



UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Control diferencial de la ruta de MAP quinasas de
integridad celular por GTPasas de la familia Rho en
Schizosaccharomyces pombe

Dña. Laura Sánchez Mir

2014

“Control diferencial de la ruta de MAP quinasas de
integridad celular por GTPasas de la familia Rho en
Schizosaccharomyces pombe”

Trabajo realizado en el Departamento de Genética y Microbiología de la
Universidad de Murcia, para optar al grado de Doctor en Biología, por la
Licenciada **Laura Sánchez Mir.**

Murcia, 24 de Julio de 2014



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. José Cansado Vizoso, Catedrático de Universidad del Área de Microbiología en el Departamento de Genética y Microbiología, AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Control diferencial de la ruta de MAP quinasas de integridad celular por GTPasas de la familia Rho en *Schizosaccharomyces pombe*", realizada por D^a. Laura Sánchez Mir, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 29 de Mayo de 2014





UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D^a. Teresa Soto Pino, Profesora Titular de Universidad del Área de Microbiología en el Departamento de Genética y Microbiología,
AUTORIZA:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada "Control diferencial de la ruta de MAP quinasas de integridad celular por GTPasas de la familia Rho en *Schizosaccharomyces pombe*", realizada por D^a. Laura Sánchez Mir, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 29 de Mayo de 2014

Teresa Soto Pino





UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. José Tudela Serrano, Catedrático de Universidad del Área de Bioquímica y Biología Molecular y **Presidente Comisión Académica programa doctorado *** Biología Molecular y Biotecnología, INFORMA:

Que una vez evaluado, de conformidad con el procedimiento establecido en el artículo 21 del Reglamento de doctorado de la Universidad de Murcia, el expediente completo de la tesis doctoral titulada "Control diferencial de la ruta de MAP quinastas de integridad celular por GTPasas de la familia Rho en Schizosaccharomyces pombe", realizada por D^a Laura Sánchez Mir, bajo la inmediata dirección y supervisión de D. José Cansado Vizoso y D^a Teresa Soto Pino, esta Comisión Académica, en sesión celebrada en fecha 30/05/2014, ha dado su autorización para su presentación ante la Comisión General de Doctorado.

Murcia, a 30 de Mayo de 2014



Doctorando: D^a. Laura Sánchez Mir

Mod: T-40



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

Vicerrectorado de
Estudios

D^a LAURA SÁNCHEZ MIR
C/ Arturo Duperier, 4, 4º B
30009 MURCIA

Vista la solicitud presentada el día 14 de mayo de 2014, por D^a LAURA SÁNCHEZ MIR, con D.N.I.: 48500214-E, sobre autorización para presentación de tesis doctoral como compendio de publicaciones con carácter previo a la tramitación de la misma en la Universidad de Murcia, le comunico que la Comisión de General de Doctorado, vistos:

- el informe previo del Presidente de la Comisión Académica del Doctorado en Biología Molecular y Biotecnología , y
- el visto bueno de la Comisión de Ramas de Conocimiento de Ciencias ,

resolvió, en su sesión de 16 de mayo de 2014, **ACCEDER** a lo solicitado por la interesada pudiendo, por lo tanto, presentar su tesis doctoral en la modalidad de compendio de publicaciones.

Lo que en cumplimiento del artículo 58 de la vigente Ley 30/1992, de Régimen Jurídico de las Administraciones Públicas y del Procedimiento Administrativo Común, de 26 de noviembre, se **notifica** a D^a LAURA SÁNCHEZ MIR, significándole que contra este acuerdo, y conforme a lo establecido en el artículo 21.2 de los Estatutos de la Universidad de Murcia, podrá interponer recurso de alzada ante el Sr. Rector Magfco de esta Universidad, en el plazo de un mes a partir del día siguiente a la recepción de la misma.

Murcia, 16 de mayo de 2014
Vicerrectora de Estudios y
Presidenta de la Comisión General de Doctorado


Concepción Palacios Bernal

Esta memoria ha sido concebida como compendio de las siguientes publicaciones:

- Laura Sánchez-Mir, Teresa Soto, Alejandro Franco, Marisa Madrid, Raúl A. Viana, Jerónima Vicente, Mariano Gacto, Pilar Pérez, José Cansado (2014). *Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast*. PLoS One 9:e88020.

- Laura Sánchez-Mir, Alejandro Franco, Rebeca Martín-García, Marisa Madrid, Jerónima Vicente, Teresa Soto, Mariano Gacto, Pilar Pérez, José Cansado (2014). *Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity MAPK pathway*. Molecular and Cellular Biology, doi:10.1128/MCB.01515-13 (aceptado/en prensa).

- Laura Sánchez-Mir, Alejandro Franco, Marisa Madrid, Jerónima Vicente, M. Antonia Villar-Tajadura, Teresa Soto, Pilar Pérez, Mariano Gacto, José Cansado (2012). *Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast*. Journal of Biological Chemistry 287: 26038-26051.

El trabajo presentado en esta memoria ha sido financiado con las ayudas procedentes de:

- Título del proyecto: “Análisis molecular, regulación y funciones de la ruta de MAP quinasas de integridad celular”.

Referencia: BFU2008-01653.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Programa Nacional de Biología Fundamental.

- Título del proyecto: “Determinantes de membrana implicados en rutas de señalización mediadas por MAP quinasas en la levadura con fisión”.

Referencia: BFU2011-22517.

Entidad financiadora: Ministerio de Ciencia e Innovación. Programa Nacional de Biología Fundamental.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mis directores, el **Dr. José Cansado Vizoso**, por darme la oportunidad de incorporarme a este grupo sin conocerme e iniciarme en el mundo de la investigación, y la **Dra. Teresa Soto Pino**, por haberme enseñado todo lo que sé y por su disposición para escucharme y resolver cualquier duda o problema en todo momento. Gracias al **Dr. Alejandro Franco** por su generosidad y colaboración, los trabajos incluidos en esta Tesis son tan suyos como míos. A la **Dra. Marisa Madrid**, de la que admiro su capacidad de trabajo y sacrificio, por su ayuda, sus consejos y su compañía durante estos años. Al **Dr. Mariano Gacto Fernández** y la **Dra. Jero Vicente Soler**, por su asesoramiento y sus recomendaciones durante la realización de este trabajo. Gracias al **Dr. Javier Campoy** (Dpto. Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Murcia) por su ayuda para la realización de parte de los experimentos realizados en este trabajo.

Gracias a **Andrés Núñez**, que me acompañó y me aconsejó durante mis inicios y a **Rafa, Bea y Vero** que han estado ahí en la recta final. Y a **Paco Garro** por su compañía, sus ánimos y su asistencia técnica durante este tiempo.

Por otro lado, gracias a la **Dra. Pilar Pérez** (Instituto de Biología Funcional y Genómica, Universidad de Salamanca, CSIC), tanto por su extensa colaboración en este trabajo, como por haberme aceptado tan amablemente en su grupo durante algunos meses. Y por supuesto a los integrantes del grupo, los **PPGs**, que me acogieron como a una más e hicieron mi estancia tan agradable. En especial a **Raúl** y a **Rebeca**, cuya labor ha sido fundamental en este trabajo.

Gracias a mis padres, **Antonio y M^a Carmen**, y a mi hermana **Nuria** por haber apoyado todas mis decisiones y por inculcarme el valor del trabajo y el esfuerzo para conseguir lo que me proponga. Gracias a vosotros soy lo que soy. También quiero agradecer el apoyo de mi familia política durante estos años.

A mis amigos, **M^a José, Paloma, Elena, Noelia, Lorena, Willy, Edu, Ana, Mercedes, Joaquín, Charo, Rubén, Irene, Juan Fran** y afortunadamente un largo etcétera... Gracias porque a pesar de no tener claro lo que hago ni cómo lo hago, siempre habéis estado ahí y os habéis interesado por "*mis bichos*". Pero mi agradecimiento más especial es para **Shere**, que ha sido la que me ha acompañado durante toda esta etapa, gracias por los desayunos, las risas, nuestra semanita de vacaciones... Y por supuesto a ti, **Javi**, sé lo orgulloso que estarías. Gracias por haber formado parte de mi vida.

Por último y más importante, gracias a Manolo, que es el que realmente ha vivido la tesis, acompañándome en los buenos momentos y sobre todo, animándome en los malos. Gracias por estar a mi lado y por tu apoyo incondicional.

Y en general, gracias a todas las personas que han contribuido de una u otra manera a la realización de este trabajo.

ABREVIATURAS

AA: Aminoácido

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ADNc: ADN copia

AG: Aparato de Golgi

AMPC: adenosín-monofosfato-3',5'-cíclico

ARN: Ácido Ribonucleico

ARNm: Ácido Ribonucleico mensajero

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BSA: "*Bovine Seric Albumin*" o Albúmina sérica bovina

2-BP: 2-bromopalmitato

CESR: "*Core Environmental Stress Response*" o Respuesta a estrés ambiental central

CIP: Ruta de MAP quinasas de integridad celular

DAPI: 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole

CRE: "*cAMP-Response Element*" o Elemento de respuesta a AMPC

DHHC: Aspartato-Histidina-Histidina-Cisteína

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNTP: Deoxirribonucleótidos trifosfato

D.O.: Densidad Óptica en nm

DSP: "*Dual Specificity Phosphatase*" o Fosfatasa de especificidad dual

DTT: Ditioneitol

EDTA: "*EtilenDiaminTetracetic Ácid*" o Ácido etilendiaminotetraacético

EGTA: Ácido etilenglicol-bis (β -aminoetil éter)- N,N,N',N'- tetraacético

EMM: "*Edinburg Minimal Medium*" o Medio mínimo de Edimburgo para *S. pombe*

ESR: "*Environmental Stress Response*" o Respuesta a estrés ambiental

F: Farnesilación

FRAP: "*Fluorescence Recovery After Photobleaching*" o Recuperación de la fluorescencia tras fotoblanqueo

FT: Farnesil transferasa

GAP: "*GTPase Activating Protein*" o Proteína activadora de la actividad GTPasa

GDI: "*GDP Dissociation Inhibitor*" o Inhibidor de la disociación de GDP

GDP: Guanosina 5'-difosfato

GEF: "*GTP Exchange Factor*" o Factor intercambiador de GTP

GFP: "*Green Fluorescent Protein*" o Proteína verde fluorescente

GG: Geranilgeranilación

GGT: Geranilgeranil transferasa

GS: Glucán sintasa

GPI: glicosil-fosfatidil-inositol

GST: Glutati6n S transferasa

GTP: Guanosina 5'-trifosfato

GTPasa: Trifosfatasa de guanosina

HA: Epítopo de hemaglutinina del virus de la gripe humana

HA6H: Epítopo de hemaglutinina seguido de 6 histidinas consecutivas

HEPES: Ácido N-(2-hidroietil) piperazin-N'-(2-etanolulf6nico)

HK: Histidín quinasa

HRP: Peroxidasa de rábano (Horseradish Peroxidase)

Kb: Kilobases de DNA o 1000 pb

Kd: 1000 Dalton

MAPK: MAP quinasa

MAPKK (MEK): MAP quinasa quinasa

MAPKKK (MAPKK quinasa o MEKK): MAP quinasa quinasa quinasa

MAP-quinasa: Quinasa activada por mit6genos

Mb: Megabases en una secuencia de DNA

MIN: Minutos

MOPS: Ácido morfolinopropanosulf6nico

MP: Membrana plasmática

NES: "*Nuclear Export Signal*" o Secuencia de exportación nuclear

NEM: N-ethylmaleimide

NETO: "*New End Take Off*"

NLS: "*Nuclear Localization Signal*" o Secuencia de localización nuclear

NP-40: Nonidet P-40

OE.: Sobreexpresión de un gen (OverExpresion)

ORF: "*Open Reading Frame*" o Fase de lectura abierta

P: Ortofosfato

PAGE: "*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*" o Electroforesis en gel de poliacrilamida

PAK: "*p21 Activated Kinase*" o Quinasa activada por p21

Pb: Pares de bases en una secuencia de DNA

PBS: "*Phosphate Buffered Saline*" o Tampón fosfato salino

PBST: "*Phosphate Buffered Saline Tween-20*" o Tampón fosfato salino con Tween-20

PC: Pared celular

PCR: "*Polymerase Chain Reaction*" o Reacción en cadena de la polimerasa

PDK: Quinasa dependiente de fosfoinosítidos

PKC: Proteína quinasa C

PP2C: "*serine/threonine phosphatase*" o Fosfatasa de serina y treonina

PPasa: Fosfatasa

PRKs: "*PKC-Related Kinases*" o Quinasas asociadas a Rho

PT: Palmitoil transferasa

PTP: "*Tyrosine phosphatase*" o Fosfatasa de tirosina

r.p.m: Revoluciones por minuto

RBD: "*Rhotekin Rho-binding domain*" o Dominio de unión a Rotequina

RE: Retículo endoplasmático

SAPK: "*Stress Activated Protein Kinase*" o Proteína quinasa activada por estrés

SD: *“Standart Desviation”* o Desviación Estándar

SDS: *“Sodium Docecil Sulphate”* o Dodecil sulfato de sodio

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes

SPB: *“Spindle Pole Body”* o Cuerpo polar del huso

SSC: *“Salt Sodium Citrate”* o Citrato de sodio salino

TAE: Tampón de Tris, ácido Acético y EDTA

TBST: *“Tris-Buffered Saline Tween-20”* o Tampón Tris salino con Tween-20

TE: Tris-EDTA

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina

TF: *“General Transcription Factor”* o Factor de transcripción general

Tris: Tris-(hidroximetil)-amino-metano

U.R: Unidades relativas

UV: Ultravioleta

V: Voltios

VIC: *“Viable in the presence of Immunosuppressant FK506 and Chloride ion”* o Viable en presencia de inmusupresor FK506 e ión cloro

WT: *“Wild Type”* o Estirpe Silvestre

w/v: peso/volumen

YES: *“Yeast extract with supplementation”* o Medio rico para *S. pombe*

RESUMEN

Las rutas de señalización mediadas por MAP quinasas (MAPK) tienen un papel fundamental en la respuesta de células eucariotas frente a estímulos ambientales. La levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* representa un modelo particularmente adecuado para abordar estudios básicos sobre dichas rutas de señalización, debido a la gran homología funcional que existe entre sus circuitos reguladores y los de organismos superiores. En *S. pombe*, la ruta de MAPKs de integridad celular (CIP) participa en la regulación de numerosos procesos biológicos como la construcción de la pared celular, la citocinesis, la morfogénesis, la fusión de vacuolas durante el estrés hipotónico, y la homeostasis iónica mediante la modulación de la activación de la MAPK Pmk1 en respuesta a cambios en las condiciones ambientales.

Aunque la GTPasa Rho2 es el principal activador de la ruta de integridad celular a través del ortólogo de PKC Pck2, Pmk1 puede ser activada en ausencia de ambos dependiendo de la naturaleza del estímulo recibido, lo que indica la existencia de elementos reguladores adicionales aguas arriba del módulo de MAPKs. Se ha propuesto a la GTPasa Rho1 como candidata para tal función, mientras que el ortólogo de PKC Pck1 parece regular negativamente la actividad de la CIP. Hemos investigado el posible papel de Rho1 y Pck1 como reguladores de la CIP empleando un mutante hipoactivo de Rho1 (*rho1-596*) y un mutante carente de Pck1 en distintos fondos genéticos. Las evidencias obtenidas mostraron que Rho1 y Pck1 son activadores de la ruta adicionalmente a Rho2 y Pck2, lo que pone de manifiesto la naturaleza ramificada de los mecanismos de señalización que actúan aguas arriba del módulo de MAPKs.

Por otra parte Rho2 se localiza en la membrana plasmática y en el área de división celular, y es farnesilada *in vivo* en el motivo -CAAX de su extremo C-terminal, siendo esta modificación esencial para su localización y función activadora de la CIP. Sin embargo, la presencia de un residuo de cisteína previo al motivo -CAAX sugiere que Rho2 podría encontrarse palmitoilada en dicho residuo. Para estudiar la relevancia biológica de la palmitoilación de Rho2 creamos una serie de cepas que expresan versiones mutantes tanto de Rho2 como de Rho1 afectadas en lipidación, y estudiamos su localización y función biológica. Los resultados obtenidos permitieron concluir que en la levadura con fisión, la GTPasa Rho2 es palmitoilada *in vivo*, siendo esta modificación crítica para su correcta localización en membrana plasmática y para ejercer su regulación de la morfogénesis y la ruta de integridad celular.

Por último, son numerosos los estudios que han puesto de manifiesto la importancia de la localización subcelular de los componentes de los módulos de MAP quinasas en la respuesta a estrés. En el caso de la ruta de integridad celular, la MAPK Pmk1 muestra una localización núcleo/citoplasmática constitutiva, así como en el huso mitótico, el corpúsculo polar del huso, y en el septo durante la separación celular. Sin embargo, a diferencia del modelo descrito en ERK1/2 en mamíferos, el patrón de localización de Pmk1 no se modifica en respuesta a estrés, lo que indica que tanto la forma activa como inactiva de la MAP quinasa son capaces de entrar en el núcleo. En base a esto, nos planteamos el estudio de la relevancia biológica de la localización nuclear de Pmk1 sobre su función biológica. Para ello recurrimos a la caracterización de mutantes de *S. pombe* que expresan una versión de Pmk1 anclada a la membrana plasmática y excluida del núcleo constitutivamente en distintos fondos genéticos. Los resultados mostraron que aunque la localización nuclear de Pmk1 en *Schizosaccharomyces pombe* no es crítica para ejercer la mayor parte de sus funciones biológicas, sí es necesaria para la regulación transcripcional en respuesta al estrés de pared celular, lo que revela la importancia del control espacio-temporal de la actividad de las MAPKs en los organismos eucariotas.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

1- Características generales de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
1.1 Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	2
2- Las GTPasas de la familia Rho	5
2.1 Características generales.....	5
2.2 Regulación.....	8
2.2.1 GEFs.....	8
2.2.2 GAPs.....	9
2.2.3 GDIs.....	9
2.3 GTPasas Rho en <i>S. pombe</i>	9
2.3.1 Rho1.....	10
2.3.2 Rho2.....	12
2.4 GTPasas Rho y biosíntesis de pared celular en <i>S. pombe</i>	13
2.4.1 Composición de la pared celular.....	13
2.4.2 Síntesis del α y β -glucano.....	14
2.5 GTPasas Rho y polaridad celular.....	15
2.6 GTPasas Rho e integridad celular.....	17
3- Modificaciones postraduccionales de GTPasas Rho	18
3.1 Isoprenilación.....	20
3.1.1 Prenilación.....	22
3.1.2 Proteólisis.....	22
3.1.3 Metilación.....	22
3.2 Regulación de proteínas Rho mediante localización subcelular.....	23
3.3 Modificaciones que favorecen la interacción de las GTPasas Rho preniladas con membranas.....	24
3.3.1 Secuencia polibásica.....	24
3.3.2 Palmitoilación.....	24

3.4	Palmitoilación.....	24
3.4.1	Palmitoil transferasas.....	26
3.4.2	Palmitoilación como mecanismo de regulación de la actividad biológica de las GTPasas Rho.....	27
3.5	Palmitoilación y regulación de GTPasas Ras y Rho en <i>S. pombe</i>	28
3.5.1	Ras1.....	28
3.5.2	Rho3.....	29
4-	Las rutas de MAP quinasas.....	30
4.1	Organización de las rutas de MAP quinasas.....	30
4.1.1	Sensores.....	30
4.1.2	Módulo de MAP quinasas.....	30
4.1.3	Efectores de MAP quinasas.....	31
4.1.4	Reguladores de MAP quinasas.....	31
4.2	Conservación evolutiva.....	32
4.3	Ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i>	34
4.3.1	Sensores.....	34
4.3.2	Regulador de respuesta Mcs4.....	34
4.3.3	Módulo de MAP quinasas.....	35
4.3.3.1	MAPKK quinasa Wak1 y Win1.....	35
4.3.3.2	MAPK quinasa Wis1.....	35
4.3.3.3	MAP quinasa Sy1.....	35
4.3.4	Efectores de la ruta SAPK.....	37
4.3.4.1	Factores de transcripción: Atf1 y Pcr1.....	37
4.3.4.2	Proteínas de unión a ARN: Csx1, Upf1, Cip1 y Cip2.....	37
4.3.4.3	Proteínas quinasas activadas por Sty1: Cmk2, Srk1 y Plo1.....	38
4.3.4.4	Factores reguladores de la traducción.....	38
4.3.5	Reguladores negativos de la ruta SAPK.....	38
4.4	Ruta de MAP quinasas de integridad celular en <i>S. pombe</i>	39

4.4.1 Sensores.....	40
4.4.2 Reguladores aguas arriba del módulo de MAP quinasas.....	40
4.4.2.1 Las GTPasas Rho1 y Rho2.....	40
4.4.2.2 Las proteínas quinasas Pck1 y Pck2.....	41
4.4.3 Módulo de MAP quinasas.....	43
4.4.3.1 MAPKK quinasa Mkh1.....	43
4.4.3.2 MAPK quinasa Pek1.....	43
4.4.3.3 MAP quinasa Pmk1.....	44
4.4.4 Efectores de la ruta de integridad celular.....	45
4.4.4.1 Proteína de unión a ARN: Rnc1 y Nrd1.....	45
4.4.4.2 Factores de transcripción: Atf1 y Mbx1.....	45
4.4.4.3 Canal iónico: Cch1-Yam8.....	46
4.4.4.4 Proteínas reguladoras de ciclo celular: Clp1.....	47
4.4.5 Regulación negativa de la ruta de integridad celular.....	47
4.5 Interconexión (“ <i>crosstalk</i> ”) entre las rutas de MAP quinasas de respuesta a estrés y de integridad celular en <i>S. pombe</i>	48
5- Bibliografía.....	49
OBJETIVOS	
Justificación y objetivos.....	67
PUBLICACIONES	
1- <i>Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast</i>.....	69
Abstract.....	70
2- <i>Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signalling to the fission yeast cell integrity MAPK pathway</i>.....	71
Abstract.....	72
3- <i>Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast</i>.....	73

Abstract.....	74
CONCLUSIONES	
1- Conclusiones específicas.....	75
2- Conclusiones generales.....	76

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2
Tabla 2.1. Clasificación funcional de la superfamilia de GTPasas Ras.....	6
Tabla 3.1. Modificaciones lipídicas de proteínas en mamíferos.....	19
Tabla 3.2. Modificaciones lipídicas de secuencias carboxilo terminales de distintas proteínas Ras y Rho de mamíferos.....	21
Figura 1.1. Imágenes de la levadura con fisión <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mediante diversas técnicas microscópicas.....	1
Figura 1.2. Ciclo de vida de <i>S. pombe</i>	3
Figura 2.1. Hidrólisis de GTP por GTPasas de la superfamilia RAS.....	6
Figura 2.2. Estructura de las proteínas de la superfamilia Ras.....	7
Figura 2.3. Ciclo de activación/desactivación de GTPasas Rho.....	7
Figura 2.4. Reguladores del estado de activación de las GTPasas Rho.....	8
Figura 2.5. Reguladores específicos de la GTPasa Rho1.....	11
Figura 2.6. Reguladores específicos de la GTPasa Rho2.....	12
Figura 2.7. Ultraestructura y organización de la pared celular de <i>S. pombe</i>	13
Figura 2.8. Papel de Rho1 y Rho2 durante la biosíntesis del α y β -glucano de la pared celular en <i>S. pombe</i>	15
Figura 2.9. Regulación del establecimiento del crecimiento polarizado en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pombe</i>	16
Figura 2.10. Rutas de MAP quinasas de integridad celular en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pombe</i>	18
Figura 3.1. Procesamiento del motivo C-terminal -CAAX en GTPasas.....	23
Figura 3.2. Dinámica de palmitoilación de proteínas.....	25
Figura 3.3. Las palmitoil transferasas son proteínas transmembranales.....	26
Figura 3.4. Tráfico intracelular de H- y N-Ras en mamíferos.....	28

Figura 3.5. En <i>S. pombe</i> Ras1 regula distintos procesos biológicos dependiendo de su estado de palmitoilación.....	29
Figura 4.1. El módulo de MAP Quinasas y la transmisión de señales.....	31
Figura 4.2. Conservación de las rutas de MAP quinasas.....	33
Figura 4.3 Ruta de MAP Quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i>	36
Figura 4.4 Ruta de MAP quinasas de integridad celular en <i>S. pombe</i>	41
Figura 4.5 Pek1 como interruptor molecular	43
Figura 4.6 Regulación antagónica de la concentración de Ca ²⁺ intracelular por parte de Pmk1 y Ppb1.....	46
Figura 4.7 Interconexión (“ <i>crosstalk</i> ”) entre las rutas de respuesta a estrés y de integridad celular en <i>S. pombe</i>	49

INTRODUCCIÓN

1. CARACTERÍSTICAS GENERALES DE *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Figura 1.1) fue aislada por primera vez por Linder en 1983 a partir de cerveza de mijo elaborada en ciertas regiones de África. Su nombre genérico hace referencia por un lado a su condición de levadura (*-Saccharomyces*), y por otro a su mecanismo de división por fisión (*Schizo-*). En cuanto al epíteto, indica el nombre local de la cerveza elaborada con esta levadura. Sin embargo, la mayoría de las estirpes silvestres y mutantes de *S. pombe* que se utilizan en los laboratorios proceden de un aislamiento realizado en Europa por A. Osterwalder en 1921 a partir de mosto. En los años 40 Urs Leupold caracterizó genéticamente a *S.pombe*, y en 1950 Murdoch Mitchison reconoció su potencial único para los estudios de crecimiento y división celular debido a su peculiar morfología y forma de división. Posteriormente, en los años 70, Paul Nurse combinó con éxito los estudios de Mitchison con la aproximación genética de Leupold, dando lugar a un incremento exponencial en el empleo de esta levadura como modelo experimental.

S. pombe es un eucariota unicelular que forma colonias de células libres inmóviles. Durante el crecimiento vegetativo su morfología es cilíndrica, con un tamaño de 12-15 μm de longitud y un diámetro de 3-4 μm (Figura 1.1).

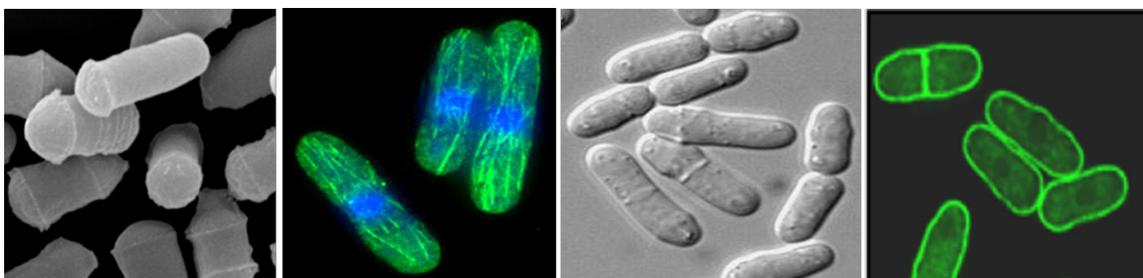


Figura 1.1 Imágenes de la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* mediante diversas técnicas microscópicas.

Taxonómicamente, *S. pombe*, al igual que *Saccharomyces cerevisiae*, pertenece al grupo de los ascomicetos (Tabla 1.1). Sin embargo, el análisis de sus genomas ha puesto de manifiesto que ambas levaduras se separaron evolutivamente hace 1000-1200 millones de años (Sipiczki, 2000, Heckman *et al.*, 2001, James *et al.*, 2006), coincidiendo aproximadamente con la separación de los hongos de plantas y metazoos. De hecho, la divergencia observada entre algunos genes homólogos de *S. pombe* y *S. cerevisiae* es tan grande como la que presentan con sus respectivos homólogos en humanos.

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de *Schizosaccharomyces pombe*.

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

El genoma de *S. pombe* está totalmente secuenciado (3 cromosomas, ~14 Mb, Wood *et al.*, 2002), y su ciclo biológico es rápido y principalmente haploide, lo que facilita su manipulación genética y lo hace especialmente apropiado como organismo modelo en biología celular. Al tratarse de un eucariota simple, posee un alto grado de similitud con células de organismos superiores en lo que se refiere a procesos biológicos tales como la organización del citoesqueleto, la compartimentalización celular, o el procesamiento de ARN, entre otros. Además, su mecanismo de división por bipartición la convierte en idónea para el estudio del ciclo celular, ya que, atendiendo a su morfología, es relativamente sencillo identificar la fase del ciclo en que se encuentra. Por otro lado, sus proteínas se encuentran fuertemente conservadas evolutivamente en relación a organismos superiores, siendo un organismo enormemente atractivo para el estudio de rutas de señalización y transducción de señales. Finalmente, al tratarse de un hongo, posee una pared celular rígida que lo protege mecánicamente y mantiene la forma y la estabilidad osmótica. Esta característica permite su empleo como modelo para el estudio de los procesos implicados en la formación, biosíntesis y degradación de este componente celular, y en la identificación y cribado de fármacos antifúngicos.

1.1 Ciclo de vida de *S. pombe*

En condiciones favorables de crecimiento, *S. pombe* es haploide y se divide asexualmente por mitosis (ciclo mitótico; Figura 1.2). Sin embargo, cuando las condiciones externas empeoran y las células detectan la falta de nutrientes, *S. pombe* puede entrar en un estado de latencia (fase estacionaria), o bien iniciar el ciclo sexual por conjugación entre tipos sexuales

opuestos, denominados h^+ y h^- (cepas heterotálicas). Por otro lado, existen cepas homotálicas (h^{90}) capaces de conjugarse entre sí, ya que en condiciones adversas algunas células pueden variar el tipo sexual.

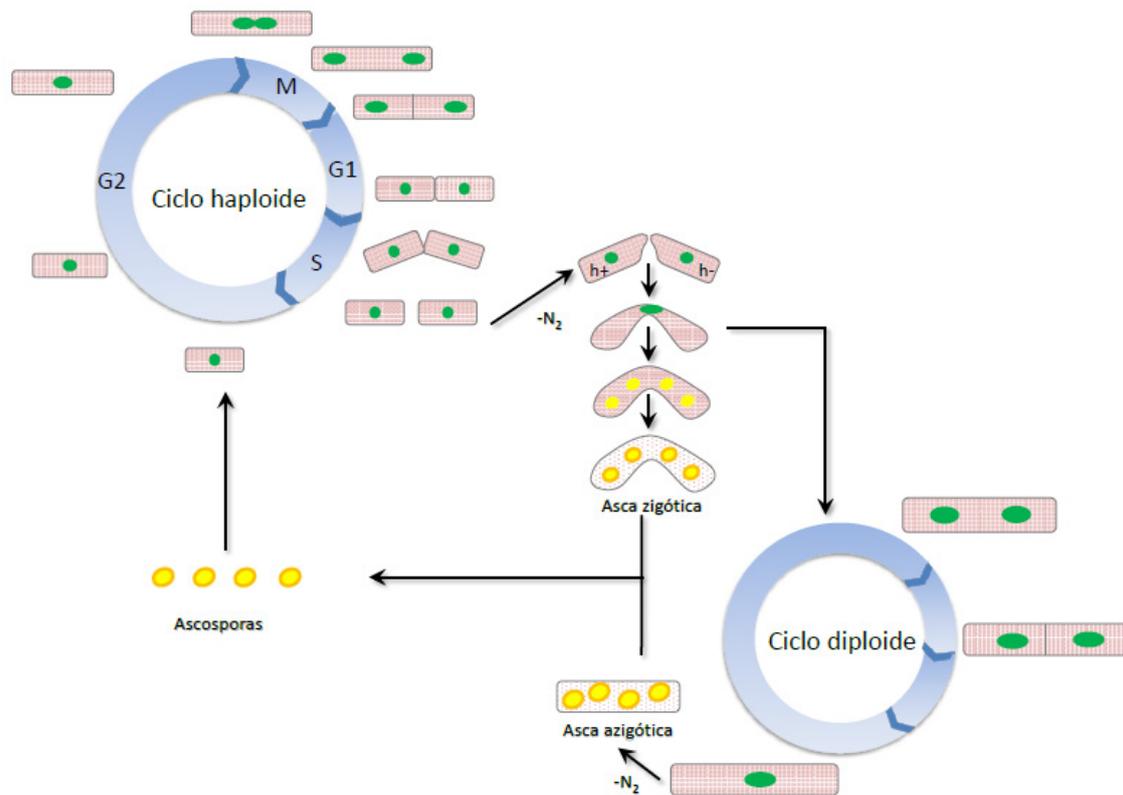


Figura 1.2 Ciclo de vida de *S. pombe*.

En medios de cultivo ricos en glucosa el ciclo vegetativo de una cepa haploide de *S. pombe* tiene una duración aproximada de entre 2 y 4 horas. Cuando las células detectan la limitación de nutrientes, y en especial en ausencia de nitrógeno, se induce el ciclo sexual (Figura 1.2). Las células bloquean su ciclo celular en la fase G1, y cuando en la población existen ambos tipos sexuales (h^+ y h^-), comienza el proceso de conjugación. Dos células de sexo opuesto se reconocen mediante feromonas y a continuación se produce la elongación de las células hacia la fuente emisora de feromonas del sexo contrario (“*shmooing*”). Las dos células se fusionan dando lugar a un cigoto diploide que inicia un proceso de meiosis que concluye con la formación de un asca con cuatro esporas haploides (Figura 1.2). Finalmente las paredes del asca se autolisan, liberando los cuatro productos meióticos que pueden sobrevivir durante largos periodos de tiempo en condiciones abióticas (Leupold, 1950). Cuando las condiciones ambientales lo permiten, las esporas germinan y entran nuevamente en el ciclo mitótico (Yamamoto *et al.*, 1997) (Figura 1.2).

Alternativamente, el cigoto puede mantenerse en un ciclo vegetativo diploide si las condiciones nutricionales mejoran en el momento de su formación. Sin embargo los cigotos son bastante inestables, y si las condiciones siguen siendo desfavorables inician la meiosis sin necesidad de conjugarse, originando ascas azigóticas constituidas por cuatro ascosporas haploides (Figura 1.2).

Dado que se trata de un organismo eucariota, el ciclo mitótico de *Schizosaccharomyces pombe* está dividido en cuatro fases: G1, S, G2 y M (Mitchison, 1970; Figura 1.2). La fase G1 o "Gap 1" tiene lugar entre la mitosis y la replicación de los cromosomas, y se caracteriza por la síntesis de ARN y proteínas necesarias para la duplicación del ADN. Es en esta fase en la que, en caso de limitación de nutrientes, las células inician el ciclo sexual. A continuación tiene lugar la fase S, en la que se produce la replicación del DNA. En *S. pombe*, la duración de la fase G1 es relativamente corta, pues tras la división las células hijas ya poseen un tamaño suficiente para iniciar la duplicación del material genético (MacNeill y Fantes, 1997) (Figura 1.2).

La fase G2 es un periodo muy largo que en *S. pombe* llega a ocupar el 70% del ciclo celular, produciéndose el incremento de la masa y/o volumen celular. Cuando se alcanza un tamaño crítico, comienza la mitosis (fase M), produciéndose la condensación de los cromosomas, la formación del huso mitótico, y la segregación de las cromátidas hermanas hacia ambos polos celulares (Hagan y Hyams, 1988) (Figura 1.2). Tras la mitosis se produce la división celular (citocinesis) mediante la formación de un septo de división en el centro de la célula. El septo primario, rico en β -glucano, comienza a crecer desde la superficie interna de la pared celular hasta dividir el citoplasma en dos partes iguales. A continuación, cada célula hija contribuye a la formación de un septo secundario a ambos lados del primario. La formación del septo maduro, compuesto por tres capas (primario y dos secundarios), finaliza durante la fase G1. La separación celular comienza con la degradación de la pared celular que limita el septo, y que progresa hacia el interior del septo primario, liberándose así las dos células hijas al comienzo de la fase S. Las fases M, G1 y S se suceden normalmente antes de la separación física de las dos células hijas, por lo que cuando esto ocurre ya se encuentran en fase G2 temprana (MacNeill y Fantes, 1997) (Figura 1.2).

Tras la división celular, el crecimiento de las células hijas se produce de forma monopolar por el polo existente en el ciclo celular anterior (polo "viejo"). Una vez alcanzan una masa crítica determinada, se inicia el crecimiento simultáneo por el polo "nuevo" originado a partir de la división de la célula madre en dos células hijas. Esta activación del crecimiento bipolar conocida como NETO, ("New End Take Off") se inicia en la fase G2 o "Gap 2". La transición

entre las distintas etapas del ciclo celular es un proceso altamente regulado en el que las proteínas participantes se sintetizan y/o activan de forma periódica.

2. LAS GTPasas DE LA FAMILIA RHO

2.1 Características generales

Las GTPasas de la familia Rho son un subgrupo de proteínas pertenecientes a la superfamilia de proteínas G pequeñas (también conocidas como superfamilia Ras) que están presentes en todas las células eucariotas y presentan un alto grado de conservación. Se trata de moléculas monoméricas con una masa molecular que varía entre 20 y 40 KDa, siendo similares bioquímica y funcionalmente a la subunidad α de las proteína G heterotriméricas (Hughes, 1983; Wenneberg *et al.*, 2005). Las GTPasas Rho regulan multitud de procesos celulares como la organización del citoesqueleto, la citocinesis, el tráfico de vesículas, la expresión génica, o el transporte núcleo-citoplasma (Bustelo *et al.*, 2007; Jaffe y Hall, 2005). Intervienen por tanto en procesos fisiológicos fundamentales como la embriogénesis, el mantenimiento de polaridad celular, y la adhesión, migración, o diferenciación celular. Dada su relevancia funcional las GTPasas Rho están relacionadas directa o indirectamente con distintas patologías, existiendo un amplio campo de investigación en torno a ellas (Williams y Rottner, 2010).

La superfamilia Ras está formada por cinco subfamilias (Tabla 2.1): **Ras** ("*Rat Sarcoma*"), implicada esencialmente en proliferación celular; **Rho** ("*Ras homologous*"), reguladoras de los procesos anteriormente mencionados; **Rab** ("*Ras-like proteins in brain*"), implicadas en transporte vesicular y tráfico de proteínas; **Ran** ("*Ras-like nuclear proteins*"), que participan en el intercambio de ARN y proteínas entre citoplasma y núcleo; y **Arf** ("*ADP ribosylation factor*"), implicadas también en transporte intracelular de vesículas. A su vez la subfamilia de GTPasas Rho está formada por unos 20 miembros, siendo los más estudiados en mamíferos RhoA, Rac1, y Cdc42. **RhoA** está implicada en la formación de fibras de estrés y ensamblaje de focos de adhesión. **Rac1** participa en la formación de lamelipodios y plegamientos de membrana, mientras que **Cdc42** promueve la formación de parches de actina y filopodios (Wenneberg *et al.*, 2005). Los tres miembros de la subfamilia Rho participan por tanto en rutas de transducción de señales que modulan el ensamblaje de diferentes estructuras mediante filamentos de actina. Adicionalmente, regulan otros procesos como polaridad, transcripción, ciclo celular, dinámica de microtúbulos, o transporte vesicular (Etienne-Manneville y Hall,

2002). Dada la amplia variedad y relevancia de procesos en que participan, la actividad de las Rho GTPasas se encuentra regulada de manera muy precisa a nivel espacio temporal (Wenneberg *et al.*, 2005), como veremos más adelante.

Tabla 2.1 Clasificación funcional de la superfamilia de GTPasas Ras.

Subfamilia	Funciones Principales	Miembros representativos
Ras	Control de la expresión, proliferación celular, diferenciación, supervivencia	Ras, Rab, R-Ras, Ral, Rheb
Rho	Reorganización del citoesqueleto, progresión del ciclo celular, expresión génica	Rac, Rho, Cdc42
Rab	Tráfico vesicular, vías endocíticas y secretorias	Rab1, Rab6
Ran	Transporte nucleoplasmático de ARN y proteínas	Ran
Arf	Regulación de tráfico vesicular	Arf1, Arf6

Desde el punto de vista bioquímico, los miembros de la superfamilia Ras tienen la capacidad de unir nucleótidos Guanina (GTP o GDP), y además poseen actividad GTPasa intrínseca que permite la hidrólisis del GTP al que se encuentran unidas, dando lugar a GDP y fosfato inorgánico (Figura 2.1)

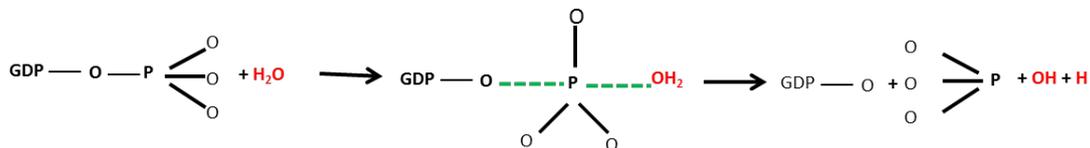


Figura 2.1 Hidrólisis de GTP por GTPasas de la superfamilia RAS.

Además, estas proteínas contienen dos regiones “Switch” (Switch I y Switch II) y una región “P-loop”. Ambas regiones interactúan con grupos fosfato, y requieren la presencia del ión magnesio (Mg^{2+}), permitiendo una unión de alta afinidad entre la GTPasa y el nucleótido de guanina (Vetter y Wittinghofer, 2001) (Figura 2.2). Sin embargo, a pesar de su elevada afinidad por GDP y GTP, las GTPasas Rho son funcionalmente activas sólo cuando están unidas a GTP, exponiendo entonces su región de interacción con las proteínas diana.

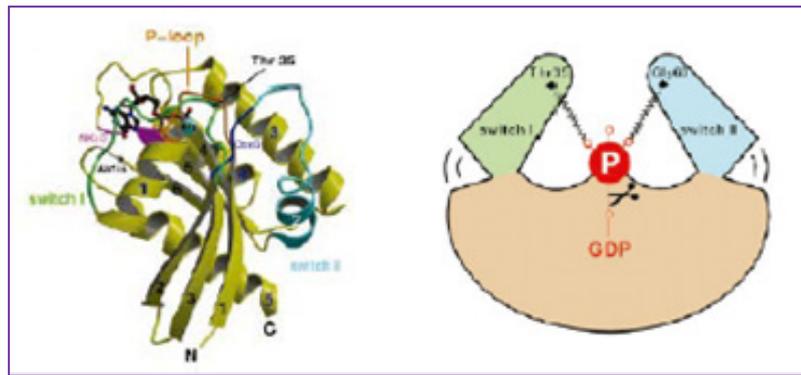


Figura 2.2 Estructura de las proteínas de la superfamilia Ras (tomado de Vetter y Wittinghofer, 2001).

En resumen, y de manera similar al resto de miembros de la superfamilia Ras, las proteínas Rho alternan dos estados conformacionales: uno activo cuando se encuentran unidas a GTP, y otro inactivo en el que la unión es a GDP. Por tanto actúan como interruptores moleculares, de forma que en su estado activo (unido a GTP), reconocen sus proteínas diana y generan una respuesta que termina cuando el GTP es hidrolizado y Rho es apagado (unido a GDP) (Etienne-Manneville y Hall 2002) (Figura 2.3).

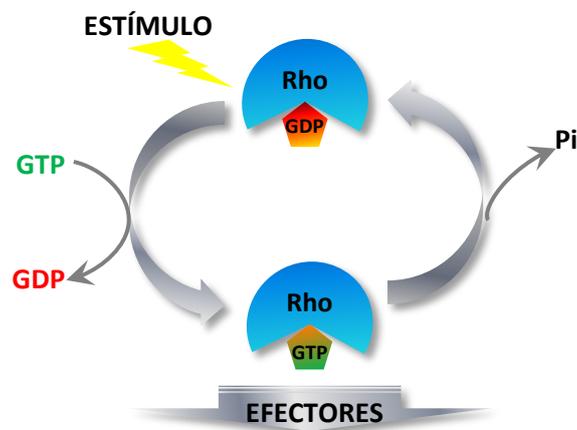


Figura 2.3 Ciclo de activación/desactivación de GTPasas Rho.

Hasta ahora se han descrito más de setenta moléculas efectoras potenciales para los miembros de la familia de proteínas Rho más estudiados (RhoA, Rac1 y Cdc42). Entre ellas se encuentran quinasas, lipasas, oxidasas, y proteínas adaptadoras (Jaffe y Hall, 2005). Frecuentemente las GTPasas actúan como activadores aguas arriba en rutas de señalización reguladas por módulos de MAP quinasas, que a su vez activan/desactivan a distintos factores de transcripción (Banuett, 1998; Vojtek y Cooper, 1995).

2.2 Regulación

La simplicidad del mecanismo de acción de las GTPasas Rho contrasta con la complejidad de las rutas que regulan. Curiosamente, pese a tener una alta afinidad por GTP o GDP, su actividad GTPasa intrínseca no es elevada, por lo que el intercambio entre GTP y GDP es poco eficiente (Arellano *et al.*, 1999). Por esta razón la unión de las GTPasas Rho a GTP/GDP se encuentra regulada por un numeroso grupo de proteínas (Wenneberg, 2005). La identificación y caracterización de dichos reguladores ha sido crucial para entender el funcionamiento de las GTPasas (Arellano *et al.*, 1999).

La actividad de las Rho GTPasas es regulada por tres tipos de proteínas fundamentales (Figura 2.4):

- GEFs (“*Guanine nucleotide exchange factors*”)
- GAPs (“*GTPase activating proteins*”)
- GDIs (“*GDP Dissociation inhibitor*”)

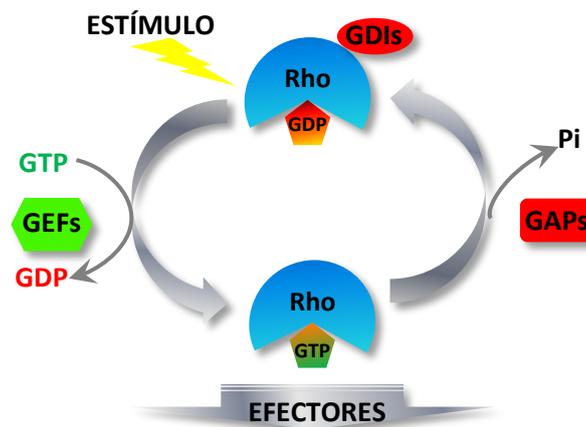


Figura 2.4 Reguladores del estado de activación de las GTPasas Rho.

2.2.1 GEFs (*Guanine nucleotide exchange factors*)

Controlan la transición de GDP a GTP ya que al interactuar con la GTPasa unida a GDP modifican el sitio de unión al nucleótido, facilitando así la disociación del GDP y su sustitución por GTP (Vetter y Wittinghofer, 2001). Como consecuencia de la interacción del GEF con la GTPasa se producen una serie de cambios conformacionales que bloquean el sitio de unión a Mg^{2+} , debilitándose la unión a los fosfatos y facilitando la liberación del nucleótido. Dado que la concentración de GDP en la célula es 10 veces menor que la de GTP, este nucleótido es el primero en unirse a la GTPasa tras la disociación del GDP.

2.2.2 GAPs (*GTPase activating proteins*)

La actividad GTPasa intrínseca de las proteínas Rho permite la hidrólisis de GTP a GDP, lo que favorece un cambio conformacional que inactiva la proteína. Sin embargo dicho proceso es muy poco eficiente en las GTPasas Rho, por lo que necesitan una proteína GAP que acelere la reacción. Las proteínas GAP son activadoras de la actividad GTPasa que permite la correcta hidrólisis de GTP a GDP, favoreciendo el mantenimiento del estado inactivo de la proteína.

El número de RhoGEFs y RhoGAPs es claramente superior al número de proteínas Rho, y una misma proteína Rho puede ser regulada por más de un GEF o GAP. Por el contrario, un mismo GEF o GAP puede regular a más de una proteína Rho. La existencia de esta "relación funcional promiscua" sugiere que la actividad de proteínas Rho es modulada por distintos GEFs o GAPs dependiendo del contexto biológico (Pérez y Rincón, 2010). Por otro lado, las GEFs y GAPs son proteínas multidominio capaces de unirse a otras proteínas y a distintas membranas biológicas. Ello no solo les permite modificar el estado de activación de las GTPasas, sino también actuar como proteínas adaptadoras, favoreciendo la localización adecuada de la GTPasa para ejercer su función señalizadora (Pérez y Rincón, 2010).

2.2.3 GDIs (*GDP Dissociation inhibitor*)

Actúan regulando negativamente a las proteínas Rho a tres niveles:

- Inhibiendo la disociación de GDP, manteniendo así a la GTPasa en forma inactiva.
- Interaccionando con la GTPasa unida a GTP, bloqueando así la hidrólisis del nucleótido e impidiendo que la GTPasa activa se ponga en contacto con sus efectores.
- Extrayendo la GTPasa de la membrana mediante el enmascaramiento de su grupo prenilo, impidiendo así su unión a GEFs.

Durante mucho tiempo las proteínas GEFs, GAPs y GDIs han sido consideradas como los principales reguladores de las proteínas Rho. Sin embargo, evidencias recientes han demostrado que su actividad puede ser regulada mediante mecanismos adicionales (Boulter *et al.*, 2012; *ver más adelante*).

2.3 GTPasas Rho en *S. pombe*

El genoma de *S. pombe* presenta seis genes que codifican proteínas Rho: Rho1, Rho2, Rho3, Rho4, Rho5 y Cdc42. **Rho1** y **Rho2**, que serán descritas con detalle a continuación, están implicadas en el control de la morfogénesis y en el mantenimiento de la polaridad e integridad celulares (Pérez y Cansado, 2010). **Rho3** participa en la separación de las dos células hijas al final de la citocinesis mediante la regulación del complejo del exocisto (Wang *et al.*, 2003), además de ser un posible regulador de la integridad celular (Ma *et al.*, 2006). **Rho4** está implicada en el control de la citocinesis mediante la regulación de las glucanasas Eng1 y Agn1 (Santos *et al.*, 2005). **Rho5** parece tener un papel en el control en la fase estacionaria de crecimiento y en la formación de ascosporas (Rincón *et al.*, 2006). Además puede sustituir funcionalmente a Rho1 en el mantenimiento de la integridad celular y organización del citoesqueleto de actina, aunque no es tan efectivo como éste. **Cdc42** es esencial y regula la progresión y crecimiento celulares, la reorganización del citoesqueleto de actina, y la polaridad y señalización celulares (Miller y Johnson, 1994) (*ver apartado 2.5*).

2.3.1 Rho1

El gen *rho1*⁺ se aisló por primera vez a partir de una genoteca de ADNc de *S.pombe* utilizando como sonda RhoA humano (Nakano y Mabuchi, 1995). Rho1 presenta un 73% de identidad a nivel de su secuencia de aminoácidos con Rho1 de *S.cerevisiae* y un 67% con RhoA humano (Nakano y Mabuchi, 1995).

La GTPasa Rho1 es esencial y participa en la regulación de la biosíntesis de pared celular y el citoesqueleto de actina (Arellano *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1997). Su localización subcelular depende de la fase del ciclo celular, y está definida en los sitios de crecimiento activo y en el septo durante la separación celular (Arellano *et al.*, 1996; Nakano *et al.*, 1997). La sobreexpresión de Rho1 provoca que las células presenten una pared celular engrosada y que aparezcan encadenadas, lo que sugiere una función reguladora de la citocinesis (Arellano *et al.*, 1999b; Arellano *et al.*, 1997). De hecho, recientemente se ha demostrado que la paxilina (Pxl1), una proteína implicada en formación y contracción del anillo de actomiosina, también modula la actividad de Rho1 durante la citocinesis (Pinar *et al.*, 2008).

La delección de Rho1 es letal, provocando una disminución acusada de la actividad de la β (1,3)-glucán sintasa y lisis celular que no son suprimidas mediante estabilización osmótica (Arellano *et al.*, 1997). Ello sugiere que el defecto en biosíntesis de pared celular no es la única

causa de la muerte celular en los mutantes carentes de dicha GTPasa (Viana *et al.*, 2013). Rho1 también participa en la regulación de la morfogénesis modulando directa o indirectamente el citoesqueleto de actina. Así, la sobreexpresión de un alelo constitutivamente activo de Rho1 (Rho1 G15V) produce una pérdida completa de la polaridad y la aparición de acúmulos de actina, mientras que su ausencia provoca la desorganización de los polímeros de actina (Arellano *et al.*, 1997). Como se explicará con mayor detalle en el apartado 4.4.2.1, Rho1 ha sido propuesto como posible miembro de la ruta de MAP quinasas de integridad celular (García *et al.*, 2009a).

La activación de Rho1 es llevada a cabo por tres GEFs distintos (Figura 2.5):

- Rgf1, que activa a Rho1 durante la fase NETO del crecimiento polarizado y durante la biosíntesis de pared celular (García *et al.*, 2006a; García *et al.*, 2009a).
- Rgf2, cuya función es esencial durante la esporulación, además de ejercer un papel accesorio junto con Rgf1 en el control del crecimiento polarizado (García *et al.*, 2009b).
- Rgf3, que regula a Rho1 durante la citocinesis (Tajadura *et al.*, 2004; Morrell-Falvey *et al.*, 2005; Mutoh *et al.*, 2005; García *et al.*, 2006a).

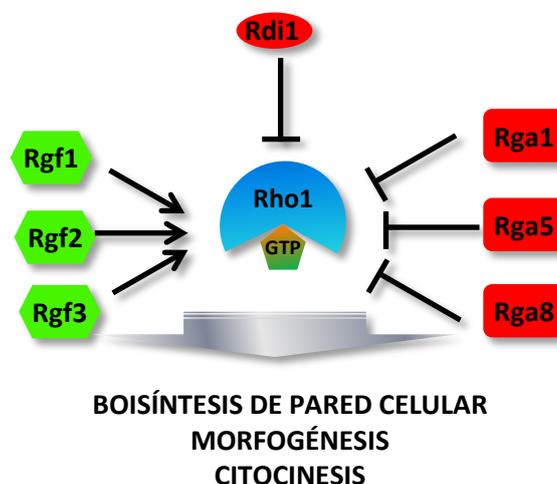


Figura 2.5 Reguladores específicos de la GTPasa Rho1.

Rho1 es regulado negativamente al menos por tres GAPs (Figura 2.5):

- Rga1, principal regulador negativo de Rho1, cuya ausencia da lugar a células con paredes celulares muy finas y graves defectos morfogénéticos (Nakano *et al.*, 2001).

- Rga5, que participa en la regulación de la integridad celular y citocinesis (Calonge *et al.*, 2003).
- Rga8, cuya actividad es modulada por Shk1, es una proteína efectora de Cdc42, por lo que esta GAP podría balancear la interacción funcional entre ambas GTPasas (Yang *et al.*, 2003).

Rdi1, la única GDI presente en el proteoma de *S. pombe*, también regula negativamente la actividad de Rho1, además de a Rho4 y Cdc42 (Figura 2.5) (Nakano *et al.*, 2001).

2.3.2 Rho2

El gen *rho2*⁺, al igual que *rho1*⁺, se identificó tras una búsqueda de genes cuya sobreexpresión causa aberraciones morfológicas (Hirata *et al.*, 1998). Rho2 es una proteína asociada a membrana que se localiza en sitios de crecimiento activo y en el septo (Hirata *et al.*, 1998), y participa en control de la polaridad celular, la reorganización del citoesqueleto de actina, y la biosíntesis de pared celular (Pérez y Cansado, 2010). Su sobreexpresión es letal, causando alteraciones morfológicas, despolarización de la actina y un aumento de la síntesis del α -glucano (Calonge *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 1998). En cambio la delección de Rho2 no es letal, aunque provoca una morfología celular redondeada y una mayor sensibilidad al tratamiento con glucanasas (Hirata *et al.*, 1998). Ambos fenotipos son rescatados parcialmente por Rho1, lo que sugiere un cierto grado de solapamiento funcional entre ambas GTPasas.

Hasta el momento no se han identificado GEFs de Rho2 y solamente hay descritos 3 GAPs que modulan negativamente su actividad (Figura 2.6):

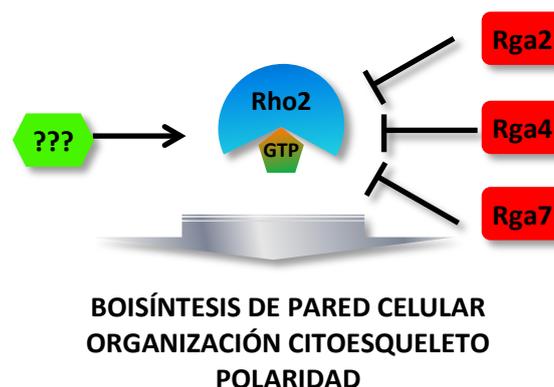


Figura 2.6 Reguladores específicos de la GTPasa Rho2.

- Rga2, cuya delección produce un aumento del α -glucano celular, participa en el control de la morfología celular e interviene en la interacción Rho2-Pck2, por lo que regula la ruta de integridad celular (Villar-Tajadura *et al.*, 2008).
- Rga4, que también es GAP DE Cdc42, controla el diámetro y la simetría celular. Modula negativamente la ruta de integridad celular debido a su actividad como GAP de Rho2, pero de forma independiente a Cdc42 (Soto *et al.*, 2010).
- Por último, Rga7 es GAP de Rho2, regulando negativamente la actividad de la ruta de integridad celular (Soto *et al.*, 2010).

2.4 GTPasas Rho y biosíntesis de pared celular en *S. pombe*

La pared celular es una estructura externa a la membrana plasmática que posee una elevada resistencia mecánica y elasticidad y está presente en plantas, hongos y bacterias. Sus funciones principales son la estabilización de las condiciones osmóticas, la protección frente a estreses físicos y químicos, la regulación del tamaño y forma celular, y actuar como sitio de anclaje de algunas proteínas (Klis *et al.*, 2006).

2.4.1 Composición de la pared celular

La pared celular de *S. pombe* está compuesta por α (1,3)-glucano (18-28%), β -glucano (46-54%) y galactomanano (9-14%) (Ishiguro, 1998). La capa externa es rica en galactomanano, mientras que la capa más interna contiene β (1,3), β (1,6) y α (1,3)-glucano (Pérez y Ribas, 2004) (Figura 2.7). Los dos tipos principales de β -glucano son el β (1,3) β (1,6)-glucano (el más abundante), y el β (1,6) β (1,3)-glucano, que sólo representa el 2% total de la pared celular (Manner y Meyers, 1977). El α -glucano es un componente fundamental en la pared de *S. pombe* que no se encuentra en la pared celular de *S. cerevisiae*. Es un polímero esencial para el mantenimiento de la forma celular y en el control de la polaridad (Katayama *et al.*, 1999).

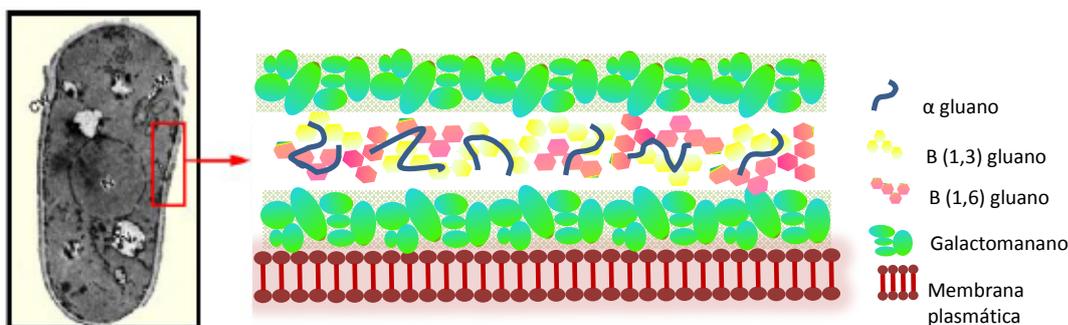


Figura 2.7 Ultraestructura y organización de la pared celular de *S. pombe*.

La quitina, un componente estructural importante en la pared de *S.cerevisiae*, no ha sido detectada en *S. pombe*. No obstante, esta levadura posee un gen homólogo a la quitina sintasa (*chs1⁺*) que se ha implicado en la formación de quitosán durante la maduración de la pared de las ascosporas (Arellano *et al.*, 2000).

2.4.2 Síntesis del α y β -glucano

En *S. pombe* el $\beta(1,3)$ -glucano es sintetizado por la enzima $\beta(1,3)$ -glucán sintasa (GS), que consta de al menos una subunidad reguladora, Rho1, y una o varias subunidad/es catalítica/s codificadas por los genes: *bgs1⁺* (*cps1⁺*), *bgs2⁺*, *bgs3⁺* y *bgs4⁺* (Arellano *et al.*, 1996; Ribas *et al.*, 1991). En *S. cerevisiae* la subunidad catalítica de este complejo enzimático está codificada por los genes *FKS1* (Douglas *et al.*, 1994; Mazur *et al.*, 1995) y *FKS2* (Mazur *et al.*, 1995), que presentan una elevada homología con *bgs1⁺*. Bsg1 es una proteína integral de membrana muy estable a lo largo del ciclo celular. Se localiza en el sitio de formación del septo y en los polos celulares (Cortés *et al.*, 2002). El gen *bgs2⁺* codifica una proteína esencial para la esporulación (Martín *et al.*, 2000). *bgs3⁺* participa en el crecimiento vegetativo y en la germinación de esporas, y *bgs4⁺* regula el crecimiento de la pared celular y es necesario para compensar el exceso de degradación de la misma durante el proceso de citocinesis (Cortés *et al.*, 2002).

Se han identificado cinco genes en *S. pombe* que conforman la familia $\alpha(1,3)$ -glucan sintasa denominados *mok1⁺*, *mok11⁺*, *mok12⁺*, *mok13⁺* y *mok14⁺*. Los cuatro últimos son inducidos transcripcionalmente durante los procesos de meiosis y esporulación (Mata *et al.*, 2002; García *et al.*, 2006b). *mok1⁺/ags1⁺* cifra una $\alpha(1,3)$ -glucán sintasa esencial en *S. pombe* (Hochstenbach *et al.*, 1998; Katayama *et al.*, 1999). Mok1 localiza en los sitios de crecimiento activo de las células, los polos celulares y el septo, y es regulado por la proteína quinasa Pck2 (Katayama *et al.*, 1999), cuya presencia es necesaria para su correcta localización (Calonge *et al.*, 2000).

La función de Rho1 durante la biosíntesis de pared celular tiene lugar a través de su interacción con al menos tres elementos: la enzima $\beta(1,3)$ -glucán sintasa, responsable de la síntesis del β -glucano (Arellano *et al.*, 1996), y las quinasas ortólogas a PKC, Pck1 y Pck2, que también regulan la síntesis de pared celular (Arellano *et al.*, 1999; Sayers *et al.*, 2000). Por tanto, Rho1 controla la biosíntesis del β -glucano de manera dual, bien directamente o indirectamente mediante Pck1 y Pck2 (Arellano *et al.*, 1999; Calonge *et al.*, 2000; Sayers *et al.*, 2000) (Figura 2.8).

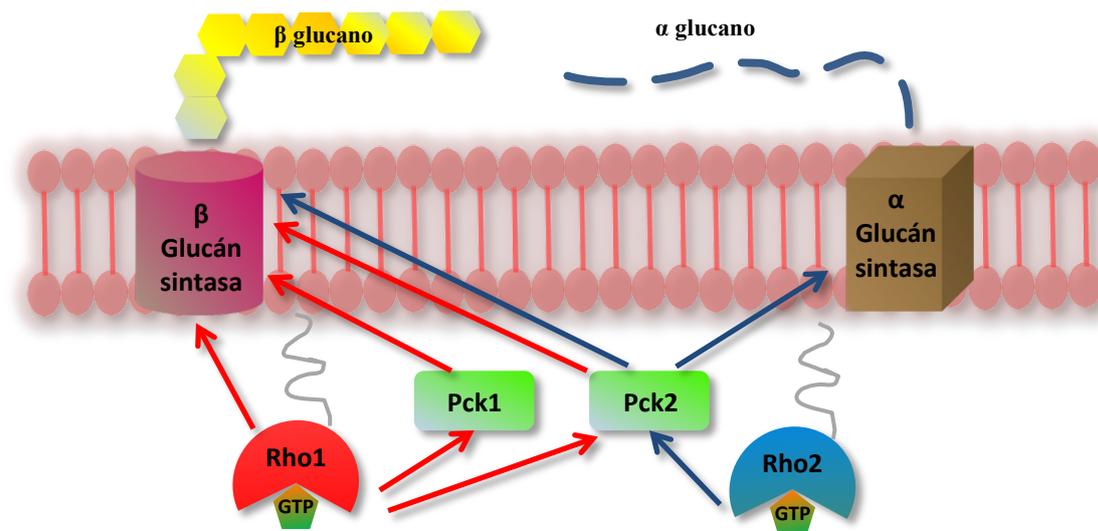


Figura 2.8 Papel de Rho1 y Rho2 durante la biosíntesis del α y β -glucano de la pared celular en *S. pombe*.

La GTPasa Rho2 estimula la biosíntesis de α -glucano regulando positivamente a Mok1 (Calonge *et al.*, 2000) (Figura 2.8). Aunque la forma activa de Rho2 interacciona con Pck1 y Pck2 (Arellano *et al.*, 1999a), su actividad reguladora sobre la α -glucán sintasa se produce exclusivamente a través de Pck2 (Katayama *et al.*, 1999; Calonge *et al.*, 2000) (Figura 2.8).

2.5 GTPasas Rho y polaridad celular

La selección de los sitios específicos donde se activa el crecimiento de forma coordinada con la progresión del ciclo celular es regulada por señales enormemente específicas (Chang y Peter, 2003). El crecimiento polarizado puede dividirse en 3 pasos claves:

- 1) Marcaje del sitio donde se iniciará el crecimiento en respuesta a señales intracelulares.
- 2) Reconocimiento del sitio de polarización y señalización hacia el citoesqueleto para permitir su organización asimétrica.
- 3) Distribución asimétrica de los componentes celulares y secreción polarizada.

Las GTPasas Rho son activadas específicamente en las proximidades de las proteínas que establecen el lugar donde se iniciará el crecimiento polarizado.

S. cerevisiae se divide mediante la formación de una sola yema que crece apicalmente hasta alcanzar una forma redonda. Tras la mitosis, cuando el núcleo se ha dividido, se forma un septo que separa la célula madre de la hija, siendo posteriormente degradado para liberar ambas células. En esta levadura, la acumulación y activación de Cdc42 en el sitio de crecimiento de la yema es esencial para el establecimiento del crecimiento polarizado. La

activación del GEF de Cdc42 Bem1 por parte de Bud1/Rsr1 (ortólogo de Ras1) permite el desarrollo del crecimiento polarizado (Figura 2.9).

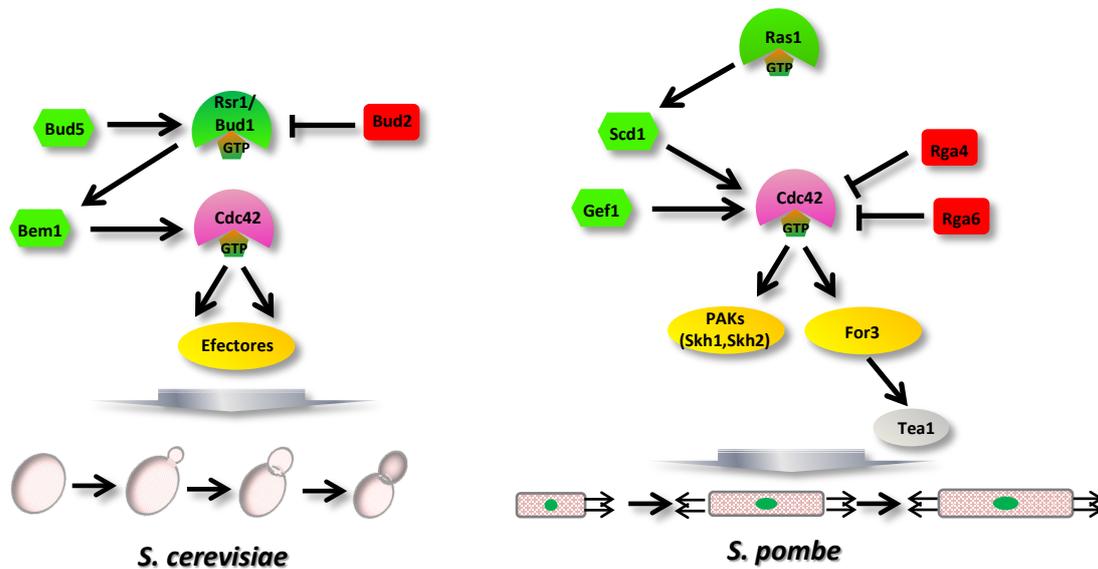


Figura 2.9 Regulación del establecimiento del crecimiento polarizado en *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

En *S. pombe*, a diferencia de lo que ocurre en *S. cerevisiae*, es el citoesqueleto de microtúbulos el que determina el sitio de crecimiento polarizado. Tea1 fue la primera proteína responsable de la selección del sitio de crecimiento polarizado descubierta en esta levadura (Mata y Nurse, 1997). Tea1 interacciona con la formina For3, que a su vez debe ser activada por Cdc42, para permitir el ensamblaje de los cables de actina y su crecimiento polarizado durante la interfase (Martin *et al.*, 2007). Además, recientemente se ha demostrado la implicación de la subunidad Sec3 del exocisto en la organización de los cables y parches de actina (Jourdain *et al.*, 2012). En *S. pombe* *cdc42⁺* es un gen esencial que participa en el control del crecimiento, la reorganización del citoesqueleto de actina, la polaridad, y la señalización celulares (Miller y Johnson, 1994). El papel Cdc42 como regulador de rutas de MAP quinasas está bien establecido (Johnson, 1999), siendo esencial en la respuesta celular frente a feromonas tanto en *S. cerevisiae* como en *S. pombe*. Cdc42 se localiza en los polos de crecimiento, áreas de división y endomembranas (Merla y Johnson, 2000). Su ausencia causa un fuerte defecto en el ensamblaje de los cables de actina y en la localización de For3 (Martin *et al.*, 2007; Rincón *et al.*, 2009), dando lugar a células redondeadas que además son incapaces de conjugarse (Miller y Johnson, 1994).

En *S. pombe* se han descrito dos GEFs específicos de Cdc42, Scd1 (Chang *et al.*, 1994) y Gef1 (Hirota *et al.*, 2003; Coll *et al.*, 2003). Ambas proteínas comparten una función esencial en la activación de Cdc42, ya que la doble delección es letal. Hasta hace muy poco el único GAP conocido de Cdc42 era Rga4 (Tabete *et al.*, 2008). Sin embargo recientemente se ha descubierto un segundo GAP de Cdc42, Rga6, que colabora con Rga4 en el mantenimiento del crecimiento polarizado (S.A. Rincón, M.Estravís y P.Pérez, 2014) (Figura 2.9). Los efectores de Cdc42 en *S. pombe* son las PAKs Shk1 y Shk2. Aunque Shk1 interacciona físicamente con Mkh1, la MAPKK quinasa de la ruta de integridad celular (Merla y Johnson 2001), no parece tener ninguna función reguladora de la actividad de dicha ruta de señalización (Madrid *et al.*, 2006).

2.6 GTPasas Rho e integridad celular

El crecimiento celular en las levaduras está limitado por la existencia de la pared celular, por lo que deben seleccionar regiones donde ésta sea debilitada para permitir la incorporación de material nuevo (Cabib *et al.*, 1998). Es por tanto necesario que los procesos asociados a la biosíntesis de la pared celular y a la organización del citoesqueleto de actina se encuentren perfectamente coordinados. Las GTPasas Rho tienen un papel fundamental en dicha coordinación, de manera que mientras en *S. cerevisiae* Rho1 es la principal responsable del mantenimiento de la integridad celular, Rho1 y Rho2 cumplen esta función en *S. pombe* (Levin, 2005; Cabib *et al.*, 1998).

En *S. cerevisiae*, Rho1 se localiza en áreas de crecimiento polarizado (Qadota *et al.*, 1996), siendo activado por los GEFs Rom1, Rom2, y Tus1 (Ozaki *et al.*, 1996; Schmelzle *et al.*, 2002), y desactivada por los GAPs Bem2, Sac7, Bag7, y Lrg1 (Cid *et al.*, 1998). Una vez activado, Rho1 interacciona con distintas proteínas efectoras: Fks1 y Fks2 (componentes de la enzima β -glucán sintasa), Pck1, la formina Bni1, el factor de transcripción Skn7, y la subunidad Sec3 del exocisto (Levin, 2005). Rho1 en su estado activo estabiliza a Pck1 en las zonas de crecimiento, donde es activado por Pkh1 y Pkh2, las dos proteínas homólogas a PDK1 (quinasa 1 dependiente de fosfoinosítidos) presentes en esta levadura. Como consecuencia se desencadena la activación de la ruta de MAP quinasas de integridad celular, dando lugar a la activación del factor de transcripción Rlm1 que regula la expresión de distintos genes implicados en biosíntesis de pared celular. Entre ellos destacan *FKS1* y *FKS2*, que codifican la enzima (1,3)- β -glucán sintasa (Levin, 2005) (Figura 2.10).

En *S. pombe* Rho1 y Rho2 se localizan en los sitios de crecimiento activo (Arellano *et al.*, 1997), e interaccionan e incrementan la estabilidad de Pck1 y Pck2, los dos ortólogos a PKC presentes en esta levadura (Arellano *et al.*, 1999; Villar-Tajadura *et al.*, 2008) (Figura 2.10). Hasta el momento solamente se ha descrito que la GTPasa Rho2 regula la activación de la ruta de MAP quinasas de integridad celular por medio de Pck2 (Ma *et al.*, 2006; Barba *et al.*, 2008) (Figura 2.10).

El papel de Rho2 como activador de la ruta de integridad celular así como el funcionamiento de ésta se explicará más extensamente en el apartado 4.4.

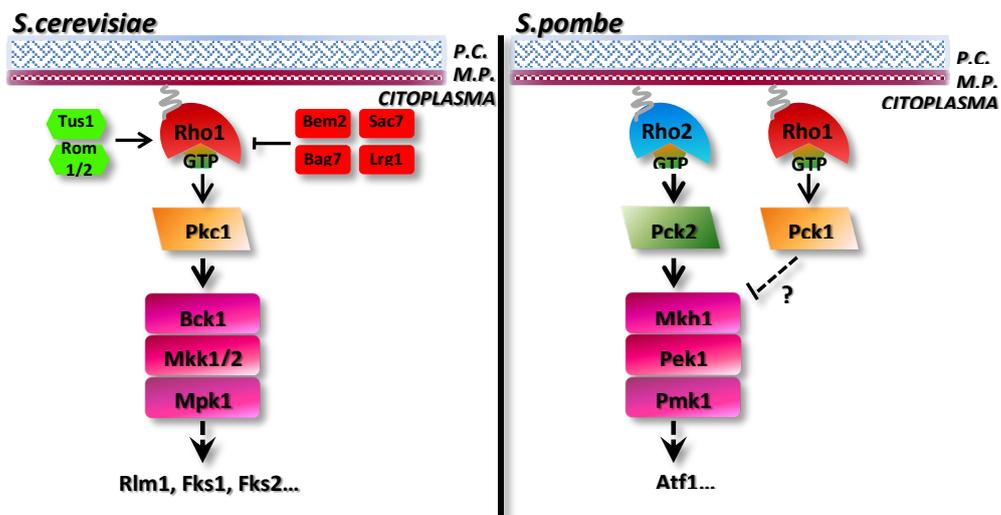


Figura 2.10 Rutas de MAP quinasas de integridad celular en *S. cerevisiae* y *S. pombe*.

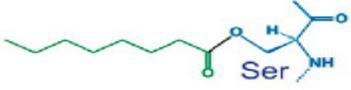
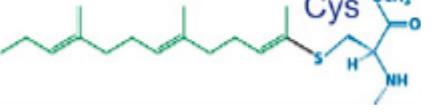
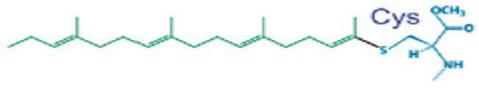
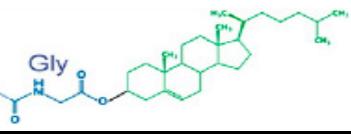
3. MODIFICACIONES POSTRADUCCIONALES DE GTPasas Rho

Las proteínas celulares se encuentran sometidas a una amplia variedad de modificaciones de carácter estático y dinámico en su secuencia aminoacídica (Salaun *et al.*, 2010). Las modificaciones postraduccionales modulan procesos tales como el plegamiento y localización proteica, su maduración y degradación (Ahearn *et al.*, 2012). Un claro ejemplo clásico de modificación postraduccional reversible de proteínas lo encontramos en la fosforilación, siendo un mecanismo ampliamente extendido de transmisión de la información en rutas de señalización intracelulares. Sin embargo, además de la fosforilación, las proteínas celulares pueden sufrir un gran número de modificaciones como isoprenilación, palmitoilación, metilación, nitrosilación, ubiquitinación, o incluso proteólisis (Ahearn *et al.*, 2012).

La primera descripción de una modificación proteica mediante la unión covalente de un lípido fue realizada por Folch y Less en los años 60. Este tipo de modificación postraduccional no solo modula la unión de proteínas a membranas celulares, sino que también media las interacciones proteína-proteína, interviene en el tráfico celular, determina su localización subcelular, y regula su estabilidad o vida media (Salaun *et al.*, 2010; Resh, 1999; Resh, 2004; Linder y Deschenes, 2004; Conibear y Davis, 2010).

Las proteínas pueden ser modificadas covalentemente en el citoplasma o en la cara citoplasmática de las membranas celulares mediante la unión de una gran variedad de lípidos, como ácido octanoico, ácido mirístico, ácido palmítico, ácido palmitoleico, ácido esteárico, grupos farnesilo o geranilgeranilo, colesterol, etc... (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Modificaciones lipídicas de proteínas en mamíferos.

Lípido	Estructura molecular*	Enzima catalizadora	Ejemplo
Ácido Octanoico		Ghrelina-O-acil transferasa	Ghrelina
Ácido Mirístico		N-miristoil transferasa	Recoverina
Ácido Palmítico		Palmitoil transferasa	RhoB
Ácido Palmitoleico		Porcupine	Wnt3a
Ácido Esteárico		-	GAP-43
Grupo farnesilo		Farnesil transferasa	H-Ras
Grupo Geranilgeranilo		Geranilgeranil transferasa I	RhoA
Colesterol			Hedgehog

*En verde se muestra el lípido unido, mientras que la parte proteica se representa en azul, mostrándose el aminoácido modificado (Adaptado de Aicart-Ramos *et al.*, 2011).

3.1 Isoprenilación

Entre las modificaciones postraduccionales que sufren las proteínas Rho y, por extensión, la mayoría de los miembros de la superfamilia Ras, se encuentra la isoprenilación de su extremo carboxilo terminal (Boulter *et al.*, 2012). Los estudios iniciales relacionados con este tipo de modificaciones pusieron de manifiesto que las proteínas Ras eran farnesiladas con el fin de asociarse a membranas lipídicas (Hancock *et al.*, 1989; Hancock *et al.*, 1991a; Hancock *et al.*, 1991b; Casey *et al.*, 1989). Dichos estudios fueron extendidos más tarde a otros miembros de la superfamilia Ras, entre los que se encuentran las proteínas Rho (Katayama *et al.*, 1991; Adamson *et al.*, 1992).

Las proteínas que forman parte de la superfamilia Ras, incluidas las GTPasas Rho, muestran un alto grado de homología entre sí en su extremo amino terminal, en el que se localizan los dominios de unión a nucleótidos de guanina y de interacción con sus proteínas efectoras. Sin embargo, la región carboxilo terminal, también conocida como región hipervariable, difiere bastante entre los miembros de la familia de proteínas Ras y Rho. En los años 80 se observó que el extremo carboxilo terminal de la proteína Ras era el responsable de su unión a membranas (Willumsen *et al.*, 1984). En efecto, esta región contiene la información necesaria para regular la localización subcelular de dicha GTPasa y, por extensión, modular su actividad. Más tarde, Clarke y colaboradores apreciaron la presencia invariable en esta familia de proteínas de una cisteína como cuarto residuo aguas arriba de su extremo C-terminal (Clarke *et al.*, 1988), lo que llevó a estos investigadores a sospechar que la modificación lipídica se producía sobre dicho aminoácido. Dicha secuencia fue denominada “caja CAAX” y, como se muestra en Tabla 3.2, se encuentra presente en la mayoría de las proteínas pertenecientes a las familias Ras y Rho.

En la caja **-CAAX**, **C** es la cisteína que será prenilada, **A** representa cualquier aminoácido alifático que generalmente no influye en la especificidad del motivo, y **X** es cualquier aminoácido, determinando su identidad el tipo de prenilación que tendrá lugar en el residuo de cisteína (Aicart-Ramos *et al.*, 2011).

Tabla 3.2 Modificaciones lipídicas de secuencias carboxilo terminales de distintas proteínas Ras y Rho de mamíferos.

Proteína	Extremo carboxilo terminal*	Localización	Tipo de isoprenilación
H-Ras	QHKLRLNPPDESGPG CMSCKCVLS	MP, AG	Farnesilación
N-Ras	QY RMKKLN SSDDGTQ CMGLPCVVM	MP, AG	Farnesilación
K-Ras4A	QY RLKKISKEE KTPG CVKIKKCIIM	MP, AG	Farnesilación
K-Ras4B	RKHKEKMSKDG KKKKKK SKTKCVIM	MP	Farnesilación
Rap2A	EIV RQMNYAAQPD KDDP CCSACNIQ	MP, AG, endosomas	Farnesilación
Rap2B	EIV RQMNYAAQ PNGDEG CCSACVIL	MP, AG, endosomas	Geranilgeranilación
Rap2C	EIV RQMNYSSLPE KQDQ CCTT CVVQ	MP, Citoplasma, endosomas	Geranilgeranilación
RhoA	EVFEMATRAALQ ARRGKKKSGCLVL	MP, Citoplasma	Geranilgeranilación
RhoB	ETAT RAALQKRY GSQNG CINCKVL	MP, AG, endosomas	Farnesilación o Geranilgeranilación
RhoC	EVFEMAT RAGLQVRKNKRRRGCPIL	MP, Citoplasma	Geranilgeranilación
Rac1/1b	VFDEAI RAVLC PPP VKKRKRKCLLL	MP, Citoplasma	Geranilgeranilación
Rac2	VFDEAI RAVLC PQPT RQQKRACSL L	MP, AG, RE, membrana nuclear	Geranilgeranilación
Rac3	VFDEAI RAVLC PPP VKKPGKKT VF	MP, endomembranas	Geranilgeranilación
RhoG	EVFAEAV RAVLNPTPIKRG SCILL	MP, endosomas, mitocondrias	Geranilgeranilación
Rnd1	LHLPS R SELIS TFKKEKAK SCSIM	MP	Farnesilación
Rnd2	QLSG RPDR GNEGEIHK DRAKSC NLM	Endosomas, Citoplasma	Farnesilación
Rnd3/RhoE	MPS R PELSAVATDL RKD AK SCTVM	MP, AG, citoplasma	Farnesilación
Cdc42	NVFDEAILAALEPP PKSRR CVLL	MP, AG, RE, membrana nuclear	Geranilgeranilación
TC10/RhoQ	AILTP KKHTVKKR IGS RCIN CCLIT	MP, endosomas	Farnesilación o Geranilgeranilación
TCL	AILTIFHP KKKKKRC SEGH SCSII	MP, endosomas	Farnesilación
RhoD	AAEVALSS RG RNFWR RRITQGF CVVT	MP, endosomas	Farnesilación
Rif/RhoF	EAA K VALSAL KKAQRQ KKRR LCLLL	MP	Geranilgeranilación
RhoH/TTF	V RTAVNQARRR NRRR LFSINECKIF	endomembranas	Geranilgeranilación
Wrch-1	KSK SRT PKMKNLSK SW WKY CFV	MP, endosomas	---
Chp/Wrch-2	LE KKLNAKGV RTL SR CR WKK FF CVF	MP, endosomas	---

*Los 4 últimos aminoácidos de cada proteína, representados en negrita y cursiva, constituyen el dominio CAAX. Los residuos en rojo son cisteínas palmitoilables, mientras que los verdes representan secuencia polibásicas (Adaptado de Aicart-Ramos *et al.*, 2011 y Roberts *et al.*, 2008).

La lipidación del motivo -CAAX es un proceso altamente organizado que se sucede secuencialmente a lo largo de varios compartimentos celulares, finalizando con el anclaje de la proteína en la membrana plasmática u otras membranas celulares (Wright y Philips, 2006). El proceso completo, que se muestra esquematizado en la Figura 3.1 consta de tres etapas:

3.1.1 Prenilación

En una primera fase una prenil transferasa citosólica promueve la unión de un lípido poliisoprenoide a la cisteína del motivo -CAAX mediante la formación de un enlace tioester estable (Figura 3.1) (Wright y Philips, 2006). En el caso de las GTPasas Rho, una farnesil transferasa o una geranilgeranil transferasa tipo I son las responsables de la unión covalente de un grupo farnesilo o geranilgeranilo, respectivamente, al residuo de cisteína (Roberts *et al.*, 2008). La adición de un grupo u otro depende de la identidad del aminoácido “X” del motivo. Así, si X es Glutamina, Cisteína, Serina, Treonina o Alanina, la proteína será farnesilada, mientras que la presencia de residuos de Leucina, Fenilalanina, Isoleucina o Valina favorecen la geranilgeranilación (Aicart-Ramos *et al.*, 2011). Aunque que la mayoría de las GTPasas Rho sufren un proceso de geranilgeranilación, en las proteínas Ras predomina la farnesilación (Boulter *et al.*, 2012).

3.1.2 Proteolisis

Una vez que ha sido prenilada, la proteína es translocada a la cara citosólica del retículo endoplasmático (RE), donde tiene lugar la ruptura proteolítica de los tres aminoácidos terminales del motivo (-AAX) (Figura 3.1). La responsable de dicha ruptura es una proteasa esencial presente en retículo endoplasmático denominada Rce1 (enzima convertidora de Ras1 en mamíferos) (Roberts *et al.*, 2008), y cuyo sustrato específico son las proteínas preniladas (Ahearn *et al.*, 2012). Una vez proteolizados los tres últimos aminoácidos del motivo -CAAX, la cisteína prenilada se convierte en el extremo C-terminal de la proteína (Boulter *et al.*, 2012).

3.1.3 Metilación

Durante este último paso, el único reversible del proceso, la cisteína prenilada es metilada por una isoprenilcisteína carboxil metil transferasa (denominada Icmt en mamíferos) que cataliza la unión de un grupo metilo al residuo de cisteína prenilado (Figura 3.1) (Ahearn *et al.*, 2012).

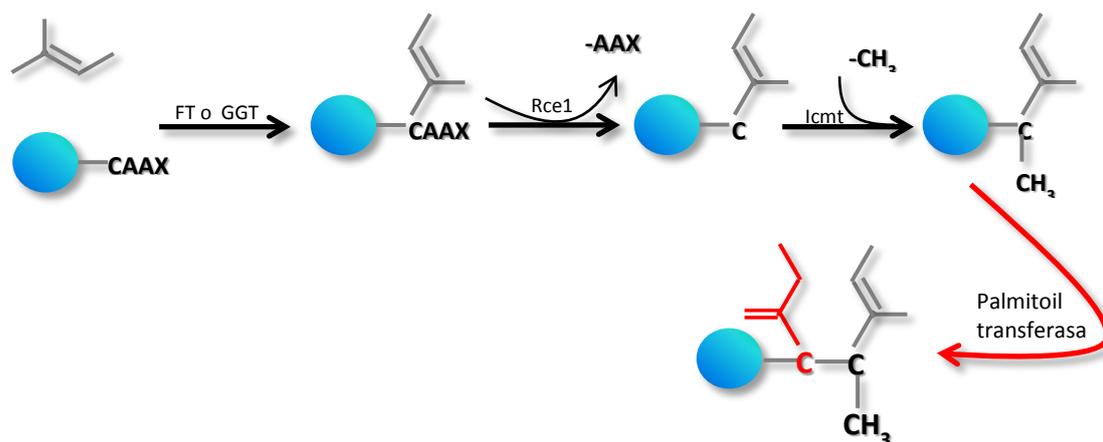


Figura 3.1 Procesamiento del motivo C-terminal -CAAX en GTPasas.

La finalidad de la secuencia de modificaciones descrita es proporcionar un aumento de la hidrofobicidad de la proteína, facilitando así su asociación a las membranas (Roberts *et al.*, 2008). Ello da como resultado una GTPasa madura y funcional, que puede ser liberada al citosol asociada a un GDI, o bien translocada a la cara interna de la membrana plasmática (Cushman y Casey, 2009).

3.2 Regulación de proteínas Rho mediante localización subcelular

Aunque, como se ha explicado en el capítulo anterior, los GEFs, GAPs, y GDIs son considerados los reguladores canónicos de las proteínas Rho, estudios realizados durante los años 90 establecieron que el tránsito entre el citosol y la membrana plasmática de las proteínas Rho estaba correlacionado con su ciclo de unión a GTP/GDP (Bokoch *et al.*, 1994; Quinn *et al.*, 1993). Ello llevó a la aceptación de la idea de que las proteínas Rho en su forma activa se localizan en la membrana plasmática, mientras que en estado inactivo presentan localización citosólica. Sin embargo, entre los años 2000 y 2004, una serie de trabajos de Del Pozo y Schwartz pusieron de manifiesto que la localización en la membrana y la actividad biológica de la Rho GTPasa Rac1 se encuentran disociadas (Del Pozo *et al.*, 2000; Del Pozo *et al.*, 2002; Del Pozo *et al.*, 2004). Sin embargo, aunque la localización membranal de las GTPasas Rho no es necesaria para su activación bioquímica (unión a GTP), sí lo es para que esta se manifieste en forma de actividad biológica (Boulter *et al.*, 2012). La isoprenilación de proteínas Rho es esencial debido a que no solo regula su localización subcelular, sino que determina la correcta señalización aguas abajo de la GTPasa (Boulter *et al.*, 2012).

3.3 Modificaciones que favorecen la interacción de las GTPasas Rho preniladas con membranas

A pesar de que la prenilación es necesaria para la asociación de las Ras y Rho GTPasas a la membrana plasmática, dicha modificación no es suficiente para que la unión sea completa y estable, siendo necesaria la presencia de elementos adicionales que favorezcan dicha interacción. Estas modificaciones vienen definidas por la presencia aguas arriba del motivo -CAAX de un *cluster* de aminoácidos básicos y/o de residuos de cisteína susceptibles de ser palmitoilados.

3.3.1 Secuencia polibásica

Muchas GTPasas Rho presentan una secuencia de aminoácidos básicos (arginina o lisina) situada aguas arriba del dominio de isoprenilación (Tabla 3.2). Esta secuencia confiere carga positiva a la proteína, lo que facilita su interacción con los fosfolípidos de la membrana cargados negativamente.

3.3.2 Palmitoilación

Algunas GTPasas contienen uno o dos residuos de cisteína situados justo antes dominio -CAAX que sufren un proceso de palmitoilación (Tabla 3.2). La palmitoilación, al igual que la presencia de una región polibásica, favorece la localización membranal de la proteína prenilada, lo que garantiza una señalización apropiada. El mecanismo de palmitoilación en las proteínas Ras y Rho se explica de manera detallada a continuación.

3.4 Palmitoilación

La S-acilación de proteínas o palmitoilación es un proceso reversible que consiste en la adhesión de una molécula de ácido palmítico a un residuo de cisteína mediante un enlace tioéster por medio de una palmitoil- o acil-transferasa (Aicart-Ramos *et al.*, 2011) (Figuras 3.1 y 3.2). A su vez, el residuo palmitoilado puede despalmitoilarse por la acción de tioesterasas específicas (Aicart-Ramos *et al.*, 2011).

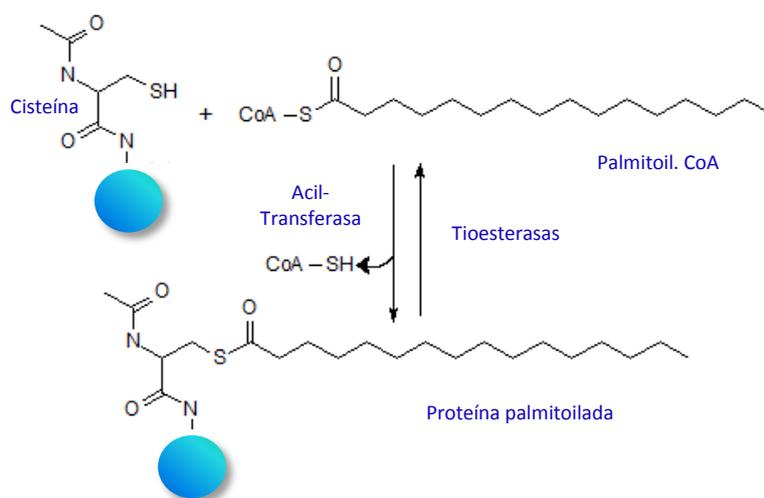


Figura 3.2 Dinámica de palmitoilación de proteínas.

La cantidad y diversidad de proteínas que se encuentran palmitoiladas en células eucariotas es muy alta, pudiendo ser modificadas secuencialmente por distintos lípidos, o solamente ser palmitoiladas. En el caso de las proteínas Ras y algunos miembros de la familia Rho, la palmitoilación tiene lugar en el dominio hipervariable adyacente al motivo -CAAX, generalmente en residuos de cisteína próximos a la cisteína isoprenilada, e independientemente de que ésta sea farnesilada o geranylgeranilada (Tabla 3.2). En estas proteínas la prenilación es un requisito previo para que se produzca la palmitoilación (Aicart-Ramos *et al.*, 2011).

El desarrollo reciente de distintas técnicas en el campo de la proteómica ha permitido el análisis y estudio del palmitoiloma en algunos organismos modelo como levaduras, *Drosophila*, ratones y determinadas líneas celulares de vertebrados (Roth *et al.*, 2006; Bannan *et al.*, 2008; Yount *et al.*, 2010; Martin and Cravatt, 2009), dando lugar al desarrollo de técnicas para la predicción de posibles sitios de palmitoilación (Hu *et al.*, 2011; Ren *et al.*, 2008). Aunque no se ha definido una secuencia consenso estricta para la palmitoilación, los residuos de cisteína que sufren esta modificación comparten una serie de características:

- Se encuentran adyacentes a los sitios de prenilación.
- Los aminoácidos adyacentes suelen ser básicos o hidrofóbicos.
- Suelen localizarse flanqueando los dominios transmembrana o dentro de ellos.

En mamíferos encontramos múltiples ejemplos de GTPasas palmitoiladas tanto en miembros de la familia Ras (H-Ras y N-Ras), como en la familia Rho (RhoB, TC10/RhoQ, Rac1) (Tabla 3.2).

3.4.1 Palmitoil transferasas

A pesar de que la palmitoilación se descubrió hace varias décadas, la identificación de los enzimas responsables de este proceso ha sido enormemente laboriosa, al tratarse de proteínas unidas a membrana y muy difíciles de purificar (Aicart-Ramos *et al.*, 2011). Los enzimas responsables de la transferencia del palmitato a los correspondientes residuos de cisteína son un grupo de proteínas denominadas S-palmitoil transferasas (PTs). Aunque son un grupo heterogéneo de proteínas, todas ellas se caracterizan a nivel estructural por presentar varios motivos transmembrana (generalmente 3 o 4), y un dominio conservado de unos 50 aminoácidos denominado DHHC (Aspartato-Histidina-Histidina-Cisteína). La mayoría de las palmitoil transferasas son proteínas integrales de la membrana del AG, de manera que las reacciones de palmitoilación tienen lugar en la cara citosólica de la membrana de este orgánulo (Salaun *et al.*, 2010) (Figura 3.3).

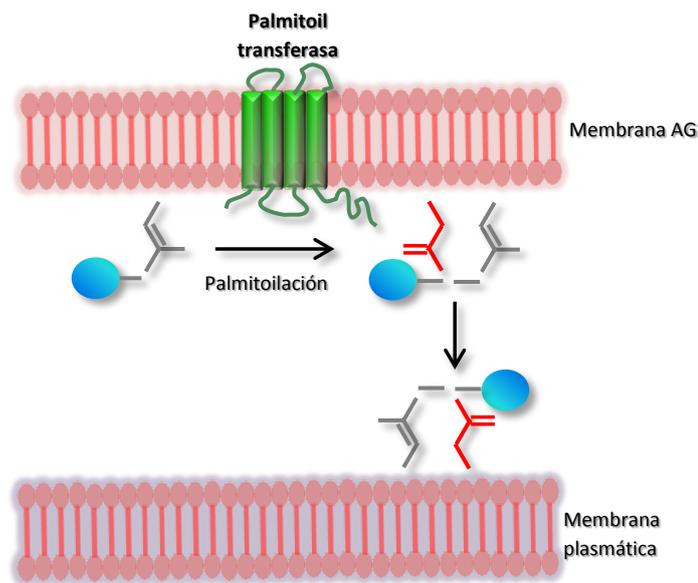


Figura 3.3 Las palmitoil transferasas son proteínas transmembranales.

Se ha descrito la presencia de 25 proteínas DHHC en humanos, mientras que en levaduras su número se reduce a 6 en *S. cerevisiae* (Akr1, Erf2, Pfa3, Pfa4, Pfa5 y Swf1) (Roth *et al.*, 2006) y 5 en *S. pombe* (Akr1, Pfa5, Pfa3, Swf1 y Erf2) (Rocks *et al.*, 2010). El elevado número existente de palmitoil transferasas sugiere que la maquinaria celular requerida para la palmitoilación es un sistema coordinado y altamente regulado (Ohno *et al.*, 2006). En levaduras se ha comprobado que algunas PTs muestran una mayor preferencia por un tipo determinado de sustrato. Así, Erf2 es la principal palmitoil transferasa de las GTPasas Ras y Rho (Roth *et al.*, 2006). Por el contrario, otros estudios han puesto de manifiesto que algunas

proteínas pueden ser palmitoiladas por más de una palmitoil transferasa, lo que complica su análisis funcional (Salaun *et al.*, 2010).

3.4.2 Palmitoilación como mecanismo de regulación de la actividad biológica de las GTPasas Rho

La palmitoilación actúa como un mecanismo de regulación muy versátil, modulando el tráfico de proteínas a lo largo de los distintos compartimentos celulares y su distribución en distintos subdominios membranales (Levental *et al.*, 2010), así como el cambio de orientación de proteínas en la membrana (Hayashi *et al.*, 2005; Lin *et al.*, 2009), y el grado de ubiquitinación (Valdez-Taubas y Pelham, 2005; Linder y Deschenes, 2007; Abrami *et al.*, 2008). Por todo ello, la palmitoilación tiene un papel muy importante en la regulación del crecimiento y proliferación celulares (Mitchell *et al.*, 2012).

Por otro lado, la versatilidad funcional que proporciona la palmitoilación se ve amplificada por su carácter reversible, ya que la dinámica de palmitoilación/despalmitoilación añade un nivel regulatorio adicional a la función señalizadora de algunas proteínas. El ejemplo más estudiado al respecto es el de la palmitoilación de las isoformas H- y N-Ras (Goodwin *et al.*, 2005; Rocks *et al.*, 2005; Roy *et al.*, 2005). Una vez farnesilado, Ras permanece unido débilmente a la membrana del Aparato de Golgi (AG) donde tiene lugar la palmitoilación, lo que permite su tráfico hasta la membrana plasmática, donde posteriormente será despalmitoilado y liberado al citosol. Una vez en el citosol, volverá al AG para palmitoilarse nuevamente y volver a ser transportado a la membrana plasmática, repitiéndose así el proceso. Este ciclo crea un flujo continuo de Ras desde el AG a la membrana plasmática que permite el reajuste continuo de su localización subcelular y, lo que es más importante, su actividad biológica (Goodwin *et al.*, 2005; Rocks *et al.*, 2005) (Figura 3.4).

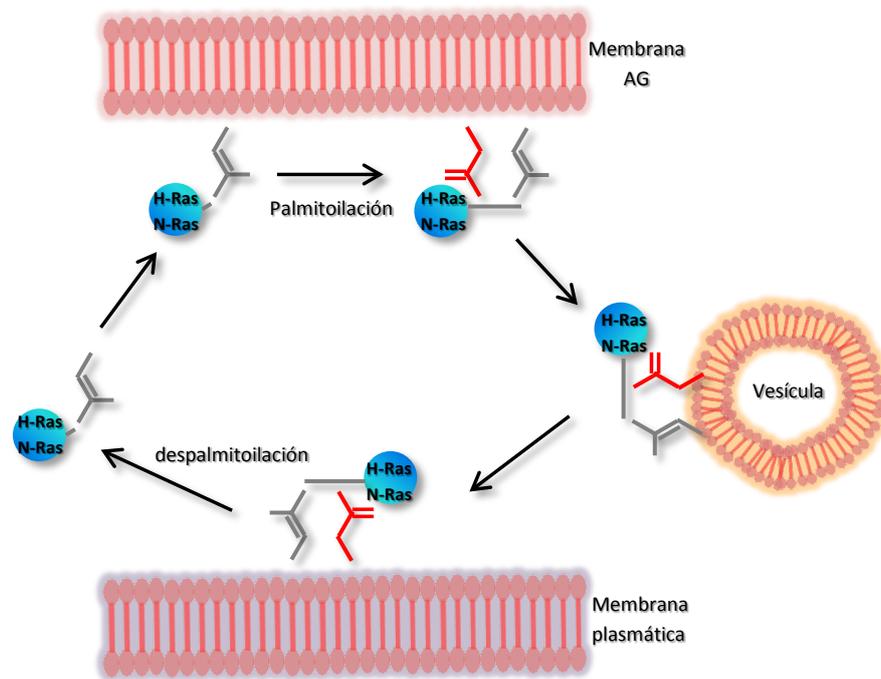


Figura 3.4 Tráfico intracelular de H- y N-Ras en mamíferos.

3.5 Palmitoilación y regulación de GTPasas Ras y Rho en *S. pombe*

3.5.1 Ras1

Hasta hace unos años se pensaba que la señalización mediada por Ras se producía únicamente desde la membrana plasmática. Sin embargo, los estudios realizados por Choy *et al.* (1999) y Chiu *et al.* (2002) mostraron que las isoformas N-Ras y H-ras podían ser activadas y señalizar desde endomembranas. Estos hallazgos sugerían que Ras podía regular distintas rutas de señalización desde diferentes compartimentos celulares.

El genoma de *S. pombe*, a diferencia de células superiores o incluso *S. cerevisiae*, codifica una sola proteína Ras, denominada Ras1 (Fukui *et al.*, 1986). Ras1 regula dos rutas de señalización diferentes, la ruta de respuesta a feromonas y conjugación por medio de la MAP quinasa Byr2 (Wang *et al.*, 1991), y la morfogénesis y crecimiento polarizado a través de Scd1, uno de los dos GEFs de la GTPasa Cdc42 (Chang *et al.*, 1994; Yen *et al.*, 2003) (Figura 3.5).

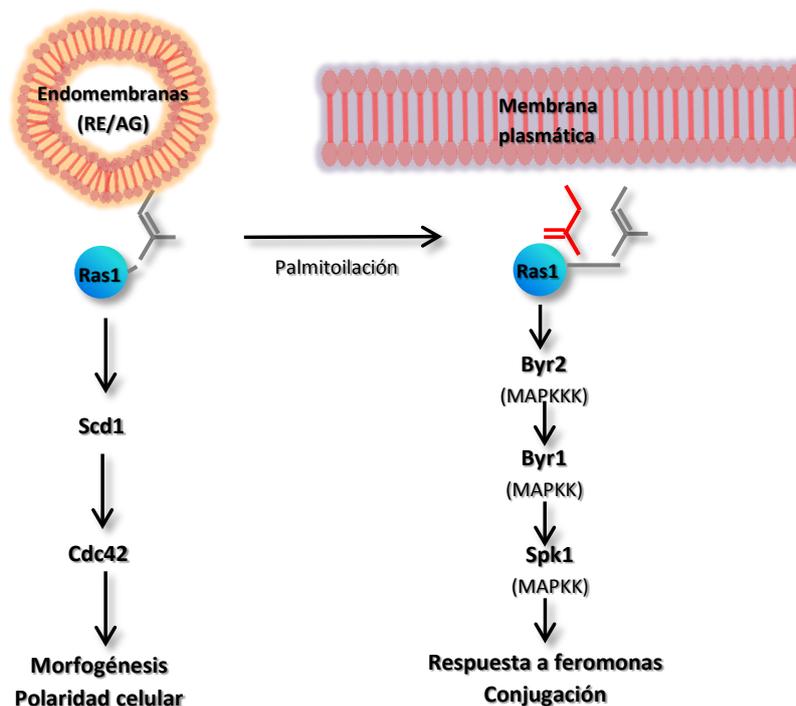


Figura 3.5 En *S. pombe* Ras1 regula distintos procesos biológicos dependiendo de su estado de palmitoilación.

Ras 1 regula ambos procesos desde compartimentos celulares diferentes mediante un mecanismo dependiente de su estado de palmitoilación (Onken *et al.*, 2006). Mientras que Ras1 farnesilado y palmitoilado regula diferenciación sexual desde la membrana plasmática, la forma no palmitoilada de la proteína regula morfogénesis y polaridad celular desde endomembranas, fundamentalmente RE y AG. (Figura 3.5) (Onken *et al.*, 2006). Erf2, junto con la proteína adaptadora Erf4, es la PT responsable de la palmitoilación de Ras1 *in vivo* (Young *et al.*, 2013).

3.5.2 Rho3

La GTPasa Rho3 regula en *S. pombe* el crecimiento polarizado y la exocitosis (Nakano *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2003), y participa en el control del tráfico intracelular de vesículas (Kita *et al.*, 2011). Recientemente se ha descrito que el complejo formado por la palmitoil transferasa Erf2 y su cofactor Erf4 palmitoila a Rho3 de forma diferencial dependiendo del estado en el que se encuentre la célula (Zhang *et al.*, 2013). Así, los niveles de actividad de dicho complejo, bajos durante el crecimiento vegetativo y altos en meiosis, determinan el grado de palmitoilación de sus sustratos, Ras1 y Rho3. El aumento de la actividad de Erf2-Erf4 promueve la entrada de las células en meiosis aumentando el estado de palmitoilación de Rho3, lo que pone de manifiesto la importancia de la GTPasa en el control de la diferenciación sexual en *S.*

pombe. Sin embargo el incremento en el nivel de palmitoilación de Ras1 no es necesario para la entrada en meiosis (Zhang *et al.*, 2013).

4. LAS RUTAS DE MAP QUINASAS

Todos los seres vivos desarrollan mecanismos para detectar y responder a las alteraciones que se producen en el medio circundante. El estudio de las rutas de señalización implicadas en la detección y respuesta frente a esos cambios es esencial para comprender cómo las células se adaptan y sobreviven en condiciones ambientales adversas. Las rutas de MAP quinasas (“*Mitogen Activated Protein Kinases*”) constituyen un mecanismo fundamental en la respuesta celular frente a los cambios ambientales, presentando un alto grado de conservación en todos los organismos eucariotas. Juegan un papel clave en la transducción de señales generadas en la superficie celular y su transmisión hasta el núcleo, donde se producirán los cambios necesarios en la expresión génica que permitirán la adaptación celular frente a las nuevas condiciones ambientales (Marshal, 1995).

4.1 Organización de las rutas de MAP quinasas

Los componentes implicados en la señalización por medio de las rutas de MAP quinasas se organizan en rutas fuertemente conservadas tal y como se expone a continuación:

4.1.1 Sensores

Dependiendo del estímulo recibido los receptores de la señal pueden ser proteínas transmembranales acopladas a proteínas G, sistemas de regulación de dos componentes, receptores tirosina quinasa, o proteínas integrales de membrana. En levaduras se han identificado todos estos tipos a excepción de los receptores del tipo tirosina quinasa.

4.1.2 Módulo de MAP Quinasas

Está compuesto por tres proteínas quinasas que mantienen un alto grado de conservación evolutiva y cuya estructura básica es muy similar: la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), la MAPK quinasa (MAPKK), y la MAP quinasa (MAPK). En respuesta al estímulo, la MAPKKK es normalmente activada por fosforilación dependiente de quinasas o proteínas de la familia Rho o Ras, aunque también puede activarse por oligomerización o relocalización subcelular (Figura 4.1).

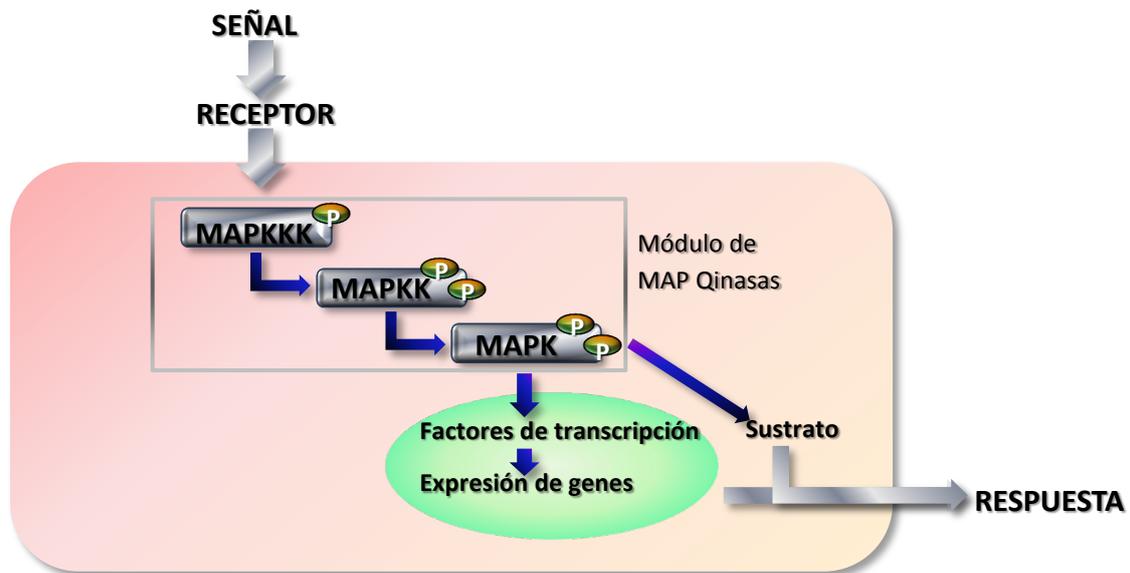


Figura 4.1 El módulo de MAP Quinasas y la transmisión de señales.

La MAPKKK, una vez activada, fosforila y activa al segundo elemento del módulo, la MAPKK (MEK) en residuos de treonina o serina. Por último, la MAPKK reconoce y fosforila dualmente a la MAPK en residuos de treonina y tirosina del motivo Thr-X-Tyr (Figura 4.1), donde X puede ser prolina, glicina, o ácido glutámico, dependiendo de la familia de MAPK de que se trate (Songyang *et al.*, 1996).

4.1.3 Efectores de MAP Quinasas

Los principales efectores de MAPKs son fundamentalmente factores de transcripción (Hill y Treisman; 1995; Treisman, 1996), aunque también se han identificado otros tipos de dianas como proteínas reguladoras de ciclo celular, chaperonas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de unión a ARN, y una amplia variedad de sustratos citoplasmáticos.

4.1.4 Reguladores de MAP Quinasas

Una de las principales características de la respuesta a estrés es el elevado grado de especificidad en la función y activación de las MAP quinasas, que viene determinado por distintos mecanismos. El más importante es la interacción física secuencial entre los distintos miembros de una ruta, aunque asimismo existen proteínas adaptadoras que agrupan los tres componentes de la cascada en un módulo específico. Además, la localización subcelular

diferencial de los componentes de la ruta también modula su función, constituyendo otro mecanismo esencial de regulación de su actividad biológica (Paul *et al.*, 1997).

Una vez que las células se han adaptado a las nuevas condiciones, la cascada de MAP quinasas debe ser desactivada por reguladores negativos que limitan la duración e intensidad de la señal (Karin y Hunter, 1995). Los principales reguladores negativos son las fosfatasa de MAP quinasas (MKPs), que pueden presentar especificidad dual, o desfosforilar específicamente residuos de tirosina (fosfatasa de tirosina), o de serina y treonina (fosfatasa de serina y treonina) (Farooq y Zhou, 2004).

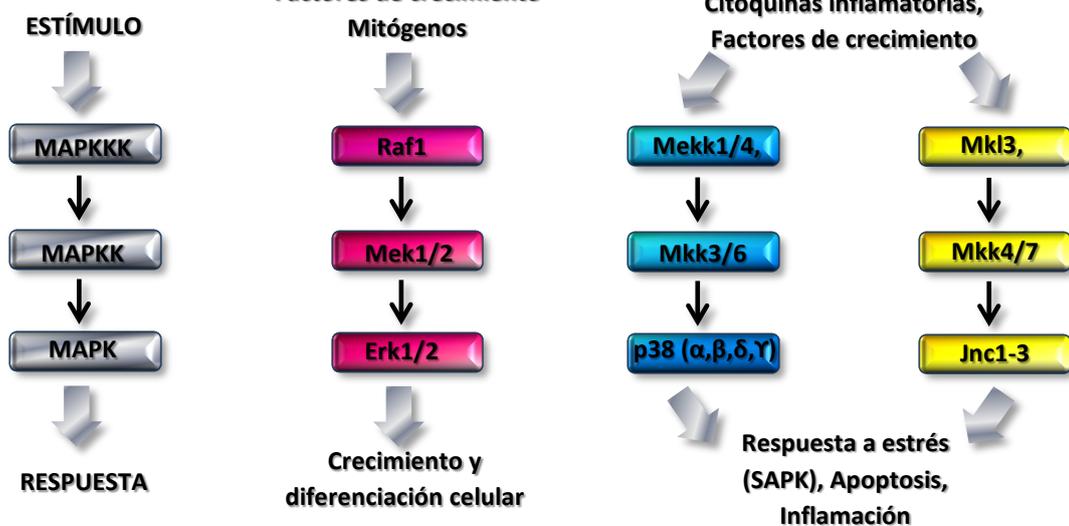
4.2 Conservación evolutiva

En mamíferos las rutas de MAPKs regulan multitud de procesos celulares como diferenciación, movilidad, proliferación y apoptosis, y se dividen en tres grupos: ERK, p38 y JNK (Figura 4.2). ERK y p38 presentan homólogos en levaduras, mientras que las MAPKs de tipo JNK solamente se han descrito en humanos (Davis, 2000). ERK1 y ERK2 están relacionadas con la regulación de la diferenciación y proliferación celular, mientras que JNK y p38 participan en las respuestas celulares a estrés y apoptosis (Schaeffer y Weber, 1999), y son conocidas como SAPKs (“*Stress Activated Proteín Kinases*”).

En *S. cerevisiae* se han identificado cinco rutas de MAPKs (Figura 4.2). De ellas, cuatro están presentes en células vegetativas: **FUS3**, que regula la respuesta a feromonas y la conjugación, **KSS1**, que participa en filamentación e invasividad, **HOG1**, que controla el crecimiento en condiciones de alta osmolaridad, y **SLT2/MPK1**, implicada en integridad celular. La quinta, **SMK1**, regula la síntesis de la pared de ascosporas (Krisak *et al.*, 1994) (Figura 4.2). En *S. pombe* solamente se han descrito tres rutas de MAPKs. Se trata de la ruta de respuesta a feromonas, cuya MAPK es **Spk1**; la ruta de respuesta a estrés o SAPK, en la que la MAPK es **Sty1**, y la ruta de integridad celular, cuyo elemento central es la MAPK **Pmk1** (Figura 4.2).

Mientras que las rutas JNK y p38 de mamíferos son homólogas a las rutas SAPK de *S. pombe* y HOG1 de *S. cerevisiae*, la ruta de integridad celular de *S. pombe* mantiene un alto grado de conservación con las quinasas ERK1/2 de mamíferos y la ruta SLT2/MPK1 de *S. cerevisiae* (Schaeffer y Weber, 1999).

Mamíferos



S.cerevisiae



S.pombe

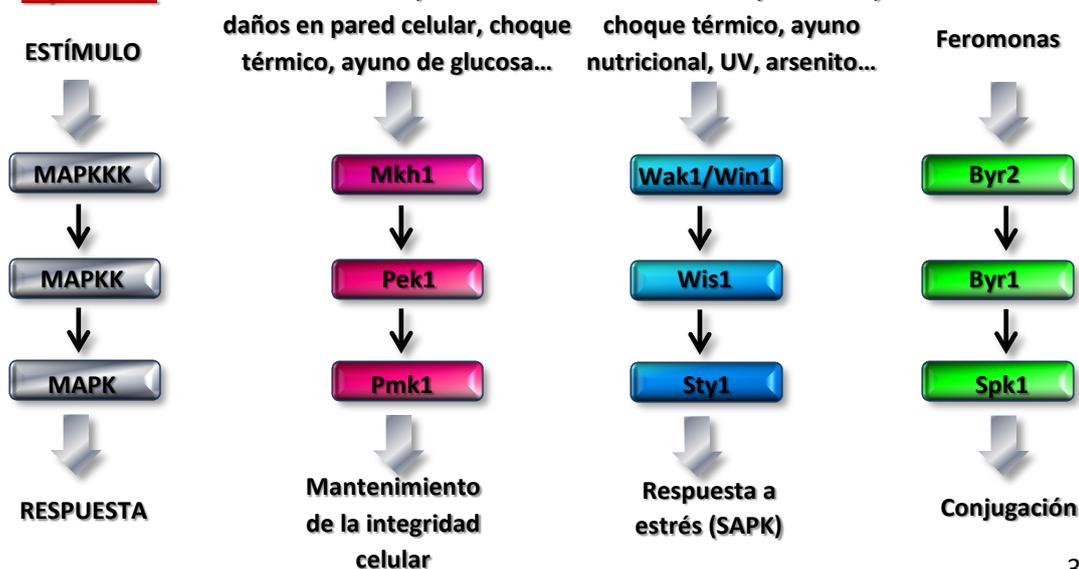


Figura 4.2 Conservación de las rutas de MAP quinasa.

A continuación se procederá a una descripción exhaustiva de las rutas SAPK y de integridad celular en *S. pombe*, al tratarse del organismo modelo utilizado en la presente Tesis Doctoral.

4.3 Ruta de MAPKs de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*

Numerosos estudios han puesto de manifiesto la importancia de la ruta SAPK en el ciclo vital de *S. pombe*, ya que su pérdida de función provoca graves defectos en el control del ciclo celular y en la respuesta general de la levadura frente a distintas situaciones de estrés (Warbrick y fantes, 1991; Shiozaki y Russell, 1995a, b; Millar *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2002; George *et al.*, 2007). El elemento central de la ruta SAPK es la MAPK Sty1, también denominada Spc1 o Phh1 (Shiozaki y Russell, 1995a, b; Millar *et al.*, 1995; Kato *et al.*, 1996). Seguidamente se indican los principales componentes de esta ruta (Figura 4.3.).

4.3.1 Sensores

En la actualidad se desconocen los sensores implicados en la detección y señalización de la mayoría de los estreses que activan la ruta SAPK (estrés osmótico, metales pesados o pro-oxidantes), excepto en el estrés oxidativo inducido por H₂O₂ en cuyo caso la señal es transmitida a través de una variante del sistema de dos componentes bacteriano. Se trata de un sistema fosfotransferasa compuesto por dos histidín quinastas (Mak2 y Mak3), la proteína Mpr1/Spy1 (transmisora de grupos fosfato a través de histidinas), y el regulador de respuesta Mcs4 (Shieh *et al.*, 1997; Shiozaki *et al.*, 1997; Quinn *et al.*, 2002) (Figura 4.3). En respuesta a H₂O₂, Mak2 y Mak3 se autofosforilan y a través la proteína Mpr1 se transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta Mcs4, que a su vez activa la cascada de MAPKs.

En el caso del estrés térmico o en presencia de arsenito la activación del ruta es provocada por la inhibición de la fosfatasa de tirosina Pyp1 que desactiva a la MAPK Sty1 (Nguyen y Shiozaki, 1999; Rodríguez-Gabriel y Russell, 2005; Petersen y Nurse, 2007; Hartmuth y Petersen, 2009).

4.3.2 Regulador de respuesta Mcs4

Mcs4 está implicado en la detección de estrés oxidativo y su transmisión a través del sistema de dos componentes (Santos y Shiozaki, 2001), y su presencia es necesaria para la activación de Sty1 en respuesta a cualquier tipo de estrés (Soto *et al.*, 2002; Buck *et al.*, 2001). Mcs4 interacciona físicamente con Mpr1, Tdh1 y las MAPKKKs de la ruta SAPK (Wak1 y Win1) y estas interacciones han resultado ser muy importantes en su mecanismo de acción. Así,

recientemente se ha demostrado que aunque Mcs4 es el único regulador de respuesta de la ruta SAPK, muestra una función dual en la señalización durante estrés. Por una parte recibe el estrés oxidativo originado por peróxido a través del sistema de multicomponentes Mak2/Mak3-Mpr1 para finalmente activar a las MAPKKs Wis4 y Win1. Por otra parte, debe estabilizar el complejo heteromérico que se forma entre las MAPKKs, cuya integridad promueve la interacción física con la MAPK Wis1 y, con ello permitir la activación de la MAPK Sty1. Por lo tanto, el complejo heteromérico Mcs4-MAPKKs podría servir como una plataforma estabilizadora para que tenga lugar la correcta señalización durante estrés a través de la ruta SAPK (Morigasaki *et al.*, 2013).

4.3.3 Módulo de MAP quinasas

4.3.3.1 MAPKK quinasa Wak1 y Win1

Las dos MAPKKs que forman parte del módulo de la ruta SAPK son **Wak1** (también conocida como Wis4 o Wik1), y **Win1**. En respuesta a estrés Mcs4 se une y activa a Wak1 y Win1, que a su vez fosforilan a la MAPK Wis1 y ésta a Sty1 (Shieh *et al.*, 1997; Samejima *et al.*, 1997, Morigasaki *et al.*, 2013) (Figura 4.3). Sin embargo, en determinadas situaciones como bajos niveles de peróxido de hidrógeno, estrés osmótico o respuesta a bajas temperaturas, no es necesaria la participación simultánea de ambas MAPKKs para la activación de la ruta SAPK (Soto *et al.*, 2002; Shiozaki *et al.*, 1998, Quin *et al.*, 2002).

4.3.3.2 MAPK quinasa Wis1

Wis1 es esencial para la activación de la ruta SAPK en la respuesta a todos los estímulos ambientales (Shiozaki *et al.*, 1998), excepto en el caso de del estrés térmico y del tratamiento con arsenito (Nguyen y Shiozaki, 1999; Rodríguez-Gabriel y Russell, 2005). En respuesta a estrés Wis1 se une y fosforila a Sty1 en el citoplasma (Nguyen *et al.*, 2002), lo que permite la activación y posterior translocación al núcleo de la MAPK.

4.3.3.3 MAP quinasa Sty1

El elemento central de la ruta SAPK es la MAP quinasa **Sty1/Spc1/Phh1** (Shiozaki y Rusell, 1995; Millar *et al.*, 1995, Kato *et al.*, 1996). En respuesta a condiciones ambientales adversas como el estrés osmótico, choque térmico, estrés oxidativo, estrés por bajas temperaturas o limitación de glucosa y/o nitrógeno, la forma fosforilada de Wis1 se asocia y fosforila a Sty1 en sendos residuos de treonina (Thr-171) y tirosina (Tyr-173) del motivo conservado -TGY-

(treonina-glicina-tirosina) (Figura 4.3), (Shiozaki y Russell, 1995; Millar *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2002; George *et al.*, 2007; Quinn *et al.*, 2002; Rodríguez-Gabriel y Russell; 2005; Shiozaki y Russell, 1996; Degols *et al.*, 1996; Degols y Russell, 1997; Soto *et al.*, 2007).

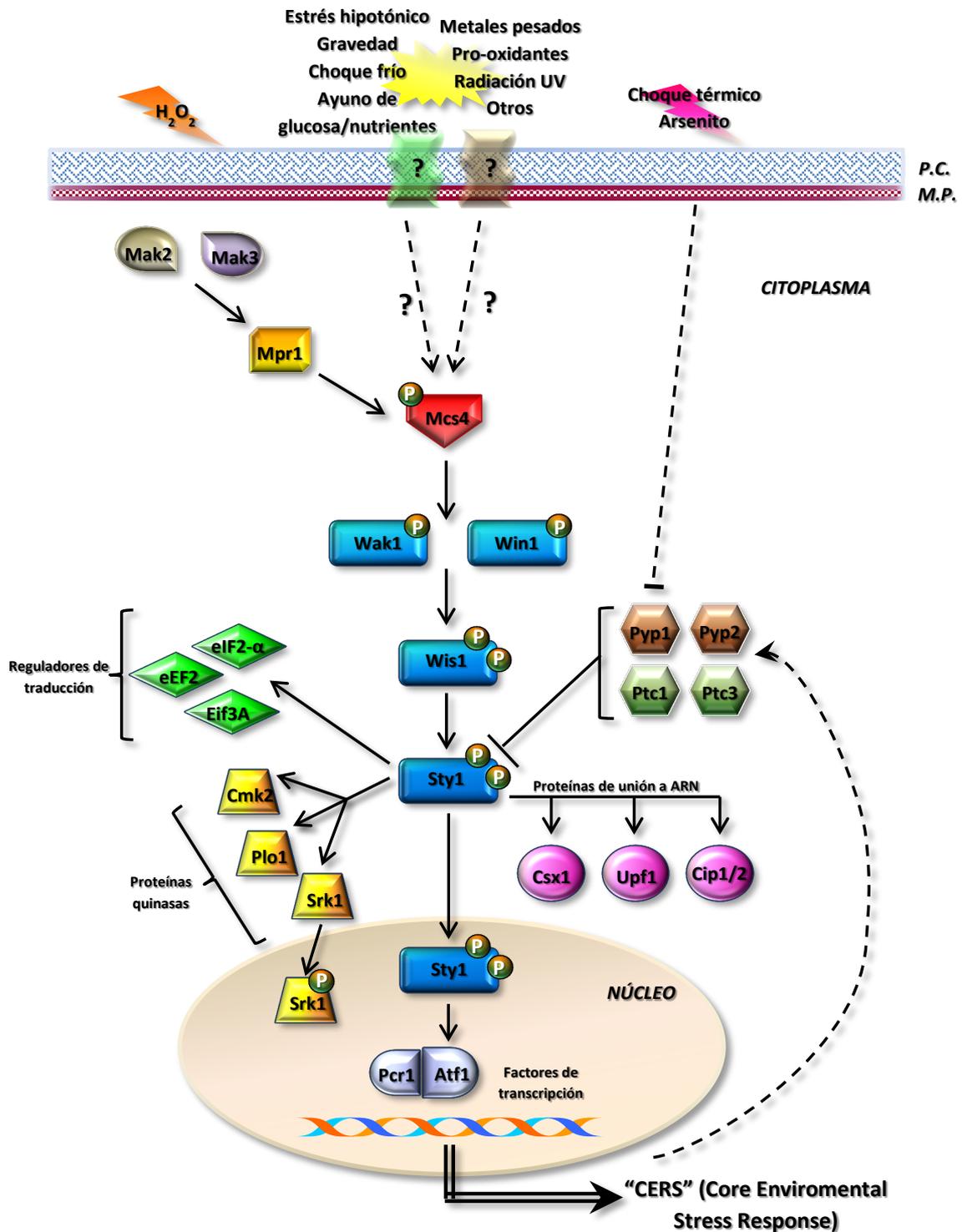


Figura 4.3 Ruta de MAP Quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*.

Una vez fosforilada Sty1 se transloca al núcleo, donde actúa sobre efectores específicos (Gaits *et al.*, 1998) (*ver a continuación*).

La activación de Sty1 es transitoria y la cinética e intensidad de su respuesta depende de la naturaleza y magnitud del estímulo recibido.

4.3.4 Efectores de la ruta SAPK

4.3.4.1 Factores de transcripción: Atf1 y Pcr1

Atf1 es un factor de transcripción ortólogo a ATF-2 de células superiores cuya ausencia provoca en *S. pombe* defectos durante la diferenciación sexual y una sensibilidad moderada frente al estrés oxidativo y osmótico, de manera análoga al mutante *sty1Δ*. Sin embargo, a diferencia de este último, no muestra anomalías en el ciclo celular, lo que sugiere que Atf1 participa exclusivamente en la respuesta celular frente al estrés. En cuanto penetra en el núcleo la forma activa de Sty1 se asocia y fosforila a Atf1 (Shiozaki y Russell, 1996). Una vez fosforilado, Atf1 regula la expresión de los genes necesarios para la respuesta adaptativa de *S. pombe* frente a diferentes tipos de estrés, así como la entrada en meiosis (Figura 4.3). Atf1 es una proteína con un dominio bZIP de unión a motivos CRE ("cAMP-Response Element") que están presentes en los promotores de la mayoría de los genes cuya expresión es regulada por la ruta SAPK, y que en *S. pombe* forman parte de la denominada "CERS" ("Core Enviromental Stress Response") (Chen *et al.*, 2007). Además, se ha descrito que la fosforilación de Atf1 por Sty1 tiene como finalidad aumentar la estabilidad del factor de transcripción (Lawrence *et al.*, 2007). Atf1 se encuentra en el núcleo formando heterodímeros con otro factor transcripcional denominado **Pcr1**. Curiosamente, la presencia de Pcr1 no es necesaria para la expresión de la mayoría de genes dependientes de Atf1 en respuesta a estrés (Sanso *et al.*, 2008; Lawrence *et al.*, 2007).

4.3.4.2 Proteínas de unión a ARN: Csx1, Upf1, Cip1 y Cip2

Csx1 es una proteína de unión ARN que es fosforilada por la forma activa de Sty1 en respuesta a estrés oxidativo, lo que permite la estabilización los ARN mensajeros de *atf1*⁺ y *pcr1*⁺ y la modulación de la expresión de genes dependientes de Atf1 en estas condiciones (Rodríguez-Gabriel *et al.*, 2003). **Upf1** es un helicasa que también participa en la estabilización de mensajero de *atf1*⁺ en respuesta a estrés oxidativo (Rodríguez-Gabriel *et al.*, 2006). Por

último, **Cip1** y **Cip2** son dos proteínas de unión a ARN que co-purifican con Csx1 y que aparentemente muestran actividades opuestas a esta proteína (Martín *et al.*, 2006).

4.3.4.3 Proteínas quinasas activadas por Sty1: Cmk2, Srk1 y Plo1

Cmk2 es una proteína quinasa tipo II dependiente de calcio/calmodulina, ortóloga a RCK2 de *S. cerevisiae*, que es fosforilada *in vivo* por Sty1 en presencia de H₂O₂, aunque su función específica es desconocida (Sánchez-Piris *et al.*, 2002).

Sty1 tiene una función crucial en la regulación del ciclo celular mediante su acción sobre las quinasas **Srk1** y la Polo quinasa **Plo1**. En respuesta a estrés Sty1 fosforila a Srk1 y promueve su entrada en el núcleo, donde fosforila e inactiva a la fosfatasa Cdc25, bloqueando de esta manera el inicio de la mitosis (Figura 4.3) (López-Avilés *et al.*, 2005, 2008; Smith *et al.*, 2002). Plo1 es fosforilada por Sty1 en respuesta a choque térmico o centrifugación, lo que promueve su reclutamiento en los cuerpos polares del huso (*SPBs*, "*Spindle Pole Bodies*"), donde modula la actividad de la quinasa dependiente de ciclina Cdc2 por medio de Cdc25 y Wee1 (Petersen y Hagan, 2005).

4.3.4.4 Factores reguladores de la traducción

En células eucariotas la actividad del factor de inicio de la traducción **eIF2 α** es fundamental para la regulación de la síntesis proteica en respuesta a estrés. Sty1 regula la traducción reduciendo el estado de fosforilación de este factor (Dunand-Sauthier *et al.*, 2005; Berlanga *et al.*, 2010). Además, en respuesta a estrés Sty1 se asocia *in vivo* al factor de elongación **eEF2** y al factor de inicio de la traducción **eIF3a**, incrementando su estado de fosforilación e inactivándolos (Figura 4.3) (Asp *et al.*, 2008).

4.3.5 **Reguladores negativos de la ruta SAPK**

La regulación de la magnitud y duración de la activación de las MAP quinasas es crucial para permitir una respuesta adecuada frente a los estímulos ambientales (Dube y Tremblay, 2005). En este sentido, las fosfatasas de MAPKs son reguladores negativos esenciales, dada su capacidad para desfosforilar las formas activas de las MAP quinasas en residuos de treonina, tirosina, o ambos. En eucariotas se han descrito tres tipos de fosfatasas que regulan negativamente a las MAPKs: fosfatasas de tirosina (PTPs), fosfatasas de serina y treonina (PP2Cs), y fosfatasas de especificidad dual (DSPs) (Farooq y Zhou, 2004).

En *S. pombe* las fosfatasa de tirosina **Pyp1** y **Pyp2**, y las fosfatasa de serina y treonina **Ptc1** y **Ptc3** desfosforilan a Sty1 *in vivo* (Figura 4.3). Pmp1, la única fosfatasa de especificidad dual existente en este organismo solamente regula negativamente a Pmk1, la MAPK de la ruta de integridad celular (Sugiura *et al.*, Toda, 1998; Madrid *et al.*, 2007). Pyp1 y Pyp2 presentan localización núcleo-citoplasmática tanto en crecimiento vegetativo como en situaciones de estrés (Gaits y Russel, 1999), y se unen y desfosforilan *in vivo* a Sty1 en el residuo de tirosina-173 (Millar *et al.*, 1995; Degols y Shiozaki, 1996). Pyp1 es la principal responsable de la desactivación de Sty1 en células en crecimiento, mientras que la desfosforilación en situaciones de estrés es realizada conjuntamente por Pyp1 y Pyp2 (Shiozaki y Russel, 1995; Millar *et al.*, 1995). La expresión basal del gen *pyp1+*, así como la inducción por estrés de *pyp1+*, *pyp2+*, y *ptc1+*, es regulada por Sty1-Atf1 (Figura 4.3), constituyendo un mecanismo de retroalimentación negativa (Wilkinson *et al.*, 1996; Shiozaki y Russel, 1996; Degols y Shiozaki, 1996; Gaits *et al.*, 1997).

De las cuatro fosfatasa del tipo PP2C, Ptc1 y Ptc3 desactivan a Sty1 *in vivo* mediante la desfosforilación del residuo de treonina-171 (Nguyen y Shiozaki, 1999). En el caso del choque térmico, donde el aumento de la actividad de Sty1 es resultado de la inhibición temporal de la unión de Pyp1, la acción de Ptc1 y Ptc3 permite recuperar el nivel basal de fosforilación de la MAP quinasa (Nguyen y Shiozaki, 1999).

4.4 Ruta de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe*

Dicha ruta, cuyo elemento central es la MAP quinasa Pmk1/Spm1, es esencial para el control de la integridad celular en *S. pombe* y participa en procesos como la construcción y mantenimiento de la pared celular, la citocinesis, la morfogénesis, la fusión de vacuolas durante el estrés hipotónico, y la homeostasis iónica (Toda *et al.*, 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2006). La ausencia Pmk1 o de alguno de los componentes del módulo de MAPK provoca en *S. pombe* defectos severos durante la citocinesis (multiseptación) o la fusión de vacuolas, hipersensibilidad frente al estrés osmótico y a daños en la pared celular (Toda *et al.*, 1996; Sengar *et al.*, 1997; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000). A continuación se describen los principales componentes de esta ruta de señalización y su relevancia biológica.

4.4.1 Sensores

En *S. cerevisiae* las proteínas transmembranales Wsc1, Mid2, y Mlt1 actúan como sensores principales de la ruta de integridad celular (Levin, 2005). *S. pombe* posee dos sensores homólogos a los citados, denominados Wsc1 y Mlt2. Wsc1 localiza en los sitios de crecimiento activo y en el septo de división, mientras que Mlt2 localiza en la periferia celular. Un reciente estudio ha puesto de manifiesto que ambas proteínas activan a la GTPasa Rho1, y que la sobreexpresión de Rho1 suprime la letalidad provocada por la doble delección de Wsc1 y Mlt2 (Cruz *et al.*, 2013). La presencia de Mlt2 es necesaria para la supervivencia celular frente a diversos estreses, mientras que la sobreexpresión de Msc1 activa la biosíntesis de pared celular. Sin embargo, aunque Wsc1 y Mlt2 regulan el ensamblaje de la pared celular a través de Rho1, lo hacen independientemente de la ruta de integridad celular, cuya actividad no se ve afectada en mutantes *wsc1Δ* y *mlt2Δ* (Cruz *et al.*, 2013). Por tanto, actualmente se desconoce la identidad del sensor o sensores responsables en *S. pombe* de la detección y transmisión de señales hacia la ruta de integridad celular.

4.4.2 Reguladores aguas arriba de módulo de MAP quinasas

4.4.2.1 Las GTPasas Rho1 y Rho2

En 2006 Ma y colaboradores demostraron que Rho2 y Pck2, junto con Cpp1, actúan aguas arriba de la cascada de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe* (Ma *et al.*, 2006) (Figura 4.4). Rho2 es farnesilado *in vivo* en el residuo de cisteína-197 del motivo -CAAX por la farnesiltransferasa Cpp1, permitiendo su anclaje a la membrana plasmática y la correcta activación de la ruta (Ma *et al.*, 2006). La letalidad asociada a la sobre-expresión de *rho2⁺* es consecuencia de la hiperactivación de la ruta de integridad celular, ya que es suprimida tras la interrupción de *pck2⁺* o de alguno de los componentes del módulo de MAP quinasas (Ma *et al.*, 2006). Por lo tanto, Rho2 regula positivamente la activación del módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 por medio de Pck2 (Ma *et al.*, 2006) (Figura 4.4).

Hasta la realización de este trabajo se había propuesto que Rgf1 (GEF de Rho1) regula la activación de Pmk1 favoreciendo la activación de la GTPasa esencial Rho1 (García *et al.*, 2009a). La capacidad de Rho1 de suprimir alguno de los fenotipos asociados a la falta de Rho2, y la activación residual de Pmk1 observada en ausencia de Rho2 o Pck2 (Barba *et al.*, 2008), apuntaban a Rho1 como posible activador de la ruta de integridad celular. Parte del trabajo realizado en la presente Tesis se ha dedicado a dilucidar dicho papel. Por otra parte, Rho1 se

encuentra geranil-geranilado *in vivo* en su extremo –CAAX, siendo esta modificación lipídica esencial para ejercer sus funciones biológicas (Arellano *et al.*, 1998).

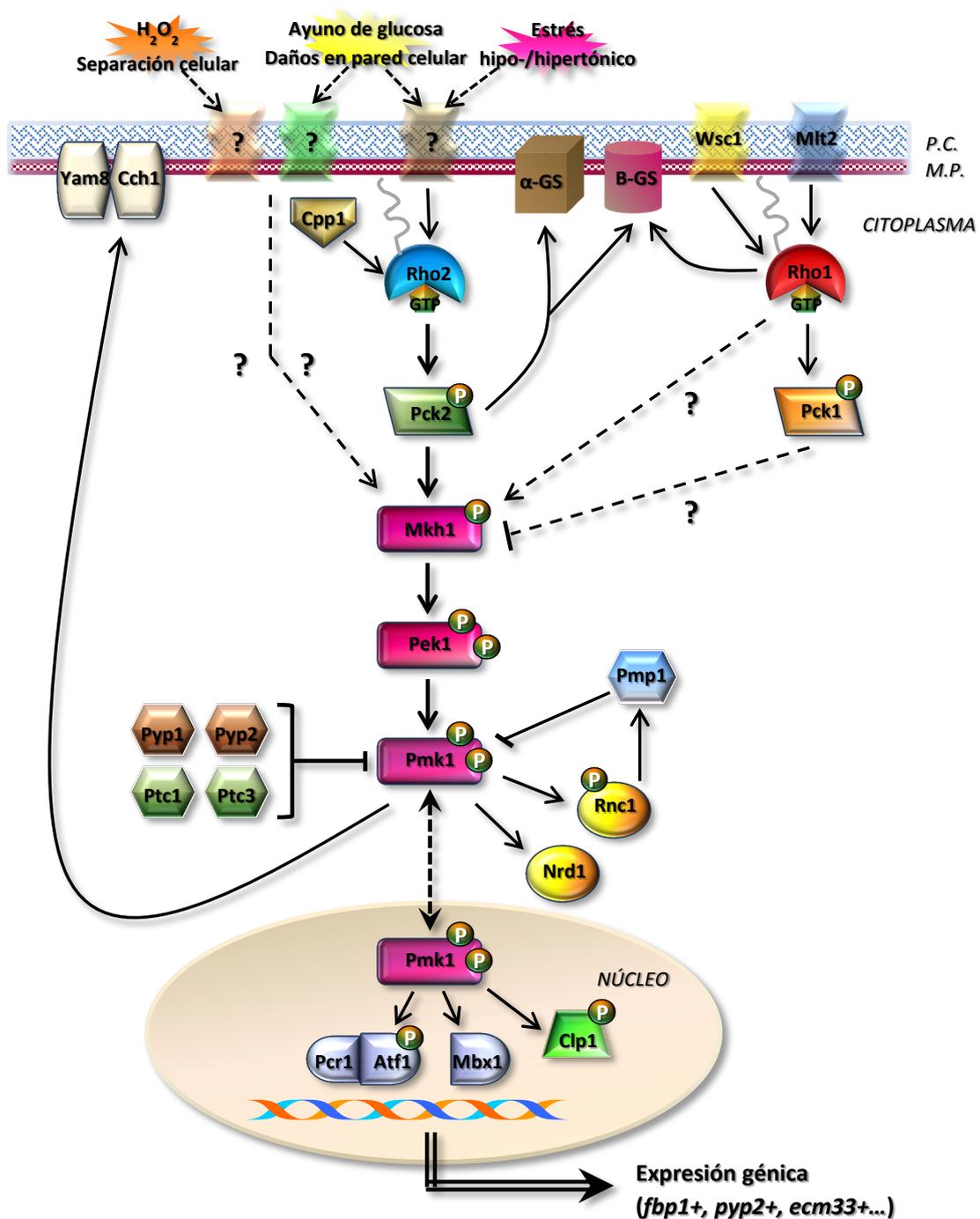


Figura 4.4 Ruta de MAP quinasa de integridad celular en *S. pombe*.

4.4.2.2 Las proteínas quinasa Pck1 y Pck2

En mamíferos se han definido hasta 20 isoformas de proteínas quinasa C (PKCs) (Mellor y Parker, 1998). Por el contrario, mientras que *S. cerevisiae* presenta un ortólogo esencial de la

PKC denominado Pkc1 (Levin *et al.*, 1990), *S. pombe* posee dos ortólogos denominados Pck1 y Pck2 (Toda *et al.*, 1993). Aunque los mutante simples *pck1Δ* o *pck2Δ* son viables, la doble deleción de ambos genes es letal, lo que sugiere que Pck1 y Pck2 comparten funciones esenciales durante el crecimiento celular. Los mutantes *pck2Δ* muestran defectos en polaridad, paredes celulares delgadas, e hipersensibilidad a temperaturas elevadas y al tratamiento con enzimas líticas (Toda *et al.*, 1993; 1996; Shiozaki y Russell, 1995). La deleción de Pck1 no causa fenotipos evidentes, excepto una moderada sensibilidad frente al Calcofluor y la Equinocandina B, un inhibidor de la β -glucán sintasa (Arellano *et al.*, 1997). Por otro lado, mientras que la sobreexpresión de Pck1 no produce alteraciones evidentes, la sobreexpresión de Pck2 es letal, dando lugar a células con paredes muy gruesas y deformadas (Arellano *et al.*, 1999a).

Ambas quinasas, relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional con las quinasas asociadas a Rho de mamíferos ("PKC-Related Kinases" o PRKs), contienen en su extremo amino terminal dos secuencias HR1 responsables de su unión a GTP-Rho1 y GTP-Rho2 (Mellor y Parker, 1998), y secuencias tipo PEST, implicadas en su degradación por el proteasoma (Arellano *et al.*, 1999b). Pck1 y Pck2 son muy inestables, y su unión a las formas activas de Rho1 y Rho2 aumenta su estabilidad. Además, dicha unión promueve cambios en su localización, estabilizándolas en los sitios donde su función es requerida. De hecho, Pck1 y Pck2 co-localizan con Rho1 y Rho2 en zonas de crecimiento (Matsuyama *et al.*, 2006). Probablemente Pck1 y Pck2 son fosforiladas y activadas por Ksg1, el único ortólogo a la quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK1) presente en *S. pombe* (Niederberger y Schweingruber, 1999), aunque esta hipótesis no ha sido todavía demostrada (Pérez y Cansado 2010).

Pck2 fue identificado como un componente de la ruta de integridad celular en *S. pombe* debido a su capacidad de complementar el fenotipo "VIC" (*ver más adelante*) (Ma *et al.*, 2006). Pck2 es activado por Rho2 y transmite la señal hacia Pmk1 gracias a su interacción con la MAPKK quinasa Mkh1 (Figura 4.4). Sin embargo, distintas evidencias genéticas y bioquímicas obtenidas previamente a la realización de este trabajo sugerían que Pck1 participaba en el control de la integridad celular en paralelo a Rho2-Pck2-Pmk1 (Ma *et al.*, 2006), o era un regulador negativo de dicha ruta (Barba *et al.*, 2008).

4.4.3 Módulo de MAP quinasas

El módulo de MAP quinasas de la ruta de integridad celular está formado por la MAPKK quinasa Mkh1, la MAPK quinasa Pek1/Skh1 y la MAP quinasa Pmk1/Spm1. En respuesta a un estímulo externo se produce la fosforilación secuencial de los componentes del módulo (Figura 4.4).

4.4.3.1 MAPKK quinasa Mkh1

Mkh1 ("*Mek Kinase Homolog 1*") fue identificada como la MAPKKK de la ruta de integridad en *S. pombe* debido, por una parte, a su alto grado de identidad con la MAPKKK BCK1 de *S. cerevisiae*, y por otra, a que su ausencia provoca los mismos fenotipos que la falta Pek1 o Pmk1 (Sengar *et al.*, 1997; Madrid *et al.*, 2006). Mkh1 es fosforilado por Pck2, y transmite la señal de activación al resto de componentes del módulo al interactuar *in vivo* con la MAPKK Pek1 y la MAPK Pmk1, formando un complejo ternario (Loewith *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2006).

4.4.3.2 MAPK quinasa Pek1

El gen *pek1+* ("*pombe mEK 1*"), también denominado *skh1+*, codifica la MAPK quinasa de la ruta de integridad celular en *S. pombe* y presenta un 46% de identidad con MKK1 y MKK2, las MAPK quinasas de la ruta análoga en *S. cerevisiae*.

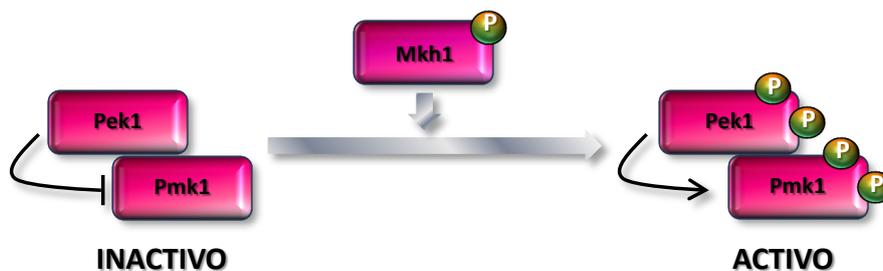


Figura 4.5 Pek1 como interruptor molecular.

Pek1 es fosforilada y activada por Mkh1 en respuesta a un estímulo activador de la ruta (Sugiura *et al.*, 1999) (Figura 4.4). Cabe destacar que, en células no estresadas, la forma inactiva de Pek1 se une a Pmk1 actuando como un inhibidor de la señalización. Esta función dual de Pek1 según su estado de fosforilación le permite actuar como un interruptor molecular dando lugar a una respuesta del tipo "todo o nada" (Sugiura *et al.*, 1999) (Figura 4.5).

4.4.3.3 MAP quinasa Pmk1

La MAPK **Pmk1/Spm1** ("*S. pombe* MAP kinase 1") fue caracterizada como un homólogo estructural de MPK1/SLT2 de *S. cerevisiae*, y constituye el elemento central de la ruta de integridad celular en *S. pombe* (Toda *et al.*, 1996; Sengar *et al.*, 1997). Pmk1 es fosforilada de manera dual por Pek1 en dos residuos conservados de treonina y tirosina en las posiciones 186 y 188 de motivo de activación –TEY- (Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2006). La activación de Pmk1 es completamente dependiente de Mkh1 y Pek1, indicando que se trata de un módulo de transmisión lineal no ramificado (Figura 4.4) (Madrid *et al.*, 2006).

Pmk1 es ortóloga a las MAPKs ERK1 y ERK2 presentes en humanos que forman parte de la cascada clásica de quinasa activadas por mitógenos, y que se activan en respuesta a factores de crecimiento, ésteres de forbol, y en menor medida por estrés osmótico o citoquinas (Schaeffer y Weber, 1999). Aunque inicialmente se creía que Pmk1 se activaba únicamente en respuesta a temperaturas elevadas o tras el tratamiento con cloruro sódico, nuestro grupo ha descrito que también se activa en respuesta a distintas situaciones adversas, como el estrés hiper- e hipo-osmótico, el ayuno de glucosa, el daño a la pared celular inducido con caspofungina (una equinocandina que inhibe la actividad de las β -glucan sintasas de la pared celular), y el estrés oxidativo mediado por hidroperóxidos o agentes pro-oxidantes (Figura 4.4) (Madrid *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2007; Barba *et al.*, 2008). Los mutantes de *S. pombe* carentes de Pmk1 son sensibles a la mayoría de los tipos de estrés que inducen su activación, por lo que la función de la MAPK es necesaria para la adaptación y supervivencia celular frente a tales condiciones.

Sorprendentemente, a diferencia del modelo de *S. cerevisiae*, los elementos que actúan aguas arriba del módulo de MAP quinasa pueden actuar o no como reguladores de la ruta dependiendo del tipo de estrés (Barba *et al.*, 2008). Así, mientras que la activación de Pmk1 inducida por los estreses hipo- e hipertónico depende totalmente de la señalización mediada por Rho2-Pck2 (Figura 4.4), la activación durante la separación celular o el tratamiento con peróxido de hidrógeno es completamente independiente de ambas proteínas (Figura 4.4) (Barba *et al.*, 2008). Otros estreses, como el ayuno de glucosa o el daño de la pared celular pueden ser canalizados a través de Pck2 o por medio de rutas alternativas (Figura 4.4) (Barba *et al.*, 2008). Estas observaciones sugieren la existencia de diversas rutas que regulan la actividad basal y la activación de Pmk1 en respuesta a estrés, y que actúan de manera

independiente del control de Rho2 y/o Pck2 según la naturaleza del estímulo activador (Barba *et al.*, 2008).

Mkh1 (MAPKKK) y Pek1 (MAPKK) son proteínas esencialmente citoplasmáticas, aunque también localizan en el septo durante la citocinesis. Sin embargo Pmk1 (MAPK) presenta localización núcleo/citoplasmática, así como en el huso mitótico, el corpúsculo polar del huso (SPB), y el septo (Madrid *et al.*, 2007). Contrariamente al modelo descrito para ERK1/2 en mamíferos, la localización de Pmk1 no se modifica en respuesta a estrés ni en ausencia de Mkh1 ni Pek1, lo que sugiere que su activación tiene lugar en el citoplasma y/o septo, y que tanto las formas activa como inactiva de la MAPK son capaces de translocarse al núcleo (Madrid *et al.*, 2007).

4.4.4 Efectores de la ruta de integridad celular

4.4.4.1 Proteínas de unión a ARN: Rnc1 y Nrd1

Rnc1 ("*RNA-binding protein that supresses calcineurin deletion 1*"), participa en la regulación de Pmp1, la fosfatasa específica de Pmk1, uniéndose a su ARN mensajero y estabilizándolo (Sugiura *et al.*, 2003). Pmk1 en su estado activo fosforila a Rnc1, que su vez estabiliza a Pmp1. Es decir, Rnc1 regula negativamente la actividad de Pmk1 por medio de Pmp1 (Sugiura *et al.*, 1998 y 2003) (Figura 4.4).

Nrd1 regula la citocinesis mediante la unión y estabilización del ARN mensajero del gen *cdc4⁺* (cadena ligera de la miosina II). Pmk1 en su forma activa se une y fosforila a Nrd1, impidiendo su unión al ARNm de *cdc4⁺*, lo que promueve su desestabilización (Satoh *et al.*, 2009). La fosforilación de Nrd1 por Pmk1 es dependiente de la fase del ciclo celular (Satoh *et al.*, 2009).

4.4.4.2 Factores de transcripción: Atf1 y Mbx1

Atf1 es un factor transcripcional clave en la respuesta a estrés de *S. pombe* cuya actividad es regulada fundamentalmente por la ruta SAPK. Sin embargo también es fosforilado por Pmk1 en ciertas condiciones, como en respuesta a daños en la pared celular (Takada *et al.*, 2007). Además, Pmk1 refuerza a la ruta SAPK en respuesta a la limitación de glucosa por medio de Atf1, activando la expresión de los genes que intervienen en la adaptación al metabolismo respiratorio como *fbp1⁺* o *pyp2⁺* (Madrid *et al.*, 2013). Por tanto Atf1 actúa como efector común y nexo de unión entre ambas rutas de MAP quinasas en contextos biológicos concretos.

Mbx1 es un factor de transcripción que en *S. pombe* regula la expresión génica durante la transición M-G1 del ciclo celular (Papadopoulou *et al.*, 2008). MbX1 participa en la ruta de integridad celular mediante la regulación de la inducción del gen *ecm33⁺*, que codifica una proteína de pared celular con motivo GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) (Takada *et al.*, 2010). La expresión de *ecm33⁺* se induce en presencia de agentes que dañan la pared celular (Jung y Levin, 1999), y en respuesta a los mismos estreses que activan a Pmk1, siendo dicha inducción regulada tanto por Atf1 como por MbX1 (Takada *et al.*, 2010).

4.4.4.3 Canal iónico: Cch1-Yam8

Los genes *yam8⁺* y *cch1⁺* codifican las subunidades de un canal de calcio (Ca^{2+}) presente en la membrana plasmática de *S. pombe*. En presencia de sales (NaCl , KCl , o MgCl_2) o de compuestos que causan daño en la pared celular se produce la activación de la ruta de integridad celular, de forma que Pmk1 en su estado activo fosforila y activa a Cch1, produciendo la apertura del canal formado por el complejo **Cch1-Yam8** y permitiendo la entrada de Ca^{2+} a la célula (Figura 4.6). El aumento de los niveles intra-citoplasmáticos de Ca^{2+} promueve a su vez la activación de la calcineurina (Ppb1), que desfosforila a Cch1 causando el cierre del canal. Por tanto, la sensibilidad salina que presentan los mutantes con niveles elevados de fosforilación de Pmk1 es debida al efecto dañino que provoca el aumento de la entrada de Ca^{2+} en la célula como consecuencia de la hiperactivación del canal Cch1-Yam8 (Ma *et al.*, 2011).

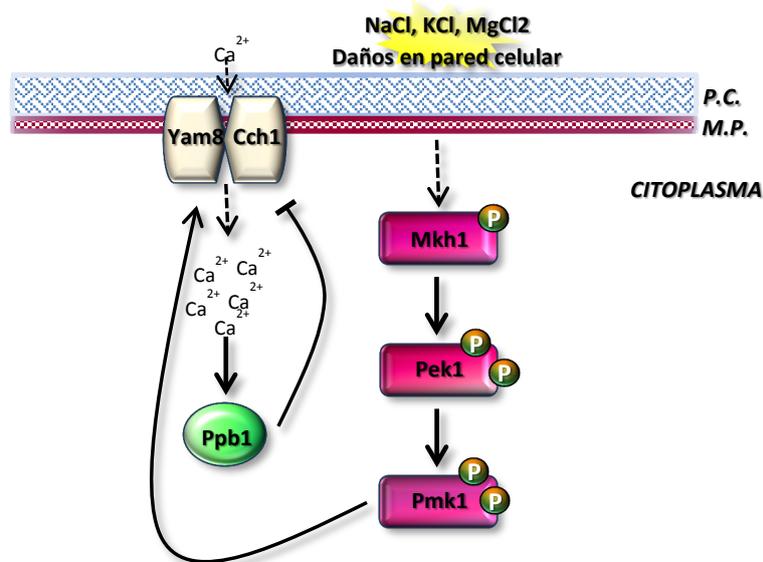


Figura 4.6 Regulación antagonica de la concentración de Ca^{2+} intracelular por parte de Pmk1 y Ppb1.

La falta de Ppb1 o su inactivación farmacológica en presencia de FK506 (un inhibidor específico de la calcineurina) también provoca hipersensibilidad salina, y puede ser suprimida en ausencia de los principales elementos de la ruta (Rho2, Pck2, Mkh1, Pek1 o Pmk1), al impedir la entrada de Ca^{2+} en la célula (Ma *et al.*, 2011). Este fenotipo, denominado “VIC” (“*Viable in the presence of immunosuppressant and chloride ion*”), es un marcador característico de los mutantes que presentan defectos en la actividad de la ruta de integridad celular y ha sido utilizado frecuentemente para el rastreo e identificación de mutantes afectados en su función.

4.4.4.4 Proteínas reguladoras de ciclo celular: Clp1

Clp1 es un ortólogo de la fosfatasa esencial CDC14 de *S. cerevisiae*. En células vegetativas Clp1 localiza en el nucléolo, “liberándose” de este orgánulo para acceder a sus sustratos en respuesta a daños en el ADN, o durante el estrés oxidativo mediado por H_2O_2 (Díaz-Cuervo y Bueno, 2008). Recientemente se ha demostrado que Pmk1 fosforila a Clp1, y que su falta retrasa la liberación de Clp1 del nucléolo durante el tratamiento con H_2O_2 . Por tanto, la fosforilación de Pmk1 sobre Clp1 contribuye a la regulación temporal de este proceso (Broadus y Gould, 2012).

4.4.5 Regulación negativa de la ruta de integridad celular

Pmp1 es el principal regulador negativo de la MAP quinasa Pmk1 (Sugiura *et al.*, 1998). Se trata de una fosfatasa de especificidad dual capaz de unirse e inactivar a Pmk1 desfosforilando los residuos treonina-186 y tirosina-188 de la MAP quinasa. Los niveles de expresión de *pmp1⁺* son constantes a lo largo del ciclo celular y no varían en situaciones de estrés. Tal como se ha comentado en el apartado 4.4.4.1, la estabilidad del mensajero de *pmp1⁺*, depende de su unión a la proteína de unión a ARN Rnc1, que es fosforilada por Pmk1 (Sugiura *et al.*, 2003).

Además de Pmp1, las fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2, así como las fosfatasas de serina y treonina Ptc1 y Ptc3 son capaces de unirse y desfosforilar a Pmk1 *in vivo* (Madrid *et al.*, 2007) (Figura 4.4). El papel de cada una de estas fosfatasas en la regulación de la actividad de Pmk1 depende del estado fisiológico de las células. Pyp1 y Ptc1 regulan el nivel de fosforilación de Pmk1 tanto en condiciones basales como en respuesta a estrés osmótico, mientras que Pmp1 sólo lo hace en crecimiento vegetativo, y Pyp2 en respuesta a estrés osmótico (Madrid *et al.*, 2007).

4.5 Interconexión (“crosstalk”) entre las rutas de MAP quinasas de respuesta a estrés y de integridad celular en *S. pombe*

La ruta SAPK se activa específicamente en respuesta a estímulos como el ayuno de nitrógeno, presencia de metales pesados, baja temperatura, o la radiación ultravioleta, mientras que el estrés hipotónico o los daños en la pared celular solamente activan a la ruta de integridad celular (Warbrick y fantes, 1991; Shiozaki y Russell, 1995a, b; Millar *et al.*, 1995; Soto *et al.*, 2002; George *et al.*, 2007; Toda *et al.*, 1996; Sengar *et al.*, 1997; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997; Sugiura *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2000 Madrid *et al.*, 2006). Por el contrario, otros estreses ambientales como el choque hiperosmótico, la hipergravedad, el estrés oxidativo, el choque térmico, o el ayuno de glucosa promueven la activación de las dos rutas de señalización (Madrid *et al.*, 2007), lo que sugiere la existencia de algún tipo de interrelación funcional.

El primer punto de interconexión entre ambas rutas viene dado por las fosfatasas Pyp1, Pyp2, Ptc1 y Ptc3, cuya activación transcripcional es dependiente de la actividad de la ruta SAPK por medio de Sty1 y Atf1, y que además de regular negativamente a Sty1, son capaces de desfosforilar a Pmk1 (Figura 4.4 y 4.7) (Madrid *et al.*, 2007). Estudios posteriores confirmaron la relevancia de la ruta SAPK en la regulación negativa de la actividad de Pmk1 mediante la caracterización de la proteína ribosómica Cpc2, ortólogo a RACK1 (“*Receptor of Activated protein C Kinase*”) en eucariotas superiores. La unión de Cpc2 a la subunidad 40S del ribosoma es esencial para la traducción, entre otros, de los RNA mensajeros de Pyp1 y Pyp2 durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés (Figura 4.7), regulando el nivel de fosforilación de Sty1 y Pmk1 (Nuñez *et al.*, 2009).

Por último, el factor transcripcional Atf1 define un segundo punto de interacción entre ambas rutas en condiciones de estrés por daños en la pared celular y en la adaptación celular en ausencia de glucosa (Figura 4.7). En el primer caso, Atf1 es fosforilado tanto por Sty1 como por Pmk1 (Takada *et al.*, 2007). En el segundo, Pmk1 incrementa la actividad de la ruta SAPK activando a Atf1 y favoreciendo la transmisión de la señal aguas arriba de Sty1 (Madrid *et al.*, 2013). Ello sugiere que la ruta de integridad celular actúa como refuerzo de la ruta SAPK en el control de la supervivencia y adaptación celular frente a ciertas condiciones de estrés (Madrid *et al.*, 2013).

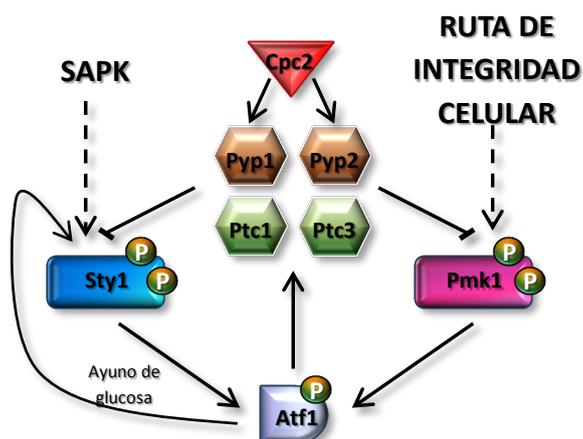


Figura 4.7 Interconexión (“crosstalk”) entre las rutas de respuesta a estrés y de integridad celular en *S. pombe*.

5. BIBLIOGRAFÍA

- A**damson, P., Marshall, C. J., Hall, A. y Tilbrook, P. A. (1992). Post-translational modifications of p21 rho proteins. *J. Biol. Chem.* **267**, 20033–20038.
- Ahearn, I.M., Haigis, K., Bar-Sagi, D., Philips, M.R. (2012).** Regulating the regulator: post614 translational modification of RAS. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**:39-51.
- Aicart-Ramos, C., Valero, R.A., Rodríguez-Crespo, I. (2011).** Protein palmitoylation and subcellular trafficking. *Biochim. Biophys. Acta* **1808**:2981-2994.
- Abrami, L., B.A. Kunz, I. Iacovache, y F.G. van der Goot (2008).** Palmitoylation and ubiquitination regulate exit of the Wnt signaling protein LRP6 from the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **105**: 5384–5389.
- Arellano, M., Durán, A. y Pérez, P. (1996).** Rho1 GTPase activates the (1-3)b-D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J.* **15**, 4584-4591.
- Arellano, M., Durán, A. y Pérez, P. (1997).** Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *J. Cell Sci.* **110** (Pt 20), 2547-2555.
- Arellano, M., Coll, P.M., Yang, W., Durán, A., Tamanoi, F., Pérez, P. (1998).** Characterization of the geranylgeranyl transferase type I from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **29**: 1357-1367.

Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Durán, A. y 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), 3569-3578.

Arellano, M., Coll, P. M. y 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., Cartagena-Lirola, H., Nasser Hajibagheri, M. A., Durán, A. y Valdivieso, M. H. (2000). Proper ascospore maturation requires the *chs1+* chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **35**, 79-89.

Asp, E., Nilsson, D., Sunnerhagen, P. (2008). Fission yeast mitogen activated protein kinase Sty1 interacts with translation factors. *Eukaryot. Cell*, **7** (2), 328-338.

Bannan, B.A., Van Etten, J., Kohler, J.A., Tsoi, Y., Hansen, N.M., Sigmon, S., Fowler, E., Buff, H., Williams, T.S., Ault, J.G., Glaser, R.L., Korey, C.A. (2008). The Drosophila protein palmitoylome: characterizing palmitoyl-thioesterases and DHHC palmitoyltransferases. *Fly (Austin)* **2**, 198-214.

Banuett, F. (1998). Signalling in the Yeasts: An Informational Cascade with Links to the Filamentous Fungi. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* Vol. **62**, No. 2: 249-274.

Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto, M., Cansado, J. (2008) Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* **20**: 748-757.

Berlanga, J.J., Rivero, D., Martín, R., Herrero, S., Moreno, S., de Haro, C. (2010). Role of mitogen-activated protein kinase Sty1 in regulation of eukaryotic initiation factor 2 alpha kinases in response to environmental stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell*, **9** (1), 194-207.

Bokoch, G.M., Bohl, B.P. y Chuang, T.H. (1994). Guanine nucleotide exchange regulates membrane translocation of Rac/ Rho GTP-binding proteins. *J. Biol. Chem.* **269**, 31674-31679.

Boulter, E., Estrach, S., García-Mata, R., Féral, C.C. (2012). Off the beaten paths: alternative and crosstalk regulation of Rho GTPases. *FASEB J.* **26**: 469-479.

Broadus, M.R. y Gould, K.L. (2012). Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Mol. Biol. Cell* **23** (20) 4118-4128.

Buck, V., Quinn, J., Soto, T., Martin, H., Saldanha, J., Makino, K., Morgan, B.A. y Millar, J.B.A. (2001). Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated Mitogen-activated Protein Kinase pathway. *Mol. Biol. Cell.* **12** (2), 407-419.

Bustelo, X.R., Sauzeau, V. y Berenjeno, I.M. (2007). GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays*, **29**: 356-370. doi: 10.1002/bies.20558.

- Cabib, E., Drgonova, J. y Drgon, T. (1998)** Role of small G proteins in yeast cell polarization and wall biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 307–333.
- Calonge, T.M., Arellano, M., Coll, P.M. y Pérez, P. (2003)** Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Microbiol.* **47**, 507–518.
- Casey, P.J., Solski, P.A., Der, C.J. y Buss, J.E. (1989)**. p21 ras is modified by a farnesyl isoprenoid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 8323–8327.
- Calonge, T.M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I. y Pérez, P. (2000)**. *Schizosaccharomyces pombe* rho2p GTPase regulates cell Wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Mol. Biol. Cell* **11**, 4393–4401.
- Chang, F. y Peter, M. (2003)** Yeasts make their mark. *Nat. Cell Biol.* **5**, 294–299.
- Chang, E.C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H.P. y Wigler, M.H. (1994)**. Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* **79**, 131–141.
- Chen, R.E. y Thorner, J. (2007)**. Function and regulation in MAPK signalling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Biochim. Biophys. Acta*, **1773** (8), 1311-1340.
- Chiu, V.K., Bivona, T., Hach, A., Sajous, J.B., Silletti, J., Wiener, H., Johnson 2nd, L., Cox, A.D., Philips, M.R. (2002)**. Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi, *Nat Cell Biol* **4** 343–350.
- Choy, E., Chiu, V.K., Silletti, J., Feoktistov, M., Morimoto, T., Michaelson, D., Ivanov, I.E. y Philips, M.R. (1999)**. Endomembrane trafficking of ras: the CAAX motif targets proteins to the ER and Golgi. *Cell*. **98**: 69–80.
- Cid, V.J., Cenamor, R., Sánchez, M. y Nombela, C. (1998)**. A mutation in the Rho1-GAP-encoding gene BEM2 of *Saccharomyces cerevisiae* affects morphogenesis and cell wall functionality. *Microbiology* **144**, 25–36.
- Clarke S., Vogel, J.P., Deschenes, R.J., Stock, J.B. (1988)**. Posttranslational modification of the Ha-ras oncogene protein: evidence for a third class of protein carboxyl methyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**: 4643–4647.
- Coll, P. M., Trillo, Y., Ametzazurra, A. y Pérez, P. (2003)** Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 313–323.
- Conibear E. y Davis, N.G. (2010)**. Palmitoylation and depalmitoylation dynamics at a glance. *J Cell Sci* **123**, 4007–4010.
- Cortés, J.C., Ishiguro, J., Durán, A. y Ribas, J.C. (2002)**. Localization of the (1,3)beta-D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is

involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J. Cell Sci.* **115**, 4081- 4096.

Cruz, S., Muñoz, S., Manjón, E., García, P., Sánchez, Y. (2013). The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *Microbiologyopen.* **2** (5):778-94.

Cushman, I. y Casey, P.J. (2009) Role of isoprenylcysteine carboxymethyltransferase-catalyzed methylation in Rho function and migration. *J. Biol. Chem.* **284**, 27964–27973.

Davis, R.J. (2000). Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell.* **103** (2), 239-252.

Degols, G., Shiozaki, K., Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.*, **16** (6), 2870-2877.

Degols, G. y Russell, P. (1997). Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **17**, 3353-3356.

Degols, G., Shiozaki, K. y Russell, P. (1996). Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell Biol.* **16**, 2870-2877.

Del Pozo, M. A., Alderson, N. B., Kiosses, W. B., Chiang, H. H., Anderson, R. G. y Schwartz, M.A. (2004). Integrins regulate Rac targeting by internalization of membrane domains. *Science* **303**, 839–842.

Del Pozo, M.A., Kiosses, W.B., Alderson, N.B., Meller, N., Hahn, K.M. y Schwartz, M.A. (2002). Integrins regulate GTP-Rac localized effector interactions through dissociation of Rho-GDI. *Nat. Cell Biol.* **4**, 232–239.

Del Pozo, M.A., Price, L.S., Alderson, N.B., Ren, X.D. y Schwartz, M.A. (2000). Adhesion to the extracellular matrix regulates the coupling of the small GTPase Rac to its effector PAK. *EMBO J.* **19**, 2008–2014.

Díaz-Cuervo, H. y Bueno, A. (2008). Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Flp1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Mol Biol Cell* **19**, 2488–2499.

Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., el-Sherbeini, M., et al. (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* FKS1 (ETG1) gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3-beta-D-glucan synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91** (26), 12907-12911.

Dube, N. y Tremblay, M.L. (2005). Involvement of the small protein tyrosine phosphatases TC-PTP and PTP1B in signal transduction and diseases: from diabetes, obesity to cell cycle, and cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, **1754** (1-2), 108-117.

Dunand-Sauthier, I., Walker, C.A., Narasimhan, J., Pearce, A.K., Wek, R.C., y Humphrey, T.C. (2005). Stress-activated protein kinase pathway functions to support protein synthesis and translational adaptation in response to environmental stress in fission yeast. *Eukaryot. Cell* **4** (11), 1785-1793.

Etienne-Manneville S. y Hall A. (2002). Rho GTPases in cell biology. *Nature* **420**: 629–635.

Farooq, A. y Zhou, M.M. (2004). Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cell. Signal.* **16**, 769-779.

Fukui, Y., Kozasa, T., Kaziro, Y., Takeda, T., Yamamoto, M. (1986). Role of a Ras homolog in the life cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell* **44**: 329-336.

Gaits, F., Shiozaki, K., y Russell, P. (1997). Protein phosphatase 2C acts independently of stress activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **272** (28), 17873-17879.

Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K. y Russell, P. (1998). Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev.* **12** (10), 1464-1473.

Gaits, F. y Russell, P. (1999). Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/Sty1 in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **10** (5), 1395-1407.

García P., Tajadura V., 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**: 721–731.

García, P., García, I., Marcos, F., Ruiz de Garibay, G. y 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**: 1321–1334.

García, P., Tajadura, V., García, I. y Sánchez, Y. (2006a) Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* **23**, 1031–1043.

García, I., Tajadura, V., Martín, V., Toda, T. y 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** (3), 836-53.

George, V.T., Brooks, G., Humphrey, T.C. (2007). Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **18** (10), 4168-4179.

Goodwin, J.S., Drake, K.R., Rogers, C., Wright, L., Lippincott-Schwartz, J., Philips, M.R. y Kenworthy, A.K. (2005). Depalmitoylated Ras traffics to and from the Golgi complex via a nonvesicular pathway. *J. Cell Biol.* **170**: 261–272.

Hagan, I.M. y 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), 343-357.

Hancock, J.F., Cadwallader, K., Paterson, H., Marshall, C.J. (1991b). A CAAX or a CAAL motif and a second signal are sufficient for plasma membrane targeting of ras proteins. *EMBO J.* **10**, 4033–4039.

Hancock, J.F., Cadwallader, K., Marshall, C.J. (1991a). Methylation and proteolysis are essential for efficient membrane binding of prenylated p21K-ras(B). *EMBO J* **10**, 641–646.

Hancock, J.F., Magee, A.I., Childs, J.E., Marshall, C.J. (1989). All Ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell* **57**, 1167–1177.

Hartmuth, S. y Petersen, J. (2009). Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *J. Cell Sci.*, **122** (Pt 11), 1737-1746.

Hayashi, T., Rumbaugh, G., Huganir, R.L. (2005). Differential regulation of AMPA receptor subunit trafficking by palmitoylation of two distinct sites. *Neuron* **47**, 709–723.

Heckman, D., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L. y Hedges, S.B. (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* **293**, 1129-1133.

Hill, C.S. y Treisman, R. (1995). Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell* **80** (2), 199-211.

Hirata, D., Nakano, K., Fukui, M., Takenaka, H., Miyakawa, T. y Mabuchi, I. (1998) Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role of a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *J. Cell Sci.* **111**, 149–159.

Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K. y Yamamoto, M. (2003) Gef1p and Scd1p, the two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **14**, 3617–3627.

Hochstenbach, F., Klis, F.M., van den Ende, H., van Donselaar, E., Peters, P.J. y Klausner, R.D. (1998). Identification of a putative α -glucan synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 9161-9166.

Hu, L.L., Wan, S.B., Niu, S., Shi, X.H., Li, H.P., Cai, Y.D., Chou, K.C. (2011). Prediction and analysis of protein palmitoylation sites. *Biochimie* **93** 489–496.

Hughes, SM. (1983). Are guanine nucleotide binding proteins a distinct class of regulatory proteins? *FEBS Lett.* **28**,164 (1):1-8.

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**(4), 181-191.

Jaffe, A.B. y Hall, A. (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **21**: 247–69.

James, T.Y., Kauff, F., Schoch, C.L., Matheny, P.B., Hofstetter, V., Cox, C.J., Celio, G., Gueidan, C., Fraker, E., Miadlikowska, J., Lumbsch, H.T., Rauhut, A., Reeb, V., Arnold, A.E., Amtoft, A., Stajich, J.E., Hosaka, K., Sung, G.H., Johnson, D., O'Rourke, B., Crockett, M., Binder, M., Curtis, J.M., Slot, J.C., Wang, Z., Wilson, A.W., Schüssler, A., Longcore, J.E., O'Donnell, K., Mozley-Standridge, S., Porter, D., Letcher, P.M., Powell, M.J., Taylor, J.W., White, M.M., Griffith, G.W., Davies, D.R., Humber R.A., Morton, J.B., Sugiyama, J., Rossman, A.Y., Rogers, J.D., Pfister, D.H., Hewitt, D., Hansen, K., Hambleton, S., Shoemaker, R.A., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Spotts, R.A., Serdani, M., Crous, P.W., Hughes, K.W., Matsuura, K., Langer, E., Langer, G., Untereiner, W.A., Lücking, R., Büdel, B., Geiser, D.M., Aptroot, A., Diederich, P., Schmitt, I., Schultz, M., Yahr, R., Hibbett, D.S., Lutzoni, F., McLaughlin, D.J., Johnson, D.I. (1999). Cdc42: An essential Rho-type GTPase controlling eukaryotic cell polarity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**(1), 54-105.

Jourdain I., Dooley H.C. y Toda T. (2012) Fission Yeast Sec3 Bridges the Exocyst Complex to the Actin Cytoskeleton. *Traffic* **13**: 1481–1495.

Jung, U.S. y Levin, D.E. (1999). Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Mol. Microbiol.* **34**,1049-1057.

Karin, M. y Hunter, T. (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* **1**, 747-757.

Katayama, M., Kawata, M., Yoshida, Y., Horiuchi, H., Yamamoto, T., Matsuura, Y. y Takai, Y. (1991). The posttranslationally modified C-terminal structure of bovine aortic smooth muscle rhoA p21. *J. Biol. Chem.* **266**, 12639–12645.

Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P. y Toda, T. (1999). Fission yeast α -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J. Cell Biol.* **144**, 1173-1186.

Kato, T., Okazaki, K., Murakami, H., Stettler, S., Fantes, P. y Okayama, H. (1996). Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS Lett.* **378**, 207-212.

Kita, A., Li, C., Yu, Y., Umeda, N., Doi, A., Yasuda, M., Ishiwata, S., Taga, A., Horiuchi, Y., Sugiura, R. (2011). Role of the small GTPase Rho3 in Golgi/endosome trafficking through functional interaction with adaptin in fission yeast. *PLoS One.* **6** (2): e16842.

Klis, F.M., Boorsma, A. y De Groot, P.W. (2006). Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23** (3), 185-202.

Krisak, L., Strich, R., Winters, R.S., Hall, J.P., Mallory, M.J., Kreitzer, D., Tuan, R.S., Winter, E. (1994). SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* **8** (18): 2151-61.

Lawrence, C.L., Maekawa, H., Worthington, J.L., Reiter, W., Wilkinson, C.R., Jones, N. (2007). Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *J. Biol. Chem.*, **282** (8), 5160- 5170.

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

Levental, I., Grzybek, M., Simons, K. (2010). Greasing their way: lipid modifications determine protein association with membrane rafts. *Biochemistry* **49**, 6305–6316.

Levin, D.E. (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **69**, 262-291.

Levin, D.E., Fields, F.O., Kunisawa, R., Bishop, J.M. y Thorner, J. (1990). A candidate protein kinase C gene PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell* **62**, 213 224.

Lin, D.T., Makino, Y., Sharma, K., Hayashi, T., Neve, R., Takamiya, K. y Huganir, R.L. (2009). Regulation of AMPA receptor extrasynaptic insertion by 4.1N, phosphorylation and palmitoylation. *Nat. Neurosci.* **12**: 879–887.

Linder M. y Deschenes R. (2004). Model organisms lead the way to protein palmitoyltransferases. *J Cell Sci.* **117** (Pt 4): 521-6.

Linder M. y Deschenes R. (2007). Palmitoylation: policing protein stability and traffic. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**: 74–84.

López-Avilés, S., Lambea, E., Moldon, A., Grande, M., Fajardo, A., Rodríguez-Gabriel, M.A., Hidalgo, E., Aligue, R. (2008). Activation of Srk1 by the mitogen-activated protein kinase Sty1/Spc1 precedes its dissociation from the kinase and signals its degradation. *Mol. Biol. Cell.* **19** (4), 1670-1679.

López-Avilés, S., Grande, M., González, M., Helgesen, A.L., Alemany, V., Sánchez-Piris, M., Bachs, O., Millar, J.B. y Aligue, R. (2005). Inactivation of the Cdc25 phosphatase by the stress activated Srk1 kinase in fission yeast. *Mol. Cell.* **17** (1), 49-59.

Loewith, R., Hubberstey, A. y Young, D. (2000). Skh1, the MEK component of the *mkh1* signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Cell Sci.* **113**, 153-160.

Ma, Y., Sugiura, R., Koike, A., Ebina, H., Sio, S.O., Kuno, T. (2011). Transient receptor potential (TRP) and Cch1-Yam8 channels play key roles in the regulation of cytoplasmic Ca²⁺ in fission yeast. *PLoS ONE* **6**: e22421.

Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama, Y., Sugiura, R. (2006). Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signalling in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **17**: 5028-5037.

MacNeill, S.A. y Fantes, P.A. (1997). Genetic and physiological analysis of DNA replication in fission yeast. *Methods Enzymol.* **283**, 440-459.

Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M., Cansado, J. (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **281**: 2033-2043.

Madrid, M., Fernández-Zapata, J., Sánchez-Mir, L., Soto, T., Franco, A., Vicente-Soler, J., Gacto, M., Cansado, J. (2013). Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. *BMC Microbiology* **11**; 13:34.

Madrid, M., Nuñez, A., Soto, T., Vicente-Soler, J., Gacto, M. (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**: 4405–4419.

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

Marshall, C.J. (1995). Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell* **80**, 179-185.

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

Martin, B.R. y Cravatt, B.F. (2009). Large-scale profiling of protein palmitoylation in mammalian cells, *Nat Methods* **6**, 135–138.

Martín, V., Ribas, J.C., Carnero, E., Durán, A., y Sánchez, Y. (2000). *bgs2+*, a sporulation specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol. Microbiol.* **38** (2), 308-321.

Martín, V., Rodríguez-Gabriel, M.A., McDonald, W.H., Watt, S., Yates, J.R. 3rd, Bähler, J. y Russell, P. (2006). Cip1 and Cip2 are novel RNA-recognition-motif proteins that counteract Csx1 function during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell.* **17** (3), 1176-1183.

Mata, J., Lyne, R., Burns, G. y Bähler, J. (2002). The transcriptional program of meiosis and sporulation in fission yeast. *Nat. Genet.* **32** (1),143-7.

Mata, J. y Nurse, P. (1997) tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast. *Cell* **89**, 939–950.

Matsuyama, A., Arai, R., Yashiroda, Y., Shirai, A., Kamata, A., Sekido, S., Kobayashi, Y., Hashimoto, A., Hamamoto, M., Hiraoka, Y., Horinouchi, S. y Yoshida, M. (2006). ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat. Biotechnol.* **24** (7), 841-847.

Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J. A., Nielsen, J. B. y Foor, F. (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast (1-3) β -D-glucan synthase. *Mol. Cell Biol.* **15** (10), 5671-5681.

Mellor, H. y Parker, P.J. (1998). The extended protein kinase C superfamily. *Biochem. J.* **332**, 281-292.

Merla, A. y Johnson, D.I. (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr. Genet.* **39** (4), 205-209.

Merla, A. y Johnson, D. I. (2000) The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.* **79**, 469–477.

Millar, J.B.A., Buck, V. y Wilkinson, M.G. (1995). Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes Dev.* **9**, 2117-2130.

Miller, P.J. y Johnson, D.I. (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized cell growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **14** (2), 1075-1083.

Mitchell, DA., Hamel, LD., Ishizuka, K., Mitchell, G., Schaefer, LM., Deschenes, RJ. (2012). The Erf4 subunit of the yeast Ras palmitoyl acyltransferase is required for stability of the acyl-Erf2 intermediate and palmitoyl transfer to a Ras2 substrate. *J. Biol. Chem.* **287**: 34337-34348.

Mitchinson, M. (1970). Methods in Cell Physiology. *Academic Press. New York.* **4**: 131.

Morigasaki, S., Ikner, A., Tatebe, H., Shiozaki, K. (2013). Response regulator-mediated MAPKKK heteromer promotes stress signaling to the Spc1 MAPK in fission yeast. *Mol Biol Cell.* **24** (7): 1083-92.

Morrell-Falvey, J. L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G. D. y Gould, K. L. (2005) Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J. Cell Sci.* **118**, 5563–5573.

Mutoh, T., Nakano, K. y Mabuchi, I. (2005) Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 are involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* **10**, 1189–1202.

Nakano, K. y Mabuchi, I. (1995). Isolation and sequencing of two cDNA clones encoding Rho proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Gene* **155** (1), 119-122.

Nakano, K., Arai, R. y Mabuchi, I. (1997). The small GTP-binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **2**, 679–694.

Nakano, K., Mutoh, T. y Mabuchi, I. (2001). Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* **6**, 1031–1042.

Nakano, K., Imai, J., Arai, R., Toh, E. A., Matsui, Y. y Mabuchi, I. (2002). The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J. Cell Sci.* **115**, 4629–4639.

Nguyen, A.N. y Shiozaki, K. (1999). Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine- specific phosphatases. *Genes Dev.* **13** (13), 1653-1663.

Nguyen, A.N., Ikner, A.D., Shiozaki, M., Warren, S.M. y Shiozaki, K. (2002). Cytoplasmic localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Mol. Biol. Cell* **13** (8), 2651-2663.

Niederberger, C. y Schweingruber, M.E. (1999). A *Schizosaccharomyces pombe* gene, *ksg1*, that shows structural homology to the human phosphoinositide-dependent protein kinase PDK1, is essential for growth, mating and sporulation. *Mol. Gen. Genet.*, **261**, 177-183.

Núñez, A., Franco, A., Madrid, M., Soto, T., Vicente, J., Gacto, M., Cansado, J. (2009). Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **20** (18), 3996-4009.

Ohno, Y., Kihara, A., Sano, T. y Igarashi, Y. (2006). Intracellular localization and tissue specific distribution of human and yeast DHHC cysteine-rich domain-containing proteins. *Biochim Biophys Acta* **1761**, 474–483.

Onken, B., Wiener, H., Philips, MR., Chang, EC. (2006). Compartmentalized 632 signaling of Ras in fission yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 9045-9050.

Ozaki, K., Tanaka, K., Imamura, H., Hihara, T., Kameyama, T., Nonaka, H., Hirano, H., Matsuura, Y. y Takai, Y. (1996). Rom1p and Rom2p are GDP/GTP exchange proteins (GEPs) for the Rho1p small GTP binding protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **15**, 2196–2207.

Papadopoulou, K., Ng, S. S., Ohkura, H., Geymonat, M., Sedgwick, S. G. y McInerney, C. J. (2008). Regulation of gene expression during M-G1- phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors. *J. Cell Sci.* **121**, 38–47.

Paul, A., Wilson, S., Belham, C.M., Robinson, C.J., Scott, P.H., Gould, G.W. y Plevin, R. (1997). Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cell Signal.* **9** (6), 403-410.

Pérez, P. y Ribas, J.C. (2004). Cell wall analysis. *Methods* **33** (3), 245-251.

Pérez, P. y Rincón, S.A. (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem. J.* **426**, 243–253.

Pérez, P. y Cansado, J. (2010). Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Curr. Protein Pept. Sci.* **11**: 680-692.

Petersen, J. y Hagan, I.M. (2005). Polo kinase links the stress pathway to cell cycle control and tip growth in fission yeast. *Nature*, **435** (7041), 507-512.

Petersen, J. y Nurse, P. (2007). TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nat. Cell Biol.*, **9** (11), 1263-1272.

Pinar, M., Coll, P. M., Rincón, S. A. y Pérez, P. (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pxl1 is a paxillin homologue that modulates Rho1 activity and participates in cytokinesis. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1727–1738.

Qadota, H., Python, C. P., Inoue, S. B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D. E. y Ohya, Y. (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- β -glucan synthase. *Science* **272**, 279–281.

Quinn, M. T., Evans, T., Loetterle, L. R., Jesaitis, A. J. y Bokoch, G. M. (1993). Translocation of Rac correlates with NADPH oxidase activation. Evidence for equimolar translocation of oxidase components. *J. Biol. Chem.* **268**, 20983–20987.

Quinn, J., Findlay, V.J., Dawson, K., Millar, J.B.A., Jones, N., Morgan, B.A. y Toone, W.M. (2002). Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Biol. Cell* **13** (3), 805-816.

Ren J., Wen L., Gao X., Jin C., Xue Y., Yao X. (2008). CSS-Palm 2.0: an updated software for palmitoylation sites prediction. *Protein Eng Des Sel* **21**, 639–644.

Resh, M.D. (1999). Fatty acylation of proteins: new insights into membrane targeting of myristoylated and palmitoylated proteins. *Biochim Biophys Acta* **1451**, 1–16.

- Resh, M.D. (2004).** Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins, *Subcell Biochem* **37**, 217–232.
- Ribas, J.C., Díaz, M., Durán, A. y Pérez, P. (1991).** Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3) β -D-glucan. *J. Bacteriol.* **173**, 3456-3462.
- Rincón, S.A., Santos, B. y Pérez, P. (2006).** Fission yeast Rho5p GTPase is a functional paralogue of Rho1p that plays a role in survival of spores and stationary-phase cells. *Eukaryot. Cell* **5** (3), 435-446.
- Rincón, S. A., Ye, Y., Villar-Tajadura, M. A., Santos, B., Martin, S. G. y Pérez, P. (2009).** Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol. Biol. Cell* **20**, 4390–4399.
- Rincón, S.A., Estravís, M., Pérez, P. (2014).** Cdc42 regulates polarized growth and cell integrity in fission yeast. *Biochem Soc Trans.* **42** (1): 201-5.
- Roberts, P.J., Mitin, N., Keller, P.J., Chenette, E.J., Madigan, J.P., Currin, R.O., Cox, A.D., Wilson, O., Kirschmeier, P., Der, C.J. (2008).** Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J. Biol. Chem.* **283**: 25150-25163.
- Rodríguez-Gabriel, M.A., Burns, G., McDonald, W.H., Martín, V., Yates, J.R. 3rd., Bähler, J. y Russell, P. (2003).** RNA-binding protein Csx1 mediates global control of gene expression in response to oxidative stress. *EMBO J.* **1**, 6256-6266.
- Rodríguez-Gabriel, M.A. y Russell, P. (2005).** Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot. Cell*, **4** (8), 1396-1402.
- Rodríguez-Gabriel, M.A., Watt, S., Bahler, J., Russell, P. (2006).** Upf1, an RNA helicase required for nonsense-mediated mRNA decay, modulates the transcriptional response to oxidative stress in fission yeast. *Mol. Cell Biol.*, **26** (17), 6347-6356.
- Rocks, O., Peyker, A., Kahms, M., Verveer, P.J., Koerner, C., Lumbierres, M. Kuhlmann, J., Waldmann, H., Wittinghofer, A., Bastiaens, P.I. (2005).** An acylation cycle regulates localization and activity of palmitoylated Ras isoforms. *Science* **307** 1746–1752.
- Rocks, O., Gerauer, M., Vartak, N., Koch, S., Huang, Z.P., Pechlivanis, M., Kuhlmann, J., Brunsveld, L., Chandra, A., Ellinger, B., Waldmann, H., Bastiaens, P.I. (2010).** The palmitoylation machinery is a spatially organizing system for peripheral membrane proteins, *Cell* **141**, 458–471.
- Roth, A.F., Wan, J., Bailey, A.O., Sun, B., Kuchar, J.A., Green, W.N., Phinney, B.S., Yates, J.R., Davis, N.G (2006).** Global analysis of protein palmitoylation in yeast. *Cell* **125**, 1003–1013.
- Roy, S., Plowman, S., Rotblat, B., Prior, I.A., Muncke, C., Grainger, S., Parton, R.G., Henis, Y.I., Kloog, Y. y Hancock J.F. (2005).** Individual palmitoyl residues serve distinct roles in H-ras trafficking, microlocalization and signaling. *Mol. Cell. Biol.* **25**: 6722–6733.

- S**alaun, C., Greaves, J., Chamberlain, L.H. (2010). The intracellular dynamic of protein palmitoylation. *J. Cell. Biol.* **191**: 1229-1238.
- Samejima, I., Mackie, S. y Fantes, P.A. (1997). Multiple modes of activation of the stress responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *EMBO J.* **16**, 6162-6170.
- Sánchez-Piris, M., Posas, F., Alemany, V., Winge, I., Hidalgo, E., Bachs, O. y Aligue, R. (2002). The serine/threonine kinase Cmk2 is required for oxidative stress response in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **277** (20), 17722-17727.
- Sanso, M., Gogol, M., Ayte, J., Seidel, C., Hidalgo, E. (2008). Transcription factors Pcr1 and Atf1 have distinct roles in stress and Sty1-dependent gene regulation. *Eukaryot. Cell*, **7** (5), 826-835.
- Santos, B., Martín-Cuadrado, A. B., Vázquez de Aldana, C. R., del Rey, F. y Pérez, P. (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryotic Cell* **4**, 1639–1645.
- Santos, J.L. y Shiozaki, K. (2001). Fungal histidine kinases. *Sci. STKE*, (98), re1.
- Satoh, R., Morita, T., Takada, H., Kita, A., Ishiwata, S., Doi, A., Hagihara, K., Taga, A., Matsumura, Y., Tohda, H., Sugiura, R. (2009). Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **20** (9), 2473-2485.
- Sayers, L.G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T. y Parker, P.J. (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells* **5** (1), 17-27.
- Schaeffer, H.J. y Weber, M.J. (1999). Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol. Cell. Biol.* **19** (4), 2435-2444.
- Schmelzle, T., Helliwell, S. B. y Hall, M. N. (2002). Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 1329–1339.
- Sengar, A.S., Markley, N.A., Marini, N.J. y Young, D. (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3508-3519.
- Shieh, J.C., Wilkinson, M.G., Buck, V., Morgan, B., Makino, K. y Millar, J.B.A. (1997). The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes Dev.* **11**, 1008-1022.
- Shiozaki, K. y Russell, P. (1995a). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J.* **14** (3), 492-502.

Shiozaki, K. y Russell, P. (1995b). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* **378**, 739-743.

Shiozaki, K. y Russell, P. (1996). Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes Dev.* **10**, 2276-2288.

Shiozaki, K., Shiozaki, M. y Russell, P. (1997). Mcs4 mitotic catastrophe suppressor regulates the fission yeast cell cycle through the Wik1-Wis1-Spc1 kinase cascade. *Mol. Biol. Cell* **8** (3), 409-419.

Shiozaki, K., Shiozaki, M. y Russell, P. (1998). Heat Stress activates fission yeast Spc1/Sty1 MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Mol. Biol. Cell* **9** (6), 1339-1349.

Sipiczki, M. (2000). Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome Biol.* **1** (2): reviews 1011.1.

Smith, D.A., Toone, W.M., Chen, D., Bähler, J., Jones, N., Morgan, B.A. y Quinn, J. (2002). The Srk1 protein kinase is a target for the Sty1 stress-activated MAPK in fission yeast. *J. Biol. Chem.* **277** (36), 33411-33421.

Songyang, Z., Lu, K.P., Kwon, Y.T., Tsai, L.H., Filhol, O., Cochet, C., Brickey, D.A., Soderling, T.R., Bartleson, C., Graves, D.J., DeMaggio, A.J., Hoekstra, M.F., Blenis, J., Hunter, T., Cantley, L.C. (1996). A structural basis for substrate specificities of protein Ser/Thr kinases: primary sequence preference of casein kinases I and II, NIMA, phosphorylase kinase, calmodulin-dependent kinase II, CDK5, and Erk1. *Mol Cell Biol.* **11**: 6486-93.

Soto, T., Beltrán, F.F., Paredes, V., Madrid, M., Millar, J.B.A., Vicente-Soler, J., Cansado, J. y Gacto, M. (2002). Cold induces Stress-Activated Protein Kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Biochem.* **269**, 1-10.

Soto, T., Núñez, A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M. y Cansado, J. (2007). Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology* **153**, 1519–1529.

Soto, T., Villar-Tajadura, M.A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Cansado, J., Santos, B. y Pérez, P. (2010). Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* **285**: 11516–11525.

Spatafora, J.W. y Vilgalys, R. (2006). Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* **443** (7113): 818-22.

Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M. y Kuno, T. (1998). *pmp1+*, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *EMBO J.* **17** (1), 140- 148.

Sugiura, R., Toda, T., Dhut, S., Shuntoh, H. y Kuno, T. (1999). The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* **399**, 479-483.

Sugiura, R., Kita, A., Shimizu, Y., Shuntoh, H., Sio, S.O. y Kuno, T. (2003). Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature* **424**, 961-965.

Tajadura, V., García B., García, I., García, P. y Sánchez Y. (2004). *Schizosaccharomyces pombe* Rgf3p is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall beta-glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J. Cell Sci.* **117**: 6163–6174.

Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., Tohda, H., Giga-Hama, Y., Kuno, T., Sugiura, R. (2007). Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **18** (12), 4794-4802.

Takada, H., Nishida, A., Domae, M., Kita, A., Yamano, Y., Uchida, A., Ishiwata, S., Fang, Y., Zhou, X., Masuko, T., Kinoshita, M., Kakehi, K., Sugiura, R. (2010). The cell surface protein gene *ecm33+* is a target of the two transcription factors Atf1 and Mbx1 and negatively regulates Pmk1 MAPK cell integrity signaling in fission yeast. *Mol. Biol. Cell*, **21** (4), 674-685.

Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R., Shiozaki, K. (2008). Pom1 DYRK regulates localization of the 733 Rga4 GAP to ensure bipolar activation of Cdc42 in fission yeast. *Curr. Biol.* **18**: 322-330.

Toda, T., Shimanuki, M. y Yanagida, M. (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J.* **12** (5), 1987-1995.

Toda T., Dhut, S., Superti-Furga, G., Gotoh, Y., Nishida, E., Sugiura, R. y Kuno, T. (1996). The fission yeast *pmk1+* gene encodes a novel mitogen-activated protein kinase homolog which regulates cell integrity and functions coordinately with the protein kinase C pathway. *Mol. Cell Biol.* **16**, 6752-6764.

Treisman, R. (1996). Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **8**, 205-215.

Valdez-Taubas, J. y Pelham H. (2005). Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J.* **24**: 2524–2532.

Vetter I.R. y Wittinghofer A. (2001). The Guanine Nucleotide-Binding Switch in Three Dimensions *Science* **294**, 1299-1304. doi: 10.1126/science.1062023.

Viana, R.A., Pinar, M., Soto, T., Coll, P.M., Cansado, J., Pérez, P. (2013). Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics* **195**: 421–32.

Villar-Tajadura, M. A., Coll, P. M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B. y Pérez, P. (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol. Microbiol.* **70**, 867–881.

Vojtek, A.B. y Cooper, J.A. (1995). Rho Family Members: Activators of MAP Kinase Cascades. *Cell*, Vol. **62**, 527-529.

Warbrick, E. y Fantes, P. (1991). The Wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* **10** (13), 4291-4299.

Wang, Y., Xu, H.P., Riggs, M., Rodgers, L. y Wigler, M. (1991). *byr2*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene encoding a protein kinase capable of partial suppression of the *ras1* mutant phenotype. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 3554–3563.

Wang, H., Tang, X., Balasubramanian, M.K. (2003). Rho3p regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics.* **164**: 1323-1331.

Wennerberg K., Rossman K.L. y Der C.J. (2005). The Ras superfamily at a glance. *Journal of Cell Science* **118**, 843-846.

Wilkinson, M.G., Samuels, M., Takeda, T., Toone, M.W., Shieh, J., Toda, T., Millar, J.B.A. y Jones, N. (1996). The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes Dev.* **10** (18), 2289-2301.

Williams, M.J. y Rottner, K. (2010). Introduction to Small GTPases. *Small GTPases* **1:1**, 1-1.

Willumsen, B.M., Christensen, A., Hubbert, N.L., Papageorge, A.G., Lowy, D.R. (1984). The p21 ras C-terminus is required for transformation and membrane association. *Nature* **310** (5978):583-6.

Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., y *et al.* (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **415**, 871-880.

Wright L.P. y Philips, M.R. (2006). Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J. Lipid Res.* **47**: 883–891.

Yamamoto, A., Imai, I. y Watanabe, Y. (1997). Mating and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Review. Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 1035-1106.

Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, X. y Marcus, S. (2003). The novel Rho GTPase-activating protein family protein, Rga8, provides a potential link between Cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* **278**, 48821–48830.

Yen, H.C.S., Gordon, C. y Chang, E.C. (2003). *Schizosaccharomyces pombe* Int6 and Ras homologs regulate cell division and mitotic fidelity via the proteasome. *Cell* **112**, 207–217.

Young, E., Zheng, Z.Y., Wilkins, A.D., Jeong, H.T., Li, M., Lichtarge, O., Chang, E.C. (2014). Regulation of Ras localization and cell transformation by evolutionarily conserved palmitoyltransferases. *Mol. Cell. Biol.* **34**: 374–385.

Yount, J.S., Moltedo, B., Yang, Y.Y., Charron, G., Moran, T.M., Lopez, C.B., Hang, H.C. (2010). Palmitoylome profiling reveals S-palmitoylation-dependent antiviral activity of IFITM3. *Nat Chem Biol* **6**, 610–614.

Zaitsevskaya-Carter, T. y Cooper, J.A. (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO J.* **16**, 1318-1331.

Zhang, M.M., Wu, P.Y., Kelly, F.D., Nurse, P., Hang, H.C. (2013). Quantitative control of protein S-palmitoylation regulates meiotic entry in fission yeast. *PLoS Biol.* **11**: e1001597.

OBJETIVOS

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Numerosos estudios han destacado la importancia de las rutas de señalización mediadas por MAP quinasas (proteínas quinasas activadas por mitógenos, MAPK) en la respuesta de las células eucariotas frente a distintos estímulos ambientales y situaciones de estrés. La levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* constituye un excelente modelo para el estudio de las señales y circuitos moleculares que promueven la activación de las MAP quinasas, debido a que se encuentra evolutivamente más próxima a organismos superiores que al resto de levaduras. El desarrollo de la presente Tesis se ha centrado en el estudio de la ruta de integridad celular y su elemento central, la MAP quinasa Pmk1, cuya actividad es fundamental para la regulación de la construcción de la pared celular, la citocinesis, la morfogénesis, la fusión de vacuolas durante el estrés hipotónico, y la homeostasis iónica.

Hasta la realización de este trabajo, los únicos elementos que se había demostrado que actúan aguas arriba del módulo de MAP quinasas de dicha ruta eran la GTPasa Rho2 y el ortólogo de la PKC Pck2. Rho2 es un miembro de la superfamilia de GTPasas Ras que regulan un importante número de procesos esenciales en organismos eucariotas. Su falta de función o sobre-activación provoca numerosas patologías, como la diabetes o el cáncer, lo que hace que sean objeto de un amplio campo de investigación. A pesar de que Rho2 y Pck2 son los únicos activadores conocidos de la ruta de integridad celular, Pmk1 puede ser activada en respuesta a ciertos estímulos ambientales en su ausencia, lo que sugiere la existencia de otros elementos reguladores de la ruta. La GTPasa esencial Rho1 se ha propuesto como posible activador aguas arriba de la ruta de MAP quinasas de integridad celular, dada su capacidad para rescatar parcialmente alguno de los fenotipos asociados a la ausencia de Rho2. Además, ambas GTPasas interactúan *in vivo* con Pck1 y Pck2, los dos ortólogos de la PKC presentes en *S. pombe*. Al contrario de Pck2, resultados previos apuntaban a que Pck1 era sin embargo un regulador negativo de la ruta.

Rho2 sufre una serie de modificaciones lipídicas *in vivo* en el motivo -CAAX de su extremo carboxilo terminal que incluyen la farnesilación del residuo de cisteína-197, lo que permite su anclaje a la membrana plasmática y el desarrollo de su función biológica. Sin embargo, la presencia de una cisteína adicional en posición inmediatamente anterior a la cisteína prenilada sugiere que Rho2 se encuentra palmitoilado en dicho residuo, tal como sucede en Rho GTPasas humanas como RhoB, TC10/RhoQ, o Rac1. La palmitoilación es un proceso dinámico y reversible de gran interés biológico, ya que constituye un mecanismo regulador de la unión de proteínas a membranas así como de la compartimentalización de su actividad biológica.

Por último, múltiples estudios han puesto de manifiesto la importancia de la localización subcelular de los distintos componentes de los módulos de MAP quinasas en la respuesta celular frente al estrés. En el caso de la ruta de integridad celular, mientras que Mkh1 (MAPKK quinasa) y Pek1 (MAPK quinasa) son proteínas citoplasmáticas, Pmk1 (MAP quinasa) muestra una localización núcleo/citoplasmática constitutiva, así como en el huso mitótico, el corpúsculo polar del huso, y el septo durante la separación celular. Sin embargo, a diferencia del modelo clásico descrito en ERK1/2 en mamíferos, la localización subcelular de Pmk1 no se modifica en respuesta a estrés, lo que indica que tanto la forma activa como inactiva de la MAP quinasa son capaces de entrar en el núcleo. Todo ello nos llevó a cuestionar cuál es la verdadera relevancia biológica de la localización nuclear de Pmk1.

En base a los antecedentes descritos, nos planteamos el abordaje los siguientes objetivos:

- 1- Estudio del papel de Rho1 y Pck1 como activadores de la ruta de integridad celular en *S. pombe*.

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de este objetivo han sido publicados en el artículo: *Rho1 GTPase and PKC Ortholog Pck1 Are Upstream Activators of the Cell Integrity MAPK Pathway in Fission Yeast (2014), PLoS One 9:e88020.*

- 2- Papel de la palmitoilación de Rho2 sobre su localización subcelular y la regulación de la ruta de integridad celular.

Las evidencias obtenidas tras el desarrollo de este objetivo han sido publicadas en el artículo: *Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity MAPK pathway, Molecular and Cellular Biology (2014), Molecular and Cellular Biology doi:10.1128/MCB.01515-13 (aceptado/en prensa).*

- 3- Estudio de la relevancia de la localización nuclear de Pmk1 sobre su actividad biológica.

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de este objetivo han sido publicados en el artículo: *Biological Significance of Nuclear Localization of Mitogen-activated Protein Kinase Pmk1 in Fission Yeast (2012), Journal of Biological Chemistry 287: 26038-26051.*

PUBLICACIONES



Publicación 1:

Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast

Laura Sánchez-Mir, Teresa Soto, Alejandro Franco, Marisa Madrid, Raúl A. Viana, Jerónima Vicente, Mariano Gacto, Pilar Pérez, José Cansado.

Enero 2014

PLoS ONE 9(1): e88020. doi:10.1371/journal.pone.0088020

Publicación 1:***Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast.***

Laura Sánchez-Mir, Teresa Soto, Alejandro Franco, Marisa Madrid, Raúl A. Viana, Jerónima Vicente, Mariano Gacto, Pilar Pérez, José Cansado.

PLoS ONE 9(1): e88020. doi:10.1371/journal.pone.0088020

Abstract

In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* the cell integrity pathway (CIP) orchestrates multiple biological processes like cell wall maintenance and ionic homeostasis by fine tuning activation of MAPK Pmk1 in response to various environmental conditions. The small GTPase Rho2 positively regulates the CIP through protein kinase C ortholog Pck2. However, Pmk1 retains some function in mutants lacking either Rho2 or Pck2, suggesting the existence of additional upstream regulatory elements to modulate its activity depending on the nature of the environmental stimulus. The essential GTPase Rho1 is a candidate to control the activity of the CIP by acting upstream of Pck2, whereas Pck1, a second PKC ortholog, appears to negatively regulate Pmk1 activity. However, the exact regulatory nature of these two proteins within the CIP has remained elusive. By exhaustive characterization of strains expressing a hypomorphic Rho1 allele (rho1-596) in different genetic backgrounds we show that both Rho1 and Pck1 are positive upstream regulatory members of the CIP in addition to Rho2 and Pck2. In this new model Rho1 and Rho2 control Pmk1 basal activity during vegetative growth mainly through Pck2. Notably, whereas Rho2-Pck2 elicit Pmk1 activation in response to most environmental stimuli, Rho1 drives Pmk1 activation through either Pck2 or Pck1 exclusively in response to cell wall damage. Our study reveals the intricate and complex functional architecture of the upstream elements participating in this signaling pathway as compared to similar routes from other simple eukaryotic organisms.

<http://www.plosone.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pone.0088020>

Publicación 2:

***Rho2 palmitoylation is required for
plasma membrane localization and proper
signaling to the fission yeast cell integrity
MAPK pathway***

Laura Sánchez-Mir, Alejandro Franco, Rebeca Martín-García,
Marisa Madrid, Jerónima Vicente, Teresa Soto, Mariano Gacto,
Pilar Pérez, José Cansado.

Mayo 2014

Molecular and Cellular Biology, doi:10.1128/MCB.01515-13.

Publicación 2:***Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity MAPK pathway.***

Laura Sánchez-Mir, Alejandro Franco, Rebeca Martín-García, Marisa Madrid, Jerónima Vicente, Teresa Soto, Mariano Gacto, Pilar Pérez, José Cansado.

Molecular and Cellular Biology. doi:10.1128/MCB.01515-13.

Abstract

The fission yeast small GTPase Rho2 regulates morphogenesis and is an upstream activator of the cell integrity pathway, whose key element, mitogen-activated protein kinase (MAPK) Pmk1, becomes activated by multiple environmental stimuli and controls several cellular functions. Here we demonstrate that farnesylated Rho2 becomes palmitoylated in vivo at cysteine-196 within its carboxyl end and that this modification allows its specific targeting to the plasma membrane. Unlike that of other palmitoylated and prenylated GTPases, the Rho2 control of morphogenesis and Pmk1 activity is strictly dependent upon plasma membrane localization and is not found in other cellular membranes. Indeed, artificial plasma membrane targeting bypassed the Rho2 need for palmitoylation in order to signal. Detailed functional analysis of Rho2 chimeras fused to the carboxyl end from the essential GTPase Rho1 showed that GTPase palmitoylation is partially dependent on the prenylation context and confirmed that Rho2 signaling is independent of Rho GTP dissociation inhibitor (GDI) function. We further demonstrate that Rho2 is an in vivo substrate for DHHC family acyltransferase Erf2 palmitoyltransferase. Remarkably, Rho3, another Erf2 target, negatively regulates Pmk1 activity in a Rho2-independent fashion, thus revealing the existence of cross talk whereby both GTPases antagonistically modulate the activity of this MAPK cascade.

<http://mcb.asm.org/content/early/2014/05/06/MCB.01515-13>

Publicación 3:

Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast

Laura Sánchez-Mir, Alejandro Franco, Marisa Madrid, Jerónima Vicente, M. Antonia Villar-Tajadura, Teresa Soto, Pilar Pérez, Mariano Gacto, José Cansado.

Junio 2012

Journal of Biological Chemistry 287: 26038-26051.

doi: 10.1074/jbc.M112.345611

Publicación 3:***Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast.***

Laura Sánchez-Mir, Alejandro Franco, Marisa Madrid, Jerónima Vicente, M. Antonia Villar-Tajadura, Teresa Soto, Pilar Pérez, Mariano Gacto, José Cansado.

Journal of Biological Chemistry 287: 26038-26051. doi: 10.1074/jbc.M112.345611

Abstract

Mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways play a fundamental role in the response of eukaryotic cells to environmental changes. Also, much evidence shows that the stimulus-dependent nuclear targeting of this class of regulatory kinases is crucial for adequate regulation of distinct cellular events. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, the cell integrity MAPK pathway, whose central element is the MAPK Pmk1, regulates multiple processes such as cell wall integrity, vacuole fusion, cytokinesis, and ionic homeostasis. In nonstressed cells Pmk1 is constitutively localized in both cytoplasm and nucleus, and its localization pattern appears unaffected by its activation status or in response to stress, thus questioning the biological significance of the presence of this MAPK into the nucleus. We have addressed this issue by characterizing mutants expressing Pmk1 versions excluded from the cell nucleus and anchored to the plasma membrane in different genetic backgrounds. Although nuclear Pmk1 partially regulates cell wall integrity at a transcriptional level, membrane tethered Pmk1 performs many of the biological functions assigned to wild type MAPK like regulation of chloride homeostasis, vacuole fusion, and cellular separation. However, we found that down-regulation of nuclear Pmk1 by MAPK phosphatases induced by the stress activated protein kinase pathway is important for the fine modulation of extranuclear Pmk1 activity. These results highlight the importance of the control of MAPK activity at subcellular level.

<http://www.jbc.org/content/287/31/26038.long>

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. Conclusiones específicas

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de la presente Tesis han permitido extraer las siguientes conclusiones, que se presentan agrupadas de acuerdo con los objetivos propuestos inicialmente.

Objetivo 1. Estudio sobre el papel de Rho1 y Pck1 como activadores de la ruta de integridad celular en *S. pombe*.

Conclusiones:

- En *S. pombe* la GTPasa Rho1 regula positivamente la ruta de integridad celular durante el crecimiento vegetativo de forma alternativa a Rho2, y empleando al ortólogo a PKC Pck2 como su principal diana.
- Pck2 es el principal regulador positivo de la ruta de integridad celular, mientras que la participación de Pck1 en dicha ruta está limitada a la respuesta celular frente al daño en la pared celular.
- Pck1 es diana de Rho1 durante la activación de Pmk1 en respuesta a estrés de pared celular, aunque podría actuar independientemente de Rho1 en otros contextos biológicos.
- Rho1 promueve la supervivencia celular frente al daño en la pared celular mediante mecanismos dependientes e independientes de la activación de la ruta de integridad celular.

Objetivo 2. Papel de la palmitoilación de Rho2 sobre su localización subcelular y la regulación de la ruta de integridad celular.

Conclusiones:

- La GTPasa Rho2 se encuentra palmitoilada *in vivo* en el residuo de cisteína-196 situado en su extremo C-terminal.
- La palmitoilación de Rho2 favorece su localización preferente en la membrana plasmática, aunque no influye sobre su actividad GTPasa.

- La palmitoilación y localización de Rho2 en la membrana plasmática es necesaria para el control de la morfogénesis, y una correcta señalización hacia la ruta de MAP quinasas de integridad celular durante el crecimiento vegetativo y en respuesta a estrés.
- La inclusión de secuencias polibásicas en el extremo carboxilo terminal de Rho2 interfiere con su palmitoilación dependiendo del contexto de prenilación.
- La GDI Rdi1 regula negativamente la actividad de la ruta de integridad celular mediante un mecanismo independiente de Rho2.
- La palmitoil transferasa de la familia DHHC Erf2 es la principal responsable de la palmitoilación *in vivo* de Rho2.
- Rho2 y Rho3 son palmitoiladas *in vivo* por Erf2, y regulan la actividad de la ruta de integridad celular de manera antagónica.

Objetivo 3. Estudio de la relevancia de la localización nuclear de Pmk1 sobre su actividad biológica.

Conclusiones:

- El/los mecanismo/s responsable/s de la entrada al núcleo de las formas activas e inactivas de Pmk1 son independientes de la maquinaria de importe nuclear y de la presencia de secuencias de localización nuclear.
- La exclusión nuclear de Pmk1 provoca un incremento en su estado basal de fosforilación debido a la ausencia de regulación negativa en dicho compartimento celular por las fosfatasa Pyp1, Pyp2, y Ptc1.
- La exclusión nuclear de Pmk1 no afecta a la regulación de la fusión de vacuolas en respuesta a estrés hipotónico, y tampoco tiene un gran impacto sobre la dinámica de activación de la MAPK en respuesta a estrés, excepto en condiciones de choque térmico.
- Aunque la regulación de la homeostasis iónica y de la separación celular son ejercidas por formas extra-nucleares de Pmk1, su presencia en el núcleo es necesaria para una regulación fina de ambos procesos.

- Pmk1 regula parcialmente la respuesta celular frente al estrés por daño en la pared celular modulando la actividad del factor transcripcional Mbx1 a nivel nuclear.

2. Conclusiones generales

La unificación de los resultados y conclusiones obtenidos nos llevan a proponer las siguientes conclusiones generales:

- 1) La GTPasa Rho1 y el ortólogo de PKC Pck1 son miembros de la ruta de integridad celular en *S. pombe* además de los activadores previamente conocidos Rho2 y Pck2. Estos resultados ponen de manifiesto la naturaleza compleja y ramificada de los mecanismos de señalización que operan aguas arriba de esta ruta de señalización.
- 2) En la levadura con fisión, la GTPasa Rho2 se encuentra palmitoilada *in vivo*, siendo esta modificación crítica para su correcta localización en la membrana plasmática y para ejecutar su papel regulador de la morfogénesis y de la ruta de integridad celular.
- 3) A diferencia de los organismos superiores, la localización nuclear de Pmk1 no es crítica en *S. pombe* para ejercer sus funciones biológicas. Sin embargo su presencia en el núcleo es necesaria para la regulación fina de algunas de estas funciones a nivel transcripcional. Estas resaltan la importancia del control de la actividad de las MAP quinasas a nivel espacio-temporal.

