificado (C). Los anticuerpos se conjugaron con oro coloidal para detectarlos al microscopio electrónico de transmisión (Imágenes tomadas de Humbel *et al.*, 2001).

2.2.2. α -glucano

El α -glucano es un polímero de unidades de glucosa unidas por enlaces α -(1,3) (los más abundantes) con una pequeña proporción de enlaces α -(1,4) (Manners and 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 (Grün *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 si llegan a formar fibrillas (Horisberger and Rouvet-Vauthey, 1985; Konomi *et al.*, 2003).

La enzima responsable de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular, denominada α -glucán sintasa (AGS), sólo se ha caracterizado parcialmente. Se han identificado varios genes en *S. pombe* que codifican posibles subunidades catalíticas de la α -glucán sintasa (AGS), 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.*, 2006b).

La proteína Mok1 es una proteína integral de membrana de 272 kDa y 2.410 aminoácidos. Existen varias evidencias de que Mok1 sea una de las enzimas implicadas en la biosíntesis del α -glucano. El mutante termosensible *mok1-664* tiene reducida su pared celular, concretamente el α -glucano, a temperatura restrictiva. Por otro lado, la sobreexpresión de Mok1 es letal y causa un aumento de α -glucano en la célula. (Katayama *et al.*, 1999). Mok1 muestra similitud con proteínas involucradas en el metabolismo del glucógeno (Hochstenbach *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999) y contiene cinco dominios estructurales enumerados desde la región N-terminal a la C-terminal:

- A. Una secuencia señal, que conduce a la proteína hacia la vía secretora.
- B. Dominio extracelular (TGL) de unos 1.000 aminoácidos, que presenta homología con las α -amilasas (enzimas que catalizan la hidrólisis de enlaces α -(1,4) o α -(1,6)).
- C. Región transmembrana de unos 20 aminoácidos, que hace de conexión entre los dominios intracelular y extracelular.
- D. Dominio intracelular (SYN) de aproximadamente 1.000 aminoácidos, que muestra homología con las glucógeno-sintasas bacterianas y las almidón-sintasas vegetales.
- E. Dominio transmembrana, de unos 400 aminoácidos. Contiene 12 motivos que atraviesan la membrana plasmática.

El dominio intracelular produciría cadenas de α -glucano. Estos polímeros se transportarían a través de la membrana gracias a su dominio transmembrana, que actuaría como un poro. Cuando el α -glucano se localizase en la zona exterior, sería el dominio extracelular el que conectaría las cadenas de α -glucano con los demás componentes de la pared celular. Por tanto, esta posible enzima realizaría tres funciones: síntesis, transporte y remodelación del α -glucano (Hochstenbach *et al.*, 1998).

Recientemente se ha descrito que el dominio intracelular es capaz de sintetizar α -(1,4)-glucano, ya que la ausencia de *mok1*⁺ o mutaciones en este dominio producen un descenso de este polímero, mientras que la sobreexpresión de la proteína completa o del dominio SYN provoca una acumulación de α -(1,4)-glucano (Vos *et al.*, 2007). Estos investigadores proponen un nuevo modelo, en el que existiría una enzima no identificada hasta el momento que sería la responsable de la síntesis de la fracción α -(1,3)-glucano. El α -(1,4)-glucano lo sintetizaría el dominio SYN y este polisacárido serviría de cebador para la elongación llevada a cabo por otra hipotética y desconocida α -(1,3)-glucán sintasa. Una vez sintetizado todo el conjunto, éste se transportaría a través de la membrana mediante el dominio transmembrana de Mok1. Posteriormente, cuando ya se localizara en la zona extracelular, entonces se llevaría a cabo la remodelación del polímero por el dominio TGL de

Mok1. Esto daría lugar al α -glucano maduro que estaría preparado para incorporarse al resto de componentes de la pared celular (Vos *et al.*, 2007).

Mok1 se localiza en los polos de crecimiento y en el septo y esta localización es dependiente de actina (Katayama *et al.*, 1999; Konomi *et al.*, 2003). La GTPasa Rho2 y la quinasa Pck2 participan en la regulación y localización de Mok1 en los polos celulares (Calonge *et al.*, 2000; Durán and Pérez, 2004; Katayama *et al.*, 1999). La cepa mutante doble *rho2 Δ mok1-664* presenta letalidad sintética, de manera similar a *pck2 Δ mok1-664*. La sobreexpresión de *mok1⁺* es letal en células silvestres y deja de serlo en las células *rho2 Δ* , donde además la cantidad de α -glucano disminuye respecto a la sobreexpresión de *mok1⁺* en las células silvestres (Calonge *et al.*, 2000). 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 o a través de Pck2 y Pck1 (Arellano *et al.*, 1999a; 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 como ejerce esta regulación.

2.2.3. Galactomanano

El galactomanano de la pared de *S. pombe* representa del 9 al 14 % del total de los azúcares de la pared celular. Son polímeros de naturaleza glicoproteica que se encuentran formados 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 and Vonlanthen, 1977). El galactomanano se asocia covalentemente con proteínas de la pared mediante enlaces N- y O-glicosídicos. Posteriormente estas proteínas asociadas son liberadas al espacio periplasmático y son atrapadas en la matriz de glucanos de la pared celular (Gemmill and 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 and Rouvet-Vauthey, 1985).

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/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 produce posteriormente en el aparato de Golgi (Gemmill and Trimble, 2004).

Recientemente se han caracterizado varios genes *oma* (*oma1*⁺, *oma2*⁺ y *oma4*⁺) que codifican O-manosil-transferasas en *S. pombe*. La falta de actividad de estas proteínas provoca en la célula un descenso de O-manosilación que hace que se produzcan defectos graves en la pared celular y en la formación del septo (Willer *et al.*, 2005). También se han identificado otros genes implicados en la glicosilación de las proteínas de la pared celular, como Gmd3. Las células carentes de esta proteína presentan un descenso de residuos de manosa y galactosa en la superficie de las galactomanoproteínas (Umeda *et al.*, 2000).

2.3. 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, estos 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 and Vai, 1999). En *S. pombe* existen 4 genes denominado *gas1*⁺, *gas2*⁺, *gas4*⁺ y *gas5*⁺ que codifican para este tipo de proteínas. Recientemente, se ha descrito que Gas4 está involucrada en la maduración de la pared de la ascospora y en su viabilidad (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 glucanasas: 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-Núñez *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). Recientemente se ha descrito que Eng2, junto con Agn2, está implicada en la degradación de la pared del asca, favoreciendo su liberación (Encinar del Dedo *et al.*, 2009).

3. Las GTPasas de la familia Rho

Las GTPasas de la familia Rho constituyen un subgrupo de la superfamilia de las proteínas G pequeñas. Son moléculas monoméricas con una masa molecular que puede variar entre 20 y 40 kDa. Están altamente conservadas en todos los eucariotas donde participan en funciones importantes dentro de la célula como la regulación de los citoesqueletos de actina y microtúbulos, la regulación de la polaridad celular, del tráfico de vesículas, del ciclo celular y de la expresión génica, etc. (Bustelo *et al.*, 2007; Jaffe and Hall, 2005).

Estas proteínas tienen la capacidad de unir nucleótidos de guanina (GDP o GTP) y además poseen actividad GTPásica intrínseca, que permite hidrolizar el GTP al que se encuentran unidas, dando lugar a GDP y fosfato inorgánico (Bourne *et al.*, 1991).

La subfamilia Rho (Ras homologous) está constituida por al menos 20 miembros, pero los más estudiados son RhoA, Rac1 y Cdc42. RhoA participa en la formación de fibras de estrés de actina y en el ensamblaje de focos de adhesión. Rac1 promueve la formación de lamelipodios y el *ruffling* de la membrana y Cdc42 activa la formación de filopodios. Estos estudios han permitido implicar a las proteínas Rho en la regulación de la polaridad, motilidad, morfogénesis, endocitosis, exocitosis e interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular. Dado la extensa variedad de procesos en los que se ven implicadas, estas moléculas necesitan estar finamente reguladas por un gran número de factores (Wennerberg *et al.*, 2005).

3.1. Modificaciones postraduccionales de las proteínas Rho

Las proteínas G de pequeño tamaño molecular necesitan determinados cambios postraduccionales para dirigirse y anclarse a las estructuras membranosas donde van a desempeñar sus funciones. En general estos cambios tienen lugar en el extremo C-terminal de estas proteínas y consisten en la incorporación de grupos isoprenoides seguida de una proteólisis que 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:

- A. Si el extremo C-terminal es Cys-A-A-X, siendo A un aminoácido alifático y X un aminoácido cualquiera, se produce la incorporación de un grupo farnesilo en la cisteína por la farnesiltransferasa I, posteriormente se produce la proteólisis del grupo A-A-X y la carboximetilación de la cisteína (Wennerberg *et al.*, 2005).
- B. 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).

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

3.2. Regulación de las proteínas Rho

Las proteínas Rho muestran una alta afinidad por la unión con 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:

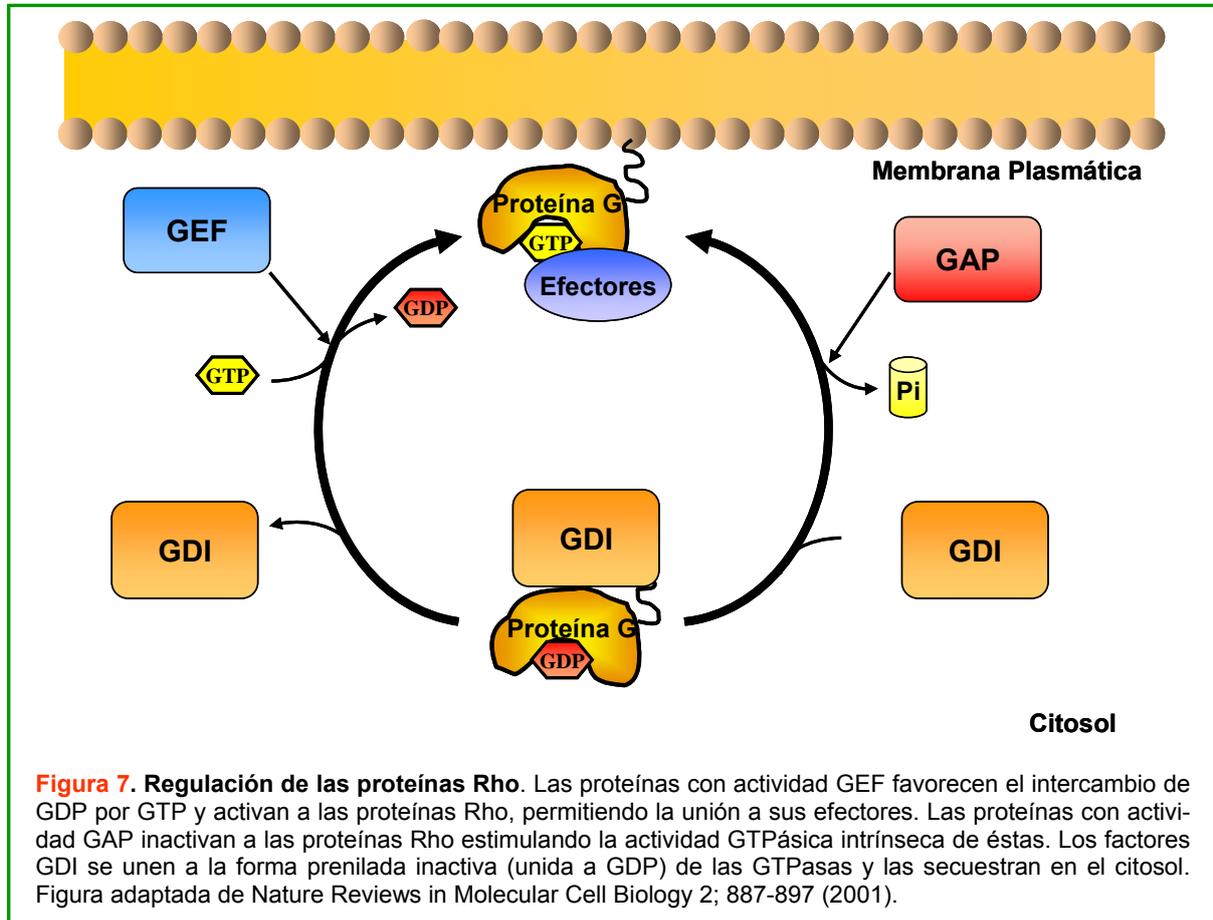


Figura 7. Regulación de las proteínas Rho. Las proteínas con actividad GEF favorecen el intercambio de GDP por GTP y activan a las proteínas Rho, permitiendo la unión a sus efectores. Las proteínas con actividad GAP inactivan a las proteínas Rho estimulando la actividad GTPásica intrínseca de éstas. Los factores GDI se unen a la forma prenilada inactiva (unida a GDP) de las GTPasas y las secuestran en el citosol. Figura adaptada de Nature Reviews in Molecular Cell Biology 2; 887-897 (2001).

A. 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 7). Estos GEFs interactúan con la forma unida a GDP de la GTPasa y provocan la disociación del nucleótido que, posteriormente, es sustituido por GTP (Vetter and Wittinghofer, 2001). El sitio de unión de nucleótidos de guanina se sitúa entre los *switch I* y *switch II* de 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 and Wittinghofer, 2001). La unión del GEF a la proteína Rho induce cambios conformacionales en las regiones *switch* y en el *P-loop* que bloquean el sitio de unión al magnesio. Esto hace que la interacción con los fosfatos se debilite y facilita que se libere el nucleótido permitiendo la entrada a 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 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).

B. Las proteínas GDI (GDP Dissociation Inhibitor)

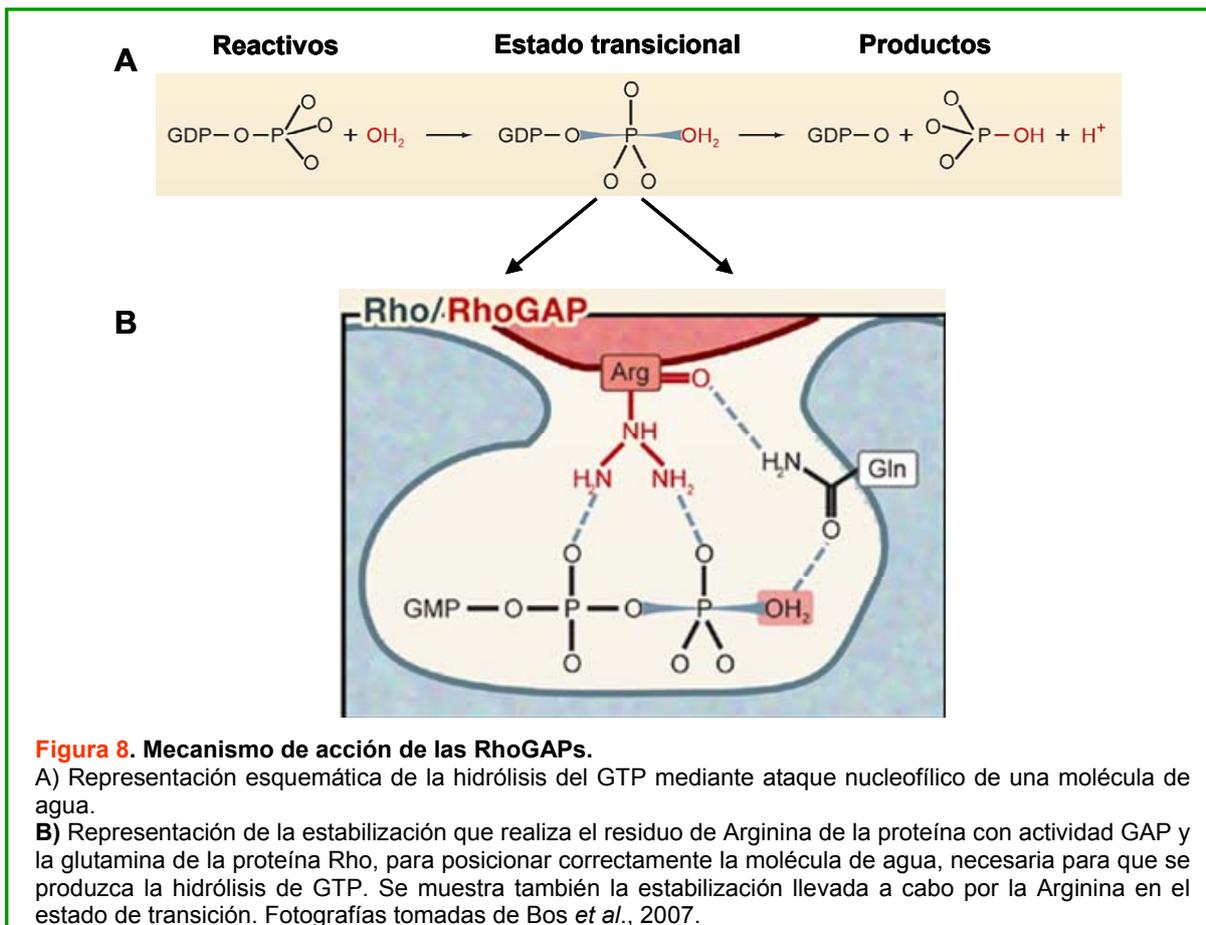
Son proteínas que inhiben la disociación del nucleótido GDP y tienden a mantener a la GTPasa en estado inactivo. Se unen a la GTPasa y enmascaran el grupo prenilo de la proteína G impidiendo que se ancle a la membrana e interactúe con proteínas GEF. Así, la proteína Rho permanece inactiva en el citosol (Wennerberg *et al.*, 2005). Estos reguladores negativos sólo actúan sobre proteínas de la familia Rho y Rab (Figura 7).

C. Las proteínas con actividad GAP (GTPase Activating Protein)

Son proteínas activadoras de la actividad GTPásica intrínseca de la proteína G. Favorecen la hidrólisis del GTP a GDP haciéndola más eficiente y promoviendo que la GTPasa se encuentre en estado inactivo (Figura 7).

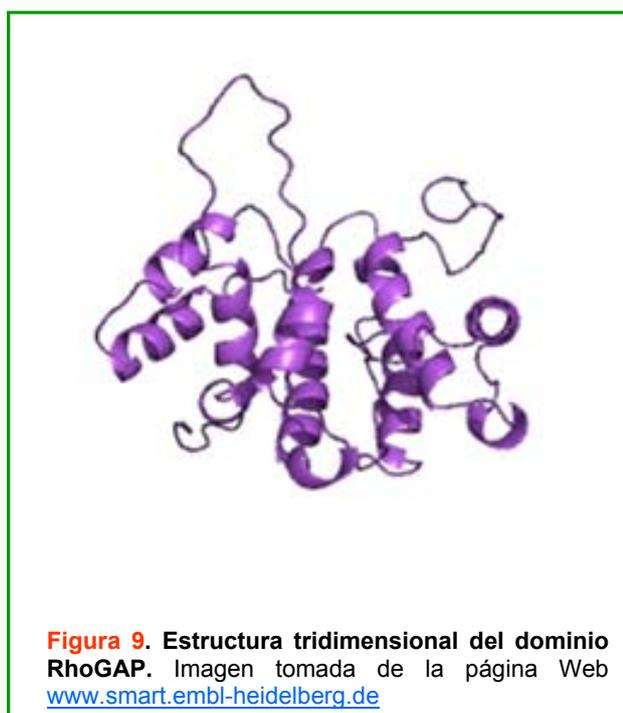
Aunque las proteínas G son denominadas GTPasas, la reacción de hidrólisis del GTP es poco eficiente y necesitan la interacción con una GAP que acelere dicha reacción varias órdenes de magnitud.

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 del GTP en



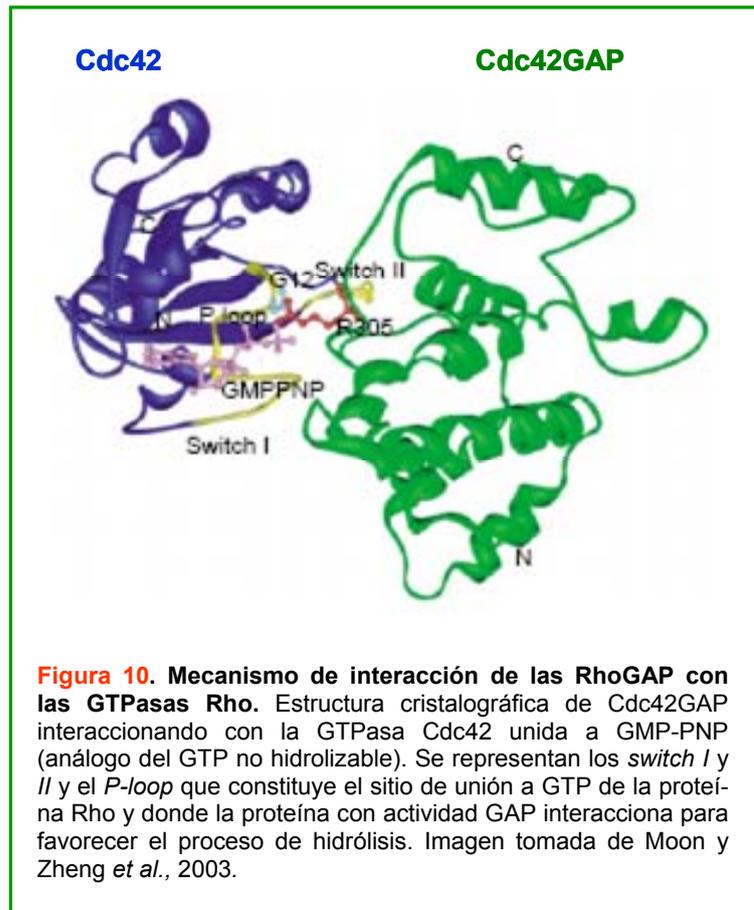
la estructura cristalográfica del complejo Ras con *GppNHp* (análogo no hidrolizable de GTP). Esta molécula de agua va a realizar un ataque nucleofílico al fosfato y del GTP y por lo tanto lo convierte en GDP. La función de la proteína con actividad GAP en esta reacción consiste en permitir la correcta orientación de la molécula de agua y en estabilizar el estado de transición (Bos *et al.*, 2007). (Figura 8)

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 (Figura 9). Este dominio consta de unos 150 aminoácidos



y es diferente al módulo GAP de otros reguladores negativos para las GTPasas Ras, Ran o ARF, pero es suficiente para la unión a proteínas Rho activas y para acelerar su actividad GTPásica (Moon and Zheng, 2003).

La esencia de las RhoGAP es el dominio RhoGAP. Este dominio consiste en nueve α -hélices y un residuo de Arginina altamente conservado. El dominio RhoGAP interacciona con los *switch I* y *II* y el *P-loop* de las proteínas Rho, que es lo que constituye el sitio de unión de GTP (Moon and Zheng, 2003) (Figura 9 y 10).



Estudios cristalográficos en los que se compara la posición de una Cdc42GAP con la GTPasa unida a un análogo no hidrolizable del GTP (GMPPNP) o unida a GDP, muestran un cambio de rotación de 20° de la proteína Rho con respecto a la proteína con actividad GAP. Estos cambios conformacionales pueden ayudar a la Arginina conservada a introducirse en el sitio activo de la proteína Rho y estabilizar el proceso de hidrólisis de GTP durante la formación del denominado *estado transicional* (Figura 8). De hecho, estas modificaciones permiten a la Arginina interactuar con el glutámico o la glutamina de la GTPasa, que es responsable del posicionamiento de la molécula de agua necesaria para que se produzca la catálisis. La estabilización que realiza la Arginina en el residuo del glutámico o glutamina de la GTPasa, limita la libertad de la molécula de agua y puede así reducir la barrera energética para la hidrólisis del GTP (Moon and Zheng, 2003). (Figura 8)

3.3. Funciones de las RhoGAPs

En humanos se ha estimado que existen 80 RhoGAP que regulan a 20 miembros de las GTPasas Rho. Esta sobreabundancia de reguladores negativos sugiere que cada RhoGAP puede regular específicamente una o varias funciones de una o varias GTPasas Rho. A continuación se citan algunos ejemplos del papel de RhoGAPs en distintos procesos.

3.3.1. Morfogénesis y polaridad

Los reguladores de las proteínas Rho tiene un papel clave en la morfogénesis. Así, la proteína p190, una de las primeras proteínas con actividad GAP identificadas, está implicada en el crecimiento y orientación del axón y en la morfogénesis neuronal (Brouns *et al.*, 2000; Brouns *et al.*, 2001). p190 puede ser un importante regulador de la reorganización de actina mediada por RhoA en los conos de crecimiento neuronales (Brouns *et al.*, 2001). Este posible papel se ha observado en estudios de inhibición de la expresión de p190 mediante la utilización de ARNs de interferencia en *Drosophila*, donde el bloqueo de p190 lleva a la retracción del axón, afectando a la ruta de RhoA y al efector Drok, la quinasa de la cadena ligera reguladora de la miosina (Billuart *et al.*, 2001). Otra GAP implicada en la morfogénesis neuronal es RacGAP50C. Esta proteína de *Drosophila* forma un complejo con la quinesina denominada *Pavarotti* (Pav) y, además de su papel en citoquinesis, este complejo es necesario para la regulación de la morfogénesis en neuronas post-mitóticas. La distribución de este complejo contribuye a la regulación espacial de la GTPasa Rac, que es esencial en el crecimiento axonal. La localización de RacGAP50C puede regular negativamente a Rac y restringir el crecimiento del axón, ya que la eliminación de la actividad GAP de RacGAP50C, produce un crecimiento axonal exagerado. Por tanto, RacGAP50C actúa como GAP de la GTPasa Rac, limitando el crecimiento del axón en neuromas post-mitóticas (Goldstein *et al.*, 2005).

Además de en la morfogénesis, las GAPs también son importantes en otros procesos de polaridad celular. Recientemente, se ha descrito que la proteína con actividad GAP p190-A participa en la direccionalidad de la migración de la célula (Jiang *et al.*, 2008).

3.3.2. Crecimiento celular y diferenciación

Un ejemplo de GAP que regula el crecimiento celular y la diferenciación es p190-B. Los ratones carentes de esta proteína manifiestan una severa reducción del tamaño del timo y defectos en el cerebro como menos conexiones neuronales y una corteza cerebral más delgada. Además, el tamaño de los ratones es un 30 % más pequeño. Por tanto p190-B tiene una función en la diferenciación del timo y del cerebro y en la determinación del tamaño del animal (Moon and Zheng, 2003).

3.3.3. Endocitosis

La Oligophrenina-1 es una GAP que está implicada en la regulación del sistema nervioso y recientemente se ha involucrado en procesos endocíticos. Los ratones carentes de la Oligophrenina-1 presentan defectos importantes en la endocitosis mediada por clatrina y

sufren una reducción de la plasticidad sináptica. Parece que este efecto puede ser debido a la desregulación que se produce en la vía de señalización RHOA-ROCK en este modelo de ratón, ya que al inhibir farmacológicamente esta vía, se produce una recuperación de los defectos endocíticos y de la plasticidad neuronal en estos ratones (Khelifaoui *et al.*, 2009).

3.3.4. Supresión de tumores

Las GTPasas Rho están involucradas en muchos aspectos de la tumorigénesis. Existen algunas proteínas con actividad GAP que pueden tener un papel en supresión tumoral. DCL1 es un potencial supresor tumoral y regula negativamente a RhoA y Cdc42. DCL1 de rata aparece deletado en el 44 % de los carcinomas hepatocelulares (Yuan *et al.*, 1998). Varios estudios demuestran que la reintroducción de DCL1 en líneas celulares de cáncer de hígado provoca un descenso del crecimiento tumoral de las mismas (Kim *et al.*, 2009). Recientemente se ha descrito que RalGAP1 y RalGAP2 forman complejos proteicos con características estructurales y catalíticas similares al complejo supresor de tumores *esclerosis tuberosa* (Shirakawa *et al.*, 2009).

3.4. Mecanismos de regulación de las RhoGAPs

La actividad de cada RhoGAP debe ser finamente regulada en el espacio y en el tiempo para que las proteínas Rho no estén continuamente inactivas (Moon and Zheng, 2003).

Las proteínas con actividad GAP pueden regular a una única GTPasa y favorecer específicamente su actividad GTPásica en un proceso concreto o regular a varias de estas proteínas G en múltiples procesos a la vez. Para realizar esta delicada y compleja función, estas proteínas a su vez deben de estar muy reguladas. A continuación se detallan ejemplos de diferentes tipos de regulación de las proteínas con actividad GAP:

3.4.1. Regulación por fosforilación

Existen varios datos que indican que la actividad GAP puede ser regulada por proteínas quinasas. Un ejemplo es la regulación de p190 por las quinasas Src (Tirosina quinasas). Estas quinasas fosforilan a p190 en dos residuos de tirosina cercanos al dominio RhoGAP. Una vez que p190 está fosforilado, recluta mediante uno de los residuos de Tyr-P a la GAP p120Ras. Esta interacción activa la función GAP de p190, causando ruptura de las fibras de estrés de actina, reducción de adhesiones focales y pérdida de adhesión a la fibronectina, efectos claros de bajos niveles de RhoA activa (Moon and Zheng, 2003). Además, se ha identificado una fosfatasa, LMW-PTP (*Low Molecular Weight Protein-Tyrosine Phosphatase*) que puede funcionar como regulador negativo de p190. Las quinasas Src

fosforilan a LMW-PTP y aumentan significativamente su actividad fosfatasa para que inactive a p190 en determinados momentos. De esta manera, se consigue una adecuada regulación para p190 por mecanismos de fosforilación y desfosforilación (Moon and Zheng, 2003).

Otro ejemplo de regulación por fosforilación es el de Bem2 y Bem3 de *S. cerevisiae*. Estas GAPs son hiperfosforiladas durante la emergencia de la yema por la quinasa Cdc28. Esta fosforilación inhibe sus actividades GAP *in vivo*. Bem2 y Bem3 regulan negativamente a la GTPasa Cdc42 durante G1 y su inactivación por la quinasa Cdc28/Cln2 contribuye a activar específicamente a Cdc42 en la emergencia de la yema para promover la polimerización de actina (Knaus *et al.*, 2007).

3.4.2. Regulación por la unión a lípidos

Rga1 y Rga2 son dos GAPs de Cdc42 en *S. cerevisiae* que son reguladas por fosfolípidos de membrana. Se ha descrito que la fosfatidiletanolamina y la fosfatidilserina estimulan la actividad GAP de Rga1 y Rga2, mientras que el fosfatidilinositol (4,5) bifosfato la inhibe. Mediante la distribución de estos fosfolípidos en las membrana se puede regular la localización de Cdc42 activa en el sitio de crecimiento mediante la activación o desactivación de estas GAPs (Saito *et al.*, 2007).

Otro ejemplo de regulación por lípidos es el de Rgd1. Esta proteína tiene actividad GAP sobre Rho3 y Rho4 en la levadura de gemación. Los fosfatidilinosoles regulan el reclutamiento de Rgd1 a las membranas a través de su dominio FCH y estimulan específicamente la actividad GAP de Rgd1 (Prouzet-Mauleon *et al.*, 2008).

3.4.3. Regulación por interacción proteína-proteína

CdGAP es una proteína con un dominio RhoGAP en su extremo N-terminal y una región de múltiples dominios ricos en prolina en su extremo C-terminal. CdGAP regula negativamente a Cdc42 y Rac1 e interacciona directamente a través de su región intermedia con los dominios SH3 de la intersectina, una proteína *scaffold* endocítica que contiene cinco dominios SH3. La unión con la intersectina inhibe la actividad GAP de CdGAP *in vitro* e *in vivo*. Esto sugiere que la interacción con esta proteína puede inducir cambios conformacionales en CdGAP, impidiendo al dominio GAP realizar su función (Moon and Zheng, 2003).

4. GTPasas de la familia Rho, polaridad y biosíntesis de pared en levaduras

Estudios realizados en distintos hongos y levaduras, principalmente en *S. cerevisiae* y *S. pombe*, indican que las GTPasas de la familia Rho participan en la regulación de la polaridad, la morfogénesis, la secreción, la citoquinesis y la biosíntesis de la pared celular de estos organismos. Por tanto, las funciones de estas proteínas, en lo que se refiere a la regulación del citoesqueleto celular, están altamente conservadas desde mamíferos hasta levaduras y, además, en hongos ejercen directamente un papel activador de las enzimas responsables de la biosíntesis de la pared celular.

4.1. Las proteínas Rho en *S. cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae posee seis GTPasas de la familia Rho, denominadas Rho1-5 y Cdc42. Todas ellas se localizan en la membrana plasmática y desempeñan distintas funciones en el establecimiento y mantenimiento de la polaridad celular (Levin, 2005).

4.1.1. La GTPasa Rho1

Es una proteína esencial para esta levadura y controla la ruta MAPK de integridad de pared celular (CWI), activa a la quinasa Pkc1 (protein kinase C) y a las β -(1,3)-glucán sintasas (Fks1 y Fks2) y desempeña un papel importante en la organización del citoesqueleto de actina y la secreción polarizada (Cabib *et al.*, 1998; Levin, 2005). Esta GTPasa se localiza en las áreas de crecimiento polarizado de manera dependiente del citoesqueleto de actina (Ayscough *et al.*, 1999; Qadota *et al.*, 1996; Yamochi *et al.*, 1994).

Rho1 es homóloga a RhoA de mamíferos y su ciclo GDP/GTP está regulado por proteínas GEF y GAP. Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1 son proteínas con actividad GAP descritas para la GTPasa Rho1 (Cid *et al.*, 1998; Martín *et al.*, 2000b; Peterson *et al.*, 1994; Roumanie *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2001). Bem2 tiene un dominio RhoGAP que es precedido de un dominio PH. Las cepas mutantes de *BEM2*, al igual que las cepas mutantes de *RHO1*, tienen defectos de pared celular y la sobreexpresión de *BEM2* regula negativamente la ruta de integridad de pared celular (Cid *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 2002). Lrg1 es una proteína con actividad GAP con un dominio RhoGAP en su extremo C-terminal y tres dominios LIM en su extremo N-terminal. Sac7 fue identificada por primera vez como supresora de la termosensibilidad de una cepa mutante de actina *act1-4* (Dunn and Shortle, 1990). Esta proteína tiene un solo dominio RhoGAP. La delección de *SAC7* suprime la termosensibilidad de una cepa mutante de

TOR2, que regula la ruta MAPK de integridad de pared y la organización de actina (Park and Bi, 2007). *Bag7* contiene un único dominio RhoGAP. La delección de *BAG7* no presenta fenotipo aparente y la sobreexpresión de esta GAP suprime la sensibilidad al frío de *sac7Δ*, sugiriendo que *Sac7* y *Bag7* realizan funciones redundantes, probablemente, en la organización de actina (Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002). Todas estas proteínas con actividad GAP realizan funciones específicas y diferenciales en los procesos regulados por Rho1. *Lrg1* es la proteína encargada de regular negativamente a Rho1 en la biosíntesis del β-(1,3)-glucano (Watanabe *et al.*, 2001). Además, se ha implicado en procesos de fusión celular y de separación de la célula madre y la célula hija (Fitch *et al.*, 2004; Svarovsky and Palecek, 2005). *Bem2* y *Sac7* son las únicas GAPs que regulan a través de Rho1 la ruta MAPK de integridad de pared celular (Martín *et al.*, 2000b; Schmidt *et al.*, 2002). Por otro lado, *Bag7* y *Sac7* realizan funciones en la regulación del citoesqueleto de actina (Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002).

Rho1 es activada por las proteínas GEF *Rom1*, *Rom2* y *Tus1* (Ozaki *et al.*, 1996; Schmelzle *et al.*, 2002). *Rom1*, *Rom2* tienen funciones redundantes en la regulación de Rho1 y probablemente en la de la GTPasa *Rho2*. La cepa carente de ambos GEFs es letal y la sobreexpresión de *TUS1* no recupera la viabilidad (Schmelzle *et al.*, 2002). *Tus1* es necesario para la activación de Rho1 en respuesta a defectos en la pared celular. Las células carentes de *TUS1* son termosensibles y este defecto se suprime con la sobreproducción de componentes de la ruta MAPK de integridad de pared (Schmelzle *et al.*, 2002). *Tus1* y, en menor medida, *Rom2* están implicados en la localización y activación de Rho1 necesarias para la citoquinesis (Yoshida *et al.*, 2009; Yoshida *et al.*, 2006). La regulación de ambas proteínas GEF se ejerce mediante su fosforilación por la quinasa *Cdc5/Polo*.

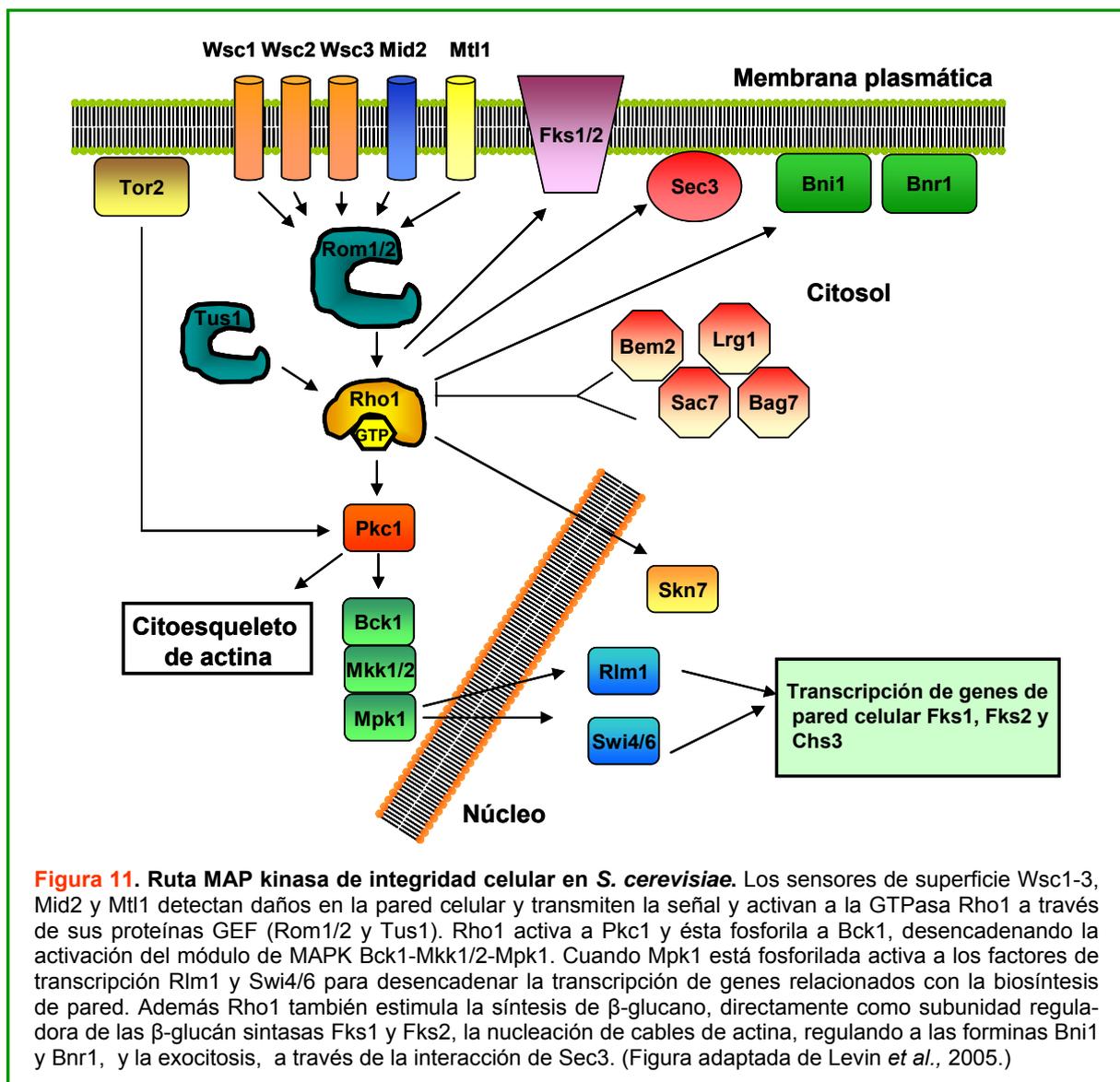
El efecto antagónico de la regulación de Rho1 por proteínas GEF y GAP se demuestra por el hecho de que *S. cerevisiae* puede sobrevivir en ausencia de GEF si además se eliminan las proteínas con actividad GAP *Lrg1* y *Sac7* (Yoshida *et al.*, 2009).

Además de GEFs y GAPs, en *Saccharomyces cerevisiae* existe un RhoGDI denominado *Rdi1*. Esta proteína se asocia a Rho1, *Cdc42* y *Rho4*. *Rdi1* extrae a Rho1 y *Cdc42* de las membranas y forma complejos solubles con estas proteínas en el citoplasma de forma dependiente de la quinasa *Cla4*, una proteína transmisora de la señal de *Cdc42* (Tiedje *et al.*, 2008). Aunque la delección de *RDI1* no presenta fenotipos aparentes, recientemente se ha implicado en la regulación del crecimiento pseudohifal y en la salida de mitosis, a través de su regulación negativa de la GTPasa *Cdc42* (Tiedje *et al.*, 2008). Por otro lado, la regulación que *Rdi1* ejerce sobre la GTPasa *Rho4* es diferente a la de Rho1 y *Cdc42*. *Rdi1* extrae a *Rho4* de la membrana para degradarla por las vías del proteasoma y proteasas vacuolares y este proceso es dependiente de *Ygk3*, homóloga a la quinasa de la

glucógeno sintasa 3 β (Tiedje *et al.*, 2008).

Se ha descrito que Rho1 en su forma activa interacciona con distintas proteínas de la levadura de gemación: la quinasa Pkc1; las β -(1,3)-glucán sintasas, Fks1 y Fks2; las forminas Bni1 y Bnr1; el factor transcripcional Skn7 y el componente del exocisto Sec3. Todas estas proteínas participan en la biosíntesis de la pared celular, en la polarización del citoesqueleto de actina y en la exocitosis (Levin, 2005). Se sabe que GTP-Rho1 interacciona directamente con Fks1 y Fks2 activándolas (Drgonová *et al.*, 1996; Mazur and Baginsky, 1996; Qadota *et al.*, 1996) y que aunque puede interactuar directamente con Bni1, lo hace a través de Pkc1 (Dong *et al.*, 2003).

Respecto a la interacción con Pkc1, se sabe que Rho1 favorece la activación de la quinasa, probablemente, mediada por Pkh1 y Pkh2 (Schmelzle *et al.*, 2002). Tras su activación, Pkc1 transmite la señal a la ruta MAPK de integridad de la pared celular. Esta ruta



MAPK es una de las cinco que existen en la levadura de gemación y regula la respuesta a estrés de la pared celular. La componen unos sensores de superficie celular (Wsc1-3), Mid2 y Mtl1, la GTPasa Rho1 y sus reguladores: GAPs (Bem2 y Sac7) y GEFs (Rom1/2 y Tus1), la quinasa Pkc1 y el módulo de MAPK: Bck1 (MAPKKK), Mkk1/2 (MAPKKs) y Mpk1/Stl2 (MAPK). (Figura 11)

Varios estudios bioquímicos y genéticos han establecido que los sensores de superficie detectan daños en la pared celular y transmiten la señal a las proteínas GEF de Rho1. Esta GTPasa a su vez activa a Pkc1 y está fosforilada a Bck1. Esta MAPKKK activa a las MAPKK Mkk1/2, que fosforilan en residuos de Tirosina y Treonina a Mpk1. Mkk1/2 y Bck1 son proteínas citoplasmáticas. Además un pequeño *pool* de estas quinasas se localiza en las zonas de crecimiento activo y esta localización es dependiente de Spa2, un componente del polarisoma (Levin, 2005). La MAPK Mpk1 se localiza en el citoplasma en condiciones de no estrés y se desplaza al núcleo rápidamente en respuesta a estrés. Allí activa a los factores de transcripción Rlm1 y Swi4/6 para producir la transcripción de genes relacionados con el control de la progresión del ciclo celular y con la biosíntesis de la pared celular como *FKS1*⁺, *FKS2*⁺ y *CHS3*⁺ (Levin, 2005; Park and Bi, 2007) (Figura 11).

La pérdida de función de las proteínas quinasas de esta ruta provoca un fenotipo de lisis celular a altas temperaturas, corregible por un estabilizador osmótico como el sorbitol. Además, son sensibles a las feromonas y a sustancias que dañan la pared celular como el calcoflúor, el rojo congo, la cafeína y las enzimas líticas. También presentan defectos en la polarización de actina.

4.1.2. La GTPasa Cdc42

Esta GTPasa tiene la función principal de establecer el crecimiento polarizado en *S. cerevisiae*. Antes de este proceso, es necesario determinar el sitio donde se va a producir el crecimiento polarizado. Los genes *BUD1*, *BUD2* y *BUD5* codifican una GTPasa Ras, su GAP y su GEF, respectivamente, y son, junto con las septinas, las proteínas encargadas de determinar el sitio de gemación. Una vez elegido el lugar para la emergencia de la yema, la célula debe polarizar todos los componentes necesarios para la instauración del crecimiento en dicho punto (Sheu *et al.*, 2000) y ello implica: la polimerización de actina, la orientación del citoesqueleto de microtúbulos hacia esa región, el ensamblaje del anillo de septinas y la localización de un grupo de proteínas que forman un complejo denominado *polarisoma* (Spa2, Bni1, Bud6 etc.) (Pruyne and Bretscher, 2000; Sheu *et al.*, 2000; Sheu *et al.*, 1998). La pieza clave en el acoplamiento entre el lugar elegido por el complejo Bud1-Bud2-Bud5 y la emergencia de la yema es la GTPasa Cdc42.

Cdc24 es la única proteína con actividad GEF específica para Cdc42 en *S. cerevisiae*

(Zheng *et al.*, 1994). La localización de Cdc24 alterna entre el núcleo y las zonas de crecimiento (Nern and Arkowitz, 2000; Toenjes *et al.*, 1999). En el núcleo se mantiene unida a la proteína Far1 (Nern and Arkowitz, 2000; Shimada *et al.*, 2000). Al comienzo de la fase S se produce la degradación de Far1 desencadenada por la quinasa dependiente de ciclina Cdc28 y la ciclina Cln2 (Gulli *et al.*, 2000). Esto conduce a la relocalización de Cdc24 en la zona de emergencia de la yema, probablemente mediada por su interacción con GTP-Bud1 (Park *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2002). La localización de Cdc24 permite la activación localizada de Cdc42 en la zona de emergencia de la yema. Bem1 es una proteína adaptadora que podría facilitar el reclutamiento de proteínas implicadas en el establecimiento del crecimiento polarizado, ya que se une a Cdc24, a Cdc42 activa y a proteínas diana de Cdc42, como la quinasa de la familia PAK, Cla4 (Bose *et al.*, 2001; Chant, 1994). Además, se ha descrito que Bem1 favorece un circuito de retroalimentación positivo en el que la activación de Cdc42 por Cdc24 reclutaría a Bem1 a la zona de crecimiento y ésta, a su vez, estabilizaría a Cdc24, que activaría a Cdc42 en esa región (Butty *et al.*, 2002). Cuando Cdc42 se localiza en la región de crecimiento, coordina varias actividades celulares como la polarización del citoesqueleto de actina y la activación de algunas rutas de señalización (Butty *et al.*, 2002).

Existen varias proteínas efectoras para la GTPasa Cdc42: Ste20 es una quinasa importante para las rutas de filamentación y respuesta a feromona (Leberer *et al.*, 1992; Ramer and Davis, 1993; Roberts and Fink, 1994); la quinasa Cla4 desempeña un papel en la organización de septinas y citoquinesis (Benton *et al.*, 1997; Carroll *et al.*, 1998; Cvrckova *et al.*, 1995; Longtine *et al.*, 1998); Gic1 y Gic2 son dos proteínas implicadas en la polimerización del citoesqueleto de actina y son importantes en la emergencia de la yema y en respuesta a feromonas (Bi *et al.*, 2000; Brown *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 1997); la formina Bni1 (Evangelista *et al.*, 1997); Iqg1, homóloga en *S. cerevisiae* a IQGAP de mamíferos, una proteína adaptadora que participa en la regulación del citoesqueleto de actina ejercida por Cdc42 (Osman and Cerione, 1998); Boi1 y Boi2, necesarias para el crecimiento polarizado (Bender *et al.*, 1996; McCusker *et al.*, 2007). Además, Cdc42 interacciona con subunidades del complejo del exocisto regulando su activación (Wu *et al.*, 2008).

Para realizar todas estas funciones, Cdc42 debe estar finamente regulada en el tiempo y en el espacio, tanto por su GEF Cdc24 como por sus GAPs. Cdc24 es estabilizado en la membrana por la proteína adaptadora Bem1, así se mantiene activada Cdc42 en los sitios de crecimiento polarizado (Butty *et al.*, 2002; Irazoqui *et al.*, 2003). Recientemente, se ha descrito que Bem1 promueve la formación del complejo entre Cdc24 y la PAK. Análisis de cepas mutantes de Bem1 indica que ambos, GEF y PAK, deben estar unidos a la misma molécula de Bem1 y una proteína de fusión GEF-PAK puede eliminar la necesidad de

Bem1 (Kozubowski *et al.*, 2008). Por tanto, el crecimiento polarizado puede establecerse mediante un complejo que una a GTP-Cdc42 con PAK y promueva la activación permanente de Cdc42 vía GEF. Este complejo, mediante la retroalimentación positiva, amplificaría la concentración de GTP-Cdc42 en el córtex (Kozubowski *et al.*, 2008).

En *S. cerevisiae* existen cuatro proteínas con actividad GAP que regulan a Cdc42: Bem2, Bem3, Rga1 y Rga2. Mediante ensayos *in vitro* e interacciones en ensayos del doble híbrido se cree que Bem3, Rga1 y Rga2 son GAPs específicas para Cdc42, mientras que Bem2 tiene actividad GAP para Rho1 y Cdc42 (Park and Bi, 2007). Ninguno de estos genes es esencial. Bem2 y Bem3 son necesarios para prevenir la activación prematura de Cdc42 durante la fase G1 (Knaus *et al.*, 2007). Bem3 tiene el dominio RhoGAP en su extremo C-terminal, un dominio PH y PX en su zona central. Esta proteína con actividad GAP para Cdc42, podría participar en la regulación de la morfogénesis, ya que la cepa *bem3Δ* presenta células con morfología aberrante, hecho que no ocurre con las cepas *rga1Δ* y *rga2Δ*. Sin embargo, la cepa mutante triple *rga1Δ bem3Δ rga2Δ* presenta un incremento en los defectos morfológicos con respecto a *bem3Δ*, lo que lleva a pensar que Rga1 y Rga2 pueden tener un papel secundario en este proceso (Smith *et al.*, 2002). Bem3 está también implicada en la regulación del crecimiento polarizado durante la conjugación. En las células carentes de *BEM3* aumenta la frecuencia de formación de proyecciones cuando se tratan con altas concentraciones de feromonas (Bidlingmaier and Snyder, 2004). Rga1 y Rga2 presentan cada una, un dominio RhoGAP en su extremo C-terminal y dos dominios LIM en su extremo N-terminal. Rga1 tiene un papel en crecimiento invasivo. Las células carentes de *RGA1* aumentan su capacidad invasiva, se alargan y tienen un defecto en la selección del sitio de gemación (Smith *et al.*, 2002). Rga2 también está implicada en este proceso, aunque en menor medida que Rga1. Recientemente se ha descrito que Rga2 es un sustrato de Pho85 y Cdc28, CDKs específicas de G1 (McCusker *et al.*, 2007; Sopko *et al.*, 2007). La fosforilación dependiente de CDK impide la actividad de Rga2 en esta fase del ciclo y garantiza una correcta activación de Cdc42 durante el establecimiento de la polaridad celular en G1 (Sopko *et al.*, 2007).

Los distintos fenotipos de las cepas carentes de *RGA1*, *RGA2* y *BEM3* nos lleva a pensar que estas proteínas con actividad GAP regulan diferentes funciones de Cdc42, aunque hay procesos en los que parece que estas proteínas realizan funciones redundantes. Uno de ellos es el papel que desempeñan en la regulación de las septinas. Todas ellas están implicadas en el ensamblaje inicial del anillo de septinas. Células carentes de estas GAPs tienen bloqueada o retrasada la formación del anillo de septinas. Además co-localizan con las septinas tanto en la emergencia de la yema como en la citoquinesis (Caviston *et al.*, 2003; Gladfelter *et al.*, 2004).

La localización de Bem3 y Rga2 es similar a la de Cdc42. Se encuentran en el sitio de gemación, en la punta de la yema y en el cuello de la célula madre. En cambio, la localización de Rga1 es un poco diferente, se localiza en el sitio de gemación, pero en la yema se sitúa en todo el córtex celular. Además, en la zona del cuello, Rga1 se localiza en forma de anillo en las etapas iniciales y se convierte en doble anillo en etapas más tardías (Caviston *et al.*, 2003; Park and Bi, 2007). Las diferencias en localización de estas proteínas pueden contribuir a la regulación diferencial de la GTPasa Cdc42. Recientemente se ha descrito que Rga1, a través de su localización diferencial con respecto a Rga2 y Bem3, específicamente impide la activación de Cdc42 en el sitio de división anterior y esto permite que el proceso de citocinesis se realice en una zona adyacente (Tong *et al.*, 2007).

En resumen, las GAPs de Cdc42, desempeñan diferentes papeles en unos procesos y redundantes en otros para regular a esta GTPasa en el crecimiento celular polarizado.

4.1.3. La GTPasa Rho2

Rho2 es una GTPasa no esencial en *S. cerevisiae* y su función ha sido muy poco estudiada. Algunos trabajos han mostrado cierta redundancia funcional de Rho2 con Rho1 (Mack *et al.*, 1996; Ozaki *et al.*, 1996; Qadota *et al.*, 1992). Por el momento, se ha descrito que Bem2 tiene actividad GAP sobre esta GTPasa y Rom1 y Rom2 pueden actuar como proteínas GEF de Rho2 (Kim *et al.*, 1994; Madden and Snyder, 1998; Manning *et al.*, 1997; Ozaki *et al.*, 1996; Schmidt *et al.*, 1997). Rho2 se ha aislado como supresor multicopia de los defectos de una cepa mutante carente de profilina, *pfy1Δ* y se ha implicado a esta GTPasa en una ruta desconocida que repolarizaría los parches de actina. Esta ruta tendría como proteínas sensoras a Mid2 y Wsc1, que transmitirían la señal a las proteínas GEF Rom1 y Rom2 y éstas activarían a Rho2 para promover la repolarización del citoesqueleto de actina en ausencia o deficiencia de la profilina (Marcoux *et al.*, 2000). Además de su función en la organización del citoesqueleto de actina, Rho2 parece tener un papel en la organización del citoesqueleto de microtúbulos, ya que la delección de *RHO2* es más sensible a benomilo (droga que despolimeriza los microtúbulos) y su sobreexpresión suprime la termosensibilidad de cepas mutantes *cik1* y *kar3*. Los genes *CIK1* y *KAR3* codifican proteínas asociadas al citoesqueleto de microtúbulos (Manning *et al.*, 1997).

4.1.4. Las GTPasas Rho3 y Rho4

Son GTPasas no esenciales involucradas en el crecimiento polarizado de la levadura de gemación. La delección de *RHO3* causa defectos en el crecimiento celular, mientras que la delección de *RHO4* no presenta fenotipo aparente. La delección de ambos es letal a 30°C y la sobreexpresión de *RHO4* suprime los defectos de crecimiento de *rho3Δ*. Esto nos indi-

ca que Rho3 y Rho4 tienen funciones redundantes en *S. cerevisiae*.

Las células *rho3Δ rho4Δ* tienen los parches de actina despolarizados y menos cables de actina (Adamo *et al.*, 1999; Matsui and Toh, 1992). Rho4 interacciona con Bnr1, una forma similar a Bni1 (Imamura *et al.*, 1997). Rho3 interacciona con la subunidad del exocisto Exo70 y la miosina de tipo V, Myo2 (Robinson *et al.*, 1999). El mutante *rho3^{E51V}* presenta una acumulación de vesículas post-Golgi, preferentemente en la célula hija, sugiriendo un papel de Rho3 en el transporte y anclaje vesicular (Adamo *et al.*, 1999). Este papel lo apoya el que la sobreexpresión de la GTPasa Rab Sec4 suprima los defectos de crecimiento de *rho3Δ rho4Δ*.

Hasta el momento sólo se ha descrito una GAP, Rgd1 y ninguna proteína GEF para las GTPasas Rho3 y Rho4 (Doignon *et al.*, 1999). La delección de *RGD1* produce una acumulación de estas dos GTPasas en su estado activo (Roumanie *et al.*, 2000). Rgd1 contiene un dominio RhoGAP en su extremo C-terminal y dominios FCH y DEP, relacionados con asociación de membranas, en su extremo N-terminal (Park and Bi, 2007).

4.1.5. La GTPasa Rho5

Rho5 es una proteína no esencial a la que se ha atribuido un papel como regulador negativo en la ruta MAPK de integridad de pared celular. Las células *rho5Δ* tienen activada esta ruta de integridad (Schmitz *et al.*, 2002). Rgd2 es la única proteína que presenta actividad GAP *in vitro* e interacciona por el ensayo de doble híbrido con Rho5 (Roumanie *et al.*, 2001). La GTPasa Rho5 es necesaria para la muerte celular inducida por H₂O₂ e interacciona con Trr1, una tioredoxina reductasa que es un componente clave del sistema antioxidante citoplásmico (Singh *et al.*, 2008). Rho5 está regulada por Msi1 a través de la quinasa Npr1. Estas proteínas actúan suprimiendo la señal de Rho5 activada mediante fosforilación y ubiquitinación (Annan *et al.*, 2008).

4.2. Las proteínas Rho en *S. pombe*

S. pombe contiene en su genoma seis genes que codifican GTPasas de la familia Rho, denominadas Rho1-5 y Cdc42. Al igual que en *S. cerevisiae*, sólo Rho1 y Cdc42 son esenciales (Arellano *et al.*, 1996; Miller and Johnson, 1994).

4.2.1. La GTPasa Rho1

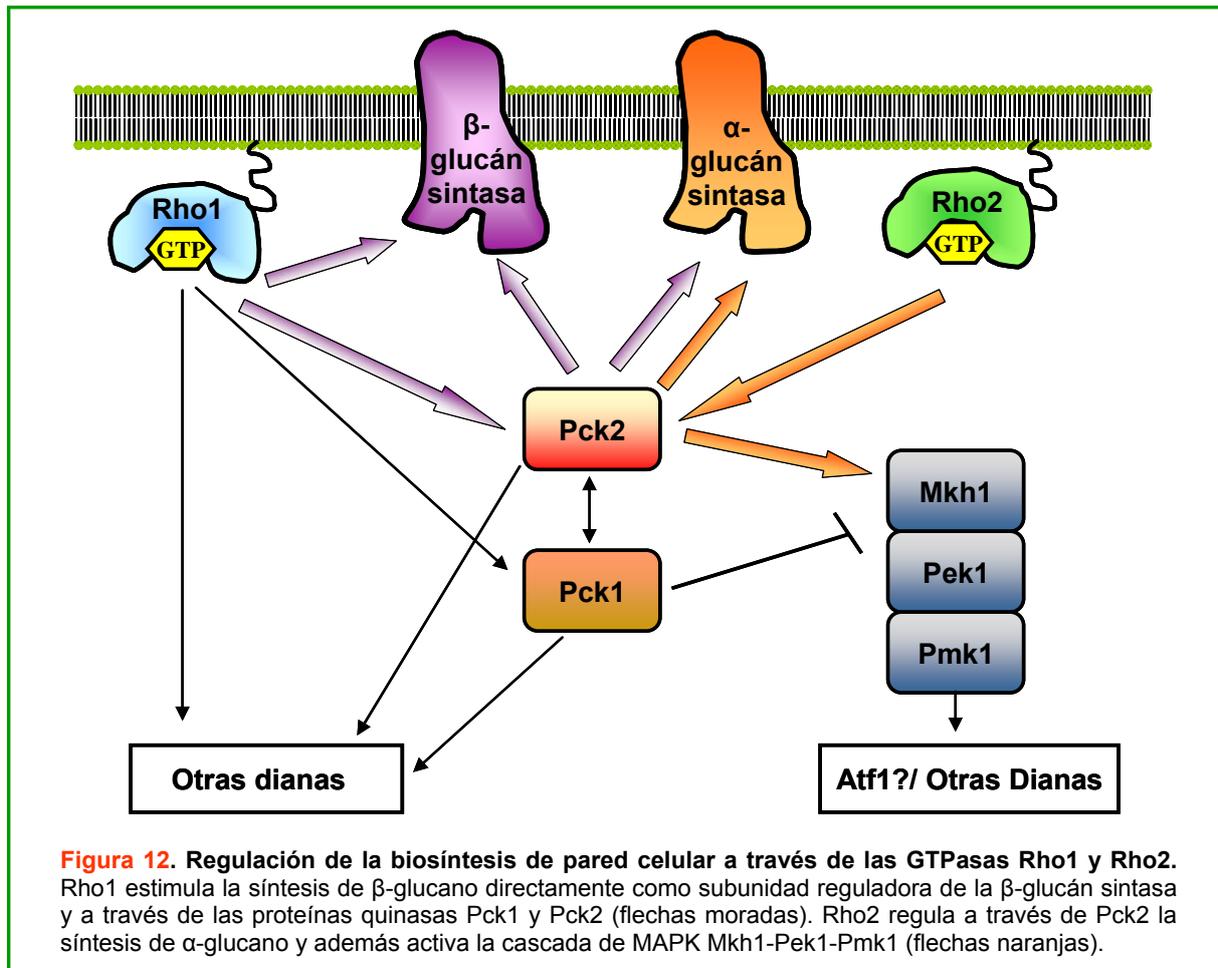
Este gen fue aislado por primera vez de una genoteca de ADNc de *S. pombe* utilizando como sonda el ADNc de RhoA. SpRho1 muestra un 73 % y un 67 % de identidad frente a Rho1 de *S. cerevisiae* y RhoA de *Homo sapiens*, respectivamente (Nakano and Mabuchi, 1995).

La GTPasa Rho1 es esencial y juega un papel fundamental en la regulación de la biosíntesis de pared y el citoesqueleto de actina (Arellano *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1997). Rho1 activa directamente a la enzima β -(1,3)-glucán sintasa (Arellano *et al.*, 1996). Las células que sobreexpresan *rho1*⁺ poseen una pared mucha más gruesa y en ocasiones aparecen células encadenadas, lo que sugiere un papel de Rho1 en citoquinesis (Arellano *et al.*, 1999b; Arellano *et al.*, 1997). Cuando se elimina la expresión de *rho1*⁺, disminuye la actividad β -(1,3)-glucán sintasa y las células se lisan, fundamentalmente en el momento de la separación (Arellano *et al.*, 1999b; Arellano *et al.*, 1997). Recientemente se ha descrito una proteína denominada Pxl1, que tiene un papel en la formación y contracción del anillo de actomiosina y modula la actividad de Rho1 (Pinar *et al.*, 2008).

Rho1 está también implicada en el control de otros procesos morfogénéticos, ya que su sobreexpresión produce una pérdida completa de la polaridad de la actina (Arellano *et al.*, 1997). La sobreexpresión del alelo *rho1G15V*, que codifica una proteína constitutivamente activa, causa la aparición de acúmulos de actina y la eliminación de la expresión de *rho1*⁺ hace que se desorganice la actina, indicando que esta GTPasa es necesaria para la polimerización de actina y por tanto debe de actuar a través de otras proteínas efectoras además de la β -(1,3)-glucán sintasa (Arellano *et al.*, 1997).

Se han descritos otras dos proteínas dianas de Rho1 en esta levadura, Pck1 y Pck2, homólogas a Pkc1 de *S. cerevisiae*. Ambas fueron clonadas por la similitud de la secuencia que codifica el dominio catalítico con la de otros genes que codifican proteínas de la familia de las PKCs (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 son sensibles a calcoflúor y las células carentes de *pck2*⁺ presentan defectos morfológicos y una pared celular anormalmente delgada (Arellano *et al.*, 1999a). Además, la cepa mutante *pck2* Δ es muy sensible a la degradación de enzimas líticas y presenta defectos en la biosíntesis de la pared celular ya que las células son incapaces de regenerar protoplastos en un medio estabilizado osmóticamente (Arellano *et al.*, 1999a; Kobori *et al.*, 1994; Shiozaki and Russell, 1995; Toda *et al.*, 1996b). Por otra parte, la sobreexpresión de *pck2*⁺ es letal y el fenotipo es parecido al que produce la sobreexpresión de *rho1G15V* (Arellano *et al.*, 1999a). Todos estos datos indican que Pck1 y Pck2 tienen un papel en el mantenimiento de la integridad celular.

Rho1 activa la síntesis de pared celular directamente a través de la β -(1,3)-glucán sintasa e indirectamente a través de Pck1 y Pck2. La disminución de la expresión de una de estas quinasas en ausencia de la otra provoca una reducción del 40-50 % de la actividad β -(1,3)-glucanásica (Arellano *et al.*, 1999a). Sin embargo, la regulación que ambas quina-



Las realizadas en la integridad de la pared es diferente. Pck2 es la quinasa fundamental en la regulación de la biosíntesis del β-glucano y, como se mencionará más adelante, del α-glucano (Arellano *et al.*, 1999a). El papel de Pck1 está menos estudiado pero podría regular la integridad de pared por una vía alternativa a Pck2, que actualmente se desconoce (Figura 12).

La GTPasa Rho1 se localiza en los puntos de crecimiento activo y en el septo (Arellano *et al.*, 1997; Nakano *et al.*, 1997). Experimentos realizados en cepas de *S. pombe* con el crecimiento polarizado alterado, han demostrado que Rho1 funciona una vez que se ha definido el área de crecimiento, ya que su localización depende del marcador de polaridad Tea1 (Arellano *et al.*, 1997).

4.2.1.1. Reguladores de la GTPasa Rho1

Hasta el momento se han identificado tres proteínas GEF de Rho1, denominadas Rgf1, Rgf2 y Rgf3, (García *et al.*, 2006a; García *et al.*, 2009a; García *et al.*, 2009b; Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004) tres GAPs, Rga1, Rga5 y Rga8 (Calonge *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003) y una proteína

GDI, Rdi1, el único GDI de *S. pombe*, que también se une a Rho4 y Cdc42, aunque se desconoce el proceso celular en el que participa (Nakano *et al.*, 2003). Es posible que otras proteínas GEF o GAP de *S. pombe*, además de las descritas, regulen a la GTPasa Rho1.

Rgf1 es necesario para la activación de Rho1 en la biosíntesis de la pared celular, concretamente del β -glucano. Rgf1 también es necesario para que se active el crecimiento en el polo nuevo durante NETO y actúa por encima del módulo de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1 en la ruta de integridad celular (García *et al.*, 2006a; García *et al.*, 2009a).

Rgf3 es una proteína esencial y activa a Rho1 específicamente durante el proceso de citoquinesis (Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; Tajadura *et al.*, 2004).

Rgf2 es una proteína esencial en el proceso de esporulación y, además, puede cooperar con Rgf1 en la regulación de la biosíntesis de la pared durante el crecimiento vegetativo (García *et al.*, 2009b).

El genoma de *S. pombe* codifica nueve putativas proteínas con actividad GAP de las cuales tres regulan a la GTPasa Rho1.

A. Rga1 es una proteína con un dominio RhoGAP en su extremo C-terminal y dos dominios LIM en su extremo N-terminal. Es el principal regulador negativo de Rho1. Tiene un papel importante en el crecimiento celular y la morfogénesis, ya que las células carentes de *rga1*⁺ son morfológicamente aberrantes, los parches de actina están deslocalizados y la pared celular presenta un extraordinario engrosamiento. Además cuando se sobreexpresa *rga1*⁺ se inhibe el crecimiento y las células tienen defectos morfológicos. Los datos obtenidos indican una alteración en los niveles de actividad de Rho1. Ambas proteínas interactúan por el ensayo de doble híbrido y co-localizan en las áreas de crecimiento activo y septo (Nakano *et al.*, 2001).

B. Rga5 es un regulador negativo que sólo tiene el dominio RhoGAP. Rga5 tiene funciones en integridad celular y en citoquinesis ya que la sobreexpresión de *rga5*⁺ es letal y las células se lisan. En la cepa *rga5* Δ hay una acumulación de células en septación, apareciendo células multitabicadas a la temperatura de 37°C.

Es una proteína asociada a la membrana que se localiza en las zonas de crecimiento activo y en el septo. Tiene actividad GAP específica *in vivo* e *in vitro* para Rho1 y regula negativamente la actividad β -(1,3)-glucán sintasa y la interacción de la GTPasa Rho1 con Pck1. Además, la ausencia de *rga5*⁺ suprime el defecto de sensibilidad a calcoflúor de la cepa *pck1* Δ , por lo que Rga5 puede tener un papel regulador de Rho1 en la ruta de integridad celular en la que participa Pck1 (Calonge *et al.*, 2003).

C. Rga8 es una proteína que, además del dominio RhoGAP, presenta un dominio

FCH en su extremo N-terminal y un dominio DEP en una región intermedia. Rga8 tiene actividad GAP *in vivo* para Rho1 pero su papel regulador de esta GTPasa es una incógnita. Entre ambas proteínas existe una interacción funcional positiva, en vez de negativa, ya que la sobreexpresión de *rga8*⁺ agrava los defectos de la sobreexpresión de *rho1*⁺. Por otro lado, Rga8 es fosforilada por Shk1, una quinasa efectora de Cdc42. Esta GAP parece tener un papel de regulación negativa del crecimiento celular dependiente de Shk1 (Yang *et al.*, 2003).

4.2.2. La GTPasa Rho3

Esta GTPasa no es esencial, aunque la cepa *rho3Δ* no crece a 37°C. La delección de *rho3*⁺ se rescata por la sobreexpresión de *RHO3* de *S. cerevisiae*, pero no por la sobreexpresión de otras proteínas de la familia Rho de *S. pombe*. Esto indica que Rho3 realiza una función exclusiva y compartida con Rho3 de *S. cerevisiae*. Esta GTPasa 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 cepa mutante *sec8-1* (Wang *et al.*, 2003a). Las interacciones genéticas de *rho3Δ* con componentes del complejo del exocisto sugieren que esta GTPasa regula la actividad del complejo. Por otra parte, la localización de Rho3 depende de este complejo. Las células carentes de *rho3*⁺ acumulan vesículas a 37°C y muestran una secreción de fosfatasa ácida reducida (Wang *et al.*, 2003a). Por todo ello, se ha propuesto que Rho3 es un modulador de la función de este complejo.

Se ha descrito también la interacción de Rho3 unida a GTP con la formina For3 mediante el ensayo de doble híbrido (Nakano *et al.*, 2002), aunque hasta ahora no se ha demostrado que participe en su activación.

Todos estos datos sugieren que, en *S. pombe*, Rho3 funciona coordinando procesos necesarios para la secreción polarizada.

En cuanto a la regulación de Rho3, hasta el momento se desconocen reguladores positivos o negativos para esta GTPasa.

4.2.3. La GTPasa Rho4

Rho4 es la única GTPasa de la familia Rho que se localiza exclusivamente en la región de división. No es una proteína esencial y las células carentes de *rho4*⁺ manifiestan defectos de separación celular a alta temperatura y acumulan vesículas alrededor del septo (Nakano *et al.*, 2003; Santos *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. De hecho, Rho4 regula positivamente la secreción y localización de las

enzimas líticas Agn1 y Eng1, necesarias para la degradación del septo y la separación de las dos células hijas (Santos *et al.*, 2005). Todos los datos indican que Rho4 puede tener una función antagónica a Rho1 en la regulación de la pared celular de *S. pombe*.

Como en el caso de Rho3, por el momento, no se conocen las proteínas GEF o GAP que regulan a esta GTPasa.

4.2.4. La GTPasa Rho5

Rho5 es una proteína muy similar a Rho1 (86 % de identidad). Esta GTPasa no es esencial, la cepa mutante *rho5Δ* es indistinguible de la cepa silvestre, sin embargo, en ausencia de Rho1 regula la actividad β -glucán sintasa y la organización del citoesqueleto de actina. Esto indica que Rho5 puede realizar las funciones de Rho1 aunque de forma menos eficiente (Nakano *et al.*, 2005; Rincón *et al.*, 2006). Se ha demostrado que Rho5 se expresa en fase estacionaria, en condiciones de falta de nutrientes y en los procesos de conjugación celular (Rincón *et al.*, 2006). De hecho, la cepa *rho5T20N*, constitutivamente inactiva, produce esporas inviables, mientras que las esporas de la cepa *rho5G15V*, constitutivamente activa, poseen una morfología aberrante y una menor viabilidad. Esto implica a Rho5 en el proceso de esporulación (Rincón *et al.*, 2006).

Es posible que algunas de las proteínas reguladoras de Rho1 pudieran regular a Rho5. Sin embargo, no se ha descrito ningún regulador específico para esta GTPasa.

4.2.5. La GTPasa Cdc42

Esta GTPasa es esencial y participa en el control del crecimiento celular polarizado y en el proceso de morfogénesis en *S. pombe* (Miller and Johnson, 1994). Cdc42 se localiza en las membranas internas y en la membrana plasmática, estando más concentrado en los polos de crecimiento y en el septo (Merla and 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 citoquinesis (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). Hace unos años se describió 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 and Johnson, 2001). Sin embargo, en estudios posteriores se observó que la activación de Pmk1 en respuesta a diferentes tipos

de estrés es independiente de Shk2 (Madrid *et al.*, 2006).

Cdc42 juega un papel esencial en la regulación del ensamblaje de cables de actina. Hace unos años se describió que interacciona en su estado activo con For3, la formina responsable de la formación de cables de actina en interfase y homóloga a Bni1 de *S. cerevisiae* (Feierbach and Chang, 2001; Nakano *et al.*, 2003; Sawin, 2002). Posteriormente, se vio que Cdc42 es necesaria para activar y localizar a esta formina (Martin *et al.*, 2007). La cepa mutante *cdc42-1625*, con una mutación puntual en el gen *cdc42*⁺, presenta unos cables de actina muy cortos y For3 no se encuentra correctamente localizada en los polos celulares (Martin *et al.*, 2007). Recientemente, se ha descrito a Pob1 como una proteína que facilita la localización de For3 y su interacción con Cdc42 para estimular la formación de cables de actina (Rincón *et al.*, 2009). Pob1, homóloga a las proteínas Boi de *S. cerevisiae*, es esencial y está implicada en el crecimiento polarizado y en la septación (Toya *et al.*, 1999). Pob1 se aisló como un supresor de la cepa termosensible *cdc42-879*. Pob1 rescata los defectos 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).

4.2.5.1. Los reguladores de la GTPasa Cdc42

Hasta el momento se ha descrito que esta GTPasa 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 and Yamamoto, 1988; Hirota *et al.*, 2003; Tatebe *et al.*, 2008).

Scd1 es homóloga a Cdc24 de *S. cerevisiae* y está implicada en la regulación del crecimiento apical, ya que las células carentes de *scd1*⁺ presentan morfología redonda. También es necesaria para la respuesta sexual ya que *scd1* Δ es incapaz de conjugarse (Chang *et al.*, 1994). Scd1 pone en contacto a la GTPasas Ras1 y Cdc42 formando un complejo macromolecular que incluye, además, a la proteína adaptadora Scd2 y a la quinaasa de la familia PAK Shk1, para regular la morfología celular y el proceso de conjugación (Chang *et al.*, 1999; Chang *et al.*, 1994; Fukui and Yamamoto, 1988). 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 quinaasa (Endo *et al.*, 2003).

Gef1 participa en el proceso de citoquinesis 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 citoquinesis, aunque también puede verse en los polos de crecimiento (Coll *et al.*, 2003). Gef1 no interacciona con los componentes de la ruta de Scd1 (Hirota *et al.*, 2003). La eliminación simultánea de las dos proteínas GEF es letal, generan-

do 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.

Rga4 es la única proteína descrita con actividad GAP para 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 esa 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* para Cdc42 e interacciona con esta GTPasa por co-inmunoprecipitación y ensayo de doble híbrido (Tatebe *et al.*, 2008).

Rga4 se localiza en el contorno de la célula, excluida de las zonas de crecimiento. Pom1 regula la localización de Rga4 ya que en las células *pom1*Δ esta proteína se localiza en el polo de no crecimiento en células monopolares (Tatebe *et al.*, 2008). Rga4 es la responsable del defecto de NETO de las células *pom1*Δ, al impedir activarse a Cdc42 en el polo nuevo (Tatebe *et al.*, 2008).

4.2.6. La GTPasa Rho2

El gen *rho2*⁺ fue identificado en un *screening* de genes cuya sobreexpresión causaba morfología aberrante. La sobreexpresión de *rho2*⁺ es letal, causa alteraciones morfológicas, despolarización de actina y un incremento de la biosíntesis del α-glucano (Calonge *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 1998). Rho2 es una proteína asociada a la membrana y se concentra en las áreas de crecimiento activo y en el septo (Hirata *et al.*, 1998).

Esta GTPasa en estado activo interacciona con Pck1 y Pck2 en ensayos de doble híbrido (Arellano *et al.*, 1999a). Sin embargo, sólo Pck2 se ha descrito como proteína transmisora de la señal de Rho2 ya que todos los efectos que se observan en la sobreexpresión de *rho2*⁺ se suprimen en ausencia de Pck2. En la cepa *pck1*Δ los defectos se agravan, por lo que esta quinasa no parece actuar como una proteína efectora de Rho2 (Calonge *et al.*, 2000). La delección de *rho2*⁺ no es letal, pero presenta defectos en la integridad de pared celular (Hirata *et al.*, 1998). Las células carentes de *rho2*⁺ tienen defectos similares a los descritos en la cepa *pck2*Δ, una pared más delgada que las células silvestres y mayor sensibilidad al tratamiento con β-glucanasas y con compuestos inhibidores de la síntesis de pared (aculeacina A y papulacandina B) (Calonge *et al.*, 2000). La sobreexpresión de *pck2*⁺ suprime la sensibilidad al tratamiento con β-glucanasas de la cepa *rho2*Δ, confirmando el papel efector que tiene esta quinasa en la ruta de señalización de la GTPasa Rho2 (Calonge *et al.*, 2000) (Figura 12).

Como se ha mencionado en el apartado 2.2.2, Rho2 y Pck2 están involucradas en la regulación de Mok1, la posible α -glucán sintasa. *rho2* Δ y *pck2* Δ son sintéticos letales con *mok1-664* y ambas proteínas son necesarias para localizar a la posible α -glucán sintasa en las áreas de crecimiento activo. Además, la sobreexpresión de *mok1*⁺ es letal en la célula y produce un incremento exacerbado de α -glucano. Todos estos efectos se corrigen en ausencia de Rho2 o Pck2, confirmando el papel de esta GTPasa como activadora de la biosíntesis de α -glucano a través de la quinasa Pck2 (Calonge *et al.*, 2000) (Figura 12).

Se ha propuesto que aunque las funciones en la integridad de pared celular de Rho1 y Rho2 son diferentes, debe existir un solapamiento parcial ya que, si bien la sobreexpresión de *rho2*⁺ no rescata la letalidad de la delección de *rho1*⁺, la sobreexpresión de *rho1*⁺ rescata parcialmente la sensibilidad de la cepa *rho2* Δ a la aculeacina A (Hirata *et al.*, 1998).

Además de su papel en la biosíntesis de pared, Rho2 también a través de Pck2 activa la ruta MAPK formada por el módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 (Loewith *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2006; Sengar *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996a; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997) (Figura 12).

Una característica que presentan las cepas carentes de los genes implicados en esta ruta, es su capacidad de antagonizar los efectos de la eliminación de la calcineurina en la homeostasis iónica. La calcineurina es una proteína con actividad fosfatasa activable por calcio y calmodulina. Esta proteína juega un papel fundamental como mediadora en la señalización del calcio. En *S. pombe* forma un heterodímero compuesto por la subunidad catalítica Ppb1 y la subunidad reguladora Cnb1 (Sio *et al.*, 2005; Sugiura *et al.*, 2003; Sugiura *et al.*, 1999; Sugiura *et al.*, 1998). La eliminación de la subunidad catalítica de la calcineurina, Ppb1, o la inhibición de su actividad mediante inmunosupresores (como FK506), produce hipersensibilidad al Cl⁻, mientras que la inactivación simultánea de la ruta de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1 suprime este fenotipo.

Basándose en esta interacción se ha descrito el denominado fenotipo *vic* (*Viable in the presence of Immunosuppressant and Chloride ion*), y se ha visto que todos los mutantes nulos de los componentes de la cascada de integridad presentan este fenotipo, es decir, son viables en presencia del inmunosupresor FK506 y altas concentraciones de MgCl₂ (Sugiura *et al.*, 1999; Sugiura *et al.*, 1998).

Con el fin de buscar nuevos componentes de la ruta de integridad se realizó un *screening*, en búsqueda de fenotipos *vic* (Ma *et al.*, 2006). Se identificó una cepa mutada en el gen *cpp1*⁺ que codifica para la subunidad β de la farnesiltransferasa. En *S. pombe*, esta enzima cataliza la modificación postraduccional de las GTPasas Ras1, Rho2 y Rho3. Así se llegó a identificar a Rho2 como un nuevo miembro de la ruta de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1 ya que *rho2* Δ presenta también fenotipo *vic*. La localización de Rho2 en

la membrana es crítica para la función de esta GTPasa en esta ruta MAPK y Cpp1 es una molécula clave controlando espacialmente a la GTPasa Rho2 (Ma *et al.*, 2006).

La sobreexpresión de *rho2*⁺ deja de ser letal cuando eliminamos Mkh1, Pek1 o Pmk1 de la célula, al igual que ocurre con la sobreexpresión de *pck2*⁺, lo cual sitúa a Rho2 y Pck2 por encima del módulo de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1 en la ruta de integridad celular. Además, la sobreexpresión de *rho2*⁺ o *pck2*⁺ incrementa en gran medida los niveles de fosforilación de Pmk1 (Ma *et al.*, 2006). Pck2 interacciona físicamente con Mkh1, indicando que esta quinasa puede activar directamente a la MAPKKK y así transmitir la señal.

Al igual que ocurre con la biosíntesis del α -glucano, Pck1 no es un efector de Rho2 en la activación de esta ruta MAPK. A diferencia de *rho2* Δ y *pck2* Δ , *pck1* Δ no presenta fenotipo *vic* y la sobreexpresión de *pck1*⁺ no aumenta los niveles de fosforilación de Pmk1 (Ma *et al.*, 2006). Por el contrario, Pck1 tiene un efecto regulador negativo en la ruta de integridad celular ya que la ausencia de Pck1 provoca una fosforilación constitutiva de Pmk1 (Barba *et al.*, 2008).

En resumen, Rho2 activa a través de Pck2, la biosíntesis del α -glucano y la ruta de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1. Hasta el momento de la realización de este trabajo doctoral, se desconocían los reguladores para esta GTPasa.

4.2.6.1. La ruta MAPK de mantenimiento de la integridad celular

En *S. pombe* existen tres cascadas de MAPKs: La de respuesta a feromonas, con Spk1 como MAPK (Toda *et al.*, 1991); la de respuesta a estrés, con Sty1/Spc1 como MAPK (Shiozaki and Russell, 1995) y la de mantenimiento de la integridad celular con Pmk1/Spm1 como MAPK.

En la ruta de mantenimiento de la integridad celular se ha identificado una cascada de MAPKs constituida por las proteínas Mkh1 (MAPKKK), Pek1/Shk1 (MAPKK) y Pmk1/Spm1 (MAPK) (Loewith *et al.*, 2000; Sengar *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996a; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997) (Figura 13). La eliminación de cualquiera de estas quinasas, provoca alteraciones morfológicas, células multitabicadas, hipersensibilidad al ión potasio y al tratamiento con β -glucanasas y defectos en fusión vacuolar (Bone *et al.*, 1998; Loewith *et al.*, 2000; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996a; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997). Todos estos defectos sugieren que esta ruta participa en la biosíntesis de pared celular, citoquinesis, homeostasis iónica y endocitosis.

El módulo MAPK de la ruta de integridad incluye:

- A. Mkh1 (Mek Kinase Homolog 1), homóloga a Bck1 de *S. cerevisiae*, es la MAPKKK que en su estado activo fosforila a Pek1 (Sengar *et al.*, 1997) (Figura 13).

B. Pek1 (*pombe mEK1*), también denominada Skh1, es la MAPKK de la ruta de integridad. Es una proteína homóloga a Mkk1 y Mkk2 de *S. cerevisiae* y se comporta como un interruptor molecular actuando como un potente regulador negativo de Pmk1 cuando está desfosforilada, de tal manera que la ruta carece de actividad basal, y como activador de Pmk1, cuando está fosforilada (Sugiura *et al.*, 1999). Este mecanismo contribuye a que en *S. pombe* exista una respuesta de “todo o nada” en esta vía de MAPKs (Sugiura *et al.*, 1999), diferenciándose así de lo que ocurre en *S. cerevisiae* donde la ruta de integridad de pared celular está siempre activa (Martín *et al.*, 2000b) (Figura 13).

C. Pmk1 (*S. pombe MAP kinase1*), también denominada Spm1, es homóloga de Mpk1/Slt2 en *S. cerevisiae*. Esta quinasa es la MAPK de la ruta de integridad celular y es fosforilada por Pek1 en los residuos Thr¹⁸⁶ y Tyr¹⁸⁸ (Loewith *et al.*, 2000; Sugiura *et al.*, 1999) (Figura 13).

Pmk1 se localiza en el citoplasma y en el núcleo, mientras que Mkh1 y Pek1 se localizan exclusivamente en el citoplasma. Las tres quinasas se localizan también en la zona de división celular. A diferencia de lo que ocurre con su ruta homóloga en *S. cerevisiae*, Pmk1 bajo condiciones de estrés o ausencia de Mkh1 o Pek1 no altera su localización subcelular, por lo que la activación de esta MAPK ocurrirá en el citoplasma o septo y tanto la forma activa como la inactiva traspasarán la membrana nuclear para transmitir la señal (Madrid *et al.*, 2006).

Aunque inicialmente se describió que esta cascada de señalización se activaba exclusivamente por altas temperaturas y cloruro de sodio, se ha demostrado que la fosforilación de Pmk1 se induce por múltiples condiciones de estrés, como estrés hipo o hiperosmótico, ausencia de glucosa, daño a la pared celular o estrés oxidativo. En todos los casos, la activación de Pmk1 depende completamente de Mkh1 y Pek1 (Madrid *et al.*, 2006). Sin embargo, no todos los tipos de estrés activan la cascada a través de Rho2 y Pck2. Un ejemplo es la activación de la ruta por estrés oxidativo (H₂O₂), que es totalmente independiente de Rho2 y Pck2. Esto indica que deben existir activadores de la ruta, actualmente desconocidos, frente a este tipo de estrés (Barba *et al.*, 2008).

Existe una fosfatasa que desfosforila e inactiva a Pmk1, denominada Pmp1 (*S. pombe MAP kinase phosphatase1*). Es una fosfatasa de especificidad dual que se une e inactiva *in vivo* e *in vitro* a Pmk1 (Sugiura *et al.*, 1998). Las células carentes de *pmp1*⁺ son hipersensibles al ión cloruro, presentan una morfología aberrante y en ocasiones son multitabicadas (Sugiura *et al.*, 1998) (Figura 13).

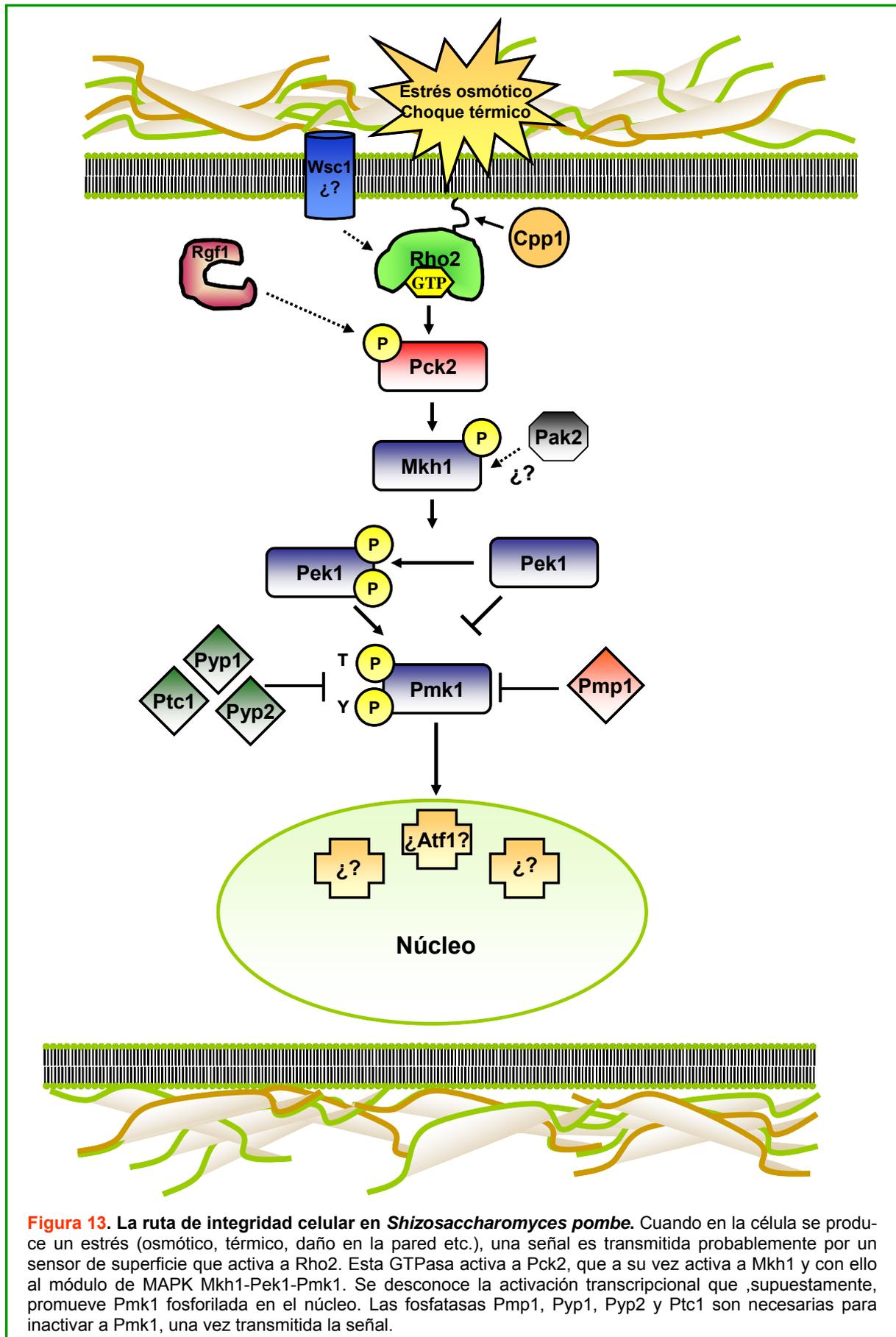


Figura 13. La ruta de integridad celular en *Shizosaccharomyces pombe*. Cuando en la célula se produce un estrés (osmótico, térmico, daño en la pared etc.), una señal es transmitida probablemente por un sensor de superficie que activa a Rho2. Esta GTPasa activa a Pck2, que a su vez activa a Mkh1 y con ello al módulo de MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1. Se desconoce la activación transcripcional que, supuestamente, promueve Pmk1 fosforilada en el núcleo. Las fosatasas Pmp1, Pyp1, Pyp2 y Ptc1 son necesarias para inactivar a Pmk1, una vez transmitida la señal.

Además de Pmp1, se ha descrito que Sty1, la MAPK de la respuesta a estrés de *S. pombe*, es necesaria para la correcta desactivación de Pmk1 en respuesta a estrés osmótico (Madrid *et al.*, 2006). Este proceso es dependiente de Atf1, que es el principal factor de transcripción fosforilado por Sty1 en respuesta a estrés. Las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2 y la Serina/Treonina-fosfatasa Ptc1, que son componentes de la ruta de la MAPK Sty1 y regulan negativamente a esta MAPK, están también implicadas en la desfosforilación de Pmk1 bajo estrés osmótico (Madrid *et al.*, 2007) (Figura 13).

Recientemente, se ha descrito que el factor de transcripción Atf1 es fosforilado por Pmk1 en condiciones de daño en la pared celular (Takada *et al.*, 2007). Estos autores proponen que la ruta de respuesta a estrés y la de integridad celular convergen en el factor de transcripción Atf1, para activar la expresión de determinados genes que reparen los daños producidos en la pared celular (Takada *et al.*, 2007) (Figura 13). Esta teoría no está probada, ya que no se ha conseguido ver ninguna activación transcripcional de genes relacionados con la pared celular por la activación de la ruta MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1, como sí ocurre en la ruta homóloga de *S. cerevisiae*.

OBJETIVOS

Objetivos

El objetivo general de este trabajo es el estudio de las GAPs, reguladoras negativas de las GTPasas Rho, y de su papel en distintos procesos celulares.

En concreto, nuestro objetivo ha sido estudiar la proteína Rga2 y la regulación que ejerce sobre las GTPasas de la familia Rho. Adicionalmente, hemos estudiado otras posibles RhoGAPs de *S. pombe* y su relación con Rga2.

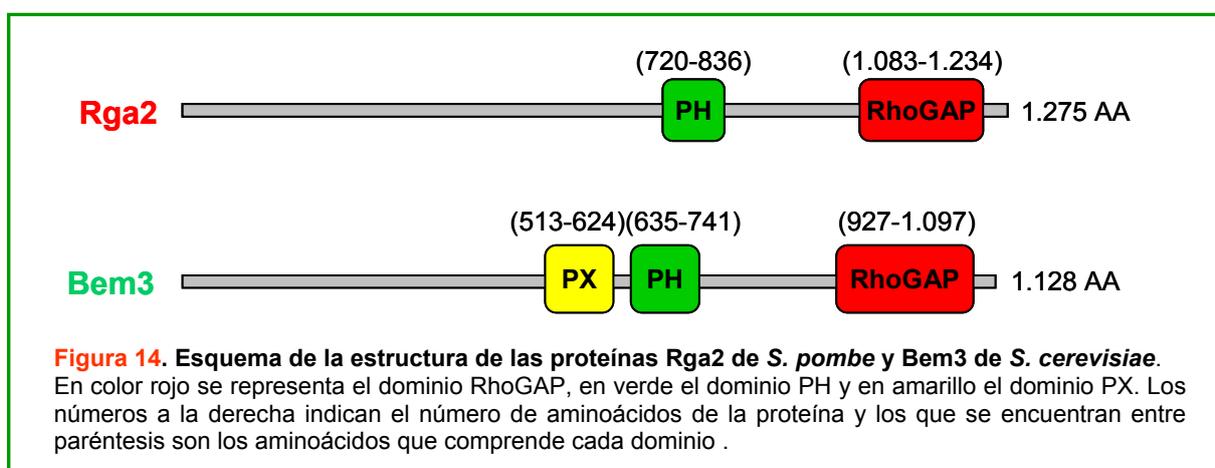
RESULTADOS

Estudio de la función de la proteína Rga2

1. Análisis estructural de la proteína Rga2

En el genoma de *Schizosaccharomyces pombe* hay nueve fases de lectura abierta (ORF) que codifican posibles GAPs (GTPase-Activating Proteins) ya que poseen un dominio RhoGAP altamente conservado. En *S. pombe*, estas proteínas con dominio RhoGAP se han denominado proteínas Rga. Dentro del proyecto general del laboratorio, que es el estudio de las proteínas Rho, en este trabajo se decidió abordar el estudio de algunas proteínas Rga. En primer lugar, se estudió la ORF SPAC26A3.09c que codifica la proteína Rga2, una proteína de 1.275 aminoácidos con una masa molecular de 143,5 kDa.

El análisis detallado de la secuencia proteica de Rga2 que se muestra en la base de datos del Instituto Sanger (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/index.jsp>) revela la presencia de dos dominios altamente conservados; un dominio RhoGAP en su extremo C-terminal comprendido entre los aminoácidos 1.083-1.234 y un dominio central PH (Pleckstrin Homology) comprendido entre los aminoácidos 720-836. En el extremo N-terminal no se ha detectado ningún dominio conocido (Figura 14).



El dominio RhoGAP, de unos 200 aminoácidos, se ha encontrado en todas las proteínas que funcionan como GAP de las proteínas Rho y representan un amplio rango de moléculas con múltiples funciones. Este dominio está compuesto de nueve hélices alfa y contiene varios aminoácidos muy conservados e importantes para su función. Uno de los más importantes es la Arg 85, involucrada en la unión a las proteínas G y en potenciar su actividad GTPásica (Barrett *et al.*, 1997). Además, este dominio también es conocido como dominio BH (Breakpoint cluster region-Homology) porque fue originalmente identificado como una región homóloga al producto del gen *bcr*⁺ (breakpoint cluster region), una molécula implicada en las leucemias mieloides crónicas (Diekmann *et al.*, 1991). Posteriormente, se

propuso el nombre BH, para englobar a todos los dominios RhoGAP, tanto los que estimulan la actividad GTPásica intrínseca de las GTPasas de la familia Rho como los que carecen de esta capacidad pero sí interaccionan con estas proteínas G (Musacchio *et al.*, 1996).

El dominio PH, de unos 100 aminoácidos, fue identificado por primera vez en la proteína Plecstrina y se ha encontrado en un gran número de proteínas relacionadas con la señalización intracelular y con los componentes del citoesqueleto. Se ha propuesto que este dominio podría interaccionar con fosfolípidos de membrana o residuos de serina o treonina fosforilados (Gibson *et al.*, 1994). Con frecuencia, los reguladores de proteínas G, como GEFs y GAPs, presentan este dominio. Se ha descrito que el dominio PH influye en la localización subcelular de algunas proteínas GEF (Rossman *et al.*, 2002).

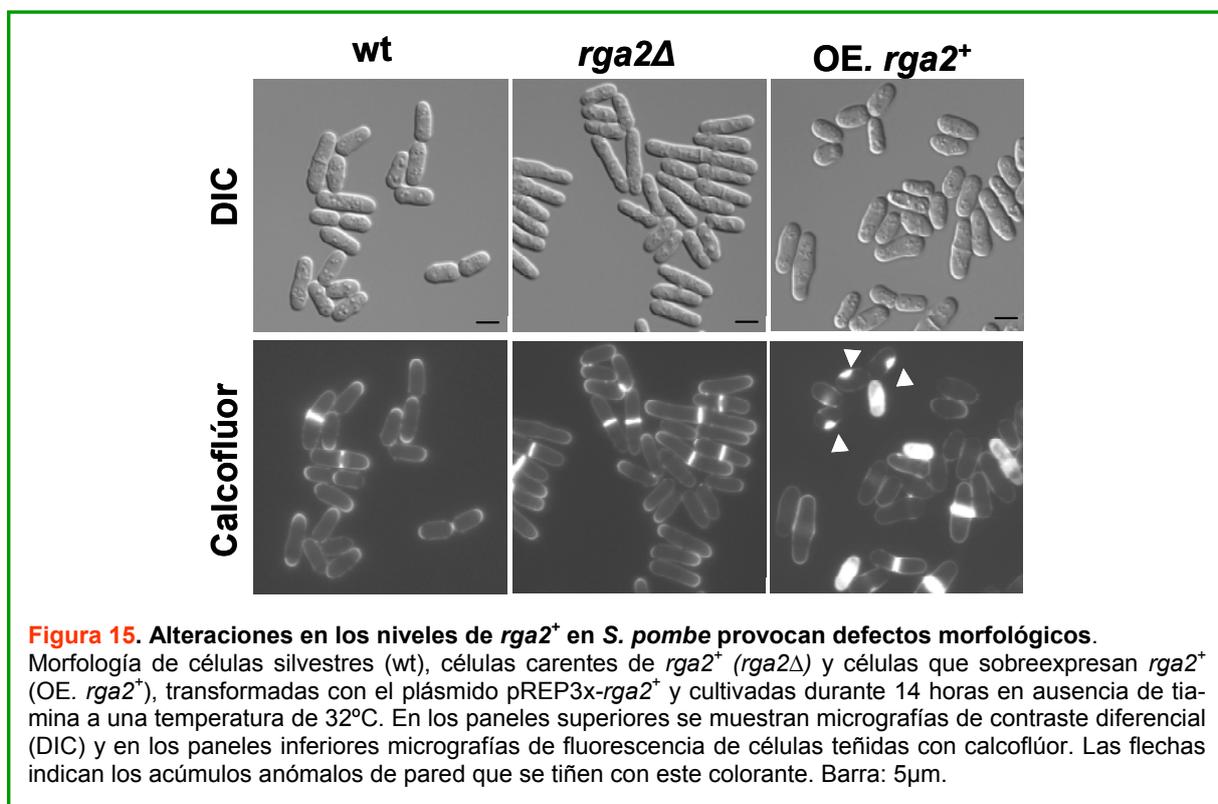
La proteína homóloga de Rga2 en *S. cerevisiae* es Bem3, una GAP de la GTPasa Cdc42 que participa en la regulación de la organización del citoesqueleto y en el mantenimiento de la polaridad celular (Zheng *et al.*, 1994). Ambas proteínas presentan una identidad del 23 % y además tienen en común su estructura primaria, ya que ambas presentan los dominios RhoGAP y PH. Además, la proteína Bem3 muestra otro motivo adicional que es el dominio PX (PhoX domain), implicado en señalización celular y tráfico vesicular mediante la unión con fosfoinosítoles (Xu *et al.*, 2001) (Figura 14).

2. Rga2 participa en la regulación morfológica y en la integridad celular en *S. pombe*

Para determinar la función del gen *rga2*⁺, se llevó a cabo la delección del mismo y se sustituyó por las secuencias de los genes *ura4*⁺ o *KanMX6*⁺ en una cepa haploide *h⁻ leu1-32 ura4-D18* tal y como se describe en el apartado 6.8. de Materiales y Métodos. Mediante PCR se confirmó que la interrupción del gen *rga2*⁺ era correcta en ambas cepas. Las células carentes del gen *rga2*⁺ fueron capaces de crecer a todas las temperaturas lo que demuestra que *rga2*⁺ no es un gen esencial. Sin embargo, mediante microscopía se observó que las células *rga2*Δ presentan defectos morfológicos: las células son más largas (16,05μm ± 2,02 (n=100) *versus* 14,05μm ± 1,47 (n=100) en el momento de división) y de menor diámetro (3,55μm ± 0,4 (n=120) *versus* 3,98μm ± 0,3 (n=120)) que la cepa silvestre (Figura 15). Estos datos sugieren que Rga2 es una proteína que puede participar en la regulación morfológica. Para corroborar este dato se llevó a cabo su sobreexpresión bajo el promotor *Pnmt*, reprimible por tiamina, y se comprobó que las células que sobreexpresaban *rga2*⁺ son más cortas y gruesas que las células silvestres (Figura 15). Estos datos sugieren que Rga2 tiene un papel en la regulación de las dimensiones de la célula, tanto en la longitud como en el diámetro celular.

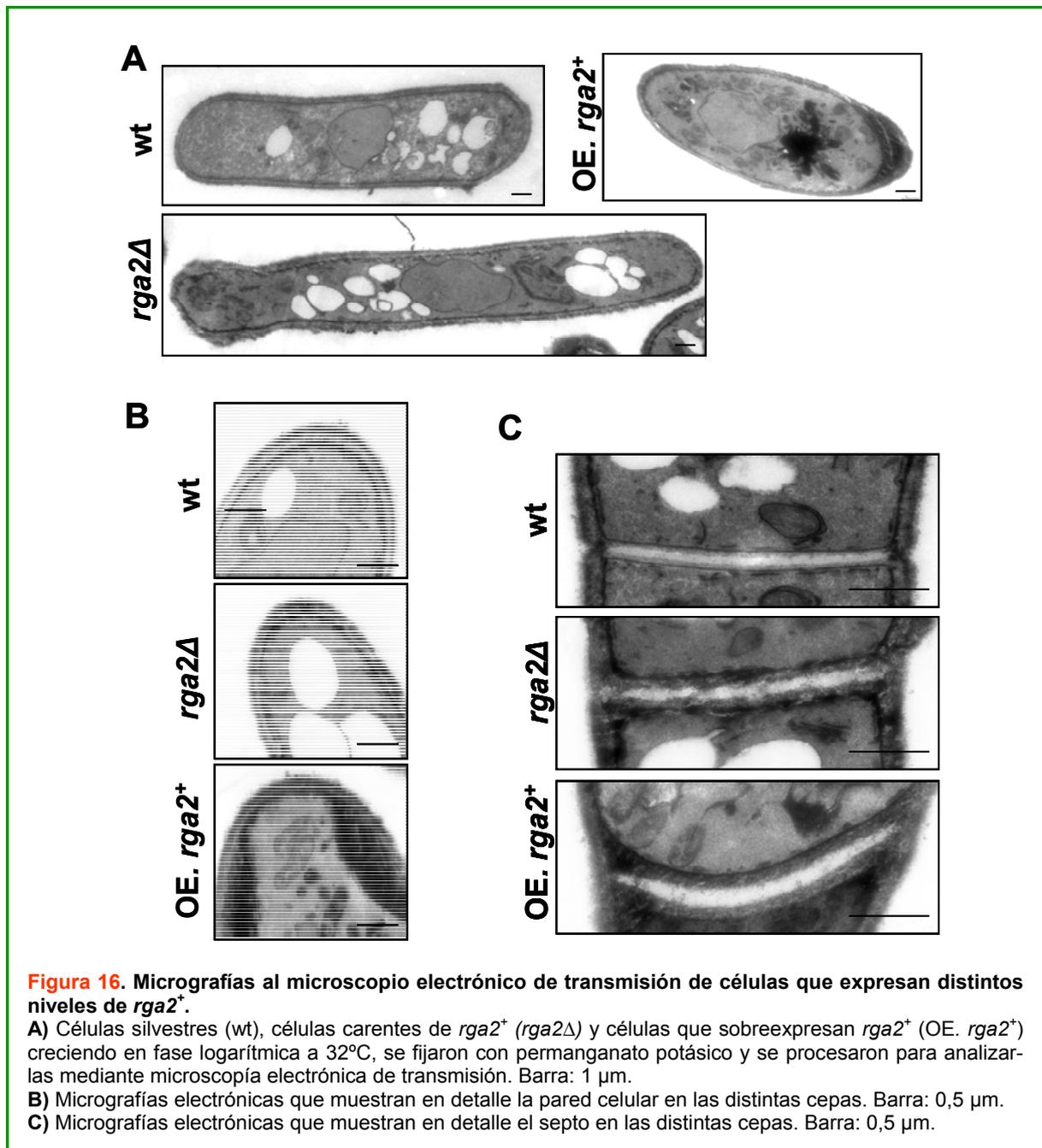
En torno al 20 % de las células que sobreexpresaban *rga2*⁺ sufrieron lisis celular cuando se cultivaron en ausencia de tiamina (repressor del promotor *nmt1*) durante 14 horas. Sin embargo, la presencia de sorbitol (estabilizador osmótico) en el medio de cultivo a una concentración de 1,2 M redujo parcialmente la lisis celular provocada por la sobreexpresión de *rga2*⁺, indicando posibles defectos en la pared celular.

Además un 15 % de las células que sobreexpresaban el gen *rga2*⁺, presentaban acúmulos anormales de calcoflúor. Este compuesto fluorescente es un antifúngico que se une a la pared celular y altera el ensamblaje correcto de sus componentes. En *S. pombe*, se une y afecta principalmente al β -(1,3)-glucano lineal (Nicholas *et al.*, 1994). Probablemente, los acúmulos de calcoflúor estén causados por una pared celular desorganizada. Para



comprobar nuestra hipótesis, estudiamos la estructura de la pared de las células que sobreexpresan *rga2*⁺ mediante microscopía electrónica de transmisión. Estas células presentan una pared celular desorganizada y se observan claramente acúmulos de material denso a los electrones que, probablemente, coincidan con los acúmulos anormales observados mediante tinción con calcoflúor (Figura 16A-B). Además, en las células en proceso de división, los septos, tanto primario como secundario, son más engrosados, si los comparamos con los de una cepa silvestre (Figura 16C). Los mismos estudios demostraron que las células carentes de *rga2*⁺ tienen también la pared y el septo desorganizados con respecto a

una estirpe silvestre (Figura 16B-C). Todos estos resultados indicaron que Rga2 no es una proteína esencial pero participa tanto en la regulación de la morfología celular como en la integridad de la pared celular.



3. La proteína Rga2 se localiza en las zonas de crecimiento y en el septo

Para estudiar la localización *in vivo* de la proteína Rga2, se construyó una cepa en la que se fusionó la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo C-terminal de la proteína Rga2, según el método descrito (Bähler *et al.*, 1998a) (ver el apartado 6.10. de Materiales y

Métodos). La proteína Rga2-GFP es funcional ya que las células presentan una morfología similar a la estirpe silvestre. Cuando observamos las células al microscopio de fluorescencia pudimos comprobar que la proteína Rga2 se localiza de forma punteada en los polos y en el septo. Se observó también mucho fondo de fluorescencia inespecífica en el citoplasma.

El calcoflúor tiñe con mayor intensidad las zonas de crecimiento activo

de la célula. Cuando realizamos una tinción con este colorante, observamos que la proteína Rga2 se localiza en el polo de crecimiento cuando la célula crece de manera monopolar y se sitúa en ambos polos cuando ya se ha activado el segundo polo (NETO) y la célula crece de manera bipolar (Figura 17). Estos resultados indican que Rga2 podría formar parte

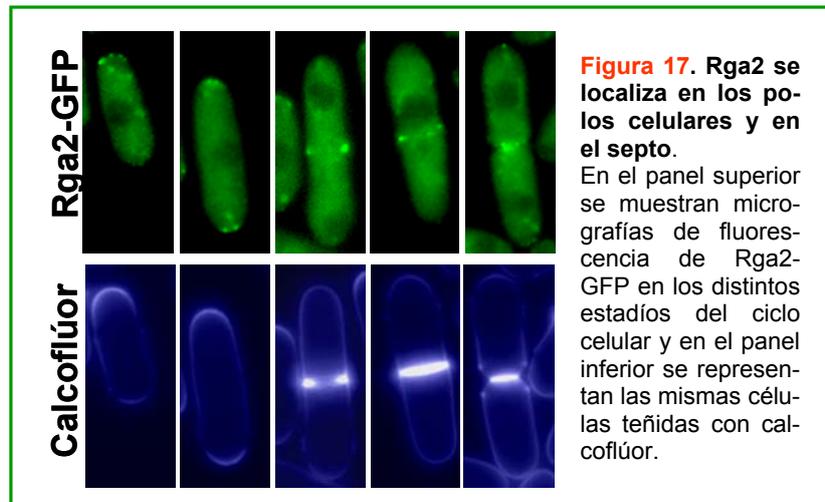


Figura 17. Rga2 se localiza en los polos celulares y en el septo.

En el panel superior se muestran micrografías de fluorescencia de Rga2-GFP en los distintos estadios del ciclo celular y en el panel inferior se representan las mismas células teñidas con calcoflúor.

de un complejo proteico localizado en las regiones de crecimiento de la célula.

Para estudiar con más detalle la localización de esta proteína en la zona de división celular realizamos una co-localización con Pxl1, una proteína que se localiza en el anillo de actomiosina (Pinar *et al.*, 2008). Para ello la proteína Pxl1 se fusionó a la proteína Cherry-RFP en su extremo N-terminal y la proteína Rga2 se fusionó a la proteína GFP en su extremo C-terminal y observamos la localización de ambas proteínas en el septo. La proteína Rga2 aparece en la zona de división después de la proteína Pxl1, siguiendo al anillo de actomiosina mientras se contrae durante la septación y permaneciendo en esta zona después de que la proteína Pxl1 desaparece

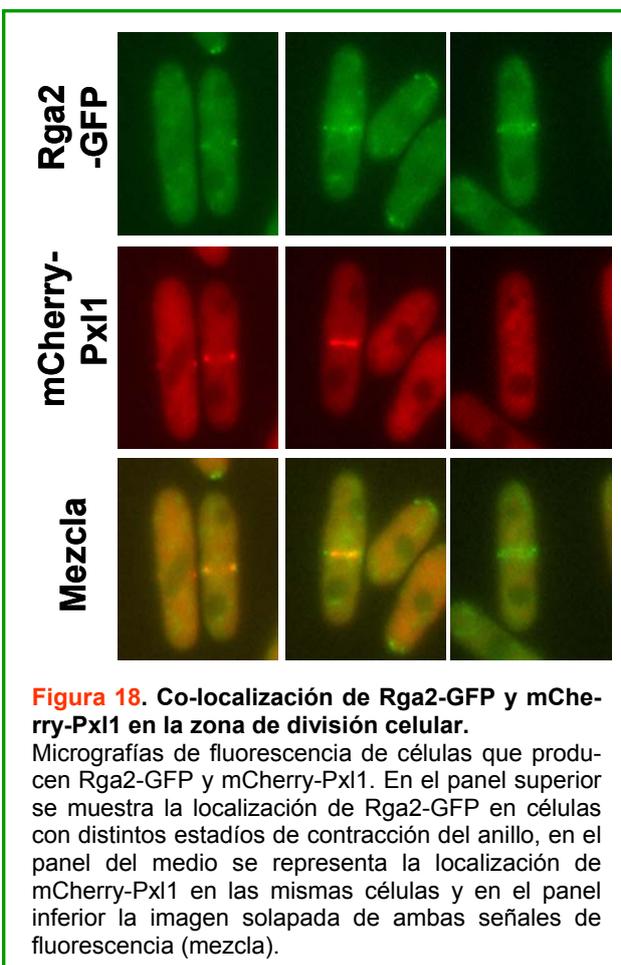


Figura 18. Co-localización de Rga2-GFP y mCherry-Pxl1 en la zona de división celular.

Micrografías de fluorescencia de células que producen Rga2-GFP y mCherry-Pxl1. En el panel superior se muestra la localización de Rga2-GFP en células con distintos estadios de contracción del anillo, en el panel del medio se representa la localización de mCherry-Pxl1 en las mismas células y en el panel inferior la imagen solapada de ambas señales de fluorescencia (mezcla).

(Figura 18). Estos resultados nos indican que en la zona de división, Rga2 no forma parte del anillo de actomiosina y, probablemente, se localiza en la membrana que se forma por detrás de él.

4. Análisis del papel de los distintos dominios de la proteína Rga2 en su función y localización

Rga2 es una proteína con dos dominios (PH y RhoGAP). Como ya se ha mencionado en el apartado 1 de Resultados, el dominio PH se ha relacionado con unión a fosfolípidos y el dominio RhoGAP es el motivo específico de las proteínas que regulan negativamente a las GTPasas Rho (Ver Apartado 1 de Resultados).

Nos planteamos estudiar con más profundidad el posible papel de estos dominios en la función y localización de la proteína. Para ello realizamos una serie de cepas en las que, partiendo de la cepa con la delección del gen *rga2*⁺, llevamos a cabo la integración de distintos fragmentos truncados del gen bajo el control de su propio promotor. Además, en el extremo C-terminal de los distintos fragmentos de Rga2 se fusionó la proteína GFP para así poder observar la localización de las distintas proteínas truncadas. Las cepas construidas fueron las siguientes: Rga2-ΔGAP-GFP, Rga2-ΔPH-GFP, Rga2-ΔPHΔGAP-GFP y Rga2-ΔN-GFP (Figura 19A).

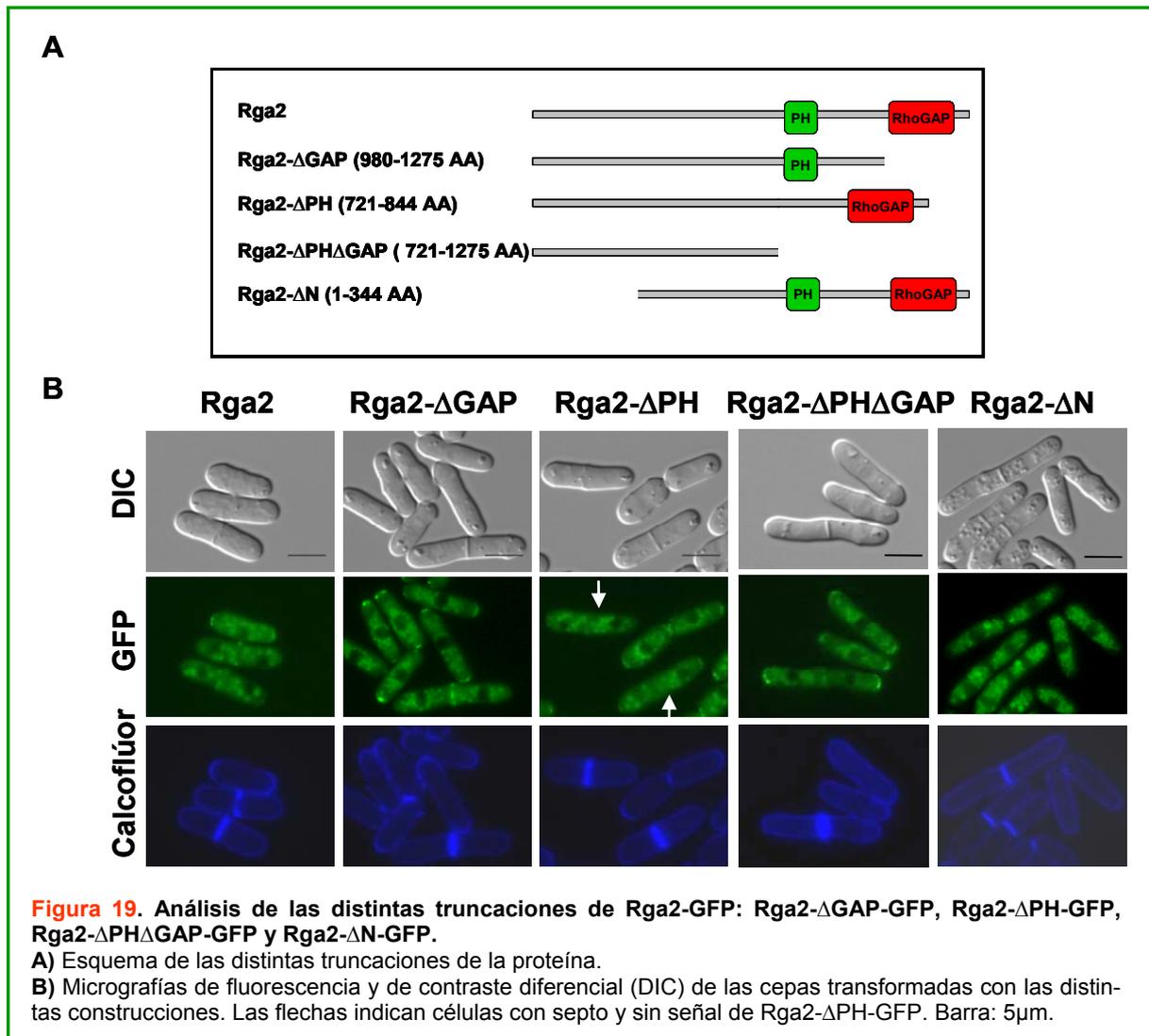
En cada una de las cepas generadas analizamos la localización de la proteína y la morfología de las células (Figura 19B). La proteína que carece de la región N-terminal (1-344 aminoácidos) no es capaz de localizarse y como consecuencia no es funcional. Sus células presentan un fenotipo similar a la cepa mutante *rga2*Δ. Por el contrario, la proteína que carece de la región C-terminal se localiza en los polos, por tanto, sólo la presencia de la región N-terminal es suficiente para localizar la proteína en los polos celulares. Sin embargo, la morfología de las células Rga2-ΔPHΔGAP-GFP (721-1.275 aminoácidos) y Rga2-ΔGAP-GFP (980-1.275 aminoácidos), era similar a la de la cepa carente del gen *rga2*⁺. Este último resultado nos indica que el dominio GAP es importante para la función de la proteína. En cuanto a la localización en la zona de división, además de la región N-terminal, es necesario también el dominio PH ya que en la cepa Rga2-ΔPH-GFP (721-844 aminoácidos) la proteína se localiza en los polos celulares pero no en el septo. En esta cepa, la morfología es similar a la de la cepa silvestre, lo que demuestra que la actividad GAP en los polos es suficiente para una correcta morfología de las células (Figura 19B). Como resumen de todos estos resultados podemos decir que:

- A. La región N-terminal de Rga2 es necesaria para la localización de la proteína en los polos celulares.
- B. La región N-terminal y el dominio PH son necesarios para la localización de Rga2 en

la zona de división celular durante el proceso de citoquinesis.

C. El dominio GAP es necesario para la correcta morfología de la célula.

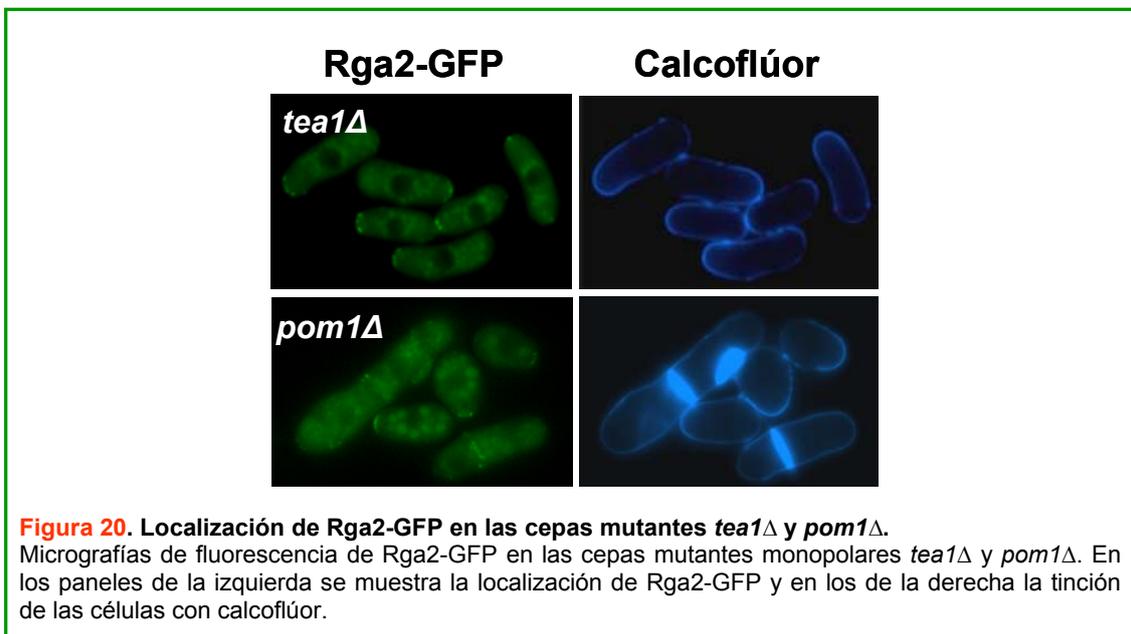
D. El defecto morfológico de la delección es debido a la falta de función de Rga2 en los polos celulares y no en el septo.



5. La localización de Rga2 depende de marcadores de polaridad

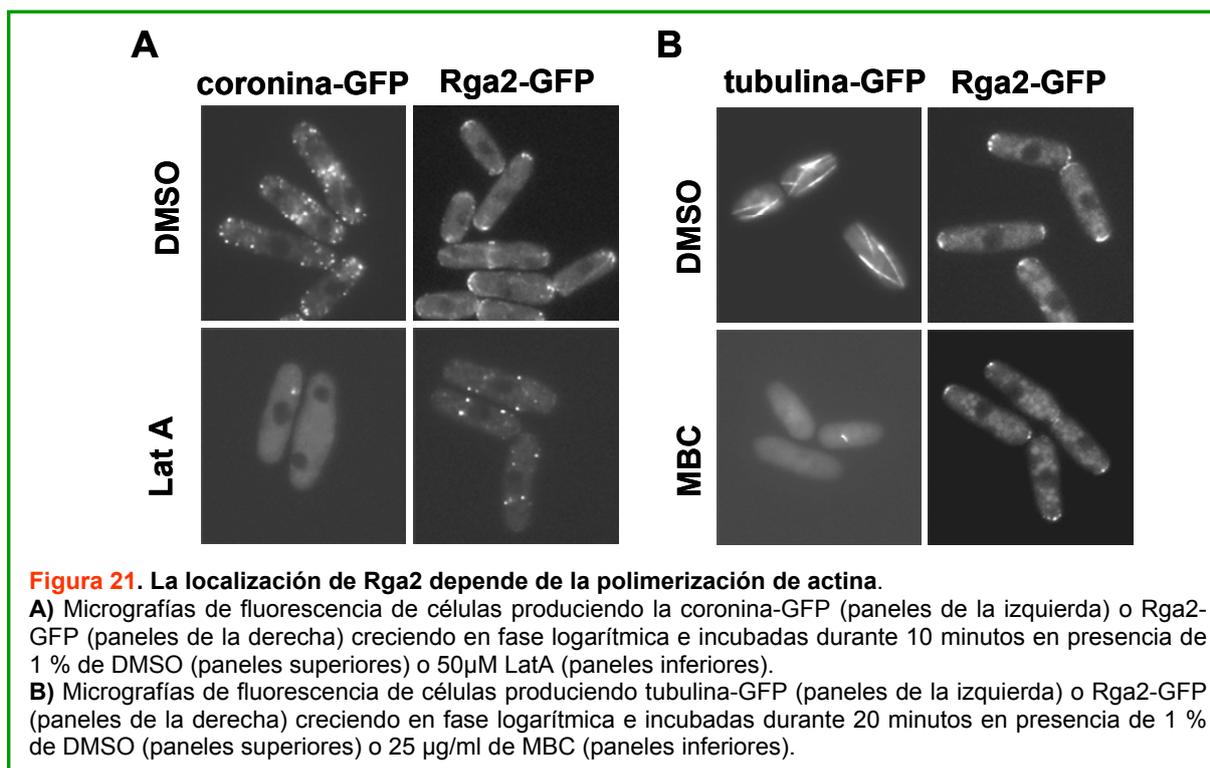
Para ahondar en el estudio de la localización de la proteína Rga2 estudiamos si su localización en los polos dependía de marcadores de polaridad como Tea1 o Pom1. Tea1 es una proteína fundamental para marcar el sitio de crecimiento de la célula (Mata and Nurse, 1997). *tea1Δ* tiene un severo defecto en NETO, por lo que la mayoría de las células presentan un patrón monopolar. Pom1 es una quinasa implicada en el crecimiento polarizado y en citoquinesis (Bähler and Pringle, 1998b). Las células carentes de *pom1*⁺ también presentan crecimiento monopolar. Se llevó a cabo la localización de la proteína Rga2 en las

cepas mutantes *tea1Δ* y *pom1Δ* y se observó que la proteína sólo se localizaba en el polo de crecimiento que se pone de manifiesto por la tinción con calcoflúor (Figura 20). Por tanto, la localización de Rga2 depende de los marcadores de polaridad Tea1 y Pom1.

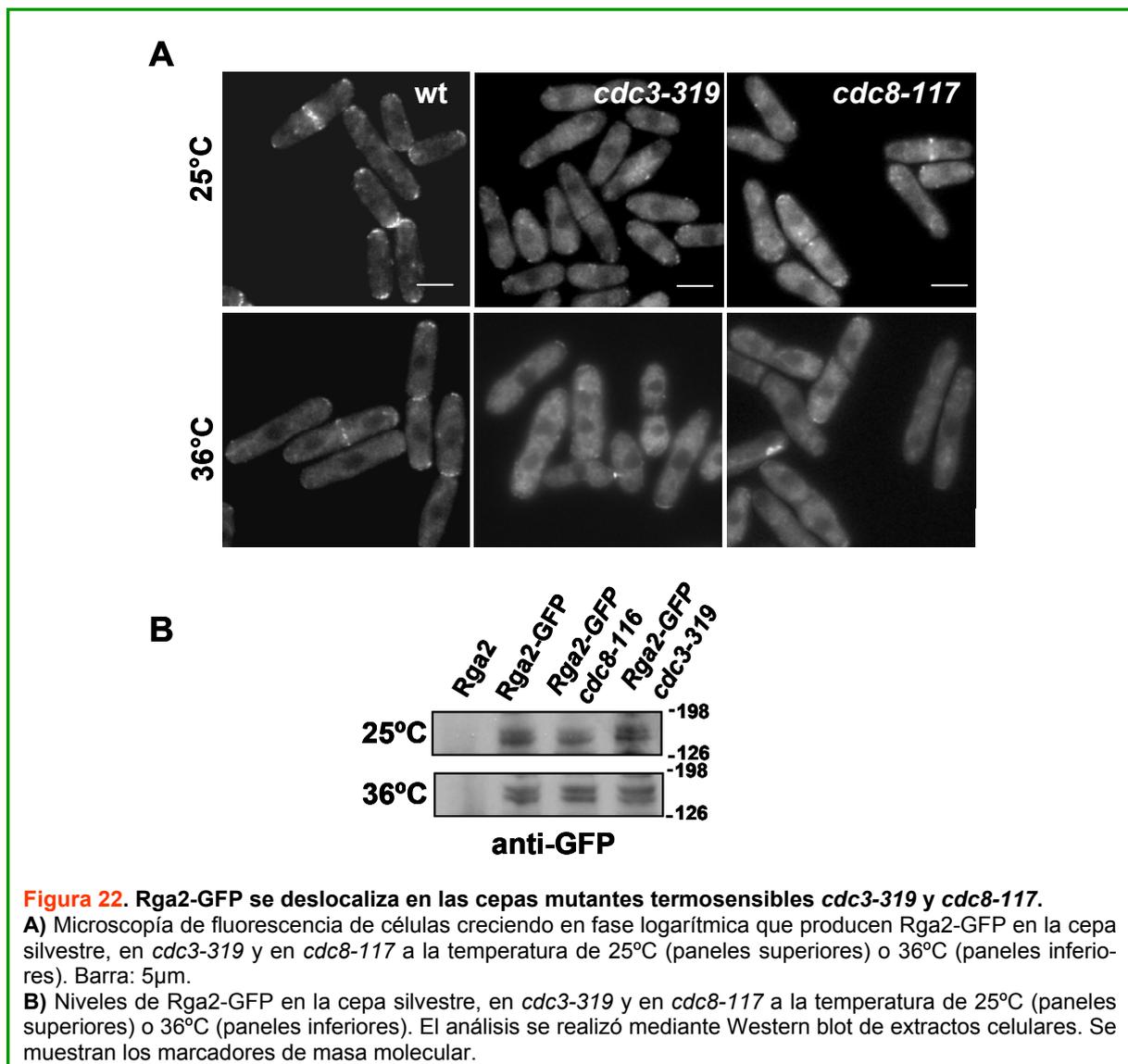


6. La localización de Rga2 depende del citoesqueleto de actina

Otra cuestión que nos preguntamos sobre la localización de esta proteína, era si de-



pendía de algún tipo de citoesqueleto de la célula. Para ello, se llevó a cabo la localización de Rga2 en presencia de Latrunculina A (Lat A), una droga que inhibe la polimerización de actina. Como control para ver el efecto de la Latrunculina A, usamos la cepa con la proteína coronina marcada con la proteína GFP (Crn1-GFP), esta proteína está asociada a la F-actina y se usa como marcador de los parches de F-actina (Pelham and Chang, 2002; Pelham and Chang, 2001). A los diez minutos del tratamiento con Latrunculina A, se observó que la coronina se había deslocalizado totalmente, al igual que la proteína Rga2 que también había perdido su localización en los polos y en la zona de división y aparecía como puntos discretos en el citoplasma (Figura 21A). Por otro lado, se observó la localización de la proteína Rga2 en presencia de metil benzimidazol carbamato (MBC), una droga que despolimeriza los microtúbulos. Como control se utilizó una cepa en la que la tubulina está marcada con GFP. Después de 20 minutos de tratamiento, la proteína Rga2 se localizó perfectamente en los polos de la célula a pesar de que la tubulina estaba despolimerizada

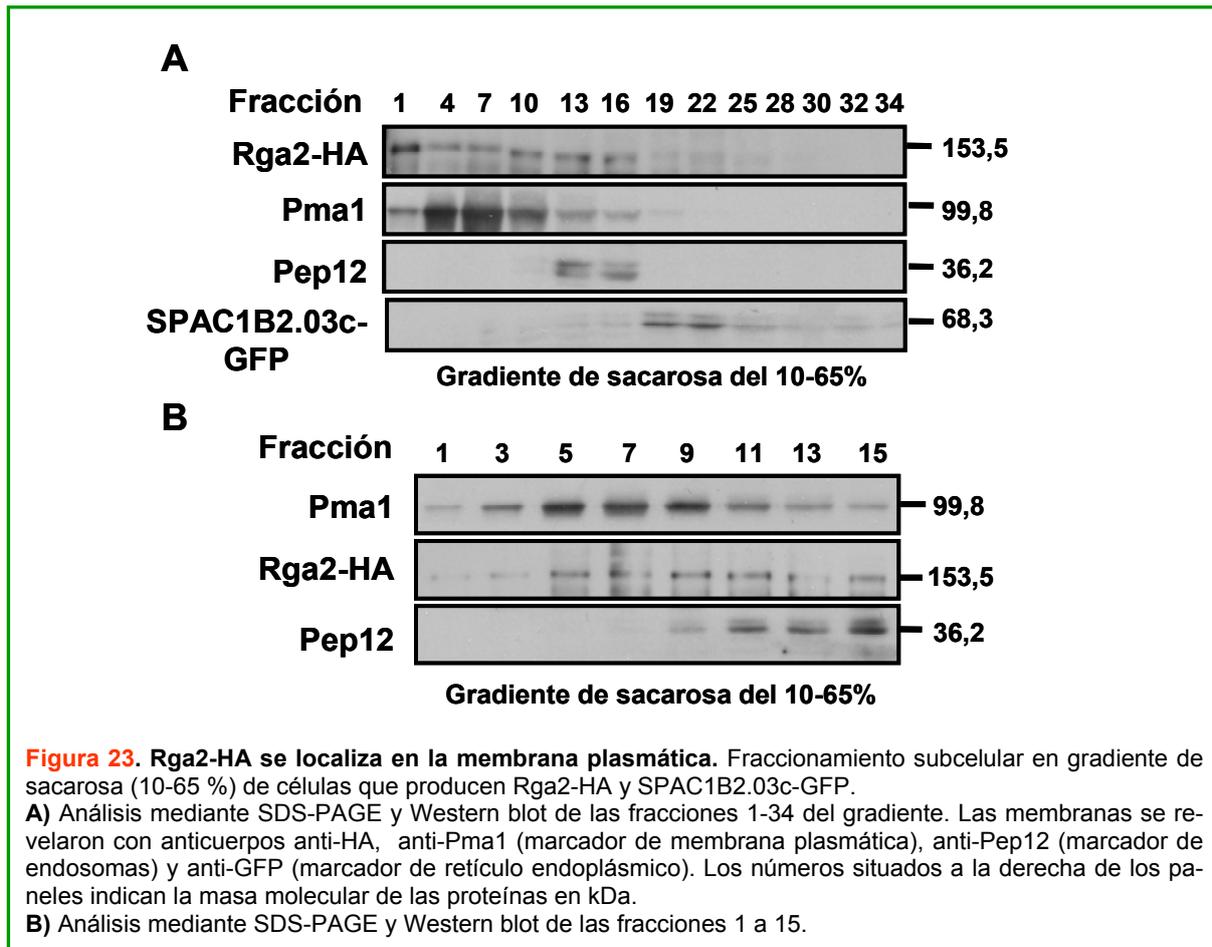


(Figura 21B). Estos datos indican que Rga2 depende del citoesqueleto de actina pero no de los microtúbulos para localizarse en los polos celulares.

Para corroborar la localización dependiente de actina de Rga2, se llevó a cabo el estudio de la localización de esta proteína en las cepas mutantes termosensibles *cdc3-319* y *cdc8-117*. Estas cepas están afectadas en las proteínas profilina y tropomiosina, respectivamente. La profilina es una proteína de unión a actina implicada en la polimerización y nucleación de la F-actina en el anillo de actomiosina (Nurse *et al.*, 1976) y la tropomiosina es una proteína que se une lateralmente a filamentos de actina y los estabiliza (Moseley and Goode, 2006). Rga2 se deslocalizó en ambos mutantes incluso a temperatura permisiva (25°C) (Figura 22A). Para comprobar que la deslocalización de la proteína no era debida a la degradación de la misma, se analizaron los niveles de la proteína Rga2 mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-GFP y se observó que la cantidad de Rga2 no variaba en ninguna de las cepas mutantes ni a la temperatura permisiva ni a la restrictiva (Figura 22B).

7. Rga2 se localiza en una fracción subcelular que solapa con la proteína de membrana plasmática Pma1

Para determinar si Rga2 era una proteína de la membrana plasmática o de otro tipo de membranas, se realizó un fraccionamiento subcelular mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. Extractos celulares de una cepa que lleva Rga2-HA y SPAC1B2.03c-GFP se sometieron a un gradiente continuo de sacarosa del 10-65 % a una velocidad de 25.000 rpm durante 20 horas a 4°C (ver Apartado 10 de Materiales y Métodos). Se recogieron 34 fracciones desde la parte más densa a la menos densa del gradiente y en ellas se analizó la presencia de la proteína Rga2-HA mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA. Como marcadores se utilizaron las siguientes proteínas de localización subcelular conocida: SPAC1B2.03c que codifica una proteína de la membrana del retículo endoplasmático (Aslett and Wood, 2006; Matsuyama *et al.*, 2006), Pma1, una ATPasa localizada en la membrana plasmática (Ghislain *et al.*, 1987) y Pep12, una proteína SNARE de endosomas (Becherer *et al.*, 1996; Takegawa *et al.*, 2003; Kienle *et al.*, 2009). Como se observa en la figura 23A, Rga2 se encuentra en las fracciones 1 a la 16, que corresponden a las fracciones de la membrana plasmática (Pma1) y endosomas (Pep12). Para delimitar con más detalle la localización subcelular de Rga2, volvimos a correr las fracciones, pero en este caso de dos en dos y observamos que se localiza de manera similar a Pma1 (Figura 23B). Por tanto, sugerimos que esta proteína se localiza en la membrana plasmática.



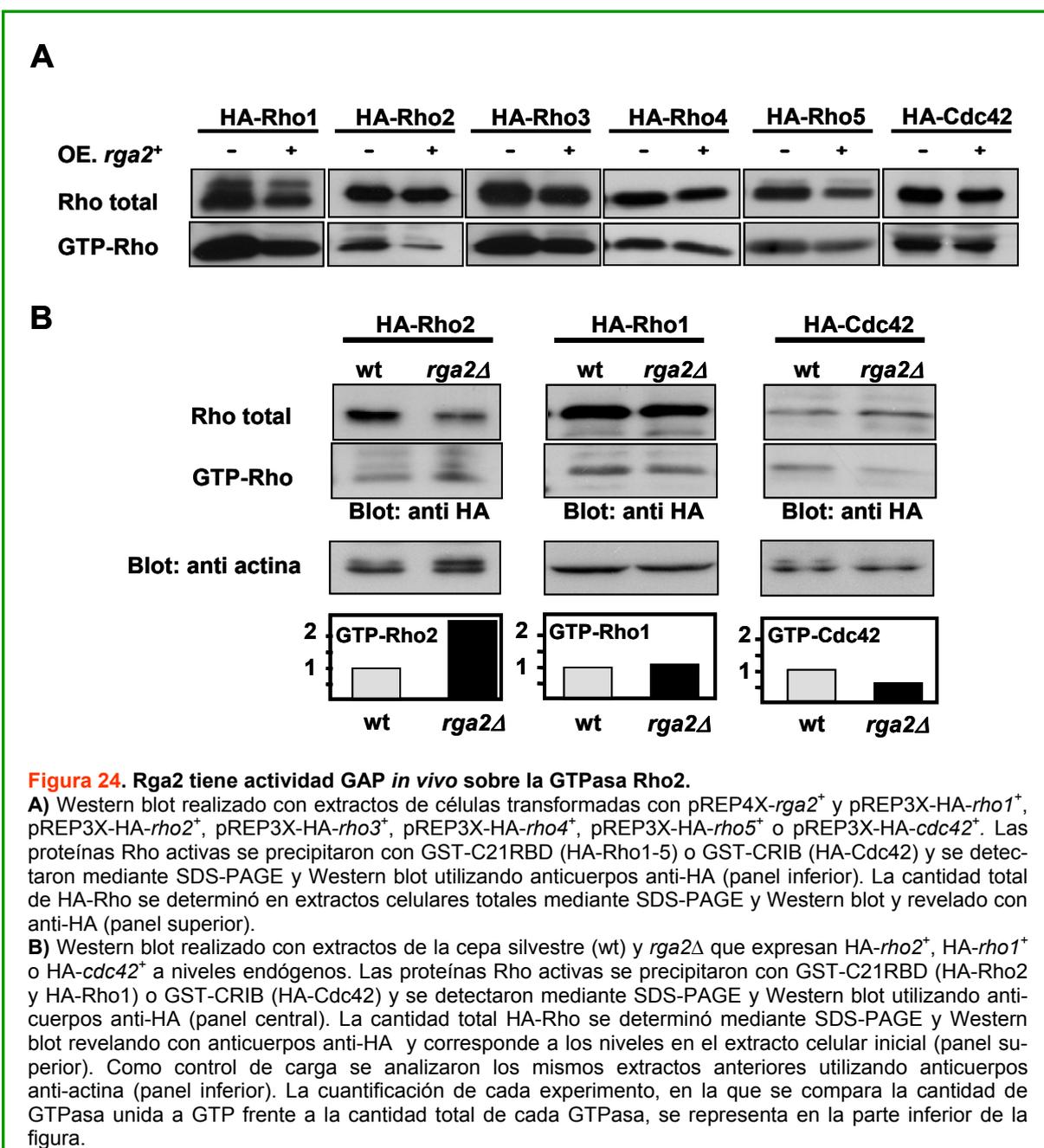
8. Rga2 tiene actividad GAP específica para la GTPasa Rho2

8.1. Rga2 tiene actividad GAP *in vivo* e *in vitro* específica para la GTPasa Rho2

Para determinar el posible papel de Rga2 como GAP de alguna de las GTPasas de la familia Rho decidimos llevar a cabo la valoración de la actividad GAP *in vivo* mediante ensayos de *pull-down*, en los que se determina la cantidad de la GTPasa Rho activa, es decir, unida a GTP. Las cantidades de Rho1-5 activas que existen en la célula se analiza mediante su precipitación con bolas de glutation-sefarosa unidas a GST-C21RBD (RhoA Binding Domain), el dominio de unión a RhoA de la proteína de células animales denominada rotequina. (Coll *et al.*, 2003; Reid *et al.*, 1996; Ren *et al.*, 1999). Para determinar la cantidad de Cdc42 activa se utilizan también bolas de glutation-sefarosa unidas a la proteína de fusión GST-CRIB (Cdc42/Rac Interactive Binding), que contiene el dominio de la proteína Pak2 que se une a Cdc42 activa (Manser *et al.*, 1998). Los dominios RBD y CRIB sólo se unen a las proteínas Rho cuando se encuentran en su forma activa (unidas a GTP). Por lo tanto, mediante la utilización de GTPasas marcadas con el epítipo HA, podemos medir la frac-

ción de las distintas GTPasas que se encuentran unidas a GTP (ver apartado 7.5 de Materiales y Métodos). Así, analizamos los niveles de cada proteína Rho unida a GTP en la cepa que sobreexpresaba *rga2*⁺ y los comparamos con los niveles en la cepa silvestre. Para ello, se transformaron las células con los plásmidos pREP4X-*rga2*⁺ o pREP4X (Control) y con cada uno de los siguientes plásmidos: pREP3X-HA-*rho1*⁺, pREP3X-HA-*rho2*⁺, pREP3X-HA-*rho3*⁺, pREP3X-HA-*rho4*⁺, pREP3X-HA-*rho5*⁺ y pREP3X-HA-*cdc42*⁺, que producían cada una de las GTPasas marcadas con el epítipo HA.

Una vez obtenidas las distintas cepas transformantes, se incubaron durante 14 horas a 32°C en medio mínimo y en ausencia de tiamina (represor del promotor *nmt1* de los plásmidos pREP) para permitir la expresión de los distintos genes. Posteriormente, se obtuvieron

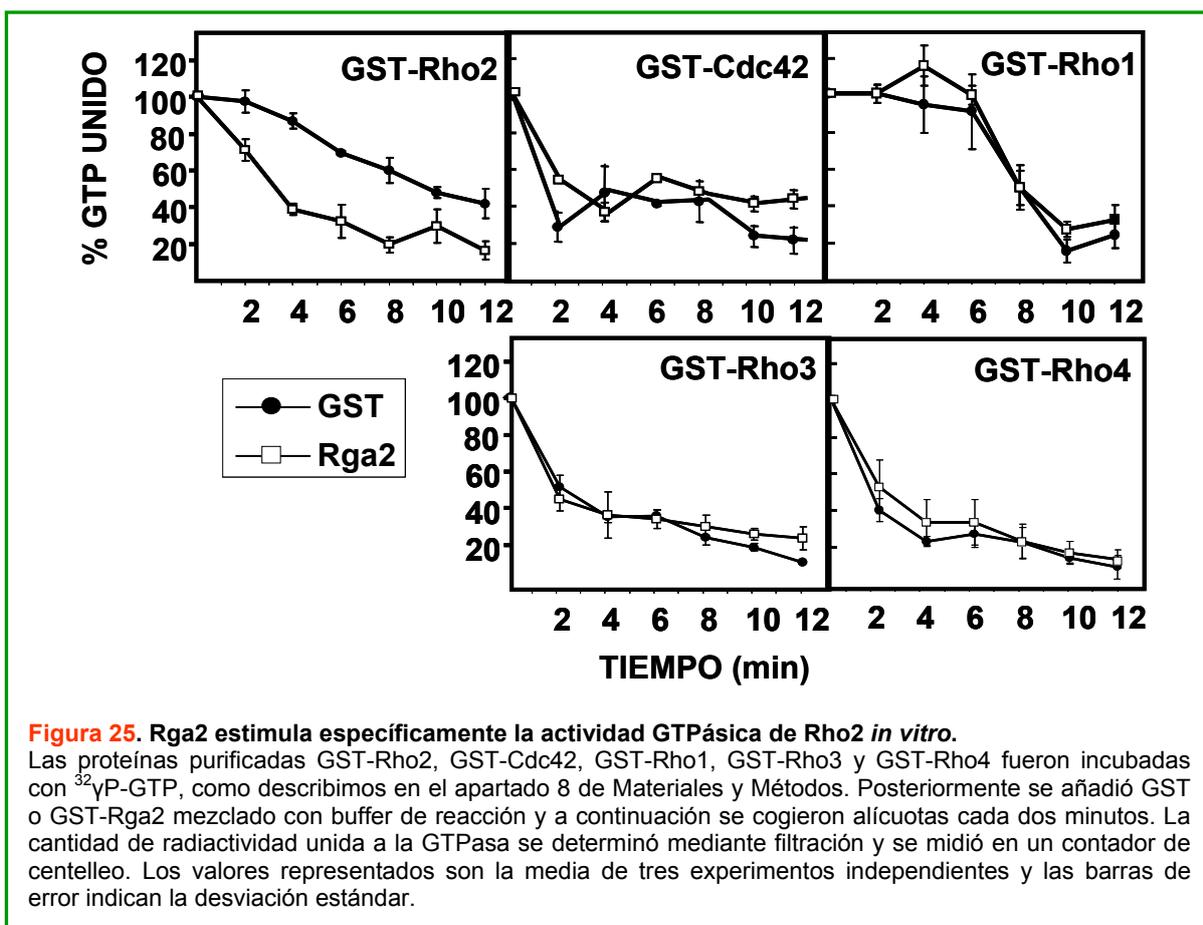


los extractos celulares y una parte de los mismos se incubó durante 3 horas con bolas de glutation-sefarosa que estaban unidas a GST-C21RBD (Rho1-5) o a GST-CRIB (Cdc42). Las proteínas Rho activas presentes en los extractos se unen al péptido C21RBD o CRIB y precipitan junto con las bolas de glutation-sefarosa. La cantidad de cada una de las proteínas Rho unidas a estas bolas se analizó mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA. La cantidad total de cada GTPasa se determinó directamente por SDS-PAGE y Western blot con anticuerpos anti-HA a partir de los extractos celulares originales. Como se puede ver en la [figura 24A](#), cuando sobreexpresamos *rga2*⁺ se observa una importante reducción en los niveles de Rho2 activa, si lo comparamos con la cepa silvestre. En el resto de las proteínas Rho no se aprecian diferencias significativas en sus niveles activos entre la cepa silvestre y la cepa que sobreexpresa *rga2*⁺. Para comprobar este resultado se construyeron cepas en las que el gen HA-*rho2*⁺ está integrado en su locus, bajo el control de su propio promotor, y se analizó la cantidad de Rho2 activa tanto en una cepa silvestre como en la cepa *rga2*Δ. Como control, también analizamos la cantidad endógena de Rho1 activa y Cdc42 activa en células carentes de *rga2*⁺ y en células silvestres. Estos experimentos pusieron de manifiesto que en la cepa *rga2*Δ existía un aumento de los niveles de Rho2 activa con respecto a la cepa silvestre ([Figura 24B](#)). Como era de esperar, estos resultados eran opuestos a los datos de la cepa que sobreexpresa *rga2*⁺, indicando que Rga2 regula negativamente la actividad de la GTPasa Rho2 *in vivo*. En el caso de la GTPasa Rho1, sus niveles activos no se vieron alterados por la ausencia de la proteína Rga2 ([Figura 24B](#)). Sorprendentemente, en la cepa *rga2*Δ se observó un descenso en los niveles de la GTPasa Cdc42 activa, respecto a la estirpe silvestre, sugiriendo que Rga2 también actúa regulando positivamente a la GTPasa Cdc42 bien de forma directa o indirecta ([Figura 24B](#)).

Nos llamó la atención el hecho de que de forma reproducible la cantidad total de la proteína Rho2 en la cepa *rga2*Δ fuese siempre menor que en una estirpe silvestre ([Figura 24B](#)). Para comprobar que era un efecto específico sobre la GTPasa, se analizó la cantidad de actina en los diferentes experimentos y se pudo observar que los niveles no variaban en las distintas cepas ([Figura 24B](#)). Con este control pudimos afirmar que había menos cantidad total de la GTPasa Rho2 en las células carentes del gen *rga2*⁺, concretamente un 68 % si lo comparamos con una estirpe silvestre. Una posible explicación a esta observación sería la degradación de la GTPasa Rho2 una vez activada.

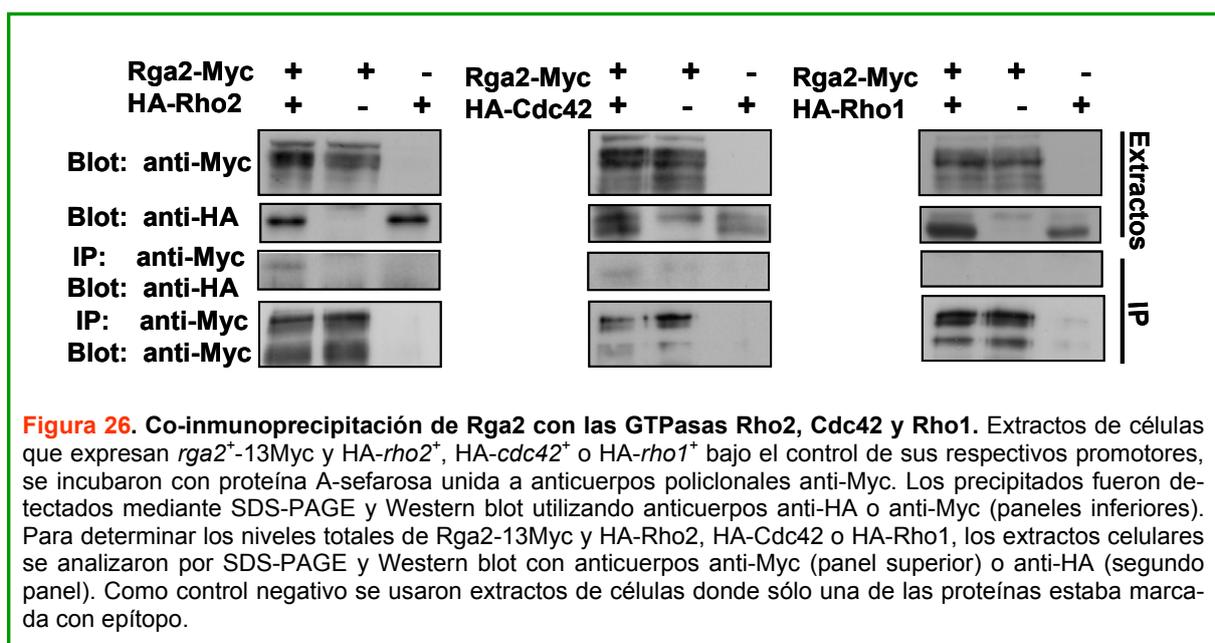
Para confirmar que la proteína Rga2 tenía actividad GAP específica sobre la GTPasa Rho2, llevamos a cabo ensayos *in vitro* de la actividad GTPásica de la proteína Rga2 frente a la GTPasa Rho2 y al resto de las proteínas Rho. Los genes *rho1*⁺, *rho2*⁺, *rho3*⁺, *rho4*⁺, *cdc42*⁺ y *rga2*⁺ fueron clonados, mediante PCR, utilizando oligonucleótidos adecuados, en

fase con la secuencia codificante de la proteína GST en el vector pREPKZ (Shiozaki and Russell, 1995). Los plásmidos obtenidos se utilizaron para transformar *S. pombe* y a partir de los extractos celulares de las células transformadas, se purificaron por afinidad con bolas de glutation-sefarosa las proteínas híbridas GST, GST-Rho1, GST-Rho2, GST-Rho3, GST-Rho4, GST-Cdc42 y GST-Rga2. La utilización de ^{32}P -GTP permite medir *in vitro* la actividad GTPásica de las proteínas GST-Rho1, GST-Rho2, GST-Rho3, GST-Rho4, GST-Cdc42 bien en presencia de GST o de GST-Rga2 (ver apartado 8 de Materiales y Métodos). En la **figura 25** se demuestra que la presencia de GST-Rga2 en la reacción con la proteína híbrida GST-Rho2 fue capaz de aumentar la velocidad de hidrólisis del ^{32}P -GTP causada por la GTPasa Rho2, ya que la radiactividad disminuyó considerablemente respecto a la reacción control sin Rga2. En los experimentos realizados con las demás proteínas Rho no se apreciaron cambios significativos en la actividad GTPásica cuando la reacción se hizo en presencia de GST-Rga2 (**Figura 25**). Por lo tanto, con todos estos resultados podemos afirmar que Rga2 es una GAP específica tanto *in vitro* como *in vivo* de la GTPasa Rho2, y actúa regulándola negativamente en la levadura de fisión.



8.2. Rga2 interacciona físicamente con la GTPasa Rho2

El siguiente paso fue confirmar la existencia de una relación directa *in vivo* entre la proteína Rga2 y la GTPasa Rho2. Para ello, se llevaron a cabo experimentos de co-inmunoprecipitación a partir de extractos de células que producían la proteína Rga2 fusionada a trece copias del epítipo Myc, bajo el control de su propio promotor, y la proteína Rho2, fusionada al epítipo HA, y expresada también bajo el control de su promotor endógeno. Además, como controles, se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación de Rga2 con las proteínas Cdc42 o Rho1, ambas fusionadas al epítipo HA. Se incubaron los extractos de las distintas cepas con anticuerpos policlonales anti-Myc y tras realizar la inmunoprecipitación con bolas de proteína A-sefarosa, las proteínas se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot empleando anticuerpos anti-HA y anti-Myc para detectar la presencia de Rho2 y Rga2, respectivamente. Como se puede observar en la [figura 26](#), se detectó una banda específica correspondiente a HA-Rho2 cuando inmunoprecipitamos la proteína Rga2-13Myc, sugiriendo que ambas proteínas interactúan *in vivo*. En cuanto al ensayo de co-inmunoprecipitación con la GTPasa Cdc42, se observó una banda débil correspondiente a HA-Cdc42 en los inmunoprecipitados con anticuerpos anti-Myc, en células que producían Rga2-13Myc y HA-Cdc42, indicando que estas dos proteínas podrían interactuar ([Figura 26](#)). En el ensayo de co-inmunoprecipitación de Rga2 con Rho1, no se apreció ninguna interacción ([Figura 26](#)).



9. Rga2 regula negativamente la biosíntesis de la pared celular

9.1. Análisis del papel de Rga2 en la integridad de la pared celular

Se ha descrito que en *Schizosaccharomyces pombe*, la GTPasa Rho2 señala a través de la quinasas Pck2 (homóloga de la proteína quinasas C) en la regu-

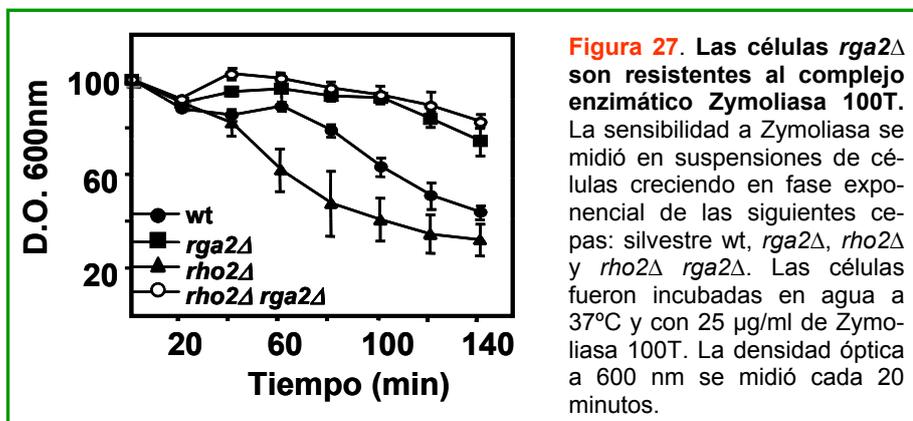
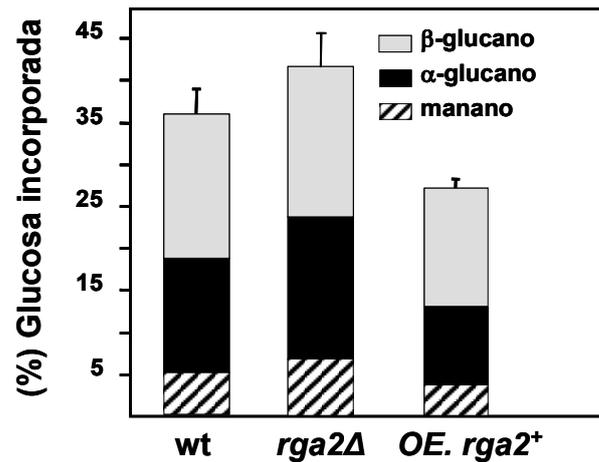


Figura 27. Las células *rga2Δ* son resistentes al complejo enzimático Zymoliasa 100T. La sensibilidad a Zymoliasa se midió en suspensiones de células creciendo en fase exponencial de las siguientes cepas: silvestre wt, *rga2Δ*, *rho2Δ* y *rho2Δ rga2Δ*. Las células fueron incubadas en agua a 37°C y con 25 µg/ml de Zymoliasa 100T. La densidad óptica a 600 nm se midió cada 20 minutos.

lación de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular (Calonge *et al.*, 2000) y en la activación de la ruta MAPK (Mkh1-Pek1-Pmk1) de integridad celular (Ma *et al.*, 2006). Para estudiar el posible papel de la proteína Rga2 en la regulación de la GTPasa Rho2, lo primero que analizamos fue el efecto de esta GAP en la integridad de la pared celular. Se ha descrito que la cepa *rho2Δ* es muy sensible al tratamiento con Zymoliasa 100T (Calonge *et al.*, 2000). La Zymoliasa 100T es un complejo enzimático que incluye β -glucanasas y es capaz de degradar el β -(1,3)-glucano de la pared de levaduras. Se analizó el efecto de la Zymoliasa 100T en la cepa *rga2Δ* y observamos que es más resistente que la estirpe silvestre (Figura 27). Este dato concuerda con el hecho de que Rga2 sea un regulador negativo de la GTPasa Rho2 ya que en la cepa *rga2Δ* hay más cantidad de GTP-Rho2 y por tanto más α -glucano. La mayor cantidad de este polímero podría conferir a las células mayor resistencia frente a la degradación de β -glucano. Sin embargo, la cepa del doble mutante *rho2Δ rga2Δ* se comporta igual que la cepa *rga2Δ* en el tratamiento a este compuesto (Figura 27). Este dato nos sugiere que Rga2 participa en la regulación de la síntesis de la pared celular no sólo como regulador negativo de Rho2, sino en otras vías que actualmente desconocemos.

9.2. Las células *rga2Δ* presentan defectos en la composición de la pared celular

Para analizar la función de Rga2 en la regulación de la biosíntesis de la pared celular, determinamos la composición de la pared celular en las células que sobreexpresaban *rga2⁺* y en células carentes del gen *rga2⁺* en comparación con células silvestres. La incorporación de ^{14}C -glucosa en los distintos polímeros de pared (β -glucano, α -glucano y manano) se determinó tal y como se describe en el apartado 9 de Materiales y Métodos. Como se observa en la figura 28 en las células *rga2Δ* se produjo un incremento significativo de la cantidad de



	manano	α-glucano	β-glucano
wt	5,0 ± 1,7	13,5 ± 1,2	17,5 ± 1,5
<i>rga2Δ</i>	6,8 ± 1,1	16,0 ± 2,9	19,0 ± 1,3
OE. <i>rga2+</i>	3,9 ± 0,9	9,4 ± 0,2	13,8 ± 1,3

Figura 28. Composición de la pared celular de cepas con diferentes niveles de la proteína Rga2.

Células crecidas durante 14 horas sin tiamina a la temperatura de 32°C, se incubaron 6 horas con ^{14}C -glucosa y posteriormente se realizó el fraccionamiento y análisis de la pared celular como se describe en el apartado 9 de Materiales y Métodos. En la gráfica se representan los niveles relativos de incorporación de ^{14}C -glucosa en cada uno de los polímeros que forman la pared celular en la cepa silvestre (wt), *rga2Δ* y en las células transformadas con el plásmido de sobreexpresión pREP3X-*rga2+* (OE. *rga2+*). Los valores representados son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la incorporación de ^{14}C -glucosa en la pared. La tabla representa los valores numéricos medios y la desviación estándar expresados como porcentajes del total de ^{14}C -glucosa incorporada en cada uno de los polímeros de los tres experimentos independientes realizados en cada cepa.

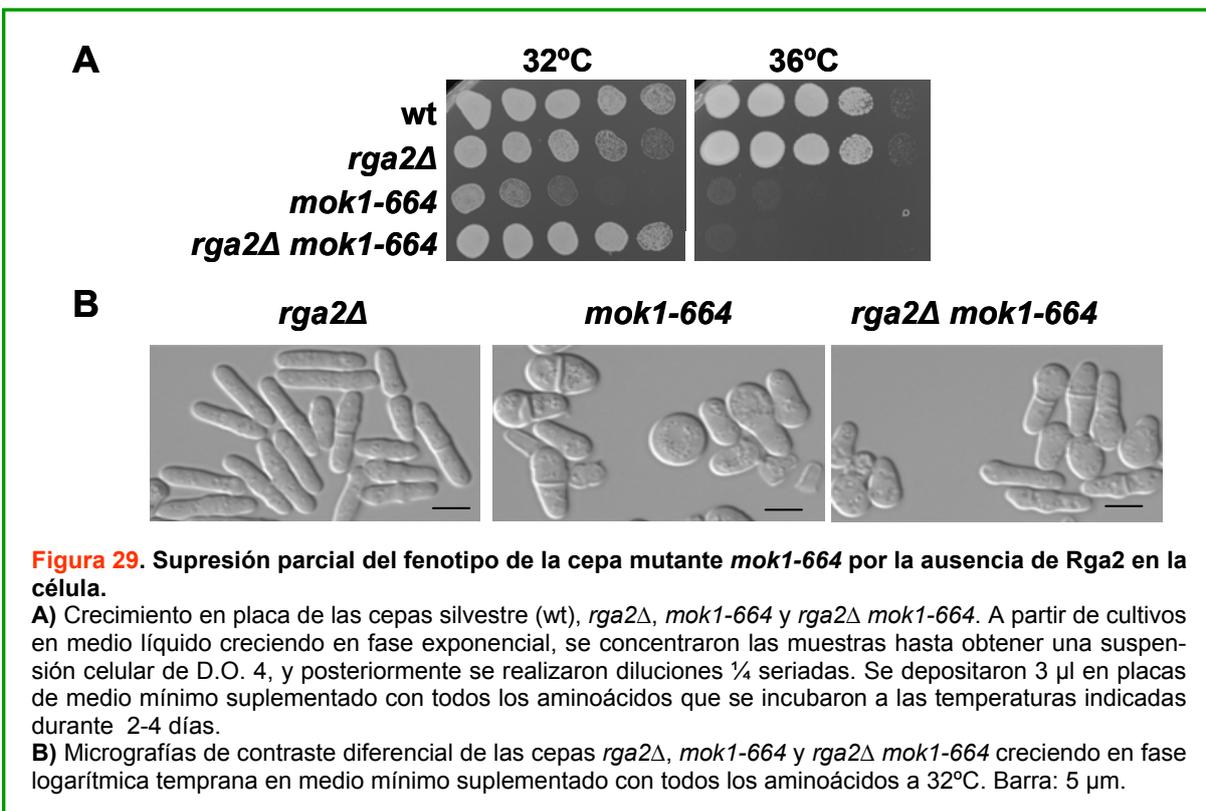
glucosa incorporada en el total de pared celular ($35,3 \pm 2,9$ % en las células silvestres frente a $42,1 \pm 3,1$ % en las células *rga2Δ*). Se detectó un incremento en todos los polímeros de la pared pero el que más aumentó fue el α-glucano, con un incremento del 24 %. Por el contrario, las células que sobreexpresaron *rga2+* mostraron un descenso en la cantidad de glucosa incorporada en la pared celular ($35,3 \pm 2,9$ % en las células silvestres frente a $27,1 \pm 1,4$ % en las células que sobreexpresaron *rga2+*). También fue la cantidad de α-glucano la que sufrió un mayor descenso, específicamente un 30 %.

Todos estos resultados indican que Rga2 está regulando negativamente la biosíntesis de la pared celular, particularmente la del α-glucano.

Como mencionamos en el Apartado 2 de Resultados, en torno a un 15 % de las células que sobreexpresan *rga2+* muestran acúmulos anormales de calcoflúor y un 15-20 % de lisis celular (Figuras 15 y 16). Sin embargo, cuando se sobreexpresó el gen *rga2+* en la cepa *rho2Δ* observamos una importante reducción de estos acúmulos (14 % en células silvestres frente a 4 % en células *rho2Δ*) y de la lisis celular (18 % en células silvestres a 5 % en células *rho2Δ*). Estos datos sugieren que los defectos en integridad celular causados por la sobreexpresión de *rga2+* son mediados, al menos parcialmente, por la GTPasa Rho2.

9.3. La delección del gen *rga2*⁺ suprime parcialmente los defectos de la cepa mutante termosensible *mok1-664*

Dado los resultados obtenidos en el fraccionamiento celular, nos propusimos estudiar la relación funcional entre Rga2 y la probable α -glucán sintasa, Mok1, que está regulada por la quinasa Pck2 (Katayama *et al.*, 1999) y por la GTPasa Rho2 (Calonge *et al.*, 2000). Mok1 es una proteína esencial. Existe una cepa mutante termosensible *mok1-664*, con una mutación puntual en el aminoácido 876 de la proteína Mok1, que es incapaz de crecer a 36°C. A esta temperatura, las células mutantes adoptan una morfología aberrante y se lisan, a menos que se encuentre presente en el medio de cultivo un estabilizador osmótico (Katayama *et al.*, 1999). Se construyó la cepa *rga2* Δ *mok1-664* y se comparó su crecimiento a distintas temperaturas con la cepa del mutante *mok1-664*. Como se puede ver en la **figura 29A**, la cepa *mok1-664* presenta un defecto de crecimiento a 32°C, mientras que la cepa *rga2* Δ *mok1-664* es capaz de crecer mejor a esta temperatura. Además, las células *rga2* Δ *mok1-664* presentan una morfología más parecida a una estirpe silvestre que la cepa *mok1-664* (**Figura 29B**). Sin embargo, la delección de *rga2*⁺ no es suficiente para corregir la termosensibilidad de la cepa mutante *mok1-664* (**Figura 29A**). Por tanto, *rga2* Δ suprime parcialmente los defectos de la cepa *mok1-664*. Esto se podría deber a que en las células *rga2* Δ hay mayores niveles de Rho2 activa que compensan parcialmente la menor actividad de Mok1 encargada de la síntesis del α -glucano, que es un polímero esencial para la

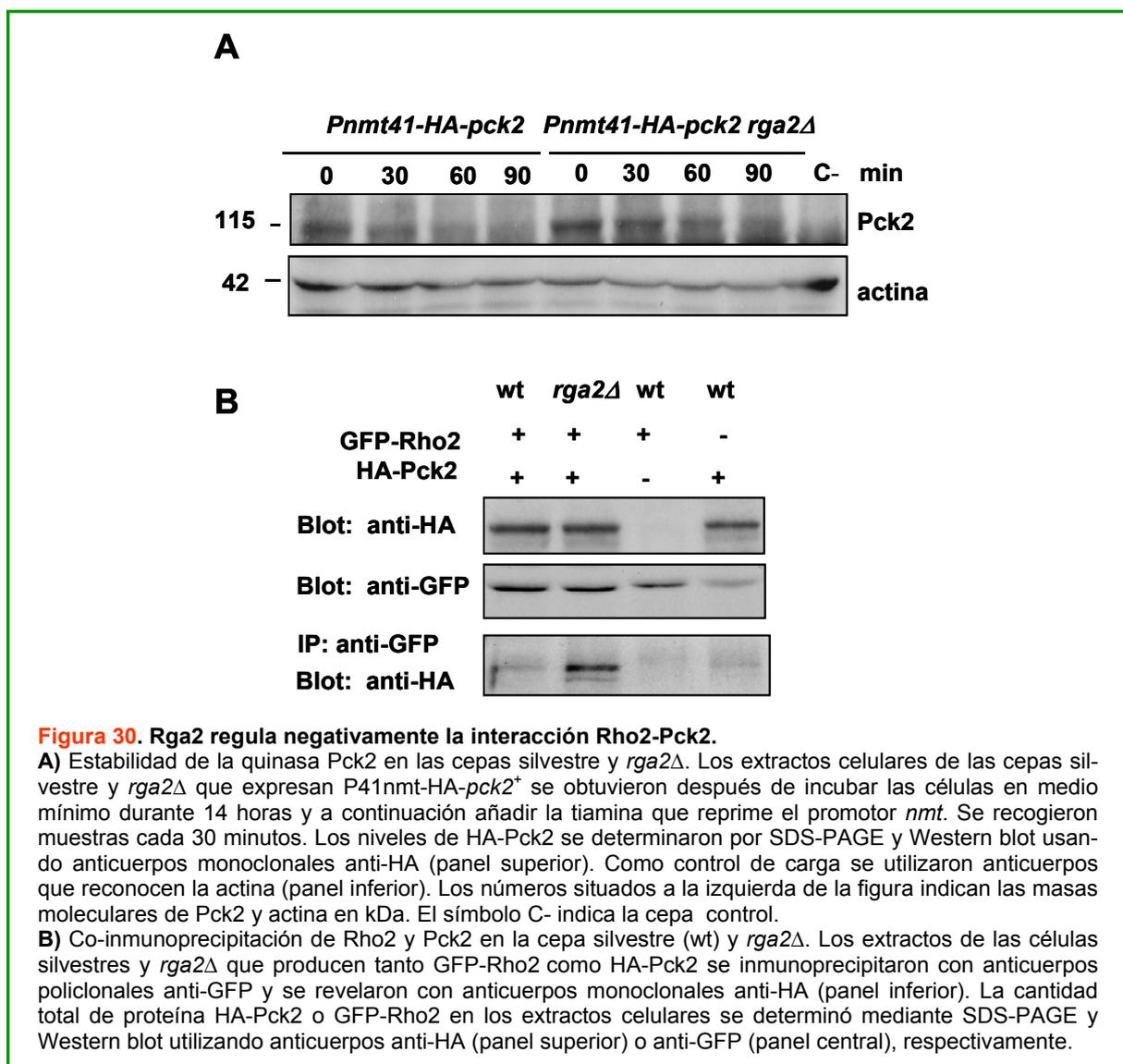


supervivencia de la levadura. Todos estos datos corroboran que Rga2 actúa como GAP de Rho2 y participa en la regulación de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular.

9.4. Papel de Rga2 en la interacción de Rho2 con la quinasa Pck2

Se ha descrito que Rho1 y Rho2 unidas a GTP interaccionan con las quinasas Pck1 y Pck2 y se ha demostrado que Rho1 activa es capaz de estabilizar a estas quinasas (Arellano *et al.*, 1999a; Sayers *et al.*, 2000). La quinasa Pck2 es el único efector conocido de la GTPasa Rho2 y una posibilidad es que la activación de Rho2, de forma análoga a la de Rho1, produzca una estabilización de la quinasa (Calonge *et al.*, 2000; Ma *et al.*, 2006).

Con el fin de estudiar si Rga2 regula negativamente la interacción Rho2-Pck2, se realizaron experimentos en los que se determinaron los niveles de la quinasa Pck2 en células carentes de *rga2*⁺. Se construyó la cepa *P41nmt1-HA-pck2*⁺ *rga2* Δ que carece del gen *rga2*⁺ y tiene el gen *pck2*⁺ bajo el control de un promotor inducible (*nmt41*). Las células se



incubaron durante 14 horas en ausencia de tiamina para inducir la expresión del gen *pck2*⁺. Posteriormente, se añadió tiamina al medio, reprimiendo de esta manera la expresión de la quinasa y se tomaron muestras a intervalos de 30 minutos. Los niveles de HA-Pck2 se detectaron mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA. En las células silvestres se observó una disminución de los niveles de HA-Pck2 a partir de los 30 minutos mientras que en las células *rga2Δ* la desaparición de la proteína Pck2 fue mucho más lenta y a los 90 minutos todavía había niveles detectables de la quinasa (Figura 30A). Este resultado indica que la proteína Rga2 regula negativamente la estabilidad de Pck2, probablemente a través de su regulación negativa sobre la GTPasa Rho2.

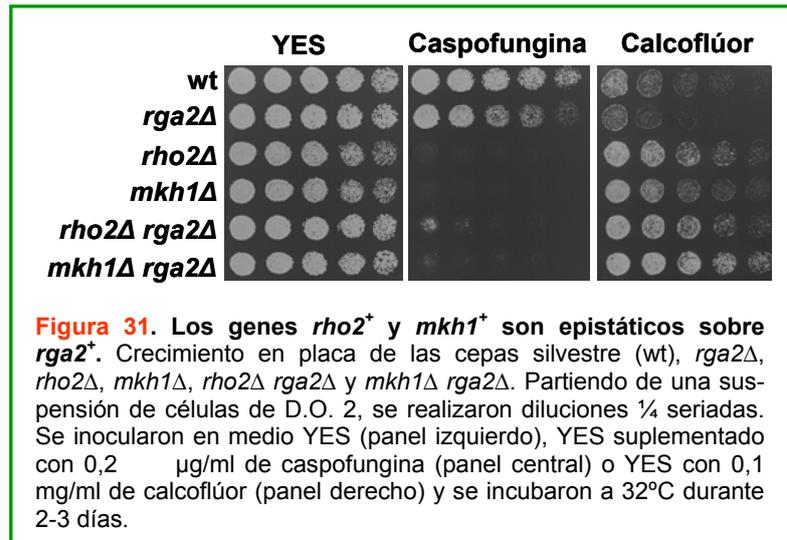
Para demostrar que el efecto de Rga2 sobre Pck2 se debía a su actividad GAP sobre Rho2, se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación entre las proteínas Rho2 y Pck2 en presencia y ausencia de Rga2. GFP-Rho2 se inmunoprecipitó con anticuerpos anti-GFP en extractos celulares de las cepas: *GFP-rho2*⁺ *HA-pck2*⁺ y *GFP-rho2*⁺ *HA-pck2*⁺ *rga2Δ*. Posteriormente tanto los inmunoprecipitados como los extractos celulares se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA y anti-GFP. Como se observa en la figura 30B la interacción entre las proteínas Rho2 y Pck2 es mucho más fuerte en ausencia de Rga2. Estos resultados indican que Rga2 regula negativamente la interacción Rho2-Pck2 y concuerdan con el hecho de que en la cepa *rga2Δ* los niveles de Rho2 activa son más altos, y esto incrementa la interacción de Rho2 con su efector Pck2.

10. Rga2 regula negativamente a la GTPasa Rho2 en la ruta MAPK de integridad celular (Mkh1-Pek1-Pmk1)

10.1. Los genes *rho2*⁺ y *mkh1*⁺ son epistáticos sobre *rga2*⁺

Como hemos mencionado anteriormente, la GTPasa Rho2 unida a GTP interacciona con la quinasa Pck2 y activa la ruta MAPK de integridad celular (Ma *et al.*, 2006). Actualmente en *S. pombe* se conocen tres rutas MAPK: la cascada de respuesta a estrés (SAPK), la ruta activada por feromonas y la ruta de integridad celular. Esta última está compuesta por el módulo de quinasas formado por Mkh1 (MAPKKK), Pek1/Shk1 (MAPKK) y Pmk1/Spm1 (MAPK) (Loewith *et al.*, 2000; Sengar *et al.*, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996a; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997). Esta ruta se activa en respuesta a múltiples condiciones de estrés (Madrid *et al.*, 2006) y está implicada en el mantenimiento de la integridad celular, citoquinesis, homeostasis iónica y fusión vacuolar. La disrupción de cualquiera de los componentes del módulo de MAPKs produce células con hipersensibilidad al potasio y a las enzimas β -(1,3)-glucanasas y con defectos en fusión va-

cuolar (Bone *et al.*, 1998; Loewith *et al.*, 2000; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996a; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997). Recientemente, se ha descrito que las cepas mutantes carentes de los genes del módulo de MAPK de integridad celular son también hipersensibles a micafungina, una equinocandina que afecta a la pared celular (Ma *et al.*, 2006).



dina que afecta a la pared celular (Ma *et al.*, 2006).

Con el fin de estudiar el papel de Rga2 en esta ruta MAPK, analizamos la posible interacción genética entre esta proteína y alguno de los componentes de la cascada de MAPK, concretamente Mkh1 (MAPKKK). Para ello, se realizaron una serie de ensayos de crecimiento en placa con diferentes compuestos que afectan a la pared celular. Se utilizaron la caspofungina, equinocandina que inhibe la actividad de la β -(1,3)-glucán sintasa, y el calcoflúor, antifúngico que se une a la pared celular y altera el ensamblaje correcto de sus componentes, concretamente del β -(1-3)-glucano lineal. Como se observa en la **figura 31**, *rga2Δ* no es hipersensible a caspofungina y crece igual que una cepa silvestre a una concentración de 0,2 μg/ml de esta droga, mientras que las cepas mutantes dobles *rho2Δ rga2Δ* y *mkh1Δ rga2Δ* presentan hipersensibilidad igual que las cepas mutantes simples *rho2Δ* y *mkh1Δ*. Por el contrario, con una concentración de 0,1 mg/ml de calcoflúor, tanto *rga2Δ* como la cepa silvestre son incapaces de crecer, mientras que las cepas mutantes dobles *rho2Δ rga2Δ* y *mkh1Δ rga2Δ* son resistentes a esta concentración de calcoflúor, como las cepas mutantes simples *rho2Δ* y *mkh1Δ* (**Figura 31**). Estos resultados nos indican que *mkh1⁺* y *rho2⁺* son epistáticos sobre *rga2⁺*.

10.2. El dominio GAP de Rga2 es necesario para la función de esta proteína en la homeostasis del Cl⁻

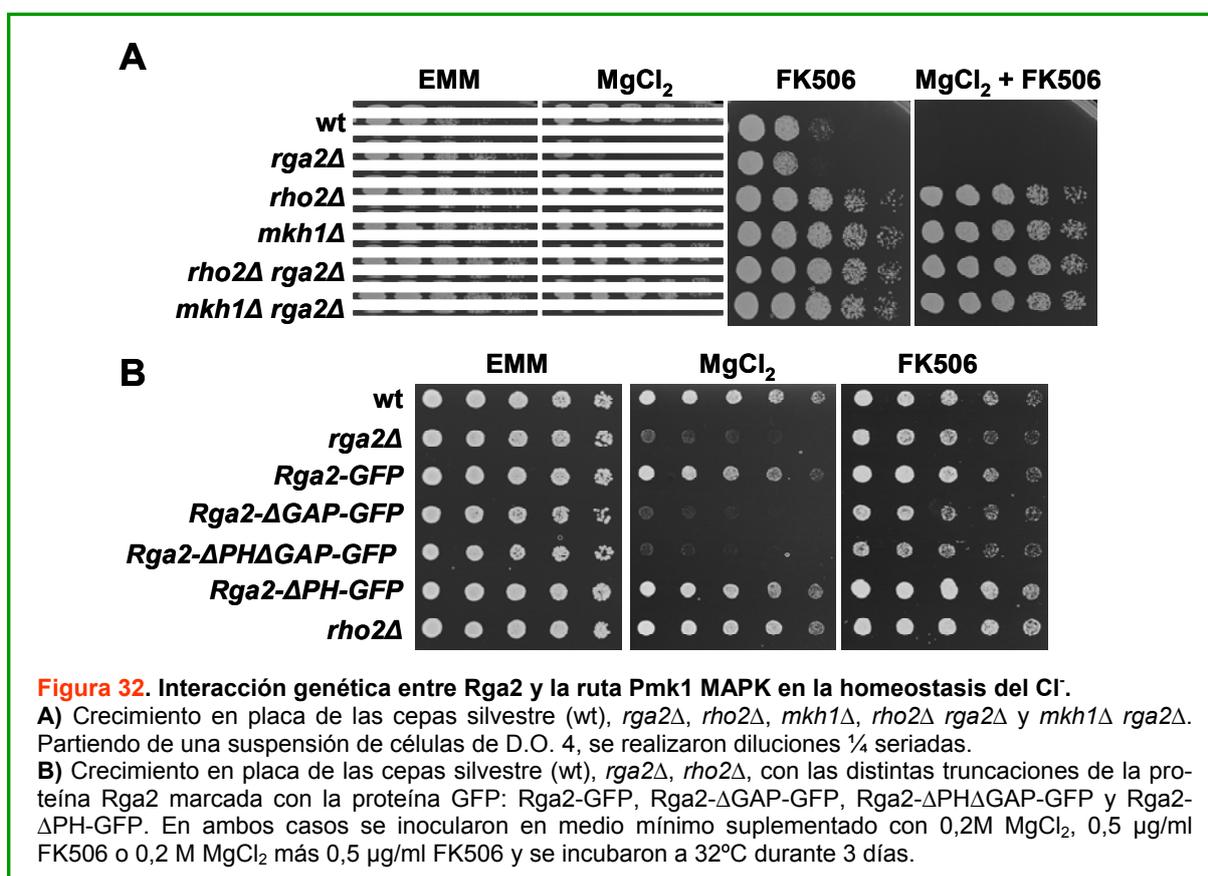
La calcineurina es una proteína fosfatasa de tipo 2B, dependiente de calmodulina y calcio, que está implicada en procesos de polaridad celular, conjugación y posicionamiento del cuerpo polar del huso mitótico (SPB) y del núcleo (Yoshida *et al.*, 1994). En *S. pombe*, la eliminación de la actividad de esta fosfatasa, bien eliminando el gen *ppb1⁺* (que codifica la subunidad catalítica) o bien inhibiendo su actividad mediante inmunosupresores como FK506, produce hipersensibilidad al cloruro de magnesio. Sin embargo, las cepas mutantes

carentes de alguno de los genes de la ruta de señalización Pmk1 MAPK son capaces de crecer en presencia de $MgCl_2$, aún en ausencia de la calcineurina.

Basándose en la interacción de este módulo de MAPK con la calcineurina se ha descrito el fenotipo *vic* (*viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion*) y se ha observado que todas las cepas mutantes carentes de alguno de los genes de esta ruta presentan fenotipo *vic*, es decir, son viables en presencia del inmunosupresor FK506 y altas concentraciones de $MgCl_2$ (Sugiura *et al.*, 1999; Sugiura *et al.*, 1998).

Para estudiar el posible papel de Rga2 en la ruta de integridad, se realizaron ensayos de sensibilidad a $MgCl_2$ con las mismas cepas detalladas en el apartado anterior y observamos que *rga2Δ* es hipersensible a una concentración de 0,2M $MgCl_2$ y ligeramente más sensible que las células silvestres al inmunosupresor FK506 (Figura 32A). Por el contrario, las cepas mutantes dobles *rho2Δ rga2Δ* y *mkh1Δ rga2Δ* no son hipersensibles a $MgCl_2$ y son más resistentes al compuesto FK506, al igual que las cepas mutantes simples *rho2Δ* y *mkh1Δ* (Figura 32A). Todos estos resultados, junto con los anteriores, indican que Rga2 participa en la ruta MAPK de integridad celular, regulando negativamente a la GTPasa Rho2 y a la actividad de la MAPK Pmk1.

Para corroborar que el dominio GAP de Rga2 está implicado en el papel que ejerce esta proteína en la ruta de integridad, determinamos la sensibilidad a $MgCl_2$ de las cepas que contienen las distintas proteínas truncadas de Rga2: Rga2-ΔGAP-GFP,



Rga2- Δ PH Δ GAP-GFP y Rga2- Δ PH-GFP. Como se observa en la [figura 32B](#) el dominio GAP es necesario para la función de Rga2 en la homeostasis del MgCl₂.

10.3. La sobreexpresión de *rga2*⁺ causa un descenso en la activación de Pmk1 en respuesta a estrés hiperosmótico.

Con el fin de analizar con más profundidad la regulación ejercida por Rga2 sobre Pmk1, se determinó la actividad de Pmk1 bajo condiciones de estrés hiperosmótico en las siguientes cepas: wt, *rga2* Δ , *rho2* Δ y *rho2* Δ *rga2* Δ . Todas ellas presentan una copia del gen *pmk1*⁺ bajo el control de su propio promotor y fusionado en su extremo 3' a secuencias que codifican dos epítopos HA y seis histidinas consecutivas (HA6His).

Los cultivos en fase exponencial se sometieron a estrés hiperosmótico (0,6M KCl) y se tomaron alícuotas a distintos tiempos, las muestras se procesaron según se indica en el apartado 12 de Materiales y Métodos. La proteína Pmk1 se purificó mediante bolas de Ni²⁺ que presentan afinidad por las 6His y se analizó la fracción de Pmk1 fosforilada mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos policlonales anti-fosfo-p44/42 que detectan el estado activo de Pmk1. Los niveles de la proteína Pmk1 se detectaron a partir de los extractos celulares, mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA. Sorprendentemente, no observamos diferencias significativas en la fosforilación de Pmk1 entre *rga2* Δ y la cepa silvestre. No se apreciaron cambios ni en la actividad basal ni cuando las células se sometieron a estrés hiperosmótico. Sin embargo, en células *rho2* Δ o *rho2* Δ *rga2* Δ sí se apreció que la ruta no se activaba ([Figura 33A](#)).

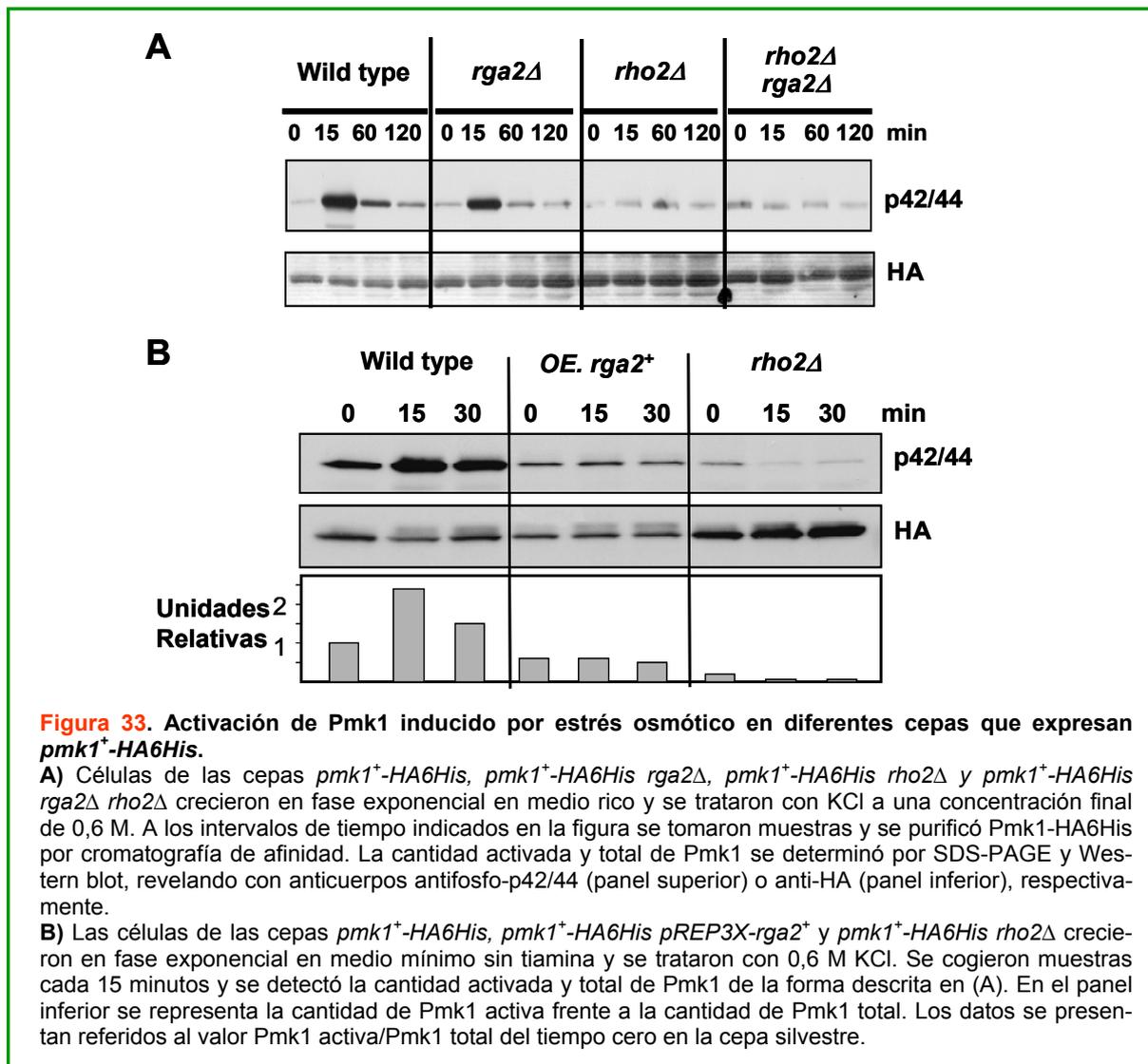
Existen al menos dos posibles explicaciones a estos resultados:

- A. Que los efectos de Rga2 en la integridad celular y en la homeostasis del MgCl₂ sean mediados por una ruta alternativa independiente de la activación de Pmk1 MAPK y dependiente de Rho2.
- B. Que Rga2 no sea el único GAP de la GTPasa Rho2 y otras GAPs estén regulando negativamente a Rho2 en esta ruta de integridad.

Si esta última hipótesis fuera correcta, la hiperactivación de Pmk1 causada por la falta de Rga2 podría ser mínima y difícil de detectar bioquímicamente. Por el contrario, la sobreexpresión del gen *rga2*⁺ podría causar un descenso en el nivel de fosforilación de Pmk1 que se podría detectar más fácilmente.

Con el fin de verificar esta última hipótesis, se midieron los niveles de fosforilación de Pmk1 en células que sobreexpresaban *rga2*⁺. Como se observa en la [figura 33B](#) se produjo un claro descenso de los niveles de fosforilación de Pmk1, tanto a nivel basal como en respuesta a estrés hiperosmótico en las células que sobreexpresaban *rga2*⁺. Estos resultados nos indican que Rga2 participa en la ruta MAPK de integridad regulando negativamente a

la GTPasa Rho2 pero sugiere la presencia de otros reguladores negativos de la GTPasa en la célula.

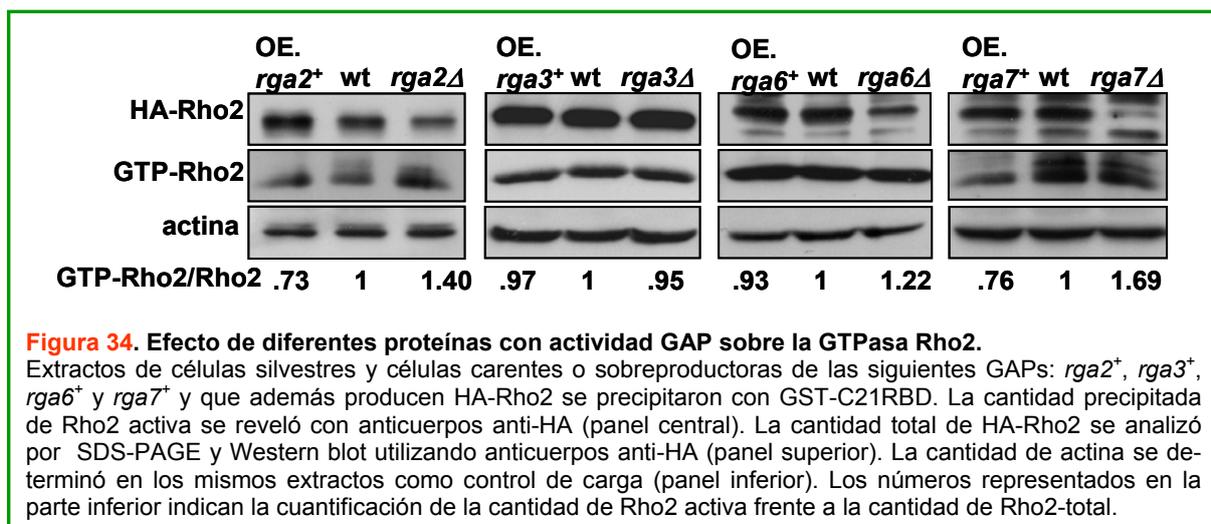


11. Efectos de otras GAPs sobre la GTPasa Rho2

Decidimos estudiar por tanto si otras proteínas podían ser reguladoras negativas de la GTPasa Rho2. En *S. pombe* existen varias RhoGAPs ya descritas: Rga1, Rga5 y Rga8 son proteínas con actividad GAP sobre la GTPasa Rho1 (Calonge *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003) y Rga4 es una GAP de Cdc42 (Tatebe *et al.*, 2008). Además, existen otras proteínas como, Rga3, Rga6 y Rga7 cuya especificidad como GAP se desconoce y por ello nos propusimos estudiarlas. Para ello, mediante ensayos de *pull-down* ya detallados anteriormente, analizamos *in vivo* los niveles de la GTPasa Rho2 activa en células que sobreproducían o carecían de las distintas GAPs. No se apreciaron diferencias en los niveles de Rho2 activa cuando variaban los niveles de Rga3 (Figura 34). Con respecto a Rga6,

se observa un ligero aumento de los niveles Rho2 activa en la cepa *rga6Δ* (122 % respecto a la cepa silvestre). Por último, en células que sobreexpresaban *rga7⁺* se observó un descenso claro de los niveles GTP-Rho2, mientras que en células carentes de esta GAP se observó un incremento de GTP-Rho2 (Figura 34). Por tanto, Rga7 es una proteína con actividad GAP para la GTPasa Rho2. La proteína Rga7 contiene 695 aminoácidos y presenta en su extremo N-terminal un dominio FCH (Fes/CIP4 homology), relacionado con la interacción de fosfolípidos de membrana (Tsujita *et al.*, 2006) y en su extremo C-terminal el dominio RhoGAP, común a todas las proteínas Rga. En su estructura primaria, se asemeja a Rgd1 de *S. cerevisiae*, GAP de las GTPasas Rho3 y Rho4 en la levadura de gemación (Barthe *et al.*, 1998).

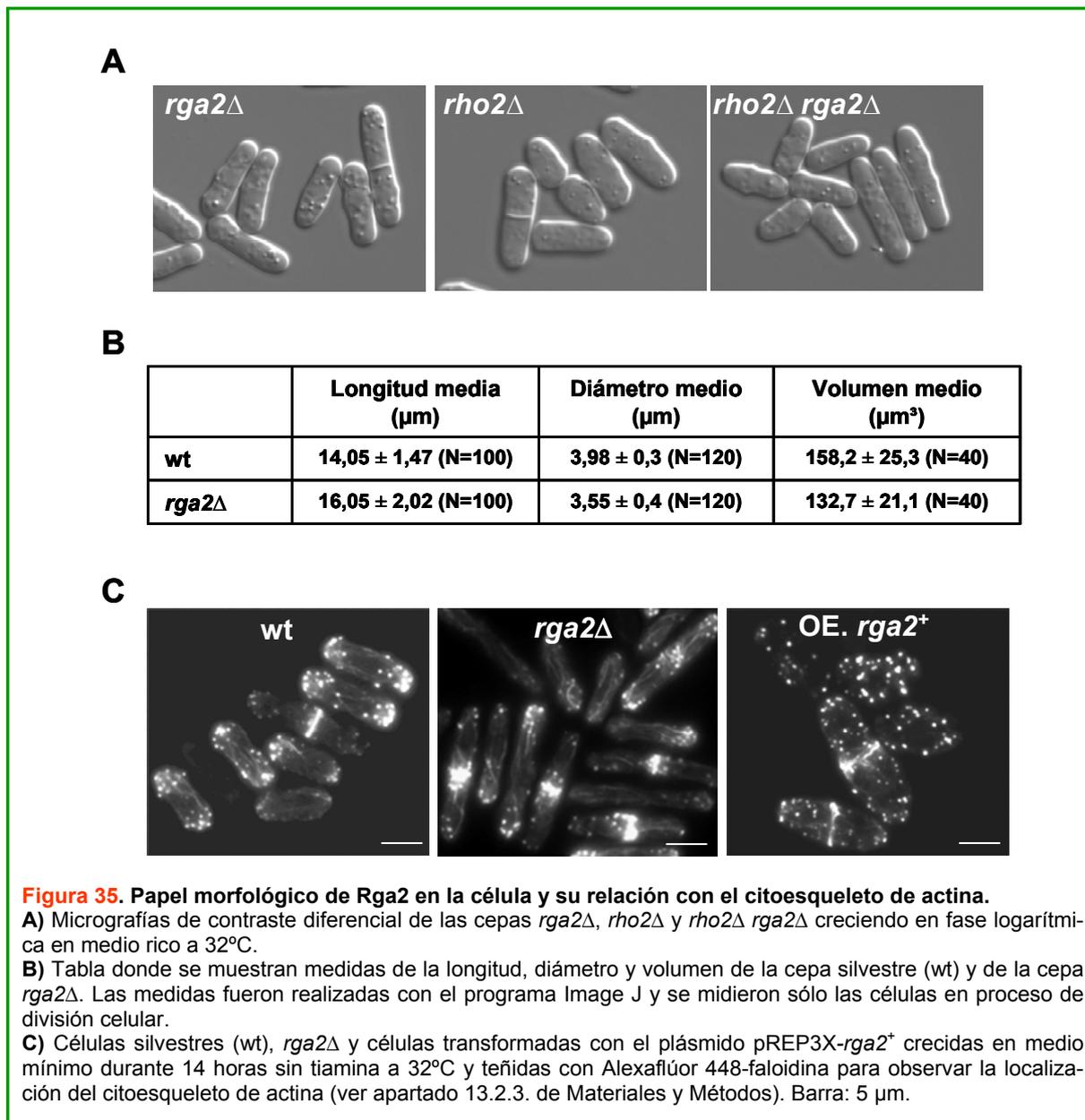
Todos estos resultados indican que Rga2, Rga7 y, quizás Rga6, poseen actividad GAP sobre Rho2. Además, se apreció una reducción de los niveles totales de la proteína Rho2 en las cepas *rga6Δ* y *rga7Δ* (86 % y 59 % respectivamente respecto a la estirpe silvestre), al igual que habíamos observado en la cepa *rga2Δ* (Figura 34). Podría ocurrir, por tanto, que Rho2 se degradase una vez que se ha activado.



12. Rga2 regula la morfología celular independientemente de la GTPasa Rho2

12.1. Análisis del citoesqueleto de actina en células que sobreexpresan *rga2⁺* y en células *rga2Δ*

Uno de los interrogantes que quedaban sin resolver era el posible papel de Rga2 sobre la morfología de la célula. Como se ha descrito en el apartado 2, tanto las células *rga2Δ* como las células que sobreexpresan *rga2⁺* presentan defectos morfológicos (Figura 15).



Las células carentes del gen *rga2*⁺ son células más largas y delgadas y presentan un menor volumen celular que la cepa silvestre (Figura 35B). Por el contrario, las células que sobreexpresan *rga2*⁺ son más cortas y anchas que las células silvestres, lo que indica que Rga2 está implicado en la regulación morfológica de la célula. Esta función no se realiza a través de la GTPasa Rho2 ya que la cepa del mutante doble *rho2*Δ *rga2*Δ presenta el mismo fenotipo morfológico que *rga2*Δ y la sobreexpresión de *rga2*⁺ en la cepa *rho2*Δ sigue causando la aparición de células más cortas y anchas (Figura 35A).

El citoesqueleto de actina está implicado en el crecimiento polarizado y la morfología celular por lo que decidimos estudiar el citoesqueleto de actina en la cepa *rga2*Δ y en células que sobreexpresaban *rga2*⁺. Como podemos observar en la figura 35C, las células

rga2Δ presentan parches de actina más polarizados en los extremos celulares y los cables son ligeramente más gruesos y alargados si los comparamos con las células silvestres. Por el contrario, las células que sobreexpresan *rga2⁺* presentan una mayor dispersión de los parches de actina, encontrándose menos concentrados en los polos celulares si los comparamos con las células silvestres. Estos datos indican que las células que tienen mayores niveles de Rga2 pierden parcialmente la polaridad y sugieren una relación, directa o indirecta, entre Rga2 y el citoesqueleto de actina.

12.2. Relación de las proteínas For3 y Rga2

El citoesqueleto de actina se encuentra más polarizado en la cepa *rga2Δ* con respecto a la estirpe silvestre. Esto podría explicar el que las células de la cepa mutante carente de *rga2⁺* sean más largas y estrechas. Para analizar con más detalle la interacción entre Rga2 y el citoesqueleto de actina, se estudió su relación con la proteína For3, una formina no esencial encargada de

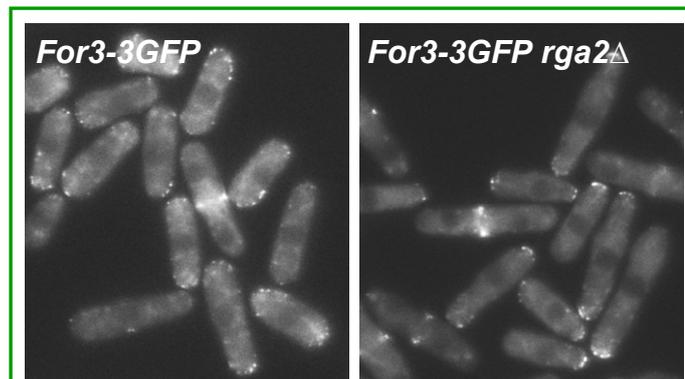
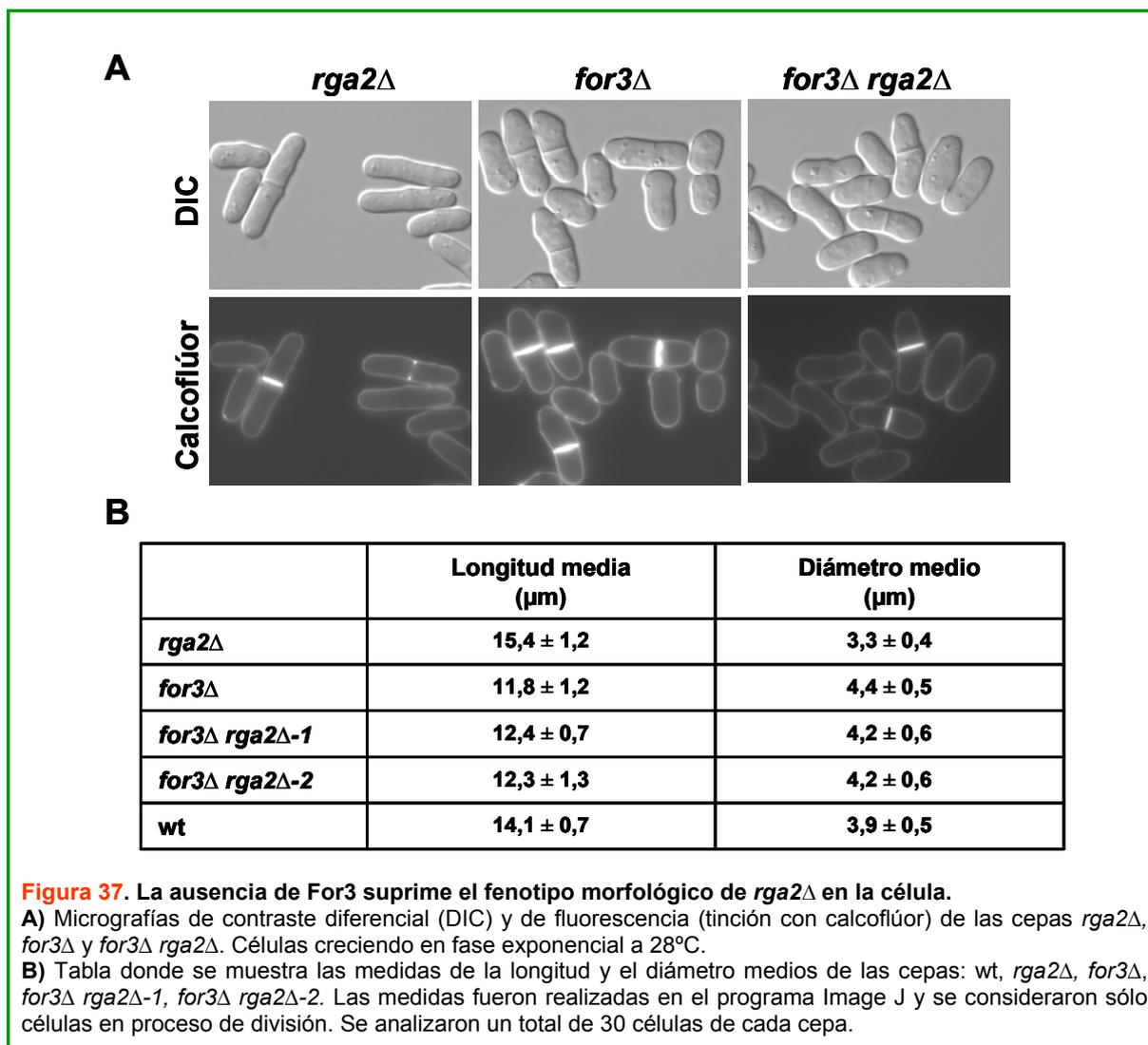


Figura 36. Localización de For3-3GFP en la cepa *rga2Δ*. Localización de For3-3GFP en células silvestres (panel izquierdo) o en células carentes de *rga2⁺* (panel derecho).

ensamblar los cables de actina durante interfase (Feierbach and Chang, 2001; Sawin, 2002). Las células *for3Δ* son viables pero presentan defectos morfológicos, originando células engrosadas o con forma de limón, y defectos en la división, que suele ser asimétrica dando lugar a dos células hijas que difieren en tamaño y en su patrón de crecimiento: una de las células hijas va a crecer de forma monopolar y la otra presenta un crecimiento bipolar prematuro (Feierbach and Chang, 2001; Sawin, 2002) (Nakano *et al.*, 2002). Por tanto, los cables de actina sintetizados por For3 no son esenciales pero contribuyen al crecimiento polarizado (Martin and Chang, 2005; Martin *et al.*, 2007).

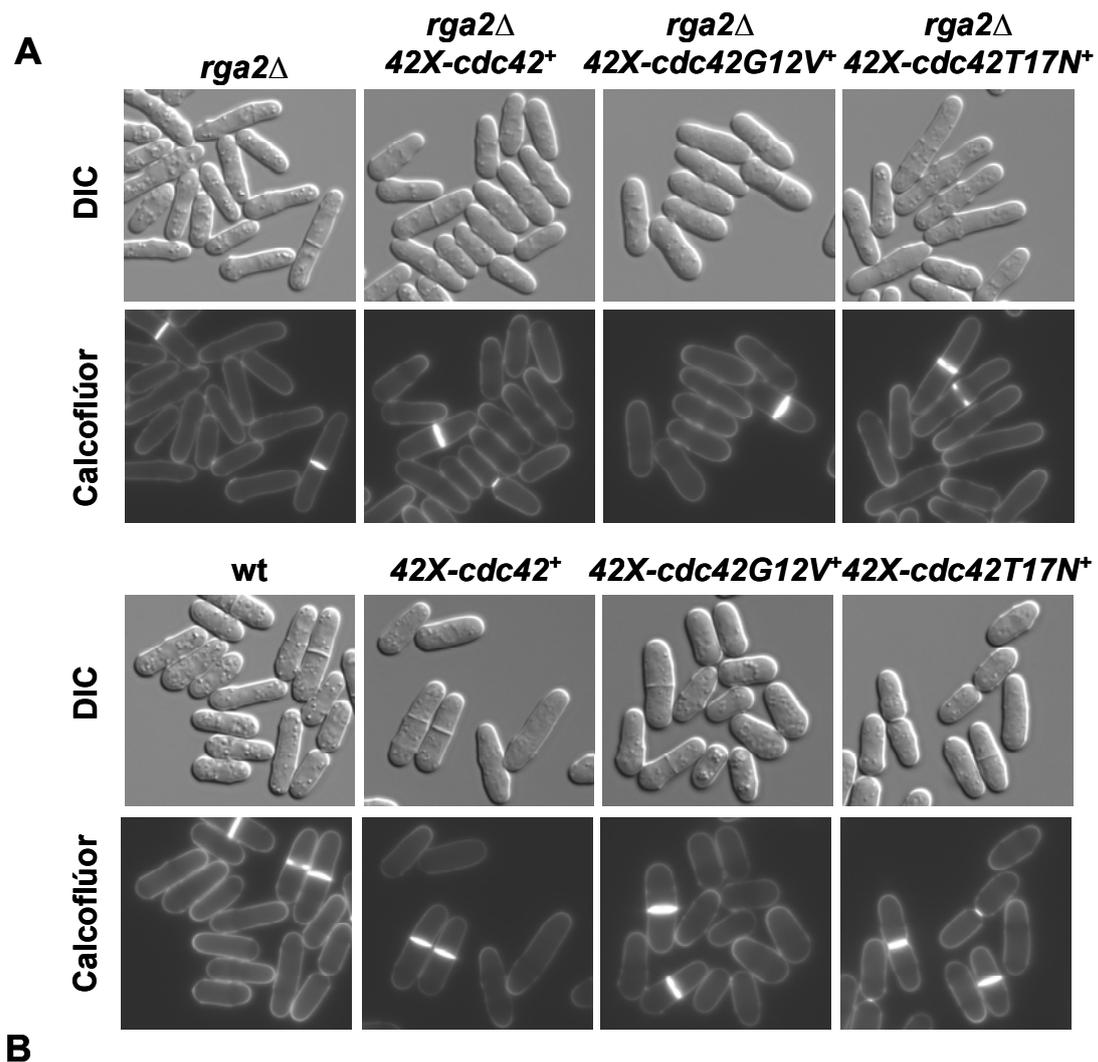
En primer lugar analizamos la localización de la proteína For3-3GFP en la cepa *rga2Δ* y observamos que esta formina se encontraba más concentrada en los polos celulares en *rga2Δ* que en una cepa silvestre (Figura 36). Esto sugiere que For3 se encuentra hiperpolarizada en *rga2Δ* y puede generar cables de actina más fuertes. Para comprobar esta hipótesis, construimos la cepa *for3Δ rga2Δ* y estudiamos su fenotipo morfológico. Como se observa en la figura 37, la cepa *for3Δ rga2Δ* presentó un fenotipo similar a la cepa *for3Δ*. Por tanto, For3 es necesaria para el fenotipo morfológico de *rga2Δ*.

Lo siguiente que nos planteamos fue estudiar la causa de la hiperpolarización de la



formina For3 en *rga2Δ*. Se ha descrito que For3 interacciona por ensayo de doble híbrido con las GTPasas Rho3 y Cdc42 (Nakano *et al.*, 2003) y que esta última GTPasa y la proteína Bud6 son necesarias para eliminar el mecanismo de autoinhibición de la formina For3 (Martin *et al.*, 2007). Como se mencionó en el Apartado 8.1. de Resultados, los niveles de Rho3 activa no se ven alterados por la falta o la sobreexpresión de la proteína Rga2. Sin embargo, los niveles de GTP-Cdc42 sí se modifican cuando existen variaciones en los niveles de esta GAP. Concretamente, en la cepa *rga2Δ* hay un descenso en la cantidad de GTP-Cdc42 con respecto a la cepa silvestre (Figura 24B). Otra prueba de su posible relación con Cdc42, es que observamos que ambas proteínas co-inmunoprecipitan (Figura 26). Todos estos resultados podrían relacionar los bajos niveles de GTP-Cdc42 con la hiperpolarización de la formina For3 en la cepa *rga2Δ*.

Con el fin de comprobar esta hipótesis llevamos a cabo la sobreexpresión del gen *cdc42⁺* en la cepa *rga2Δ* para ver si era capaz de corregir su defecto morfológico. Para ello,



	Longitud media (μm)	Diámetro medio (μm)
<i>rga2</i> Δ	$16,0 \pm 1,5$	$3,0 \pm 0,4$
<i>rga2</i> Δ <i>42X-cdc42</i> ⁺	$15,1 \pm 1,8$	$3,7 \pm 0,4$
<i>rga2</i> Δ <i>42X-cdc42G12V</i> ⁺	$13,6 \pm 1,5$	$3,6 \pm 0,4$
<i>rga2</i> Δ <i>42X-cdc42T17N</i> ⁺	$16,0 \pm 2,0$	$3,2 \pm 0,3$
wt	$14,0 \pm 0,9$	$3,5 \pm 0,3$
wt <i>42X-cdc42</i> ⁺	$15,1 \pm 1,1$	$3,7 \pm 0,4$
wt <i>42X-cdc42G12V</i> ⁺	$12,8 \pm 2,4$	$4,3 \pm 1,0$
wt <i>42X-cdc42T17N</i> ⁺	$14,0 \pm 1,3$	$3,8 \pm 0,3$

Figura 38. La sobreexpresión de *cdc42*⁺ corrige parcialmente el fenotipo morfológico de *rga2* Δ .

A) Micrografías de contraste diferencial (DIC) y de fluorescencia (tinción con calcoflúor) de la cepa silvestre y la cepa carente de *rga2*⁺ que sobreexpresan los siguientes plásmidos: pREP42X, pREP42X-*cdc42*⁺, pREP42X-*cdc42G12V*⁺ y pREP42X-*cdc42T17N*⁺. Las células crecieron en medio mínimo suplementado con aminoácidos durante 16 horas en ausencia de tiamina a 32°C.

B) Tabla donde se exponen las medidas de longitud y diámetro (en micrómetros) de las cepas anteriores. Las medidas fueron realizadas en el programa Image J y se consideraron sólo las células en proceso de división. Se analizaron un total de 30 células de cada cepa.

se transformaron las cepas *rga2Δ* y silvestre (utilizada como control) con los siguientes plásmidos: *pREP42X-cdc42⁺*, *pREP42X-cdc42G12V⁺* y *pREP42X-cdc42T17N⁺* (alelo silvestre, alelo hiperactivo y alelo inactivo, respectivamente). Después de 16 horas de sobreexpresión, observamos las células al microscopio y medimos su longitud y diámetro. Como se observa en la [figura 38](#), la sobreexpresión del alelo silvestre de *cdc42⁺* rescata parcialmente el fenotipo morfológico y las células presentan una morfología semejante a las células silvestres. En el caso del alelo constitutivamente activo, la corrección del fenotipo es mayor, pero este dato no lo consideramos significativo ya que la sobreexpresión de *cdc42G12V⁺* en una cepa silvestre da lugar a células más gruesas y más cortas ([Figura 38](#)). Esta circunstancia no nos permite distinguir si el efecto que vemos en *rga2Δ* es debido a un aumento de los niveles de GTP-Cdc42 o a la compensación de fenotipos independientes. Por otro lado, la sobreexpresión del alelo inactivo no modificó la morfología de las células carentes del gen *rga2⁺* ([Figura 38](#)). Estos datos sugieren que Rga2 regula la morfología de *S. pombe* a través de la GTPasa Cdc42.

12.3. Rga2 y Rga4 son proteínas con funciones opuestas en la regulación de la morfología celular

Se ha descrito que Rga4 es una GAP de la GTPasa Cdc42 que se localiza en las zonas de no crecimiento de la célula (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008). Es una proteína de 933 aminoácidos que presenta en su extremo N-terminal un dominio LIM y en su extremo C-terminal el característico dominio RhoGAP. Está implicada en el control del diámetro celular ya que las células carentes de *rga4⁺* son más cortas y más anchas que las células silvestres (Das *et al.*, 2007). Esta proteína podría ejercer una función opuesta a Rga2 en la morfología celular y en la regulación ejercida sobre la GTPasa Cdc42. Por ello, construimos la cepa *rga2Δ rga4Δ* y estudiamos su fenotipo morfológico. Como se observa en la [figura 39 A y B](#), la cepa *rga2Δ rga4Δ* es similar a la cepa silvestre. El fenotipo morfológico de las cepas mutantes *rga2Δ* y *rga4Δ* se ha compensado. Este resultado sugiere que ambas GAPs tienen un papel opuesto en la morfogénesis de la célula a través de su regulación de la GTPasa Cdc42.

Para corroborar este último resultado, observamos la localización de GTP-Cdc42 en las cepas anteriores y en células que sobreexpresaban *rga2⁺* o *rga4⁺*. Se utilizó, como fondo genético una cepa que expresa la construcción *CRIB-3GFP*, que contiene el dominio CRIB de la proteína Gic2 de *S. cerevisiae* fusionada a tres copias de la proteína verde fluorescente (3GFP) (Tatebe *et al.*, 2008). Este dominio se une específicamente a la GTPasa Cdc42 activa y permite observar su localización *in vivo*. Como se observa en la [figura 39C](#), la señal de GTP-Cdc42 está más concentrada en los polos celulares en la cepa *rga2Δ* y

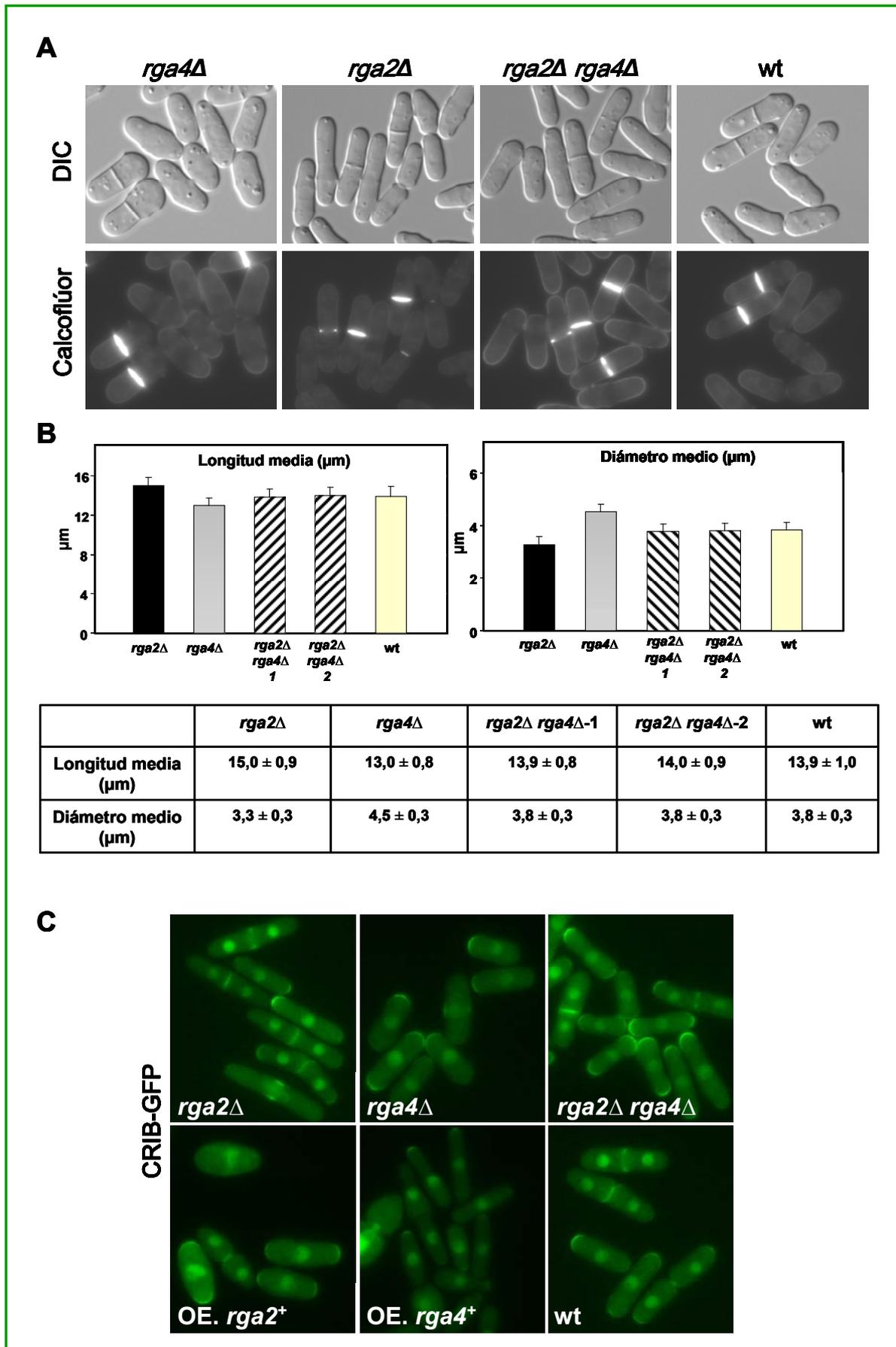


Figura 39. Rga2 y Rga4 son proteínas con funciones opuestas en la regulación de la morfología celular.

A) Micrografías de contraste diferencial (DIC) y de fluorescencia (tinción con calcoflúor) de las siguientes cepas: wt, *rga4* Δ , *rga2* Δ y *rga2* Δ *rga4* Δ . Células en fase logarítmica crecidas en medio rico a 32°C.

B) Gráficas y tabla donde se representan los datos de la longitud y diámetro medios (en micrómetros) de las cepas anteriores. Se analizaron un total de 80 células de cada cepa.

C) Micrografías de fluorescencia de las cepas wt, *rga2* Δ , *rga4* Δ , *rga2* Δ *rga4* Δ , que sobreexpresa *rga2*⁺ (OE. *rga2*⁺) y *rga4*⁺ (OE. *rga4*⁺) y además producen CRIB-GFP. Las células crecieron en medio rico (wt, *rga2* Δ , *rga4* Δ y *rga2* Δ *rga4* Δ) o mínimo (OE. *rga2*⁺ y OE. *rga4*⁺) suplementado con aminoácidos durante 16 horas en ausencia de tiamina a 32°C.

más extendida en la cepa *rga4* Δ con respecto a la localización observada en la estirpe silvestre. Sin embargo, en la cepa *rga2* Δ *rga4* Δ , la localización de Cdc42 activa es similar a la cepa silvestre. Además, en las células que sobreexpresan *rga2*⁺, la señal de CRIB-GFP es más ancha en los polos celulares, mientras que en las células que sobreproducen la proteína Rga4, la señal de GTP-Cdc42 es más estrecha con respecto a la cepa silvestre (Figura 39C). Estos datos sugieren que ambas proteínas tienen funciones antagónicas en la regulación de las dimensiones celulares a través de la GTPasa Cdc42.

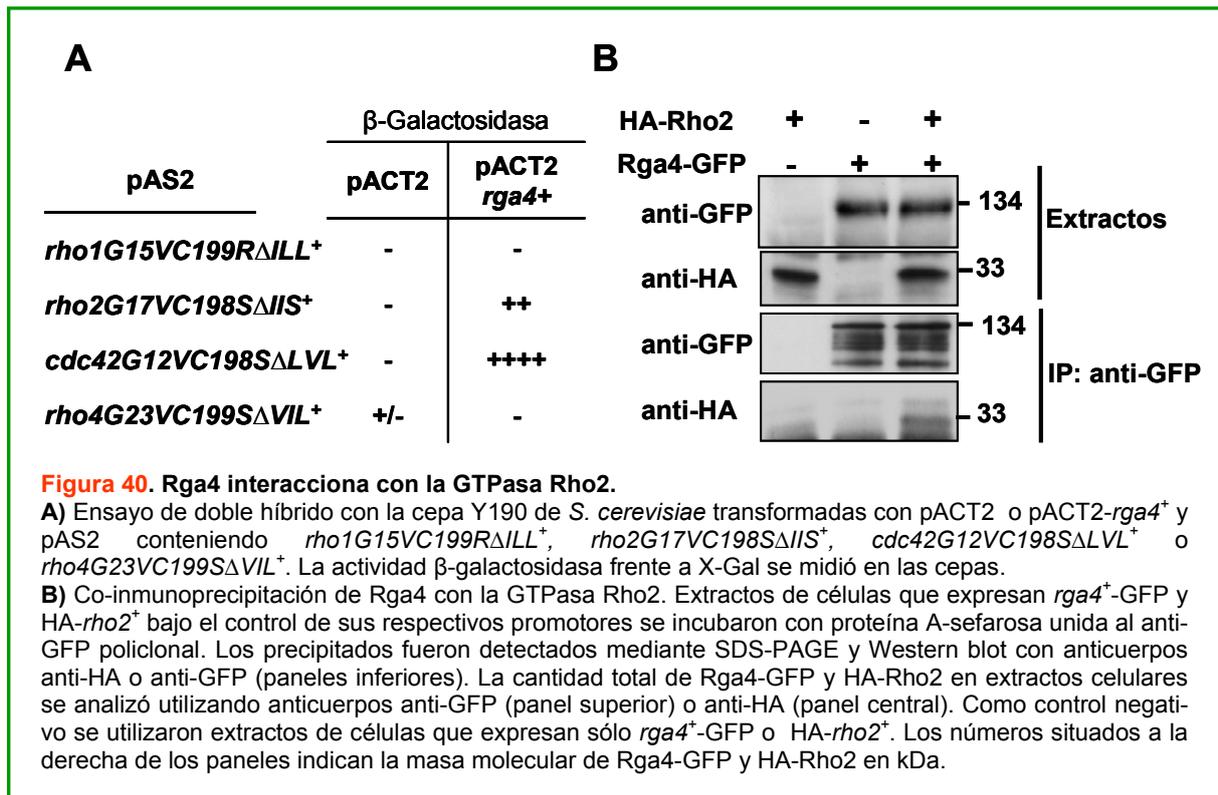
Estudio de la función de la proteína Rga4

13. Rga4 es también una proteína con actividad GAP sobre la GTPasa Rho2

13.1. Rga4 interacciona físicamente y mediante ensayo de doble híbrido con la GTPasa Rho2

Se ha descrito que Rga4 posee actividad GAP sobre Cdc42 y no tiene esta actividad para las GTPasas Rho1 y Rho3 (Tatebe *et al.*, 2008). Sin embargo, no existe ningún estudio sobre la posible relación entre la proteína Rga4 y la GTPasa Rho2.

En los resultados expuestos anteriormente hemos demostrado que las proteínas Rga2 y Rga4 participan en la regulación de la morfología jugando papeles opuestos en la célula. Puesto que hemos demostrado que Rga2 es una GAP específica de Rho2, procedimos a analizar si la proteína Rga4 actúa de alguna forma sobre la GTPasa Rho2. Como una primera aproximación, realizamos un ensayo de doble híbrido entre Rga4 y las GTPasas Rho1, Rho2, Rho4 y Cdc42 en su estado constitutivamente activo. Primero llevamos a cabo la clonación del gen *rga4*⁺ en el plásmido pACT2 en fase con el fragmento que codifica el dominio de activación de la transcripción del gen *GAL4*. Después se transformó la cepa Y190 de *S. cerevisiae* con este plásmido y con cada uno de los plásmidos pAS2 que contienen las distintas GTPasas en fase con el dominio de unión a DNA del gen *GAL4*. Además el extremo C-terminal de estas GTPasas se ha modificado para evitar su unión a la

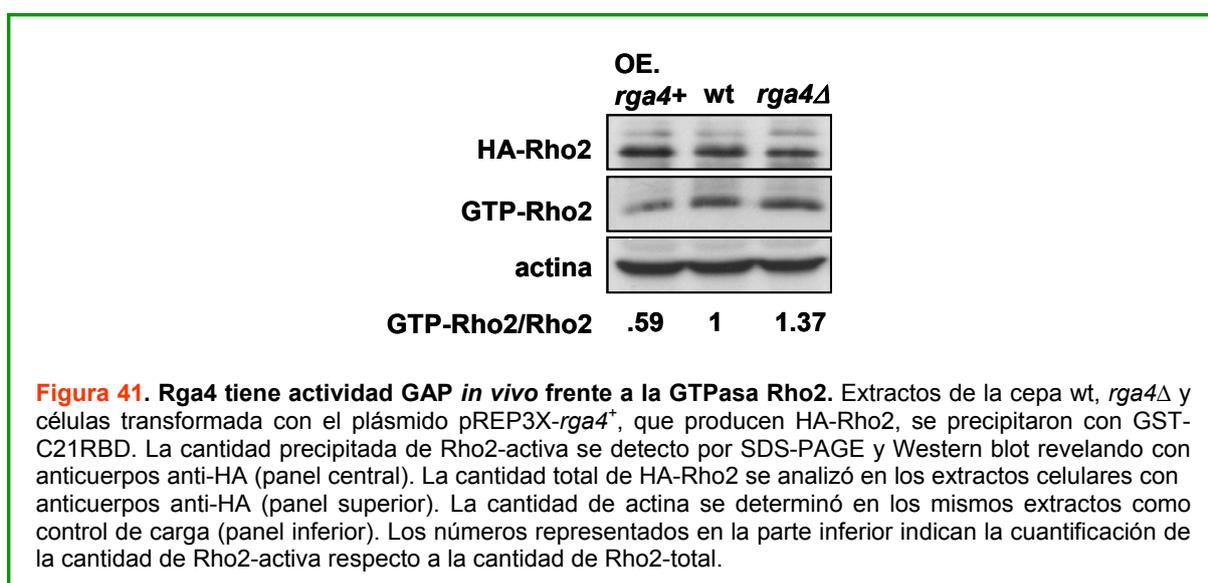


membrana (ver apartado 4 y 6.1.3. de Materiales y Métodos). Para monitorizar la interacción utilizamos el ensayo de la β-galactosidasa según se describe en el Apartado 4 de Materiales y Métodos. En la [figura 40A](#) se observa una fuerte interacción entre Rga4 y el alelo constitutivamente activo de Cdc42. La versión constitutivamente activa de la GTPasa Rho2 mostró una débil pero reproducible interacción con Rga4. Sin embargo, las GTPasas Rho1 y Rho4 no mostraron interacción con esta proteína. Por lo tanto, Rga4, además de ser una GAP de Cdc42, podría ser también una proteína con actividad GAP sobre la GTPasa Rho2.

Para caracterizar con más profundidad la interacción entre ambas proteínas se realizaron experimentos de co-inmunoprecipitación. Para ello se construyó una cepa en la que la GTPasa Rho2 está marcada con el epítipo HA en el extremo N-terminal y la proteína Rga4 está marcada con la proteína GFP en su extremo C-terminal. Utilizando extractos celulares de la cepa HA-*rho2*⁺ *rga4*-GFP⁺ se realizó la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GFP que reconocen la proteína Rga4-GFP. Los complejos inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA que reconocen HA-Rho2 y anti-GFP. Como se observa en la [figura 40B](#), se detectó una banda correspondiente a HA-Rho2 en la inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GFP, por tanto, Rga4 interacciona *in vivo* con la GTPasa Rho2.

13.2. La proteína Rga4 tiene actividad GAP *in vivo* sobre la GTPasa Rho2

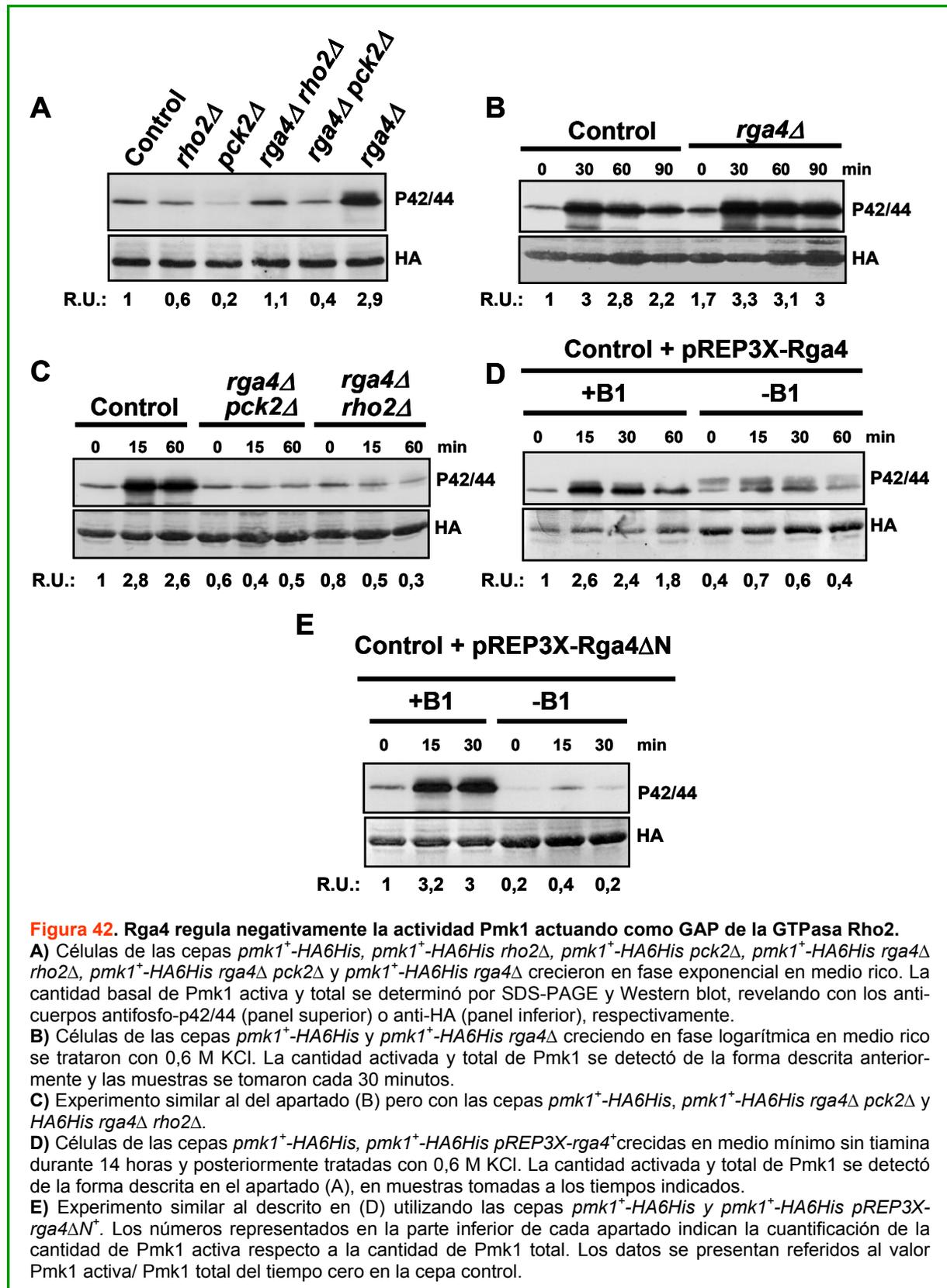
Una vez vista la interacción entre ambas proteínas, estudiamos si Rga4 presentaba actividad GAP *in vivo* sobre la GTPasa Rho2. Para ello, realizamos ensayos de “pull-down” como los descritos anteriormente (Ver Apartado 8.1), y analizamos los niveles de Rho2 unida a GTP en células que carecían de *rga4*⁺ y células que sobreexpresaban este gen. Como se observa en la **figura 41** la cantidad de GTP-Rho2 estaba significativamente reducida en las células que sobreexpresaban *rga4*⁺ y significativamente aumentada en las células que carecían de *rga4*⁺ con respecto a células silvestres. Por tanto, estos datos nos indican que Rga4 tiene actividad GAP *in vivo* para la GTPasa Rho2.



13.3. Rga4 regula negativamente la activación de la MAPK de integridad, Pmk1, actuando como GAP de la GTPasa Rho2

El paso siguiente fue buscar el papel de Rga4 en las diferentes funciones que desempeña la GTPasa Rho2 en la célula. Como ya mencionamos, Rho2 y Pck2 son miembros de la ruta MAPK de integridad celular (Ma *et al.*, 2006) y regulan positivamente a esta ruta tanto a nivel basal como bajo diferentes condiciones de estrés (Barba *et al.*, 2008). Con la colaboración del laboratorio del Dr. José Cansado, se analizó el posible papel de Rga4 en esta ruta. Se realizaron experimentos de valoración de la actividad Pmk1 a nivel basal y bajo estrés osmótico en las cepas wt, *rho2*Δ, *pck2*Δ, *rga4*Δ *rho2*Δ, *rga4*Δ *pck2*Δ y *rga4*Δ que además expresan una copia del gen *pmk1*⁺ bajo el control de su propio promotor y fusionado en su extremo 3' a secuencias que codifican dos epítomos HA y seis histidinas consecutivas (HA6His). Como se observa en la **figura 42A**, la fosforilación de Pmk1 descendió en

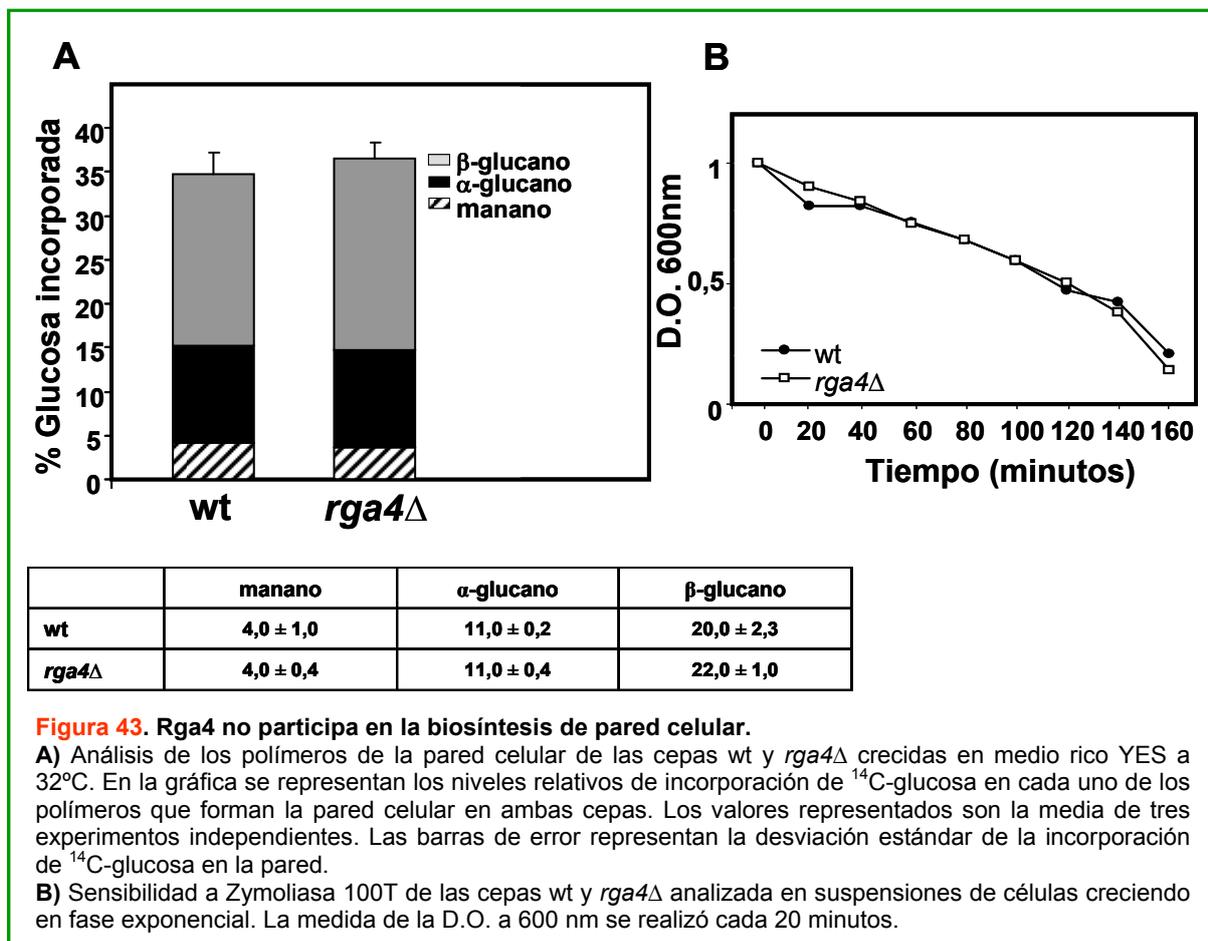
las cepas *rho2Δ* y *pck2Δ* como estaba previamente descrito. En las células carentes de *rga4⁺* existía un incremento significativo en la actividad basal de Pmk1 que fue prácticamente eliminado en las células *rga4Δ rho2Δ* y *rga4Δ pck2Δ*. Además, se realizó un segundo



ensayo en el que se midió la actividad de la MAPK bajo estrés osmótico. Como se observa en la **figura 42B**, las células *rga4Δ* presentaron un notable incremento en la fosforilación de Pmk1 en comparación con las células silvestres y este aumento era dependiente de la GTPasa Rho2 y la quinasa Pck2 (**Figura 42C**).

Para corroborar los resultados anteriores se llevó a cabo la valoración de los niveles de activación de Pmk1 en células que sobreexpresaban el gen *rga4⁺*. En estos ensayos se observó una clara reducción en los niveles de fosforilación de la MAPK tanto a nivel basal como bajo condiciones de estrés osmótico (**Figura 42D**). Además se midió la activación de Pmk1 en células que sobreproducían sólo el dominio GAP de Rga4. Como se observa en la **figura 42E**, se produce el mismo descenso en la fosforilación de Pmk1 que observamos cuando sobreproducimos la proteína completa. Todos estos resultados (realizados en el laboratorio del Dr. José Cansado) nos indican que Rga4 regula negativamente a la GTPasa Rho2 en la ruta MAPK de integridad celular y que el dominio GAP de esta proteína es necesario para dicha regulación.

13.4. Rga4 no está involucrada en la regulación de la biosíntesis de la pared celular realizada por la GTPasa Rho2



Además de su papel en la ruta MAPK de integridad celular, se ha descrito que Rho2 también regula la biosíntesis de α -glucano a través de la quinasa Pck2 (Calonge *et al.*, 2000). Para examinar si Rga4 regula negativamente a Rho2 en su papel sobre la pared celular, se analizó la composición de la pared celular en la cepa *rga4* Δ . No se aprecian diferencias significativas entre las células *rga4* Δ y las células silvestres ni en la cantidad de pared celular total ni en la proporción relativa de cada uno de los polímeros de la misma (β -glucano, α -glucano y manano) (Figura 43A). Esto sugiere que Rga4 no regula la actividad de la GTPasa Rho2 en la biosíntesis de la pared celular. Además se realizaron ensayos de resistencia a Zymoliasa 100T (complejo de β -glucanasas que digieren la pared celular) en la cepa *rga4* Δ que pusieron de manifiesto que las células *rga4* Δ presentan el mismo comportamiento que las células silvestres, corroborando que la pared celular de la cepa *rga4* Δ es similar a la de la cepa silvestre (Figura 43B). Este dato apoya la idea de que Rga4 no participa como GAP de Rho2 en la biosíntesis de α -glucano en la pared celular de *S. pombe*.

Estudio de la función de la proteína Rga6

14. Análisis estructural de la proteína Rga6

La fase de lectura abierta SPBC354.13 de *Schizosaccharomyces pombe*, denominada *rga6*⁺, codifica una proteína con 733 aminoácidos y una masa molecular de 80,7 kDa. El análisis estructural *in silico* de Rga6 muestra únicamente un dominio RhoGAP comprendido entre los aminoácidos 332 y 510.

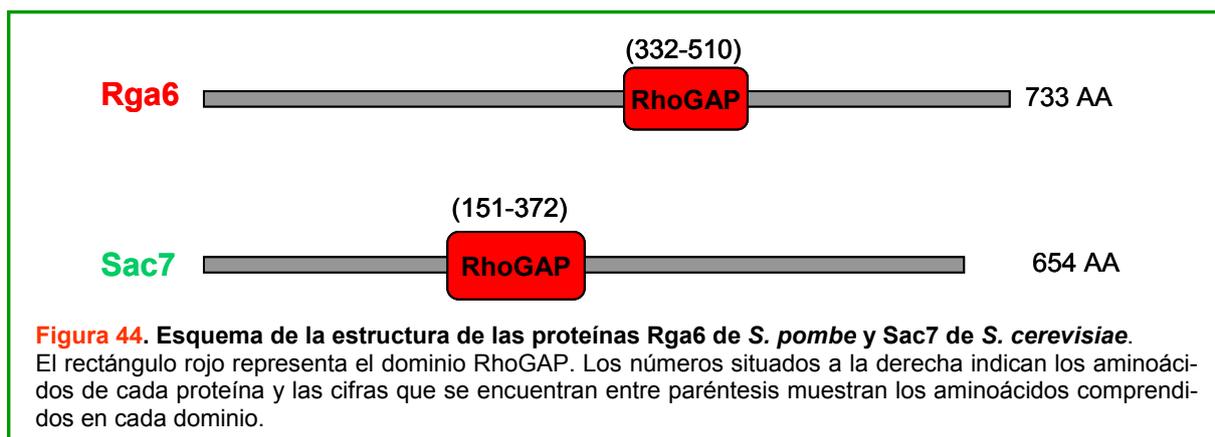
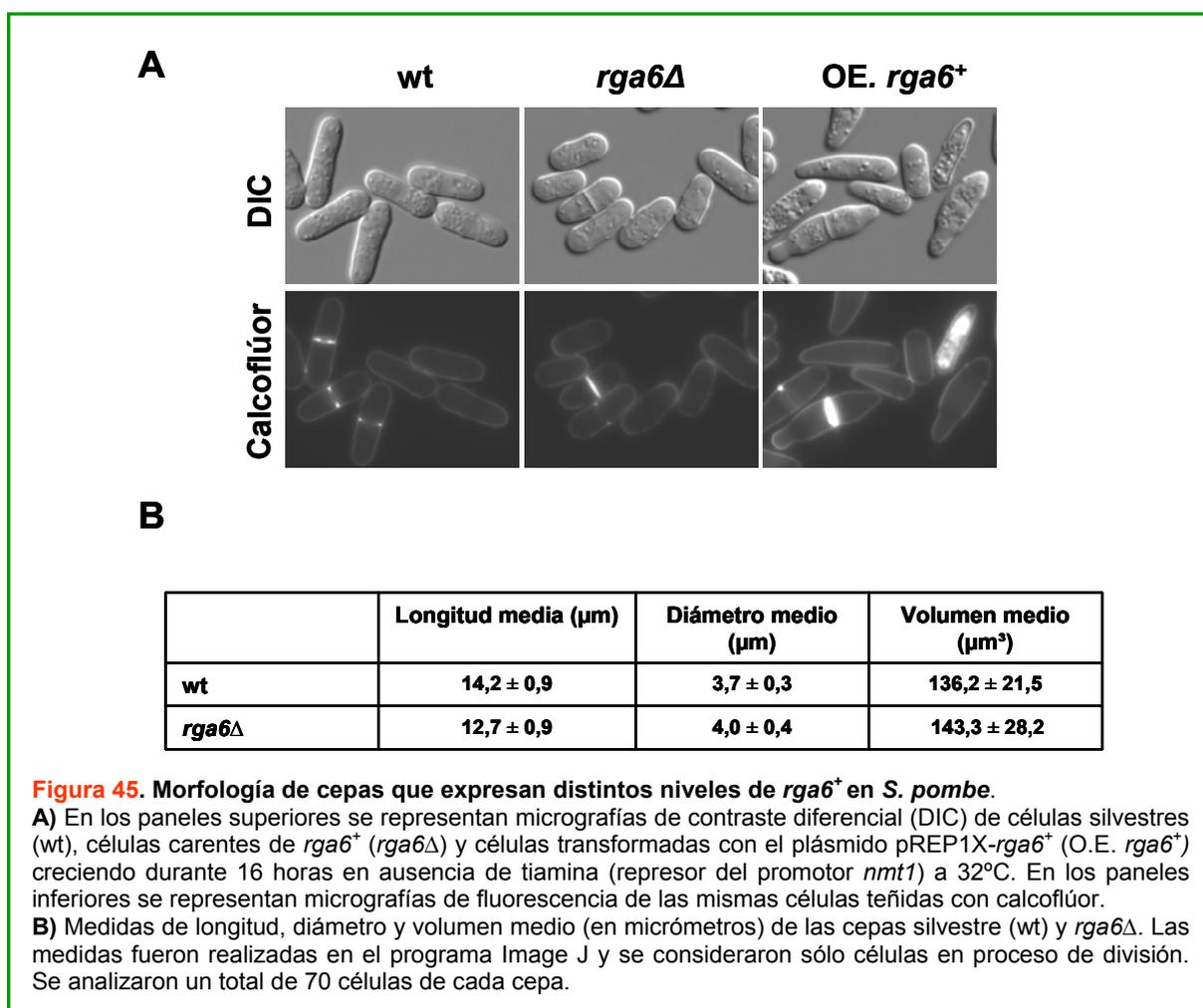


Figura 44. Esquema de la estructura de las proteínas Rga6 de *S. pombe* y Sac7 de *S. cerevisiae*. El rectángulo rojo representa el dominio RhoGAP. Los números situados a la derecha indican los aminoácidos de cada proteína y las cifras que se encuentran entre paréntesis muestran los aminoácidos comprendidos en cada dominio.

Rga6 presenta similitud con Sac7, una GAP de la GTPasa Rho1 que participa en la regulación del citoesqueleto de actina en *S. cerevisiae* (Dunn and Shortle, 1990; Novick *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002; Ubersax *et al.*, 2003). Ambas proteínas presentan una identidad del 17,4 % y un sólo dominio RhoGAP (Figura 44).

15. Rga6 participa en la regulación de la morfología y la integridad celular en *S. pombe*

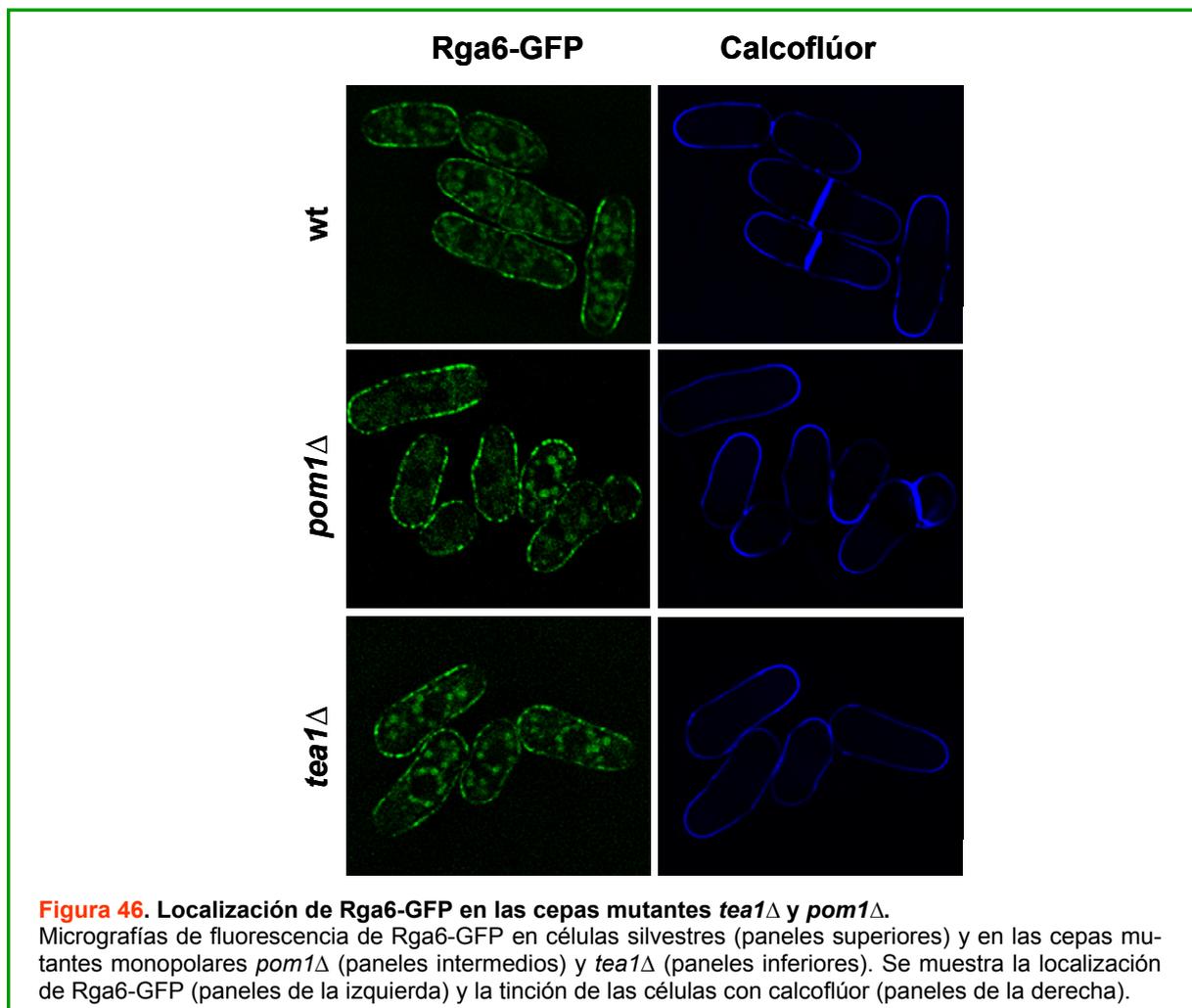
Las células carentes del gen *rga6*⁺ son capaces de crecer a distintas temperaturas lo que demuestra que este gen no es esencial. Sin embargo, presentan defectos morfológicos: son ligeramente más cortas y más gruesas que las células silvestres (Figura 45A-B). Por otro lado, las células que sobreexpresan *rga6*⁺ presentan lisis celular (20 %) y con morfología alterada (50 %). Estas células tienen forma de lágrima o limón ya que uno de los polos de crecimiento es más estrecho que el otro (Figura 45). Estos resultados indican que Rga6 juega un papel en la morfogénesis y en la integridad celular de *S. pombe*.



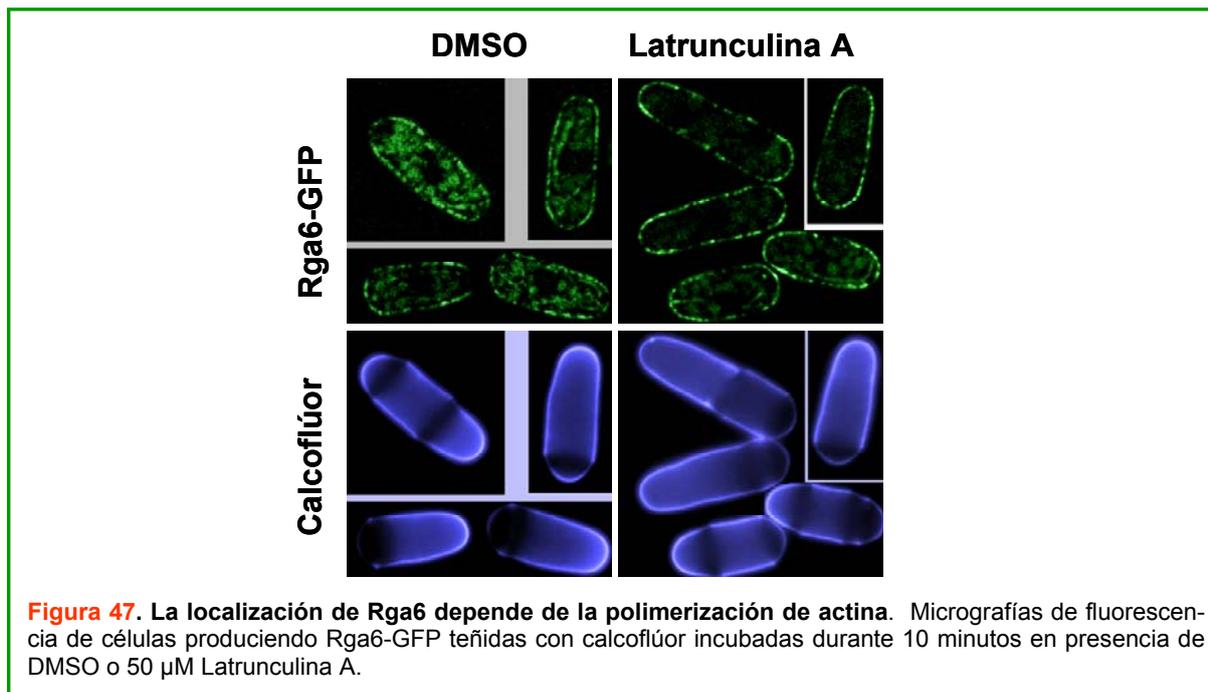
16. Rga6 se localiza en las zonas de no crecimiento de la célula

Para determinar la localización *in vivo* de Rga6, realizamos una cepa en la que fusionamos la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo C-terminal de Rga6, según el método descrito (Bähler *et al.*, 1998a). La proteína Rga6-GFP es funcional ya que la cepa gene-

rada no presenta defectos morfológicos. Mediante observación al microscopio de fluorescencia pudimos comprobar que Rga6 se localiza en el contorno celular de manera no uniforme. Al realizar una tinción con calcoflúor, que permite distinguir cuál es el polo de crecimiento, se observó que Rga6 se encuentra excluido de las zonas de crecimiento (Figura 46). Para corroborar este dato, analizamos la localización de Rga6-GFP en las cepas mutantes monopolares *tea1* Δ y *pom1* Δ . En estas cepas, la proteína con actividad GAP se localizó en todo el contorno celular excepto en el polo de crecimiento (Figura 46). Por lo tanto, podemos afirmar que la proteína Rga6 se localiza en zonas donde no hay crecimiento celular.

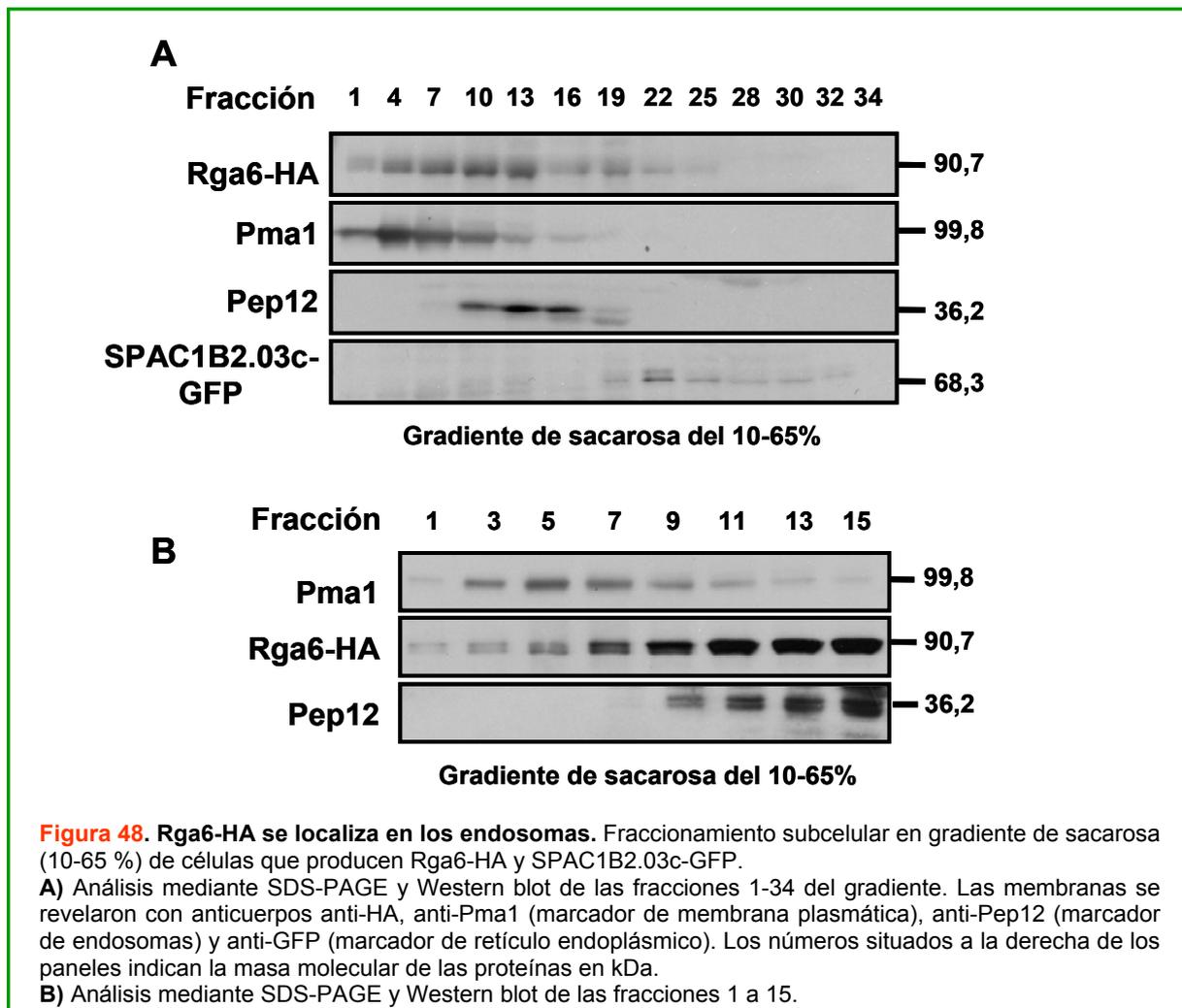


Para ahondar en el estudio de Rga6 analizamos si su localización depende del citoesqueleto de actina. Para ello, tratamos las células con Latrunculina A que despolimeriza este citoesqueleto y observamos que Rga6 mantiene su localización en todo el contorno celular pero no se excluye de los polos, lo que sugiere que la exclusión de la proteína del polo de crecimiento depende del citoesqueleto de actina (Figura 47).



17. Rga6 se localiza en una fracción subcelular que solapa con la proteína de Golgi Pep12

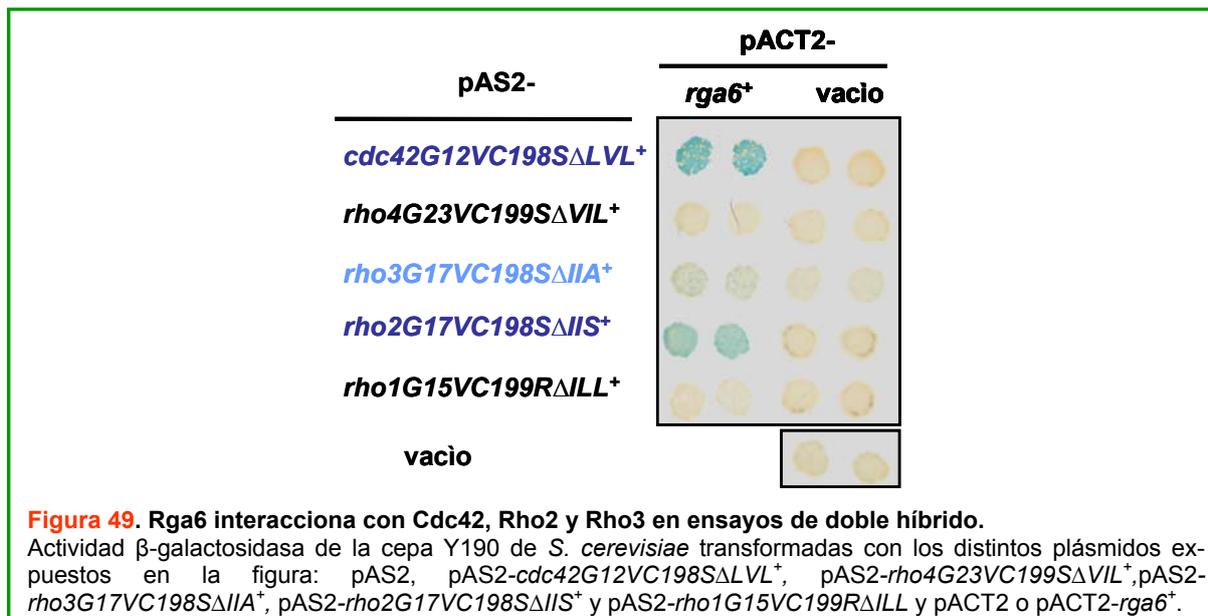
La localización de Rga6 es parecida a la del retículo endoplásmico cortical. Para determinar si Rga6 era una proteína de la membrana plasmática o de otro tipo de membranas, se realizó un fraccionamiento subcelular mediante centrifugación en gradiente de sacarosa. Extractos celulares de una cepa que lleva Rga6-HA y SPAC1B2.03c-GFP se sometieron a un gradiente continuo de sacarosa del 10-65 % a una velocidad de 25.000 rpm durante 20 horas a 4°C (ver Apartado 10 de Materiales y Métodos). Se recogieron 34 fracciones desde la parte más densa a la menos densa del gradiente y en ellas se analizó la presencia de la proteína Rga6-HA mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA. Como marcadores se utilizaron las siguientes proteínas de localización subcelular conocida: SPAC1B2.03c que codifica una proteína de la membrana del retículo endoplasmático (Aslett and Wood, 2006; Matsuyama *et al.*, 2006), Pma1, una ATPasa localizada en la membrana plasmática (Ghislain *et al.*, 1987) y Pep12, una proteína SNARE de endosomas (Becherer *et al.*, 1996; Kienle *et al.*, 2009; Takegawa *et al.*, 2003). Como se observa en la [figura 48A](#), Rga6 se encuentra en las fracciones 4 a la 19, que corresponden a las fracciones de la membrana plasmática (Pma1) y endosomas (Pep12). Para delimitar con más detalle la localización subcelular de Rga6, volvimos a correr las fracciones, pero en este caso de dos en dos y observamos que se localiza de manera similar a Pep12 ([Figura 48B](#)). Por tanto, sugerimos que esta proteína se localiza en una fracción de membranas subcelulares que podría corresponder a endosomas.



18. Rga6 es una proteína con actividad GAP para las GTPasas Rho2 y Cdc42

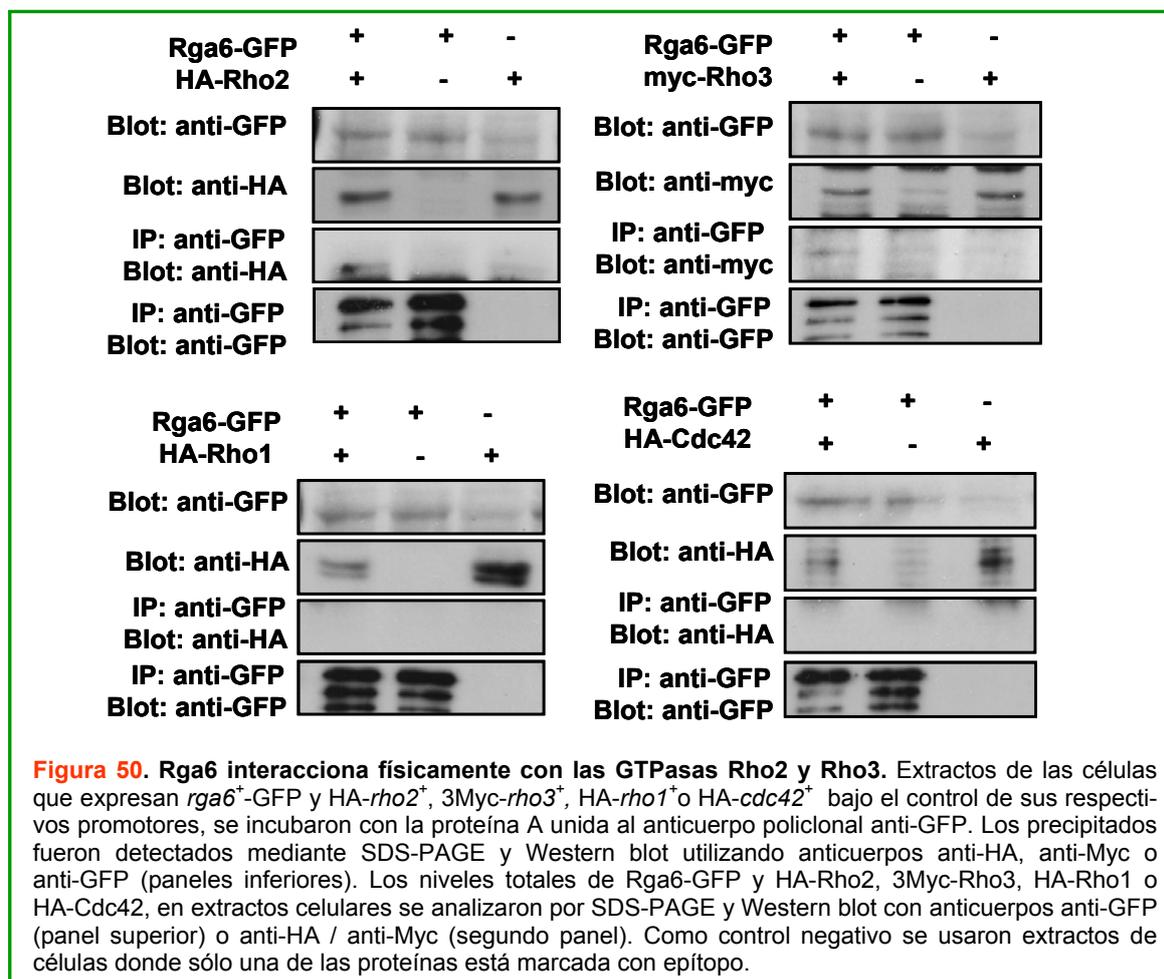
18.1. Rga6 interacciona con las GTPasas Rho2, Rho3 y Cdc42 mediante el ensayo de doble híbrido

Para abordar el estudio de cuál o cuáles son las GTPasas reguladas por Rga6, realizamos ensayos de doble híbrido entre Rga6 y las distintas GTPasas de la familia Rho en su estado constitutivamente activo. En primer lugar, clonamos la fase de lectura abierta correspondiente a *rga6*⁺ en el plásmido pACT2 en fase con el fragmento que codifica el dominio de activación de la transcripción de *GAL4*. Después, transformamos la cepa Y190 de *S. cerevisiae* con este plásmido y con cada uno de los plásmidos pAS2 que contienen las distintas GTPasas de la familia Rho en fase con el dominio de unión a DNA de *GAL4*. En la [figura 49](#) se muestra el ensayo de β -galactosidasa que permite concluir que las GTPasas Rho2, Cdc42 y, débilmente, Rho3 interaccionan con la proteína Rga6 en este tipo de ensayo. No se observó interacción con Rho1 ni tampoco con Rho4.



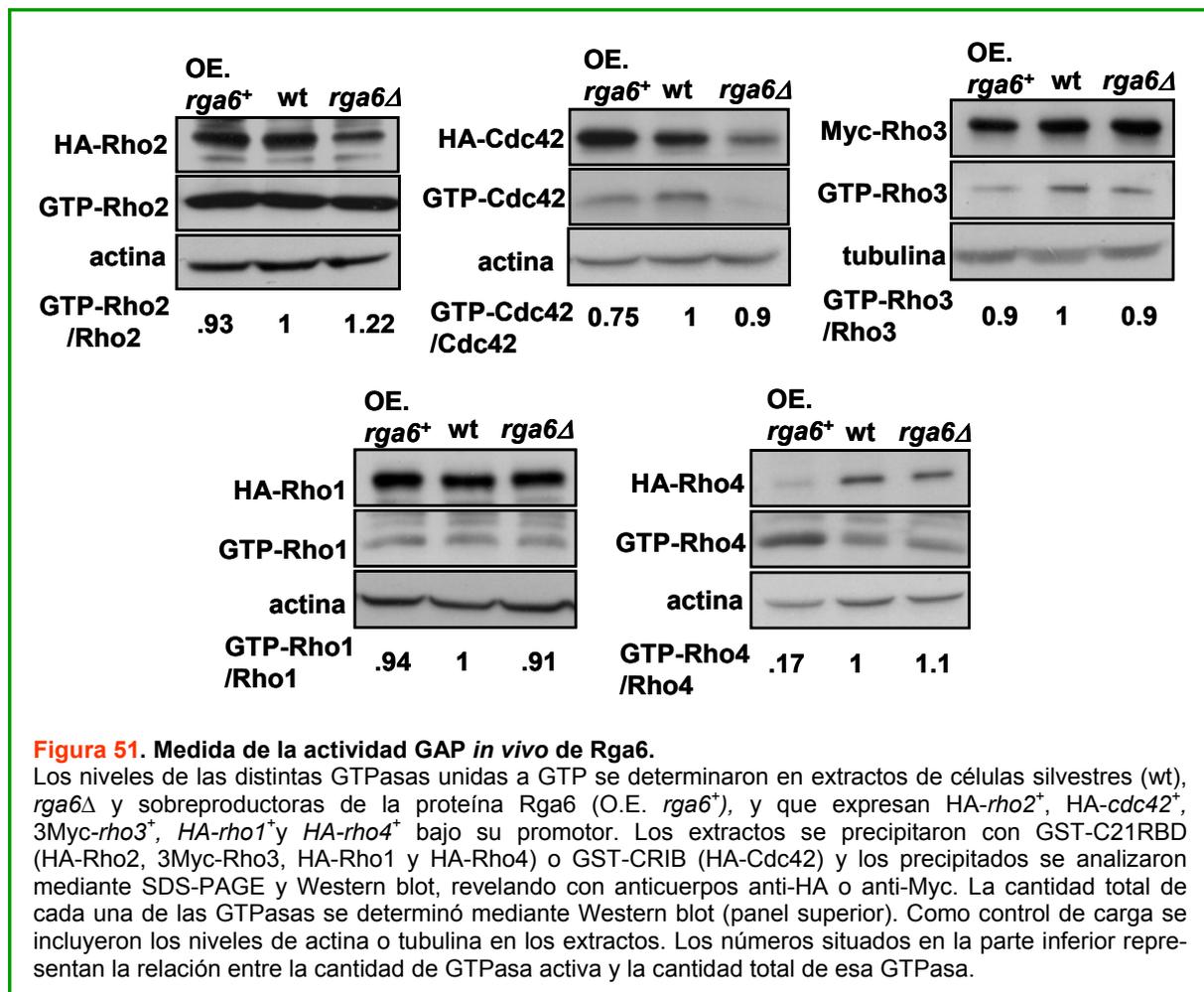
18.2. Rga6 interacciona físicamente con las GTPasas Rho2, y Rho3

Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación analizamos una posible interacción directa entre Rga6 y las GTPasas Rho2 y Rho3. A partir de extractos de las cepas



HA-rho2⁺ rga6-GFP⁺ y *3Myc-rho3⁺ rga6-GFP⁺* (*rho3⁺* está fusionada en su extremo 5' a tres copias de la secuencia codificante del epítipo Myc y expresada bajo el control de su promotor endógeno) se inmunoprecipitó la proteína Rga6-GFP con anticuerpos anti-GFP. Los complejos inmunoprecipitados se analizaron mediante SDS-PAGE y Western blot utilizando anticuerpos anti-HA, anti-Myc y anti-GFP. Como se observa en la [figura 50](#) en la co-inmunoprecipitación con anticuerpos anti-GFP que reconocen a la proteína Rga6-GFP se detectó una banda tenue con anti-HA correspondiente a HA-Rho2 y otra con anti-Myc correspondiente a 3Myc-Rho3. Por lo tanto, Rga6 interacciona *in vivo* con las GTPasas Rho2 y Rho3. Además, se realizaron ensayos de co-inmunoprecipitación con las GTPasas Cdc42 y Rho1, partiendo de los extractos de las cepas *HA-rho1⁺ rga6-GFP⁺* y *HA-cdc42⁺ rga6-GFP⁺* y realizando las co-inmunoprecipitaciones de la misma forma que con las GTPasas Rho2 y Rho3. En estos ensayos, no se observó banda ni de Cdc42 ni de Rho1 en el precipitado de Rga6-GFP, por lo que estas proteínas no interaccionan físicamente con Rga6 al menos en estas condiciones ([Figura 50](#)).

18.3. Rga6 tiene actividad GAP *in vivo* sobre la GTPasa Rho2



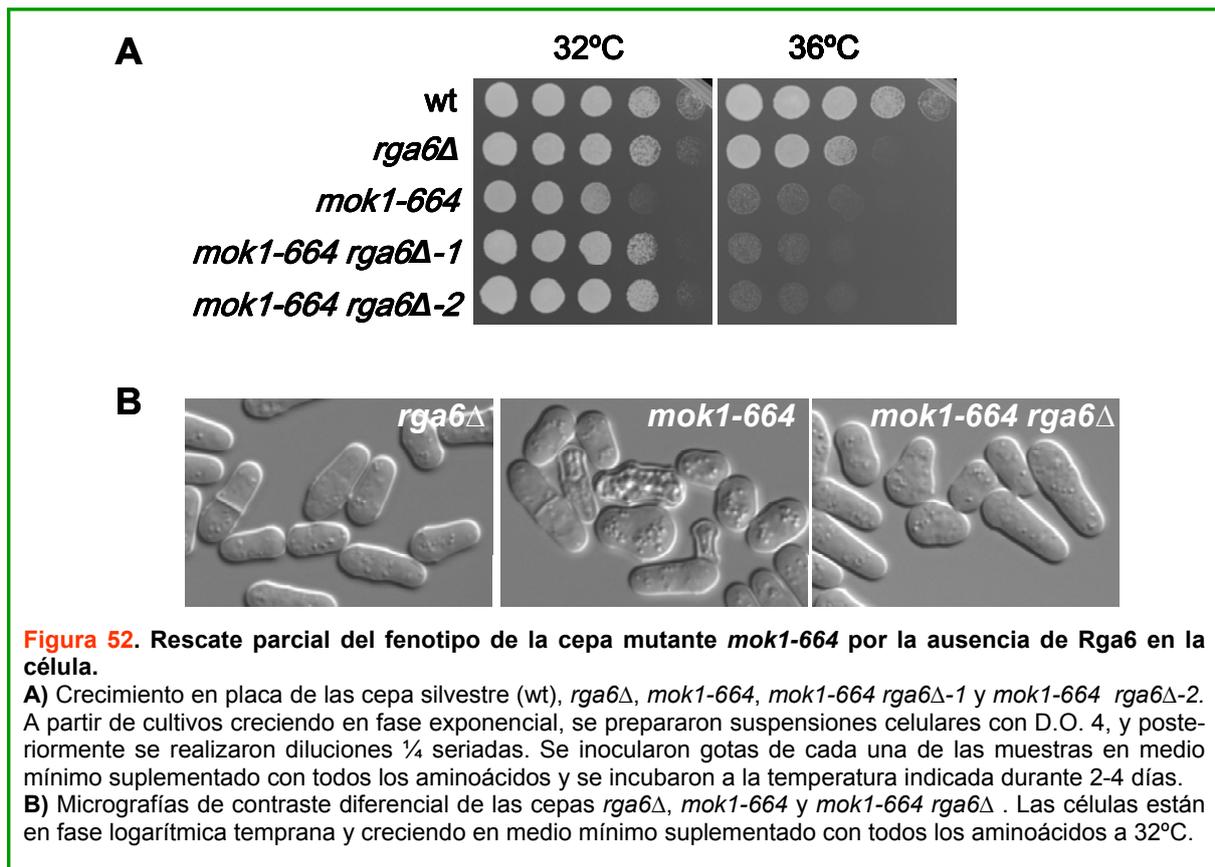
Para estudiar si Rga6 tiene actividad GAP *in vivo* con alguna de las GTPasas de la familia Rho, realizamos ensayos de “pull-down”, usando el dominio de unión a RhoA de la proteína rotequina (RBD) (Rho1-4) o el dominio CRIB de la proteína Pak2 (Cdc42) unido a la proteína GST, y medimos la cantidad de Rho activa en células carentes de *rga6*⁺ o que sobreproduzcan esta GAP. En el caso de Rho2, las células *rga6Δ* presentaron un ligero incremento de Rho2 activa si lo comparamos con la cepa silvestre. Sorprendentemente, no se apreciaron cambios en la actividad de Rho2 cuando se sobreexpresó *rga6*⁺ (Figura 51). Por tanto, Rga6 podría estar actuando de forma limitada sobre Rho2, o bien requerir una proteína adicional y limitante para su efecto sobre Rho2. Con la GTPasa Cdc42, se observó un descenso en la cantidad de GTP-Cdc42 cuando sobreexpresamos *rga6*⁺, pero los niveles activos de Cdc42 no varían en la cepa *rga6Δ* (Figura 51). Este dato nos indica que Rga6 podría actuar como GAP de Cdc42. Sin embargo, el hecho de no observar cambios en los niveles de GTP-Cdc42 cuando falta *rga6*⁺, sugiere que en condiciones fisiológicas Rga6 no actúa como regulador negativo de Cdc42 o que existen otras GAPs de esta GTPasa, como puede ser Rga4, que enmascaran el efecto regulador de Rga6. En los ensayos realizados con las GTPasas Rho3 y Rho1 no se apreciaron cambios en el estado de activación de estas GTPasas (Figura 51). Sorprendentemente, se produjo un gran aumento de los niveles de GTP-Rho4 cuando se sobreexpresa *rga6*⁺ pero estos niveles no se alteran en *rga6Δ* (Figura 51). Esto indica que Rga6 podría tener un efecto activador indirecto sobre Rho4. Todos los experimentos presentados permiten concluir que Rga6 tiene una ligera actividad GAP *in vivo* sobre Rho2 y Cdc42.

19. Estudio de Rga6 como GAP de Rho2

19.1. Rga6 regula negativamente a Rho2 en la biosíntesis de la pared celular

Los diferentes resultados presentados indican que la proteína Rga6 podría regular negativamente no sólo a una sino a varias GTPasas. La sobreexpresión de *rga6*⁺ produce lisis celular (20 %) y células en forma de limón o lágrima (50 %). Con el fin de establecer la función de la regulación de Rga6 sobre las distintas GTPasas de la familia Rho, realizamos un experimento en el que se llevó a cabo la sobreexpresión de *rga6*⁺ en las cepas mutantes nulas *rho2Δ*, *rho3Δ* y *rho4Δ*. En el caso de *rho2Δ*, la lisis provocada por la sobreexpresión de *rga6*⁺ disminuyó considerablemente (4 %). En el caso de *rho3Δ* y *rho4Δ* no se apreciaron diferencias considerables. Por tanto, esto hace pensar que los defectos de integridad celular provocados por la sobreexpresión de *rga6*⁺ son mayoritariamente debidos a la regulación de la GTPasa Rho2.

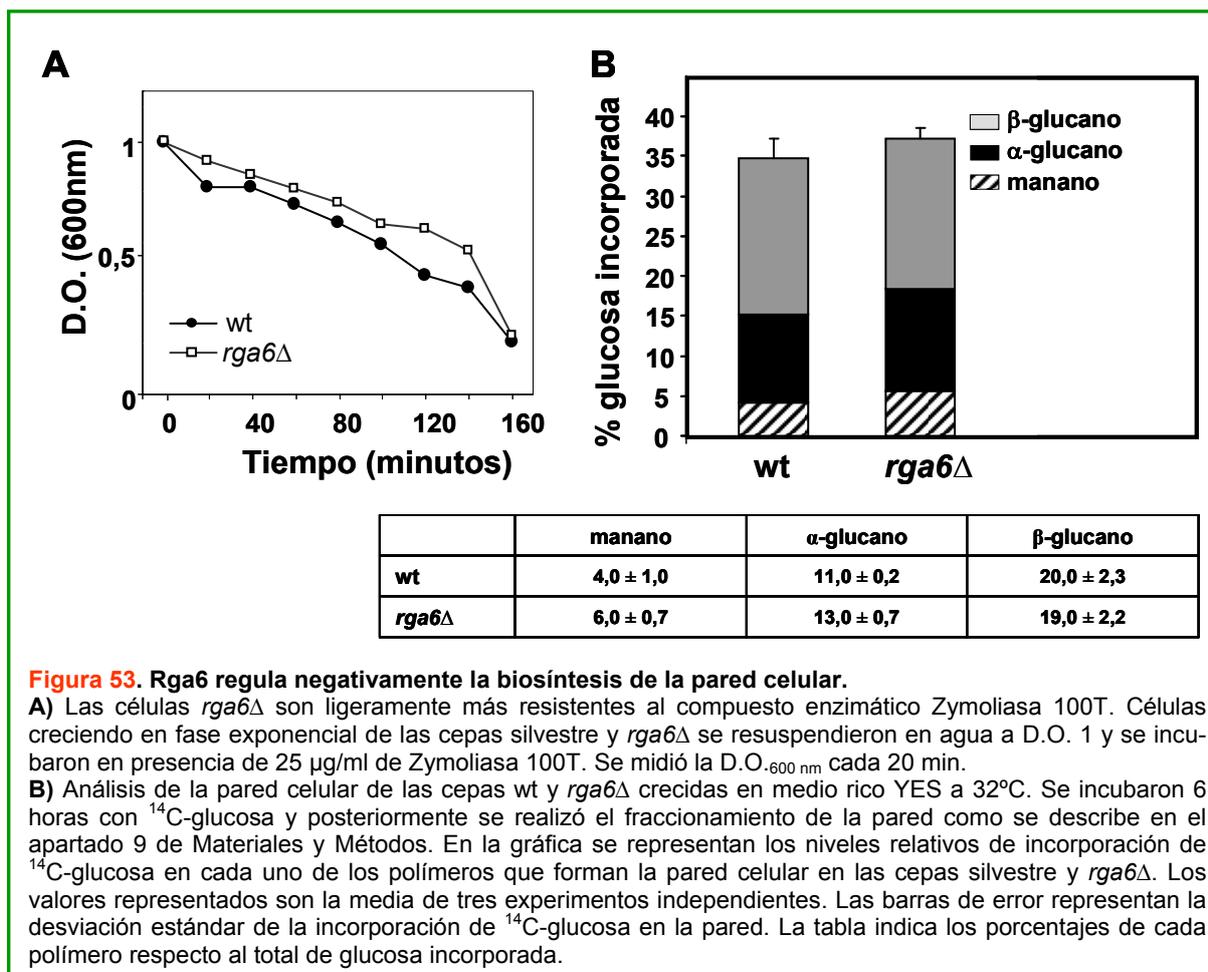
Rho2 regula la biosíntesis de α -glucano a través de la quinasa Pck2, que a su vez re-



gula la localización de Mok1, la posible α -glucán sintasa (Katayama *et al.*, 1999) (Calonge *et al.*, 2000). La eliminación del gen *rga6*⁺ en la cepa mutante y termosensible *mok1-664* mejoró su crecimiento y su morfología a temperaturas semi-permisivas, pero no llegó a rescatar la termosensibilidad a 36°C (Figura 52). Esta mejora en el crecimiento de *mok1-664* podría ser debida a que haya más Rho2 activa en *rga6*Δ que podría compensar parcialmente la menor actividad de la defectuosa enzima Mok1 al activarla y/o localizarla mejor. Por tanto, estos datos sugieren que Rga6 actúa como GAP de Rho2 y participa en la regulación de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular.

Para comprobarlo se determinó la sensibilidad a Zymoliasa de la cepa *rga6*Δ, comprobando que es ligeramente más resistente a Zymoliasa 100T que una estirpe silvestre (Figura 53A). Realizamos también el análisis de los polímeros de la pared celular. Como se observa en la figura 53B, la cepa *rga6*Δ presenta un ligero aumento de α -glucano (16 %) y manano (36 %) con respecto a la estirpe silvestre. Estos resultados corroboran que Rga6, en menor medida que Rga2, regula negativamente a la GTPasa Rho2 en la biosíntesis de la pared celular.

Nos preguntamos si Rga6 regularía negativamente a la GTPasa Rho2 en su papel activador de la ruta de integridad celular. Como ya hemos comentado anteriormente, la delección de *rga2*⁺ confiere sensibilidad a MgCl₂ (Ver Apartado 10.2). Sin embargo, *rga6*Δ en

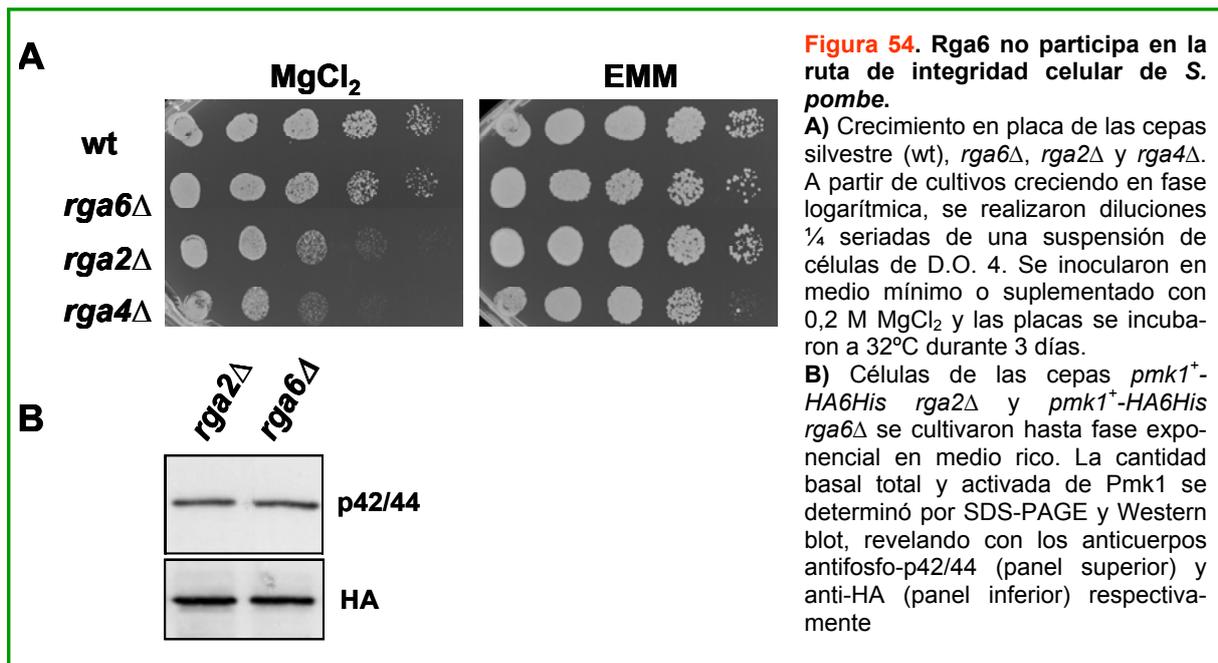


placas suplementadas con MgCl₂ se comporta de manera similar a la estirpe silvestre (Figura 54A), lo que sugiere que no tiene una participación relevante en esta cascada de señalización. Además, en colaboración con el laboratorio del Dr. José Cansado, se midió la activación de la MAPK Pmk1 en la cepa *rga6* Δ a nivel basal y se vio que es similar a la obtenida en la cepa *rga2* Δ , que a su vez no varía con respecto a la de una estirpe silvestre (Ver apartado 10.3) (Figura 54B). Este dato nos sugiere que no se produce una mayor activación de la MAPK en las células carentes de *rga6*⁺.

Por lo tanto, todos los resultados sugieren que Rga6 podría regular negativamente a la GTPasa Rho2 en la biosíntesis del α -glucano de la pared celular, pero no participa en la ruta de integridad de las MAPK (Mkh1-Pek1-Pmk1).

20. Papel de Rga6 en la morfología de *S. pombe*

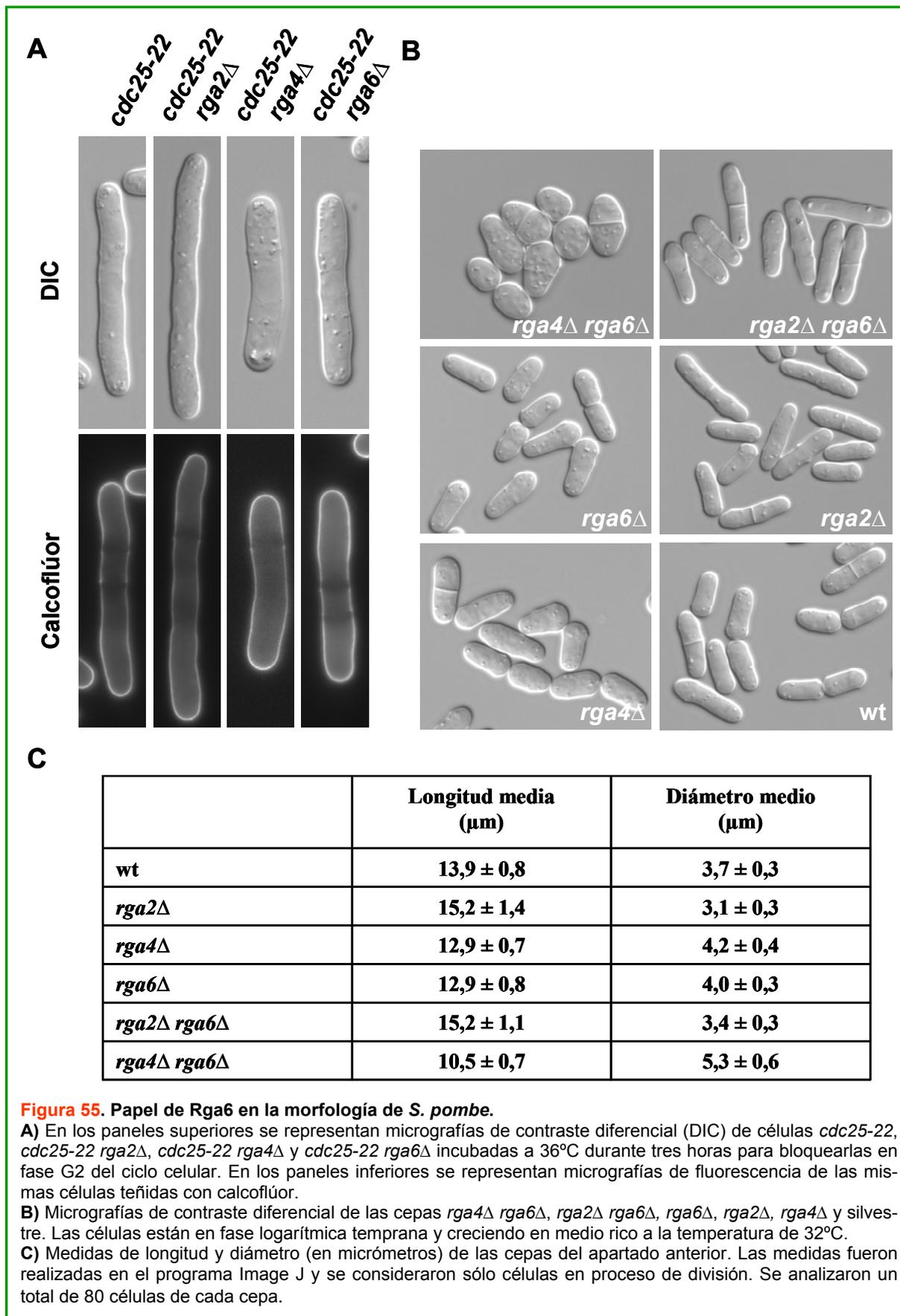
Además de su función en la biosíntesis del α -glucano a través de la regulación a la GTPasa Rho2, Rga6 podría participar en la morfogénesis celular. Las células carentes de esta GAP, son ligeramente más cortas y anchas que las de la estirpe silvestre. Este resultado lo podemos observar mejor al utilizar como fondo genético la cepa mutante *cdc25-22*,

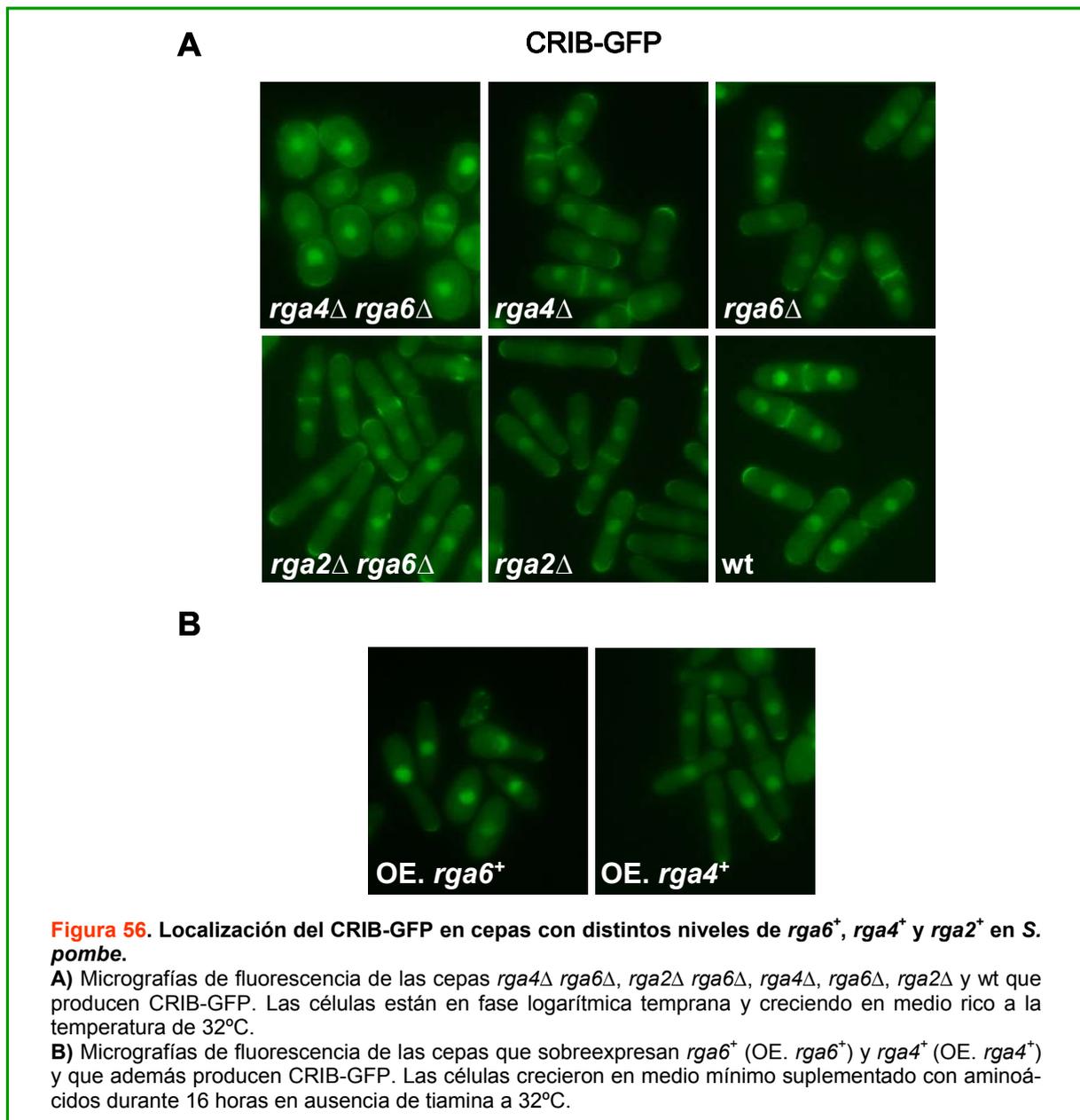


que a la temperatura restrictiva se para en la fase G2 del ciclo celular y continúa creciendo sin dividirse (Mitchison and Creanor, 1971). Como se observa en la [figura 55A](#), la cepa *cdc25-22 rga6Δ* es más corta y ancha que la cepa *cdc25-22*. También se puede observar que el defecto morfológico es semejante, pero más atenuado, que en la cepa *cdc25-22 rga4Δ* y opuesto al de la cepa *cdc25-22 rga2Δ* ([Figura 55A](#)). Todas estas observaciones sugieren que Rga6 tiene un papel en el control de la morfología celular similar al descrito para Rga4, muy probablemente como GAP de Cdc42.

Con el fin de estudiar la contribución de Rga6 a la regulación de las dimensiones celulares, realizamos cepas mutantes dobles carentes de las proteínas Rga2 y Rga4 que también están implicadas en dicho proceso. Como se observa en la [figura 55B-C](#), las células *rga4Δ rga6Δ* son más anchas y cortas que las células *rga4Δ* o *rga6Δ*, esto nos sugiere que ambas proteínas tienen papeles aditivos en el control de la morfología celular. La cepa *rga2Δ rga6Δ* presenta una morfología similar a la cepa *rga2Δ* ([Figura 55B-C](#)), lo que sugiere que el defecto morfológico de *rga6Δ* depende de la proteína Rga2.

La localización de GTP-Cdc42 en las cepas anteriores se realizó mediante su cruce con la cepa que contiene el dominio CRIB de la proteína Gic2 de *S. cerevisiae* fusionada a tres copias de la proteína verde fluorescente (3GFP) (Tatebe *et al.*, 2008). Como se observa en la [figura 56A](#), en la cepa *rga6Δ* la señal de GTP-Cdc42 es más ancha en los polos celulares con respecto a la localización observada en la estirpe silvestre. Por otro lado, en la cepa mutante doble *rga4Δ rga6Δ*, la señal de CRIB-GFP está deslocalizada por todo el contorno celular, lo que provoca una despolarización casi total de la célula ([Figura 56A](#)). Este dato corrobora el posible papel aditivo de Rga4 y Rga6 en la regulación de Cdc42.





En el caso de las células *rga2* Δ *rga6* Δ , la señal de CRIB-GFP es similar a la observada en la cepa *rga2* Δ , confirmando que la función de Rga6 en la regulación de la morfología celular a través de Cdc42 depende de Rga2 (Figura 56A). Al igual que ocurre con Rga4, las células que sobreexpresan *rga6*⁺ muestran una señal de CRIB-GFP más estrecha en los polos celulares con respecto a la cepa silvestre (Figura 56B). Todos los resultados anteriores apoyan la hipótesis de que Rga6 tiene un papel en el control de las dimensiones celulares similar al realizado por Rga4 aunque su contribución en este proceso es menor.

DISCUSIÓN

Las GTPasas de la familia Rho en *Schizosaccharomyces pombe* interactúan con multitud de proteínas efectoras, pero se conoce poco acerca de la regulación espacial y temporal de estas GTPasas. El objetivo de nuestro trabajo es estudiar esta regulación a través del estudio de las GAPs, reguladoras negativas de las proteínas Rho. Cuando se inició este proyecto, en la bibliografía estaban descritas tres GAPs, Rga1, Rga5 y Rga8, todas ellas como reguladoras negativas de la GTPasa Rho1 (Calonge *et al.*, 2003; Nakano *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2003). Posteriormente, se describió la proteína Rga4, como una proteína con actividad GAP para la GTPasa Cdc42 (Tatebe *et al.*, 2008). Nosotros iniciamos este trabajo estudiando la proteína Rga2. Mediante estudios genéticos y bioquímicos hemos llegado a la conclusión de que Rga2 es una GAP específica de la GTPasa Rho2 y, además, participa en la morfogénesis celular, probablemente, a través de su interacción con la GTPasa Cdc42.

Rga2 contiene 1.275 aminoácidos y dos dominios definidos en su estructura primaria: PH y RhoGAP. En un estudio previo (Nakano *et al.*, 2001) en el que se buscaban en *S. pombe* ortólogas de las GAPs de *S. cerevisiae*, se emparejaron las GAPs de la levadura de fisión con las de la levadura de gemación. Este estudio está basado en la similitud de la estructura primaria de estas proteínas. En el caso de Rga2, su proteína homóloga en *S. cerevisiae* es Bem3. Esta proteína presenta los mismos dominios que contiene Rga2 (PH y RhoGAP) y un dominio PX adicional. Sin embargo, aunque estas proteínas posean un 23 % de identidad, no parecen desempeñar el mismo papel de regulación en la célula. Bem3 es una proteína que tiene actividad GAP *in vitro* para las GTPasas Rho1 y Cdc42 (Knaus *et al.*, 2007; Park and Bi, 2007) y, a diferencia de Rga2, no se ha descrito que esta proteína tenga ningún papel en la integridad de la pared celular. No obstante, estas proteínas pueden tener semejanzas en cuanto a su papel en la morfogénesis. Bem3 es una GAP de Cdc42 que tiene un papel importante en la morfogénesis de la levadura de gemación (Smith *et al.*, 2002). Las células carentes de *BEM3* presentan varios defectos morfológicos como múltiples yemas o proyecciones excesivamente largas. También aparecen células en forma de cacahuete o con morfología aberrante (Smith *et al.*, 2002). Por su parte, Rga2 contribuye de manera notable a la morfogénesis celular en *S. pombe*. Las células carentes de *rga2*⁺ son células más largas y delgadas que las células silvestres y las células que sobreexpresan *rga2*⁺ son células más cortas y gruesas que las de la estirpe silvestre. Además, ambas proteínas, Bem3 y Rga2, realizan su papel morfológico mediante la regulación de la GTPasa Cdc42. Sin embargo, Bem3 es una GAP de Cdc42 mientras que Rga2 podría regular de manera positiva a Cdc42, directa o indirectamente.

Bem3 y Rga2 se localizan en las zonas de crecimiento activo. Bem3 se localiza en el sitio de gemación en G1, en la punta de la yema durante la emergencia, en el córtex de la

célula hija y en el cuello de la célula madre durante la mitosis (Knaus *et al.*, 2007). Rga2 se localiza en los polos de crecimiento y en la región del septo, tras el anillo de actomiosina. Ambas localizaciones dependen del citoesqueleto de actina y son localizaciones transitorias y muy dinámicas (Knaus *et al.*, 2007). Recientemente se ha descrito que la proteína Ent2 en su papel de adaptador endocítico puede regular la actividad de Bem3 en la membrana plasmática promoviendo su recambio endocítico (Mukherjee *et al.*, 2009). La interacción Ent2-Bem3 se realiza a través del dominio ENTH de Ent2. La sobreexpresión del dominio ENTH de Ent2 da lugar a células con una estructura de septinas aberrante. Este efecto negativo dominante de ENTH se lleva a cabo en el paso de formación del anillo de septinas mediante su efecto en la localización y función de la proteína Bem3. Además, en la cepa mutante *ent2Δ*, Bem3-GFP se localiza de forma menos polarizada y más difusa que en una cepa silvestre. Por tanto, Ent2 puede contribuir a la correcta regulación y organización de Bem3 promoviendo su endocitosis (Mukherjee *et al.*, 2009). En el caso de Rga2, no se ha estudiado su recambio endocítico, pero probablemente exista, ya que la localización de esta proteína es muy dinámica y los complejos fluorescentes de Rga2-GFP que se distinguen en las zonas de crecimiento activo de la célula están en continuo movimiento. Otra prueba del dinamismo de Rga2 es la rápida desaparición de la localización de esta proteína cuando tratamos a las células con Latrunculina A. En apenas diez minutos desaparece la proteína de los polos de las células, de igual manera que lo hace la coronina, proteína asociada a la F-actina y utilizada como marcador de los parches de actina.

La localización de Rga2 aparece como puntos discretos en las zonas de crecimiento activo de la membrana plasmática. Nuestros datos indican que la región N-terminal de Rga2 es suficiente y necesaria para la localización de la proteína en los polos celulares. Desgraciadamente, en esta región no existen motivos aparentes, por lo que no ponemos atribuir la función de la localización de la proteína a un dominio concreto. Podría ocurrir que Rga2 necesitase de la interacción con otras moléculas para localizarse o transportarse correctamente a los polos celulares. Además, esta región N-terminal de Rga2 podría estar fosforilada como se ha descrito en su proteína homóloga Bem3. La región N-terminal de Bem3 está altamente fosforilada por la quinasa de ciclo Cdc28/Cln2 durante la emergencia de la yema (Knaus *et al.*, 2007). Esta fosforilación inactiva a Bem3 para que Cdc42 se pueda activar específicamente y promover la polimerización de actina (Knaus *et al.*, 2007). De esta manera se regula la actividad GAP tanto en el espacio como en el tiempo para que ejerza su función en los momentos adecuados dentro del ciclo celular. Aunque no se ha realizado un estudio de fosforilación de Rga2, existen sitios dianas de CDKs en su región N-terminal. Concretamente hemos identificado tres posibles regiones (**S¹⁴³PYEK**, **S²³²PILK** Y **S³³⁶PRRK**). Además, al observar Rga2-Myc mediante Western blot se apre-

cian varias bandas correspondientes a esta proteína, pudiendo ser diferentes estados de fosforilación. En posteriores estudios, se podrá confirmar si Rga2 está regulada por fosforilación en su región N-terminal, al igual que Bem3 .

El dominio PH en Rga2 es necesario para localizarse en la zona de división celular. Este hecho sugiere que la interacción con fosfolípidos específicos es importante para la localización de Rga2 en la zona del septo. Los dominios PH desempeñan un papel importante en el reclutamiento de proteínas a diversas membranas permitiéndoles así interactuar con otros componentes de las rutas de transducción de señales. Los diferentes dominios PH poseen especificidades para los distintos fosfoinositoles: PIP2 (4,5); PIP2 (3,4); PIP3 (3,4,5). Esto es importante porque hace que el reclutamiento de proteínas con diversos dominios PH sea sensible a las actividades de las enzimas que fosforilan o desfosforilan el anillo del inositol. Nuestros datos sugieren la presencia de fosfoinositoles específicos en la membrana de la zona de división de *S. pombe*.

Por último, el dominio GAP es el encargado de la función que realiza Rga2. Las cepas en las que eliminamos el dominio GAP se comportan como la cepa *rga2Δ* (sensibles a $MgCl_2$ y células más largas y delgadas que las células silvestres). Por lo tanto, la región N-terminal y el dominio PH desempeñan un papel de regulación en la proteína Rga2, y el dominio GAP es el responsable de las funciones que realiza esta proteína en la célula.

Rga2 es un regulador negativo específico para la GTPasa Rho2. Este dato está basado en los siguientes resultados:

- A. Tiene actividad GAP *in vitro* para esta proteína Rho.
- B. Rga2 y Rho2 interactúan físicamente.
- C. Mediante ensayos de *pull-down* utilizando los dominios RBD o CRIB hemos observado que la ausencia de la proteína Rga2 ocasiona un aumento de Rho2 unida a GTP, mientras que su sobreexpresión causa un descenso de la forma activa de esta GTPasa.

Todos los resultados bioquímicos nos indican que Rga2 es una GAP específica de Rho2 y por tanto reguladora negativa de la señal transmitida por GTP-Rho2 a sus efectores.

Rho2 es una GTPasa no esencial, pero participa en la regulación de la biosíntesis del α -glucano de la pared celular (Calonge *et al.*, 2000) y en la regulación de la ruta MAPK de integridad, Mkh1-Pek1-Pmk1 (Ma *et al.*, 2006). Su principal efector es Pck2, que también está implicada en la regulación de estos procesos. Puesto que Rho2 participa en varias rutas de señalización, decidimos estudiar si Rga2 regula a esta proteína Rho en todos los procesos en los que participa o por el contrario es específica de alguno de ellos. Las GAPs, son moléculas muy promiscuas ya que una proteína con actividad GAP puede re-

gular a varias proteínas Rho y diferentes GAPs pueden regular a la misma proteína Rho (Tcherkezian and Lamarche-Vane, 2007). Un ejemplo de este último caso es el de las GAPs de la GTPasa Rho1 en *S. cerevisiae*, Bem2, Sac7, Bag7 y Lrg1; todas manifiestan actividad GAP *in vivo* e *in vitro* para Rho1 (Cid *et al.*, 1998; Martín *et al.*, 2000b; Peterson *et al.*, 1994; Roumanie *et al.*, 2001; Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002; Watanabe *et al.*, 2001). Sin embargo, cada una de estas proteínas está especializada en la regulación de un proceso concreto en el que participa la proteína Rho1. Lrg1 es una GAP que regula a Rho1 en la biosíntesis del β -(1,3)-glucano (Watanabe *et al.*, 2001) y, probablemente, por su papel regulador en la pared celular, también se ha implicado en fusión celular y en el proceso de separación de la célula madre y la célula hija (Fitch *et al.*, 2004; Svarovsky and Palecek, 2005). Bem2 y Sac7 son las únicas GAPs que regulan, a través de Rho1, la ruta MAPK de integridad de la pared celular (Martín *et al.*, 2000b; Schmidt *et al.*, 2002). Bag7 y Sac7 están implicadas en la regulación negativa de Rho1 en su papel organizador del citoesqueleto de actina (Schmidt *et al.*, 1997; Schmidt *et al.*, 2002).

Rga2 mediante su regulación de la GTPasa Rho2 participa en la biosíntesis del α -glucano de la pared celular. Análisis bioquímicos y genéticos apoyan esta afirmación:

- A. Existe una interacción funcional entre Rga2 y Mok1/Ags1, la posible α -glucán sintasa que es regulada por las proteínas Rho2 y Pck2 (Calonge *et al.*, 2000) (Katayama *et al.*, 1999). La cepa mutante termosensible *mok1-664* es incapaz de crecer a 36°C y presenta graves defectos morfológicos. La ausencia de Rga2 es capaz de suprimir el defecto de crecimiento y morfológico de la cepa mutante *mok1-664* a 32°C, pero no a 36°C. Esto se podría explicar por la existencia de unos mayores niveles de GTP-Rho2 en las células *rga2* Δ , que activaría a Pck2 y así compensaría parcialmente la menor actividad de Mok1 que a su vez es regulada por Pck2.
- B. Los niveles de Rga2 afectan a los niveles de α -glucano de la pared celular. Así, la delección de *rga2*⁺ causa un incremento del α -glucano, concretamente un 24 % respecto a la cepa silvestre y, a su vez, la sobreexpresión de *rga2*⁺ causa un descenso en la biosíntesis de pared celular, principalmente en el α -glucano (30 %).
- C. La sobreexpresión de *rga2*⁺ produce acúmulos anormales de pared celular que se reducen en la cepa *rho2* Δ .

Los defectos de pared se pueden detectar también analizando la resistencia de las células a las β -glucanasas, enzimas encargadas de la degradación de la pared celular. Las

células carentes de *rho2*⁺ son más sensibles al tratamiento con estas enzimas que las células silvestres (Calonge *et al.*, 2000). Sin embargo, la cepa *rga2Δ* es resistente a este tratamiento. En un principio, este dato sugería que una mayor actividad de la GTPasa Rho2, y con ello un aumento del polímero α-glucano, podría producir una mayor resistencia a este tipo de enzimas degradativas en la cepa *rga2Δ*. Sorprendentemente, la cepa mutante doble *rho2Δ rga2Δ* sigue siendo resistente a las β-glucanasas. Esto indica que la resistencia al tratamiento con Zymoliasa 100T observada en la pared de *rga2Δ* no es producida por una mayor actividad de la proteína Rho2 sino por la desregulación de otro proceso en el que probablemente participe Rga2 y que es independiente de Rho2. Se ha descrito que la resistencia a enzimas líticas como la Zymoliasa depende de la porosidad de la pared celular (de Nobel *et al.*, 1990). Estos autores determinaron que la porosidad de la pared celular está limitada por el número de puentes disulfuro que se encuentra en la misma, además de la turgencia de la pared. En *S. cerevisiae*, se ha observado que al tratar cepas mutantes carentes de los genes *PKC1* o *MPK1* con un agente oxidante como la diamida, se induce la formación de puentes disulfuro en las proteínas de la pared celular. Esta característica provoca que estas cepas mutantes manifiesten resistencia a Zymoliasa (Vilella *et al.*, 2005). Una posible explicación de la resistencia a este compuesto en la cepa *rga2Δ*, podría ser una modificación en la composición de las proteínas que forman la pared celular. El análisis de los polímeros de pared en *rga2Δ* demuestra un aumento del galactomanano (36 %) con respecto a la estirpe silvestre, que podría explicar un cambio en la porosidad de la pared. Para profundizar sobre esta hipótesis sería necesario un análisis más exhaustivo de la composición y estructura de las proteínas de la pared y estudios que determinen la cantidad de residuos SH libres que contiene la pared de células *rga2Δ* en comparación con las células silvestres.

Estudios realizados en nuestro laboratorio han demostrado que Rho1 y Rho2 en su estado activo interaccionan con las quinasas Pck1 y Pck2 y que Rho1 activa es capaz de estabilizar a estas quinasas (Arellano *et al.*, 1999a; Sayers *et al.*, 2000). Además, la delección del gen *rga5*⁺ que codifica una GAP de la GTPasa Rho1, favorece la estabilización de las dos proteínas quinasas, principalmente la de Pck1 (Calonge *et al.*, 2003). En el caso de Pck2 el resultado no es tan claro, posiblemente porque esta quinasa también interacciona con Rho2 que está regulada por otras GAPs. De hecho, en este trabajo observamos que en las células carentes de *rga2*⁺ se incrementa la interacción de Rho2 con su efector Pck2 y aumenta la estabilidad de esta quinasa. Por tanto, Rga2 actúa como regulador negativo de la GTPasa Rho2 en la interacción y estabilización de Pck2.

Evidencias genéticas y bioquímicas demuestran que Rga2 regula a la GTPasa Rho2 en su papel en la ruta de MAPK de mantenimiento de la integridad celular

(Barba *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2006). Las células carentes de *rga2*⁺, presentan fenotipos opuestos a las células carentes de *rho2*⁺ o *mkh1*⁺ (MAPKKK) frente a drogas que dañan la pared celular (calcoflúor y caspofungina) o sensibilidad al MgCl₂. Sin embargo, las cepas mutantes dobles *rho2Δ rga2Δ* y *mkh1Δ rga2Δ* se comportaban de manera similar a las cepas *rho2Δ* y *mkh1Δ*, indicando que *mkh1*⁺ y *rho2*⁺ son epistáticos sobre *rga2*⁺. En este contexto, podemos afirmar que la ausencia de Rho2 y Mkh1 es suficiente para suprimir la hipersensibilidad a MgCl₂, FK506 o calcoflúor de las células *rga2Δ*, sugiriendo que estas proteínas actúan por debajo de Rga2 en la misma ruta de señalización. Además, hemos demostrado que el dominio GAP es esencial para el papel que desempeña Rga2 en esta ruta, ya que las células carentes de este dominio son hipersensibles a MgCl₂. Todos los datos sugieren que la falta de Rga2 aumenta los niveles de fosforilación de la MAPK Pmk1. Aunque no hemos sido capaces de detectar un incremento de fosforilación de Pmk1 en la cepa *rga2Δ* respecto a una cepa silvestre, si hemos visto que en las células que sobreexpresan *rga2*⁺, la fosforilación de Pmk1 descendió en torno a un 30-40 % con respecto a las células silvestres y esta MAPK no se activó bajo estrés osmótico en dichas células. Estos datos sugieren que Rga2 también podría actuar regulando negativamente a Rho2 en esta ruta de señalización.

Ante los datos sobre la regulación de la fosforilación de Pmk1 en cepas con diferentes niveles de Rga2 proponemos tres hipótesis:

- A. Rga2 regula a Rho2 principalmente en la biosíntesis de la pared celular y de manera secundaria en la ruta MAPK de integridad celular.
- B. Rga2 regula la interacción de Rho2 con su efector Pck2 y también podría regular la interacción de Rho2 con Pck1 aunque resultados previos parecen indicar que no existe tal interacción (Calonge *et al.*, 2000). Pck1 tiene un efecto regulador negativo en la ruta MAPK de integridad celular ya que las células carentes de *pck1*⁺ presentan una fosforilación constitutiva de Pmk1 (Barba *et al.*, 2008). Así, la estabilización de ambas quinasas tendría efectos opuestos en la fosforilación de Pmk1.
- C. Rga2 no es la única GAP en la regulación negativa de la GTPasa Rho2, y otras proteínas pueden regular negativamente a esta GTPasa en su activación de la ruta MAPK de integridad y quizás en las demás funciones que realiza Rho2 en la célula.

Siguiendo esta última posibilidad, analizamos los niveles activos de Rho2 al sobreproducir o eliminar otras posibles GAPs. El resultado fue que, además de Rga2, encontramos otras tres proteínas, Rga7, Rga6 y Rga4 que podrían regular negativamente a Rho2. Esta

redundancia tan característica de las proteínas con actividad GAP puede explicar que en las células carentes de *rga2*⁺, Pmk1 no esté hiperactivada.

Rga7 es una proteína con actividad GAP *in vivo* para Rho2. Las células carentes de *rga7*⁺ presentan un incremento del 19 % de α -glucano de la pared celular con respecto a la estirpe silvestre y los niveles basales de fosforilación de Pmk1 están aumentados con respecto a la cepa silvestre (comunicación personal del Dr. José Cansado). Aunque estos datos son muy preliminares sugieren que esta proteína puede regular a Rho2 en la ruta de integridad celular y en la biosíntesis de la pared celular.

Respecto a Rga6, esta proteína tiene un efecto mínimo en la regulación de Rho2. Las células carentes de *rga6*⁺ presentan un débil incremento en los niveles activos de Rho2 y un ligero aumento del polímero α -glucano (16 %) con respecto a la estirpe silvestre. Además estas células mejoran la morfología y el defecto de crecimiento de la cepa mutante *mok1-664*. A diferencia de las células *rga2* Δ , las células *rga6* Δ no manifiestan sensibilidad al MgCl₂ y no se produce una mayor fosforilación de la MAPK Pmk1. Estos datos sugieren que Rga6 tiene un papel secundario en la biosíntesis del α -glucano y no participa en la ruta MAPK de integridad celular.

Otra proteína con actividad GAP para Rho2 es Rga4. Esta proteína está descrita como reguladora negativa de Cdc42 y es importante para el control de las dimensiones celulares (Das *et al.*, 2007; Tatebe *et al.*, 2008). Las células carentes de *rga4*⁺ son hipersensibles a MgCl₂ y presentan un incremento significativo de los niveles de fosforilación basales y bajo estrés osmótico de Pmk1. Además, este incremento es dependiente de la GTPasa Rho2 y del dominio GAP de Rga4. Sin embargo, no observamos que esta proteína tenga un papel en la regulación de la pared celular. Por tanto, los datos sugieren que

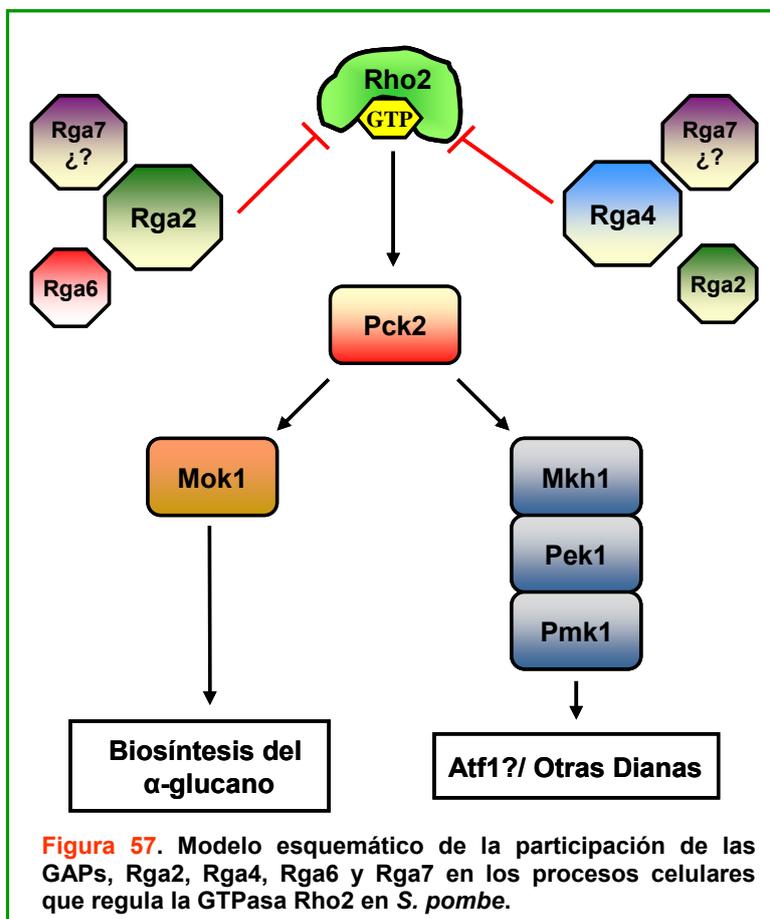


Figura 57. Modelo esquemático de la participación de las GAPs, Rga2, Rga4, Rga6 y Rga7 en los procesos celulares que regula la GTPasa Rho2 en *S. pombe*.

Rga4 y ,probablemente, Rga7 sean otras GAPs importantes en la regulación de Rho2 en la ruta de integridad celular (Figura 57).

En resumen, la GTPasa Rho2 está regulada por al menos cuatro proteínas: Rga2, Rga7, Rga6 y Rga4. Todas ellas participan de una u otra forma en los distintos procesos en los que ejerce su función Rho2. En la regulación de la biosíntesis de pared celular, Rga2 parece ser la más importante mientras que Rga7 y Rga6 tienen un papel minoritario y Rga4 no tiene ningún papel. En la ruta MAPK Mkh1-Pek1-Pmk1 de integridad celular Rga4 y, quizás, Rga7 podrían ser las más importantes, Rga2 participaría de forma secundaria y Rga6 no participaría.

En la bibliografía se han descritos ejemplos en los que varias GAPs regulan, en mayor o menor medida, un determinado proceso. La proteína Bem3, es una GAP de Cdc42 en la levadura de gemación y contribuye de manera importante a la regulación de la morfogénesis celular (Smith *et al.*, 2002). Rga1 y Rga2 son otras dos GAPs de esta GTPasa, que contribuyen con un papel minoritario en este proceso (Smith *et al.*, 2002). Estos reguladores negativos desempeñan papeles diferentes en algunos procesos, como Rga1 en el crecimiento invasivo y Bem3 en la regulación del crecimiento polarizado durante la conjugación, y redundantes en otros, como la regulación de las septinas, en las que participan las tres proteínas, Rga1, Rga2 y Bem3 (Bidlingmaier and Snyder, 2004; Caviston *et al.*, 2003; Gladfelter *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2002).

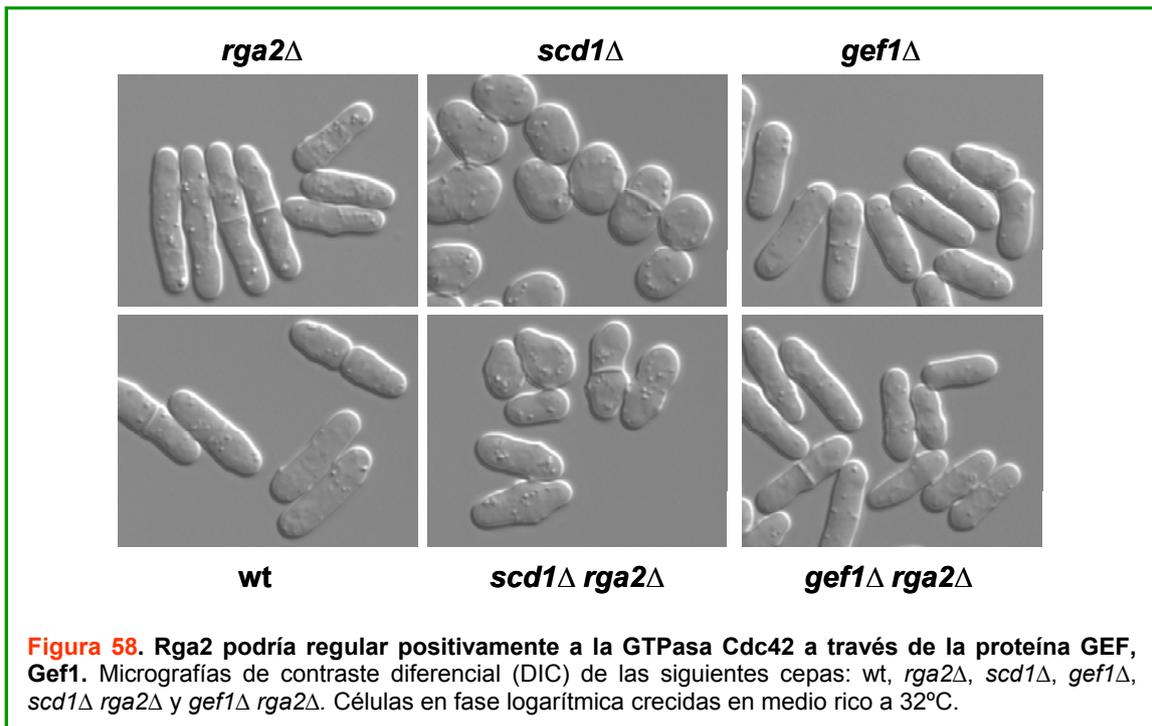
Curiosamente, hemos observado que en las células carentes de cualquiera de las proteínas con actividad GAP sobre Rho2, *rga2*⁺, *rga4*⁺, *rga6*⁺ o *rga7*⁺, se aprecia un descenso de la cantidad total de Rho2. Esto podría ser debido a que Rho2 estuviese regulada por degradación una vez activada. En células animales existen varios ejemplos de regulación de proteínas Rho por degradación (Schwamborn *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2003b) y ,recientemente, se ha publicado que la proteína Rdi1, la única proteína GDI de *S. cerevisiae*, regula la degradación de la GTPasa Rho4 a través de la vía proteolítica que incluye el proteasoma, las proteasas vacuolares y la quinasa Ygk3 (homóloga a la quinasa de la glucógeno sintasa 3β) (Tiedje *et al.*, 2008). Serán necesarios experimentos adicionales para estudiar en profundidad esta posible regulación por degradación de la GTPasa Rho2.

Rga2 regula además la morfogénesis celular de manera independiente a la GTPasa Rho2. Las alteraciones morfológicas causadas por la eliminación del gen *rga2*⁺ ocurren también en ausencia de esta GTPasa y sugerimos que puede ser debido a una disminución de los niveles de Cdc42 activa. Rga2 y Cdc42 interactúan físicamente y un aumento de la cantidad de Cdc42 corrige parcialmente el fenotipo morfológico de la cepa *rga2*Δ. Además, la delección de Rga4, la única GAP descrita para Cdc42 (Tatebe *et al.*, 2008) cau-

sa un fenotipo opuesto al de la cepa *rga2Δ*, con células más anchas y más cortas que una estirpe silvestre (Das *et al.*, 2007). La cepa mutante doble *rga2Δ rga4Δ* compensa el fenotipo morfológico de las cepas *rga2Δ* y *rga4Δ*, sugiriendo un papel antagonista de ambas proteínas en la regulación de las dimensiones celulares mediada, probablemente, por la GTPasa Cdc42. Además, Rga2 y Rga4 se localizan en áreas opuestas de la célula. Rga2 se localiza en las zonas de crecimiento activo, mientras que Rga4 se excluye de las áreas de crecimiento. La quinasa Pom1 es esencial para excluir a Rga4 del polo de no crecimiento en células monopolares (Tatebe *et al.*, 2008). Pom1 es también necesaria para la localización de Rga2 en ambos polos celulares ya que las células *pom1Δ* crecen por un sólo polo y Rga2 se localiza únicamente en el polo de crecimiento. Sin embargo, se desconoce si existe una interacción directa entre estas proteínas, como ocurre con Rga4 (Tatebe *et al.*, 2008). Por tanto, sugerimos que el papel opuesto de Rga4 y Rga2 sobre Cdc42 es necesario para el control de las dimensiones celulares.

La regulación positiva que realiza Rga2 sobre Cdc42 podría ser directa o indirecta a través de otras proteínas. En células animales se han descrito GAPs que a través de sus dominios DH y PH pueden activar a proteínas Rho y por tanto actuar como GEF (Moon and Zheng, 2003). Rga2 no contiene un dominio DH, importante para la activación de las GTPasas Rho, por lo que parece improbable que éste sea el mecanismo. Otra posibilidad es que Rga2 regule a una proteína GEF que a su vez regule la activación de Cdc42 en la morfogénesis celular. Las dos proteínas GEF descritas para Cdc42 son Scd1 y Gef1 (Coll *et al.*, 2003; Chang *et al.*, 1994; Fukui and Yamamoto, 1988; Hirota *et al.*, 2003). La ausencia de Scd1 origina células redondeadas. La cepa mutante doble *scd1Δ rga2Δ* presenta células más polarizadas que el mutante sencillo *scd1Δ* (Figura 58). Esto sugiere que ambas proteínas no participan en la misma ruta de señalización y los fenotipos se complementan parcialmente. Si bien, la falta de ambas proteínas disminuye la actividad de Cdc42. La delección de *gef1⁺* origina células ligeramente más largas que una cepa silvestre (Coll *et al.*, 2003) aunque no tanto como la de *rga2⁺*. Sorprendentemente, la cepa mutante doble *gef1Δ rga2Δ* presenta células similares a *gef1Δ*, más cortas que las del mutante sencillo *rga2Δ* (Figura 58). Aunque todavía faltan muchas incógnitas por resolver, podría ser que Rga2 regulase las dimensiones celulares a través de la interacción con la proteína Gef1 favoreciendo su efecto sobre Cdc42.

Otra proteína con un posible papel en el proceso de la morfogénesis celular es Rga6. Las células carentes de *rga6⁺* son un 11 % más cortas y un 8 % más anchas que las células silvestres. Además, la sobreexpresión de *rga6⁺* provoca una reducción del diámetro celular en los polos de crecimiento. Estos datos son similares a los resultados descritos para Rga4: Las células carentes de Rga4 son un 20 % más cortas y un 33 % más anchas



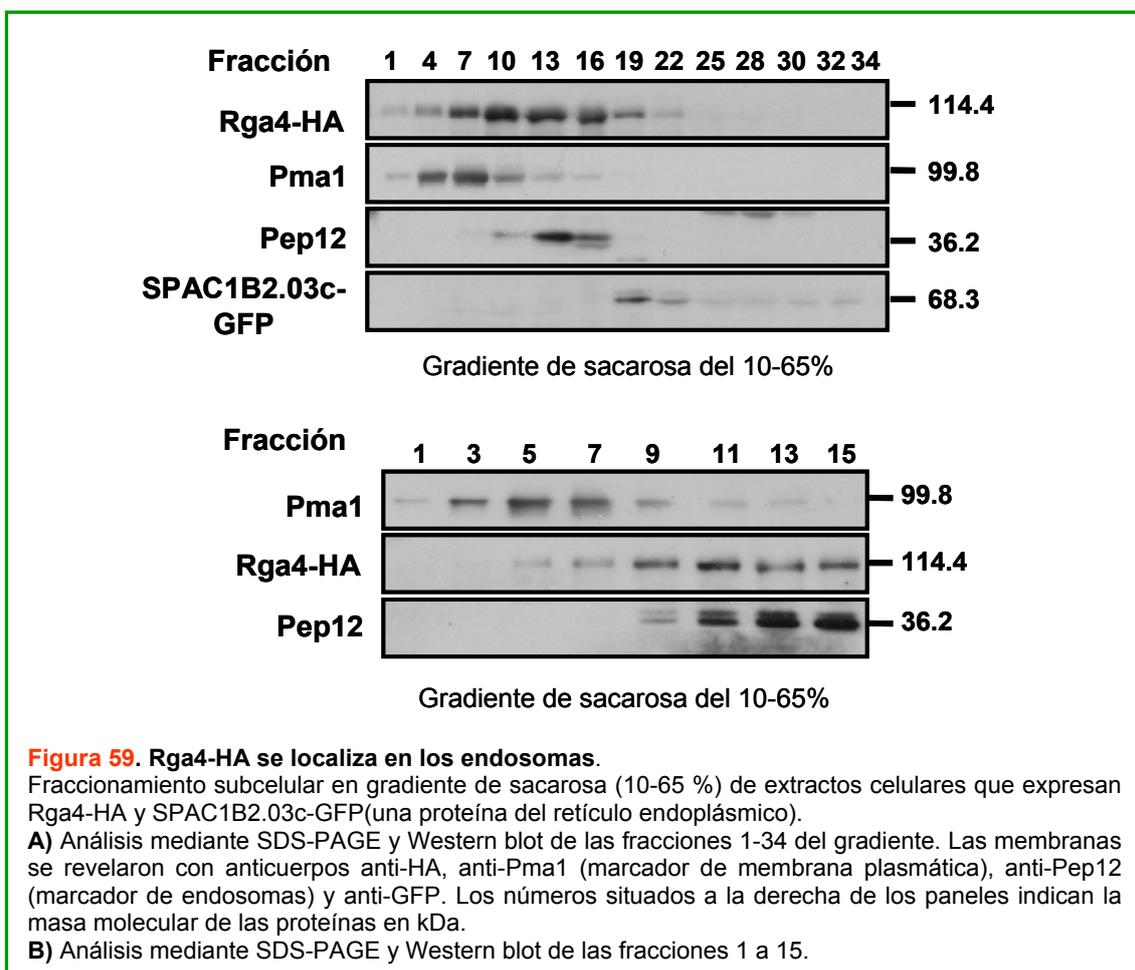
que la estirpe silvestre (Das *et al.*, 2007) y la sobreexpresión de Rga4 produce un estrechamiento en los polos celulares (Tatebe *et al.*, 2008). Las medidas de las dimensiones celulares de Rga6 indican que la contribución que realiza sobre la morfogénesis de la célula es menor que la desempeñada por Rga4. Es importante mencionar el efecto aditivo de la eliminación simultánea de ambas GAPs que causa unas células más despolarizadas y redondeadas que la eliminación individual de cualquiera de ellas. El papel de Rga6 en la morfogénesis lo podría realizar a través de la regulación de la GTPasa Cdc42. Hemos demostrado que Rga6 y Cdc42 interactúan por el ensayo de doble híbrido y Rga6 muestra actividad GAP *in vitro* sobre esta GTPasa (datos no presentados).

Por tanto, además de Rga4, proponemos que Rga2 y Rga6 son GAPs involucradas en la regulación de la morfología celular a través de su interacción con la GTPasa Cdc42. Rga4 y Rga6 actuando como reguladores negativos de esta GTPasa y Rga2 participando en una regulación positiva de Cdc42, quizá a través de la proteína Gef1. Como ya he mencionado anteriormente, la cepa mutante doble rga2 Δ rga4 Δ presenta unas dimensiones celulares similares a una cepa silvestre, sugiriendo efectos opuestos de las dos proteínas en el mismo proceso. En el caso de rga2 Δ rga6 Δ , las células muestran un fenotipo parecido a rga2 Δ , por lo que el defecto morfológico de rga6 Δ dependería de la proteína Rga2. Como ya se ha mencionado, las células de la cepa mutante doble rga4 Δ rga6 Δ son células casi redondas lo que sugiere que ambas proteínas realizan un papel aditivo en el control de la morfología celular.

La localización de Rga6 es parecida a la de Rga4 ya que ambas están excluidas de

las zonas de crecimiento. Sin embargo, Rga4 tiene una localización más restringida a la zona central de la célula (Tatebe *et al.*, 2008) mientras que Rga6 se extiende más en el contorno de la célula sugiriendo que podría desempeñar la regulación a Cdc42 en las áreas donde no apreciamos Rga4.

La localización de Rga6 y Rga4 es opuesta a la localización de Rga2 que está muy concentrada en los polos de crecimiento. Al realizar un fraccionamiento subcelular utilizando gradientes continuos de sacarosa, hemos observado que Rga2 es una proteína mayoritariamente de membrana plasmática, mientras que Rga6 y Rga4 se localizan fundamentalmente en las mismas fracciones que Pep12 (Figura 59). Pep12 es una t-SNARE homóloga de la sintaxina de mamíferos (Takegawa *et al.*, 2003). En *S. cerevisiae*, Pep12 interviene en el acoplamiento de vesículas del Golgi a los endosomas tempranos (Becherer *et al.*, 1996; Kienle *et al.*, 2009; Takegawa *et al.*, 2003). Por tanto, Rga6 y Rga4 podrían localizarse en endosomas. Esto supone que realizarían la regulación de Cdc42 en endosomas. En este sentido, ya se ha descrito que la fracción de la GTPasa Ras1 localizada en endomembranas es la que participa en la ruta del control de la morfogénesis celular junto con la proteína GEF Scd1 y la GTPasa Cdc42 en *S. pombe* (Onken *et al.*, 2006). Ras1 es una GTPasa que controla dos procesos en la levadura de fisión: la conjugación a través de la



ruta MAPK de respuesta a feromonas y la morfogénesis celular a través de su interacción con Scd1 y Cdc42 (Onken *et al.*, 2006). Estos autores obtuvieron una serie de cepas mutantes de Ras1 donde esta GTPasa se localizaba exclusivamente en endomembranas o en la membrana plasmática. Con estas cepas observaron que el “pool” de Ras1 que se localiza en endomembranas es el que participa en la ruta de la morfogénesis Ras1-Scd1-Cdc42, mientras que el “pool” de Ras1 que se sitúa en la membrana plasmática es el involucrado en la conjugación (Onken *et al.*, 2006). Por tanto, la localización de Rga6 y Rga4 en endosomas, sugiere que estas proteínas podrían estar formando parte de la ruta de señalización morfológica que controla Ras1.

Una posible forma de regulación de las locaciones de estas proteínas con actividad GAP sería la regulación por Cdk1. Cdk1 directamente controla varios componentes reguladores de la GTPasa Cdc42 para promover el crecimiento polarizado y los cambios morfológicos dentro del ciclo celular de la levadura de gemación (Moseley and Nurse, 2009). En *S. cerevisiae*, Cdk1 (Cdc28) puede inducir cambios morfológicos regulando positivamente a la proteína GEF Cdc24 (Gulli *et al.*, 2000) y negativamente a las GAPs, Bem2, Bem3 y Rga2 (Knaus *et al.*, 2007; Sopko *et al.*, 2007). En *S. pombe* no se ha demostrado que Cdk1 (Cdc2) regule a proteínas GEF y GAP, pero probablemente pueda tener lugar este tipo de regulación ya que Gef1, Rgf1, Rga2, Rga6 y Rga4 tienen múltiples sitios consenso de fosforilación de Cdk1.

La localización diferencial en la célula de Rga2, Rga6 y Rga4 puede ser un hecho importante para la regulación de las dimensiones celulares a través de la GTPasa Cdc42. En *S. cerevisiae* se ha diseñado un modelo matemático para caracterizar la polaridad y morfología en función de la distribución dinámica de proteínas polarizadas tomando como modelo la GTPasa Cdc42 constitutivamente activa (Marco *et al.*, 2007). Se considera que la combinación y el equilibrio entre los procesos de transporte polarizado, difusión y endocitosis es suficiente para una correcta distribución de las proteínas polarizadas y en definitiva para una adecuada morfología celular (Marco *et al.*, 2007). Es posible que la localización diferencial de estas tres proteínas con actividad GAP, regulada por la combinación de transporte polarizado, difusión y endocitosis, sea necesaria para que la actividad de Cdc42 esté regulada en el tiempo y en el espacio y puedan así controlarse las dimensiones celulares.

Experimentos futuros nos permitirán descifrar el mecanismo preciso de localización y/o activación por el cual estas GAPs ejercen una regulación espacial de la GTPasa Cdc42 que condiciona las dimensiones celulares.

CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Rga2 es una GAP específica de la GTPasa Rho2 y actúa regulándola negativamente en la biosíntesis de la pared celular y en la ruta de MAPK de integridad celular.
2. Rga2 se localiza en la membrana plasmática de los polos celulares y de la zona de división. La región N-terminal y el dominio PH de Rga2 son necesarios para su correcta localización.
3. Rga2 participa en el control de las dimensiones celulares, probablemente mediante su interacción con la GTPasa Cdc42 y tiene funciones opuestas a la proteína Rga4 con actividad GAP sobre Cdc42 también implicada en este proceso.
4. Rga4 es una GAP de la GTPasa Rho2 que regula negativamente la activación de la ruta de MAPK de integridad.
5. Rga6 es una GAP de varias GTPasas Rho que se excluye de las áreas de crecimiento de la célula y participa en la regulación de la morfología y la integridad celular.

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 (Durfee *et al.*, 1993). Tanto las cepas de *S. pombe* como las cepas de *S. cerevisiae* se conservan en glicerol al 25 % a -78°C . Para los trabajos de clonación molecular se utilizó la estirpe DH5 α de *Escherichia coli*. Las cepas de *E. coli* se conservan a -78°C en glicerol al 50 %.

Tabla I: Cepas utilizadas en este trabajo.

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>		
PPG0102	h ⁻ <i>leu1-32</i>	Colección laboratorio
PPG0103	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18</i>	Colección laboratorio
PPG4581	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5927	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4546	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4532	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
PPG4403	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-ΔGAP-GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
PPG4473	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-ΔPH-GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
PPG4401	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-ΔPHΔGAP -GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
PPG4471	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-ΔN -GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
PPG6015	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺:leu1⁺</i>	Colección laboratorio
PPG4418	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 pxl1::ura4⁺ cherryRFP-pxl1⁺:leu1⁺ rga2⁺-GFP:kanMX6</i>	Este trabajo
PPG5241	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 tea1::ura4⁺</i>	P. Nurse
PPG5263	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 pom1::ura4⁺</i>	P. Nurse
PPG5901	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-GFP:kanMX6 tea1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG5903	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-GFP:kanMX6 pom1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG0634	h ⁺ <i>leu1-32 ura4-D18 cmn1⁺-GFP:KanMX6</i>	MK Balasubramanian
PPG3848	h ⁻ <i>leu1-32 ura4-D18 int SV40GFP-atb2⁺ ::leu</i>	P. Nurse
PPG0160	h ⁺ <i>leu1-32 ade6 HA-rho1⁺</i>	Colección laboratorio

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

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
PPG4714	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 HA-cdc42⁺:kanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG5848	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga2::ura4⁺ HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG5850	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga2::ura4⁺ HA-cdc42⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4477	<i>h⁻ leu1-32 ade6 rga2:: KanMX6 HA-rho1⁺</i>	Este trabajo
PPG5933	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-myc:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG5963	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-myc:KanMX6 HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG3909	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 mok1-664</i>	Colección laboratorio
PPG5931	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 mok1-664 rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG5932	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 mok1-664 rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG0370	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6 rho2::ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG2370	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 mkh1::ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG4423	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 rga2::KanMX6 rho2::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG4425	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 rga2::KanMX6 mkh1::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG4460	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pmk1⁺-HA6His:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG4461	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pmk1⁺-HA6His:ura4⁺ rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4427	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pmk1⁺-HA6His:ura4⁺ rho2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4430	<i>h⁻ leu1-32 ade6-M216 pmk1⁺-HA6His:ura4⁺ rho2::KanMX6 rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG0301	<i>h⁻ leu1-32 cdc3-319</i>	P. Nurse
PPG0304	<i>h⁻ ade6 cdc8-117</i>	P. Nurse
PPG6650	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-GFP:kanMX6 cdc3-319</i>	Este trabajo
PPG6651	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga2⁺-GFP:kanMX6 cdc8-117</i>	Este trabajo
PPG0742	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga3::leu⁺</i>	Colección laboratorio
PPG3906	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga6::ura4⁺</i>	K. Nakano
PPG6149	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga7::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG6655	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga3::leu1⁺ HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4572	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga6::ura4⁺ HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4464	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 rga7::ura4⁺ HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4711	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 HA-cdc42⁺:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG4549	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 GFP-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG6153	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 P41nmt-HA-pck2⁺:KanMX6 GFP-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG6162	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 P41nmt-HA-pck2⁺:KanMX6 GFP-rho2⁺:KanMX6 rga2::ura4⁺</i>	Este trabajo

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

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
PPG6158	$h^- leu1-32 ura4-D18 P41nmt-HA-pck2^+::KanMX6 rga2::ura4^+$	Este trabajo
PPG5864	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6 rho2::KanMX6 rga2::ura4^+$	Este trabajo
PPG5670	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6 for3^+-3GFP::ura4^+$	S. Martin
PPG6608	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6 rga2::KanMX6 for3^+-3GFP::ura4^+$	Este trabajo
PPG2568	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6 for3::KanMX6$	B. Feierbach
PPG6614	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6 for3::KanMX6 rga2::ura4^+$	Este trabajo
PPG1848	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6$	Colección laboratorio
PPG4412	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6 rga2::ura4^+$	Este trabajo
PPG6901	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga4^+-GFP::KanMX6$	Colección laboratorio
PPG7114	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga4^+-GFP::KanMX6 HA-rho2^+::KanMX6$	Este trabajo
PPG4465	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga4::KanMX6 HA-rho2^+::KanMX6$	Este trabajo
TS310	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pck2::HygR pmk1^+-HA6H::ura4^+$	Este trabajo
MI200	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pmk1^+-HA6H::ura4^+$	Madrid <i>et al.</i> , 2006
MI201	$h^- leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 pmk1^+-HA6H::ura4^+$	Madrid <i>et al.</i> , 2006
TS320	$h^- leu1-32 ura4-D18 ade6-M210 rga4::KanMX6 pmk1^+-HA6H::ura4^+$	Este trabajo
MI700	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 rho2::KanR pmk1^+-HA6H::ura4^+$	Barba <i>et al.</i> , 2008
TS311	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 rho2::KanR rga4::KanR pmk1^+-HA6H::ura4^+$	Este trabajo
TS312	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6-M216 pck2::HygR rga4::KanR pmk1^+-HA6H::ura4^+$	Este trabajo
PPG3906	$h^- leu1-32 ura4-D18 ade6 rga6::ura4^+$	K. Nakano
PPG4510	$h^- leu1-32 ura4-D18 ade6 rga6::KanMX6$	P. Nurse
PPG4537	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga6^+-GFP::KanMX6$	Este trabajo
PPG4552	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga6^+-GFP::KanMX6 tea1::ura4^+$	Este trabajo
PPG4556	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga6^+-GFP::KanMX6 pom1::ura4^+$	Este trabajo
PPG7524	$h^- leu1-32 ura4-D18 SPAC1B2.03c^+-GFP::KanMX6 rga2^+-HA::KanMX6$	Este trabajo
PPG7525	$h^- leu1-32 ura4-D18 SPAC1B2.03c^+-GFP::KanMX6 rga6^+-HA::KanMX6$	Este trabajo
PPG7528	$h^- leu1-32 ura4-D18 SPAC1B2.03c^+-GFP::KanMX6 rga4^+-HA::KanMX6$	Este trabajo
PPG7113	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga6^+-GFP::KanMX6 HA-cdc42^+::ura4^+$	Este trabajo
PPG7138	$h^- leu1-32 ura4-D18 rga6^+-GFP::KanMX6 myc-rho3^+::KanMX6$	Este trabajo
PPG6641	$h^+ leu1-32 ura4-D18 myc-rho3^+::KanMX6$	Este trabajo
PPG4405	$h^+ leu1-32 ura4-D18 ade6 rga6^+-GFP::KanMX6 HA-rho1^+$	Este trabajo

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

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
PPG4410	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga6⁺-GFP:KanMX6 HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4572	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga6::ura4⁺ HA-rho2⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG4568	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga6::ura4⁺ HA-cdc42⁺:KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7159	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 myc-rho3⁺:KanMX6 rga6::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG6440	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 HA-rho4⁺:ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG7133	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 rga6::KanMX6 HA-rho4⁺:ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG7135	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 ade6 rga6::KanMX6 HA-rho1⁺</i>	Este trabajo
PPG3915	<i>h⁻ leu1-32 ura4-D18 mok1-664 rga6::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG6618	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG0149	<i>h⁺ cdc25-22</i>	Colección laboratorio
PPG3930	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 rga6::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG7566	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 cdc25-22 rga4::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG5841	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga2::ura4⁺ rga6::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG5843	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga6::ura4⁺ rga4::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7149	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 crib-3GFP:ura4⁺ rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7151	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 crib-3GFP:ura4⁺ rga4::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7150	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 crib-3GFP:ura4⁺ rga6::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG6555	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 crib-3GFP:ura4⁺</i>	K. Shiozaki
PPG7554	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 crib-3GFP:ura4⁺ rga6::KanMX6 rga2::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG7548	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 crib-3GFP:ura4⁺ rga4::KanMX6 rga2::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG7563	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 crib-3GFP:ura4⁺ rga4::KanMX6 rga6::ura4⁺</i>	Este trabajo
PPG2517	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 gef1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG2601	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 gef1::ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG3637	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 scd1::KanMX6</i>	Colección laboratorio
PPG4303	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 scd1::ura4⁺</i>	Colección laboratorio
PPG6625	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 gef1::ura4⁺ rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7153	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga2::ura4⁺ gef1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG6630	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 rga2::ura4⁺ scd1::KanMX6</i>	Este trabajo
PPG7503	<i>h⁺ leu1-32 ura4-D18 scd1::ura4⁺ rga2::KanMX6</i>	Este trabajo
Saccharomyces cerevisiae		
Y190	MATa gal4 gal80 his3 trp1-901 ade2-101 ura3-52 leu2-3,-112 ura3::gal1→LacZ lys2::gal(UAS) →his3 cyhr	Colección laboratorio

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

ESTIRPE	GENOTIPO	ORIGEN
<i>Escherichia coli</i>		
DH5 α	F- ϕ 80dlacZ Δ M 15, Δ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(rk-, mk+), phoA, supE44, l-, thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies

2. Medios de cultivo

2.1. Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* han sido descritos (Moreno *et al.*, 1991). Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar a una concentración final del 2 %. Todos los medios fueron preparados con agua destilada (Milli-Rho) y esterilizados en el autoclave.

- ◆ **Medio YES (medio rico).** Se utilizó rutinariamente para el crecimiento vegetativo de *S. pombe*. Su composición es: glucosa al 3 % y extracto de levadura al 0,5 %. El medio es suplementado con leucina, histidina, adenina, lisina y uracilo (250 mg/l).
- ◆ **Medio YES+G.** Se utilizó para la selección de cepas de *S. pombe* transformadas con el marcador de resistencia a geneticina. Su composición es la del medio YES más 100 μ g/ml de sulfato de geneticina (G-418, Life Technologies).
- ◆ **Medio YES+KCl.** Este medio se utilizó para realizar los tratamientos de choque osmótico salino en los ensayos de determinación de la actividad de Pmk1. Su composición es la del medio YES al que se añade una concentración final de 0,6 M de KCl.
- ◆ **Medio mínimo (MM).** Se utilizó como medio en los experimentos de transformación de cepas de *S. pombe* auxótrofas para leucina o uracilo. Para llevar a cabo los experimentos de sobreexpresión con el promotor del gen *nmt*, las células se cultivaron en medio mínimo con los suplementos adecuados y tiamina (5 μ g/l), consiguiendo la represión del promotor (Maundrell, 1990). Posteriormente, las células se lavaron 4 veces con agua estéril y se reinocularon en medio mínimo sin tiamina, provocando la inducción del promotor y la expresión del gen regulado por él. La composición del medio es la siguiente: Glucosa al 2 %, ftalato monopotásico 0,3 %, Na₂HPO₄ al 0,22 %, NH₄Cl al 0,5 %. Esta disolu-

ción se esteriliza en el autoclave y posteriormente se le añaden diferentes cantidades de las soluciones concentradas de sales, minerales y vitaminas, que han sido esterilizados previamente por filtración:

- **Solución concentrada de sales (50X):** 0,26 M $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5 mM $\text{Cl}_2\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,67 M KCl y 14 mM Na_2SO_4 .
- **Solución concentrada de minerales (10.000X):** 81 mM H_3BO_3 , 23,7 mM MnSO_4 , 14 mM $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 7,4 mM $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 2,5 mM $\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 6 mM KI, 1,6 mM $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 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 de esporulación (MEA).** Usado para inducir la conjugación y la esporulación en *S. pombe*. Su composición es: Extracto de malta al 3 % suplementado con adenina, histidina, leucina y uracilo (225 mg/l).

Cuando fue necesario, los medios empleados para el crecimiento de *S. pombe* se suplementaron con diversos compuestos. El sorbitol, utilizado como estabilizador osmótico, se añadió a una concentración de 1,2 M previamente a la esterilización del medio de cultivo. Otros compuestos como el calcoflúor, la caspofungina y el cloruro magnésico se añadieron al medio esterilizado a la concentración final deseada.

Para los ensayos de dependencia de la localización de proteínas con respecto a la actina se usó la droga Latrunculina A a una concentración de 50 μM en cultivos de medio YES líquido, partiendo de una solución madre preparada en DMSO a una concentración de 5 mM. Para estudiar la localización de Rga2 tras el tratamiento con drogas que afectan al citoesqueleto de microtúbulos se utilizó el compuesto metil benzimidazol carbamato (MBC) a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ en cultivos de medio YES líquido, partiendo de una solución madre preparada en DMSO a una concentración de 1 mg/ml. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, poniendo como control un cultivo tratado con el solvente DMSO al 1 %.

2.2. Medios de cultivo para *S. cerevisiae*

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

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

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 de crecimiento

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

Los experimentos se realizaron siempre con cultivos en fase exponencial de *S. pombe* o *S. cerevisiae*. De manera rutinaria se preparaba un preinóculo en medio líquido al que se dejaba alcanzar la fase exponencial y posteriormente se inoculaba 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 o 36°C. En el caso de los cultivos líquidos, los matraces se mantuvieron con una agitación de entre 200 y 250 rpm y el volumen de cultivo no superó 1/4 del volumen del matraz, para permitir su correcta aireación. El crecimiento en medio líquido se determinó mediante lectura de la absorbancia del cultivo a 600 nm en un espectrofotómetro (BioRad Smart- Spec 3000). Se emplearon curvas de calibración obtenidas previamente en el laboratorio según las cuales una densidad óptica de 0,13 equivale aproximadamente a 1×10^7 células/ml de *S. pombe*. El mantenimiento de las

cepas se realizó por resiembra en placas de medio sólido.

3.2. Condiciones de crecimiento para *E. coli*

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

4. Detección de la actividad β -galactosidasa en placa

Durante el escrutinio realizado con el sistema del doble híbrido se analizó la actividad β -galactosidasa de las colonias capaces de crecer en medio sin leucina ni triptófano siguiendo el proceso descrito (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.

5. Métodos genéticos

5.1. Conjugación y obtención de diploides

Para inducir la conjugación entre dos cepas de *S. pombe*, se usaron estirpes heterotálicas de tipo sexual opuesto (h^+ o h^-) incubadas durante 24 horas en placa de medio YES. Se recogió aproximadamente la misma cantidad de células de cada cepa y se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (25 μl). 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 28°C.

Aunque la forma diploide de *S. pombe* no es estable de forma natural, es posible conseguir cepas diploides de manera experimental. Para obtener células diploides, se realizaron cruces entre cepas haploides h^+ y h^- con requerimientos nutricionales complementarios. Por ejemplo, usando cepas que portan los alelos *ade6-M210* y *ade6-M216* se pueden seleccionar diploides en medios carentes de adenina, por complementación intragénica. A las 10-12 horas después de haber preparado el cruce, cuando la conjugación ya ha tenido lugar pero no se detectan esporas dentro de los cigotos, se extiende la mezcla de células del

cruce en MM con los suplementos necesarios, pero sin adenina, de modo que sólo las células diploides puedan crecer. Tan pronto como se aprecian las colonias a simple vista, éstas se transfieren a placas de medio YES para evitar que los diploides esporulen. Los diploides así aislados se mantienen en YES para inhibir su esporulación, reestriéndolos cada 2-3 días en medio fresco. Antes de realizar cualquier experimento con ellos, se comprueba su genotipo mediante réplicas en medio mínimo selectivo y su capacidad para esporular en medio MEA para evitar seleccionar diploides estériles.

5.2. Aislamiento de ascosporas

Para obtener esporas, se hicieron suspensiones en agua estéril de la mezcla de conjugación incubadas durante 2 días a 28°C en placas de MEA, y se trataron con 20 - 50 unidades de glusulasa (PerkinElmer Life Sciences Inc.) durante toda la noche en agitación a temperatura ambiente. Este tratamiento destruye las paredes celulares de las células vegetativas, sin afectar a las ascosporas, que poseen una pared más resistente. Se recogieron las esporas por centrifugación a 3.000 rpm durante 1 minuto. La mezcla de esporas fue lavada 4 veces con agua estéril y con la ayuda de una cámara Thoma se estimó el número de esporas por mililitro. Se realizaron diluciones apropiadas, para obtener entre 100 y 1.000 esporas por placa, y se extendieron en placas de YES. Se incubaron las placas durante 4 días a 25°C-28°C. Mediante réplica en diferentes medios selectivos o a distintas temperaturas se seleccionaron las estirpes con el genotipo deseado.

5.3. Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación: Análisis de tétradas

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

6. Procedimientos generales de biología molecular

6.1. Vectores utilizados

6.1.1. Vectores de *E. coli*

- ♦ **pBluescript KS⁺ y SK⁺** (Stratagene)

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

- ♦ **pGEX** (Pharmacia)

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

- ♦ **pGEM-T** (Promega)

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

6.1.2. Vectores de *S. pombe*

- ♦ **pREP**

Son una serie de vectores de expresión en *S. pombe*, reprimibles en pre-

sencia de tiamina. Todos ellos poseen elementos comunes en su estructura: un origen de replicación de *E. coli*; el gen de resistencia a ampicilina; el origen de replicación *ars1* de *S. pombe*; un gen marcador de complementación de auxotrofías de *S. pombe* y el promotor del gen *nmt1* (“no messenger with thiamine”) fusionado a un sitio de clonación múltiple, que permite sobreexpresar los insertos clonados cuando se incuban las células en ausencia de tiamina. Todos los vectores pREPX proceden del vector pREP1 (Maundrell, 1990), de elevada expresión, al que se le incorporó un sitio XhoI en el sitio de clonación múltiple (Forsburg, 1993). Los distintos vectores pREPX se diferencian entre sí por:

- *El marcador de selección: LEU2* de *S. cerevisiae* (que complementa estirpes *leu1-32*), en el caso de los vectores denominados con número impar, pREP1, pREP3X, pREP41X y pREP81X; y *ura4⁺* (que complementa estirpes *ura4-D18*), en el caso de los vectores denominados con número par, pREP4X, pREP42X y pREP82X.
- *El promotor:* para poder inducir niveles de expresión intermedios, se modificó el promotor *nmt* original introduciendo una serie de mutaciones en su secuencia TATA, que disminuyen la fortaleza de éste. Así, los vectores de expresión fuerte son los plásmidos pREP1, pREP3X y pREP4X, los de expresión intermedia son pREP41X y pREP42X; y los de expresión baja son pREP81X y pREP82X (Basi *et al.*, 1993).

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 and Russell, 1995). Se trata de un vector pREP1 que contiene en el extremo 5' del sitio de clonación múltiple, la secuencia codificante de la proteína GST y un sitio de corte para la trombina, y en el extremo 3' del sitio de clonación múltiple, la secuencia codificante de dos epítomos de la hemaglutinina. 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 epítomo HA de la hemaglutinina o con la del gen de la proteína verde EGFP (“Enhanced Green Fluorescent Protein”) (Craven *et al.*, 1998).

6.1.3. Vectores de *S. cerevisiae*

♦ pAS2 y pACT2

Estos vectores de expresión de *S. cerevisiae* se emplean para el ensayo 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 epítopos de la hemaglutinina bajo el control del promotor constitutivo del gen *ADH* y un sitio de clonación múltiple. Como marcador auxotrófico en *S. cerevisiae*, lleva el gen *TRP1*. También lleva el gen *CYH2*, que confiere sensibilidad a cicloheximida en cepas *cyh^r*.
- El vector pACT2, por su parte, posee el dominio de activación transcripcional del gen *GAL4* en fase con la secuencia de dos epítopos de la hemaglutinina y un sitio de clonación múltiple. Como marcador auxotrófico en *S. cerevisiae*, lleva el gen *LEU2*.

6.2. Obtención de ADN

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

6.3. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 2700 de Applied Biosystems. Las mezclas de reacción contenían: tampón de reacción suministrado por el proveedor, 1,5 mM MgCl₂, los 4 desoxinucleótidos trifosfatos precursores a una concentración final de 0,2 mM cada uno, 40 pmoles de cada oligonucleótido utilizado como cebador, 0,25 unidades de Taq polimerasa (EcoTaq, Ecogen) y una cantidad de ADN molde variable, dependiendo si se trataba de ADN genómico o plasmídico. Para la comprobación rutinaria de cepas mutantes de *S. pombe*, se utilizaron células directamente, sin necesidad de extraer el ADN.

La reacción requiere la desnaturalización del ADN molde, el anillamiento de los ceba-

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

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

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron suministrados por Isogen o Thermo y sus secuencias y utilidad se describen en la **Tabla II**.

6.4. Secuenciación de ADN

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

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

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

Tabla II: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

NOMBRE	SECUENCIA	UTILIDAD
P.Rga2(NotI)	5'-AAGGAAAAAA <u>GCGGCCGC</u> GAGTAAACGGCTATGCAAGAATAG-3' NotI	Clonación del promotor de <i>rga2</i> ⁺
P.Rga2 (BamHI)	5'-CGC <u>GGATCC</u> TTGACGAAGAGAACAAGCAGCTT-3' BamHI	Clonación del promotor de <i>rga2</i> ⁺
T.Rga2 (EcoRI)	5'-CCG <u>GAATTC</u> GAATTTAACGTCTACAAATTGTCAAC-3' EcoRI	Clonación del terminador de <i>rga2</i> ⁺
T.Rga2(SalI)	5'-AAGGACGC <u>GTCGAC</u> CACAGAGCATCCACTATTCGT-3' SalI	Clonación del terminador de <i>rga2</i> ⁺
Rga2.15	5'-CGC <u>GGATCCCATGG</u> TAAAGATGGATGTTGTGCGG-3' BamHI NcoI	Clonación de <i>rga2</i> ⁺
2.6 DO	5'-GCCTAGGTGTGGTAGAAGAC-3'	Clonación de <i>rga2</i> ⁺
2.9 UP	5'-GATCTTAAGTTGGAACAGAGG-3'	Clonación de <i>rga2</i> ⁺
2.14 DO	5'-GTCGAATTCCTCGTCTGAGC-3'	Clonación de <i>rga2</i> ⁺
erga2up	5'TTTCACGACAAACGAACGGAGCACAAAACGAAAGCGACTCTGATGTTA GTGATGACAATGGGGAGGATAACGAATTTTTCCGGATCCCCGGGTTAATT AA 3'	Marcaje de Rga2 en su extremo carboxilo
erga2DO	5'GATAGTAAAACACGTACAACCATTGAAAGTTTAAAGTAAACTAACCGTCT CAAGCGTTGACAATTTGTAGACGTTAAATTCCTAGAATTCGAGCTCGTTTA AAC 3'	Marcaje de Rga2 en su extremo carboxilo
erga6up	5'AGATTAATAAAAAGGCATCTCCAAGGGTCAGTTTGTGGACAAAACCTGTT TGGTAAATTCGATCAAACAAGAAGAAATCTCGGATCCCCGGGTTAATTA A 3'	Marcaje de Rga6 en su extremo carboxilo
erga6DO	5'AAAATGAACCTAAACTTTAAGAGCAAACAAATGGTTGTAATATATGATAA ATAAATGACACCGAAAACAGAAATCCTTTCTTAGAATTCGAGCTCGTTTAA AC 3'	Marcaje de Rga6 en su extremo carboxilo
erga2up (gap Δ)	5'GTTTTAGAGATTGCTGACACTAGACGAAACCAAGATGCTCCTGAAAAGC ACGTCCCCGTGATAGAAATCCAGTCTTCTAGACGGATCCCCGGGTTAATT AA 3'	Construcción de la cepa Rga2- Δ GAP-GFP
erga2up (gap Δ pH Δ)	5'ATCAAGTTACTAGAATTTTTGTCAAGTGACACTTTACGAGAATACCTTCA TGATGTATTCTTCTCCTCCTGAGCATGCTCGGATCCCCGGGTTAATTA A 3'	Construcción de la cepa Rga2- Δ PH Δ GAP-GFP
Δ N(BamHI)	5'-CGC <u>GGATCC</u> CATGGGCGCACCTCCTTTCCCTACTC-3' BamHI	Construcción de la cepa Rga2- Δ N-GFP
2.12DO	5'-GGCACCTGCTCCATTGAATC-3'	Construcción de la cepa Rga2- Δ N-GFP

Tabla II: Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

NOMBRE	SECUENCIA	UTILIDAD
Δ PH(SphI)	5'-TCAGACAT <u>GCATGC</u> TAGTCCCTTCTCTGTATTATC-3' SphI	Construcción de la cepa Rga2- Δ PH-GFP
GFP-1	5'-GCATCACCTTCACCCTCTCC-3'	Construcción de la cepa Rga2- Δ PH-GFP

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

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

6.6. Transformación de *E. coli*

La transformación de *E. coli* con plásmidos o con mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado (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).

6.7. 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 (Bähler *et al.*, 1998a).

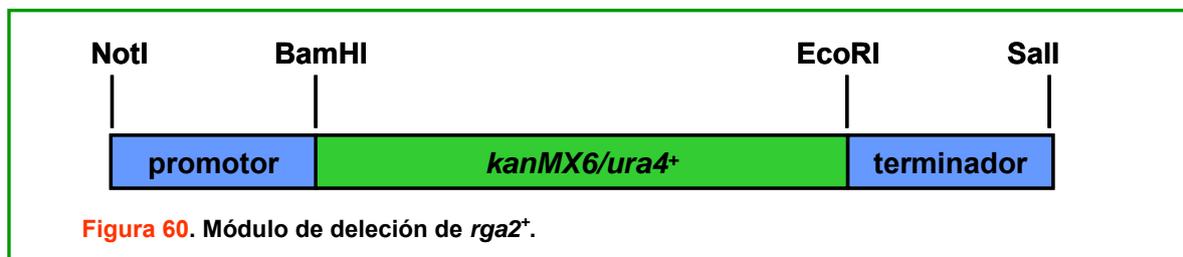
6.8. Delección de *rga2*⁺

La eliminación de la ORF correspondiente a *rga2*⁺ se llevó a cabo mediante la técnica de reemplazamiento génico en un solo paso descrita por Rothstein (1983, 1991). Para llevar a cabo este proceso, se construyó un "módulo de delección". Este módulo contenía 1.000 pares de bases de la región promotora de *rga2*⁺, el gen de resistencia a geneticina (*KanMX6*) o de prototrofia para uracilo (*ura4*⁺) y 1.000 pares de bases del terminador de *rga2*⁺. El "módulo de delección" se construyó mediante clonación secuencial de cada una de las partes en el plásmido KS (Figura 60).

En primer lugar, se obtuvieron las distintas regiones que conforman el módulo de inte-

gración mediante PCR de alta fidelidad. La región promotora se clonó, utilizando los oligonucleótidos P.Rga2(NotI), que incorpora el sitio de restricción NotI, y P.Rga2(BamHI), que incorpora el sitio de restricción BamHI, usando como molde ADN genómico extraído de una cepa silvestre. El gen de resistencia a la geneticina o el del marcador *ura4*⁺ se obtuvo mediante digestión del plásmido pFA6a-kanMX6 o pFA6a-ura4 con las enzimas BamHI y EcoRI. La región terminadora se clonó utilizando los oligonucleótidos T.Rga2(EcoRI), que incorpora el sitio EcoRI, y T.Rga2(Sall), que incorpora el sitio Sall, usando como molde ADN genómico.

El fragmento obtenido se cortó con la enzima XbaI, cuyo sitio de corte se localiza en el promotor de *rga2*⁺, y Sall, generando un fragmento de DNA que se purificó y se utilizó para transformar una cepa haploide de *S. pombe* e inducir el intercambio de la ORF del gen *rga2*⁺ por el marcador de selección *kanMX6* o *ura4*⁺ mediante recombinación homóloga.



6.9. Clonación de *rga2*⁺

La clonación del gen *rga2*⁺ se llevó a cabo en varios pasos:

- A. Los primeros 778 bp se obtuvieron llevando a cabo una PCR de alta fidelidad a partir de ADN genómico extraído de una cepa silvestre de *S. pombe*, utilizando los oligonucleótidos Rga2.15, que incorpora los sitios BamHI y NcoI, y 2.6 DO, que contiene nucleótidos de la ORF de *rga2*⁺. El producto de PCR se cortó con las enzimas de restricción BamHI y PuvII, cuyos sitios de corte se localizan en la ORF de *rga2*⁺ (Fragmento I). El segundo fragmento (II) comprendido entre los pares de bases 778-2.434 se obtuvo de la digestión del plásmido pREP3X-*rga2*⁺-N, que nos envió el Dr. Kentaro Nakano utilizando las enzimas de restricción PuvII y PstI. Ambos fragmentos (I y II) se clonaron en un plásmido KS. Este plásmido se digirió con las enzimas BamHI y PstI y por medio de una ligación triple BamHI-PuvII-PstI del vector KS y los dos fragmentos de la ORF de *rga2*⁺, se obtuvo el plásmido KS-*rga2*⁺-(2.434 bp). Posteriormente, se secuenció la construcción, y una vez comprobado que la secuencia era correc-

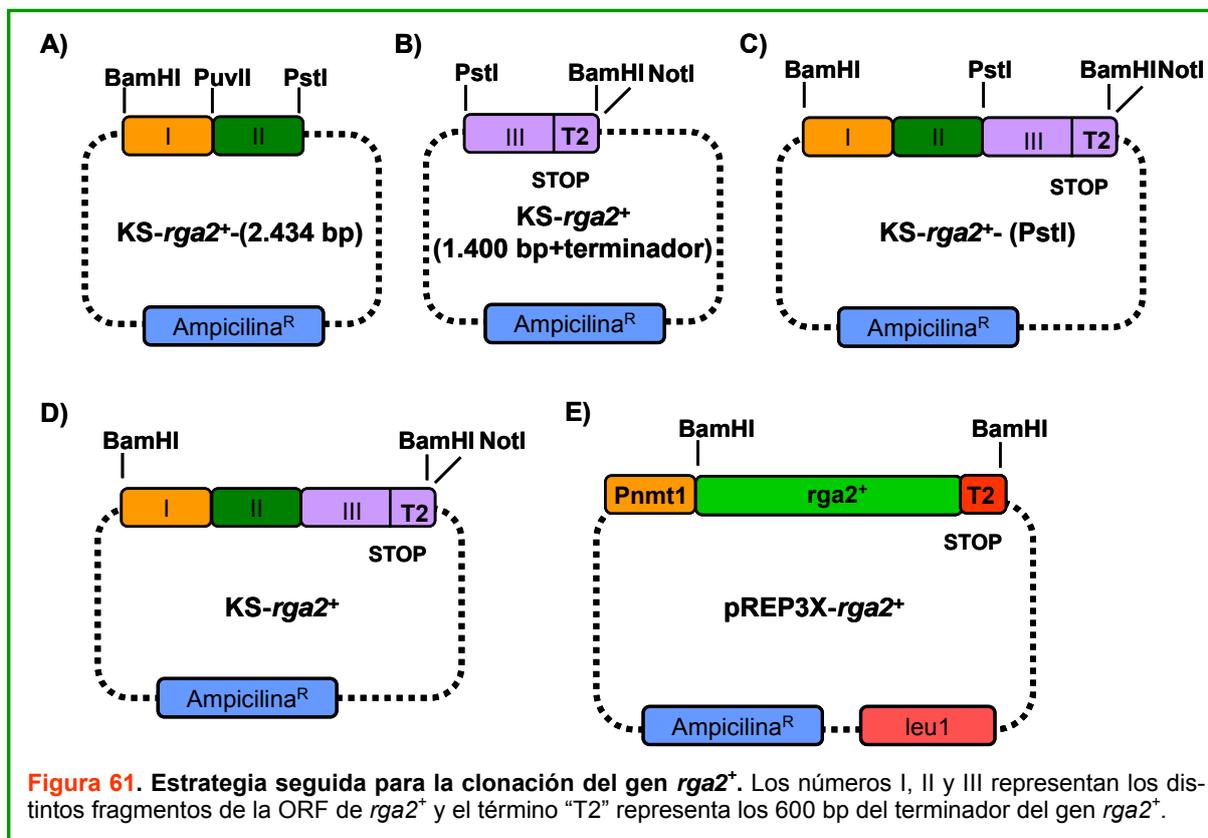
ta, proseguimos al segundo paso de clonación (Figura 61A).

- B. El fragmento comprendido entre los pares de bases 2.434-3.828 de la ORF de *rga2⁺* (III) más 600 bp del terminador del gen *rga2⁺*(T2) fueron obtenidos de la digestión del plásmido pREP3X-*rga2⁺*-N mediante las enzimas de restricción PstI y BamHI. Posteriormente se clonó en un plásmido KS (KS-*rga2⁺*-(1.400 bp+terminador)) (Figura 61B).
- C. En el tercer paso, unimos el primer fragmento de 2.434 bp (I-II) con el segundo fragmento de 1.400 bp (III) más los 600 bp del terminador (T2). El plásmido KS-*rga2⁺*-(2.434 bp) se digirió con las enzimas de restricción BamHI y PstI, obteniendo así el primer fragmento. El KS-*rga2⁺*-(1.400 bp+terminador) se digirió con las enzimas de restricción PstI y NotI, obteniendo el segundo fragmento. A continuación se clonaron ambos fragmentos en un plásmido KS. Este plásmido se digirió con las enzimas de restricción BamHI y NotI y mediante una ligación triple BamHI-PstI-NotI entre el vector KS y los dos fragmentos se obtuvo el plásmido KS-*rga2⁺*-(PstI) (Figura 61C).

El sitio PstI situado en la base nucleotídica 2.434 de la ORF de *rga2⁺* es un sitio artificial que se construyó en el laboratorio del Dr. Kentaro Nakano. Nosotros lo hemos utilizado para la clonación de *rga2⁺*, pero una vez conseguida, decidimos eliminarlo a través de varios pasos de clonación:

- D. Se volvió a obtener el fragmento comprendido entre los pares de bases 338-2.932 de la ORF de *rga2⁺* a partir de ADN genómico de una cepa silvestre de *S. pombe* mediante amplificación por PCR con los oligonucleótidos 2.9 y 2.14. Este fragmento amplificado se digirió con las enzimas de restricción SphI y XbaI, cuyos sitios de corte se localizan en la ORF de *rga2⁺*. Por otro lado, a partir del plásmido KS-*rga2⁺*-(PstI) se obtuvo el fragmento de los primeros 338 pares de bases mediante digestión con las enzimas BamHI y SphI. Tanto el fragmento amplificado por PCR como el obtenido del plásmido KS-*rga2⁺*-(PstI) se clonaron en un plásmido KS mediante ligación triple BamHI-SphI-XbaI. Una vez obtenido el plásmido KS-*rga2⁺*-(2932-sin PstI), se mandó a secuenciar y se comprobó que la construcción era correcta. El fragmento final de la ORF de *rga2⁺* (2.932-3.828 bp) más los 600 bp del terminador de *rga2⁺* se obtienen del plásmido KS-*rga2⁺*-(PstI) digiriendo con la enzima de restricción XbaI. Este fragmento se clonó en el plásmido KS-*rga2⁺*-(2.932-sin PstI), en el sitio XbaI. Finalmente, se obtuvo el plásmido KS-*rga2⁺* que se mandó a secuenciar para comprobar que la construcción era correcta (Figura 61D).

E. Posteriormente, este gen se clonó en los plásmidos pREP3X y pREP4X en el sitio BamHI de su secuencia de clonación múltiple (Figura 61E).



6.10. Marcaje de proteínas en su extremo carboxilo

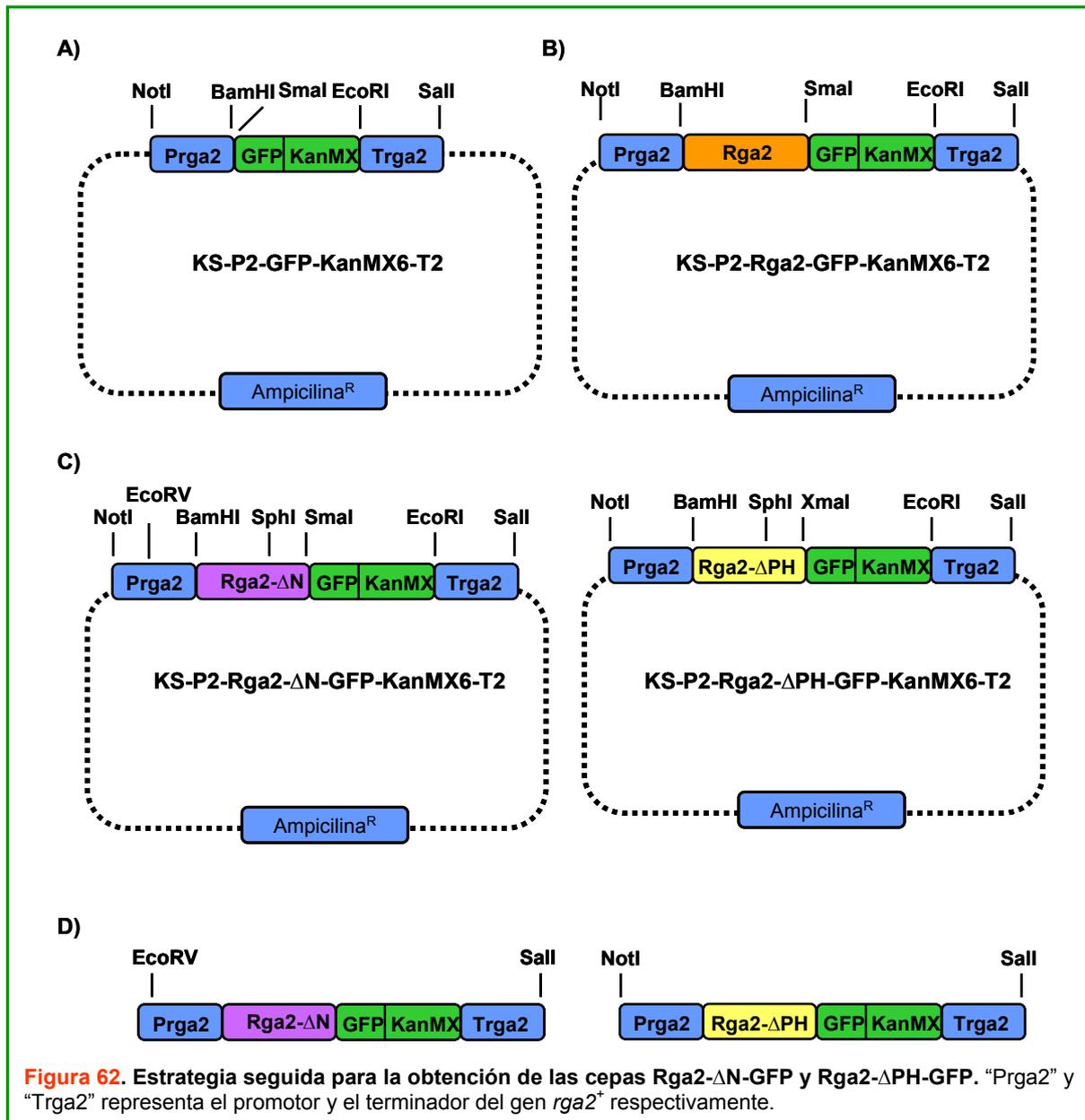
Para marcar las proteínas Rga2 y Rga6 en el extremo carboxilo con los epítomos c-Myc, HA o con la proteína verde fluorescente (GFP) se utilizó el método descrito (Bähler *et al.*, 1998a), que permite la fusión de estos epítomos en fase con la ORF del gen de interés. Como molde, se utilizaron los plásmidos que contienen las secuencias de los epítomos deseados con el marcador de selección adecuado. Como cebadores, se usaron oligonucleótidos que poseen una región en su extremo 3' complementaria a los plásmidos moldes. Uno de los oligonucleótidos presenta en su extremo 5' una región de 90-100 nucleótidos idéntica a la región 3' de la ORF del gen (excluido el codón de parada). El otro oligonucleótido incluye en su extremo 5' una región idéntica a 90-100 nucleótidos de la región 3' no codificante del gen que se encuentra a una distancia de entorno a 200 bp del codón de parada. Con el producto de PCR se transformó la cepa adecuada y los transformantes se seleccionaron dependiendo del marcador utilizado.

6.11. Obtención de las cepas mutantes Rga2- Δ N-GFP, Rga2- Δ PH-GFP, Rga2- Δ GAP-GFP y Rga2- Δ PH Δ GAP-GFP

Las proteínas truncadas Rga2- Δ GAP-GFP y Rga2- Δ PH Δ GAP-GFP fueron obtenidas mediante el método descrito en el apartado anterior de Materiales y Métodos, utilizando los oligonucleótidos *erga2up* (*gap* Δ) y *erga2DO* en el caso de la cepa Rga2- Δ GAP-GFP y *erga2up* (*gap* Δ pH Δ) y *erga2DO* en el caso de la cepa Rga2- Δ PH Δ GAP-GFP. Como molde se usó el plásmido pFA6a-kanMX6-GFP (Bähler *et al.*, 1998a). El resto de versiones truncadas de la proteína (Rga2- Δ N-GFP y Rga2- Δ PH-GFP) se obtuvieron mediante la construcción de un “módulo de integración” que disponía en su extremo 5' de 1.000 pares de bases del promotor de *rga2*⁺, seguida de la versión truncada de la ORF de *rga2*⁺ en cada caso. En el extremo 3' se situaba la secuencia que codifica la proteína GFP y el gen de resistencia a geneticina seguido de 1.000 pares de bases del terminador de *rga2*⁺ (Figura 62).

Los pasos de clonación fueron los siguientes:

- A. Lo primero fue obtener “un módulo de integración” para marcar la proteína Rga2 con GFP en su extremo C-terminal. Aunque esta cepa ya se obtuvo por el método de Bähler, la construcción de este casete nos servía de molde para la obtención de las cepas Rga2- Δ N-GFP y Rga2- Δ PH-GFP. Por tanto, partiendo del plásmido del “módulo de delección” en el que teníamos el promotor y el terminador de Rga2, intercambiamos la prototrofia para uracilo por el módulo GFP-Kanamicina del plásmido pFA6a-kanMX6-GFP (Bähler *et al.*, 1998a). Para realizar el intercambio digerimos ambos plásmidos con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI, realizamos la ligación y obtuvimos el plásmido *KS-P2-GFP-KanMX6-T2* (Figura 62A).
- B. Posteriormente, clonamos la ORF de *rga2*⁺ del plásmido *KS-rga2*⁺ mediante los sitios de restricción BamHI y SmaI. Así obtuvimos el plásmido *KS-P2-Rga2-GFP-KanMX6-T2* (Figura 62B).
- C. Una vez obtenido “el módulo de integración” de partida, amplificamos por PCR los fragmentos de la ORF de *rga2*⁺ que iban a ser intercambiados en dicho módulo. Para la construcción de la cepa Rga2- Δ N-GFP se utilizaron los oligos N Δ y 2.12DO tomando como molde el plásmido *KS-rga2*⁺. Para la construcción de la cepa Rga2- Δ PH-GFP se utilizaron los oligos Δ PH y GFP-1 tomando como molde ADN genómico de la cepa Rga2-GFP (PPG 4532). Los productos de PCR obtenidos y el plásmido *KS-P2-Rga2-GFP-KanMX6-T2* se digirió con las enzimas de restricción BamHI y SphI (en el caso de Rga2- Δ N-GFP) y SphI y XmaI (en el caso de Rga2- Δ PH-GFP). A continuación se llevaron a cabo las ligaciones y tras las com-



probaciones se obtuvieron los plásmidos de integración *KS-P2-Rga2-ΔN-GFP-KanMX6-T2* y *KS-P2-Rga2-ΔPH-GFP-KanMX6-T2* (Figura 62C).

- D. Posteriormente se cortó “el módulo de integración” de cada uno de los plásmidos con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoRV* (*KS-P2-Rga2ΔN-GFP-KanMX6-T2*) y *NotI* y *Sall* (*KS-P2-Rga2-ΔPH-GFP-KanMX6-T2*), generando un fragmento de DNA que se purificó y se utilizó para transformar la cepa *rga2::ura4* (PPG 4581) de *S. pombe* e inducir el intercambio del “módulo de delección” por las ORF truncadas del gen *rga2⁺* mediante recombinación homóloga (Figura 62D).

7. Análisis de proteínas

7.1. Obtención de extractos celulares

Los ensayos de Western blot y precipitación se realizaron a partir de extractos celulares obtenidos de la siguiente manera: Se resuspendieron 1×10^8 células en 100 μ l de tampón de lisis A (20 mM Tris·HCl pH 8, 2 mM EDTA, 100 mM NaCl, 0,5 % NP-40 y 10 % de glicerol) con inhibidores de proteasas (2 μ /ml aprotinina, 2 μ /ml leupeptina, 2 μ /ml peptatina y 1 mM PMSF). Las células se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, Sigma), en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6,0. Se comprobó la rotura celular por observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 5.000 rpm durante 10 minutos. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó mediante el método colorimétrico descrito (Bradford, 1976).

7.2 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, con la proteína GFP o con la proteína GST. En el caso de las proteínas marcadas con GST, se incubaron los extractos (2 mg de proteína total) en presencia de 30 μ l de bolitas de glutation-sefarosa (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 utilizaron anticuerpos frente al epítomo de interés, previamente incubados con 30 μ l de proteína A-sefarosa (Protein A shepharose CL-4B, GE Healthcare) al 50 % en tampón de lisis durante 2-4 horas a 4°C y se añadieron a 2-3 mg de extractos proteicos. Posteriormente, los complejos unidos a la matriz de sefarosa se sedimentaron por centrifugación y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis. Finalmente, los complejos con las bolitas de glutation-sefarosa o de proteína A-sefarosa se resuspendieron en 30 μ l 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.

7.3. Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

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

7.4. 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 frente al epítipo Myc (*Santa Cruz Biotechnology*), a una dilución de 1:1.000.
- ♣ Anticuerpo policlonal anti-GFP a una dilución 1:5.000 (*Invitrogen*).
- ♣ Anticuerpo policlonal anti-fosfo-p44/42 (*Cell Signalling*) que detecta el estado

activo de Pmk1, a una dilución de 1:2.500.

- ♣ Anticuerpo policlonal frente a Pma1 (Serrano *et al.*, 1986), a una dilución de 1:20.000.
- ♣ Anticuerpo monoclonal frente a Pep12 (*Molecular Probes*), a una dilución de 1:2.000.
- ♣ Anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón unido a HRP (*BioRad*) a una dilución 1:10.000.
- ♣ Anticuerpo monoclonal anti-IgG de conejo unido a HRP (*BioRad*) a una dilución 1:10.000.

7.5. Valoración de GTP-Rho

7.5.1. Producción de GST-C21RBD o GST-CRIB

La cantidad de Rho activa se determinó mediante el ensayo de precipitación con GST-C21RBD (Rho1-5) o GST-CRIB (Cdc42). Estos dominios sólo se asocian a Rho cuando está unida a GTP. Las proteínas recombinantes GST-C21RBD o GST-CRIB se obtuvieron en una cepa DH5 α de *E. coli* transformada con los plásmidos pGEX-C21RBD o pGEX-CRIB. El plásmido pGEX-C21RBD lleva el fragmento de ADN que codifica el péptido C21 que contiene el dominio de unión a RhoA (RBD, "Rho binding domain") de la proteína rotequina fusionada a la secuencia que codifica la proteína GST (Reid *et al.*, 1996). El plásmido pGEX-CRIB lleva el fragmento de ADN que codifica el dominio CRIB ("Cdc42/Rac Interactive Binding") de la proteína Pak2 fusionada a la secuencia que codifica la proteína GST (Manser *et al.*, 1998). Las bacterias transformadas con el plásmido pGEX-C21RBD o pGEX-CRIB se incubaron a 28°C en 400 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (50 μ g/ml) hasta que alcanzaron una D.O. a 600 nm de 0,6. En este momento, se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM para inducir la expresión del gen que codifica la proteína de fusión correspondiente y se incubaron 3 horas más a 28°C.

Se recogieron las células por centrifugación a 5.000 rpm y se resuspendieron en 20 ml de tampón PBS (tampón fosfato salino: 10 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂HPO₄, 137 mM NaCl y 2,7 mM KCl) frío al que se añadieron previamente inhibidores de proteasas (2 μ g/ml de pestatina, 2 μ g/ml de leupeptina, 2 μ g/ml de aprotinina y 1 mM 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 10.000 rpm durante 1 hora a 4°C.

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

sefarosa al 50 % previamente equilibrada con PBS y se incubó durante 2 horas a 4°C. A continuación, las bolas de glutation-sefarosa con la proteína de fusión GST-C21RBD o GST-CRIB unida, se lavaron 3 veces con 40 ml de PBS, recogiendo por centrifugación a 3.000 rpm. Por último, se resuspendieron al 50 % en solución de lisis B: 50 mM Tris·HCl pH 7,6, 20 mM NaCl, glicerol al 10 %, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT y NP-40 al 0,5 %, con inhibidores de proteasas a la misma concentración que la descrita anteriormente.

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

7.5.2. Ensayo de unión

Se obtuvieron extractos celulares de las cepas en estudio que producían las diferentes proteínas Rho fusionadas al epítipo HA en su extremo N-terminal, tal y como se describió en el apartado 7.1 de Materiales y Métodos, pero utilizando tampón de lisis B (ver apartado 7.5.1 de Materiales y Métodos). Los extractos (2 mg de proteína total) se llevaron a 500 µl con tampón de lisis B y se añadieron 10 µg de GST-C21RBD (Rho1-5) o GST-CRIB (Cdc42) asociado a bolas de glutation-sefarosa. Se incubaron 2-4 horas a 4°C y se lavaron 4 veces con 1 ml de tampón de lisis B. Finalmente, los precipitados se resuspendieron en 30 µl de tampón de carga 2X, y se sometieron a SDS-PAGE en un gel al 12 % que luego se transfirió a una membrana de PVDF, y se incubó con anticuerpos monoclonales anti-HA 12CA5, para detectar la fracción de la proteína HA-Rho unida a GTP, que había precipitado al unirse al dominio C21RBD (Rho1-5) o CRIB (Cdc42).

8. Ensayo de la actividad GTPásica

8.1. Purificación de proteínas fusionadas a GST

Para estos ensayos se utilizaron cepas transformadas con los plásmidos pREP_{KZ}, pREP_{KZ}-*rho1*⁺, pREP_{KZ}-*rho2*⁺, pREP_{KZ}-*rho3*⁺, pREP_{KZ}-*rho4*⁺, pREP_{KZ}-*cdc42*⁺ y pREP_{KZ}-*rga2*⁺ y cultivadas durante 14 horas en un medio mínimo suplementado con los aminoácidos correspondientes y carente de tiamina. Recogimos, por centrifugación, 100-200 ml de células que se resuspendieron en 500 µl de solución de lisis C (50 mM Tris·HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 0,1 % NP-40, 2 mM MgCl₂, 0,1 mM DTT y 10 % glicerol), con inhibidores de proteasas (2 µ/ml aprotinina, 2 µ/ml leupeptina, 2 µ/ml peptatina y 1 mM PMSF) incorporados.

Una vez obtenidos los extractos totales, tal como se describe en el apartado 7.1 de

Materiales y Métodos, se añadieron bolas de glutation-sefarosa, equilibradas previamente en solución de lisis C, hasta un 10 % del volumen final. Los extractos se incubaron durante dos horas a 4°C, tras lo cual, los precipitados se lavaron tres veces con 1 ml de solución de lisis C y se resuspendieron en la cantidad correspondiente de solución de lisis C más inhibidores de proteasas.

Alícuotas de cada proteína obtenida se sometieron a SDS-PAGE en un gel al 12,5 %, y se tiñeron con Coomassie Brilliant Blue R-250 para comprobar el grado de eficiencia de la purificación.

8.2. Medida de la actividad GTPásica

Para cuantificar la activación de la capacidad GTPásica de las proteínas de la familia Rho, mediada por Rga2, se siguió el protocolo descrito (Self and Hall, 1995). Se incubaron 30 µl de cada proteína GST-Rho purificada con 5 µCi de ^{32}P -GTP durante 10 minutos a 30°C en solución de lisis C (50 mM Tris·HCl pH 7,6, 1 mM EDTA, 20 mM NaCl, 0,1 % NP-40, 2 mM MgCl_2 , 0,1 mM DTT y 10 % glicerol). A continuación, la mezcla se enfrió en hielo y se añadieron 10 µl de 25 mM MgCl_2 . Alícuotas de 10 µl de esta reacción se mezclaron con 40 µl de solución de reacción (20 mM Tris·HCl pH 7,6, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 1 mg/ml BSA, 0,1 mM DTT y 1 mM GTP) y con 30 µl de proteína GST o GST-Rga2. La mezcla se incubó a 20°C en agitación tomando muestras de 10 µl a intervalos de dos minutos. Las alícuotas se diluían en 1 ml de solución de reacción a 0°C. Las muestras se filtraron utilizando membranas de nitrocelulosa y se lavaron con 10 ml de solución de lavado (20 mM Tris·HCl pH 7,6, 20 mM NaCl, 5 mM MgCl_2 , 0,1 mM DTT). Una vez secos, los filtros se transfirieron a viales de centelleo. La radiactividad debida al ^{32}P -GTP que permanecía unido a la proteína GST-Rho se cuantificó en un contador de centelleo Wallac 1409, utilizando líquido de centelleo Optiphase "Hisafe" (Wallace).

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

Se utilizó el método descrito (Arellano *et al.*, 1996). En alguno de los experimentos que se recogen en esta memoria el marcaje radiactivo de las paredes de las células se llevó a cabo tras la inducción del promotor del gen *nmt1*, por lo que las células se incubaron en medio mínimo sin tiamina durante 14 horas a 32°C antes de añadir el precursor radiactivo. En los demás casos, las células se incubaron en medio mínimo con los suplementos necesarios o 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 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^{14}C -glucosa.

Se tomaron dos muestras de 50 μl al comenzar y dos al terminar la incubación para calcular la incorporación total de glucosa radiactiva en las células. El resto de cultivo se recogió, se lavó 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 1ml 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 μl para determinar la incorporación total de ^{14}C -glucosa en las paredes.

Las paredes se hirvieron 5 minutos para inactivar las posibles glucanasas de la pared y se resuspendieron en 500 μl de 1 mM EDTA. Se hicieron alícuotas de 100 μl , de las cuales una se incubó con 100 μl de tampón 50 mM citrato-fosfato pH 5,6; dos alícuotas se incubaron en el mismo tampón en presencia de 10 μg de Zymoliasa 100T (Seikagaku Kogio) y otras dos se incubaron en 100 μl del tampón 50 mM Tris·HCl pH 7,5 con 100 unidades de Quantazima (Quantum, Biotechnologies ING) que es una β -(1,3)-glucanasa recombinante. Todas las muestras se incubaron a 28°C durante 36 horas, tras lo cual se centrifugaron a 12.000 rpm durante 5 minutos y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes y de los precipitados.

Todas las alícuotas (excepto los sobrenadantes que se valoraron directamente) se diluyeron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10 %, manteniéndose a 4°C hasta ser filtradas sobre papel Whatman GF/C. Estos filtros se lavaron 3 veces con 1 ml de TCA y 2 veces con 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.

10. Fraccionamiento subcelular por centrifugación en gradientes de densidad de sacarosa

Se recogieron células a partir de 2 litros de cultivo en fase exponencial de crecimiento (D.O.₆₀₀ 0,8) y se resuspendieron en 3 ml de tampón de lisis D (Sacarosa al 17 % (p/v), 50 mM Tris·HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA) con inhibidores de proteasas (2 μml aprotinina, 2 μml leupeptina, 2 μml pestatina y 1 mM PMSF) incorporados. La rotura de las células se

hizo mecánicamente en un vórtex, utilizando bolitas de vidrio (G8772, Sigma). El extracto crudo así obtenido se centrifugó con el fin de eliminar las paredes celulares. El sobrenadante se colocó en la parte superior de un gradiente lineal de sacarosa (10-65 % (p/v), en 50 mM Tris·HCl pH 7,5 y 1 mM EDTA, de 30 ml. Este gradiente se sometió a centrifugación en un rotor SW28 a 25.000 rpm durante 20 horas a 4°C. Terminada la centrifugación, se recogieron las muestras a través de una bomba peristáltica desde la parte inferior del tubo que contenía el gradiente. Se recogieron 30 fracciones de aproximadamente 1 ml empezando por la parte más densa del gradiente.

Por cada dos o tres fracciones obtenidas, un volumen de 10 µl se sometió a SDS-PAGE y Western blot. La presencia de las proteínas Rga2-HA, Rga6-HA y Rga4-HA, además de los marcadores de las distintas fracciones celulares se detectó mediante los siguientes anticuerpos específicos:

- ♣ Pma1 (membrana plasmática) utilizando anticuerpos anti-Pma1 (1:20.000), amablemente cedido por el Dr. César Roncero (Serrano *et al.*, 1986).
- ♣ Pep12 (endosomas) utilizando anticuerpos anti-Pep12 (1:2.000) (*Molecular Probes*), amablemente cedido por el Dr. César Roncero.
- ♣ SPAC1B2.03c-GFP (retículo endoplasmático), utilizando anticuerpos anti-GFP JL-8 (1:2.000) (*BD Biosciences*).
- ♣ Rga2-HA/Rga6-HA/Rga4-HA, utilizando anticuerpos anti-HA, 12CA5 (1:6.000) (*Boehringer*).

Para comprobar la correcta construcción del gradiente se determinó el porcentaje de sacarosa (p/v) en cada una de las fracciones, utilizando un refractómetro modelo Abbe (Atago).

11. Ensayo de sensibilidad a β -glucanasas

Estos ensayos fueron realizados siguiendo el protocolo que describe (Calonge *et al.*, 2000). Se recogieron células creciendo en fase exponencial y se lavaron con agua varias veces. A continuación, se resuspendieron a una densidad óptica de 1,0 en agua que contiene 25 µg/ml de Zymoliasa 100T. Las suspensiones celulares se incubaron a 37°C con agitación y se valoró la lisis celular midiendo la densidad óptica a 600 nm cada 20 minutos.

12. Ensayo de determinación de la actividad de Pmk1 bajo condiciones de estrés hiperosmótico

Se incubaron las células en medio rico YES o medio mínimo suplementado con los correspondientes aminoácidos y en ausencia o presencia de tiamina según los casos a una temperatura de 32°C-28°C. Cuando las células alcanzaron una densidad óptica de 0,5 se empezó el tratamiento de estrés hiperosmótico con 0,6 M KCl. En todos los casos, se recogieron mediante filtración 40 ml de cultivo a diferentes tiempos. A continuación se extrajeron las células del filtro en tubos de microcentrífuga fríos a los que previamente se le ha añadido 1 ml de PBS 1X frío. Los precipitados resultantes se congelaron y guardaron en hielo seco. A continuación, todas las muestras obtenidas se descongelaron y se resuspendieron en 150 µl de solución de lisis E (50 mM Tris·HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 0,1 % NP-40 y 15 mM imidazol) con inhibidores de proteasas (2 µ/ml aprotinina, 2 µ/ml leupeptina, 2 µ/ml pestatina y 1 mM PMSF) incorporados. Las células se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, Sigma), en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante 2 pulsos de 16 segundos a una potencia de 6,0. Se comprobó la rotura celular por observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 15 minutos. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de proteína de los extractos se cuantificó por el método colorimétrico descrito (Bradford, 1976). Pmk1-HA6H se purificó utilizando 60 µl de bolas de Niquel Ni²⁺-NTA Agarose (Qiagen) al 50 % junto con 800 µg de cada extracto celular obtenido e incubando las distintas muestras durante dos horas en agitación a 4°C. Posteriormente, Pmk1 unida a las bolas de niquel se sedimentó por centrifugación y se lavó tres veces con 1 ml de 1 M Tris·HCl pH 8. Finalmente, estos complejos proteicos se resuspendieron en 25 µl de tampón de carga 2X para proceder a la electroforesis en geles de 10 % de poliacrilamida y posterior análisis por Western blot. Para detectar el estado activo de Pmk1 se utilizaron anticuerpos policlonales anti-fosfo-p44/42 (*Cell Signalling*) a una dilución de 1:2.500 y para detectar la cantidad total de Pmk1 purificada se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-HA, 12CA5 (*Boehringer*), a una dilución 1:6.000.

13. Técnicas microscópicas y tinciones

Para llevar a cabo estas técnicas, se emplearon un microscopio Zeiss Axioskop 2 plus y un microscopio Leica DM RXA, ambos equipados con sistemas de iluminación halógena y equipos de fotografía digital. Además, se utilizó el equipo Personal Deltavision Microscopio.

pe (*Applied Precision*), que consta de un microscopio invertido Plympus IX-70.

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

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

13.2. Microscopía de fluorescencia

Para la observación de muestras fluorescentes, se utilizaron los microscopios Leica DM RXA y Deltavision con los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Las imágenes obtenidas se procesaron posteriormente con los programas Adobe Photoshop CS, Image J y el programa de Applied Biosystems del microscopio Deltavision.

13.2.1. Fluorescencia directa con GFP

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

Existen variantes de la proteína verde fluorescente, como la EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), más brillante que la original, que emite luz de 507 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 488 nm; la proteína azul fluorescente o CFP (Cyan Fluorescent Protein), que emite luz de 475 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 433 nm; o la proteína amarilla fluorescente o YFP (Yellow Fluorescent Protein), que emite luz de 527 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 514 nm.

Existe, además, la proteína roja fluorescente (DsRFP), que emite luz de 586 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 556 nm. Se han realizado modificaciones de la proteína RFP, como la mCherry, cuya luz de emisión es más brillante y estable, que emite luz de 610 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 587 nm. El marcaje

de parejas de proteínas con diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes permiten la realización de experimentos de co-localización (Shaner *et al.*, 2005). Además, estas proteínas pueden fusionarse en tándem para aumentar la intensidad de la luz de emisión.

13.2.2. Tinción de calcoflúor

El calcoflúor es un fluorocromo que, en *S. cerevisiae* tiñe las zonas de pared celular ricas en quitina, pero que en *S. pombe* se une fundamentalmente al β -(1,3)-glucano lineal del septo y de los polos en crecimiento (Cortés *et al.*, 2007) ya que *S. pombe* carece de quitina. El calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul. El calcoflúor (Blankophor BBH, Bayer Corporation) se preparó en agua a una concentración de 15 mg/ml. Para conseguir la completa disolución, se añadieron gotas de 10 N KOH. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

La tinción de calcoflúor se realizó partiendo de cultivos líquidos creciendo en fase logarítmica. Las células se recogieron por centrifugación (1 minuto a 3.000 rpm), se resuspendieron en 50 μ l de agua con calcoflúor a una dilución 1:50 y posteriormente se lavaron con PBS y se concentraron para observar la fluorescencia.

13.2.3. Tinción de actina

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

La tinción de actina se realizó siguiendo las indicaciones y modificaciones realizadas por el Dr. F. Chang a partir del protocolo inicial descrito (Marks and Hyams, 1985). Partiendo de un cultivo en fase exponencial, se tomaron 5 ml de células y se fijaron añadiendo 1 ml (1/5 del volumen del cultivo) de formaldehído al 16 % (EM-grade MeOH Free, Polysciences) y 500 μ l (1/10 del volumen del cultivo) de tampón PEM (100 mM PIPES, 1 mM EGTA y 1 mM Mg₂SO₄ 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 TX-100 al 1 % durante 30 segundos, para permitir la posterior entrada del fluorocromo. Finalmente, se lavaron tres veces con PEM, se tomó 1 μ l de células permeabilizadas y se mezclaron con 8 μ l de Alexa-flúor 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 o 2 días a 4°C.

13.3. 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 varios lavados con agua. Posteriormente las células se deshidrataron empleando concentraciones crecientes de etanol (70 %, 90 % y 100 %). Las muestras se incluyeron en resina mediante el kit Suprr 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.

14. Análisis bioinformático de los datos

Para el análisis informático de las secuencias de ADN y de proteínas, alineamiento de secuencias y mapas de restricción, se utilizaron los programas DNASTar, DNASTrider y ClustalW. Las secuencias de genes y proteínas se obtuvieron de la base de datos de *S. pombe*, The Wellcome Trust Sanger Institute *Schizosaccharomyces pombe* Gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>)

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

BIBLIOGRAFÍA

- Abenza, J. F., Pantazopoulou, A., Rodríguez, J. M., Galindo, A. and Penalva, M. A. (2009).** Long-distance movement of *Aspergillus nidulans* early endosomes on microtubule tracks. *Traffic* 10, 57-75.
- Adamo, J. E., Rossi, G. and Brennwald, P. (1999).** The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol Biol Cell* 10, 4121-33.
- Alonso-Núñez, M. L., An, H., Martín-Cuadrado, A. B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., del Rey, F., Gould, K. L. and de Aldana, C. R. (2005).** Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 16, 2003-17.
- Annan, R. B., Wu, C., Waller, D. D., Whiteway, M. and Thomas, D. Y. (2008).** Rho5p is involved in mediating the osmotic stress response in *Saccharomyces cerevisiae*, and its activity is regulated via Msi1p and Npr1p by phosphorylation and ubiquitination. *Eukaryot Cell* 7, 1441-9.
- Arellano, M., Coll, P. M. and Pérez, P. (1999b).** RHO GTPases in the control of cell morphology, cell polarity, and actin localization in fission yeast. *Microsc Res Tech* 47, 51-60.
- Arellano, M., Durán, A. and Pérez, P. (1997).** Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 110 (Pt 20), 2547-55.
- Arellano, M., Durán, A. and Pérez, P. (1996).** Rho1 GTPase activates the (1-3)beta-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J* 15, 4584-91.
- Arellano, M., Niccoli, T. and Nurse, P. (2002).** Tea3p is a cell end marker activating polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol* 12, 751-6.
- Arellano, M., Valdivieso, M. H., Calonge, T. M., Coll, P. M., Durán, A. and Pérez, P. (1999a).** *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci* 112 (Pt 20), 3569-78.
- Aslett, M. and Wood, V. (2006).** Gene Ontology annotation status of the fission yeast genome: preliminary coverage approaches 100%. *Yeast* 23, 913-9.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. and Struhl, K. (1995).** Current Protocols in Molecular Biology. *John Wiley and Sons, New York*.
- Ayscough, K. R., Eby, J. J., Lila, T., Dewar, H., Kozminski, K. G. and Drubin, D. G. (1999).** Sla1p is a functionally modular component of the yeast cortical actin cytoskeleton required for correct localization of both Rho1p-GTPase and Sla2p, a protein with talin homology. *Mol Biol Cell* 10, 1061-75.
- Bähler, J. and Pringle, J. R. (1998b).** Pom1p, a fission yeast protein kinase that provides positional information for both polarized growth and cytokinesis. *Genes Dev* 12, 1356-70.
- Bähler, J., Wu, J. Q., Longtine, M. S., Shah, N. G., McKenzie, A., 3rd, Steever, A. B., Wach, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998a).** Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943-51.
- Balasubramanian, M. K., Bi, E. and Glotzer, M. (2004).** Comparative analysis of cytokinesis in budding yeast, fission yeast and animal cells. *Curr Biol* 14, R806-18.
- Balasubramanian, M. K., Helfman, D. M. and Hemmingsen, S. M. (1992).** A new tropomyosin essential for cytokinesis in the fission yeast *S. pombe*. *Nature* 360, 84-7.
- Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto, M. and Cansado, J. (2008).** Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* 20, 748-57.

- Barrett, T., Xiao, B., Dodson, E. J., Dodson, G., Ludbrook, S. B., Nurmahomed, K., Gamblin, S. J., Musacchio, A., Smerdon, S. J. and Eccleston, J. F. (1997).** The structure of the GTPase-activating domain from p50rhoGAP. *Nature* 385, 458-61.
- Barthe, C., de Bettignies, G., Louvet, O., Peypouquet, M. F., Morel, C., Doignon, F. and Crouzet, M. (1998).** First characterization of the gene *RGD1* in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *C R Acad Sci III* 321, 453-62.
- Basi, G., Schmid, E. and Maundrell, K. (1993).** TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe* nmt1 promoter affect transcription efficiency but not the transcription start point or thiamine repressibility. *Gene* 123, 131-6.
- Becherer, K. A., Rieder, S. E., Emr, S. D. and Jones, E. W. (1996).** Novel syntaxin homologue, Pep12p, required for the sorting of luminal hydrolases to the lysosome-like vacuole in yeast. *Mol Biol Cell* 7, 579-94.
- Bender, L., Lo, H. S., Lee, H., Kokojan, V., Peterson, V. and Bender, A. (1996).** Associations among PH and SH3 domain-containing proteins and Rho-type GTPases in Yeast. *J Cell Biol* 133, 879-94.
- Benton, B. K., Tinkelenberg, A., González, I. and Cross, F. R. (1997).** Cla4p, a *Saccharomyces cerevisiae* Cdc42p-activated kinase involved in cytokinesis, is activated at mitosis. *Mol Cell Biol* 17, 5067-76.
- Bi, E., Chiavetta, J. B., Chen, H., Chen, G. C., Chan, C. S. and Pringle, J. R. (2000).** Identification of novel, evolutionarily conserved Cdc42p-interacting proteins and of redundant pathways linking Cdc24p and Cdc42p to actin polarization in yeast. *Mol Biol Cell* 11, 773-93.
- Bidlingmaier, S. and Snyder, M. (2004).** Regulation of polarized growth initiation and termination cycles by the polarisome and Cdc42 regulators. *J Cell Biol* 164, 207-18.
- Billuart, P., Winter, C. G., Maresh, A., Zhao, X. and Luo, L. (2001).** Regulating axon branch stability: the role of p190 RhoGAP in repressing a retraction signaling pathway. *Cell* 107, 195-207.
- Bone, N., Millar, J. B., Toda, T. and Armstrong, J. (1998).** Regulated vacuole fusion and fission in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol* 8, 135-44.
- Bos, J. L., Rehmann, H. and Wittinghofer, A. (2007).** GEFs and GAPs: critical elements in the control of small G proteins. *Cell* 129, 865-77.
- Bose, I., Irazoqui, J. E., Moskow, J. J., Bardes, E. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2001).** Assembly of scaffold-mediated complexes containing Cdc42p, the exchange factor Cdc24p, and the effector Cla4p required for cell cycle-regulated phosphorylation of Cdc24p. *J Biol Chem* 276, 7176-86.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. and McCormick, F. (1991).** The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349, 117-27.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-54.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F., Hu, K. Q., Delalle, I., Caviness, V. S., Silver, J., Bronson, R. T. and Settleman, J. (2000).** The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* 127, 4891-903.
- Brouns, M. R., Matheson, S. F. and Settleman, J. (2001).** p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat Cell Biol* 3, 361-7.
- Brown, J. L., Jaquenoud, M., Gulli, M. P., Chant, J. and Peter, M. (1997).** Novel Cdc42-binding

proteins Gic1 and Gic2 control cell polarity in yeast. *Genes Dev* 11, 2972-82.

Browning, H., Hackney, D. D. and Nurse, P. (2003). Targeted movement of cell end factors in fission yeast. *Nat Cell Biol* 5, 812-8.

Browning, H., Hayles, J., Mata, J., Aveline, L., Nurse, P. and McIntosh, J. R. (2000). Tea2p is a kinesin-like protein required to generate polarized growth in fission yeast. *J Cell Biol* 151, 15-28.

Brunner, D. and Nurse, P. (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102, 695-704.

Bush, D. A., Horisberger, M., Horman, I. and Wursch, P. (1974). The wall structure of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Gen Microbiol* 81, 199-206.

Bustelo, X. R., Sauzeau, V. and Berenjano, I. M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays* 29, 356-70.

Butty, A. C., Perrinjaquet, N., Petit, A., Jaquenoud, M., Segall, J. E., Hofmann, K., Zwahlen, C. and Peter, M. (2002). A positive feedback loop stabilizes the guanine-nucleotide exchange factor Cdc24 at sites of polarization. *EMBO J* 21, 1565-76.

Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A. and Silverman, S. J. (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microbiol Sci* 5, 370-5.

Cabib, E., Drgonová, J. and Drgon, T. (1998). Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu Rev Biochem* 67, 307-33.

Calonge, T. M., Arellano, M., Coll, P. M. and Pérez, P. (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 47, 507-18.

Calonge, T. M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I. and Pérez, P. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol Biol Cell* 11, 4393-401.

Carroll, C. W., Altman, R., Schieltz, D., Yates, J. R. and Kellogg, D. (1998). The septins are required for the mitosis-specific activation of the Gin4 kinase. *J Cell Biol* 143, 709-17.

Casey, P. J. (1994). Lipid modifications of G proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6, 219-25.

Caviston, J. P., Longtine, M., Pringle, J. R. and Bi, E. (2003). The role of Cdc42p GTPase-activating proteins in assembly of the septin ring in yeast. *Mol Biol Cell* 14, 4051-66.

Celton-Morizur, S., Racine, V., Sibarita, J. B. and Paoletti, A. (2006). Pom1 kinase links division plane position to cell polarity by regulating Mid1p cortical distribution. *J Cell Sci* 119, 4710-8.

Cid, V. J., Cenamor, R., Sánchez, M. and Nombela, C. (1998). A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* 144 (Pt 1), 25-36.

Coll, P. M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. and Pérez, P. (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 14, 313-23.

Cortés, J. C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sánchez, Y., Durán, A. and Ribas, J. C. (2005). The novel fission yeast (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci* 118, 157-74.

Cortés, J. C., Ishiguro, J., Durán, A. and Ribas, J. C. (2002). Localization of the (1,3)beta-D-

glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* 115, 4081-96.

Cortés, J. C., Konomi, M., Martins, I. M., Munoz, J., Moreno, M. B., Osumi, M., Durán, A. and Ribas, J. C. (2007). The (1,3)beta-D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol* 65, 201-17.

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

Cvrckova, F., De Virgilio, C., Manser, E., Pringle, J. R. and Nasmyth, K. (1995). Ste20-like protein kinases are required for normal localization of cell growth and for cytokinesis in budding yeast. *Genes Dev* 9, 1817-30.

Chang, E., Bartholomeusz, G., Pimental, R., Chen, J., Lai, H., Wang, L., Yang, P. and Marcus, S. (1999). Direct binding and In vivo regulation of the fission yeast p21-activated kinase shk1 by the SH3 domain protein scd2. *Mol Cell Biol* 19, 8066-74.

Chang, E. C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H. P. and Wigler, M. H. (1994). Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* 79, 131-41.

Chang, F. (2001). Establishment of a cellular axis in fission yeast. *Trends Genet* 17, 273-8.

Chang, F., Drubin, D. and Nurse, P. (1997). cdc12p, a protein required for cytokinesis in fission yeast, is a component of the cell division ring and interacts with profilin. *J Cell Biol* 137, 169-82.

Chant, J. (1994). Cell polarity in yeast. *Trends Genet* 10, 328-33.

Chen, G. C., Kim, Y. J. and Chan, C. S. (1997). The Cdc42 GTPase-associated proteins Gic1 and Gic2 are required for polarized cell growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 11, 2958-71.

Das, M., Wiley, D. J., Medina, S., Vincent, H. A., Larrea, M., Oriolo, A. and Verde, F. (2007). Regulation of cell diameter, For3p localization, and cell symmetry by fission yeast Rho-GAP Rga4p. *Mol Biol Cell* 18, 2090-101.

de Nobel, J. G., Klis, F. M., Priem, J., Munnik, T. and van den Ende, H. (1990). The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6, 491-9.

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

Dekker, N., van Rijssel, J., Distel, B. and Hochstenbach, F. (2007). Role of the alpha-glucanase Agn2p in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast* 24, 279-88.

Diekmann, D., Brill, S., Garrett, M. D., Totty, N., Hsuan, J., Monfries, C., Hall, C., Lim, L. and Hall, A. (1991). Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* 351, 400-2.

Doignon, F., Weinachter, C., Roumanie, O. and Crouzet, M. (1999). The yeast Rgd1p is a GTPase activating protein of the Rho3 and Rho4 proteins. *FEBS Lett* 459, 458-62.

Dong, Y., Pruyne, D. and Bretscher, A. (2003). Formin-dependent actin assembly is regulated by distinct modes of Rho signaling in yeast. *J Cell Biol* 161, 1081-92.

Drgonová, J., Drgon, T., Tanaka, K., Kollar, R., Chen, G. C., Ford, R. A., Chan, C. S., Takai, Y. and Cabib, E. (1996). Rho1p, a yeast protein at the interface between cell polarization and morphogenesis. *Science* 272, 277-9.

- Drummond, D. R. and Cross, R. A. (2000).** Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol* 10, 766-75.
- Dunn, T. M. and Shortle, D. (1990).** Null alleles of SAC7 suppress temperature-sensitive actin mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 10, 2308-14.
- Durán, A. and Pérez, P. (2004).** Cell wall synthesis. In *The Molecular Biology of Schizosaccharomyces pombe*. Vol1. 1. R. Egel (ed). New York: Springer, pp. 269-279.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H. and Elledge, S. J. (1993).** The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev* 7, 555-69.
- Encinar del Dedo, J., Dueñas, E., Arnáiz, Y., del Rey, F. and Vázquez de Aldana, C. R. (2009).** (beta)-glucanase Eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 8, 1278-86.
- Endo, M., Shirouzu, M. and Yokoyama, S. (2003).** The Cdc42 binding and scaffolding activities of the fission yeast adaptor protein Scd2. *J Biol Chem* 278, 843-52.
- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M. and Boone, C. (1997).** Bni1p, a yeast formin linking cdc42p and the actin cytoskeleton during polarized morphogenesis. *Science* 276, 118-22.
- Feierbach, B. and Chang, F. (2001).** Roles of the fission yeast formin for3p in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* 11, 1656-65.
- Feierbach, B., Verde, F. and Chang, F. (2004).** Regulation of a formin complex by the microtubule plus end protein tea1p. *J Cell Biol* 165, 697-707.
- Fitch, P. G., Gammie, A. E., Lee, D. J., de Candal, V. B. and Rose, M. D. (2004).** Lrg1p is a Rho1 GTPase-activating protein required for efficient cell fusion in yeast. *Genetics* 168, 733-46.
- Forsburg, S. L. (1993).** Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* 21, 2955-6.
- Fukui, Y. and Yamamoto, M. (1988).** Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants phenotypically similar to ras1. *Mol Gen Genet* 215, 26-31.
- Gachet, Y. and Hyams, J. S. (2005).** Endocytosis in fission yeast is spatially associated with the actin cytoskeleton during polarised cell growth and cytokinesis. *J Cell Sci* 118, 4231-42.
- García, I., Jiménez, D., Martín, V., Durán, A. and Sánchez, Y. (2005).** The alpha-glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* 97, 569-76.
- García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T. and Sánchez, Y. (2006b).** Synthesis of alpha-glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogues, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol* 59, 836-53.
- García, P., García, I., Marcos, F., de Garibay, G. R. and Sánchez, Y. (2009b).** Fission yeast rgf2p is a rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of rgf1p. *Genetics* 181, 1321-34.
- García, P., Tajadura, V., García, I. and Sánchez, Y. (2006a).** Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17, 1620-31.
- García, P., Tajadura, V. and Sánchez, Y. (2009a).** The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell* 20, 721-31.

- Gemmill, T. R. and Trimble, R. B. (2004).** Protein glycosilation. En *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe*. Vol.1. R. Egel (ed). New York: Springer, pp. 405-415.
- Ghislain, M., Schlessner, A. and Goffeau, A. (1987).** Mutation of a conserved glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane H⁺-ATPase from *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 262, 17549-55.
- Gibson, T. J., Hyvonen, M., Musacchio, A., Saraste, M. and Birney, E. (1994).** PH domain: the first anniversary. *Trends Biochem Sci* 19, 349-53.
- Gladfelter, A. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2004).** Genetic interactions among regulators of septin organization. *Eukaryot Cell* 3, 847-54.
- Glynn, J. M., Lustig, R. J., Berlin, A. and 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, 836-45.
- Goldstein, A. Y., Jan, Y. N. and Luo, L. (2005).** Function and regulation of Tumbleweed (RacGAP50C) in neuroblast proliferation and neuronal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3834-9.
- Golub, E. I. (1988).** 'One minute' transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 16, 1641.
- Grün, C. H., Hochstenbach, F., Humbel, B. M., Verkleij, A. J., Sietsma, J. H., Klis, F. M., Kamerling, J. P. and Vliegthart, J. F. (2005).** The structure of cell wall alpha-glucan from fission yeast. *Glycobiology* 15, 245-57.
- Gulli, M. P., Jaquenoud, M., Shimada, Y., Niederhauser, G., Wiget, P. and Peter, M. (2000).** Phosphorylation of the Cdc42 exchange factor Cdc24 by the PAK-like kinase Cla4 may regulate polarized growth in yeast. *Mol Cell* 6, 1155-67.
- Hagan, I. M. (1998).** The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci* 111 (Pt 12), 1603-12.
- Hagan, I. M. and Hyams, J. S. (1988).** The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 89 (Pt 3), 343-57.
- Hayles, J. and Nurse, P. (2001).** A journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 647-56.
- Hirata, D., Nakano, K., Fukui, M., Takenaka, H., Miyakawa, T. and Mabuchi, I. (1998).** Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role of a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *J Cell Sci* 111 (Pt 2), 149-59.
- Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. and Yamamoto, M. (2003).** Gef1p and Scd1p, the Two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 14, 3617-27.
- Hochstenbach, F., Klis, F. M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P. J. and Klausner, R. D. (1998).** Identification of a putative alpha-glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 9161-6.
- Horisberger, M. and Rouvet-Vauthey. (1985).** Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* 41: 748-750.
- Horisberger, M. and 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. and Rosset, J. (1978).** Localization of alpha-galactomannan and

of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* 119, 107-11.

Hsu, S. C., Hazuka, C. D., Foletti, D. L. and Scheller, R. H. (1999). Targeting vesicles to specific sites on the plasma membrane: the role of the sec6/8 complex. *Trends Cell Biol* 9, 150-3.

Hsu, S. C., TerBush, D., Abraham, M. and Guo, W. (2004). The exocyst complex in polarized exocytosis. *Int Rev Cytol* 233, 243-65.

Humbel, B. M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S. A. and Osumi, M. (2001). In situ localization of beta-glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 433-44.

Humphries, C. L., Balcer, H. I., D'Agostino, J. L., Winsor, B., Drubin, D. G., Barnes, G., Andrews, B. J. and 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.

Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T. and Takai, Y. (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 16, 2745-55.

Irazoqui, J. E., Gladfelter, A. S. and Lew, D. J. (2003). Scaffold-mediated symmetry breaking by Cdc42p. *Nat Cell Biol* 5, 1062-70.

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, 181-91.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* 153, 163-8.

Jaffe, A. B. and Hall, A. (2005). Rho GTPases: biochemistry and biology. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21, 247-69.

Jahn, R. and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 631-43.

Jiang, W., Betson, M., Mulloy, R., Foster, R., Levay, M., Ligeti, E. and Settleman, J. (2008). p190A RhoGAP is a glycogen synthase kinase-3-beta substrate required for polarized cell migration. *J Biol Chem* 283, 20978-88.

Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P. and Toda, T. (1999). Fission yeast alpha-glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J Cell Biol* 144, 1173-86.

Khelifaoui, M., Pavlowsky, A., Powell, A. D., Valnegri, P., Cheong, K. W., Blandin, Y., Passafaro, M., Jefferys, J. G., Chelly, J. and Billuart, P. (2009). Inhibition of RhoA pathway rescues the endocytosis defects in Oligophrenin1 mouse model of mental retardation. *Hum Mol Genet* 18, 2575-83.

Kienle, N., Kloepper, T. H. and Fasshauer, D. (2009). Differences in the SNARE evolution of fungi and metazoa. *Biochem Soc Trans* 37, 787-91.

Kim, T. Y., Vigil, D., Der, C. J. and Juliano, R. L. (2009). Role of DLC-1, a tumor suppressor protein with RhoGAP activity, in regulation of the cytoskeleton and cell motility. *Cancer Metastasis Rev* 28, 77-83.

Kim, Y. J., Francisco, L., Chen, G. C., Marcotte, E. and Chan, C. S. (1994). Control of cellular morphogenesis by the Ip12/Bem2 GTPase-activating protein: possible role of protein phosphorylation. *J Cell Biol* 127, 1381-94.

Knaus, M., Pelli-Gulli, M. P., van Drogen, F., Springer, S., Jaquenoud, M. and Peter, M. (2007). Phosphorylation of Bem2p and Bem3p may contribute to local activation of Cdc42p at bud emergen-

ce. *EMBO J* 26, 4501-13.

Kobori, H., Toda, T., Yaguchi, H., Toya, M., Yanagida, M. and Osumi, M. (1994). Fission yeast protein kinase C gene homologues are required for protoplast regeneration: a functional link between cell wall formation and cell shape control. *J Cell Sci* 107 (Pt 5), 1131-6.

Kobori, H., Yamada, N., Taki, A. and 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 (Pt 4), 635-46.

Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T. and Osumi, M. (2003). Characterization and behaviour of alpha-glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast* 20, 427-38.

Kozubowski, L., Saito, K., Johnson, J. M., Howell, A. S., Zyla, T. R. and Lew, D. J. (2008). Symmetry-breaking polarization driven by a Cdc42p GEF-PAK complex. *Curr Biol* 18, 1719-26.

Kushner, R. S. (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. *Boyer, H.W. and Nicosia, S. (ed.) Genetic Engineering. Elsevier, Amsterdam*, 17-24.

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-5.

Leberer, E., Dignard, D., Marcus, D., Thomas, D. Y. and Whiteway, M. (1992). The protein kinase homologue Ste20p is required to link the yeast pheromone response G-protein beta gamma subunits to downstream signalling components. *EMBO J* 11, 4815-24.

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

Lipschutz, J. H. and Mostov, K. E. (2002). Exocytosis: the many masters of the exocyst. *Curr Biol* 12, R212-4.

Liu, J., Kaksonen, M., Drubin, D. G. and Oster, G. (2006). Endocytic vesicle scission by lipid phase boundary forces. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 10277-82.

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

Liu, J., Wang, H., McCollum, D. and Balasubramanian, M. K. (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 153, 1193-203.

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

Longtine, M. S., Fares, H. and Pringle, J. R. (1998). Role of the yeast Gin4p protein kinase in septin assembly and the relationship between septin assembly and septin function. *J Cell Biol* 143, 719-36.

Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y. and Sugiura, R. (2006). Rho2 is a target of the farnesyl-transferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17, 5028-37.

Mack, D., Nishimura, K., Dennehey, B. K., Arbogast, T., Parkinson, J., Toh-e, A., Pringle, J. R., Bender, A. and Matsui, Y. (1996). Identification of the bud emergence gene *BEM4* and its interactions with rho-type GTPases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 16, 4387-95.

- Madden, K. and Snyder, M. (1998).** Cell polarity and morphogenesis in budding yeast. *Annu Rev Microbiol* 52, 687-744.
- Madrid, M., Núñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. and Cansado, J. (2007).** Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Mol Biol Cell* 18, 4405-19.
- Madrid, M., Soto, T., Khong, H. K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M. and Cansado, J. (2006).** Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 281, 2033-43.
- Magnelli, P. E., Cipollo, J. F. and Robbins, P. W. (2005).** A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. *Anal Biochem* 336, 202-12.
- Manners, D. J. and Meyer, M. T. (1977).** The molecular structures of some glucans from the cell walls of *Schizosaccharomyces pombe*. *Carbohydr. Res.* 57: 189-203.
- Manning, B. D., Padmanabha, R. and Snyder, M. (1997).** The Rho-GEF Rom2p localizes to sites of polarized cell growth and participates in cytoskeletal functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 8, 1829-44.
- Manser, E., Loo, T. H., Koh, C. G., Zhao, Z. S., Chen, X. Q., Tan, L., Tan, I., Leung, T. and Lim, L. (1998).** PAK kinases are directly coupled to the PIX family of nucleotide exchange factors. *Mol Cell* 1, 183-92.
- Marco, E., Wedlich-Soldner, R., Li, R., Altschuler, S. J. and Wu, L. F. (2007).** Endocytosis optimizes the dynamic localization of membrane proteins that regulate cortical polarity. *Cell* 129, 411-22.
- Marcoux, N., Cloutier, S., Zakrzewska, E., Charest, P. M., Bourbonnais, Y. and Pallotta, D. (2000).** Suppression of the profilin-deficient phenotype by the RHO2 signaling pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 156, 579-92.
- Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M. H. and Wigler, M. H. (1995).** Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 6180-4.
- Marks, J. and Hyams, J. S. (1985).** Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 39, 27-32.
- Martín-Cuadrado, A. B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Vázquez de Aldana, C. R. and del Rey, F. (2003).** The endo-beta-1,3-glucanase eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 116, 1689-98.
- Martín-Cuadrado, A. B., Encinar del Dedo, J., de Medina-Redondo, M., Fontaine, T., del Rey, F., Latgé, J. P. and Vázquez de Aldana, C. R. (2008).** The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3-beta-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. and de Aldana, C. R. (2005).** Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 16, 4867-81.
- Martín, H., Rodríguez-Pachón, J. M., Ruiz, C., Nombela, C. and Molina, M. (2000b).** Regulatory mechanisms for modulation of signaling through the cell integrity Sit2-mediated pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 275, 1511-9.

- Martin, S. G. and Chang, F. (2005).** New end take off: regulating cell polarity during the fission yeast cell cycle. *Cell Cycle* 4, 1046-9.
- Martin, S. G. and Chang, F. (2006).** Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol* 16, 1161-70.
- Martin, S. G., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd and Chang, F. (2005).** Tea4p links microtubule plus ends with the formin for3p in the establishment of cell polarity. *Dev Cell* 8, 479-91.
- Martin, S. G., Rincón, S. A., Basu, R., Pérez, P. and Chang, F. (2007).** Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell* 18, 4155-67.
- Martín, V., García, B., Carnero, E., Durán, A. and Sánchez, Y. (2003).** Bgs3p, a putative 1,3-beta-glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 2, 159-69.
- Martín, V., Ribas, J. C., Carnero, E., Durán, A. and Sánchez, Y. (2000a).** bgs2+, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* 38, 308-21.
- Mata, J. and Nurse, P. (1997).** tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast cell. *Cell* 89, 939-49.
- Matsui, Y. and Toh, E. A. (1992).** Yeast RHO3 and RHO4 ras superfamily genes are necessary for bud growth, and their defect is suppressed by a high dose of bud formation genes CDC42 and BEM1. *Mol Cell Biol* 12, 5690-9.
- Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y. et al. (2006).** ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 24, 841-7.
- Maudrell, K. (1990).** nmt1 of fission yeast. A highly transcribed gene completely repressed by thiamine. *J Biol Chem* 265, 10857-64.
- Mazur, P. and Baginsky, W. (1996).** In vitro activity of 1,3-beta-D-glucan synthase requires the GTP-binding protein Rho1. *J Biol Chem* 271, 14604-9.
- Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., el-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. and Foor, F. (1995).** Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* 15, 5671-81.
- Mazzei, G. J., Schmid, E. M., Knowles, J. K., Payton, M. A. and Maudrell, K. G. (1993).** A Ca²⁺-independent protein kinase C from fission yeast. *J Biol Chem* 268, 7401-6.
- McCusker, D., Denison, C., Anderson, S., Egelhofer, T. A., Yates, J. R., 3rd, Gygi, S. P. and Kelllogg, D. R. (2007).** Cdk1 coordinates cell-surface growth with the cell cycle. *Nat Cell Biol* 9, 506-15.
- Medina-Redondo, M., Arnáiz-Pita, Y., Fontaine, T., Del Rey, F., Latgé, J. P. and 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, 1283-99.
- Merla, A. and Johnson, D. I. (2000).** The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 79, 469-77.
- Merla, A. and Johnson, D. I. (2001).** The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr Genet* 39, 205-9.
- Miller, P. J. and Johnson, D. I. (1994).** Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 14, 1075-83.

- Mitchison, J. M. and Creanor, J. (1971).** Induction synchrony in the fission yeast. *Schizosaccharomyces pombe*. *Exp Cell Res* 67, 368-74.
- Mitchison, J. M. and Nurse, P. (1985).** Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 75, 357-76.
- Moon, S. Y. and Zheng, Y. (2003).** Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol* 13, 13-22.
- Moreno, M. B., Duran, A. and Ribas, J. C. (2000).** A family of multifunctional thiamine-repressible expression vectors for fission yeast. *Yeast* 16, 861-72.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991).** Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Enzymol* 194, 795-823.
- Morrell-Falvey, J. L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G. D. and Gould, K. L. (2005).** Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J Cell Sci* 118, 5563-73.
- Moseley, J. B. and Goode, B. L. (2006).** The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 605-45.
- Moseley, J. B. and Nurse, P. (2009).** Cdk1 and cell morphology: connections and directions. *Curr Opin Cell Biol* 21, 82-8.
- Motegi, F., Arai, R. and Mabuchi, I. (2001).** Identification of two type V myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell* 12, 1367-80.
- Mukherjee, D., Coon, B. G., Edwards, D. F., 3rd, Hanna, C. B., Longhi, S. A., McCaffery, J. M., Wendland, B., Retegui, L. A., Bi, E. and Aguilar, R. C. (2009).** The yeast endocytic protein Epsin 2 functions in a cell-division signaling pathway. *J Cell Sci* 122, 2453-63.
- Mulvihill, D. P., Edwards, S. R. and Hyams, J. S. (2006).** A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton* 63, 149-61.
- Musacchio, A., Cantley, L. C. and Harrison, S. C. (1996).** Crystal structure of the breakpoint cluster region-homology domain from phosphoinositide 3-kinase p85 alpha subunit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 14373-8.
- Mutoh, T., Nakano, K. and Mabuchi, I. (2005).** Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* 10, 1189-202.
- Nakano, K., Arai, R. and Mabuchi, I. (1997).** The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 2, 679-94.
- Nakano, K., Arai, R. and Mabuchi, I. (2005).** Small GTPase Rho5 is a functional homologue of Rho1, which controls cell shape and septation in fission yeast. *FEBS Lett* 579, 5181-6.
- Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh, E. A., Matsui, Y. and Mabuchi, I. (2002).** The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J Cell Sci* 115, 4629-39.
- Nakano, K. and Mabuchi, I. (1995).** Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding Rho proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* 155, 119-22.
- Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R. and Mabuchi, I. (2003).** The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes Cells* 8, 357-70.

- Nakano, K., Mutoh, T. and Mabuchi, I. (2001).** Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 6, 1031-42.
- Nern, A. and Arkowitz, R. A. (2000).** Nucleocytoplasmic shuttling of the Cdc42p exchange factor Cdc24p. *J Cell Biol* 148, 1115-22.
- Nicholas, R. O., Williams, D. W. and Hunter, P. A. (1994).** Investigation of the value of β -glucan-specific fluorochromes for predicting the β -glucans content of the cell wall of zoopathogenic fungi. *Mycol. Res.* 98, 694-698.
- Novick, P. and Guo, W. (2002).** Ras family therapy: Rab, Rho and Ral talk to the exocyst. *Trends Cell Biol* 12, 247-9.
- Novick, P., Osmond, B. C. and Botstein, D. (1989).** Suppressors of yeast actin mutations. *Genetics* 121, 659-74.
- Nurse, P., Thuriaux, P. and Nasmyth, K. (1976).** Genetic control of the cell division cycle in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 146, 167-78.
- Onken, B., Wiener, H., Philips, M. R. and Chang, E. C. (2006).** Compartmentalized signaling of Ras in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 9045-50.
- Osman, M. A. and Cerione, R. A. (1998).** Iqg1p, a yeast homologue of the mammalian IQGAPs, mediates cdc42p effects on the actin cytoskeleton. *J Cell Biol* 142, 443-55.
- Osumi, M. (1998a).** [Dynamics of cell wall formation from *Trichophyton mentagrophytes* protoplast]. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 39, 151-9.
- Osumi, M. (1998b).** The ultrastructure of yeast: cell wall structure and formation. *Micron* 29, 207-33.
- Otilie, S., Miller, P. J., Johnson, D. I., Creasy, C. L., Sells, M. A., Bagrodia, S., Forsburg, S. L. and Chernoff, J. (1995).** Fission yeast *pak1+* encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *EMBO J* 14, 5908-19.
- Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y. and Takai, Y. (1996).** Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 15, 2196-207.
- Padte, N. N., Martin, S. G., Howard, M. and Chang, F. (2006).** The cell-end factor pom1p inhibits mid1p in specification of the cell division plane in fission yeast. *Curr Biol* 16, 2480-7.
- Park, H. O. and Bi, E. (2007).** Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 48-96.
- Park, H. O., Bi, E., Pringle, J. R. and Herskowitz, I. (1997).** Two active states of the Ras-related Bud1/Rsr1 protein bind to different effectors to determine yeast cell polarity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 4463-8.
- Park, H. O., Kang, P. J. and Rachfal, A. W. (2002).** Localization of the Rsr1/Bud1 GTPase involved in selection of a proper growth site in yeast. *J Biol Chem* 277, 26721-4.
- Pelham, R. J. and Chang, F. (2002).** Actin dynamics in the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* 419, 82-6.
- Pelham, R. J., Jr. and Chang, F. (2001).** Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* 3, 235-44.
- Petersen, J., Nielsen, O., Egel, R. and Hagan, I. M. (1998).** F-actin distribution and function during

sexual differentiation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 111 (Pt 7), 867-76.

Peterson, J., Zheng, Y., Bender, L., Myers, A., Cerione, R. and Bender, A. (1994). Interactions between the bud emergence proteins Bem1p and Bem2p and Rho-type GTPases in yeast. *J Cell Biol.* .

Pinar, M., Coll, P. M., Rincon, S. A. and Perez, P. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol Biol Cell* 19, 1727-38.

Popolo, L. and Vai, M. (1999). The Gas1 glycoprotein, a putative wall polymer cross-linker. *Biochim Biophys Acta* 1426, 385-400.

Prouzet-Mauleon, V., Lefebvre, F., Thoraval, D., Crouzet, M. and Doignon, F. (2008). Phosphoinositides affect both the cellular distribution and activity of the F-BAR-containing RhoGAP Rgd1p in yeast. *J Biol Chem* 283, 33249-57.

Pruyne, D. and Bretscher, A. (2000). Polarization of cell growth in yeast. *J Cell Sci* 113 (Pt 4), 571-85.

Qadota, H., Ishii, I., Fujiyama, A., Ohya, Y. and Anraku, Y. (1992). RHO gene products, putative small GTP-binding proteins, are important for activation of the CAL1/CDC43 gene product, a protein geranylgeranyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 8, 735-41.

Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. and Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3-beta-glucan synthase. *Science* 272, 279-81.

Radcliffe, P., Hirata, D., Childs, D., Vardy, L. and Toda, T. (1998). Identification of novel temperature-sensitive lethal alleles in essential beta-tubulin and nonessential alpha 2-tubulin genes as fission yeast polarity mutants. *Mol Biol Cell* 9, 1757-71.

Ramer, S. W. and Davis, R. W. (1993). A dominant truncation allele identifies a gene, STE20, that encodes a putative protein kinase necessary for mating in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 452-6.

Reid, T., Furuyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P. and Narumiya, S. (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhophilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* 271, 13556-60.

Ren, X. D., Kiosses, W. B. and Schwartz, M. A. (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* 18, 578-85.

Rincón, S. A., Santos, B. and Pérez, P. (2006). Fission yeast Rho5p GTPase is a functional paralogue of Rho1p that plays a role in survival of spores and stationary-phase cells. *Eukaryot Cell* 5, 435-46.

Rincón, S. A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M. A., Santos, B., Martin, S. G. and Pérez, P. (2009). Pob1 Participates in the Cdc42 Regulation of Fission Yeast Actin Cytoskeleton. *Mol Biol Cell*.

Roberts, R. L. and Fink, G. R. (1994). Elements of a single MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae* mediate two developmental programs in the same cell type: mating and invasive growth. *Genes Dev* 8, 2974-85.

Robinson, N. G., Guo, L., Imai, J., Toh, E. A., Matsui, Y. and 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, 3580-7.

Rossman, K. L., WorthyLake, D. K., Snyder, J. T., Siderovski, D. P., Campbell, S. L. and Son-

dek, J. (2002). A crystallographic view of interactions between Dbs and Cdc42: PH domain-assisted guanine nucleotide exchange. *EMBO J* 21, 1315-26.

Rothstein, R. J. (1983). One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 101, 202-11.

Rothstein, R. J. (1991). Targeting, disruption, replacement and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast. in *Gurthrie, C. and Fink, G. R. (Eds), Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology, Academic Press, 281-301.*

Roumanie, O., Peypouquet, M. F., Bonneu, M., Thoraval, D., Doignon, F. and Crouzet, M. (2000). Evidence for the genetic interaction between the actin-binding protein Vrp1 and the RhoGAP Rgd1 mediated through Rho3p and Rho4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 36, 1403-14.

Roumanie, O., Weinachter, C., Larrieu, I., Crouzet, M. and Doignon, F. (2001). Functional characterization of the Bag7, Lrg1 and Rgd2 RhoGAP proteins from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 506, 149-56.

Saito, K., Fujimura-Kamada, K., Hanamatsu, H., Kato, U., Umeda, M., Kozminski, K. G. and Tanaka, K. (2007). Transbilayer phospholipid flipping regulates Cdc42p signaling during polarized cell growth via Rga GTPase-activating proteins. *Dev Cell* 13, 743-51.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring harbor Laboratory Press.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-7.

Santos, B., Gutiérrez, J., Calonge, T. M. and Pérez, P. (2003). Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 2, 521-33.

Santos, B., Martín-Cuadrado, A. B., Vázquez de Aldana, C. R., del Rey, F. and Pérez, P. (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryot Cell* 4, 1639-45.

Sawin, K. E. (2002). Cell polarity: following formin function. *Curr Biol* 12, R6-8.

Sawin, K. E. and Nurse, P. (1998). Regulation of cell polarity by microtubules in fission yeast. *J Cell Biol* 142, 457-71.

Sayers, L. G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T. and Parker, P. J. (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells* 5, 17-27.

Schmelzle, T., Helliwell, S. B. and Hall, M. N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol Cell Biol* 22, 1329-39.

Schmidt, A., Bickle, M., Beck, T. and Hall, M. N. (1997). The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell* 88, 531-42.

Schmidt, A., Schmelzle, T. and Hall, M. N. (2002). The RHO1-GAPs SAC7, BEM2 and BAG7 control distinct RHO1 functions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 45, 1433-41.

Schmitz, H. P., Huppert, S., Lorberg, A. and Heinisch, J. J. (2002). Rho5p downregulates the yeast cell integrity pathway. *J Cell Sci* 115, 3139-48.

Schwamborn, J. C., Muller, M., Becker, A. H. and Puschel, A. W. (2007). Ubiquitination of the GTPase Rap1B by the ubiquitin ligase Smurf2 is required for the establishment of neuronal polarity. *EMBO J* 26, 1410-22.

Self, A. J. and Hall, A. (1995). Measurement of intrinsic nucleotide exchange and GTP hydrolysis rates. *Methods Enzymol* 256, 67-76.

Sells, M. A., Barratt, J. T., Caviston, J., Otilie, S., Leberer, E. and Chernoff, J. (1998). Characterization of Pak2p, a pleckstrin homology domain-containing, p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* 273, 18490-8.

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

Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R. (1986). Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺ + K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature* 319, 689-93.

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

Sheu, Y. J., Barral, Y. and Snyder, M. (2000). Polarized growth controls cell shape and bipolar bud site selection in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 20, 5235-47.

Sheu, Y. J., Santos, B., Fortin, N., Costigan, C. and Snyder, M. (1998). Spa2p interacts with cell polarity proteins and signaling components involved in yeast cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* 18, 4053-69.

Shimada, Y., Gulli, M. P. and Peter, M. (2000). Nuclear sequestration of the exchange factor Cdc24 by Far1 regulates cell polarity during yeast mating. *Nat Cell Biol* 2, 117-24.

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

Shirakawa, R., Fukai, S., Kawato, M., Higashi, T., Kondo, H., Ikeda, T., Nakayama, E., Okawa, K., Nureki, O., Kimura, T. et al. (2009). Tuberosus sclerosis tumor suppressor complex-like complexes act as GTPase-activating proteins for Ral GTPases. *J Biol Chem*.

Singh, K., Kang, P. J. and Park, H. O. (2008). The Rho5 GTPase is necessary for oxidant-induced cell death in budding yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 1522-7.

Sio, S. O., Suehiro, T., Sugiura, R., Takeuchi, M., Mukai, H. and Kuno, T. (2005). The role of the regulatory subunit of fission yeast calcineurin for in vivo activity and its relevance to FK506 sensitivity. *J Biol Chem* 280, 12231-8.

Sirotkin, V., Beltzner, C. C., Marchand, J. B. and Pollard, T. D. (2005). Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J Cell Biol* 170, 637-48.

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

Smith, G. R., Givan, S. A., Cullen, P. and Sprague, G. F., Jr. (2002). GTPase-activating proteins for Cdc42. *Eukaryot Cell* 1, 469-80.

Snaith, H. A. and Sawin, K. E. (2003). Fission yeast mod5p regulates polarized growth through anchoring of tea1p at cell tips. *Nature* 423, 647-51.

Sopko, R., Huang, D., Smith, J. C., Figeys, D. and Andrews, B. J. (2007). Activation of the Cdc42p GTPase by cyclin-dependent protein kinases in budding yeast. *EMBO J* 26, 4487-500.

- Sugawara, T., Sato, M., Takagi, T., Kamasaki, T., Ohno, N. and Osumi, M. (2003).** In situ localization of cell wall alpha-1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc (Tokyo)* 52, 237-42.
- Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S. O. and Kuno, T. (2003).** Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* 424, 961-5.
- Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H. and Kuno, T. (1999).** The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* 399, 479-83.
- Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M. and Kuno, T. (1998).** *pmp1+*, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J* 17, 140-8.
- Svarovsky, M. J. and Palecek, S. P. (2005).** Disruption of LRG1 inhibits mother-daughter separation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 22, 1117-32.
- Tajadura, V., García, B., García, I., García, P. and Sánchez, Y. (2004).** *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall beta-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J Cell Sci* 117, 6163-74.
- Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S. et al. (2007).** Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Mol Biol Cell* 18, 4794-802.
- Takegawa, K., Hosomi, A., Iwaki, T., Fujita, Y., Morita, T. and Tanaka, N. (2003).** Identification of a SNARE protein required for vacuolar protein transport in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biochem Biophys Res Commun* 311, 77-82.
- Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R. and Shiozaki, K. (2008).** Pom1 DYRK regulates localization of the Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr Biol* 18, 322-30.
- Tcherkezian, J. and Lamarche-Vane, N. (2007).** Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins. *Biol Cell* 99, 67-86.
- Tiedje, C., Sakwa, I., Just, U. and Hofken, T. (2008).** The Rho GDI Rdi1 regulates Rho GTPases by distinct mechanisms. *Mol Biol Cell* 19, 2885-96.
- Toda, T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. and Kuno, T. (1996a).** The fission yeast *pmk1+* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol Cell Biol* 16, 6752-64.
- Toda, T., Niwa, H., Nemoto, T., Dhut, S., Eddison, M., Matsusaka, T., Yanagida, M. and Hirata, D. (1996b).** 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), 2331-42.
- Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M. (1991).** Fission yeast genes that confer resistance to staurosporine encode an AP-1-like transcription factor and a protein kinase related to the mammalian ERK1/MAP2 and budding yeast FUS3 and KSS1 kinases. *Genes Dev* 5, 60-73.
- Toda, T., Shimanuki, M. and Yanagida, M. (1993).** Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J* 12, 1987-95.
- Toenjes, K. A., Sawyer, M. M. and Johnson, D. I. (1999).** The guanine-nucleotide-exchange factor Cdc24p is targeted to the nucleus and polarized growth sites. *Curr Biol* 9, 1183-6.
- Tong, Z., Gao, X. D., Howell, A. S., Bose, I., Lew, D. J. and Bi, E. (2007).** Adjacent positioning of

cellular structures enabled by a Cdc42 GTPase-activating protein-mediated zone of inhibition. *J Cell Biol* 179, 1375-84.

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

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

Tsujita, K., Suetsugu, S., Sasaki, N., Furutani, M., Oikawa, T. and Takenawa, T. (2006). Coordination between the actin cytoskeleton and membrane deformation by a novel membrane tubulation domain of PCH proteins is involved in endocytosis. *J Cell Biol* 172, 269-79.

Ubersax, J. A., Woodbury, E. L., Quang, P. N., Paraz, M., Blethrow, J. D., Shah, K., Shokat, K. M. and Morgan, D. O. (2003). Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425, 859-64.

Umeda, K., Yoko-o, T., Nakayama, K., Suzuki, T. and Jigami, Y. (2000). *Schizosaccharomyces pombe* gmd3(+)/alg11(+) is a functional homologue of *Saccharomyces cerevisiae* ALG11 which is involved in N-linked oligosaccharide synthesis. *Yeast* 16, 1261-71.

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

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

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

Vilella, F., Herrero, E., Torres, J. and de la Torre-Ruiz, M. A. (2005). Pkc1 and the upstream elements of the cell integrity pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, are required for cellular responses to oxidative stress. *J Biol Chem* 280, 9149-59.

Vos, A., Dekker, N., Distel, B., Leunissen, J. A. and Hochstenbach, F. (2007). Role of the synthase domain of Ags1p in cell wall alpha-glucan biosynthesis in fission yeast. *J Biol Chem* 282, 18969-79.

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

Wang, H., Tang, X., Liu, J., Trautmann, S., Balasundaram, D., McCollum, D. and Balasubramanian, M. K. (2002). The multiprotein exocyst complex is essential for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13, 515-29.

Wang, H. R., Zhang, Y., Ozdamar, B., Ogunjimi, A. A., Alexandrova, E., Thomsen, G. H. and Wrana, J. L. (2003b). Regulation of cell polarity and protrusion formation by targeting RhoA for degradation. *Science* 302, 1775-9.

Watanabe, D., Abe, M. and Ohya, Y. (2001). Yeast Lrg1p acts as a specialized RhoGAP regulating 1,3-beta-glucan synthesis. *Yeast* 18, 943-51.

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

Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M. and Strahl, S. (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol* 57, 156-70.

Wu, H., Rossi, G. and Brennwald, P. (2008). The ghost in the machine: small GTPases as spatial

regulators of exocytosis. *Trends Cell Biol* 18, 397-404.

Xu, Y., Seet, L. F., Hanson, B. and Hong, W. (2001). The Phox homology (PX) domain, a new player in phosphoinositide signalling. *Biochem J* 360, 513-30.

Yamochi, W., Tanaka, K., Nonaka, H., Maeda, A., Musha, T. and Takai, Y. (1994). Growth site localization of Rho1 small GTP-binding protein and its involvement in bud formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* 125, 1077-93.

Yang, P., Kansra, S., Pimental, R. A., Gilbreth, M. and Marcus, S. (1998). Cloning and characterization of shk2, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* 273, 18481-9.

Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X. and Marcus, S. (2003). The novel Rho GTPase-activating protein family protein, Rga8, provides a potential link between Cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 278, 48821-30.

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

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

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

Yuan, B. Z., Miller, M. J., Keck, C. L., Zimonjic, D. B., Thorgeirsson, S. S. and Popescu, N. C. (1998). Cloning, characterization, and chromosomal localization of a gene frequently deleted in human liver cancer (DLC-1) homologous to rat RhoGAP. *Cancer Res* 58, 2196-9.

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

Zheng, Y., Cerione, R. and Bender, A. (1994). Control of the yeast bud-site assembly GTPase Cdc42. Catalysis of guanine nucleotide exchange by Cdc24 and stimulation of GTPase activity by Bem3. *J Biol Chem* 269, 2369-72.

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