



UNIVERSIDAD DE MURCIA

ESCUELA INTERNACIONAL DE DOCTORADO

Caracterización de las rutas de MAP quinasas de
respuesta a estrés e integridad celular, y su interacción
funcional con otras vías de señalización intracelular en
Schizosaccharomyces pombe

Dña. Beatriz Vázquez Marín

2017

Caracterización de las rutas de MAP quinasas de
respuesta a estrés e integridad celular, y su interacción
funcional con otras vías de señalización intracelular 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 Molecular y Biotecnología, por
la Graduada **Beatriz Vázquez Marín**.

Murcia, 28 de Septiembre de 2017

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

- Marisa Madrid, Beatriz Vázquez-Marín, Teresa Soto, Alejandro Franco, Elisa Gómez-Gil, Jerónima Vicente-Soler, Mariano Gacto, Pilar Pérez, José Cansado (2017). *Differential functional regulation of PKC orthologs in fission yeast*. The Journal of biological chemistry jbc.M117.786087.
- Marisa Madrid, Beatriz Vázquez-Marín, Alejandro Franco, Teresa Soto, Jerónima Vicente-Soler, Mariano Gacto, José Cansado (2016). *Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast*. Scientific reports 6:37515.
- Beatriz Vázquez-Marín, Teresa Soto, Javier Encinar del Dedo, Alejandro Franco, Jerónima Vicente-Soler, Elena Hidalgo, Mariano Gacto, José Cansado, Marisa Madrid (2015). *Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast*. Cellular signalling 27:2534-2542.

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

- **Título del proyecto:** “Interacción entre las rutas de MAP quinasas de integridad celular y otras vías de señalización intracelular en la levadura con fisión”
Referencia: BFU2014-52828-P
Entidad financiadora: MINECO
Entidades participantes: Universidad de Murcia.
- **Título del proyecto:** “Activación Diferencial de Isoformas de PKC y papel regulador de la ruta de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe*”
Referencia: 19346/PI/14
Entidad financiadora: Fundación Séneca (Región de Murcia)
Entidades participantes: Universidad de Murcia.
- **Título del proyecto:** “Determinantes de membrana implicados en rutas de señalización mediadas por MAP quinasas en la levadura con fisión”
Referencia: FU2011-22517
Entidad financiadora: MINECO
Entidades participantes: Universidad de Murcia

ABREVIATURAS

AA: Aminoácido

AG: Aparato de Golgi

AMPK: “*AMP-activated protein kinase*” o Proteína activada por AMP

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

ATP: Adenosina 5'-trifosfato

BSA: “*Bovine Seric Albumin*” o Albúmina sérica bovina

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

CIP: Ruta de MAP quinasas de integridad celular

CRE: “*cAMP-Response Element*” o Elemento de respuesta a AMPc.

DAG: Diacilglicerol

DMSO: Dimetil sulfóxido

DNA: *Deoxyribonucleic acid* o Ácido Desoxirribonucleico

DNTP: Deoxirribonucleótidos trifosfato

D.O.: Densidad Óptica en nm

DSP: “*Dual Specificity Phosphatase*” o Fosfatasa de especificidad dual

DTT: Ditioneitol

EDTA: “*EtilenDiaminTetracetic Acid*” o Ácido etilendiaminotetraacético

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

ESR: “*Environmental Stress Response*” o Respuesta a estrés ambiental

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

GDP: Guanosina 5'-difosfato

GEF: “*GTP Exchange Factor*” o Factor intercambiador de GTP

GFP: “*Green Fluorescent Protein*” o Proteína verde fluorescente

GST: Glutation 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-hidroxiethyl) piperazin-N'-(2-etanolulfónico)

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 mitógenos

Mb: Megabases en una secuencia de DNA

MIN: Minutos

MKP: Fosfatasa de MAP quinasa

MP: membrana plasmática

mTOR: "*Mammalian target of Rapamycin*" o Diana de rapamicina en células de mamíferos

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 (OverExpression)

ORF: “*Open Reading Frame*” o Fase de lectura abierta

P: ortofosfato

PAGE: “*Polyacrilamide Gel Electrophoresis*” o Electroforésis en gel de poliacrilamida

Pb: Pares de bases de 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

PLC: Fosfolipasa C

PLD: Fosfolipasa D

PP2C: “*Serine/Threonine Phosphatase*” o Fosfatasa de serina y treonina

PPasa: Fosfatasa

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

PTP: “*Tyrosine phosphatase*” o Fosfatasa de tirosina

r.p.m.: Revoluciones por minuto

RACK: “*Receptor for Active C protein kinase*” o Receptor para protein quinasa C activa

RE: Retículo Endoplasmático

RNA: *Ribonucleic acid* o Ácido Ribonucleico

mRNA: *Messenger Ribonucleic acid* o Ácido Ribonucleico mensajero

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

SD: “*Standart Desviation*” o Desviación Estándar

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

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

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

TOR: “*Target of Rapamycin*” o Diana de rapamicina

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 inmunosupresor FK506 e ión cloro

WT: “*Wild Type*” o Estirpe salvaje

w/v: peso/volumen

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

RESUMEN

Las rutas de señalización intracelular mediadas por proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) juegan un papel fundamental en la respuesta adaptativa de las células eucariotas frente a alteraciones ambientales. La levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* presenta una gran versatilidad para la realización de análisis genómicos, bioquímicos, y celulares, constituyendo un excelente modelo para ampliar nuestros conocimientos sobre los procesos de señalización mediados por MAPKs, debido a la gran homología funcional que existe entre sus circuitos reguladores y los de organismos superiores.

Diversos estudios han puesto de manifiesto la importancia de las proteínas quinasas C (PKCs) en múltiples procesos fisiológicos ya que regulan múltiples vías de señalización celular. En mamíferos, se ha demostrado que, independientemente de su actividad catalítica, la unión de ATP a la PKC promueve un cambio conformacional que la predispone a sufrir las modificaciones necesarias para su maduración y estabilidad. Las dos proteínas ortólogas a PKC, Pck1 y Pck2, son activadores aguas arriba del módulo de MAP quinasas de integridad celular, y actúan de forma redundante en *S. pombe* controlando funciones esenciales incluyendo morfogénesis, y la biosíntesis de la pared celular. En base a esto, tratamos de identificar los mecanismos responsables de la maduración, activación catalítica y estabilización de Pck1 y Pck2, analizando la fosforilación de Pck1 y Pck2 en el bucle de activación y en los motivos de giro e hidrofóbico en versiones de mutantes de ambas proteínas. Los resultados obtenidos revelaron que, contrariamente a Pck2, la fosforilación *in vivo* de Pck1 en el bucle de activación, motivo de giro y motivo hidrofóbico es esencial para regular la estabilidad de la quinasa y sus funciones biológicas. Por otra parte, las PKCs poseen un motivo pseudosustrato (PS) que mantiene a la enzima en una conformación cerrada y autoinhibida. Este motivo bloquea la cavidad de unión al sustrato y protege a la quinasa de la desfosforilación a los sitios de fosforilación en AL, TM y HM dentro del dominio catalítico. La delección del dominio PS o una mutación puntual en el residuo conservado de alanina por un glutámico cargado negativamente, hace que la quinasa sea constitutivamente activa tanto *in vivo* como *in vitro*. Tanto Pck1 como Pck2 también poseen sendos dominios PS, por lo que decidimos estudiar la estabilidad y señalización mediada por versiones mutantes de Pck1 y Pck2 en el motivo pseudosustrato. Así, la activación constitutiva de Pck2 promovió su desfosforilación y desestabilización, mientras que incrementó los niveles de Pck1 e interfirió con la señalización aguas abajo de la ruta CIP regulada por Pck2. Por último, también hemos demostrado que mientras que la actividad catalítica es esencial para la función biológica de Pck1, una versión catalíticamente inactiva de Pck2 es parcialmente funcional.

Por otra parte, trabajos previos han sugerido que la respuesta a estrés mediada por la ruta de MAP quinasas de integridad celular (CIP) es regulada a distintos niveles mediante su interacción con otras importantes vías de señalización intracelular, entre las que se encuentra la ruta TOR, que participa en

la adaptación celular frente a cambios nutricionales y ambientales. La presente Tesis ha utilizado un enfoque multidisciplinar que combina técnicas genéticas, bioquímicas, y de biología celular, con el fin de estudiar las interacciones funcionales de las rutas CIP y TOR durante el control del crecimiento, la morfogénesis y las respuestas celulares frente al estrés. Para ello investigamos el posible papel de la GTPasa Rhy1 como modulador de la actividad de TORC2 durante la síntesis de Pck2 en respuesta a estrés y de la quinasa Gad8 como diana de TORC2 durante la síntesis *de novo* de Pck2 en estas condiciones. Además, hemos estudiado la relevancia de Pmk1 como regulador negativo de la señalización dependiente de TOR2C-Gad8 durante la respuesta a estrés y los mecanismos responsables de dicho control. Así, hemos podido concluir que Rhy1 activa la ruta de integridad celular (CIP) y la MAPK Pmk1 mediante dos mecanismos distintos. El primero involucra a los complejos TORC2-Gad8 y TORC1-Psk1, los cuales promueven la síntesis de Pck2 en respuesta al estrés por daño en la pared celular o tras el ayuno de glucosa. En el segundo mecanismo Rhy1 activa a Pmk1 de forma independiente de TORC2 regulando la localización y/o tráfico en la membrana plasmática de activadores aguas arriba de la cascada de MAPKs, entre los que se encuentran el ortólogo de PDK-1 Ksg1 y el GEF de Rho1 Rgf1. Finalmente, hemos confirmado que Pmk1 actúa aguas arriba de Rhy1 para inhibir la señalización de TORC2 en respuesta a estrés, aunque el mecanismo responsable de dicha regulación es todavía desconocido.

En *Schizosaccharomyces pombe* las MAP quinasas de respuesta a estrés Sty1 (ruta SAPK) y de integridad celular Pmk1 (ruta CIP) controlan múltiples aspectos del ciclo de vida de esta levadura, incluyendo la morfogénesis, el ciclo celular y la respuesta frente a distintas situaciones de estrés. A diferencia de otras proteínas quinasas, la activación catalítica de las MAP quinasas por las MAPK quinasas depende de su fosforilación dual en dos residuos de tirosina y treonina del motivo conservado -TXY- (donde "X" es glicina en Sty1/P-38, o ácido glutámico en Pmk1/ERK). En la presente Tesis planteamos el estudio de la posible relevancia biológica de las formas monofosforilables de las MAP quinasas Sty1 y Pmk1 mediante el estudio de su fosforilación *in vivo* en cepas que expresan las versiones mutantes monofosforilables en los residuos de treonina, tirosina o ambos residuos. Los resultados obtenidos han permitido concluir la existencia *in vivo* de formas monofosforiladas en tirosina o treonina de Sty1 y Pmk1. Sorprendentemente, las cepas que expresan versiones de Sty1 y Pmk1 monofosforiladas en tirosina mostraron un notable incremento en el grado de fosforilación basal en dicho residuo en comparación con las versiones silvestres. Este fenómeno fue debido a un bloqueo ("*trapping*") del sitio de anclaje por parte de sus respectivas MAPKKs, Wis1 y Pek1, lo que impide la interacción de la Sty1 y/o Pmk1 con reguladores negativos (fosfatasas), y otros sustratos. Por otra parte, las cepas que expresan versiones de Sty1 o Pmk1 monofosforilables en treonina mostraron una notable capacidad para suprimir la mayoría de los defectos asociados a la falta de ambas MAPKs, como alteraciones en la progresión del ciclo celular y la citoquinesis, pared celular desestructurada, y sensibilidad frente estrés (térmico, osmótico, oxidativo). Sin embargo, el grado de supresión fue

siempre menor que el observado cuando se expresan las versiones silvestres de ambas MAPKs. En base a estas observaciones proponemos un modelo en el que las formas biológicamente activas de Sty1 y Pmk1 son esencialmente las formas fosforiladas en treonina. Sin embargo en dicho modelo la fosforilación inicial en tirosina actúa como “cebador”, permitiendo que la posterior fosforilación en treonina (activación catalítica) sea adecuada tanto en magnitud como en duración. Estas observaciones confirman el papel clave que ejerce la fosforilación en el residuo de tirosina para la activación catalítica de ambas MAP quinasas.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características Generales de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	1
1.1.1. Ciclo de vida de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2
1.2. La Proteína Quinasa Dependiente de Fosfoinosítidos	4
1.3. Las Proteínas Quinasas C	6
1.3.1. Proteínas quinasas C (PKCs) en organismos superiores	7
1.3.1.1. Isoenzimas de la PKC	7
1.3.1.2. Localización de las PKCs.....	7
1.3.1.3. Estructura de las PKCs.....	8
1.3.1.3.1. Dominio pseudosustrato (PS).....	9
1.3.1.3.2. Dominio C1	9
1.3.1.3.3. Dominio C2.....	10
1.3.1.3.4. Región V3	11
1.3.1.3.5. Dominio PB1.....	11
1.3.1.3.6. Dominio Catalítico	11
1.3.1.4. Regulación de la PKC	12
1.3.1.4.1. Regulación por fosforilación.....	12
1.3.1.4.2. Regulación por cofactores.....	16
1.3.1.4.3. Regulación independiente de segundos mensajeros.....	17
1.3.1.4.4. Regulación por unión a proteínas de anclaje.....	17
1.3.1.4.5. Regulación por desfosforilación	18
1.3.1.4.6. Regulación por proteólisis.....	18
1.3.1.5. Maduración de la PKC	19
1.3.1.6. La PKC como proteína de anclaje (“ <i>Scaffold protein</i> ”).....	20
1.3.1.7. Proteínas quinasas asociadas a Rho (“ <i>PKC-Related kinases o PRKs</i> ”)	21

1.3.2. Proteínas quinasas C en levaduras modelo.....	21
1.3.2.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	21
1.3.2.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	23
1.4. La ruta TOR (“Target of rapamycin”)	24
1.4.1. Conservación evolutiva de la ruta de señalización TOR.....	25
1.4.2. Estructura de las quinasas TOR.....	25
1.4.3. TOR en organismos superiores	26
1.4.3.1. Características generales	26
1.4.3.1.1. mTORC1	26
1.4.3.1.2. mTORC2.....	27
1.4.3.2. Reguladores aguas arriba de mTOR	29
1.4.3.2.1. Regulación de mTORC1 por el Complejo TSC1-TSC2	29
1.4.3.2.2. Regulación de mTORC1 por Rheb	30
1.4.3.2.3. Regulación de mTORC1 por Rag	30
1.4.3.2.4. Regulación de mTORC2 por Rab6	31
1.4.3.3. Efectores de mTOR.....	32
1.4.3.3.1. mTORC1	32
1.4.3.3.2. mTORC2.....	32
1.4.3.4. mTOR y la regulación de la síntesis de proteínas	33
1.4.4. TOR en levaduras modelo.....	36
1.4.4.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
1.4.4.1.1. Características generales	36
1.4.4.1.1.1. TORC1	36
1.4.4.1.1.2. TORC2.....	37
1.4.4.1.2. Reguladores de TOR en <i>S. cerevisiae</i>	39
1.4.4.1.2.1. Regulación de TORC1 por el complejo EGO.....	39
1.4.4.1.3. Efectores de TOR en <i>S. cerevisiae</i>	40

1.4.4.1.3.1. TORC1	40
1.4.4.1.3.2. TORC2	42
1.4.4.1.4. Procesos celulares regulados por TOR en <i>S. cerevisiae</i>	43
1.4.4.2. <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	44
1.4.4.2.1. Características generales	44
1.4.4.2.1.1. TORC1	45
1.4.4.2.1.2. TORC2	46
1.4.4.2.2. Reguladores de TOR en <i>S. pombe</i>	48
1.4.4.2.2.1. Regulación de TORC1 por Tsc1-Tsc2/Rhb1	48
1.4.4.2.2.1. Regulación de TORC2 por Ryl1	49
1.4.4.2.3. Efectores de TOR en <i>S. pombe</i>	50
1.4.4.2.3.1. TORC1	50
1.4.4.2.3.1. TORC2	51
1.4.4.2.4. Procesos celulares regulados por TOR en <i>S. pombe</i>	52
1.5. Metabolismo de Fosfoinosítidos en <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.....	54
1.6. Las rutas de MAP quinasas.....	55
1.6.1. Organización de las rutas de MAP quinasas	55
1.6.1.1. Sensores	55
1.6.1.2. Módulo de MAP quinasas.....	55
1.6.1.3. Efectores de MAP quinasas	56
1.6.1.4. Reguladores de MAP quinasas.....	56
1.6.2. Mecanismos de regulación de la fosforilación dual de las MAP quinasas.....	56
1.6.3. Conservación evolutiva	57
1.6.4. Ruta de MAPKs de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i>	59
1.6.4.1. Sensores	59
1.6.4.2. Regulador de respuesta Mcs4.....	59
1.6.4.3. Módulo de MAP quinasas.....	60

1.6.4.3.1. MAPKK quinasa Wak1 y Win1.....	60
1.6.4.3.2. MAPK quinasa Wis1.....	60
1.6.4.3.3. MAP quinasa Sty1.....	60
1.6.4.4. Efectores de la ruta SAPK.....	61
1.6.4.5. Reguladores negativos de la ruta SAPK	61
1.6.5. Ruta de MAP quinasas de integridad celular en <i>S. pombe</i>	63
1.6.5.1. Sensores	63
1.6.5.2. Reguladores aguas arriba del módulo de MAP quinasas	63
1.6.5.2.1. Las GTPasas Rho1 y Rho2 y los ortólogos de PKC Pck1 y Pck2	63
1.6.5.3. Módulo de MAP quinasas.....	65
1.6.5.3.1. MAPKK quinasa Mkh1.....	65
1.6.5.3.2. MAPK quinasa Pek1	66
1.6.5.3.3. MAP quinasa Pmk1.....	67
1.6.5.4. Efectores de la ruta de integridad celular.....	68
1.6.5.4.1. Proteínas de unión a RNA: Rnc1 y Nrd1	68
1.6.5.4.2. Factores de transcripción: Atf1 y Mbx1.....	68
1.6.5.4.3. Canal iónico: Cch1-Yam8.....	69
1.6.5.4.4. Proteínas reguladoras del ciclo celular: Clp1	70
1.6.5.5. Regulación negativa de la ruta de integridad celular	70
1.6.6. Interconexión (“crosstalk”) entre las rutas de MAP quinasas de respuesta a estrés y de integridad celular.....	70
1.6.7. Interacción funcional entre el complejo TORC2 y la ruta de integridad celular.....	71
2. <u>BIBLIOGRAFÍA</u>	
2.1. Bibliografía	73
3. <u>OBJETIVOS</u>	
3.1. Justificación y Objetivos.....	99
4. <u>PUBLICACIONES</u>	

1- Differential functional regulation of PKC orthologs in fission yeast	101
2- Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast.	102
3- Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast	103
5. <u>CONCLUSIONES</u>	
5.1. Conclusiones específicas	104
5.2. Conclusiones generales	105

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

INTRODUCCIÓN

Tabla 1.1. Clasificación taxonómica de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2
Tabla 1.2. Clasificación de las isoformas de PKC, estructura y mecanismo de activación (AL: <i>activation loop</i> ; TM: <i>turn motif</i> ; HM: <i>hydrofobic motif</i>)	8
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>Schizosaccharomyces pombe</i>	3
Figura 1.3. Mecanismo de activación de AKT/PKB y SGK1 por PDK-1	6
Figura 1.4. Estructura de las isoformas de PKC en humanos	10
Figura 1.5. Alineación de las secuencias del bucle de activación de los dominios catalíticos de las distintas isoformas de PKC, PKN, PKB, PKA, S6K y RSK. En verde se marcan las regiones DFG y TPD, y en rojo el sitio fosforilable del bucle de activación.....	14
Figura 1.6. Alineación de las secuencias del motivo de giro y motivo hidrofóbico del dominio catalítico de las distintas isoformas de PKC, PKN, PKB, PKA, S6K y RSK. En rojo se marcan los residuos de fenilalanina del motivo hidrofóbico, y en verde y azul el residuo fosforilable del motivo de giro e hidrofóbico, respectivamente.....	16
Figura 1.7. Modelo de regulación de la PKC desde su biosíntesis a su degradación.....	20
Figura 1.8. Estructura de las isoformas de PKC en <i>S. pombe</i> y <i>S. cerevisiae</i>	23
Figura 1.9. Estructura de mTOR	25
Figura 1.10. Composición y función de los complejos mTORC1 y mTORC2 en mamíferos... ..	28
Figura 1.11. Regulación de mTORC1.....	31
Figura 1.12. Control de la capacidad y eficacia traduccional por mTORC1	34
Figura 1.13. Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en <i>S. cerevisiae</i>	38
Figura 1.14. Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en <i>S. pombe</i>	47
Figura 1.15. Regulación de la señalización de TORC2 a través de la GTPasa Ryl1	50
Figura 1.16. Esquema general del metabolismo de fosfoinosítidos	54
Figura 1.17. El módulo de MAP quinasas y la transmisión de señales.....	57
Figura 1.18. Conservación evolutiva de las rutas de MAP quinasas	58
Figura 1.19. La ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en <i>S. pombe</i>	62

Figura 1.20. La ruta de MAP quinasas de integridad celular en <i>S. pombe</i>	66
Figura 1.21. Regulación antagónica de la concentración de Ca^{+2} intracelular por parte de Pmk1 y Ppb1.....	69
Figura 1.22. Interconexión (“croostalk”) entre las rutas de respuesta a estrés y de integridad celular en <i>S. pombe</i>	71
Figura 1.23. Interacción entre las rutas TOR y de integridad celular en <i>S. pombe</i>	72

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características Generales de *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* (Figura 1.1) fue aislada por primera vez por Linder en 1893 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 cepas 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).

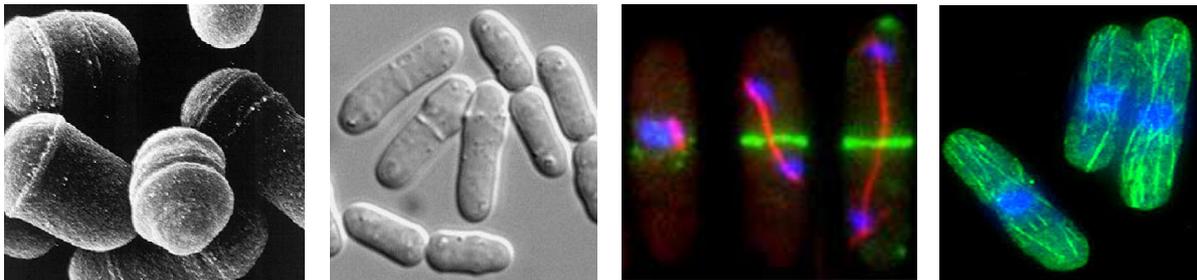


Figura 1.1 Imágenes de la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* mediante diversas técnicas microscópicas.

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 (Heckman *et al.*, 2001; Sipiczki, 2000), 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.

El genoma de *S. pombe* está totalmente secuenciado (3 cromosomas, ~14 Mb) (Wood y Bahler, 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 RNA, 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.

DOMINIO	<i>Eukarya</i>
REINO	<i>Mycota</i>
SUBREINO	<i>Neomycota</i>
FILO	<i>Ascomycota</i>
SUBFILO	<i>Archiascomycotina</i> (<i>Taphrimycotina</i>)
CLASE	<i>Schizosaccharomycetes</i> <i>Taphrinomycetes</i>
ORDEN	<i>Schizosaccharomycetales</i>
FAMILIA	<i>Schizosaccharomycetaceae</i>
GÉNERO	<i>Schizosaccharomyces</i>
ESPECIE	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>

Tabla 1.1 Clasificación taxonómica de *Schizosaccharomyces pombe*.

1.1.1. Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces 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.

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, 1949). Cuando las condiciones ambientales lo permiten, las esporas germinan y entran nuevamente en el ciclo mitótico (Yamamoto *et al.*, 1997) (Figura 1.2).

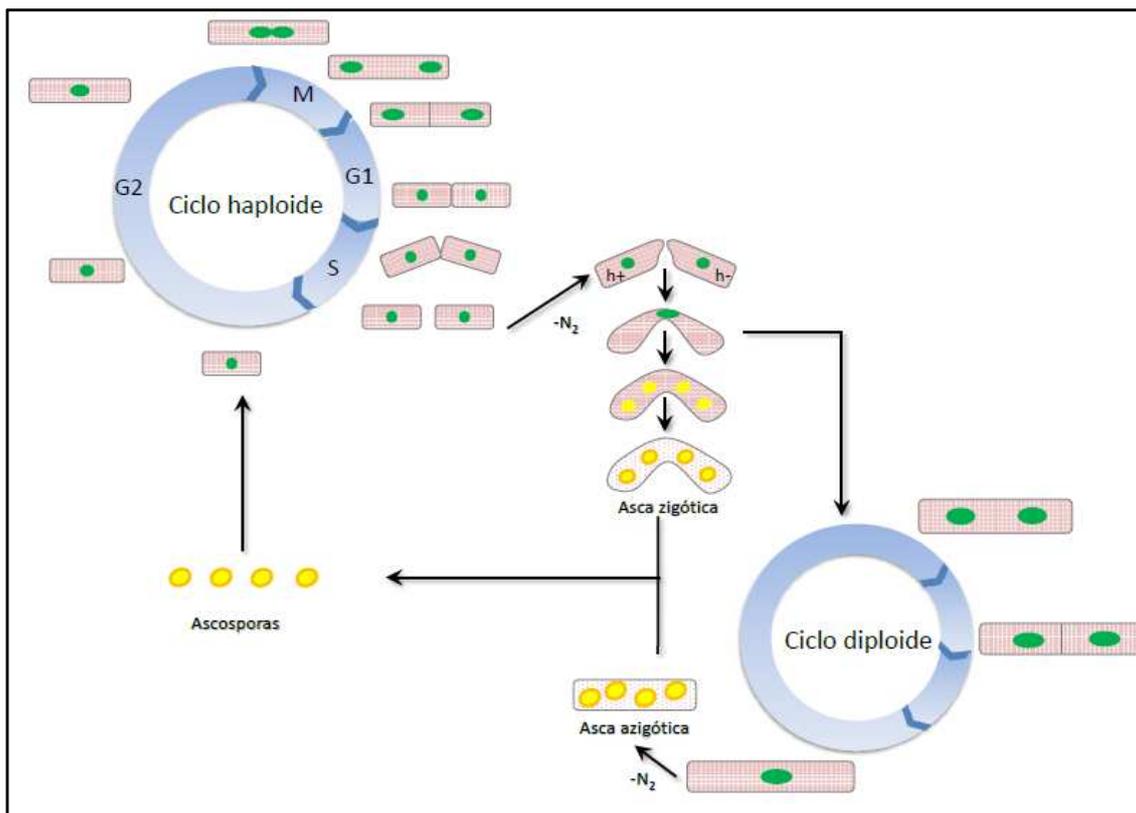


Figura 1.2 Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*.

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 conjugación, 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 RNA y proteínas necesarias para la duplicación del ADN. En esta fase las células inician el ciclo sexual en caso de limitación de nutrientes. 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.

1.2. La Proteína Quinasa Dependiente de Fosfoinosítidos

La proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos-1 (PDK-1) está implicada en la regulación del crecimiento, la proliferación, el metabolismo y la supervivencia celulares. Asimismo, PDK-1 regula la migración celular a diferentes niveles, desde la polarización celular hasta el citoesqueleto de actina y la regulación de la adhesión focal (Gagliardi *et al.*, 2015). En ratones la falta de PDK-1 es letal causando defectos en tejidos derivados de la cresta neural y desarrollo del cerebro anterior, así como un ensamblaje defectuoso del sistema vascular funcional (Lawlor *et al.*, 2002).

En humanos el gen que codifica la PDK-1 se encuentra localizado en el cromosoma 16p.3.3, y se traduce en una proteína citosólica de 556 aminoácidos con un dominio catalítico N-terminal y un dominio C-terminal con homología a pleckstrina (PH). De manera similar a otras AGC quinasas, PDK-1 contiene un sitio de fosforilación dentro del bucle de activación (Serina 241), que está

constitutivamente fosforilado por una reacción de autofosforilación en *trans* (Wick *et al.*, 2003). Por lo tanto, la quinasa PDK-1 se considera constitutivamente activa. PDK-1 es la quinasa responsable de la fosforilación de AKT/PKB en el residuo de treonina 308 del bucle de activación, lo cual es esencial para su activación (Alessi *et al.*, 1997).

PDK-1 activa a sus sustratos mediante diferentes mecanismos (Mora *et al.*, 2004). En el caso de AKT/PKB, PDK-1 se localiza en la membrana plasmática debido a la interacción de su dominio PH con fosfatidilinositol (3,4, 5) trifosfato (PIP₃) (y en menor medida con fosfatidilinositol (3,4) bifosfato, PIP₂) producido por PI3K y, por tanto, interactúa físicamente con AKT/PKB (Currie *et al.*, 1999). AKT/PKB se activa después de su anclaje a la membrana plasmática a través de la unión de su dominio PH a PIP₃, donde es fosforilado en el bucle de activación por PDK-1 y su motivo hidrofóbico por una quinasa desconocida. A continuación, se forma un bolsillo hidrofóbico en el dominio catalítico mediante la estabilización de la hélice α C resultando en la unión intramolecular del motivo hidrofóbico fosforilado a este sitio lo que asegura que PKB alcance y mantenga su máxima actividad (Figura 1.3) (Yang *et al.*, 2002a; Yang *et al.*, 2002b). En el caso de sustratos que carecen de un dominio PH (p70S6K, SGK, p90RSK e isoformas de PKC) el proceso de activación es independiente de PIP₃. PDK-1 posee un bolsillo PIF (“*PDK-1 interacting fragment*”) en el dominio quinasa que permite su interacción con el motivo hidrofóbico fosforilado de las quinasas dianas y la consecuente fosforilación de su bucle de activación (Balendran *et al.*, 1999; Biondi *et al.*, 2000; Collins *et al.*, 2003).

En la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* existen dos ortólogos a PDK-1 denominados Ksg1 y Pdk1. Ksg1 juega un papel esencial en el crecimiento celular, la conjugación, y la esporulación (Niederberger and Schweingruber, 1999), mientras que Pdk1, que carece del dominio PH, está implicada en los procesos de mitosis y citoquinesis (Bimbo *et al.*, 2005). Ksg1 presenta un 56% de homología estructural con la PDK-1 humana en las regiones de unión a ATP, centro activo, e interacción con sustratos, mientras que dominio PH se encuentra menos conservado (Niederberger and Schweingruber, 1999). Así, el dominio PH de Ksg1 carece de determinados aminoácidos que en PDK-1 son críticos para su unión a PIP₃ (Ferguson *et al.*, 2000). Varios estudios han demostrado que Ksg1 es la quinasa responsable de la fosforilación de los residuos conservados Thr387 del bucle de activación de Gad8 (ortóloga de AKT) (Matsuo *et al.*, 2003a), Thr356 del bucle de activación de Pka1 (ortóloga de PKA) (Tang and McLeod, 2004), y Ser248 de Psk1 (Nakashima *et al.*, 2012). Asimismo, previamente se había demostrado en *S. pombe* Ksg1 interacciona con los ortólogos de PKC Pck1 y Pck2 en ensayos de dos híbridos (Graub *et al.*, 2003), y que su pérdida parcial de actividad provoca graves defectos morfológicos que sugieren un papel regulador de la integridad celular en este organismo (Graub *et al.*, 2003). Recientemente, Madrid y colaboradores han demostrado que Ksg1 actúa como un regulador positivo de la ruta de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe* a través de su interacción con Pck2, que constituye el principal activador aguas arriba del módulo de

MAP quinasas. En concreto, Ksg1 fosforila a Pck2 *in vivo* en el residuo conservado de Thr842 de su bucle de activación (Barba et al., 2008; Ma et al., 2006; Madrid et al., 2015).

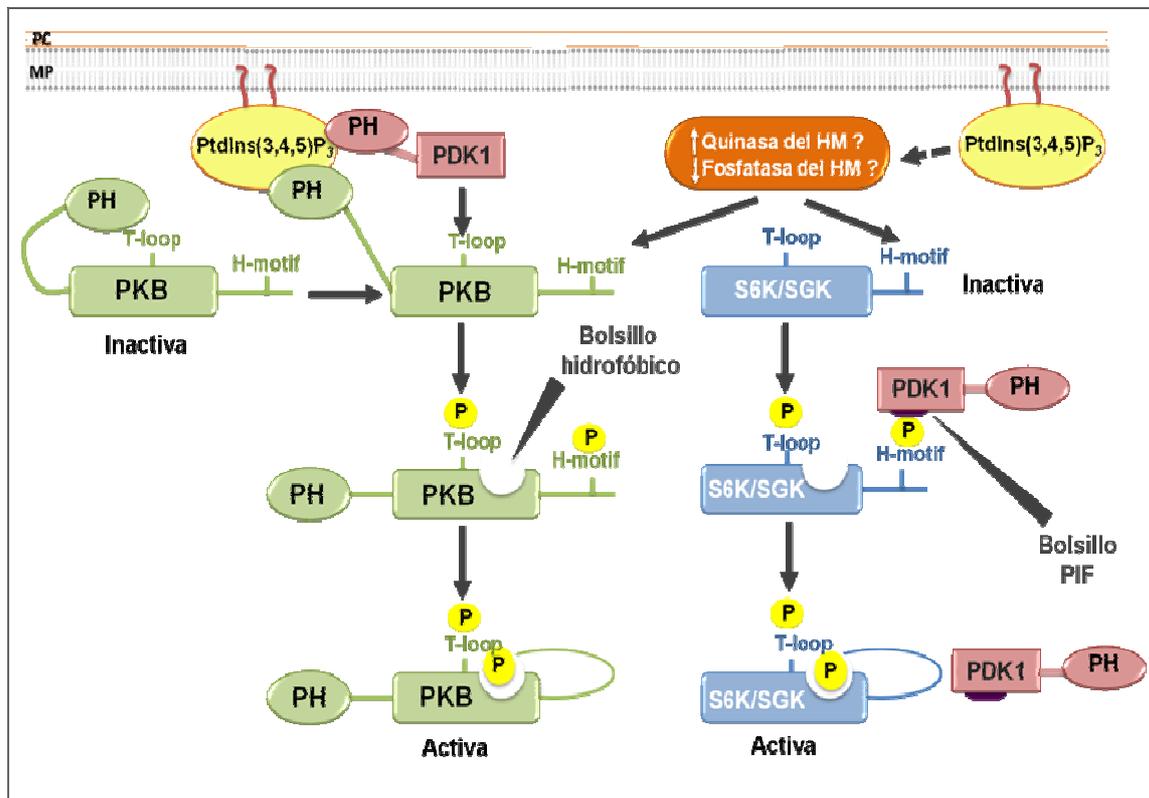


Figura 1.3 Mecanismo de activación de AKT/PKB y SGK1 por PDK-1 (modificado a partir de Mora *et al.*, 2004).

1.3. Las Proteínas Quinasas C

Las proteínas quinasas C (PKCs) constituyen un grupo de enzimas con actividad fosfotransferasa que fosforilan específicamente residuos de Ser y Thr de sus proteínas sustrato. Están involucradas en diversas vías de transducción de señales celulares, participando en multitud de funciones fisiológicas tales como la mitogénesis y la proliferación celular, la regulación del metabolismo, la apoptosis, el reordenamiento del citoesqueleto de actina, la modulación de canales iónicos, y la secreción (Newton, 2001). Dada su enorme relevancia funcional la familia de las PKCs está relacionada directa o indirectamente con distintas patologías, existiendo un amplio campo de investigación en torno a ellas.

Por otra parte, las PKCs son activas en diversos compartimentos subcelulares y su dinámica temporal de señalización difiere en base a la presencia de segundos mensajeros y de fosfatasas (Newton *et al.*, 2016).

1.3.1. Proteínas quinasas C (PKCs) en organismos superiores

1.3.1.1. Isoenzimas de la PKC

En humanos, la Proteína Quinasa C posee 10 isoformas distintas que evolucionaron a partir de la única PKC presente en *Saccharomyces cerevisiae* (Pkc1) (Levin *et al.*, 1990), y que están divididas en tres subfamilias, basadas en su estructura primaria y en el segundo mensajero que requieren para la regulación de su actividad enzimática: PKCs convencionales o clásicas, nuevas, y atípicas (Tabla 1.2). La subfamilia de PKCs clásicas (cPKC) (isoformas α , β I, β II, y γ) requieren Ca^{2+} , diacilglicerol (DAG), y fosfatidilcolina para su activación. Las PKCs nuevas (nPKCs) incluyen las isoformas δ , ϵ , η , y θ , y requieren DAG, pero no Ca^{2+} para su activación. Por último, las PKCs atípicas (aPKCs) (incluyendo la proteína quinasa C ζ y las isoformas ι / λ) no requieren Ca^{2+} ni DAG para su activación (Freeley *et al.*, 2011; Newton, 2001) (Tabla 1.2). Éstas últimas se encuentran reguladas de forma inducible por la proteína quinasa dependiente de fosfoinosítidos (PDK-1). Otra subfamilia importante es la conformada por las denominadas PKN/PRKs (“*PKC-Related Kinases*”), donde destacan PRK1, PRK2 y PRK3. Estas proteínas son insensibles a Ca^{2+} , a DAG y a ésteres de forbol, e interaccionan y son activadas por la Rho GTPasa RhoA (Griner y Kazanietz, 2007; Kazanietz, 2005). La fosfatidilserina estimula la actividad de todas las isoformas de la PKC, ya que participa en el anclaje del dominio C1 a la membrana. Las PKCs son enzimas anfitrópicas, es decir, pueden existir como formas solubles en el citosol o unidas a membranas biológicas.

Todas las isoformas de PKC son codificadas por genes diferentes, excepto PKC β I y β II, que son variantes formadas por corte y unión alternativa del mismo mRNA. En general, las isoenzimas tienen un peso molecular aparente de 80 kDa, aunque varía entre los 62 kDa y 97 kDa dependiendo de la isoforma. Su pH óptimo oscila entre 7,5 y 8, y su punto isoeléctrico es 5,6 (Liu, 1996).

1.3.1.2. Localización de las PKCs

Las PKCs localizan en sus formas activa e inactiva en diferentes compartimentos celulares, incluyendo las membranas celulares, el citoesqueleto, el núcleo y el citosol. En la línea celular U937 se ha demostrado la asociación de PKC β I a vesículas, de PKC β II a microtúbulos, de PKC ϵ a estructuras filamentosas, mientras que PKC ζ presenta una distribución citoplasmática difusa (Kiley y Parker, 1995). En células REF52 se ha demostrado la asociación de la PKC α con contactos focales, de PKC δ con filamentos y aparato de Golgi, de PKC ϵ con microfilamentos, y la presencia de PKC ζ a nivel citoplasmático (Jaken, 1997).

En numerosos tipos celulares la mayoría de PKCs se encuentran en el citoplasma en su forma inactiva, y se relocalizan a la membrana plasmática cuando se activan. Sin embargo, existen excepciones a este comportamiento. Por ejemplo PKC δ se encuentra casi exclusivamente en la

fracción particulada de células en reposo y activadas (Kanashiro y Khalil, 1998), y PKC ζ no se transloca a la membrana plasmática tras la activación con ésteres de forbol (Liu, 1996).

Las PKCs presentes en el núcleo celular son translocadas del citoplasma tras la activación o existen constitutivamente dentro de éste (Raben *et al.*, 1994). Curiosamente, existen vías de señalización del segundo mensajero distintas en el citoplasma y en el núcleo. El Ca²⁺ liberado en el citoplasma hace que la PKC citoplasmática se transloque a la membrana plasmática mientras que el Ca²⁺ que se libera dentro del núcleo transloca la PKC a la membrana nuclear (Echevarria *et al.*, 2003). Además, la producción de DAG conduce a la translocación selectiva de isoformas específicas de la PKC al núcleo.

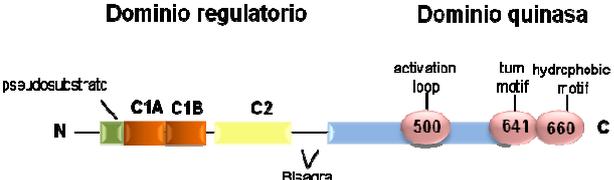
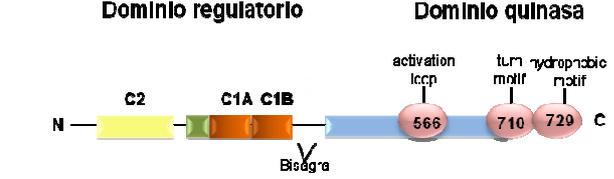
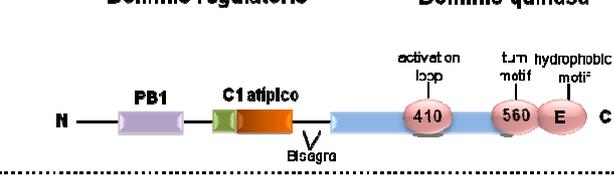
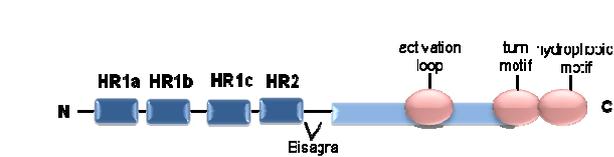
Isoformas	Estructura	Mecanismo de activación
Clásicas (α β β II γ)		<ul style="list-style-type: none"> o Fosforilación en tres sitios conservados: <ol style="list-style-type: none"> 1) Fosforilación constitutiva en el AL por PDK1 2) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el TM 3) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el HM o Unión de Ca²⁺ al dominio C2 o Unión de DAG al dominio C1 o Unión a fosfatidilserina y anclaje del dominio C1 a membranas biológicas
Nuevas (δ ϵ θ η /L)		<ul style="list-style-type: none"> o Fosforilación en tres sitios conservados: <ol style="list-style-type: none"> 1) Fosforilación constitutiva en el AL por PDK1 2) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el TM 3) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el HM o No existe unión de Ca²⁺ al dominio C2 o Unión de DAG al dominio C1 o Unión a fosfatidilserina y anclaje del dominio C1 a membranas biológicas
Atípicas (ζ ι /A)		<ul style="list-style-type: none"> o Fosforilación en tres sitios conservados: <ol style="list-style-type: none"> 1) Fosforilación inducible por agonistas en el AL por PDK1 2) Autofosforilación o fosforilación dependiente de TOR en el TM 3) Sitio de fosforilación sustituido por un residuo de Ácido glutámico en el HM o No existe unión a Ca²⁺ o El DAG no se une al dominio C1 o Unión a fosfatidilserina y anclaje del dominio C1 a membranas biológicas
PRK1/2 (PKC-related kinases)		<ul style="list-style-type: none"> o La interacción con Rho GTPasas activas a través de la unión a motivos HR facilita la fosforilación del AL por PDK1

Tabla 1.2 Clasificación de las isoformas de PKC, estructura y mecanismo de activación (AL: *activation loop*; TM: *turn motif*; HM: *hydrofobic motif*) (Adaptado de Newton, 2010).

1.3.1.3. Estructura de las PKCs

Las 10 isoenzimas de las PKCs comparten una estructura común con una región reguladora N-terminal que limita con una región catalítica C-terminal, encontrándose separadas por la región variable V3, también conocida como región bisagra (Figura 1.4) (Freeley *et al.*, 2011; Newton, 2001). La región reguladora de las PKCs contiene un dominio autoinhibidor denominado pseudosustrato, que mantiene la enzima en una conformación inactiva y dos módulos de unión a membrana, denominados

C1 (presente en todas las isoenzimas) y C2 (presente en las PKCs nuevas y clásicas) (Antal *et al.*, 2014). El dominio C1 se une al diacilglicerol (DAG) en todas las isoenzimas excepto en las atípicas, y el dominio C2 se une a los lípidos aniónicos, fosfatidilserina y Ca^{2+} en las isoenzimas clásicas (Ananthanarayanan *et al.*, 2003; Colon-Gonzalez y Kazanietz, 2006; Cho, 2001; Oancea y Meyer, 1998; Stahelin, 2014). La mitad carboxilo-terminal, que contiene los dominios C3 y C4, comprende el dominio quinasa que muestra una gran homología con otras proteínas quinasas (Kanashiro y Khalil, 1998).

A continuación se resumen las características fundamentales de las regiones que participan en la regulación de la actividad de PKC.

1.3.1.3.1. Dominio pseudosustrato (PS)

Todas las isoenzimas de PKC tienen un dominio pseudosustrato (PS) autoinhibitorio que ocupa el sitio de unión al sustrato lo cual mantiene a la enzima en una conformación inactiva (House y Kemp, 1987; Makowske y Rosen, 1989; Orr *et al.*, 1992). Tras el acoplamiento de segundos mensajeros lipídicos o proteínas de anclaje, dicho dominio se libera de su sitio de unión, permitiendo así la fosforilación del sustrato y la señalización aguas abajo (Dutil y Newton, 2000). El dominio PS se localiza en la región reguladora de la PKC, entre 13 y 30 residuos antes de la primera región C1 (Soderling, 1990). Consiste en una secuencia consenso polibásica que también se encuentra presente en los sustratos de la PKC, con la diferencia de que el residuo fosforilable (Ser o Thr) está sustituido por un residuo de Ala (House y Kemp, 1987). Se ha demostrado que tanto la delección del dominio PS como la sustitución del residuo de Ala por Glu producen la activación constitutiva de la quinasa tanto *in vitro* como *in vivo*, e independiente de efectores (Genot *et al.*, 1995; Pears *et al.*, 1990).

1.3.1.3.2. Dominio C1

Los dominios C1 pertenecen a la superfamilia de dominios ricos en cisteína. Consiste en regiones de 50 o 51 aminoácidos, con un patrón característico de Cys e His que configura el lugar de coordinación de dos iones de Zn^{2+} y forma un sitio de unión para DAG o ésteres de forbol (Ahmed *et al.*, 1991; Burns y Bell, 1991; Quest *et al.*, 1992). Los dominios C1 se clasifican en típicos y atípicos según su capacidad de unirse o no a DAG/ésteres de forbol, respectivamente.

En las PKC clásicas y nuevas el dominio C1 está formado por los subdominios C1A y C1B colocados en tándem (Hurley *et al.*, 1997), y une típicamente DAG y ésteres de forbol, aunque hay estudios que demuestran que cada uno de los subdominios lo hace con distinta afinidad (Ananthanarayanan *et al.*, 2003). La sustitución de un aminoácido de Tyr por Trp en el dominio C1B aumenta la afinidad de las PKCs nuevas por DAG en dos órdenes de magnitud en relación a las PKCs clásicas. Ello permite que las PKCs nuevas respondan a aumentos en DAG mediados por agonistas sin la necesidad de incrementar el Ca^{2+} intracelular (Newton y Brognard, 2017). Las PKC atípicas sólo

presentan un dominio C1 que no une DAG o ésteres de forbol ya que posee un anillo de residuos básicos que rodea la hendidura de unión y que impide la unión del ligando. Juega un papel importante en la interacción con ceramidas, e interviene en las uniones proteína-proteína en el caso de las isoformas PKC ζ y PKC ι/λ (Diaz-Meco y Moscat, 2001; Moscat y Diaz-Meco, 2000; Moscat et al., 2006; Ponting et al., 2002; Suzuki et al., 2003).

Por medio de su interacción con los ligandos DAG y ésteres de forbol, el dominio C1 participa en la localización de la proteínas en diferentes compartimentos membranales (Yang y Kazanietz, 2003).

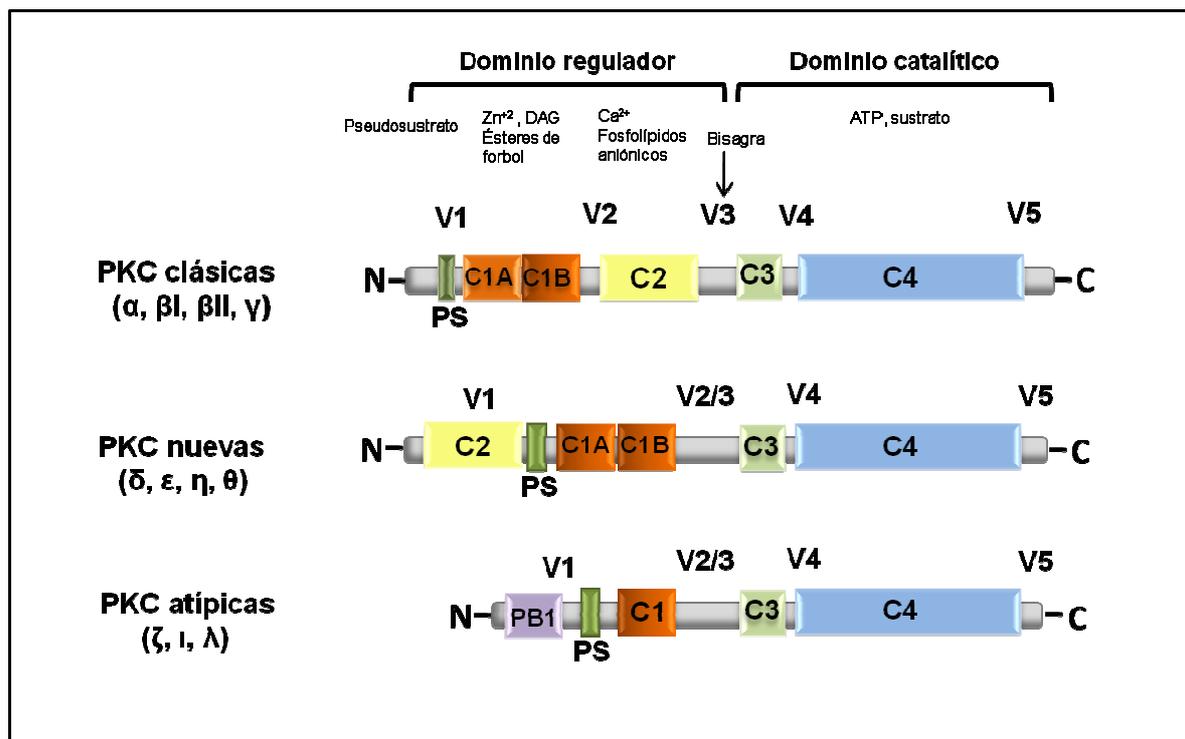


Figura 1.4 Estructura de las isoformas de PKC en humanos (Adaptado de Schmitz-Peiffer y Biden, 2008).

1.3.1.3.3. Dominio C2

Los dominios C2 contienen entre 30 y 100 aminoácidos. Este dominio se describió inicialmente en las PKC clásicas como un sitio de unión a Ca^{2+} , que ancla a las PKCs a la membrana plasmática a través de un motivo que reconoce fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP_2) (Coussens *et al.*, 1986; Knopf *et al.*, 1986; Ono *et al.*, 1986). Aunque las PKCs nuevas poseen un dominio C2, carece de residuos de Asp que coordinan Ca^{2+} , por lo cual este dominio se une en algunos casos a fosfolípidos cargados negativamente de forma independiente de Ca^{2+} , y en otras ocasiones media interacciones proteína-proteína (Corbalan-García y Gomez-Fernandez, 2006; Newton, 2001). Estos dominios pueden encontrarse también en proteínas que no están relacionadas con la familia PKC,

como las fosfolipasas y GAPs (Corbalan-Garcia y Gomez-Fernandez, 2006; Mellor y Parker, 1998; Newton, 2001).

1.3.1.3.4. Región V3

Esta región, también conocida como “bisagra”, separa el dominio regulador del dominio catalítico. Es una secuencia sensible a la ruptura proteolítica por tripsina o por las proteasas neutras dependientes de Ca^{2+} calpaína I y II. Algunos estudios indican que esta región podría estar implicada en la localización nuclear de la PKC α (Hug y Sarre, 1993). Además se ha demostrado que el dominio bisagra presente en determinadas isoformas de la PKC es degradado por caspasas durante la apoptosis (Reyland, 2009; Yoshida, 2007).

1.3.1.3.5. Dominio PB1

El dominio PB1 presente en las isoenzimas de PKC atípicas media la unión a las proteínas de anclaje, las cuales generan interacciones que promueven la liberación del pseudosustrato para permitir la señalización localizada (Newton y Brognard, 2017).

1.3.1.3.6. Dominio catalítico

Estructuralmente, el dominio catalítico está formada por dos lóbulos: un lóbulo amino terminal (lóbulo N) compuesto mayoritariamente por láminas β , y un lóbulo carboxilo terminal (lóbulo C) formado principalmente por hélices α (Johnson y Lewis, 2001; Taylor y Radzio-Andzelm, 1994). El surco que queda entre los dos lóbulos define los sitios de unión de ATP y sustrato. El lóbulo N está implicado en el anclaje y orientación del nucleótido, mientras que el lóbulo C es el responsable de la unión del péptido sustrato y de la iniciación de la transferencia del fosfato.

El dominio catalítico de las PKCs contiene los sitios de unión a ATP y los sitios consenso de fosforilación, presentando además determinantes estructurales específicos de la familia. Concretamente, todas las PKCs conservan un grupo de residuos acídicos cerca de la entrada al centro activo que podría servir como un anclaje de tipo electrostático para mantener orientado el dominio pseudosustrato en esa zona, y permitiendo que la enzima se encuentre en estado inactivo (Orr y Newton, 1994). Además, la presencia de Mg^{2+} y ATP induce un cambio significativo en la estructura secundaria de este dominio (Sanchez-Bautista *et al.*, 2006).

Lóbulo amino terminal: Bucle rico en glicinas (Región C3)

Dentro del lóbulo amino terminal se encuentra una región conservada en todas las quinasas denominada bucle rico en glicinas. Su función consiste en posicionar el grupo γ - fosfato del ATP durante la transferencia del fosfato. La mutación de este motivo inhibe por completo la actividad quinasa de la enzima (Ohno *et al.*, 1990).

Lóbulo carboxilo terminal: bucle de activación (AL), motivo de giro (TM) y motivo hidrofóbico (HM)

La secuencia carboxilo-terminal de la PKC es esencial para su regulación, ya que en ella se encuentra el sitio de unión a PDK-1. Además, en esta región se encuentra una secuencia que regula la localización celular de la enzima (Liu y Heckman, 1998; Newton, 2001).

▪ ***Bucle de activación (Región C4)***

Este bucle comprende la región donde tiene lugar la fosforilación de los sustratos y está localizado cerca de la entrada del centro activo. En esta zona se encuentran dos regiones altamente conservadas en todos los dominios quinasa. Una de ellas es la región TPD (Thr-Pro-Asp), y la otra es la región DFG (Asp-Phe-Gly/Tyr), también conocida como elemento central de transferencia de fosfato, y que es idéntica en todas las isoenzimas humanas de la PKC y en muchas otras quinasas (Kemp y Pearson, 1990; Taylor et al., 1990). Solamente las isoenzimas ζ y ι presentan una leve diferencia, caracterizada por la sustitución de la Phe de la secuencia consenso por Tyr (Ono *et al.*, 1989b). El responsable de la transferencia del grupo fosfato en la región DFG es el residuo de Asp, que está presente de forma invariable en todos los casos.

▪ ***Motivo de giro (Región V5)***

Esta región presenta una secuencia rica en residuos de Pro, dentro de la que se encuentra el residuo fosforilable del motivo. Según los modelos estructurales, esta secuencia define un giro en la molécula, y por esta razón se denomina de esta manera (Cenni *et al.*, 2002).

▪ ***Motivo hidrofóbico (Región V5)***

Presenta la secuencia consenso Phe-Xaa-Xaa-Phe-Ser/Thr/Glu. El residuo final del motivo es Ser, Thr o Glu dependiendo de la isoenzima, siendo los dos primeros aminoácidos susceptibles de fosforilación. En las PKC clásicas y nuevas es típica la presencia de Ser o Thr, mientras que el residuo de Glu es característico de las PKC atípicas (Messerschmidt *et al.*, 2005).

1.3.1.4. Regulación de la PKC

La actividad de las PKCs está sometida a una regulación estructural y espacial precisa por medio de distintos mecanismos, entre los que destacan: i- modificación covalente por fosforilación, que confiere a la enzima capacidad catalítica; ii- regulación alostérica, mediante unión a cofactores; iii- regulación intraestérica, produciéndose una autoinhibición mediada por el sitio pseudosustrato; iv- interacción con proteínas que la localizan próxima a reguladores y sustratos; y v- degradación proteolítica (Liu y Heckman, 1998; Newton, 2001).

1.3.1.4.1. Regulación por fosforilación

La fosforilación es esencial para hacer que la PKC adopte una conformación catalíticamente competente y protegerla de la degradación (Newton, 2003). En contraste con muchas otras quinasas, la

fosforilación de la PKC es constitutiva y por lo tanto su actividad no está estrechamente regulada por fosforilación, aunque sus niveles celulares sí lo están (Antal *et al.*, 2014).

La regulación por fosforilación de la PKC ocurre en el dominio quinasa donde están presentes tres sitios de fosforilación que son críticos para su activación catalítica, y que se conocen como el bucle de activación (“*Activation loop*”, AL), motivo de giro (“*Turn motif*”, TM), y motivo hidrofóbico (“*Hydrophobic motif*”, HM) (Freeley *et al.*, 2011; Newton, 2001). Las fosforilaciones de estos sitios están conservadas en las diferentes isoenzimas, a excepción de las PKC atípicas que no se fosforilan en el motivo hidrofóbico, ya que presentan un residuo de ácido glutámico que al llevar carga negativa actúa de forma similar a un residuo fosforilado. Estos sitios de fosforilación también se encuentran conservados en otras quinasas de la familia AGC como PRKs (PRK1/PKN, PRK2 y PKN β), RSK, S6K y PKB (Figura 1.5).

Fosforilación en el bucle de activación

En las células de mamífero el primer paso en el procesamiento de las PKCs es la fosforilación de un residuo conservado de treonina en el bucle de activación. Múltiples evidencias han demostrado que la quinasa dependiente de fosfoinosítidos PDK-1, es la responsable de la fosforilación del bucle de activación en la mayoría de las PKCs, así como de las proteínas quinasas relacionadas con PKC (PRK1, PRK2) (Newton, 2001). Las células deficientes en PDK-1 presentan niveles reducidos de las distintas isoformas de PKC, lo que sugiere que la fosforilación del bucle de activación regula su estabilidad y/o vida media (Balendran *et al.*, 2000; McManus *et al.*, 2004).

La fosforilación de sustratos por la PDK-1 está sometida a un control muy estricto *in vivo*. Concretamente, para que la PKC pueda ser fosforilada por la PDK-1 debe encontrarse en una conformación y localización correctas (Toker y Newton, 2000). Generalmente, la enzima recién sintetizada se localiza en la membrana donde adopta una conformación en la que el pseudosustrato queda fuera del centro activo exponiendo el sitio de fosforilación del bucle de activación (Dutil y Newton, 2000).

La fosforilación del bucle de activación de las PKCs es crucial para su activación y estabilización con la excepción de PKC δ (Liu *et al.*, 2006). En ausencia de fosforilación, la actividad catalítica de PKC δ se estabiliza gracias a la presencia de dos residuos de fenilalanina y una región de 20 aminoácidos localizados aguas arriba del dominio quinasa (Liu *et al.*, 2006). Curiosamente, dichos residuos de fenilalanina no están conservados en el resto de isoformas de la PKC, lo que explicaría por qué esta isoforma es activa en ausencia de fosforilación en el bucle de activación. Además, se ha propuesto que la fosforilación del AL en la PKC δ tiene lugar bien mediante autofosforilación o por medio de quinasas desconocidas (Freeley *et al.*, 2011). De manera similar, en células T humanas la PKC θ es capaz de autofosforilarse en el AL tras su expresión en bacteria (Czerwinski *et al.*, 2005). También se ha descrito que otras enzimas como la biliverdina reductasa o la proteína quinasa activada

por AMP (AMPK) podrían influenciar, respectivamente, la fosforilación del bucle de activación de PKC β II y PKC ζ , (Gusarova *et al.*, 2009; Maines *et al.*, 2007). Todas estas evidencias sugieren que la PDK-1 y/o otras vías de señalización alternativas regulan la fosforilación del bucle de activación de las PKCs, aunque claramente son necesarios más estudios para obtener una visión más completa sobre la manera en que esta regulación tiene lugar en distintos tejidos y organismos.

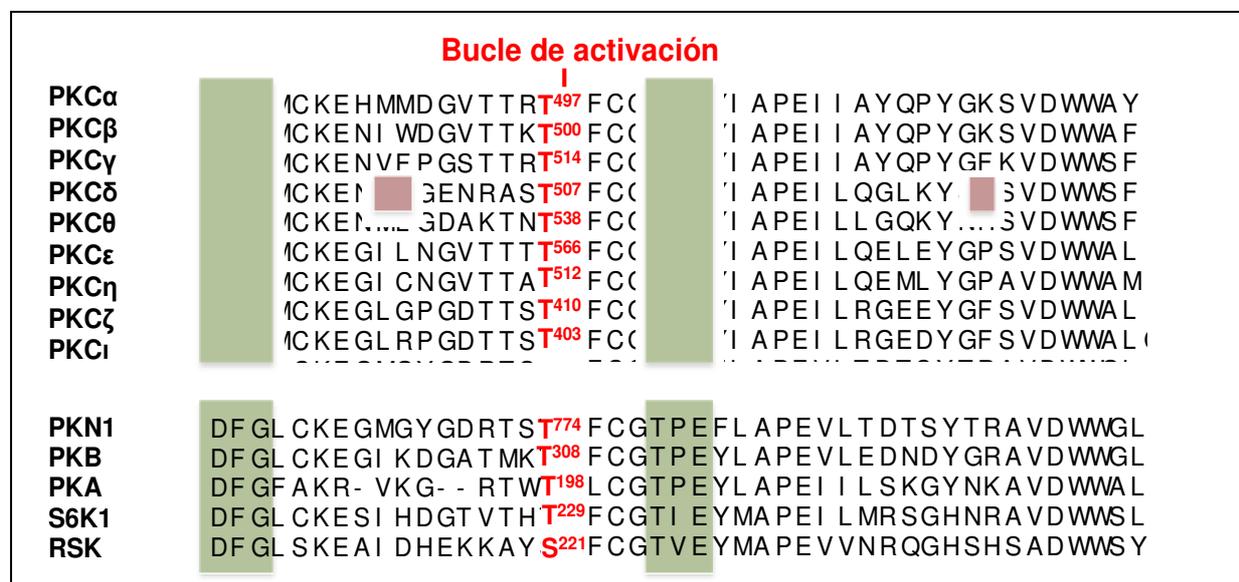


Figura 1.5 Alineación de las secuencias del bucle de activación de los dominios catalíticos de las distintas isoformas de PKC, PKN, PKB, PKA, S6K y RSK. En verde se marcan las regiones DFG y TPD, y en rojo el sitio fosforilable del bucle de activación.

La fosforilación del bucle de activación de las PKCs posiciona correctamente los residuos para la catálisis, desenmascara la entrada al sitio de unión del sustrato, y es necesaria para iniciar el procesamiento del extremo carboxilo de la quinasa mediante dos fosforilaciones secuenciales. La primera fosforilación se produce en el motivo de giro, y tiene un papel importante en la maduración y estabilidad de las PKCs, además de servir como plataforma para el establecimiento de interacciones proteína-proteína. Tras esta fosforilación, se produce la fosforilación en el motivo hidrofóbico. Aunque esta fosforilación no es esencial para la función de la enzima, influye en su localización subcelular y en su estabilidad. Además, las secuencias que rodean al motivo hidrofóbico de la PKC definen un sitio de anclaje específico para la PDK-1 (Freeley *et al.*, 2011; Newton, 2001).

Fosforilación en el motivo de giro

Esta modificación tiene lugar en un residuo de Ser o Thr que se localiza en un dominio rico en prolina fuera del dominio C4, y que se encuentra conservado en todas las isoformas de la PKC (Figura 1.6). Diversos estudios de cristalización y modelado molecular han demostrado que el fosfato del motivo de giro establece contactos esenciales que estabilizan el dominio quinasa (Grotsky *et al.*, 2006; Hauge *et al.*, 2007; Messerschmidt *et al.*, 2005). Aunque numerosos datos apoyan que esta fosforilación es importante para la estabilización de la proteína, no existe sin embargo un consenso

claro en la literatura en cuanto a la importancia de esta fosforilación para la actividad catalítica de las PKCs, ya que ésta se ve afectada de diferente manera según la isoforma estudiada. Una posible explicación es que la dependencia de dicha fosforilación en las diferentes isoformas sea distinta debido a diferencias estructurales. Alternativamente, también es posible que otros residuos de Ser/Thr de las proximidades del motivo de giro puedan ser fosforilados y compensar la falta de dicha fosforilación (Bornancin y Parker, 1996; Li et al., 1997).

Aunque en un primer momento, la fosforilación del TM se creía dependiente de autofosforilación, estudios recientes han demostrado que el complejo mTOR (“*mammalian Target of Rapamycin*”) regula la fosforilación de este motivo en algunas isoformas de la PKC (Facchinetti *et al.*, 2008; Ikenoue *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2010). mTORC2 ha sido implicado de forma indirecta en la fosforilación del motivo de giro en las PKCs clásicas (α , β I, β II, y γ) y PKC ϵ de fibroblastos embrionarios murinos (Facchinetti *et al.*, 2008; Ikenoue *et al.*, 2008). Los datos obtenidos hasta el momento sugieren que la fosforilación de las isoformas PKC δ , θ , η , ζ y ι no es dependiente de mTORC2, por lo que otras rutas de señalización o mecanismos de autofosforilación estarían implicados en el proceso.

Fosforilación en el motivo hidrofóbico

Es el único sitio cuya fosforilación no es esencial para la función de la enzima (Newton, 2001). Se encuentra conservado en las PKCs clásicas y nuevas, pero no está presente en las atípicas (Figura 1.6). En estas últimas, el residuo fosforilable de Ser o Thr se encuentra sustituido por un residuo de ácido glutámico. Estudios estructurales han demostrado que el grupo fosfato cargado negativamente en el HM establece enlaces de hidrógeno con un residuo de glicina conservado que contribuye a la estabilización de la enzima (Grotsky *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2004). En el caso de las PKCs atípicas el residuo de Glu presente en el HM realizaría una función similar (Messerschmidt *et al.*, 2005).

Además, la secuencia adyacente al HM actúa como un motivo de anclaje para la PDK-1 (Balendran *et al.*, 2000), de forma que este sitio queda expuesto para la unión de esta enzima cuando la PKC no se encuentra fosforilada, pero se enmascara en la conformación fosforilada y activa (Gao *et al.*, 2001).

El impacto funcional de la ausencia de fosforilación en el HM difiere según la isoforma de PKC estudiada. Por ejemplo, la mutación del HM en PKC β II no tiene impacto en su actividad catalítica, pero es necesaria para su estabilidad y su capacidad de señalización (Edwards y Newton, 1997).

Otras evidencias sugieren que los complejos mTORC1 y mTORC2 y otras vías de señalización participan en la fosforilación del HM de diferentes PKCs, regulando su función de manera diferencial (Facchinetti *et al.*, 2008; Ikenoue *et al.*, 2008; Parekh *et al.*, 1999).

	Motivo de giro		Motivo hidrofóbico	
	I		I	
PKC α	QPVL T ⁶³⁸	PP- DQ- - -	LVI AN- I DQSD F EGF	S ⁶⁵⁷ YVNPQFVHPI LQSAV
PKC β I	PVEL T ⁶⁴¹	PT- DK- - -	LFI MN- LDQNE F AGF	S ⁶⁶⁰ YTNPEFVI NV
PKC β II	PPVL T ⁶⁴¹	PP- DQ- - -	EVI RN- I DQSE F EGF	S ⁶⁶⁰ FVNSEFLKPEVKS
PKC γ	APAL T ⁶⁵⁵	PP- DR- - -	LVLASSI DQAD F QGF	T ⁶⁷⁴ YVNPDFVHPDARSPTSPVPV
PKC δ	KPQL S ⁶⁴³	FS- DK- - -	NLI DSMDQTAF KGF	S ⁶⁸² FVNPKYEQFLE
PKC θ	KPRL S ⁶⁷⁶	FA- DR- - -	ALI NSMDQNMFRNF	S ⁶⁹⁵ FI NPGWWSG
PKC ϵ	EPI L T ⁷¹⁰	LV- DE- - -	AI VKQI NQEE F KGF	S ⁷²⁹ YFGEDLMP
PKC η	EPVL T ⁶⁴⁵	PI- DE- - -	GHLPMI NQDE F RNF	S ⁶⁸⁴ YVSPQLQP
PKC ζ	PVQL T ⁵⁸⁰	PD- DE- - -	DAI KRI DQSE F EGF	E ⁵⁷⁹ YI NPLMSAEECV
PKN1	APTL T ⁹¹⁶	PPRDA- - -	RPLTAAEQAA F LDF	D ⁹³⁸ FVAGGC
PKB β	SI TI T ⁴⁵⁰	PP- DRYDSL	GLLELDQRTH F PQF	S ⁴⁷⁴ YSASI RE
PKA	EI RV S ³³⁸	- - - - -	I NEKCGKE F TEF	
S6K1	TPVD S ³⁷¹	P- - DD- - -	TALSESANQA F LGF	T ³⁸⁹ YVAGR
RSK	TPKD S ³⁶⁹	P- - G- - -	I PPSAGAHQL F RGF	S ³⁸⁶ FVA
			Motivo Phe-Xaa-Xaa-Phe	

Figura 1.6 Alineación de las secuencias del motivo de giro y motivo hidrofóbico del dominio catalítico de las distintas isoformas de PKC, PKN, PKB, PKA, S6K y RSK. En rojo se marcan los residuos de fenilalanina del motivo hidrofóbico, y en verde y azul el residuo fosforilable del motivo de giro e hidrofóbico, respectivamente.

1.3.1.4.2. Regulación por cofactores

Fosfatidilserina

La fosfatidilserina es un cofactor indispensable para la activación de algunas isoformas de la PKC. Este aminofosfolípido se encuentra presente exclusivamente en la cara citoplasmática de la membrana plasmática. En ausencia de DAG, la PKC presenta poca selectividad por la fosfatidilserina, pero su presencia aumenta su afinidad por esa molécula (Newton, 2001; Newton, 2004). Para la localización de la PKC en la membrana plasmática primero se produce la interacción del dominio C2 con la fosfatidilserina y PIP₂ de la membrana a través de Ca⁺², lo que favorece que el dominio C1 interaccione con DAG, permitiendo un mejor anclaje de la PKC a la membrana (Corbalan-García y Gomez-Fernandez, 2006).

DAG y ésteres de forbol

Los ésteres de forbol y el DAG provocan un aumento muy fuerte en la afinidad de las PKCs por la membrana. Aunque los dos ligandos regulan la PKC mediante el mismo mecanismo, sus efectores son diferentes. Así, los ésteres de forbol son metabolizados con mucha más lentitud que el DAG, provocando una activación más prolongada y potente. Los ésteres de forbol pueden estimular directamente la proteína quinasa C, (PKC), concretamente a la región N-terminal de la PKC, conocida como dominio C1 (Ono *et al.*, 1989a).

El DAG puede ser producido por dos rutas diferentes: mediante la hidrólisis del PIP₂ catalizada por la PLC (“*Phospholipase C*”), que produce IP₃ y DAG, o por la hidrólisis de la fosfatidilcolina, catalizada por la PLD (“*Phospholipase D*”). En este caso se produce ácido fosfatídico y colina, y el ácido fosfatídico es convertido en DAG por acción de una fosfomonoesterasa (Liu y Heckman, 1998; Newton, 2001).

Calcio (Ca²⁺)

El IP₃ generado por la hidrólisis de PIP₂ provoca la movilización de Ca²⁺ intracelular. Esta catión facilita la translocación de la PKC, incrementando la afinidad de su dominio C2 por los lípidos aniónicos. Sin embargo, el aumento en la concentración de Ca²⁺ intracelular no es indispensable para la translocación y activación de la PKC si se produce una unión suficientemente fuerte a través del dominio C1. El DAG y el Ca²⁺ tienen un efecto sinérgico sobre la activación de la enzima, y la presencia de uno de ellos reduce la cantidad del otro que es necesaria para la activación (Newton, 2001).

Fosfatidilinosítidos

La PKC también puede ser activada por fosfoinosítoles fosfato como el fosfatidilinositol (PI), el fosfatidilinositol (4)-fosfato (PIP), el fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP₂) y el fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP₃), en presencia de calcio y fosfatidilserina (Liu, 1996). El PIP₂ es un activador de PKC similar al DAG, y el PI puede sustituir a la PS como cofactor (Liu y Heckman, 1998).

1.3.1.4.3. Regulación independiente de segundos mensajeros

Algunas PKCs clásicas y PKCs nuevas que pueden activarse independientemente de los segundos mensajeros, lo que hace más compleja la señalización de la PKC. Por ejemplo, ciertas PKCs pueden ser activadas por la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), que a menudo están elevadas en enfermedades como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares y la neurodegeneración (Rahman, 2007).

1.3.1.4.4. Regulación por unión a proteínas de anclaje

Aunque las isoenzimas que integran la familia PKC presentan relativamente pocas diferencias en su especificidad por sustratos y su sensibilidad a activadores, son sin embargo capaces de desempeñar funciones específicas en la célula. La localización subcelular diferencial de los distintos isotipos parece ser la razón fundamental de esta especificidad (Jaken, 2004; Mochly-Rosen y Gordon, 1998).

La localización subcelular de la PKC es regulada por proteínas de anclaje o adaptadoras que las mantienen cerca de sus sustratos, de reguladores de su actividad (fosfatasas o quinasas), o de compartimentos intracelulares específicos. Las proteínas de anclaje también juegan un papel importante en la duración y amplitud de la actividad de la PKC, así como en la especificidad del

sustrato. Teniendo en cuenta que hay múltiples isoenzimas de PKC expresadas en la misma célula que son activadas por los mismos estímulos, las proteínas de anclaje proporcionan un nivel de selectividad funcional. Estas proteínas adaptadoras de la PKC también tienen relevancia clínica ya que se ha demostrado que cambian el perfil farmacológico de la PKC.

Se han descrito un gran número de proteínas de unión a PKC que pueden ser específicas para una o varias isoformas. Algunas se unen a las formas inactivas de la enzima, mientras que otras se unen a las formas activas. Dentro del primer grupo se encuentran las proteínas adaptadoras de la familia AKAP, que localizan a la PKC fosforilada e inactiva cerca de sus sustratos. Dentro del segundo grupo están las proteínas de la familia RACK (“*Receptor for Active C protein Kinase*”), que anclan a la PKC fosforilada y activa a localizaciones celulares específicas. Algunas de estas proteínas adaptadoras son, además, sustratos de la PKC, como las proteínas STICKs (Jaken, 1997; Jaken, 2004; Mochly-Rosen y Gordon, 1998; Newton, 2001; Ron y Kazanietz, 1999; Sim y Scott, 1999).

1.3.1.4.5. Regulación por desfosforilación

Las isoformas clásicas y nuevas de la PKC son relativamente resistentes a la desfosforilación cuando se encuentran en su conformación inactiva. Sin embargo, cuando las PKCs se encuentran unidas a la membrana en la que el ligando está acoplado, adoptan una conformación abierta que es fácilmente desfosforilada en el motivo hidrofóbico (HM) por una proteína fosfatasa con un dominio PH rico en leucina (PHLPP) (Dutil *et al.*, 1994; Gao *et al.*, 2008), que la deriva a la fracción celular insoluble en detergentes. Es ahí donde las fosfatasas que son sensibles al ácido okadaico, como la proteína fosfatasa 2A, promueven la desfosforilación de la PKC en el bucle de activación (AL) y el motivo de giro (TM) (Hansra *et al.*, 1996). En general, la activación prolongada favorece la desfosforilación lo que genera una PKC inestable (Dutil *et al.*, 1994).

La isomerización del motivo de giro de las PKC clásicas por la peptidil-prolil isomerasa (Pin1) es necesaria para que las PKCs clásicas lleguen a ser desfosforiladas (Abrahamsen *et al.*, 2012). La forma desfosforilada es entonces degradada por proteólisis (Chen *et al.*, 2007).

1.3.1.4.6. Regulación por proteólisis

La proteólisis es un proceso que inhibe la actividad biológica de las PKCs. El interés sobre la proteólisis de la PKC surgió al observar que los ésteres de forbol provocan una reducción (“*Down-regulation*”) en la cantidad de PKC celular, y es debido, al menos en parte, a un aumento en la proteólisis de la quinasa (Young *et al.*, 1987).

La PKC desfosforilada es degradada fundamentalmente a través de la vía de la ubiquitina-proteasoma (Lee *et al.*, 1996; Lu *et al.*, 1998). Curiosamente, la ubiquitinación es dependiente de la actividad de PKC (Lee *et al.*, 1996), la cual, además, puede hiperactivar la actividad de la ubiquitina (Kong y Chock, 1992; Wall *et al.*, 2000). Por tanto, la PKC actuaría en un circuito de

retroalimentación negativa, en el que se incrementaría su tasa de destrucción, con la consiguiente inactivación (Wang *et al.*, 2016).

1.3.1.5. Maduración de la PKC

El modelo general que explica el comportamiento de la PKC implica una serie de cambios conformacionales que se encuentran regulados por la unión a nucleótidos, la fosforilación del dominio quinasa y la interacción alostérica con efectores (lípidos y/o proteínas). El primer paso en la maduración de las isoformas PKC clásicas y nuevas consiste en la unión de la chaperona HSP90 y la co-chaperona CDC37 al motivo PXXP del dominio quinasa (Gould *et al.*, 2009). A continuación, tras la unión a ATP se produce un cambio conformacional que la transforma en un quinasa competente para ser fosforilada (Grotsky *et al.*, 2006). Seguidamente se producen una serie de fosforilaciones secuenciales que promueven su estabilización y son por tanto esenciales para evitar la degradación proteolítica de la enzima (Borner *et al.*, 1989). En primer lugar la PDK-1 fosforila el AL de todas las isoformas de la PKC (Le Good *et al.*, 1998), gracias a que la PKC recién sintetizada se encuentra en una conformación abierta en la que el motivo pseudosustrato no ocupa la cavidad de unión a sustrato (Dutil y Newton, 2000). En el caso de las isoformas clásicas y nuevas la fosforilación en el AL es constitutiva, mientras que las atípicas es dependiente de agonistas. Este evento desencadena dos fosforilaciones estrechamente acopladas en el extremo C-terminal en el TM y HM. Estas fosforilaciones C-terminales dependen de la actividad quinasa de PKC y también de mTORC2. No se sabe todavía si mTORC2 fosforila directamente estos sitios o si funciona como una chaperona para permitir que la PKC recién sintetizada adopte una conformación fosforilable. Las isoenzimas de PKC atípicas difieren en que su fosforilación en el motivo de giro es co-traducionalmente modificada por mTORC2 unido al ribosoma y que tienen un residuo ácido (Glu) en el motivo hidrofóbico (Facchinetti *et al.*, 2008; Ikenoue *et al.*, 2008; Jacinto y Lorberg, 2008). Como consecuencia, la PKC adopta su conformación madura gracias a la interacción entre la región carboxilo terminal fosforilada y el dominio amino terminal, lo que produce su redistribución por el citoplasma. Esta especie fosforilada es competente catalíticamente, pero mantiene una conformación inactiva “cerrada” en la que el dominio pseudosustrato ejerce una regulación negativa mediante su ocupación del dominio de unión al sustrato. De hecho, esta conformación “cerrada” es esencial para la acumulación eficiente de las isoformas PKC α y PKC ϵ en su estado fosforilado (Cameron *et al.*, 2009).

En respuesta a determinados estímulos extracelulares que activan a los receptores acoplados a proteínas G o de tirosín-quinasa en la membrana plasmática se produce la activación de la fosfolipasa C (PLC), que promueve la hidrólisis de PIP₂ a IP₃ (Ins(1,4,5)P₃) y diacilglicerol (DAG). El DAG generado permanece en la membrana plasmática, mientras que el IP₃ se transloca al citoplasma, lo que provoca un aumento intracelular de Ca²⁺. Esto hace que el dominio C2 se una a la membrana plasmática a través de la coordinación de calcio con los lípidos aniónicos y, como consecuencia, se favorece la interacción del dominio C1 con lípidos de la membrana y DAG. Esto posiciona a la PKC

produciéndose la liberación del pseudosustrato del centro activo, lo que lleva a la fosforilación de sustratos y a la máxima activación de la PKC (Newton, 2009; Steinberg, 2008). Cuando la PKC se encuentra en su conformación abierta con el bolsillo de unión a nucleótidos vacío es desfosforilada y degradada (Srivastava *et al.*, 2002). Sin embargo, la unión de HSP70 al motivo de giro desfosforilado permite que la PKC se vuelva a fosforilar para mantener la vida útil de señalización de la enzima.

Las isoenzimas de PKC nuevas están reguladas por mecanismos similares excepto que su dominio C2 no funciona como un sensor de calcio. Las isoenzimas de PKC atípicas se activan al unirse a proteínas de anclaje específicas que unen al dominio pseudosustrato fuera del sitio de unión al sustrato (Newton y Brognard, 2017).

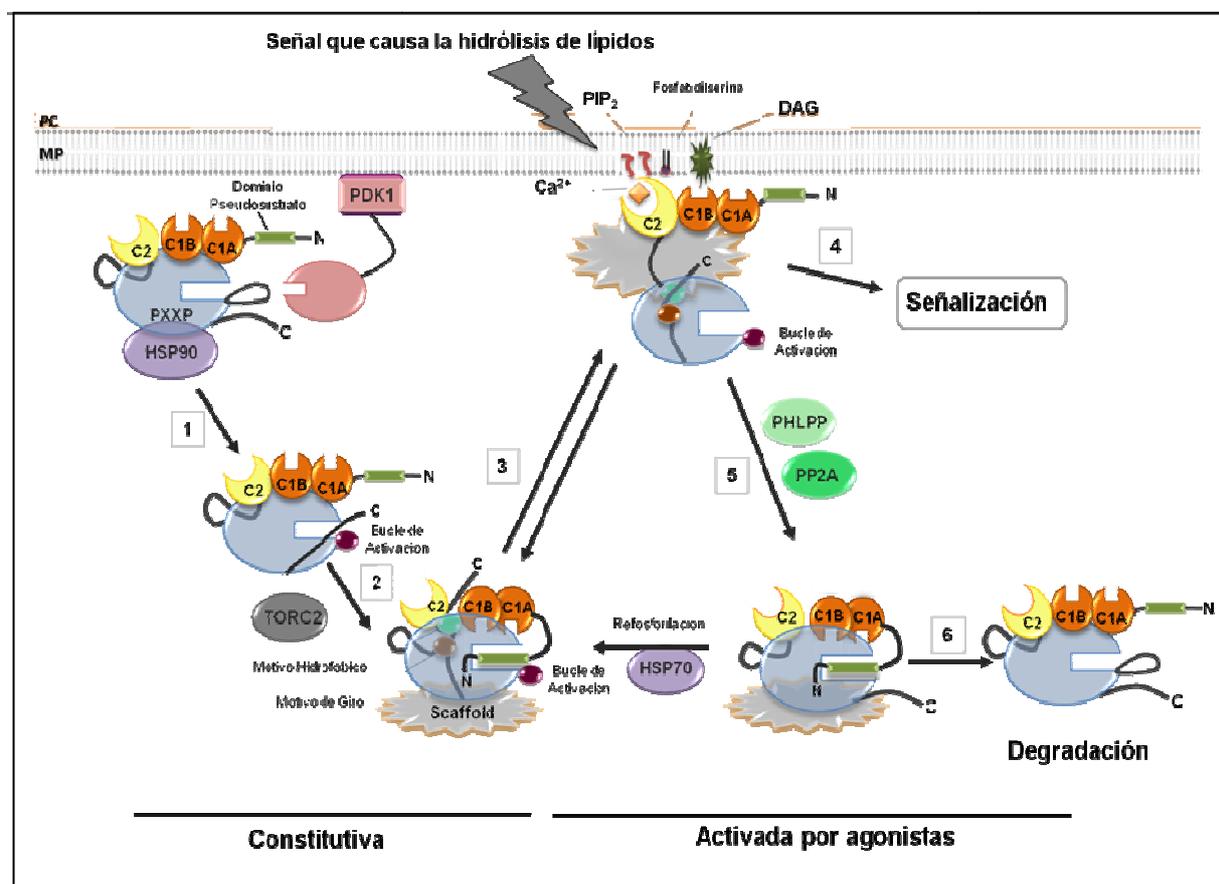


Figura 1.7 Modelo de regulación de la PKC desde su biosíntesis a su degradación (Adaptado de Newton, 2017).

1.3.1.6. La PKC como proteína de anclaje (“Scaffold protein”)

Utilizando un modelo muy simplificado se podría argumentar que la proteína quinasa C actúa como un interruptor molecular dependiente de su unión a nucleótidos (ATP). Cuando no está unida a nucleótidos, se encuentra desfosforilada y en una conformación abierta con un dominio regulatorio totalmente expuesto. Cuando está unida a nucleótidos la proteína se encuentra fosforilada y en una conformación activa pero cerrada debido en parte a la interacción del dominio PS con la cavidad de

unión a sustrato (Cameron *et al.*, 2009). Por tanto, una de las funciones del dominio quinasa es regular la disponibilidad del dominio regulatorio a través de interacciones intramoleculares. De hecho, existen evidencias que demuestran que en determinadas situaciones el dominio regulatorio de las PKCs *per se* puede ser funcional *in vivo*. Por ejemplo, la expresión del dominio regulatorio de PKC δ promueve el crecimiento de neuritas, siendo este más eficiente tras la sobre-expresión de una versión catalíticamente inactiva de la quinasa en relación a la versión silvestre (Ling *et al.*, 2004). Esta propiedad también la presentan los mutantes inactivos de PKC α que presentan una conformación abierta. Por ejemplo, la expresión del mutante en el sitio de unión a ATP de PKC α desencadena apoptosis, una capacidad que no presenta ni la versión silvestre ni una versión catalíticamente inactiva mutada en el residuo de aspártico presente en el subdominio VI en la secuencia YRDLK (Cameron *et al.*, 2009; Cameron *et al.*, 2008). Estas y otras evidencias sugieren que la activación alostérica de la PKC le confiere múltiples funciones dependientes tanto del dominio regulatorio como del dominio catalítico.

1.3.1.7. **Proteínas quinasas asociadas a Rho (“PKC-Related Kinases o PRKs”)**

La región C-terminal de las PRKs presenta un dominio quinasa cuya secuencia presenta una elevada homología con la de los miembros de la familia PKC. Se ha descrito que la GTPasa RhoA incrementa la actividad de las PRKs *in vitro* como consecuencia de su unión al dominio HR1 de la región N-terminal de la quinasa donde también está localizado el motivo pseudosustrato (Shibata *et al.*, 1996). La unión de Rho con el motivo HR1 induce un cambio conformacional que permite la interacción de la PDK-1 con la PRK, fosforilándola en el AL y estimulando su actividad quinasa (Flynn *et al.*, 2000). No obstante, se desconoce el mecanismo molecular preciso responsable de este fenómeno. Además del dominio HR1, otro dominio del extremo N-terminal de las PRKs denominado HR2 está implicado en la activación de la quinasa por lípidos y en su anclaje a las membranas biológicas (Mukai, 2003). Asimismo, el extremo C-terminal del dominio HR2 se comporta como una región autoinhibidora de la actividad de las PRKs y es sensible al ácido araquidónico (Yoshinaga *et al.*, 1999).

1.3.2. **Proteínas quinasas C en levaduras modelo**

1.3.2.1. ***Saccharomyces cerevisiae***

Saccharomyces cerevisiae posee una única proteína ortóloga a PKC denominada Pkc1. Se trata de una proteína esencial que es parte integral de la ruta de MAP quinasas de integridad celular en este organismo, además de regular distintos procesos relacionados con el control de la morfogénesis y la progresión del ciclo celular (Levin, 2011; Levin *et al.*, 1990) (Figura 1.8). La interrupción del gen *pkc1*⁺ es letal bajo condiciones normales de crecimiento (Levin y Bartlett-Heubusch, 1992; Paravicini *et al.*, 1992). De hecho, las células mutantes *pkc1* Δ presentan defectos importantes en la pared celular

como son la capa interna y externa más delgada y una membrana plasmática separada de la pared en algunos puntos (Levin *et al.*, 1994; Paravicini *et al.*, 1992; Roemer *et al.*, 1994). Pkc1 es una proteína quinasa de 132 kDa que presenta varios dominios regulatorios. En la región amino-terminal posee dos copias del dominio HR1, estructuralmente similar al presente en PRK1/PKN y PRK2 en mamíferos (Flynn *et al.*, 2000; Mellor y Parker, 1998). Además, presenta un dominio C2, un motivo pseudosustrato, un dominio C1, el dominio quinasa y la región V5 (Figura 1.8). Sin embargo, a pesar de poseer los dominios C1 y C2, Pkc1 no está regulado ni por Ca^{+2} ni por DAG debido a la alteración de algunos de sus residuos clave (Antonsson *et al.*, 1994; Watanabe *et al.*, 1994).

La GTPasa Rho1 contribuye a la estabilización y distribución espacio/temporal de Pkc1 en los sitios de crecimiento activo y en las zonas donde se produce daño en la pared celular (Andrews y Stark, 2000). Tras su interacción con Rho1, Pkc1 es fosforilado *in vivo* en el residuo T983 del bucle de activación por medio de las quinasas Pkh1 y Pkh2, que son los dos ortólogos a PDK-1 presentes en este organismo, siendo dicha fosforilación esencial para su activación catalítica y el desarrollo de sus funciones biológicas. Se ha sugerido que la fosforilación de Pkc1 en T983 podría no ser necesaria en determinados contextos biológicos (Roelants *et al.*, 2004). Por ejemplo, el mutante de Pkc1 no fosforilable por PDK-1 es capaz de conferir resistencia a miriocina a una cepa *pkc1Δ*, lo que sugiere que la propia proteína independientemente de su actividad catalítica juega un papel importante en este proceso (Roelants *et al.*, 2004). Sin embargo dichos estudios se han visto condicionados por el hecho de que los mutantes nulos *pkc1Δ* no son viables en condiciones normales de crecimiento salvo en medios equilibrados osmóticamente (Levin *et al.*, 1990; Roelants *et al.*, 2004).

En *Saccharomyces cerevisiae*, la actividad de Pkc1 está influenciada indirectamente por la proteína quinasa Tor2, ya que ésta participa en la regulación de Rom2, una proteína con actividad GEF que regula positivamente a la GTPasa Rho1 (Helliwell *et al.*, 1998; Ozaki *et al.*, 1996; Schmelzle *et al.*, 2002; Schmidt *et al.*, 1997).

Al igual que ocurre en las células de mamífero, Pkc1 también se encuentra regulada por la vía ubiquitina-proteasoma. En concreto, Wang *et al.* (2008) han demostrado que la enzima Ubp3, con actividad deubiquitinante, regula negativamente la cantidad de Pkc1. La falta de Ubp3 causa una estabilización de la proteína lo que conlleva un incremento en su abundancia, observándose el mismo efecto en los mutantes con un proteasoma defectivo. El aumento en los niveles de Pkc1 supone un incremento en la señalización dependiente de Pkc1. Aunque en *S. cerevisiae* no se conoce en detalle el mecanismo molecular responsable del proceso, en mamíferos las enzimas deubiquitinantes facilitan la proteólisis de los sustratos eliminando la cadena de ubiquitina de aquellos sustratos que ya han sido enviados al proteasoma (Verma *et al.*, 2002).

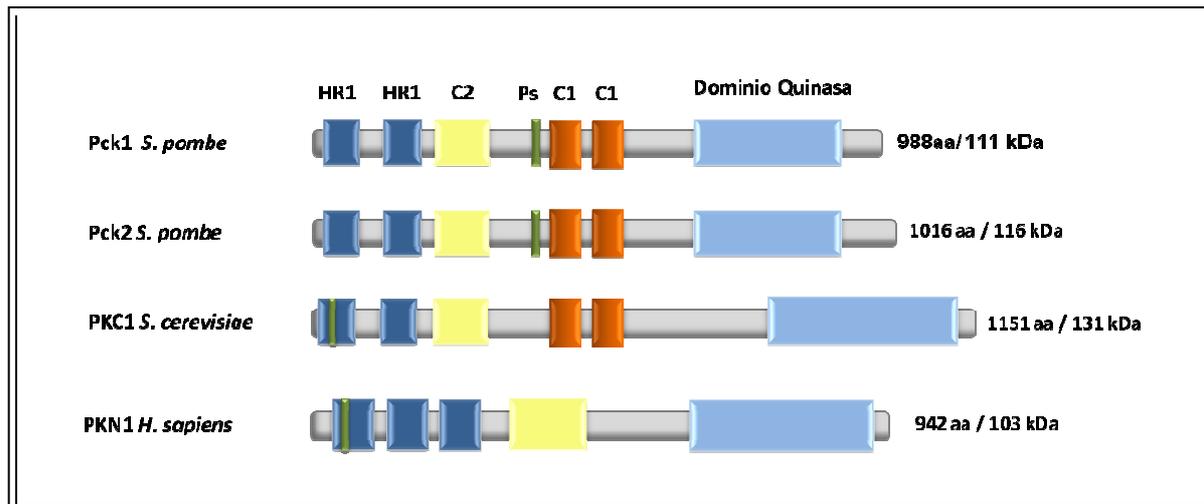


Figura 1.8. Estructura de las isoformas de PKC en *S. pombe* y *S. cerevisiae*.

1.3.2.2. *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura con fisión *S. pombe* posee dos ortólogos a PKC denominados Pck1 y Pck2. Contrariamente al modelo de *S. cerevisiae*, los mutantes simples *pck1Δ* o *pck2Δ* son viables, aunque la doble delección de ambos genes es letal, lo que sugiere que Pck1 y Pck2 comparten funciones esenciales durante el crecimiento celular (Toda *et al.*, 1993). Los mutantes *pck2Δ* muestran defectos en la polaridad celular, paredes celulares delgadas, e hipersensibilidad a temperaturas elevadas y al tratamiento con enzimas líticas (Arellano *et al.*, 1997; Toda *et al.*, 1993). La delección de Pck1 no causa fenotipos evidentes, excepto una sensibilidad moderada frente al calcoflúor 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 notorias, la sobreexpresión de Pck2 es letal, dando lugar a células con paredes muy gruesas y deformadas (Arellano *et al.*, 1999).

Pck1 y Pck2 también están relacionadas desde el punto de vista estructural y funcional con las quinasas asociadas a Rho de mamíferos (“*PKC-Related Kinases* o PRKs”). Pck1 y Pck2 son proteínas con una vida media corta que contienen en su extremo amino terminal dos secuencias HR1 responsables de su unión a las GTPasas Rho1 y Rho2 (Sayers *et al.*, 2000), y secuencias tipo PEST en el extremo N-terminal, implicadas en su degradación por el proteasoma (Arellano *et al.*, 1999) (Figura 1.8). Pck1 y Pck2 son muy inestables y su interacción con cualquiera de las GTPasas de la familia Rho, Rho1 o Rho2, aumenta su estabilidad (Arellano *et al.*, 1999; Villar-Tajadura *et al.*, 2008a). 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).

Se ha demostrado que Rho1 y Rho2 regulan de forma coordinada la biosíntesis del (1,3) β -D-glucano (Rho1) y α -glucano (Rho2), los dos principales componentes de la pared celular de *S. pombe*,

fundamentalmente por medio de Pck2 (Arellano *et al.*, 1999; Calonge *et al.*, 2000). El papel de Pck1 en el control de la integridad celular aún no se ha dilucidado en detalle. *pck1*⁺ presenta interacciones genéticas con *ras1*⁺, *rall1*⁺ y *ppe1*⁺, por lo que podría estar controlando la integridad celular a través de vías alternativas. Además, Rho1, Rho2, Pck1 y Pck2 son activadores de la ruta de MAP quinasas de integridad celular de este organismo, cuya organización se describe detalladamente más adelante (Apartado 1.6).

Nuestro grupo ha demostrado que Ksg1 se asocia *in vivo* con Pck1 y Pck2 (Madrid *et al.*, 2015). Asimismo, también se ha demostrado que fosforila *in vivo* a Pck2, principal activador de la ruta de MAP quinasas de integridad celular, en el residuo conservado de T842 presente en el bucle de activación y que esta fosforilación se encuentra regulada además por un mecanismo de autofosforilación. Esta autofosforilación es probablemente el mecanismo responsable de la fosforilación *in vivo* del residuo conservado de T984 en el motivo de giro de Pck2 (Madrid *et al.*, 2015). Estos eventos junto con la unión a Rho1 y/o Rho2 estabilizan y hacen que Pck2 sea competente para ejercer sus funciones biológicas incluyendo la activación de la ruta CIP (Madrid *et al.*, 2013). Sin embargo, a diferencia de la mayoría de las PKCs, la fosforilación *in vivo* de Pck2 en T842 no es necesaria para la transmisión de señales hacia la ruta de MAP quinasas de integridad celular durante el crecimiento y en respuesta a estrés. La activación catalítica y función biológica de Pck2 es dependiente de la fosforilación conjunta en T842 (bucle de activación) y en T984 (motivo de giro), aunque se ha sugerido que este proceso es también regulado por la fosforilación del residuo conservado en T846 del bucle de activación (Madrid *et al.*, 2015). La síntesis *de novo* de Pck2 es crítica para la activación de Pmk1, la MAP quinasa central de la ruta de integridad celular, en respuesta al daño en la pared celular o tras el ayuno de glucosa, pero no en respuesta al estrés osmótico salino (Madrid *et al.*, 2015).

1.4. La ruta TOR (“*Target of Rapamycin*”)

TOR (“*Target Of Rapamycin*”) es una proteína quinasa que controla el crecimiento y metabolismo celulares en respuesta a cambios en las condiciones nutricionales (aminoácidos), factores de crecimiento, niveles de energía celular, y en respuesta a estrés. TOR activa el crecimiento mediante la regulación positiva de procesos anabólicos y negativa de procesos catabólicos, los cuales colectivamente favorecen la acumulación de masa celular. Los procesos anabólicos activados por TOR incluyen la transcripción, la síntesis de proteínas, la biogénesis de ribosomas, el transporte de nutrientes y el metabolismo mitocondrial. Por el contrario, TOR reprime los procesos catabólicos tales como la degradación del RNA mensajero, la proteólisis dependiente de ubiquitina, la autofagia y la apoptosis. TOR desempeña un papel clave en el desarrollo y el envejecimiento y ha sido implicado en trastornos como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad y la diabetes (Hall, 2008).

1.4.1. Conservación evolutiva de la ruta de señalización TOR

TOR fue descubierto mediante el análisis genético de mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* que presentaban resistencia a la inhibición del crecimiento por rapamicina, lo que permitió la identificación de dos quinasas TOR, TOR1 y TOR2 (Heitman *et al.*, 1991). Además, se demostró que la rapamicina se asocia con la peptidil-propil cis/trans isomerasa (FKBP12) con la que forma un complejo que se une a TOR, inhibiéndolo (Wullschleger *et al.*, 2006).

El descubrimiento de TOR en otros eucariotas superiores se debe en gran medida a los estudios realizados previamente en levaduras. A mediados de los 90, estudios bioquímicos llevaron a la identificación y la clonación de su homólogo en mamíferos, mTOR (“*mammalian target of Rapamycin*”), también conocida como FRAP, RAFT, RAPT, o SEP (Sabatini *et al.*, 1994). Hasta el momento todos los genomas eucariotas analizados, incluyendo levaduras, algas, plantas, gusanos, moscas y mamíferos contienen al menos una copia de TOR, lo que sugiere que TOR se conserva en todas las formas de vida eucariotas (Wullschleger *et al.*, 2006).

1.4.2. Estructura de las quinasas TOR

Las proteínas quinasas TOR presentes en organismos eucariotas son serín/treonín-quinasas de gran tamaño (~280 kDa), y comparten un 40-60% de identidad en su secuencia de aminoácidos. Pertenecen a un grupo de proteínas conocidas como PIKKs (“*Phosphoinositide 3'-Kinase-related Kinases*”), ya que presentan en su extremo carboxilo terminal un dominio quinasa con alta homología al dominio catalítico de la fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) (Figura 1.9).

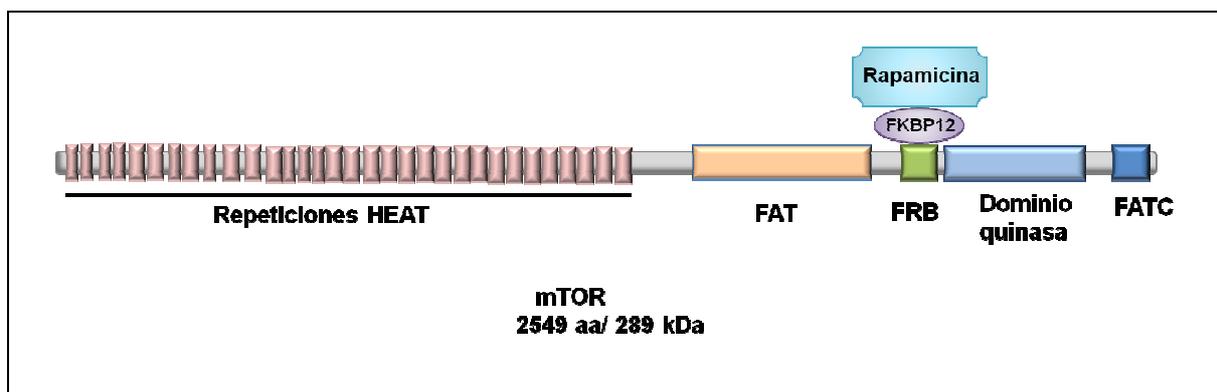


Figura 1.9. Estructura de mTOR.

A nivel estructural, las quinasas TOR se mantienen conservadas en la mayoría de los organismos. En la región amino terminal se encuentran las repeticiones HEAT (por *Huntington*, *Elongation factor 3 (EF3)*, *protein phosphatase 2A (PP2A)*, and *the yeast kinase TOR1*), que participan en la mediación de interacciones proteína-proteína (Andrade y Bork, 1995). Además, también presentan un dominio FAT central (*FRAP*, *ATM*, *TRRAP*) poco conservado entre este tipo de quinasas PIKK, y un dominio FATC (*FRAP*, *ATM*, *TRRAP*, *C-terminal*) bastante conservado. Ambos

flanquean al dominio FRB (dominio de unión al complejo FKBP12-rapamicina) y al dominio quinasa, respectivamente, los cuales son típicos de los miembros de la familia PIKK (Dames *et al.*, 2005) (Figura 1.9). TOR se encuentra en dos complejos multiproteicos funcional y estructuralmente distintos, denominados TORC1 y TORC2, presentes tanto en organismos eucariotas superiores como en levaduras (Wullschleger *et al.*, 2006).

1.4.3. TOR en organismos superiores

1.4.3.1. Características generales

A diferencia de lo que ocurre en levaduras, los eucariotas superiores poseen una única copia del gen TOR, llamado mTOR (Crespo *et al.*, 2005). Su interrupción conduce al bloqueo y muerte embrionaria de forma temprana tanto en moscas como en mamíferos, indicando que TOR juega un papel esencial en el desarrollo embrionario (Gangloff *et al.*, 2004; Murakami *et al.*, 2004).

1.4.3.1.1. mTORC1

El complejo TORC1 en mamíferos (mTORC1) está implicado en la regulación de los aspectos temporales del crecimiento celular y su actividad se inhibe por la unión del complejo FKBP12-rapamicina tanto *in vivo* como *in vitro* (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004). mTORC1 está formado por las proteínas mTOR, RAPTOR (“*Regulatory Associated Protein of mTOR*”), mLST8/GβL (“*Lethal with SEC13 protein 8*”) (Hara *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Loewith *et al.*, 2002), DEPTOR (“*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*”) (Peterson *et al.*, 2009) y PRAS40 (“*Proline-rich AKT substrate, 40 kDa*”) (Sancak *et al.*, 2007) (Figura 1.10).

RAPTOR

RAPTOR es una proteína adaptadora de 150 kDa cuya estructura se encuentra conservada de levaduras a humanos. Es esencial para el ensamblaje y localización de mTORC1 y también podría contribuir a la estabilidad del complejo (Kim *et al.*, 2002). Estructuralmente presenta una zona amino terminal conservada (RNC), seguida de 4 repeticiones HEAT en posición central y 7 repeticiones WD40 en la región carboxilo terminal. La unión RAPTOR-mTOR es sensible a la rapamicina y a la ausencia de nutrientes. RAPTOR es necesario para la correcta fosforilación de S6K1 y 4E-BP1 por mTOR. (Mahfouz *et al.*, 2006; Tee *et al.*, 2005).

mLST8

mLST8 es una proteína conservada de 36 kDa presente tanto en mTORC1 como en mTORC2, que presenta 7 repeticiones WD40 e interactúa solo con la región del dominio quinasa de TOR de forma independiente de otros factores (Adami *et al.*, 2007; Yip *et al.*, 2010). En células de mamífero, la interacción de mLST8 con mTOR estimula fuertemente la unión entre mTOR y RAPTOR y, como

resultado, aumenta la actividad quinasa del complejo hacia sus sustratos S6K1 y 4E-BP1 (Kalender *et al.*, 2010).

DEPTOR

DEPTOR, también denominado DEPDC6, es una proteína de 46 kDa que interacciona con mTOR y, cuya expresión está regulada a través de mecanismos transcripcionales y postraduccionales mediados por mTORC1 y mTORC2. DEPTOR está compuesto por dominios DEP (“*Dishevelled, Egl-10 and Pleckstrin domain*”) en su extremo amino terminal y un dominio PDZ (“*Postsynaptic density 95, discs large, zonula occludens-1*”) en su extremo carboxilo. Funcionalmente, DEPTOR actúa como inhibidor de mTOR, al cual se une de forma directa. La pérdida de DEPTOR promueve la actividad quinasa de mTORC1 y mTORC2 favoreciendo el crecimiento y la supervivencia celular. La sobreexpresión de DEPTOR inhibe la actividad de mTORC1, lo cual conduce a una activación de la señalización PI3K/mTORC2/AKT (Peterson *et al.*, 2009).

PRAS40

PRAS40 es una proteína de 40 kDa enriquecida en residuos de prolina que interactúa con RAPTOR, la cual se une a mTORC1 en células privadas de insulina y cuya interacción *in vitro* con mTORC1 se interrumpe por concentraciones altas de sal. PRAS40 inhibe el crecimiento celular, la fosforilación de S6K1 y la activación mTORC1 por Rheb. PRAS40 es sustrato de AKT y también es componente y sustrato de mTORC1, ya que posee un motivo estructural característico de proteínas fosforiladas por mTOR denominado TOS (“*TOR signaling motif*”). De esta forma, la fosforilación de PRAS40 tanto por AKT como por mTORC1 provoca la disociación de PRAS40 del complejo mTORC1, lo que conlleva a su activación (Sancak *et al.*, 2007).

1.4.3.1.2. mTORC2

En 2004 se descubrió el complejo TORC2 de mamíferos, el cual está compuesto por mTOR, RICTOR (“*Rapamycin-independent companion of mTOR*”), mLST8/GβL (“*Lethal with SEC13 protein 8*”), mSIN1 (“*Stress activated protein kinase-interacting protein 1*”), PROTOR/PRR5 (también conocido como Protor1 y Protor2) (Cybulski y Hall, 2009) y DEPTOR (“*DEP domain-containing mTOR-interacting protein*”) (Peterson *et al.*, 2009) (Figura 1.10). Este complejo regula el metabolismo, el citoesqueleto de actina y la supervivencia celular en condiciones de estrés. mTORC2 no puede ser directamente inhibida por rapamicina, la cual no afecta a su actividad catalítica *in vitro* (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004).

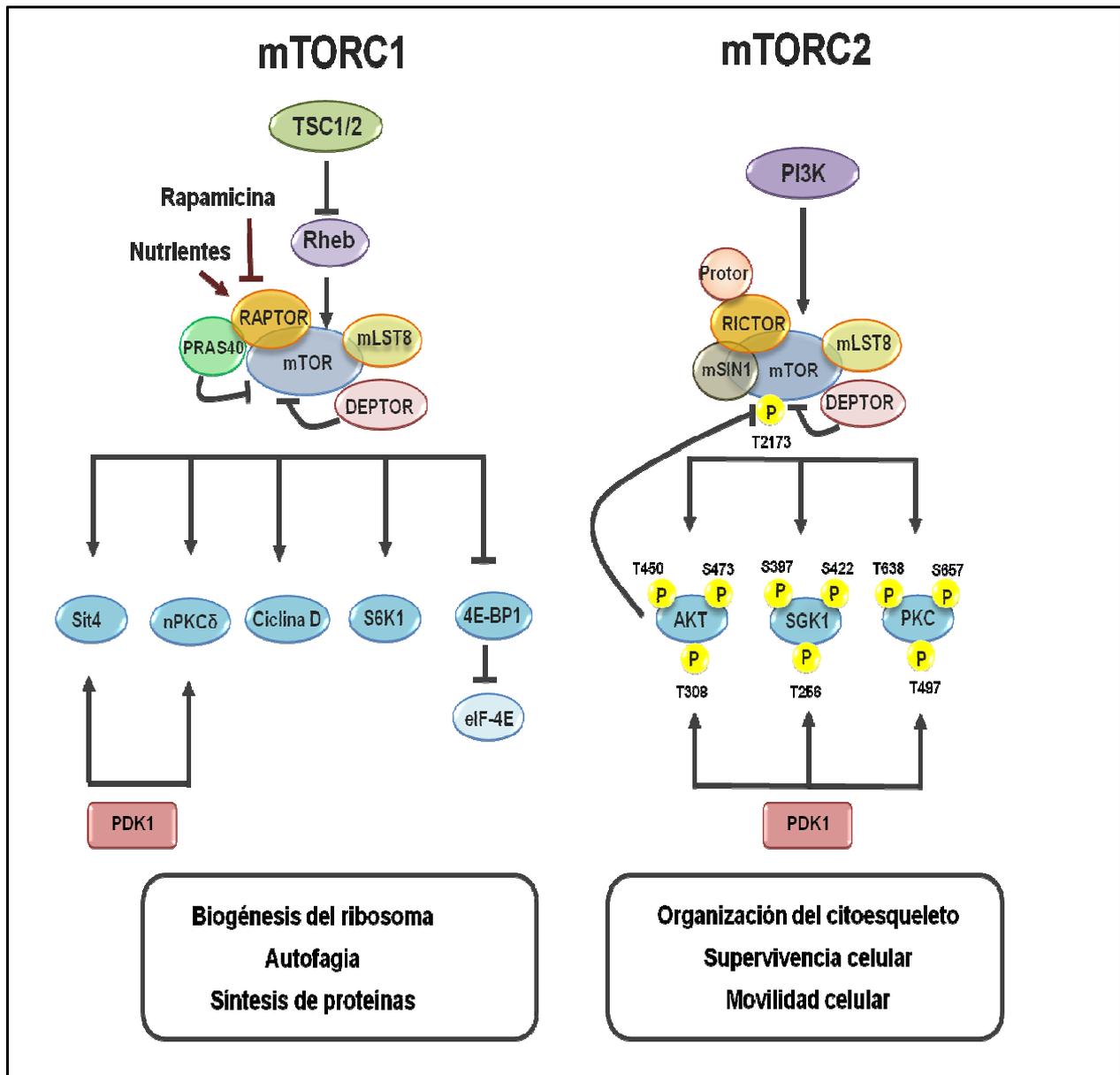


Figura 1.10. Composición y función de los complejos mTORC1 y mTORC2 en mamíferos (Adaptado de Cybulski y Hall, 2009).

RICTOR

RICTOR es un componente clave de mTORC2. Ambos desempeñan un papel esencial en el crecimiento y desarrollo embrionario, tal vez debido al control que mTORC2 ejerce sobre la organización del citoesqueleto de actina (Shiota *et al.*, 2006). RICTOR tiene pocas regiones conservadas y sus dominios funcionales no han sido identificados hasta el momento. Sin embargo, se han encontrado múltiples sitios susceptibles de fosforilación, uno de ellos diana de S6K1. La fosforilación de RICTOR dependiente de S6K1 inhibe la fosforilación de AKT en el residuo de S473 mediada por mTORC2 afectando a la proliferación celular. Este mecanismo representa una vía de posible comunicación entre ambos complejos mTOR (Sarbasov *et al.*, 2005).

mLST8

mLST8 es una proteína conservada presente tanto en mTORC1 como en mTORC2. mLST8, que está compuesto casi completamente por repeticiones WD, se une firmemente a mTOR cerca del dominio quinasa y se requiere para la integridad de mTORC2 (Guertin *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2003).

DEPTOR

DEPTOR y mLST8 son las únicas dos proteínas que son comunes tanto en mTORC1 como en mTORC2. DEPTOR interactúa con mTOR e inhibe la señalización de mTORC1 y mTORC2. DEPTOR se une a mTOR cerca del dominio quinasa y contiene dominios N-terminal DEP (“Disheveled, egl-10, pleckstrin”) y un dominio C-terminal PDZ (“Postsynaptic density 95, discs large, zonula occludens-1”) (Peterson *et al.*, 2009).

mSIN1

mTORC2 requiere tanto a RICTOR como a mSIN1 para mantener su integridad estructural y fosforilar a AKT/PKB. Existen cinco isoformas de mSIN1 y al menos tres de ellas, mSIN1.1 (Sin1), mSIN1.2 (Sin1 β) y mSIN1.5 (Sin1 α) se ensamblan de forma independiente con mTOR y RICTOR (Frias *et al.*, 2006). Curiosamente, la mayoría de los ortólogos mSIN1 contienen un dominio de unión a Ras y un dominio de homología a la plekstrina (PH), lo que sugiere que mSIN1 puede tener funciones adicionales (Schroder *et al.*, 2007).

PROTOR/PRR5

Existen dos isoformas de PROTOR denominadas PROTOR1 y PROTOR2, las cuales comparten homología en una parte de su extremo amino terminal. PROTOR se une firmemente a RICTOR pero, a diferencia de mSIN1, no es importante para la interacción entre mTORC2-RICTOR ni para la fosforilación de AKT dependiente de mTORC2 (Woo *et al.*, 2007). La depleción de PROTOR1 afecta a la fosforilación de SGK1, un sustrato de mTORC2 importante en la respuesta celular frente a estrés (Pearce *et al.*, 2011).

1.4.3.2. Reguladores aguas arriba de mTOR

mTORC1 es regulado principalmente por nutrientes, factores de crecimiento, el estado bioenergético de las células y la disponibilidad de oxígeno.

1.4.3.2.1. Regulación de mTORC1 por el Complejo TSC1-TSC2

El complejo heterodimérico TSC1-TSC2 (“*Tuberous sclerosis proteins*”) juega un papel clave como regulador y receptor de las señales de las múltiples vías de señalización que influyen en la actividad de mTOR, incluyendo las señales de los factores de crecimiento

transmitidas a través de las rutas de AKT y ERK (“*Extracellular signal-Regulated Kinase*”), la hipoxia a través de HIF1 y REDD1, y el estado de energía a través de AMPK (Wullschleger *et al.*, 2006).

En su estado activo no fosforilado, el complejo TSC1-TSC2 localiza en la membrana donde ejerce su actividad GAP (“GTPase-activating protein”) sobre el principal activador de mTORC1, la GTPasa Rheb, regulándolo negativamente (Figura 1.11). Tras su activación en respuesta a factores de crecimiento u hormonas, las vías de señalización AKT/PI3K y RAS-ERK fosforilan a TSC2, lo que deriva en la inhibición del complejo TSC1-TSC2 (Hay y Sonenberg, 2004) (Figura 1.11). La fosforilación de TSC2 promueve la translocación de TSC2 al citosol, permitiendo la activación mTORC1 (Cai *et al.*, 2006). Además, algunos estudios han demostrado que el complejo mTORC1 puede ser regulado incluso en ausencia de TSC2, lo que podría sugerir la existencia de mecanismos de regulación independientes de TSC, y probablemente también de Rheb (Roccio *et al.*, 2006; Smith *et al.*, 2005).

1.4.3.2.2. Regulación de mTORC1 por Rheb

Avruch *et al.* (2009) demostraron que Rheb, miembro de la superfamilia de GTPasas pequeñas, es el activador de mTORC1 (Figura 1.11). En mamíferos, Rheb es codificado por dos genes *RHEB1*⁺ y *RHEB2*⁺ (Patel *et al.*, 2003). *RHEB1* es dominante sobre *RHEB2* en la regulación de mTORC1 *in vivo* (Zou *et al.*, 2011). El mecanismo por el cual mTORC1 es activado por Rheb es poco conocido. La GTPasa Rheb se une directamente al dominio quinasa de mTOR y como resultado de esa unión, activa a mTORC1. No obstante, esta interacción parece ser débil y no ha sido detectada entre proteínas endógenas (Long *et al.*, 2005). Curiosamente, la interacción entre Rheb-mTOR *in vivo* e *in vitro* no depende de la unión de Rheb a GTP, aunque sí la activación catalítica de la quinasa mTOR (Sancak *et al.*, 2007).

El complejo TSC1-TSC2 juega un papel crucial en la regulación negativa de Rheb mediada por factores de crecimiento, ya que su actividad GAP promueve la conversión de GTP a GDP. Sin embargo, la regulación positiva de Rheb a través de GEFs es mucho menos conocida (Wullschleger *et al.*, 2006).

1.4.3.2.3. Regulación de mTORC1 por Rag

La GTPasa Rag es necesaria para activar a mTORC1 en respuesta a aminoácidos (Binda *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008) (Figura 1.11). En mamíferos, Rag presenta 4 isoformas, RagA y RagB que interactúan con RagC y RagD para formar un heterodímero. El complejo Rag está constitutivamente anclado a la superficie del lisosoma, a través de su interacción con *Ragulator*

formado por las proteínas MP1, p14 y p18 (Sancak *et al.*, 2010). El adaptador de señalización p62 también interactúa con Rag, favoreciendo la formación del complejo Rag que es, además, estabilizado por RAPTOR (Duran *et al.*, 2011). En ausencia de aminoácidos, RagA/B, miembro dominante del complejo, está unido a GDP y es incapaz de reclutar a mTORC1 en la superficie del lisosoma (Binda *et al.*, 2009). Como resultado, el complejo mTORC1 se encuentra disperso en el citosol en una conformación inactiva (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). La presencia de aminoácidos dentro de la célula promueve el intercambio de GDP por GTP en RagA/B por un mecanismo hasta el momento desconocido. RagA/B unido a GTP promueve la unión y el reclutamiento de mTORC1 a la superficie del lisosoma, y una vez allí, mTORC1 es capaz de interactuar con Rheb lo que conduce a su activación (Sancak *et al.*, 2010).

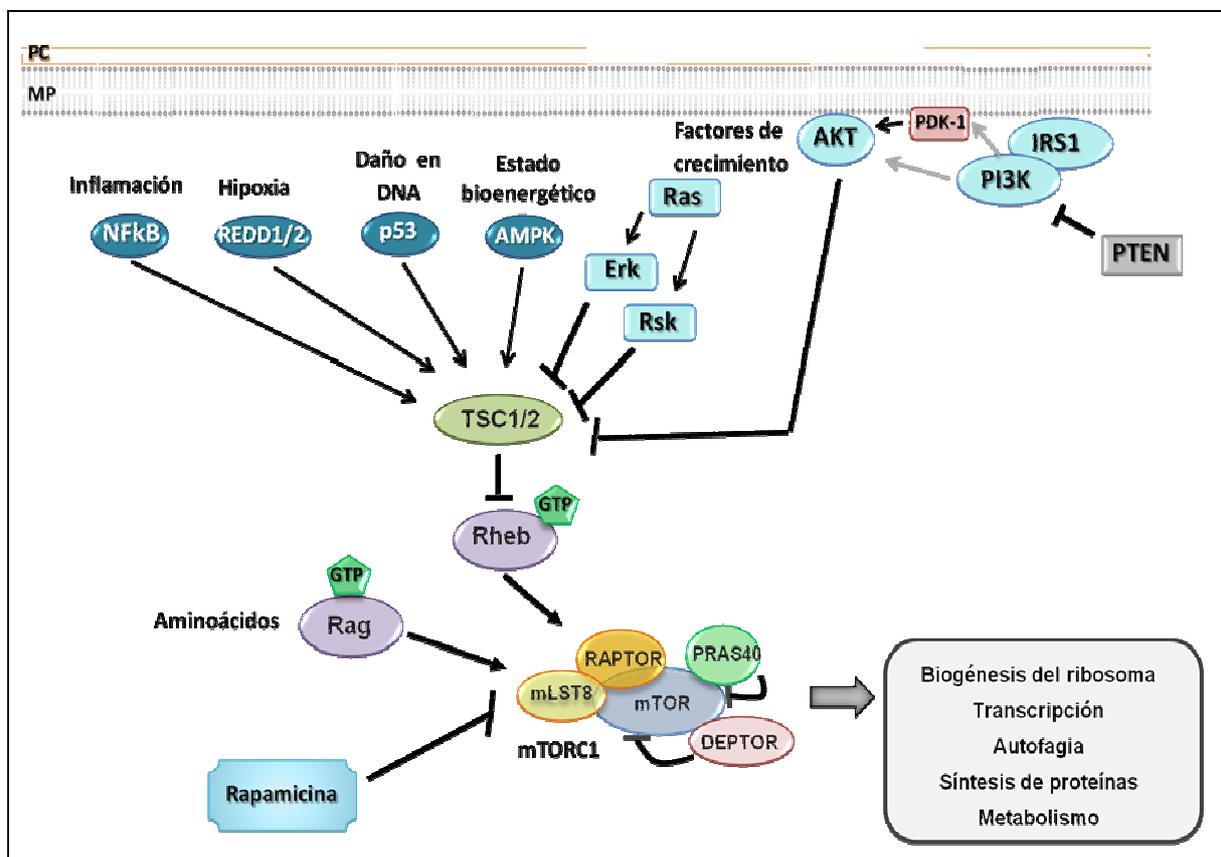


Figura 1.11. Regulación de mTORC1 (Adaptado de McCormick *et al.*, 2011).

1.4.3.2.4. Regulación de mTORC2 por Rab6

En mamíferos, la actividad del complejo mTORC2 también podría ser regulada por GTPasas de la familia Rab. Tatebe *et al.* identificaron a la GTPasa Ryh1, ortólogo de Rab6 en humanos, como un activador de la señalización de TORC2 en la levadura con fisión *Schizosaccharomyces pombe* y demostraron que Rab6 humana puede sustituir a Ryh1 en esta levadura. Estos resultados sugieren que Rab6 podría ser un activador de TORC2 en mamíferos (Tatebe *et al.*, 2010).

1.4.3.3. Efectores de mTOR

1.4.3.3.1. *mTORC1*

mTORC1 regula procesos relacionados con el crecimiento como la transcripción, la biogénesis del ribosoma, la síntesis de proteínas, el transporte de nutrientes y autofagia (Wullschleger *et al.*, 2006). En mamíferos, los substratos más caracterizados de mTORC1 son S6K y 4E-BP1, a través de los cuales mTORC1 estimula la síntesis de proteínas (Figura 1.10).

La proteína quinasa S6K1

La proteína ribosomal S6K (S6 quinasa) es un efector ampliamente estudiado del complejo mTORC1 que controla procesos celulares fundamentales, como la transcripción, la traducción, la síntesis de proteínas y lípidos, el crecimiento/tamaño celular y el metabolismo celular (Magnuson *et al.*, 2012). En mamíferos, S6K representa una familia compuesta por dos genes distintos, *S6K1⁺* (RPS6KB1, también conocido como S6K α) y *S6K2⁺* (RPS6KB2, también conocido como S6K β) (Banerjee *et al.*, 1990; Kozma *et al.*, 1990; Lee-Fruman *et al.*, 1999). En respuesta a factores de crecimiento, mTORC1 fosforila a S6K1 y S6K2 en T389 en el motivo hidrofóbico, mientras que PDK-1 fosforila directamente a S6K1 en su residuo T229 en el motivo de giro, promoviendo su actividad (Alessi *et al.*, 1998; Pullen *et al.*, 1998). Una vez activado, S6K1 actúa como un regulador positivo de la síntesis proteica (Magnuson *et al.*, 2012).

La proteína 4E-BP1

Uno de los efectores principales de mTORC1 para el control de la traducción y proliferación celulares es la proteína de unión 4E-BP1 la cual es un regulador negativo de la síntesis de proteínas (Lv *et al.*, 2015; Ma y Blenis, 2009; Shull *et al.*, 2015). Concretamente, 4E-BP1 impide el inicio de la traducción uniéndose al factor de inicio eIF4E, que es un componente limitante del complejo de múltiples subunidades que participan en la unión del ribosoma al RNA mensajero. Concretamente, la interacción de 4E-BP1 hipofosforilado con eIF4E previene su unión al factor eIF4G, inhibe el ensamblaje del complejo y reprime la traducción. mTORC1 fosforila a 4E-BP1 dando como resultado su disociación de eIF4E y el reclutamiento de eIF4G en el extremo 5' del RNA mensajero, permitiendo así el inicio de la traducción (Ma y Blenis, 2009).

1.4.3.3.2. *mTORC2*

mTORC2 regula procesos como la organización del citoesqueleto de actina, y la fosforilación y activación de miembros de la familia de quinasas AGC tales como AKT, PKC y SGK1 (Cybulski y Hall, 2009) (Figura 1.10).

AKT

La proteína quinasa AKT es codificada por 3 genes en células de mamífero denominadas AKT1 (PKB α), AKT2 (PKB β) y AKT3 (PKB γ) (Chan *et al.*, 1999). AKT fosforila a diversas dianas celulares y regula la supervivencia, el crecimiento, la proliferación y la migración celular. AKT se diferencia de otras proteínas de la familia de quinasas AGC en que poseen un dominio PH en su extremo N-terminal. Este dominio se une específicamente a PIP₂ y/o PIP₃ y juega un papel como regulador negativo (Calleja *et al.*, 2007). mTORC2 fosforila a AKT en el residuo S473 de su motivo hidrofóbico y en el residuo T450 de su motivo de giro (Ikenoue *et al.*, 2008). Diversos estudios han demostrado que PDK-1 fosforila a AKT en el residuo de T308 dentro del bucle de activación y esta fosforilación no depende, en principio, de la fosforilación en la S473 (Frias *et al.*, 2006; Guertin *et al.*, 2006; Jacinto *et al.*, 2006; Shiota *et al.*, 2006).

Proteína quinasa C (PKC)

Diversos estudios han demostrado que mTORC2 controla la actividad y estabilidad de las PKCs clásicas y nuevas a través de la fosforilación en su motivo hidrofóbico y/o de giro (Sarbasov *et al.*, 2004).

SGK1

La quinasa AGC, SGK1 (“*Serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1*”) es fosforilada por mTORC2 en el residuo S422 de su motivo hidrofóbico en respuesta a insulina y factores de crecimiento, lo que regula su actividad hacia uno de sus sustratos, NDRG1 (“*N-myc Downstream Regulated 1*”) (Garcia-Martinez y Alessi, 2008). Estudios anteriores han demostrado que la activación de SGK1 es dependiente de la activación de PI3K (fosfoinositol-3-quinasa) y de la producción de PIP₃ (Kobayashi *et al.*, 1999; Park *et al.*, 1999). Esto induce la fosforilación de SGK1 en su motivo hidrofóbico y promueve la interacción con la PDK-1, que fosforila a SGK1 en el residuo T256 en el AL (Mora *et al.*, 2004; Biondi *et al.*, 2004).

1.4.3.4. mTOR y la regulación de la síntesis de proteínas

La señalización a través de mTORC1 juega un papel clave en el control de una variedad de aspectos de la función celular. Entre ellos, controla un gran número de reguladores de la síntesis de proteínas, fundamentalmente durante los procesos de iniciación y elongación, además de actuar como el principal regulador de la producción de energía en la mitocondria (Browne y Proud, 2004; Pearce *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2001). Se ha descubierto recientemente que mTOR coordina la síntesis de proteínas y las funciones mitocondriales mediante la modulación selectiva de la síntesis de proteínas mitocondriales codificadas en el núcleo (Pearce *et al.*, 2010). mTORC1 se activa por ciertas hormonas y por factores de crecimiento, así como por nutrientes tales como aminoácidos que son necesarios para la síntesis de proteínas.

El proceso de la traducción del mRNA se divide convencionalmente en cuatro etapas principales, la primera de las cuales es la iniciación (Merrick, 2010). En células de mamífero, los factores de iniciación (eIFs) juegan un papel clave en el comienzo de la traducción, ya que favorece la unión de la subunidad 40S del ribosoma al mRNA (eIF4), y la posterior unión del RNA de transferencia iniciador que reconoce el codón de inicio. El complejo de iniciación contiene una helicasa (eIF4A), la cual puede desenrollar la estructura secundaria, y una proteína adicional, eIF4B, que promueve la actividad eIF4A. mTORC1 controla este proceso a dos niveles: i) eIF4B es fosforilado por la proteína quinasa ribosomal S6 (S6K) que es activada por mTORC1. Además, S6K fosforila a otras proteínas que participan de forma directa o indirecta en la regulación de la traducción y/o procesamiento de RNAs mensajeros, como son eEF2K, PDCD4 (“*Programmed cell death 4*”), y CBP80 (“*Nuclear cap-binding protein subunit 1*”) (Albert y Hall, 2015); ii) eIF4A es transportado al RNA mensajero a través de su interacción con eIF4G, lo cual depende de la unión de eIF4E a eIF4G; esta interacción no se lleva a cabo cuando eIF4E se une a pequeñas fosfoproteínas termoestables llamadas 4E-BP. La fosforilación de 4E-BP por mTOR inhibe su unión a eIF4E, dando lugar a la liberación de eIF4E que puede unirse a eIF4G y, así, dar lugar al inicio de la traducción (Wang *et al.*, 2005) (Figura 1.12).

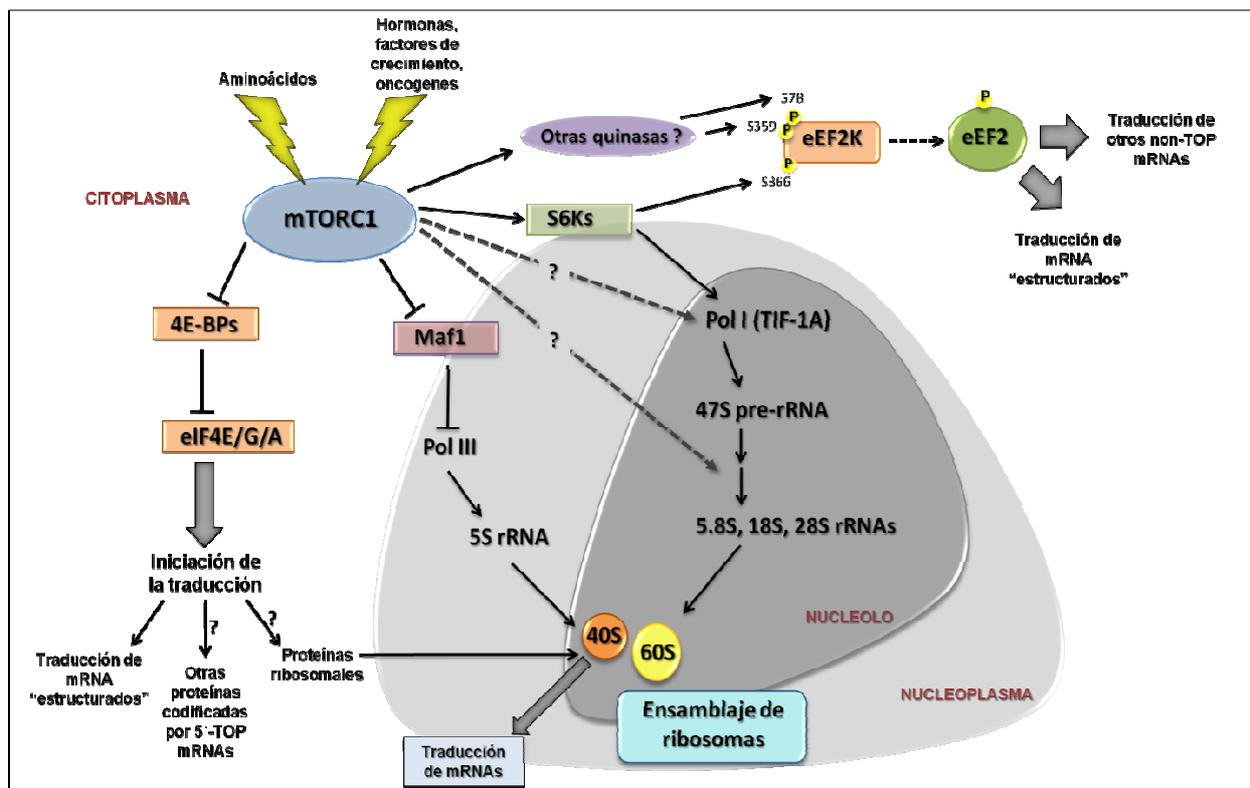


Figura 1.12. Control de la capacidad y eficacia traduccional por mTORC1 (Adaptado de Proud, 2013).

Los protagonistas fundamentales de la fase de elongación son los factores eEF1 y eEF2. eEF2 está implicado en la etapa de translocación, en la cual se libera el tRNA no cargado del sitio P para permitir la entrada del nuevo peptidil-tRNA. mTOR regula a eEF2 fosforilando e inhibiendo la

actividad de la quinasa eEF2K, promoviendo la desfosforilación del factor de elongación, y la consiguiente activación de la síntesis proteica (Wang et al., 2001) (Figura 1.12).

Los ribosomas de mamíferos están compuestos de 4 tipos diferentes de RNA ribosomales (rRNAs) y alrededor de 85-90 proteínas distintas (proteínas r). Los mRNAs que cifran estas proteínas se encuentran bajo un estricto control traduccional (Meyuhas, 2000). Dicho control es dependiente de la presencia de secuencias ricas en pirimidinas en su extremo 5' (5' TOP), y que suprime su traducción en condiciones basales. La gran mayoría de 5'TOP mRNAs codifican proteínas ribosomales y otros componentes de la maquinaria de la síntesis de proteínas. Diversos estudios han demostrado que mTORC1 regula la traducción de estos mRNAs por medio de la activación de la transcripción del DNA ribosómico (rDNA) (Hannan *et al.*, 2003; McMullen *et al.*, 2004). Aunque mTOR sí es clave para el control de la traducción de 5' TOP mRNAs, S6K y su sustrato ribosomal la proteína S6 no son necesarios para este proceso (Tang *et al.*, 2001). Además, mTORC1 regula por una parte la transcripción dependiente de la RNA polimerasa I (Pol I) modulando la actividad del factor regulador TIF-1A en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y factores de crecimiento, y por otra parte activa a Pol III, que sintetiza el rRNA 5S y tRNAs. Pol I transcribe el pre-rRNA 47S, el cual debe ser procesado para crear los rRNAs maduros 5.8S, 18S y 28S (Figura 1.12) (Mayer *et al.*, 2004).

Diversos trabajos han demostrado que la señalización de mTORC1 promueve el procesamiento de pre-rRNAs (Iadevaia *et al.*, 2012). Esto puede implicar a algunas de las proteínas ribosómicas cuya síntesis está controlada por mTORC1 y que participan en el procesamiento de pre-rRNAs. Asimismo, mTORC1 puede regular otros componentes implicados en la maduración del rRNA (Iadevaia *et al.*, 2012).

Uno de los sustratos mejor caracterizados de mTORC1 es la proteína quinasa S6 (S6K), que modula de forma indirecta la síntesis de proteínas regulando la transcripción de mRNAs implicados en la biogénesis de ribosomas (Chauvin *et al.*, 2014). La quinasa S6 parece desempeñar un papel en la relación de la señalización de mTORC1 y el control de Pol I (Jastrzebski *et al.*, 2007), aunque también pueden estar involucrados otros mecanismos adicionales. Maf1, un represor que se une e inhibe a Pol III, es fosforilado por mTOR tanto *in vitro* como *in vivo* en el residuo S75, lo que contribuye a su función como un inhibidor transcripcional (Kantidakis *et al.*, 2010; Shor *et al.*, 2010).

Hasta el momento, no se conoce con exactitud el papel del complejo mTORC2 en la síntesis de proteínas. Zinzalla *et al.* (2011) han demostrado que mTORC2 se activa a través de su asociación con el ribosoma tras la estimulación con factores de crecimiento. De hecho, en las células cancerosas que presentan hiperactivación de la vía PI3K se produce una mayor asociación de mTORC2 con el ribosoma y un incremento en la actividad del complejo. Además, mTORC2 se asocia específicamente con los ribosomas que se encuentran traduciendo sustratos específicos del complejo, a los que fosforila co-traduccionalmente (Dai *et al.*, 2013; Oh *et al.*, 2010).

1.4.4. TOR en levaduras modelo

1.4.4.1. Saccharomyces cerevisiae

1.4.4.1.1. Características generales

S. cerevisiae posee dos quinasas TOR, Tor1 y Tor2, que son codificadas por genes distintos. Tor1 forma parte exclusivamente del complejo TORC1, mientras que Tor2 se encuentra presente tanto en TORC1 como en TORC2 (Wullschleger *et al.*, 2006).

1.4.4.1.1.1. TORC1

Los componentes principales de TORC1 son Tor1 o Tor2, Kog1, Lst8 y Tco89. TORC1 es sensible a la rapamicina, la cual forma un complejo con FPR1 que se une a Tor e inhibe la actividad del complejo (Loewith *et al.*, 2002; Stan *et al.*, 1994). TORC1 regula el crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y estrés celular mediante la regulación de la síntesis de proteínas. Además también regula la biogénesis de ribosomas, autofagia, activación transcripcional, meiosis, ciclo celular, y clasificación e intercambio de transportadores de nutrientes (Inoki *et al.*, 2005; Martin y Hall, 2005) (Figura 1.13). Estudios han demostrado que TORC1 se concentra en el límite de la membrana de las vacuolas utilizando una versión unida a GFP de las proteínas Kog1, Tco89, Lst8 y Tor1 (Urban *et al.*, 2007; Berchtold y Walther, 2009; Binda *et al.*, 2009).

Tor1 y Tor2

Tor1 y Tor2 son proteínas con un peso molecular de 281 kDa y 282 kDa, respectivamente (Chen y Kaiser, 2003; Kunz *et al.*, 2000), con un 80% de similitud de sus aminoácidos (Cafferkey *et al.*, 1994). Las proteínas Tor consisten en varios dominios funcionales cuyas estructuras están conservadas evolutivamente con respecto a organismos superiores (Dames *et al.*, 2005). Estas proteínas controlan el crecimiento celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes y se asocian a vacuolas, aunque también a la membrana plasmática, al aparato de Golgi, a vacuolas, a mitocondrias y al núcleo (Dennis *et al.*, 1999; Thomas *et al.*, 1997; Kunz *et al.*, 2000).

Kog1

Kog1 tiene un peso molecular de 176 kDa y contiene cuatro repeticiones HEAT internas y siete repeticiones WD-40 C-terminales. (Loewith *et al.*, 2002). Kog1 está conservada desde levaduras a humanos y es el homólogo de la proteína reguladora TOR de mamíferos RAPTOR / mKOG1 (Loewith *et al.*, 2002).

La falta de Kog1 causa un fenotipo similar al tratamiento con rapamicina y las células muestran una parada del crecimiento celular, morfología celular alterada, reducción en la síntesis de

proteínas, acumulación de glucógeno y regulación positiva en la transcripción de catabolitos de nitrógeno reprimidos y genes de respuesta retrógrada (Loewith *et al.*, 2002).

Lst8

Lst8 es una subunidad que está presente tanto en TORC1 como en TORC2 (Cardenas *et al.*, 1999; Loewith *et al.*, 2002; Weisman y Choder, 2001). Lst8 codifica una proteína esencial conservada en eucariotas superiores con una identidad en la secuencia de aminoácidos del 28% entre la levadura y su homólogo en humanos (Roberg *et al.*, 1997). Lst8 está involucrada en los procesos de señalización mediada por TOR y en la respuesta celular a la pérdida de la función mitocondrial (también conocida como la respuesta retrógrada) (Chen y Kaiser, 2003; Liu *et al.*, 2001; Loewith *et al.*, 2002).

La pérdida de función de Lst8 produce hipersensibilidad a la rapamicina, inestabilidad de la pared celular, despolarización del esqueleto de actina y una incapacidad para absorber aminoácidos (Chen y Kaiser, 2003; Loewith *et al.*, 2002; Roberg *et al.*, 1997).

Tco89

Tco89 codifica una proteína no esencial de TORC1. Las mutaciones en Tco89 son sintéticamente letales en combinación con mutaciones en Tor1 y la pérdida de Tco89 conduce a la hipersensibilidad a la rapamicina y a defectos en la integridad de la pared celular. Al igual que Tor1, Tor2 y Lst8, Tco89 se localiza en el lado interno de la membrana plasmática, pero a diferencia de los otros componentes de TORC1, Tco89 también puede encontrarse alrededor de la membrana vacuolar. Esta diferencia de la localización sugiere que Tco89 puede tener una función adicional independiente de su papel como un componente de TORC1 (Reinke *et al.*, 2004).

1.4.4.1.1.2. TORC2

El complejo TORC2, formado por Tor2, Avo1, Avo2, Avo3, Bit61 y Lst8, es insensible a la rapamicina y está involucrado en la regulación de la polarización del citoesqueleto de actina durante la progresión del ciclo celular, la integridad de la pared celular, la síntesis de lípidos, la endocitosis de los receptores de nutrientes y la supervivencia celular en respuesta a estrés (deHart *et al.*, 2003; Schmidt *et al.*, 1996). TORC2 se localiza preferentemente cerca de la membrana plasmática por medio del dominio PH presente en Avo1 (Berchtold y Walther, 2009) (Figura 1.13).

Avo1

Avo1 codifica una proteína esencial de 165 kDa la cual juega un papel importante en la integridad estructural de TORC2 ya que junto con Avo3 actúa como una proteína de anclaje (Wullschleger *et al.*, 2005). Además, células mutantes *avo1Δ* muestran un defecto en la polarización del citoesqueleto de actina al igual que células *tor2Δ* (Wullschleger *et al.*, 2005).

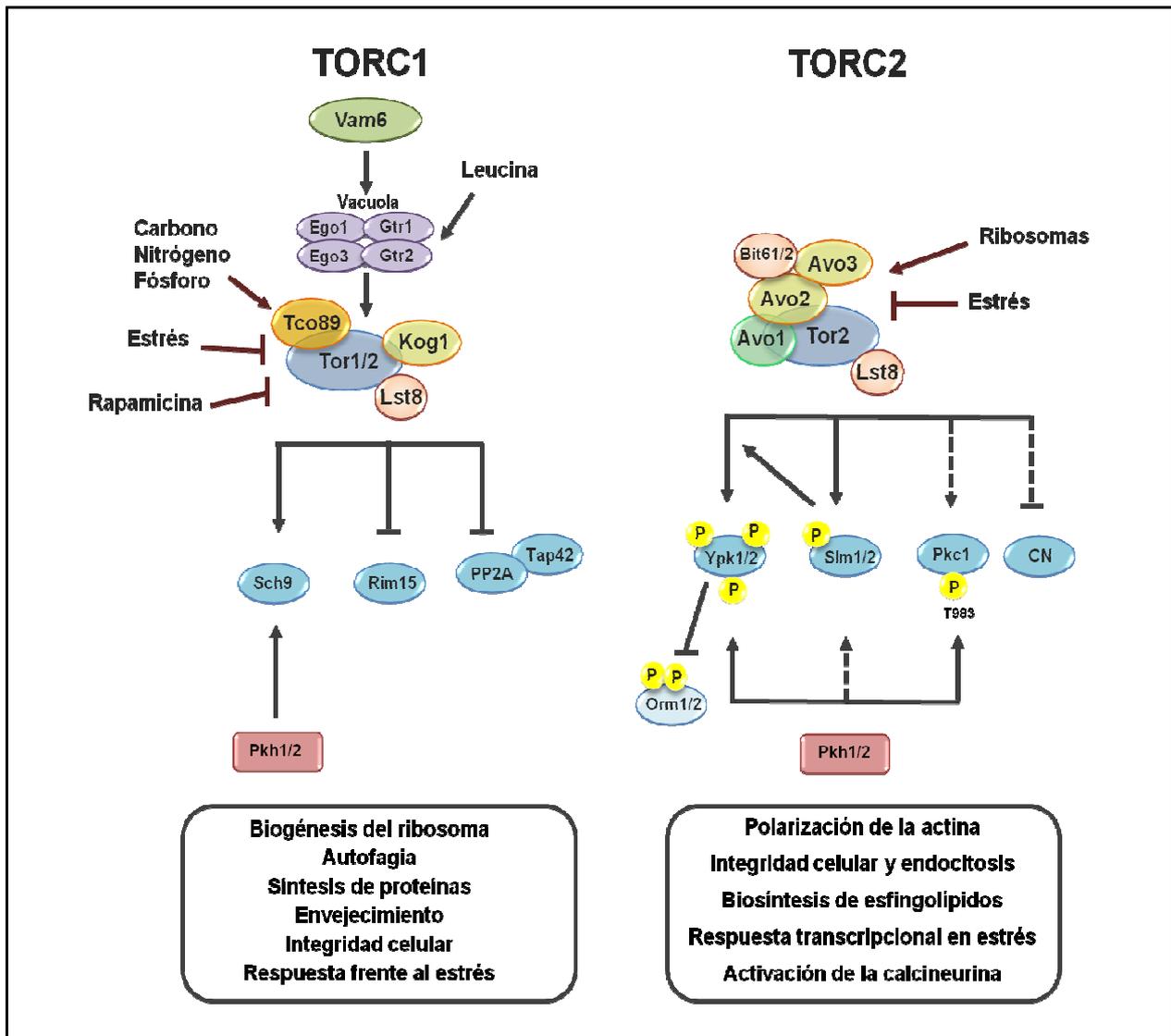


Figura 1.13. Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. cerevisiae* (Adaptado de Cybulski y Hall, 2009).

Avo2

Avo2 codifica una proteína no esencial que es una subunidad de TORC2 (Wullschleger *et al.*, 2005). A través de la interacción física directa con Avo2 y Bit61, las subunidades Slm1p y Slm2p pueden asociarse con TORC2, por tanto Avo2 podría actuar como una proteína adaptadora (Fadri *et al.*, 2005).

Avo3/Tsc11

Avo3/Tsc11 codifica una proteína esencial de TORC2 que fue originalmente identificada como un supresor de una mutación en Csg2, un gen implicado en la biosíntesis de esfingolípidos, sugiriendo un vínculo entre los esfingolípidos y la señalización de TORC2 en levadura (Beeler *et al.*, 1998). Avo3 está conservada desde levaduras a humanos y es el homólogo de la proteína RICTOR / mAvo3 en mamíferos (Jacinto *et al.*, 2004; Sarbassov *et al.*, 2004). Avo3, al igual que Avo1, se une a

la región N-terminal de los dominios HEAT de Tor2, lo cual es necesario para mantener la integridad estructural de TORC2 (Loewith *et al.*, 2002). Tor2 es capaz de fosforilar a Tsc11, pero esta fosforilación no es esencial para la integridad del complejo (Wullschleger *et al.*, 2005).

Lst8

Lst8 es una proteína esencial altamente conservada presente tanto en TORC1 como en TORC2 y está compuesta casi exclusivamente por siete dominios WD40 (Loewith *et al.*, 2002). Además, es necesaria para el transporte de la permeasa de aminoácidos Gap1 desde el aparato de Golgi hasta la superficie celular (Chen y Kaiser, 2003; Roberg et al., 1997). Lst8 se une al extremo C-terminal de Tor2, activándola (Wullschleger *et al.*, 2005).

Bit61/2

Bit61⁺ es un gen no esencial que codifica una subunidad de TORC2 que se asocia a la membrana (Wullschleger *et al.*, 2005). Está implicado en la regulación de la dinámica del citoesqueleto de actina dependiente del ciclo celular durante el crecimiento polarizado y la integridad de la pared celular. Bit61 tiene un parálogo, Bit2, que surgió de la duplicación del genoma entero (Fadri *et al.*, 2005; Loewith *et al.*, 2002; Reinke *et al.*, 2004; Wedaman *et al.*, 2003). Los efectores de TORC2, Slm1 y Slm2, son capaces de asociarse con el complejo a través de la interacción física directa con Bit61/2 y Avo2 (Fadri *et al.*, 2005).

Tor2

Tor2, la proteína principal de TORC2, es una quinasa altamente conservada que ha demostrado ser un importante regulador de múltiples funciones celulares incluyendo crecimiento celular, polimerización de actina, endocitosis y síntesis de esfingolípidos (Loewith *et al.*, 2002). El complejo TORC2 no es sensible a rapamicina debido a que el complejo PKBP12-rapamicina no se une al dominio FRB de Tor2 (Loewith *et al.*, 2002).

1.4.4.1.2. Reguladores de TOR en *S. cerevisiae*

1.4.4.1.2.1. Regulación de TORC1 por el complejo EGO

En levaduras, la actividad de TORC1 está regulada en la membrana vacuolar a través de las proteínas Ego1, Ego3, Gtr1, y Gtr2, las cuales en conjunto forman el complejo EGO (EGOC) (Dubouloz *et al.*, 2005). Gtr1 y Gtr2 son proteínas GTPasas de la familia Ras, ortólogos de las proteínas Rag A-D en mamíferos (Efeyan *et al.*, 2012; Sancak *et al.*, 2008). Gtr1, particularmente cuando está unido a GTP, interactúa físicamente con Tco89 y Kog1, y esa interacción se reduce en ausencia de leucina (Binda *et al.*, 2009). Ego1 y Ego3 son homólogos funcionales del complejo Regulator en organismos superiores (Kogan *et al.*, 2010; Sancak *et al.*, 2010). Ego1 está miristoilado

y palmitoilado en el extremo N-terminal, anclando a EGO en la membrana vacuolar (Binda *et al.*, 2009; Dubouloz *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2012). La función que ejerce Ego3 sobre el complejo no ha sido descubierta todavía, aunque se conoce que forma homodímeros, los cuales, como los dominios C-terminal de Gtr1 y Gtr2, son estructuralmente similares a los miembros de la superfamilia de proteínas Roadblock/LC7, una familia de proteínas conservadas asociadas a dineína (Kogan *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2012). En levaduras, la unión a GTP de Gtr1 en el complejo heterodimérico con Gtr2 unido a GDP estimula a TORC1 en respuesta a aminoácidos, de forma similar a lo que se observa en vertebrados (Kim *et al.*, 2008; Sancak *et al.*, 2008). El complejo EGO puede regular tanto positivamente como negativamente a TORC1 mediante la interacción física con sus subunidades.

Existen diversos mecanismos encargados de transmitir variaciones en la concentración de aminoácidos en la célula al complejo EGO. En levaduras, un posible candidato es Vam6/Vps39, el factor de intercambio del nucleótido de guanina (GEF) de Gtr1 (Binda *et al.*, 2009). Otro de los mecanismos propuesto involucra a la sintetasa L-Leucyl-tRNA (LRS). En mamíferos, cuando está presente la leucina, LRS podría actuar como GAP de RagD, mientras que en levaduras la presencia de leucina parece promover la actividad de LRS como GEF de Gtr1 (Bonfils *et al.*, 2012; Han *et al.*, 2012).

1.4.4.1.3. Efectores de TOR en *S. cerevisiae*

1.4.4.1.3.1. TORC1

Sch9

Sch9 es una proteína quinasa AGC no esencial, ortólogo de S6K1 en mamíferos, la cual está involucrada en la activación de los genes de respuesta a estrés osmótico, la regulación de la fase G1, actividad de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP (cAPK), señalización de nutrientes y regulación de la biosíntesis de esfingolípidos. TORC1 fosforila 6 residuos en el extremo C-terminal de Sch9 que corresponden a T737 en el HM, T723 y S726 en el TM y S758, S765 y S711 en una región que se asemeja al HM (Loewith *et al.*, 2011). Esta fosforilación activa a Sch9 y es utilizada como una rápida lectura de la actividad de TORC1 (Urban *et al.*, 2007) (Figura 1.13). Sch9 es rápidamente desfosforilado durante el tratamiento de las células con rapamicina y también en respuesta al ayuno de carbono, nitrógeno, fosfato, o aminoácidos específicos (Binda *et al.*, 2009; Urban *et al.*, 2007). Aunque está principalmente localizado en el límite de la membrana vacuolar, Sch9 también está asociado con la cromatina donde podría ejercer más efectos directos en el control de factores de transcripción como Gis1, aunque este papel parece tener lugar independientemente de TORC1 (Pascual-Ahuir y Proft, 2007). Uno de los principales papeles de Sch9 dependiente de su regulación por TORC1 es la modulación de la traducción y el tamaño celular (Jorgensen *et al.*, 2004). Asimismo, participa en la regulación de la respuesta celular a estrés y entrada a la fase G0, mediante la fosforilación y el secuestro en el citosol de Rim15, el cual dificulta la activación de algunos genes de

respuesta a estrés (Wanke *et al.*, 2008). Sch9 también regula negativamente genes involucrados en la función mitocondrial (Smets *et al.*, 2010), la homeostasis y señalización de esfingolípidos (Huang *et al.*, 2014), y la autofagia y el envejecimiento (Sampaio-Marques *et al.*, 2011).

Fosfatasas PP2A y Tap42

Las fosfatasas PP2A consisten en un complejo heterotrimérico, el cual contiene la subunidad Tpd3 (van Zyl *et al.*, 1992), una subunidad catalítica, la cual puede ser una de las tres proteínas redundantes Pph21, Pph22, o Pph3, y una subunidad regulatoria, Cdc55 o Rts1 (Healy *et al.*, 1991; Zhao *et al.*, 1997). Los complejos de proteínas fosfatasas relacionadas con PP2A están compuestos por Sit4 o Ppg1, acompañados por una de las cuatro subunidades regulatorias (Sap4, Sap155, Sap185, y Sap190) (Luke *et al.*, 1996). Tap42 es una proteína regulatoria esencial que actúa aguas abajo de Tor (Di Como y Arndt, 1996). Cuando TORC1 está activo fosforila a Tap42, la cual se asocia al complejo de fosfatasas Pph21/22-Sit4 junto con una de las proteínas regulatorias Rrd1 o Rrd2 del complejo PP2A (Di Como y Arndt, 1996; Jiang y Broach, 1999). Tap42 asociado al complejo de fosfatasas se localiza en la membrana, donde interactúa con TORC1 (Aronova *et al.*, 2007; Kunz *et al.*, 2000). El tratamiento con rapamicina o el ayuno de nitrógeno libera este complejo al citosol y, simultáneamente se produce la desfosforilación de Tap42 (Yan *et al.*, 2006). Esto activa a las fosfatasas, que a su vez permiten la expresión de los genes de la represión catabólica de nitrógeno y genes de respuesta a estrés (Duvel *et al.*, 2003; Shamji *et al.*, 2000). Tip41 coopera con Tap42 en una regulación similar de la actividad de los complejos de fosfatasas relacionados con PP2A que contienen Sit4 (Jacinto *et al.*, 2001; Santhanam *et al.*, 2004). La activación de Rho1, principal sensor de la ruta CIP, altera la actividad de TORC1 y PP2A por su unión directa a Kog1, lo cual resulta en una ruptura de la asociación a la membrana de TORC1. Esta unión también desencadena la liberación y activación de Tap42-PP2A (Yan *et al.*, 2012).

Rim15

Rim15 es una proteína quinasa implicada en la proliferación celular en respuesta a nutrientes, la cual regula positivamente la degradación autofágica selectiva de los ribosomas (ribofagia), mientras que regula negativamente la degradación no selectiva de los ribosomas (Waliullah *et al.*, 2017). Rim15 está regulado negativamente por TORC1 y por PKA a través de mecanismos diferentes. PKA inhibe la actividad quinasa de Rim15 (Reinders *et al.*, 1998), mientras que la inhibición de TORC1 conduce a la localización nuclear de Rim15. Esta proteína quinasa regula positivamente una variedad de genes cuya expresión depende de los factores de transcripción Msn2, Msn4 y Gis1 (Cameroni *et al.*, 2004). Además de la activación transcripcional, Rim15 también regula la expresión de genes por la estabilización postranscripcional del mRNA (Cameroni *et al.*, 2004).

1.4.4.1.3.2. TORC2

Ypk1/2

En *S. cerevisiae*, TORC2 fosforila y activa a las proteínas quinasas Ypk1 y Ypk2, las cuales comparten el 90% de similitud de secuencia y son ortólogas a Gad8 y SGK1 en *S. pombe* y células de mamíferos, respectivamente (Kamada *et al.*, 2005) (Figura 1.13). La fosforilación en el AL de Ypk1 e Ypk2 por las proteínas Pkh1 y Pkh2, homólogas a PDK-1 en mamíferos, es necesaria para su activación a través de TORC2 (Roelants *et al.*, 2002; Roelants *et al.*, 2004). TORC2 controla el nivel de esfingolípidos en la membrana plasmática a través de la activación de Ypk1 e Ypk2 (Roelants *et al.*, 2002).

En primer lugar, la disminución de esfingolípidos desencadena la activación de las proteínas eisosómicas Slm1 y Slm2 para facilitar la asociación de Ypk1 con la membrana plasmática (Luo *et al.*, 2008; Niles *et al.*, 2012; Niles y Powers, 2012). En segundo lugar, Ypk1 es fosforilado por TORC2 en dos sitios diferentes ubicados en su dominio C-terminal, posiblemente aumentando su competencia para ser fosforilado adicionalmente (Niles *et al.*, 2012). En tercer lugar, después de la fosforilación por TORC2, Pkh1/2 fosforila a Ypk1 dentro del AL de su dominio quinasa para su completa activación catalítica (DeHart *et al.*, 2002; Niles *et al.*, 2012; Roelants *et al.*, 2002). A continuación, Ypk1 fosforila a las proteínas Orm1 y Orm2, inactivándolas (Roelants *et al.*, 2011). Orm1 y Orm2 son proteínas de membrana integrales del retículo endoplasmático que inhiben la síntesis de esfingolípidos cuando se activan (Roelants *et al.*, 2011).

Slm1/2

Las proteínas Slm1 y Slm2 son proteínas eisosómicas que albergan un dominio de homología a la pleckstrina (PH), que interactúa con fosfoinosítidos. El fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato y el dominio PH de Slm1 son muy importantes en la orientación de Slm1 en la membrana plasmática (Audhya *et al.*, 2004a; Fadri *et al.*, 2005).

Las proteínas Slm1 y Slm2 desempeñan un papel muy importante en la célula a través de dos vías principales. Slm1 y Slm2 son fosforilados por TORC2 para la señalización aguas abajo del citoesqueleto de actina, y también pueden actuar para regular la actividad de TORC2. En segundo lugar, Slm1 y Slm2 juegan un papel importante en el mantenimiento de esfingolípidos mediante la regulación de la interconexión entre múltiples vías. Este mecanismo está estrechamente regulado por la adecuada fosforilación y desfosforilación de Slm1 por TORC2 y calcineurina, respectivamente. Aunque TORC2 y calcineurina son reguladores importantes de Slm1 y Slm2, otras quinasas y fosfatasas pueden ser necesarias para el mantenimiento de un nivel óptimo entre las formas fosforiladas y desfosforiladas (Bartlett y Kim, 2014).

Pkc1

Pkc1 es una serín/treonín-quinasa, homóloga a las isoformas de PKC $\alpha/\beta/\gamma$ en mamíferos. La ruta Pkc1-MAP quinasa juega un papel muy importante en el mantenimiento de la integridad celular durante el crecimiento vegetativo de *S. cerevisiae*, y es activada en respuesta a una gran variedad de estímulos externos que provocan un estrés sobre la pared celular, regulando la biogénesis de la misma en periodos de crecimiento polarizado de las células (Levin, 2005; Verna *et al.*, 1997). TORC2 controla la regulación del citoesqueleto de actina a través de la ruta de MAP quinasa de integridad celular vía Pkc1, por medio de las GTPasas Rho1 y Rho2 y su GEF (“*Guanine nucleotide Exchange Factor*”) Rom2 (Helliwell *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1997). Además, TORC2 es importante para la fosforilación de Pkc1 en su HM (Facchinetti *et al.*, 2008).

Calcineurina (CN)

La calcineurina (CN) es una fosfatasa con especificidad para residuos de serina/treonina y dependiente de calmodulina (CaM) que está compuesta por una subunidad catalítica (calcineurina A, CNA) y una subunidad reguladora (calcineurina B, CNB). La señalización a través de calcineurina juega un papel crítico en procesos que van desde la respuesta de supervivencia al estrés en levaduras (Bonilla y Cunningham, 2002) hasta al desarrollo de mamíferos (Graef *et al.*, 2001). TORC2 tiene un papel fundamental en la regulación negativa de la señalización dependiente de calcineurina en estrés (Mulet *et al.*, 2006).

1.4.4.1.4. Procesos celulares regulados por TOR en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae*, TORC1 controla la síntesis de proteínas a través de la regulación del factor de inicio de la traducción eIF2, el cual es fosforilado tras el ayuno de aminoácidos o el tratamiento con rapamicina, e interfiere con la traducción de mRNAs dependiente de 5' CAP (Hinnebusch, 2005). Además de eIF2, TORC1 parece regular otros factores reguladores de la traducción (Huber *et al.*, 2009; Loewith, 2010; Soulard *et al.*, 2010). TORC1 regula la biogénesis de ribosomas a múltiples niveles: i- controlando la acumulación de transcritos dependientes de la RNA polimerasa I (Reiter *et al.*, 2011); ii- regulando a la RNA polimerasa III por medio de las quinasa Sch9 y Maf1 (Vannini *et al.*, 2010); iii- modulando la expresión de los 78 genes que cifran la síntesis de las correspondientes proteínas que conforman el ribosoma en la levadura (Lempiainen y Shore, 2009); iv- regulando el ensamblaje del ribosoma (Honma *et al.*, 2006; Huber *et al.*, 2009; Loewith, 2010); y v- regulando la estabilidad de ciertos mRNAs ribosomales (Loewith, 2010; Soulard *et al.*, 2010).

Por otro lado, TORC1 es importante para la respuesta celular orquestada en situaciones de estrés, y que promueven su inhibición (Kuranda *et al.*, 2006; Urban *et al.*, 2007). Dicha inhibición activa la transcripción de los genes ESR (“*Environmental Stress Response*”) modificando la localización subcelular de la quinasa Rim15. En principio, este incremento en la transcripción podría

ser infructuoso, dado que la inhibición de TORC1 también provoca un aumento en la degradación de mRNAs y una disminución drástica en la traducción. Sin embargo, Rim15 fosforila a las proteínas Igo1 e Igo2, las cuales protegen a los nuevos transcritos de la degradación (Luo *et al.*, 2011; Talarek *et al.*, 2010).

TORC2 controla principalmente, aunque no exclusivamente, la polarización del citoesqueleto de actina dependiente del ciclo celular mediante el efector de Rho1, Pkc1, y la ruta Pkc1-MAP quinasa (Helliwell *et al.*, 1998). Tor2 activa a Rho1 mediante su GEF Rom2, cuya actividad se reduce en un mutante Tor2-termosensible (Bickle *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1997). El hecho de que la sobreexpresión de Rom2 suprime la mutación de un mutante Tor2 termosensible, mientras que la sobreexpresión de Rom2 catalíticamente activo es deficiente en su unión al dominio PH, sugiere que TORC2 señala a Rom2 mediante el dominio PH (Schmidt *et al.*, 1996). Esto implica que el reclutamiento y/o activación de Rom2 requiere de lípido de membrana como PIP₂ (Audhya y Emr, 2002; Desrivieres *et al.*, 1998; Helliwell *et al.*, 1998). La unión de las proteínas Slm a fosfoinosítidos y esfingolípidos también puede estar funcionalmente relacionada con el control del citoesqueleto de actina mediado por TORC2 (Audhya *et al.*, 2004a; Daquinag *et al.*, 2007; Fadri *et al.*, 2005; Friant *et al.*, 2001; Liu *et al.*, 2005; Roelants *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2000; Tabuchi *et al.*, 2006).

TORC2 ejerce una regulación positiva en la biosíntesis de esfingolípidos mediante las proteínas Ypk1 e Ypk2 (Powers *et al.*, 2010). Cuando los niveles de esfingolípidos disminuyen, Slm1 se libera del eisosoma y provoca la asociación de Ypk1 a la membrana plasmática para señalar la inducción de la producción de esfingolípidos (Berchtold *et al.*, 2012). Este proceso también está regulado por la fosfatasa calcineurina que funcionalmente está relacionada con las proteínas Slm (Aronova *et al.*, 2008; Bultynck *et al.*, 2006; Mulet *et al.*, 2006). Ypk1 fosforila a las proteínas Orm1 y Orm2, las cuales forman un complejo que regula negativamente la primera etapa en la biosíntesis de esfingolípidos por TOR (Breslow *et al.*, 2010; Han *et al.*, 2010).

1.4.4.2. *Schizosaccharomyces pombe*

1.4.4.2.1. Características generales

La levadura con fisión también posee dos quinasas TOR, Tor1 y Tor2, codificadas por los genes *tor1*⁺ y *tor2*⁺, respectivamente (Kawai *et al.*, 2001; Weisman y Choder, 2001). Tor1 es el ortólogo de Tor2 en *S. cerevisiae* y viceversa. Ambas quinasas regulan la respuesta celular tras el ayuno de fuente de nitrógeno (Weisman y Choder, 2001).

Una característica notable de *S. pombe* es que la rapamicina no inhibe el crecimiento celular, lo que contrasta significativamente con su efecto en *S. cerevisiae*. Sin embargo, la rapamicina puede inhibir algunos procesos fisiológicos en *S. pombe*, incluyendo el desarrollo sexual y la captación de

aminoácidos (Weisman y Choder, 2001; Weisman et al., 1997) y también adelanta el inicio de la mitosis (Petersen y Nurse, 2007).

1.4.4.2.1.1. *TORC1*

El complejo TORC1 está formado por Tor2, Mip1 (ortólogo de RAPTOR), Wat1/Pop3 (ortólogo de LST8), Tco89 y Toc1. Además, se ha descrito que Tor1 también puede formar parte de este complejo en determinadas condiciones de estrés nutricional (Hartmuth y Petersen, 2009) (Figura 1.14).

Tco89

El gen *tco89*⁺ codifica a una proteína de 49 kDa que se identificó mediante un análisis de espectrometría de masas de proteínas que interactuaban con Tor2. Se han encontrado homólogos únicamente en hongos, y estas proteínas comparten dos dominios conservados (Hayashi *et al.*, 2007). Las funciones fisiológicas de Tco89 son desconocidas hasta el momento.

Mip1

El gen *mip1*⁺ codifica a una proteína de 148 kDa, la cual contiene un motivo de repetición de WD en la región C-terminal y está conservada en eucariotas. Mip1 se encuentra en el citoplasma, y diversos estudios han demostrado que está unido a Mei2 *in vivo*. La forma silvestre de Mip1 es requerida para la función de Mei2 en la inducción de la meiosis. Mip1 parece estar involucrado también en la conjugación, mediante la asociación con Ste11, que es un factor de transcripción clave para el desarrollo sexual. Además, Mip1 es esencial para el crecimiento celular, para lo cual ni Mei2 ni Ste11 son relevantes. Esto sugiere que Mip1 ayuda a la expresión funcional de una serie de proteínas necesarias para la proliferación y el desarrollo sexual en la levadura con fisión. Además, Mip1 y Tor2 interactúan física y genéticamente, cooperando íntimamente en el complejo TORC1 (Shinozaki-Yabana *et al.*, 2000).

Wat1/Pop3

Pop3/Wat1 es una proteína conservada que está compuesta de 7 repeticiones WD40 (Neer *et al.*, 1994), y es necesaria para la correcta morfología de la célula y la localización de la F-actina, por lo que Poo3/Wat1 desempeña un papel crucial en la formación del citoesqueleto de actina y los microtúbulos (Kemp *et al.*, 1997). Wat1/Pop3 es una subunidad común tanto en TORC1 como en TORC2 y es necesario en la maduración del mRNA como una proteína de acoplamiento entre el *splicing* y la síntesis y/o estabilización (Ochotorena et al., 2001).

Toc1

El gen *toc1*⁺ codifica a la proteína Toc1 (“*Tor complex 1*”) de 49 kDa. Toc1 también fue identificada a través del análisis de proteínas que interactuaban con Tor2 mediante espectrometría de masas. Se ha encontrado un único homólogo en *Schizosaccharomyces japonicus* (Hayashi *et al.*, 2007). Las funciones fisiológicas de Toc1 son desconocidas hasta el momento.

Tor2 y Tor1

Tor2 es una proteína esencial y quinasa principal del complejo TORC1 en *S. pombe*, la cual controla el cambio entre el crecimiento y la diferenciación celular en respuesta a la disponibilidad de nutrientes (Weisman y Choder, 2001). Tor2 controla el crecimiento celular y la biogénesis de los ribosomas mediante la regulación de la expresión génica de proteínas ribosómicas (Álvarez *et al.*, 2006). La sobreexpresión de Tor2 reprime fuertemente la conjugación, la meiosis y la eficacia de la esporulación, mientras que la inactivación de Tor2 tiene el efecto opuesto, dando lugar a la diferenciación celular, independientemente de las condiciones nutricionales (Álvarez y Moreno, 2006). Además, una fracción de Tor1, cuando forma parte de TORC1, se asocia con Mip1, especialmente en medio mínimo, para controlar la mitosis bajo condiciones de estrés nutricional (Hartmuth y Petersen, 2009; Matsuo *et al.*, 2007).

1.4.4.2.1.2. ***TORC2***

Tor1 forma el complejo TORC2 asociándose con Ste20 (ortólogo de RICTOR/Avo3), Wat1/Pop3, Sin1 (ortólogo de mSIN1) y Bit61 (ortólogo de PROTOR/PRR5) (Álvarez y Moreno, 2006; Hayashi *et al.*, 2007; Matsuo *et al.*, 2007) (Figura 1.14).

Ste20

Ste20 es una proteína de 147 kDa que forma parte del complejo TORC2 y regula múltiples procesos celulares para controlar el crecimiento celular en respuesta a las señales ambientales (Hayashi *et al.*, 2007). El mutante *ste20Δ* es fenotípicamente similar a *tor1Δ*, por lo que Ste20 probablemente sea un componente mayoritario de TORC2. Diversos estudios han sugerido que Tor2 interacciona físicamente con Ste20 en condiciones de sobreexpresión, lo que sugiere que una pequeña proporción de TORC2 podría incluir esta quinasa (Matsuo *et al.*, 2007).

Sin1

La proteína de interacción con SAPK1, Sin1, es un componente importante del complejo TORC2 ya que es necesaria para su ensamblaje (Jacinto *et al.*, 2006; Yan *et al.*, 2006). La mayoría de homólogos de Sin1 contienen tres dominios comunes: la región conservada en el dominio medio (CRIM), el dominio de unión a Ras y el dominio de homología a pleckstrina (PH) (Schroder *et al.*,

2007). Sin1 es importante en la interacción con los sustratos del complejo, siendo el dominio CRIM la región mínima de Sin1 necesaria para esta función (Cameron *et al.*, 2011).

Bit61

El gen *bit61*⁺ codifica a una proteína de 47 kDa que es componente de TORC2. Bit61 pertenece a la familia HbrB/Bit61, cuyos miembros comparten cuatro dominios conservados (Hayashi *et al.*, 2007). La proteína Bit61 de *S. pombe* se identificó mediante un análisis de espectrometría de masas de proteínas que interactuaban con Tor1 (Hayashi *et al.*, 2007). Las funciones fisiológicas de Bit61 son desconocidas hasta el momento.

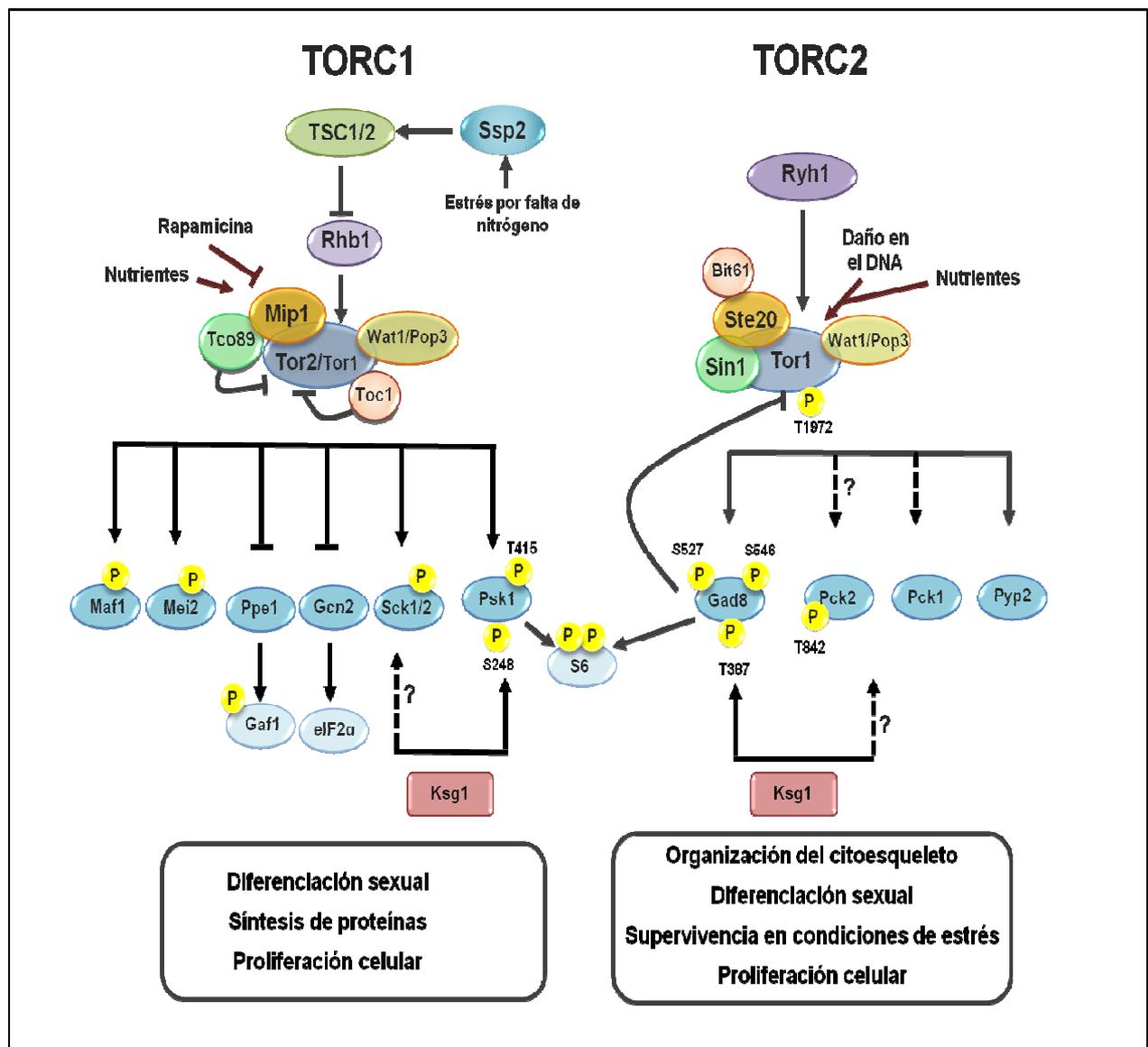


Figura 1.14. Composición y función de los complejos TORC1 y TORC2 en *S. pombe* (Adaptado de Cybulski y Hall, 2009).

Tor1

Tor1 es la quinasa principal del complejo TORC2 en *S. pombe*. Tor1 no es esencial para el crecimiento celular normal, ya que su delección es viable. Sin embargo, esta proteína se requiere para la entrada en fase estacionaria y el desarrollo sexual en el ayuno de nutrientes, para la absorción de aminoácidos, y para la supervivencia en diversas condiciones de estrés, tales como alta osmolaridad, estrés oxidativo, baja o alta temperatura y bloqueo de la replicación del DNA (Kawai *et al.*, 2001; Schonbrun *et al.*, 2009; Weisman *et al.*, 2005). Tor1 también se requiere para el mantenimiento de la longitud del telómero del DNA y heterocromatina en los centrómeros y telómeros. Además, Tor1 promueve la entrada mitótica mediante la regulación de la actividad de Cdc2 (Ikeda *et al.*, 2008; Schonbrun *et al.*, 2009).

1.4.4.2.2. Reguladores de TOR en *S. pombe*

1.4.4.2.2.1. Regulación de TORC1 por Tsc1-Tsc2/Rhb1

En la levadura con fisión, los genes *tsc1⁺* y *tsc2⁺* fueron identificados como los homólogos estructurales de TSC1 y TSC2 en humanos (Matsumoto *et al.*, 2002). Tsc1 y Tsc2 forman un heterodímero y promueven la absorción de nutrientes, tales como aminoácidos y nucleótidos, a través de la regulación de la localización y la expresión de diversos transportadores (Aspuria y Tamanoi, 2008; Matsumoto *et al.*, 2002). Tsc1 y Tsc2 también están involucrados en la respuesta celular al ayuno de nitrógeno. La interrupción del gen *tsc1⁺* o *tsc2⁺* causa un retraso en el arresto de la fase G1 y una disminución en la eficacia de conjugación. El análisis de microarrays ha demostrado que la interrupción de cualquiera de los genes *tsc⁺* causa la disminución de la expresión de genes involucrados en la respuesta al ayuno de nitrógeno y la diferenciación sexual en condiciones de ayuno de nitrógeno, tales como *fnx1⁺*, *mei2⁺* y *sxa2⁺* (Matsumoto *et al.*, 2002; Murai *et al.*, 2009; Nakase *et al.*, 2006).

Rhb1 es el homólogo funcional de Rheb en células superiores, el cual actúa como activador de TORC1. Por otra parte, aunque en la levadura *S. cerevisiae* también se ha encontrado un homólogo de Rheb, RHB1, éste parece no ejercer ningún efecto sobre la regulación de TORC1 (Aspuria y Tamanoi, 2004). Las células interrumpidas en *rhb1⁺* no crecen, lo que indica que *rhb1⁺* es un gen esencial para la proliferación celular (Mach *et al.*, 2000; Yang *et al.*, 2001). Curiosamente, la expresión de Rheb restablece la proliferación celular en un mutante nulo *rhb1Δ*, lo que sugiere una relación funcional entre ambos. Sin embargo, esto no ocurre en *S. cerevisiae* con RHB1 (Yang *et al.*, 2001). Además, la disminución de la expresión de *rhb1⁺* o la sobreexpresión de mutaciones dominantes negativas en Rhb1 causa defectos en el crecimiento, el ciclo celular se detiene en la fase G1 y las células son pequeñas y redondas (Mach *et al.*, 2000; Tabancay *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2001). Estos fenotipos son similares a los de las células en condiciones de ayuno de nitrógeno. De hecho, la expresión de *fnx1⁺* y

mei2⁺, cuya transcripción es inducida por el ayuno de nitrógeno, se eleva por la represión de la expresión de Rhb1 (Mach *et al.*, 2000). Se ha demostrado que Rhb1 interactúa y activa a Tor2 de forma dependiente a su estado de unión a GTP, y que el complejo Tsc1/Tsc2 actúa como una GAP aguas arriba de Rhb1, regulando negativamente a TORC1 en condiciones de ayuno de nitrógeno.

La función de la ruta de señalización TSC/Rhb1/TORC1 en la levadura con fisión es muy similar a la de las células de mamíferos, la cual desempeña un papel crítico en la regulación de la síntesis y el crecimiento de proteínas en eucariotas. Estudios han demostrado que esta ruta en la levadura con fisión es inhibida por la rapamicina (Nakashima *et al.*, 2010). Esto es interesante, ya que, a diferencia de algunas líneas celulares de mamíferos y la levadura *S. cerevisiae*, la rapamicina no impide la proliferación de las células prototróficas en la levadura con fisión (Kawai *et al.*, 2001; Weisman *et al.*, 1997).

1.4.4.2.2. Regulación de TORC2 por Ryh1

El gen *ryh1⁺* codifica a una GTPasa de la familia Rab ortóloga a Rab6 en humanos (Tabete *et al.*, 2010; Duran *et al.*, 2012). Ryh1 oscila entre una forma activa unida a GTP y una inactiva unida a GDP. Este intercambio está regulado a través de sus GEFs activadoras Sat1 y Sat4, y su único regulador negativo conocido hasta el momento, la GAP Gyp10 (Figura 1.15) (Tabete *et al.*, 2010). Ryh1 localiza principalmente en el aparato de Golgi y regula el tráfico retrógrado desde los endosomas hasta el aparato de Golgi, el retículo endoplasmático y la membrana plasmática (He *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2014; Ma *et al.*, 2010).

Ryh1 regula positivamente la señalización de la vía TORC2-Gad8. La inactivación de Ryh1, TORC2 y Gad8 resulta en fenotipos similares, tales como la sensibilidad a estrés y defectos vacuolares, lo que corrobora que regulan los mismos procesos celulares (Tatebe *et al.*, 2010). La falta de actividad de Ryh1 o de sus GEFs, Sat1 y Sat4, reduce significativamente la fosforilación dependiente de TORC2 de Gad8 en su HM. Sin embargo, la fosforilación mínima de Gad8 que se detecta en ausencia de Ryh1 sugiere que TORC2 podría estar regulado por otro activador, posiblemente otra GTPasa de la familia Rab (Tatebe *et al.*, 2010). Diversos estudios han demostrado que la expresión del mutante constitutivamente activo de Ryh1, Ryh1.Q70L (“GTP-locked”), es suficiente para inducir la fosforilación de Gad8, mientras que el mutante dominante negativo Ryh1.T25N (“GDP-locked”), ejerce el efecto contrario. Además, en el mutante Ryh1.Q70L se observa una mayor interacción entre Gad8 y TORC2, lo que implica que Ryh1 unido a GTP promueve la interacción física entre TORC2 y Gad8 (Tatebe *et al.*, 2010).

La disponibilidad de glucosa regula el estado de activación de TORC2 a través de Ryh1. En medio rico de glucosa, Ryh1 unido a GTP induce la fosforilación de Gad8 dependiente de TORC2 mientras que en condiciones de ayuno de glucosa, Ryh1 se inactiva rápidamente provocando el

apagado de la ruta de señalización TORC2-Gad8. Curiosamente, en estas condiciones, la fosforilación de Gad8 dependiente de TORC2 se recupera gradualmente e independientemente de Ryh1, lo que sugiere la existencia de un activador adicional de TORC2, cuya función estaría regulada negativamente por glucosa (Hatano *et al.*, 2015).

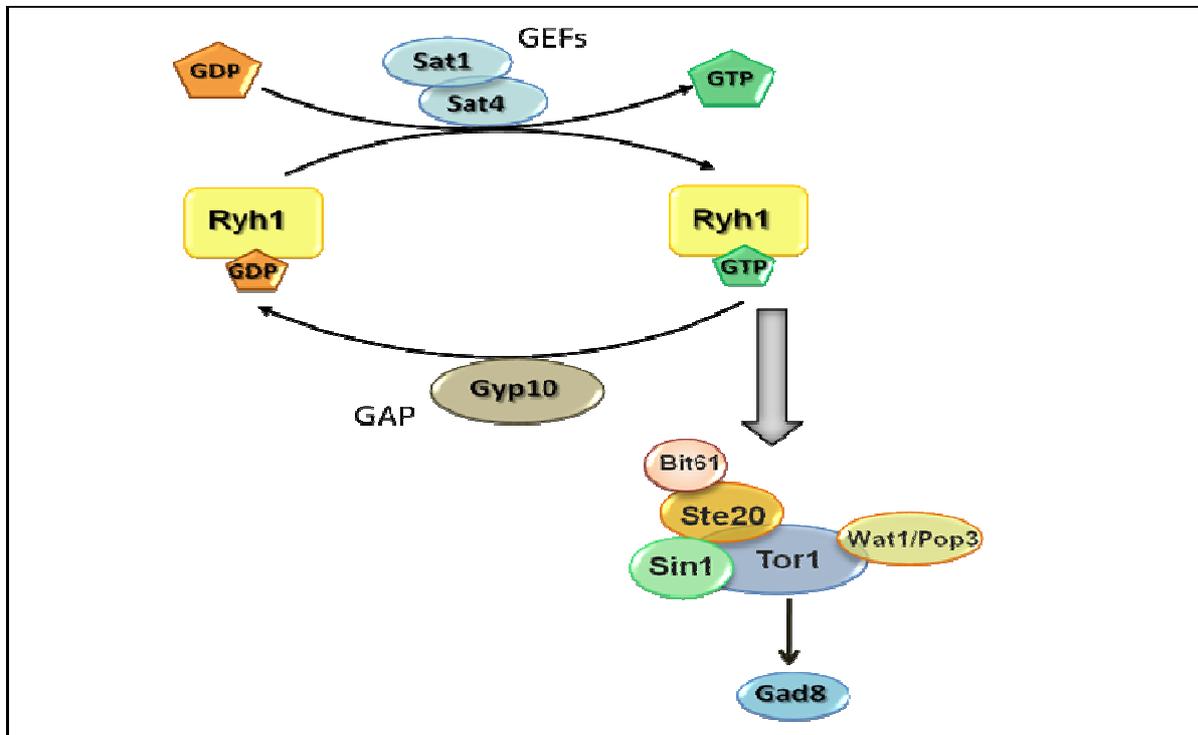


Figura 1.15. Regulación de la señalización de TORC2 a través de la GTPasa Ryh1 (Adaptado de Tabete y Shiozaki, 2010).

1.4.4.2.3. *Efectores de TOR en S. pombe*

1.4.4.2.3.1. *TORC1*

En *S. pombe* existen tres quinasas de la familia AGC que presentan homología con S6K1 de humanos denominadas Psk1, Sck1 y Sck2 (Figura 1.14). Su regulación depende del estado nutricional de la célula encontrándose fosforiladas en presencia de nutrientes y desfosforiladas en condiciones de ayuno.

Psk1

De forma similar al resto de quinasas de la familia AGC, Psk1 presenta tres motivos fosforilables característicos (AL, TM y HM) cuya fosforilación es importante para su actividad. En particular, la fosforilación en T415 del HM y, posiblemente, en T392 del TM están reguladas por TORC1 tanto *in vivo* como *in vitro* y esto ocurre de manera dependiente a nutrientes (nitrógeno, glucosa y glutamina). Por su parte, la fosforilación de Psk1 en el residuo S248 del AL, la cual es clave para su actividad quinasas, es dependiente de Ksg1 (Nakashima *et al.*, 2012) (Figura 1.14). Psk1 es

necesaria para la fosforilación dependiente de TORC1 de los residuos S235 y S236 de la proteína ribosomal S6 (RpS6), la cual está codificada en esta levadura por dos genes distintos, *rpS601⁺* y *rpS602⁺* (Nakashima *et al.*, 2010).

Sck1/2

Las proteínas Sck1 y Sck2 son homólogas a Sch9 en *Saccharomyces cerevisiae*, que es la diana principal de TORC1 y que asocia la señalización nutricional al proceso de crecimiento celular (Urban *et al.*, 2007).

Diversos estudios han demostrado que tanto Sck1 y Sck2 cumplen una función que se solapa con Pka1, que es la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) (Jin *et al.*, 1995; Fujita *et al.*, 1998). Se ha propuesto la existencia de una interconexión entre TORC1 y PKA a través de Sck1 en la regulación del inicio de la diferenciación sexual (Mudge *et al.*, 2014), aunque esta relación sigue siendo desconocida. Recientemente, se ha demostrado que TORC1 promueve la actividad de la proteína fosfatasa PP2A-B55 mediante la inhibición de la ruta de Greatwall-Endosulfina (Ppk18-Igo1 en *S. pombe*). PP2A-B55 antagoniza la actividad CDK en la fase G2, lo que resulta en el aumento del tamaño de las células en esta fase (Chica *et al.*, 2016; Martin *et al.*, 2017). Se ha sugerido la implicación de Sck2 en la vía TORC1 y Greatwall-Endosulfina, debido al hecho de que la sobreexpresión de Sck2 inhibe la actividad de la quinasa de Greatwall, Ppk18 (Chica *et al.*, 2016). También la sobreexpresión de Sck2 conduce a la elongación celular (Weston *et al.*, 2017; Rallis *et al.*, 2014).

Otros efectores de TORC1 en *S. pombe*

El complejo TORC1 en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* tiene otros sustratos conocidos, además de Psk1 y Sck1/2. Estas dianas son las proteínas Gcn2, Ppe1, Mei2 y Maf1.

1.4.4.2.3.2. TORC2

Gad8

Gad8 es una serín/treonín proteína quinasa perteneciente a la familia de quinasas AGC, que es un sustrato directo del complejo TORC2 (Figura 1.14). La interrupción de Gad8 causa fenotipos similares a los de la interrupción de Tor1. En conjunto, Tor1, Ksg1 y Gad8 constituyen un módulo de señalización implicado en el desarrollo sexual y el crecimiento celular en condiciones de estrés. Además de su papel en la resistencia al estrés celular, la ruta de señalización de TORC2-Gad8 promueve el inicio de la mitosis y también afecta a la expresión del gen *rum1⁺* que codifica a un inhibidor de la CDK, el cual es esencial para la detención del ciclo celular en la fase G1 después del ayuno de nitrógeno (Ikeda *et al.*, 2008). Gad8 presenta tres sitios de fosforilación conservados que son importantes para su actividad quinasa, y que son el residuo T387 en el AL, S527 en el TM y S546 en

el HM (Newton, 2001; Toker y Newton, 2000). Tor1 es responsable de la fosforilación en S527 y en S546, mientras que Ksg1 fosforila a T387 directamente (Matsuo et al., 2003b) (Figura 1.14). En las células *tor1Δ*, se observa una disminución significativa de la fosforilación de Gad8 en S546, así como un descenso de su actividad quinasa. La fosforilación de Gad8 en S546 es necesaria para el control del arresto celular en la fase G1, la conjugación, la longitud de la célula en división y el tamaño vacuolar, pero es prescindible para la remodelación del citoesqueleto de actina así como para la supervivencia celular en condiciones de estrés por calor e iones de potasio (Du et al., 2016). Estudios han demostrado que no solo Tor1, sino también los otros componentes de TORC2 son necesarios para la fosforilación del motivo hidrofóbico de Gad8.

Estudios recientes han demostrado que la fosforilación de Gad8 en el residuo evolutivamente conservado T6 impide la asociación física entre Gad8 y TORC2. La fosforilación de T6, mediada posiblemente por PKC, disminuye la fosforilación dependiente de TORC2 de Gad8 en S546, lo que produce un aumento en la actividad del complejo ya que se reduce la fosforilación de Tor1 en T1972 (Halova et al., 2013). Una de las evidencias que apoyan que PKC podría ser la quinasa responsable de la fosforilación en T6 es que el aumento en la expresión de Pck2, ortólogo de la PKC, impide la unión de Gad8 y el complejo causando una reducción en la fosforilación de Gad8 en S546 (Du et al., 2016). Sin embargo, hasta el momento no existen evidencias de una regulación directa de Pck2 sobre T6. La fosforilación de Gad8 en T6 es importante para la remodelación del citoesqueleto de actina y para la supervivencia celular en presencia de iones de potasio y del calor, de manera independiente al estado de fosforilación de Gad8 en S546 (Du et al., 2016).

Pyp2

La fosfatasa específica de residuos de tirosina Pyp2 fue identificada, junto a Pyp1, como un inhibidor del inicio de la mitosis en *S. pombe* (Ottillie et al., 1992; Millar et al., 1992). Pyp2 es una de las fosfatasas responsables de la desfosforilación de la MAP quinasa Sty1 en el residuo Y173 (Millar et al., 1995). Tor1, a través del regulador negativo de la traducción Gcn2, controla los niveles de la fosfatasa Pyp2 en respuesta al estrés nutricional o en presencia de rapamicina (Petersen y Nurse, 2007). El descenso en la actividad de Tor1 produce una disminución en la actividad de Gcn2 lo que causa una reducción en los niveles de Pyp2. Como consecuencia, se produce un incremento en la fosforilación del motivo de activación de Sty1, la cual fosforila a la Polo quinasa Plo1 en S402 promoviendo su localización en el corpúsculo polar del huso (SPB) (Petersen y Nurse 2007). Desde el SPB, Plo1 controla la activación de Cdc2 promoviendo la entrada en mitosis (Mulvihill et al., 1999; MacIver et al., 2003; Petersen y Hagan, 2005).

1.4.4.2.4. Procesos celulares regulados por TOR en *S. pombe*

TORC1 reprime la diferenciación sexual regulando negativamente al factor de transcripción

Ste11 y a la proteína de unión a RNA Mei2 (Álvarez y Moreno, 2006; Shinozaki-Yabana et al., 2000). Además, también controla la transcripción de genes que cifran proteínas ribosomales, y la síntesis de proteínas fosforilando a la proteína ribosomal S6 y al factor de iniciación eIF2, de manera similar a lo que ocurre en otros organismos (Álvarez y Moreno, 2006; Nakashima et al., 2010; Valbuena et al., 2012).

Por otro lado, en estudios anteriores se pensaba que la fosforilación de la proteína ribosomal S6 (Rps6) era específica de TORC1 (Nakashima *et al.*, 2010) y por lo tanto se había utilizado para cuantificar la señalización del complejo. Sin embargo, se ha demostrado que Gad8 ejerce un papel en la fosforilación de Rps6. Gad8 co-inmunoprecipita con Rps6 y regula su fosforilación. Conjuntamente, Psk1 también modula la fosforilación de Rps6, por lo que ambos complejos, TORC1 y TORC2, regulan a la proteína ribosomal S6. Dado que Gad8 está fosforilado por TORC2 (Matsuo et al., 2003b), esto podría significar que el complejo TORC2 en estado activo co-purifica con ribosomas (Zinzalla *et al.*, 2011), lo cual plantea la posibilidad de que Gad8 también puede ser fosforilado por TORC2 en los ribosomas.

El complejo TORC2 regula la reorganización del citoesqueleto, la diferenciación sexual y la supervivencia celular en condiciones de estrés. TORC2 fosforila los motivos de giro e hidrofóbico de la proteína quinasa de la familia AGC Gad8 (Ikeda et al., 2008; Matsuo et al., 2003a). Curiosamente, Gad8 retrofosforila a Tor1 (TORC2) en el residuo de Thr1972, reduciendo su actividad (Halova *et al.*, 2013). La actividad del complejo TORC2 es regulada positivamente por Ryh1 (Tatebe *et al.*, 2010). Sin embargo, la falta de Ryh1 no afecta a la actividad quinasa intrínseca de Tor1, aunque la sobre-expresión de una versión de Ryh1 constitutivamente activa promueve la interacción entre TORC2 y Gad8. Estos resultados sugieren que Ryh1 estimula la señalización aguas abajo del complejo TORC2 favoreciendo la interacción con sus sustratos (Tatebe *et al.*, 2010).

Además, el complejo TORC2 es importante para el mantenimiento de la estabilidad genética durante la fase S del ciclo celular (Schonbrun *et al.*, 2013), y la supervivencia celular en condiciones de daño en el DNA (Schonbrun *et al.*, 2009).

Recientemente, nuestro grupo ha demostrado que el complejo TORC2 no fosforila *in vivo* a Pck2, pero favorece su síntesis *de novo* durante el crecimiento celular y en respuesta a estrés, siendo este necesario para permitir la activación de Pmk1 en *S. pombe* en respuesta a estímulos ambientales específicos, tales como el daño en la pared celular o ayuno de glucosa (Madrid *et al.*, 2015).

1.5. Metabolismo de Fosfoinosítidos en *Schizosaccharomyces pombe*

Los fosfolípidos que contienen inositol (fosfatidilinosoles) se encuentran en todos los eucariotas y constituyen 2-8% de los fosfolípidos celulares totales. El fosfatidilinositol (PtdIns) se sintetiza en el retículo endoplasmático y representa más del 80% de los fosfatidilinosoles totales (Majerus, 1992).

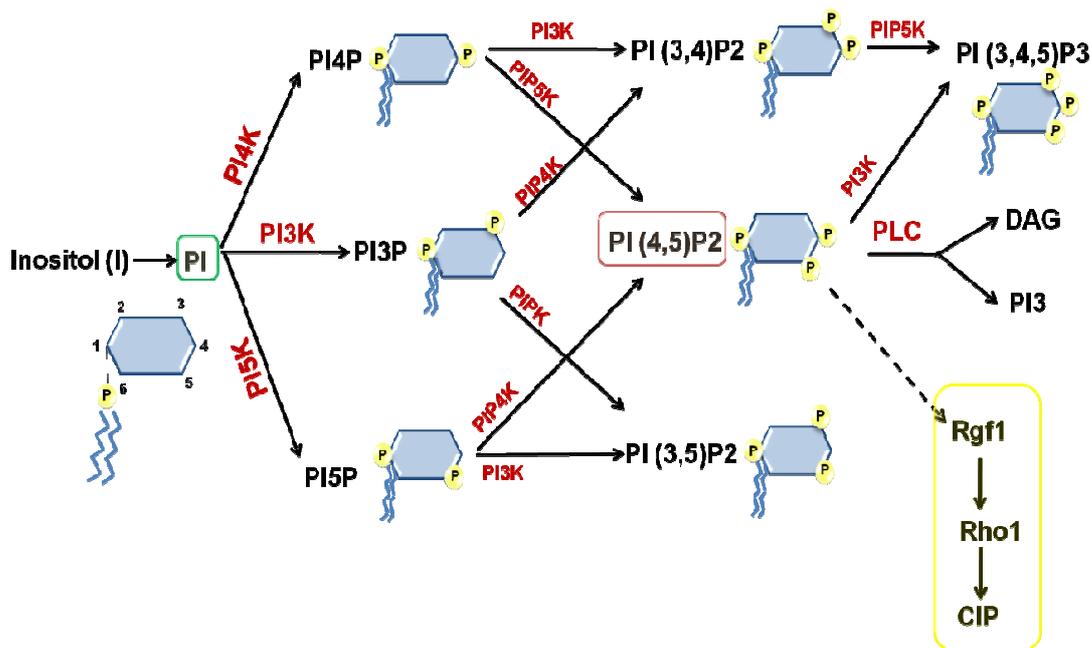


Figura 1.16. Esquema general del metabolismo de fosfoinosítidos.

Los fosfoinosítidos desempeñan un papel crucial en una gran variedad de procesos celulares incluyendo la señalización celular, el crecimiento celular, el tráfico de membranas, la transcripción y la organización del citoesqueleto de actina (Majerus, 1992; Martin y Hall, 2005; Roth, 2004; Simonsen et al., 2001; Yin y Janmey, 2003). Tanto en levaduras como en mamíferos, el fosfoinosítido fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) se sintetiza a través de una fosforilación secuencial, donde primero se produce la fosforilación del fosfatidilinositol (PI) generando fosfatidilinositol 4-fosfato (PI4P) mediante la acción de la fosfatidilinositol 4-quinasa (PI4K), para después ser fosforilado por la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa (PIP5K) generando fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) (Fruman *et al.*, 1998; Odorizzi *et al.*, 2000). A continuación, la fosfolipasa C hidroliza a PIP₂ dando dos segundos mensajeros esenciales, IP₃ y DAG (Berridge y Irvine, 1984) (Figura 1.16). En células de mamífero, IP₃ se une a receptores específicos e induce la liberación de calcio intracelular que está acumulado, mientras que el DAG activa a la PKC. Además, estudios han demostrado que PIP₂ está directamente implicado en el mantenimiento de la organización del citoesqueleto de actina y en la endocitosis y el reciclado de vesículas sinápticas (Audhya et al., 2004b; Takenawa y Itoh, 2001). PIP₂

también se une a proteínas con dominios de homología de pleckstrina (PH), tales como pleckstrina o todas las isoenzimas de fosfolipasa C (Homma *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2000). Además, el fosfatidilinositol y sus metabolitos fosforilados también juegan un papel importante en la regulación del tráfico de membrana (Desrivieres *et al.*, 1998).

El gen esencial *its3*⁺ codifica la fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinasa (PIP5K), encargada de la producción de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) en *S. pombe* (Zhang *et al.*, 2000). Diversos estudios han demostrado que *Its3* es necesaria también para la síntesis de PIP₃ (Mitra *et al.*, 2004). De manera similar a su homólogo *Mss4* en *S. cerevisiae*, una mutación en *Its3* provoca la desorganización del citoesqueleto de actina y una morfología celular aberrante (Desrivieres *et al.*, 1998; Honma *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2000).

1.6. Las Rutas de MAP Quinasas

Todos los seres vivos desarrollan mecanismos para detectar y responder a las alteraciones que se producen en el medio que les rodea. 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 (Marshall, 1995).

1.6.1. Organización de las rutas de MAP quinasas

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

1.6.1.1. 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 representantes de todos los grupos citados a excepción de los receptores del tipo tirosina quinasa.

1.6.1.2. Módulo de MAP Quinasas

Está compuesto por tres proteínas quinasas, la MAPK quinasa quinasa (MAPKKK), la MAPK quinasa (MAPKK), y la MAP quinasa (MAPK), que mantienen un alto grado de conservación evolutiva y cuya estructura básica es muy similar. 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 1.17).

Una vez activada, la MAPKKK 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 conservados de treonina y tirosina (Figura 1.17) (Songyang *et al.*, 1996).

1.6.1.3. Efectores de MAP Quinasas

Los principales efectores de las MAPKs son 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 RNA, y una amplia variedad de sustratos citoplasmáticos.

1.6.1.4. Reguladores de MAP Quinasas

Una de las principales características de la respuesta de las rutas de MAP quinasas frente al estrés es su elevado grado de plasticidad y especificidad, y que viene determinado por distintos mecanismos. El más importante es la interacción física secuencial entre los distintos miembros de una ruta, aunque también 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).

Por otra parte, 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 fosfatasas de MAP quinasas (MAKPs), que pueden presentar especificidad dual o desfosforilar específicamente residuos de tirosina (fosfatasas de tirosina), o de serina y treonina (fosfatasas de serina y treonina) (Farooq y Zhou, 2004).

1.6.2. Mecanismos de regulación de la fosforilación dual de las MAP quinasas

Las MAP quinasas poseen una característica única, y que consiste en que su activación por la MAPK quinasa implica la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina del motivo de activación Thr-X-Tyr, donde X puede ser prolina, glicina, o ácido glutámico, según la familia de MAPK de que se trate. De hecho, distintas evidencias apoyan el “dogma” de que la fosforilación dual de las MAPKs es un requisito indispensable para su activación. Así, distintos estudios realizados con MAPKs humanas (ERK1/2, p-38) demostraron que la mutación de uno de los dos fosfoaceptores reducía drásticamente su actividad catalítica (Enslin *et al.*, 2000; Robbins *et al.*, 1993). Sin embargo, otros trabajos han sugerido la posibilidad de que la fosforilación de los dos fosfoaceptores del motivo

-TXY- no tenga igual relevancia desde el punto de vista biológico. Además, estudios realizados *in vitro* mostraron que las formas monofosforilables de ERK2 humana son de 1 a 2 órdenes de magnitud menos activas que la forma fosforilada dual, pero más activas que la forma no fosforilable (Zhou y Zhang, 2002). También existen resultados muy sugerentes empleando como modelo a *S. cerevisiae*. Se ha descrito que una versión de Hog1 mutada en el residuo de tirosina del sitio de activación careció casi por completo de actividad catalítica, pero fue capaz por sobre-expresión de rescatar parcialmente el fenotipo osmosensible del mutante nulo *hog1Δ* (Bell y Engelberg, 2003).

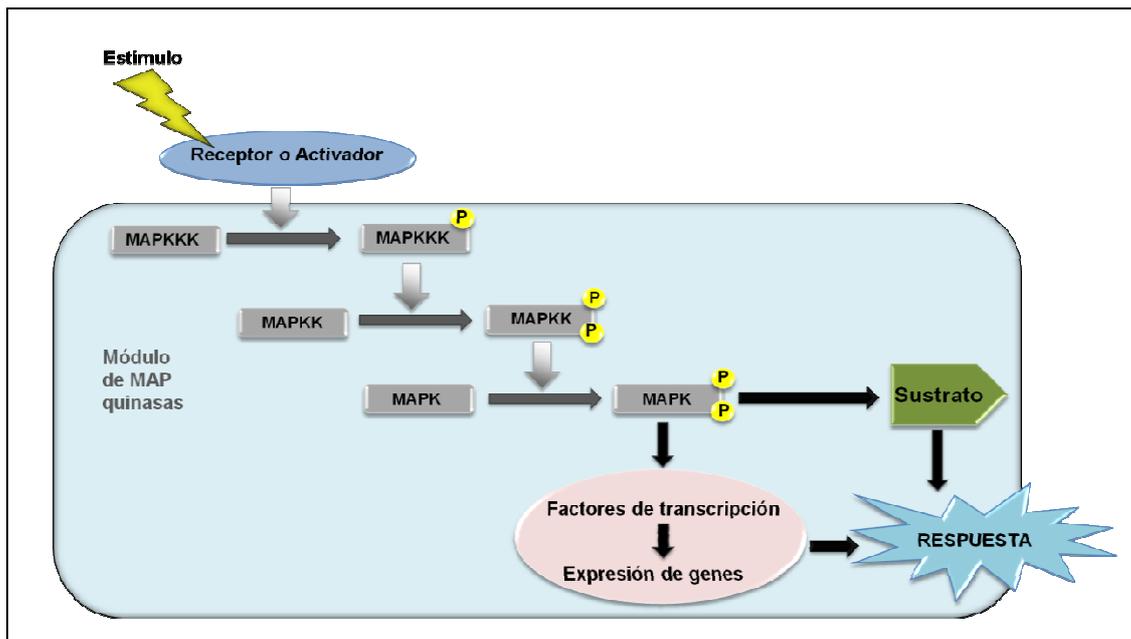


Figura 1.17. El módulo de MAP quinasas y la transmisión de señales.

1.6.3. Conservación evolutiva

Las rutas de MAPKs regulan en mamíferos multitud de procesos celulares como diferenciación, movilidad, proliferación y apoptosis, y se dividen en tres grupos: ERK, p38 y JNK (Figura 1.18). 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 frente al estrés y la apoptosis (Schaeffer y Weber, 1999), y son conocidas como SAPKs (“*Stress Activated Protein Kinases*”).

En *S. cerevisiae* se han identificado cinco MAPKs (Figura 1.18). Cuatro de ellas son funcionales 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 la regulación de la integridad celular. La quinta ruta, controlada por la quinasa SMK1, regula la síntesis de la pared de ascosporas (Krisak *et al.*, 1994) (Figura 1.18). 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 1.18).

Mientras que las rutas JNK y p38 de mamíferos son homólogas a las rutas SAPK de *S. pombe* y HOG1 en *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).

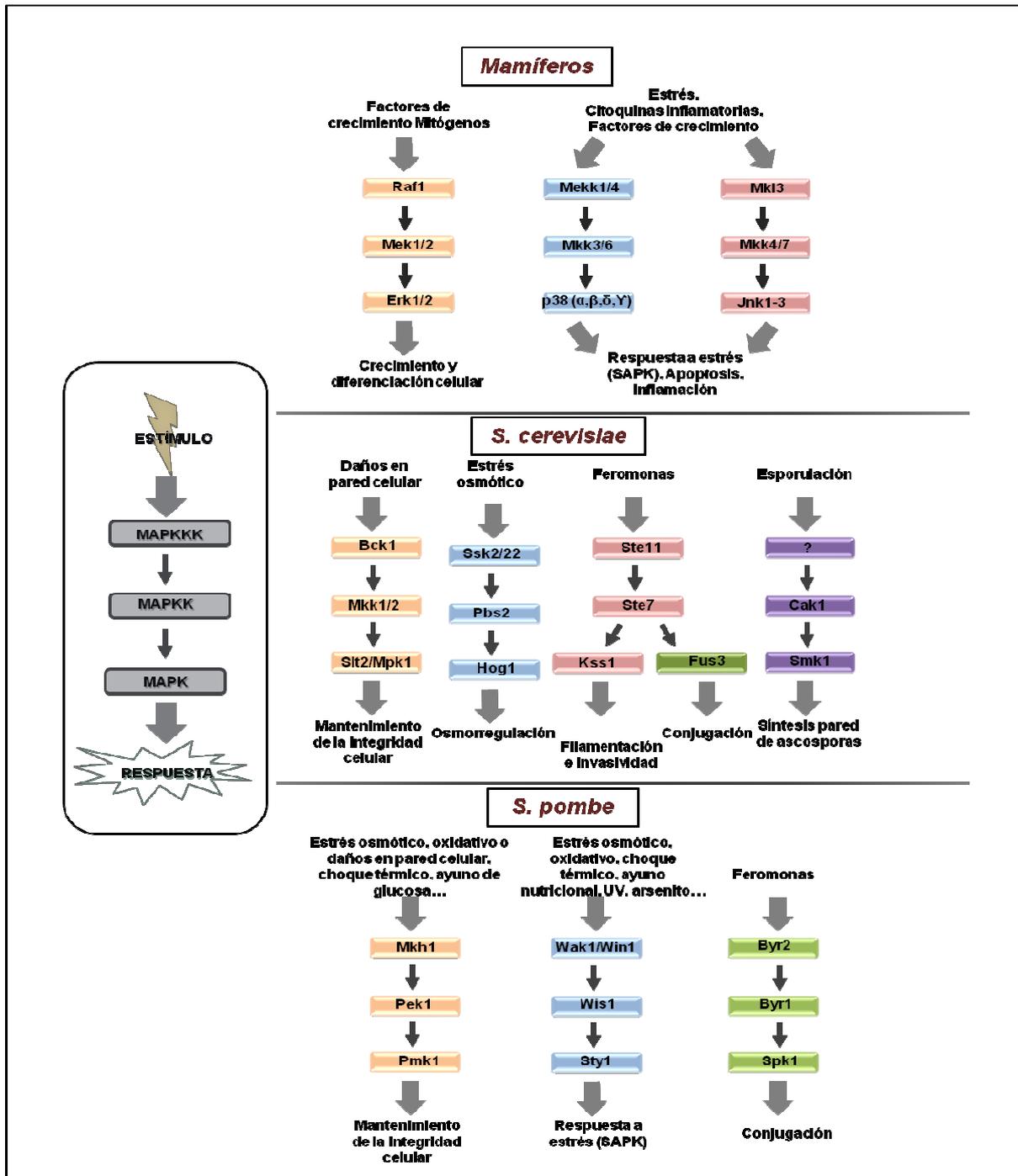


Figura 1.18. Conservación evolutiva de las rutas de MAP quinasas.

A continuación se procederá a una descripción exhaustiva de las rutas SAPK y de integridad celular en *S. pombe*, ya que constituyen la base experimental de la presente Tesis Doctoral.

1.6.4. 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 (George et al., 2007; Millar et al., 1995; Shiozaki y Russell, 1995a; Shiozaki y Russell, 1995b; Soto et al., 2002; Warbrick y Fantes, 1991). El elemento central de la ruta SAPK es la MAPK Sty1, también denominada Spc1 o Phh1 (Kato et al., 1996; Millar et al., 1995; Shiozaki y Russell, 1995a; Shiozaki y Russell, 1995b). Los principales componentes de esta ruta se escriben a continuación (Figura 1.19).

1.6.4.1. 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, 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 quinasa (Mak2 y Mak3), la proteína Mpr1/Spy1 (transmisora de grupos fosfato a través de histidinas), y el regulador de respuesta Mcs4 (Quinn et al., 2002; Shieh et al., 1997; Shiozaki y Russell, 1995a) (Figura 1.19). En respuesta a H₂O₂, Mak2 y Mak3 se autofosforilan, y por medio de la proteína Mpr1 se transfiere el grupo fosfato al regulador de respuesta Mcs4, que a su vez activa la cascada de MAPKs. *Schizosaccharomyces pombe* posee un segundo regulador de respuesta llamado Prr1, el cual actúa como un factor de transcripción y regula directamente la respuesta a estrés oxidativo independientemente de Sty1. Además, Prr1 juega un importante papel en la viabilidad celular en respuesta a estrés oxidativo a diferentes concentraciones (Ohmiya et al., 1999; Shieh et al., 1997).

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 (Hartmuth y Petersen, 2009; Nguyen y Shiozaki, 1999; Petersen y Nurse, 2007; Rodriguez-Gabriel y Russell, 2005).

1.6.4.2. Regulador de respuesta Mcs4

Mcs4 es una proteína de 522 aminoácidos que contiene un dominio receptor característico con un residuo de aspartato altamente conservado (Buck et al., 2001; Cottarel, 1997). Mcs4 está implicado en la detección de estrés oxidativo y su transmisión a través del sistema de dos componentes (Santos y Shiozaki, 2001), aunque su presencia es necesaria para la activación de Sty1 en respuesta a cualquier tipo de estrés (Buck et al., 2001; Soto et al., 2002). Mcs4 también ha sido implicado en la regulación del ciclo celular, ya que los mutantes de este gen presentan una entrada tardía en la fase M (Aoyama et

al., 2001; Aoyama et al., 2000; Bahn, 2008; Santos y Shiozaki, 2001). Además, se ha demostrado que los mutantes de este gen son estériles, lo cual indica que Mcs4 es esencial para el desarrollo sexual (Nakamichi *et al.*, 2002). Mcs4 interacciona físicamente con Mpr1, Tdh1, y las MAPKKKs de la ruta SAPK Wak1 y Win1. 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 Wis4 y Win1. Por otra parte, debe estabilizar el complejo heteromérico que se forma entre las MAPKKKs, cuya integridad promueve la interacción física con la MAPKK Wis1 y, con ello permitir la activación de la MAPK Sty1. Por lo tanto, el complejo Mcs4-MAPKKKs parece actuar como una plataforma estabilizadora que modula la correcta señalización a través de la ruta SAPK en respuesta a estrés (Morigasaki y Shiozaki, 2013)

1.6.4.3. Módulo de MAP Quinasas

1.6.4.3.1. MAPKK quinasa Wak1 y Win1

Wak1 (también conocida como Wis4 o Wik1) y Win1 son las dos MAPKKKs que forman parte del módulo de la ruta SAPK en *S. pombe*. En respuesta a estrés, Mcs4 se une y activa a Wak1 y Win1, que a su vez fosforilan a la MAPKK Wis1, y ésta a Sty1 (Morigasaki y Shiozaki, 2013; Samejima et al., 1997; Shieh et al., 1997) (Figura 1.19). Curiosamente, en determinadas situaciones (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 (Quinn *et al.*, 2002; Shiozaki *et al.*, 1998; Soto *et al.*, 2002).

1.6.4.3.2. 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; Rodriguez-Gabriel y Russell, 2005). Wis1 se une y fosforila a Sty1 en el citoplasma en respuesta a estrés, lo que permite la activación y posterior translocación al núcleo de la MAPK (Nguyen *et al.*, 2002).

1.6.4.3.3. MAP quinasa Sty1

El elemento central de la ruta SAPK es la MAP quinasa Sty1/Spc1/Phh1 (Kato et al., 1996; Millar et al., 1995; Shiozaki y Russell, 1995a). 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) en respuesta a distintas condiciones ambientales adversas, como el estrés osmótico, choque térmico, estrés oxidativo, estrés por bajas temperaturas, o limitación de glucosa y/o nitrógeno (Degols y Russell, 1997; Degols et al., 1996; George et al., 2007; Millar et al., 1995; Quinn et al., 2002; Rodriguez-Gabriel y Russell, 2005; Shiozaki y Russell, 1995a; Shiozaki y Russell, 1996;

Soto et al., 2002; Soto et al., 2007) (Figura 1.19).

Una vez fosforilada, Sty1 se transloca al núcleo, donde actúa sobre efectores específicos (Gaits *et al.*, 1998). La activación de Sty1 es transitoria y la cinética e intensidad de su respuesta depende de la naturaleza y magnitud del estímulo recibido (Figura 1.19).

1.6.4.3.4. *Efectores de la ruta SAPK*

Uno de los principales efectores de la ruta SAPK es el factor de transcripción Atf1. Atf1 es una proteína con un dominio bZIP de unión a motivos CRE (“cAMP-Response Element”) que presenta homología con ATF-2 de células superiores. Su 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*. Una vez entra 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 1.19), y que constituyen la denominada “CERS” (“Core Environmental Stress Response”) (Chen y Thorner, 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 los genes dependientes de Atf1 en respuesta a estrés (Lawrence *et al.*, 2007).

Otros efectores relevantes de la ruta SAPK y de Sty1 incluyen distintas proteínas de unión a RNA (Csx1, Upf1, Cip1 y Cip2), factores reguladores de la traducción (eIF2 α , eEF2, eIF3a) y distintas proteínas quinasas (Cmk2, Srk1 y Plo1) (Perez y Cansado, 2010).

1.6.4.4. **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). 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 fosfatasas de tirosina Pyp1 y Pyp2, y las fosfatasas de serina y treonina Ptc1 y Ptc3 desfosforilan a Sty1 *in vivo* (Figura 1.19). Pmp1, la única fosfatasa de especificidad dual existente en este organismo solamente regula negativamente a Pmk1, la MAPK de la ruta de integridad celular (Madrid *et al.*, 2007; Sugiura *et al.*, 1998). Pyp1 y Pyp2 presentan localización núcleo-citoplasmática tanto en crecimiento vegetativo como en situaciones de estrés (Gaits y Russell,

1999), y se unen y desfosforilan *in vivo* a Sty1 en el residuo de tirosina-173 (Degols *et al.*, 1996; Millar *et al.*, 1995). 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 (Millar *et al.*, 1995; Shiozaki y Russell, 1995a). La expresión basal del gen *pyp1+*, así como la inducción por estrés de *pyp1+*, *pyp2+*, y *ptc1+*, es regulada por Sty1-Atf1 (Figura 1.19), constituyendo un mecanismo de retroalimentación negativa (Degols *et al.*, 1996; Gaits *et al.*, 1997; Shiozaki y Russell, 1996; Wilkinson *et al.*, 1996).

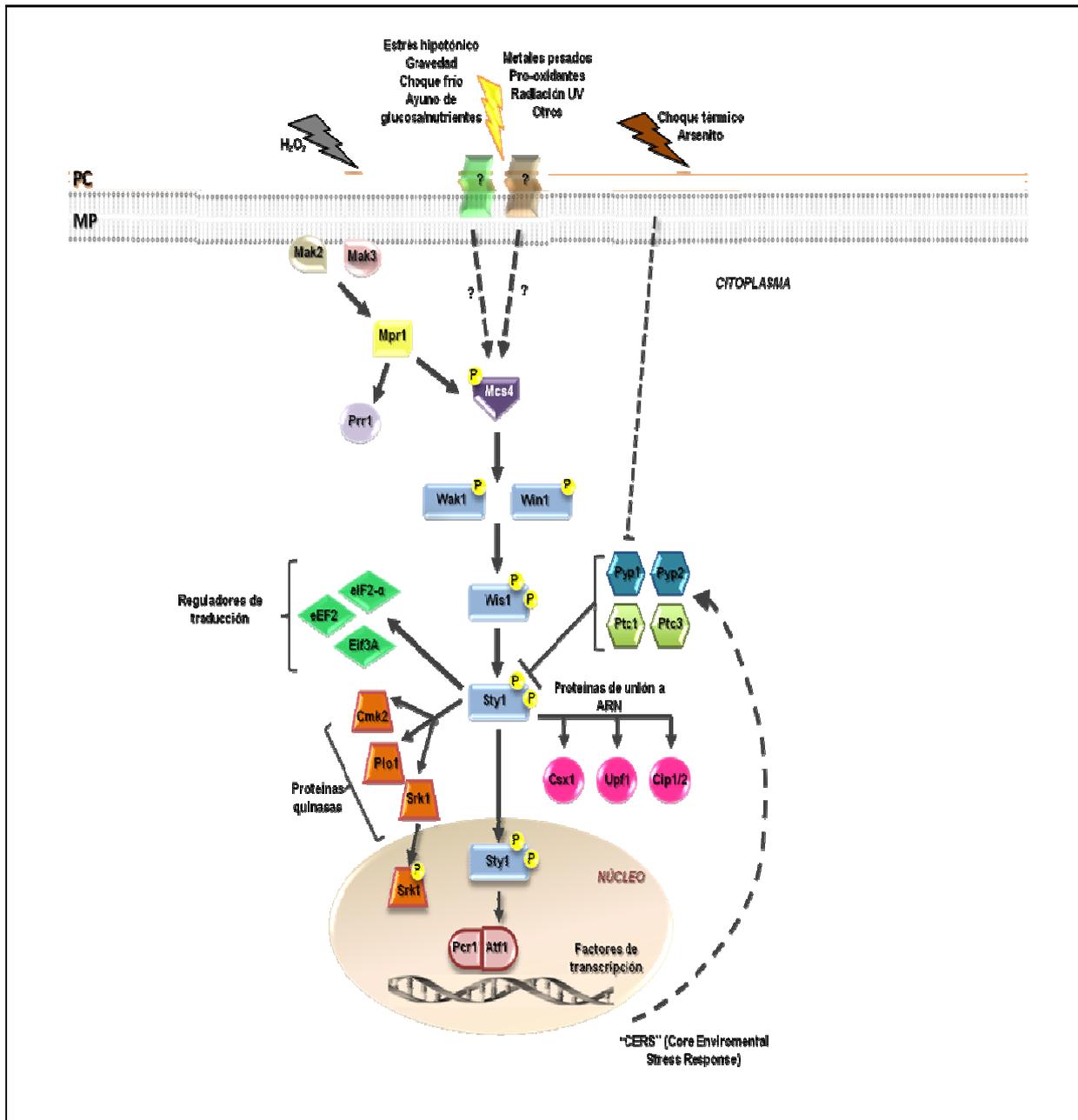


Figura 1.19. La ruta de MAP quinasas de respuesta a estrés (SAPK) en *S. pombe*.

De las cuatro fosfatasas 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).

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

Esta ruta, cuyo elemento central es la MAP quinasa Pmk1/Spm1, es esencial para el control de la integridad celular en *S. pombe*, participando 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 (Loewith et al., 2000; Madrid et al., 2006; Sugiura et al., 1999; Toda et al., 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). 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 (Loewith et al., 2000; Sengar et al., 1997; Sugiura et al., 1999; Toda et al., 1996; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). A continuación se describen los principales componentes de esta ruta de señalización y su relevancia biológica.

1.6.5.1. Sensores

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. 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).

1.6.5.2. Reguladores aguas arriba del módulo de MAP quinasas

1.6.5.2.1. Las GTPasas Rho1 y Rho2 y los ortólogos de PKC Pck1 y Pck2

Las GTPasas Rho son reguladores fundamentales de la dinámica del citoesqueleto de actina, el ciclo celular, la expresión génica, el tráfico de vesículas y la polaridad celular (Cook *et al.*, 2014; Hall, 2012; Ridley, 2015). La mayoría de las Rho GTPasas ciclan entre una conformación activa unida a GTP, que interactúa con los efectores aguas abajo, y una conformación inactiva unida a GDP. El

intercambio de GDP a GTP inducido por los factores de intercambio de nucleótidos de guanina (GEFs) promueve su activación, mientras que la hidrólisis de GTP a GDP es favorecida por proteínas activadoras de la GTPasa (GAP) (Rossmann *et al.*, 2005). Además de su papel clásico como moléculas de transducción de señales ligadas a la membrana, recientemente se ha demostrado que las GTPasas Rho y sus GEFs también se localizan en el núcleo, lo que sugiere que una parte relevante de los mecanismos están ligados a este compartimento celular (Rajakyla y Vartiainen, 2014; Weston *et al.*, 2012).

En 2006 Ma y colaboradores demostraron que la GTPasa Rho2 y Pck2 actúan aguas arriba de la cascada de MAP quinasas de integridad celular en *S. pombe* (Ma *et al.*, 2006) (Figura 1.20). Rho2 no es una proteína esencial, aunque el mutante nulo *rho2Δ* presenta algunos defectos estructurales en la pared celular (Calonge *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 1998). 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 de integridad (Ma *et al.*, 2006). Recientemente nuestro grupo ha demostrado que el residuo de cisteína-196 de Rho2 se encuentra además palmitoilado *in vivo*, y que dicha modificación reversible es esencial para que la GTPasa pueda ejercer sus funciones biológicas (Sanchez-Mir *et al.*, 2014a). Mediante estudios de microscopía y fraccionamiento subcelular en gradientes de densidad hemos confirmado que la localización de Rho2 en la membrana plasmática está fuertemente alterada en mutantes que expresan una versión no palmitoilable de la GTPasa, redistribuyéndose hacia estructuras endomembranas (Golgi, endosomas,...). Además, los mutantes no palmitoilables de Rho2 son incapaces de regular correctamente la construcción de la pared celular y de transmitir la señal de activación hacia Pmk1 en respuesta a distintos estreses. Ello confirma la existencia de un modelo no-compartmentalizado por el que Rho2 controla ambos procesos exclusivamente desde la membrana plasmática (Sanchez-Mir *et al.*, 2014a). Por otra parte, la sobreexpresión de *rho2*⁺ en *S. pombe* provoca la despolarización de actina, y un aumento en la cantidad de α -glucano en la pared celular (Calonge *et al.*, 2000; Hirata *et al.*, 1998). La letalidad asociada a la sobreexpresión de Rho2 es consecuencia de la hiperactivación de la ruta de integridad celular, ya que se suprime tras la interrupción de *pck2*⁺ o de alguno de los componentes del módulo de MAP quinasas. Por lo tanto, Rho2 regula positivamente la activación del módulo Mkh1-Pek1-Pmk1 fundamentalmente por medio de Pck2 (Ma *et al.*, 2006) (Figura 1.20).

En *S. pombe*, la GTPasa esencial Rho1 es un homólogo funcional de RhoA humano y de Rho1 en *S. cerevisiae* (Nakano *et al.*, 1997). Rho1 es un activador directo de la (1,3) - β -D-glucano sintasa, siendo este enzima responsable principal de la síntesis de glucano de la pared celular en *S. pombe*. La actividad de Rho1 está regulada por tres GEFs, Rgf1, Rgf2 y Rgf3 (Garcia *et al.*, 2009a; Mutoh *et al.*, 2005). Entre ellos, Rgf1 es el más prominente, ya que activa a Rho1 durante el crecimiento polarizado y es necesario para la correcta reorganización de la actina mientras se produce la transición de crecimiento monopolar a bipolar durante la fase NETO (New End Take Off) (Garcia *et al.*, 2006a;

García *et al.*, 2006b). Tanto Rho1 como Rho2 en su forma activa (unidos a GTP) interaccionan *in vivo* con los dos ortólogos a PKC Pck1 y Pck2 (Arellano *et al.*, 1999; Villar-Tajadura *et al.*, 2008b). Estudios previos habían propuesto que Rho1 podría actuar como activador alternativo de la ruta de integridad celular en *S. pombe* debido por una parte a su capacidad de suprimir algunos fenotipos asociados a la falta de Rho2, y, por otra, a la existencia de cierta activación de Pmk1 en ausencia de Rho2 o Pck2 (Barba *et al.*, 2008). Además, también se había descrito que Rgf1 regula la activación de Pmk1 por medio Rho1 (García *et al.*, 2009b). En efecto, nuestro grupo ha confirmado recientemente que Rho1 y Pck1, el segundo ortólogo a PCK, regulan la ruta de Pmk1 de forma aditiva y/o alternativa a Rho2 y Pck2. Mediante el empleo de un mutante que expresa un alelo hipomórfico de Rho1 (Rho1-596) hemos demostrado que Rho1 y Rho2 regulan independientemente a Pck2 para mantener la actividad basal de Pmk1 durante el crecimiento vegetativo (Viana *et al.*, 2013). Según este modelo Pck1 regularía la actividad de Pmk1 asociándose con Mkh1 (la MAPKKK de la ruta), y actuando como diana específica de Rho1 únicamente en respuesta al daño en la pared celular (Sanchez-Mir *et al.*, 2014b; Viana *et al.*, 2013). Esta observación fue totalmente inesperada ya que evidencias genéticas y bioquímicas obtenidas previamente sugerían que Pck1 participaba en el control de la integridad celular en paralelo al complejo Rho2-Pck2-Pmk1 (Ma *et al.*, 2006), o como regulador negativo de dicha ruta (Barba *et al.*, 2008).

Curiosamente, la activación de la ruta de integridad celular en respuesta a la limitación de glucosa tiene lugar a través de Pck2 por medio de un mecanismo desconocido que es independiente de la actividad de Rho1 y/o Rho2 (Madrid *et al.*, 2013).

En conjunto, todas estas observaciones revelan la existencia de un complejo entramado molecular formado por Rho1, Rho2, Pck1 y Pck2, y que actúa aguas arriba de la ruta de integridad celular en *S. pombe* para regular su actividad y/o activación de manera precisa dependiendo del tipo de estímulo.

1.6.5.3. 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 distintos estímulos externos se produce la fosforilación secuencial de los distintos componentes del módulo (Figura 1.20).

1.6.5.3.1. MAPKK quinasa Mkh1

Mkh1 (“*Mek Kinase Homolog 1*”) fue identificada como la MAPKKK de la ruta de integridad en *S. pombe* gracias a su alto grado de identidad con la MAPKKK BCK1 de *S. cerevisiae*, y a que su ausencia provoca los mismos fenotipos que la falta Pek1 o Pmk1 (Madrid *et al.*, 2006; Sengar *et al.*, 1997). Mkh1 es fosforilada ocasionalmente por Pck1 (daño en la pared celular), y fundamentalmente

por Pck2, transmitiendo la señal de activación al resto de componentes del módulo mediante su interacción *in vivo* con la MAPKK Pck1 y la MAPK Pmk1, formando un complejo ternario (Loewith *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2006; Sanchez-Mir *et al.*, 2014b).

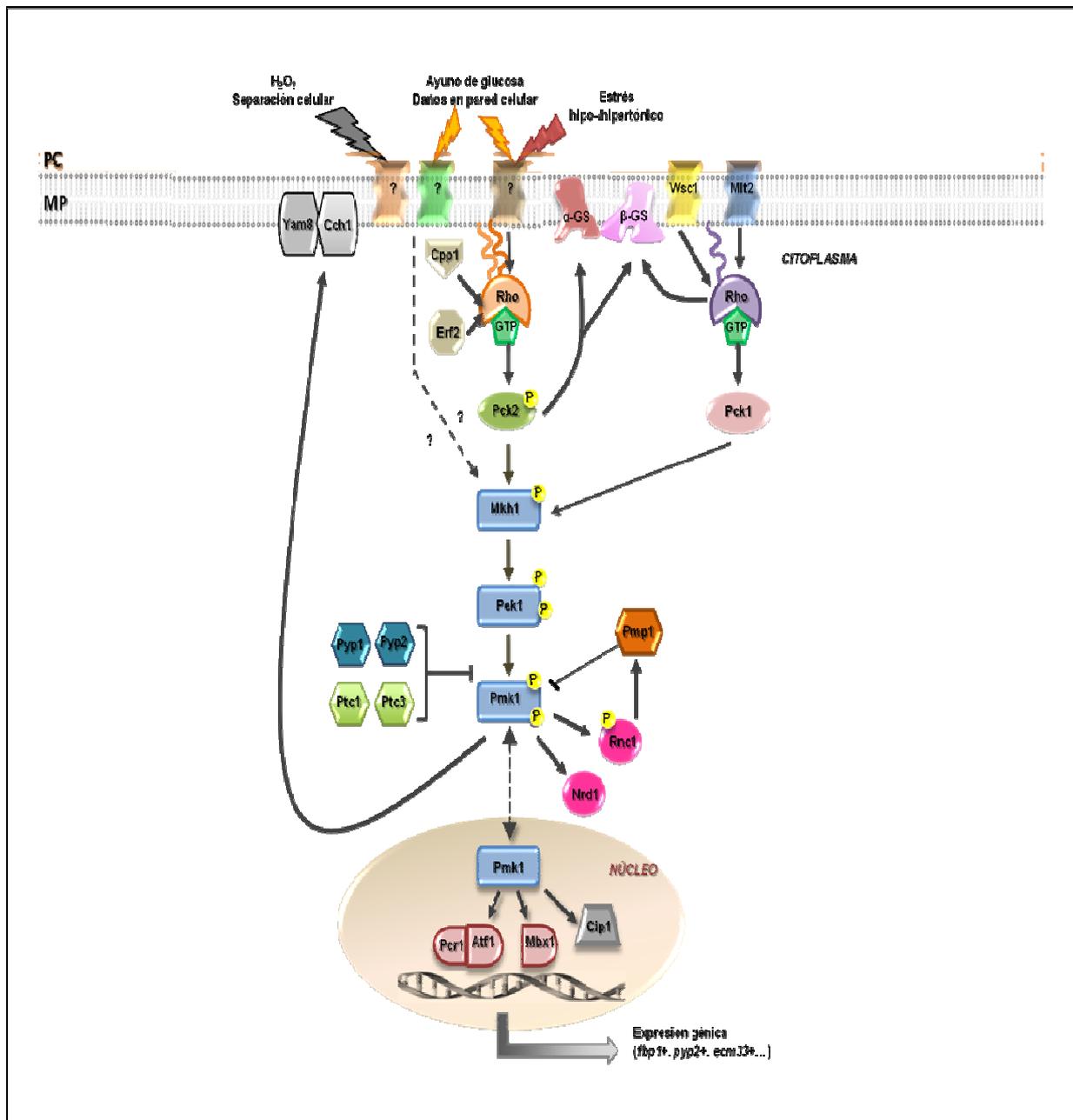


Figura 1.20. La ruta de MAP quinasa de integridad celular en *S. pombe*.

1.6.5.3.2. *MAPK* quinasa *Pek1*

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

Pek1 es fosforilada y activada por *Mkh1* en respuesta a los distintos estímulos activadores de la ruta (Sugiura *et al.*, 1999) (Figura 1.20). 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 1.20).

1.6.5.3.3. MAP quinasa Pmk1

La MAPK Pmk1/Spm1 (“*S. pombe* MAP kinase I”) 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* (Sengar *et al.*, 1997; Toda *et al.*, 1996). 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– (Loewith *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2006; Sugiura *et al.*, 1999). La activación de Pmk1 es completamente dependiente de Mkh1 y Pek1, indicando que se trata de un módulo de transmisión lineal no ramificado (Figura 1.20) (Madrid *et al.*, 2006).

Pmk1 es ortóloga a las MAPKs humanas ERK1 y ERK2 que forman parte de la cascada clásica de quinasas 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 1.20) (Barba *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2006; Soto *et al.*, 2007). Los mutantes de *S. pombe* carentes de Pmk1 son sensibles a la mayoría de los estreses que inducen su activación, por lo que su función es necesaria para la adaptación y supervivencia celulares frente a tales condiciones.

Tal como se ha comentado anteriormente, y a diferencia del modelo de *S. cerevisiae*, los elementos que actúan aguas arriba del módulo de MAP quinasas y Pmk1 pueden actuar o no como reguladores de la ruta dependiendo del tipo de estrés (Barba *et al.*, 2008; Sanchez-Mir *et al.*, 2014b). Así, mientras que la activación de Pmk1 inducida por los estreses hipo- e hipertónico depende totalmente de la señalización mediada por Rho2-Pck2 (Figura 1.20), la activación durante la separación celular o el tratamiento con peróxido de hidrógeno es completamente independiente de ambas proteínas (Figura 1.20) (Barba *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2013). 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 que implican a Rho1 y/o Pck1 (Figura 1.20) (Barba *et al.*, 2008; Madrid *et al.*, 2013; Sanchez-Mir *et al.*, 2014b).

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). Nuestro grupo ha analizado la relevancia biológica de la localización nuclear de Pmk1 mediante la obtención de un mutante que expresa una versión de la MAP quinasa anclada a la membrana plasmática y excluida constitutivamente del núcleo. Los resultados obtenidos indicaron que la exclusión nuclear de Pmk1 no afectó significativamente a su función reguladora de la homeostasis iónica, activación de Pmk1 inducida por estrés, la fusión de vacuolas, o citoquinesis, ya que todos estos procesos se ejecutaron de forma similar tanto en células control como en aquellas que expresan la versión de la proteína anclada en la membrana plasmática (Sanchez-Mir *et al.*, 2012). Por el contrario, Pmk1 presente en el núcleo regula el mantenimiento de la integridad celular en *S. pombe* fundamentalmente a nivel transcripcional. Adicionalmente, la regulación negativa de Pmk1 a nivel nuclear es realizada por fosfatasa específicas inducidas por la ruta SAPK (ver a continuación), lo que condiciona su actividad a nivel extranuclear (Sanchez-Mir *et al.*, 2012). Estos resultados sugieren que el control de la actividad de Pmk1 a nivel espacial determina en gran medida sus funciones biológicas.

1.6.5.4. Efectores de la ruta de integridad celular

1.6.5.4.1. Proteínas de unión a RNA: Rnc1 y Nrd1

Rnc1 (“*RNA-binding protein that suppresses calcineurin deletion 1*”), participa en la regulación de Pmp1, la fosfatasa dual específica de Pmk1, uniéndose a su RNA 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.*, 2003; Sugiura *et al.*, 1998) (Figura 1.20).

Nrd1 regula la citocinesis mediante la unión y estabilización del RNA 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 RNAm 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).

1.6.5.4.2. 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 su inducción regulada tanto por Atf1 como por Mbx1 (Takada *et al.*, 2010).

1.6.5.4.3. 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 manera que la forma activa de Pmk1 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 1.21). 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).

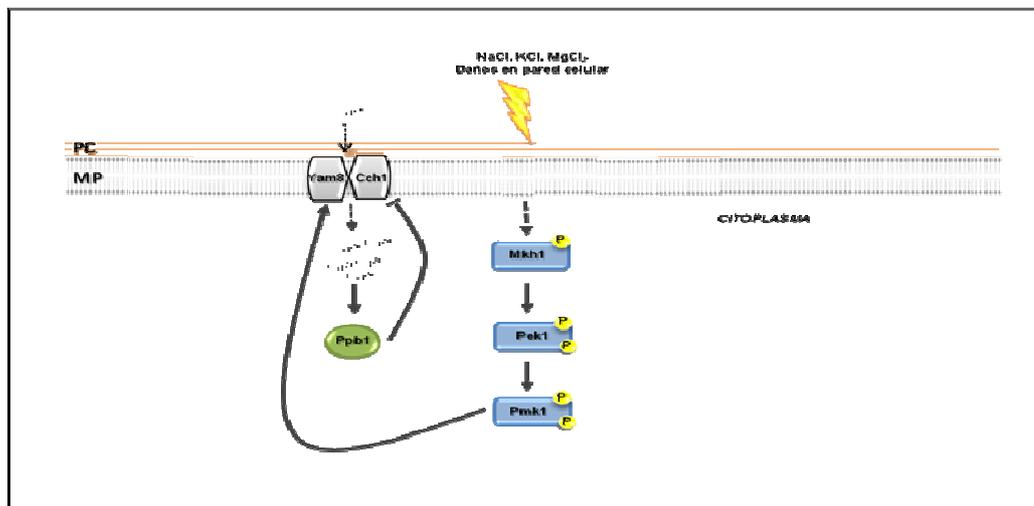


Figura 1.21. Regulación antagonica de la concentración de Ca^{2+} intracelular por parte de Pmk1 y Ppb1.

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 es utilizado frecuentemente para el rastreo e identificación de mutantes afectados en su función.

1.6.5.4.4. Proteínas reguladoras del ciclo celular: Clp1

Clp1 es un ortólogo de la fosfatasa esencial CCdc14 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 H₂O₂ (Diaz-Cuervo y Bueno, 2008). Recientemente se ha demostrado que Pmk1 fosforila a Clp1, y que su ausencia retrasa la liberación de Clp1 del nucléolo durante el tratamiento con H₂O₂. Por tanto, la fosforilación de Pmk1 sobre Clp1 contribuye a la regulación temporal de este proceso (Broadus y Gould, 2012).

1.6.5.5. **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, la estabilidad del mensajero de *pmp1*⁺, depende de su unión a la proteína de unión a RNA 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 1.20). 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 y Pyp2 lo hacen únicamente durante el crecimiento vegetativo y el estrés osmótico, respectivamente (Madrid *et al.*, 2007).

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

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 (George *et al.*, 2007; Loewith *et al.*, 2000; Madrid *et al.*, 2007; Millar *et al.*, 1995; Sengar *et al.*, 1997; Shiozaki y Russell, 1995a; Soto *et al.*, 2002; Sugiura *et al.*, 1999; Toda *et al.*, 1996; Warbrick y Fantes, 1991; Zaitsevskaya-Carter y Cooper, 1997). 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 entre ambas MAP quinasas.

El primer punto de interconexión entre ambas rutas viene dado por las fosfatasa 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 1.20 y 1.22) (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 1.22), regulando el nivel de fosforilación de Sty1 y Pmk1 (Nunez *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 1.22). 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).

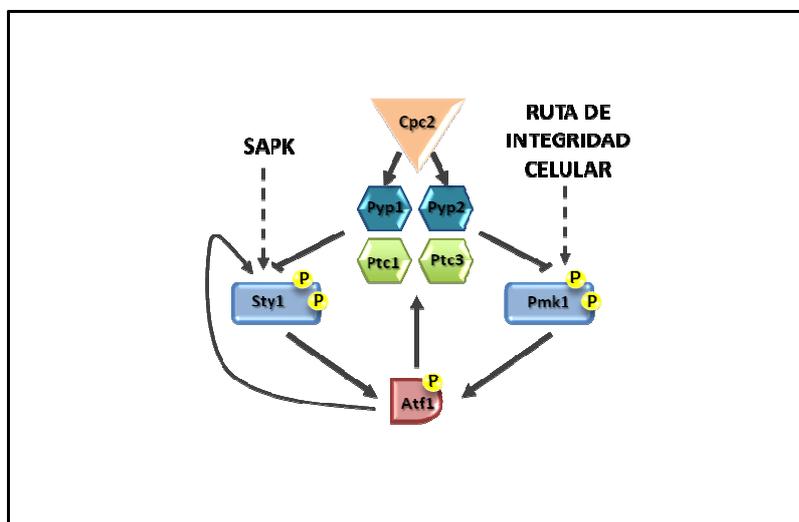


Figura 1.22. Interconexión (“crosstalk”) entre las rutas de respuesta a estrés y de integridad celular en *S. pombe*.

1.6.7. Interacción funcional entre el complejo TORC2 y la ruta de integridad celular

Nuestro grupo había demostrado inicialmente que la activación rápida y transitoria de Pmk1 en respuesta a estrés osmótico es independiente de la síntesis proteica *de novo* (Madrid *et al.*, 2006). Por el contrario, la activación de Pmk1 en respuesta a caspofungina (daño en pared celular), o tras el

ayuno de glucosa requiere la síntesis de Pck2 *de novo*, y presenta una cinética progresiva que recuerda a un mecanismo de retroalimentación positivo (Madrid *et al.*, 2013; Madrid *et al.*, 2015). La necesidad de ofrecer una respuesta adaptativa mantenida durante la reparación de los daños causados en la pared celular (caspofungina), o la reorganización de la pared celular durante el arresto nutricional (glucosa), podría ser la causa que explique la necesidad de incrementar la síntesis de Pck2 que activa la ruta de integridad celular en ambas condiciones.

De hecho, nuestro grupo ha demostrado recientemente que el complejo TORC2 y la ruta de integridad celular parecen interactuar funcionalmente tanto de forma positiva como negativa en respuesta al ayuno de glucosa y tras el daño en la pared celular (Madrid *et al.*, 2015). Así, Tor1, la quinasa del complejo TORC2, promueve el incremento de la síntesis Pck2 en respuesta a los estreses citados y la consecuente activación de Pmk1, la MAP quinasa de la ruta de integridad celular (Madrid *et al.*, 2015). Sorprendentemente, un trabajo reciente del grupo de Ronit Weissman (Cohen *et al.*, 2014) ha propuesto que la ruta de integridad celular inhibiría a su vez la actividad del complejo TORC2 y su principal efector la AGC quinasa Gad8 en respuesta al ayuno de glucosa. Por tanto, todas estas evidencias perfilan un modelo en el que el complejo TORC2 regularía positivamente la ruta de integridad celular por medio de Pck2, y en el que Pmk1, una vez activada, inhibiría a su vez la actividad del complejo. Este mecanismo de retroregulación entre ambas rutas de señalización permitiría modular la respuesta de adaptación frente al estrés de una manera dinámica y enormemente flexible.

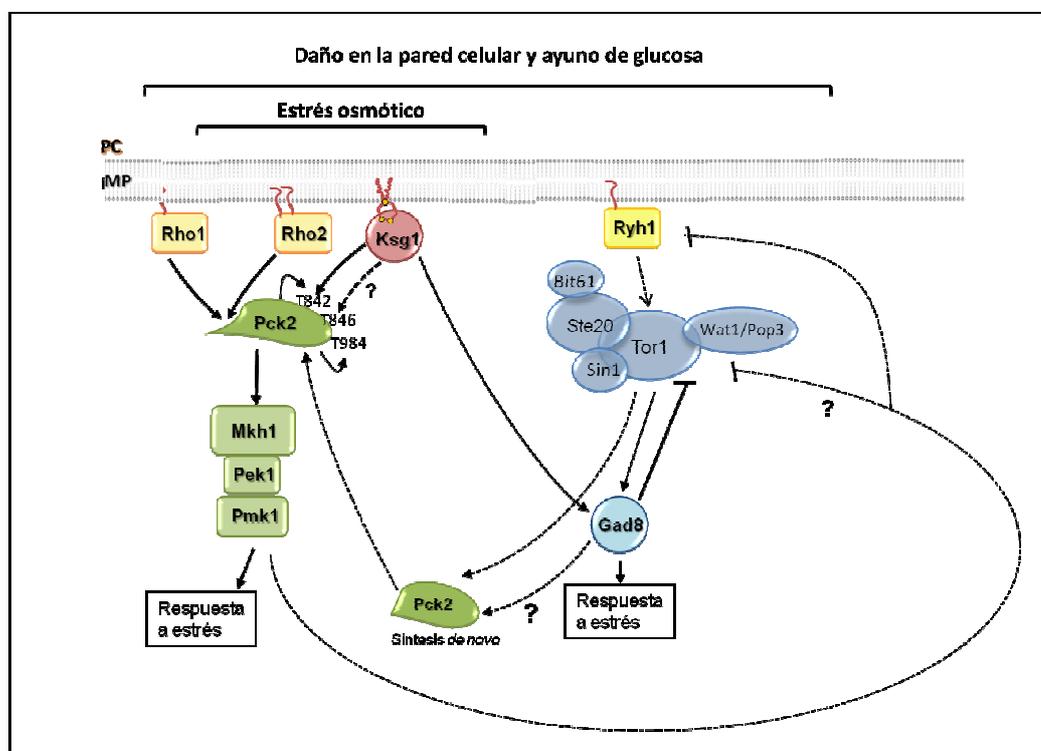


Figura 1.23. Interacción entre las rutas TOR y de integridad celular en *S. pombe*.

2. BIBLIOGRAFÍA



- Abrahamsen, H., A.K. O'Neill, N. Kannan, N. Kruse, S.S. Taylor, P.A. Jennings, and A.C. Newton. 2012. Peptidyl-prolyl isomerase Pin1 controls down-regulation of conventional protein kinase C isozymes. *The Journal of biological chemistry*. 287:13262-13278.
- Adami, A., B. Garcia-Alvarez, E. Arias-Palomo, D. Barford, and O. Llorca. 2007. Structure of TOR and its complex with KOG1. *Molecular cell*. 27:509-516.
- Ahmed, S., R. Kozma, J. Lee, C. Monfries, N. Harden, and L. Lim. 1991. The cysteine-rich domain of human proteins, neuronal chimaerin, protein kinase C and diacylglycerol kinase binds zinc. Evidence for the involvement of a zinc-dependent structure in phorbol ester binding. *The Biochemical journal*. 280 (Pt 1):233-241.
- Albert, V., and M.N. Hall. 2015. mTOR signaling in cellular and organismal energetics. *Current opinion in cell biology*. 33:55-66.
- Alessi, D.R., S.R. James, C.P. Downes, A.B. Holmes, P.R. Gaffney, C.B. Reese, and P. Cohen. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Current biology : CB*. 7:261-269.
- Alessi, D.R., M.T. Kozlowski, Q.P. Weng, N. Morrice, and J. Avruch. 1998. 3-Phosphoinositide-dependent protein kinase 1 (PDK1) phosphorylates and activates the p70 S6 kinase in vivo and in vitro. *Current biology : CB*. 8:69-81.
- Álvarez, B., and S. Moreno. 2006. Fission yeast Tor2 promotes cell growth and represses cell differentiation. *Journal of cell science*. 119:4475-4485.
- Ananthanarayanan, B., R.V. Stahelin, M.A. Dighman, and W. Cho. 2003. Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *The Journal of biological chemistry*. 278:46886-46894.
- Andrade, M.A., and P. Bork. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein. *Nature genetics*. 11:115-116.
- Andrews, P.D., and M.J. Stark. 2000. Dynamic, Rho1p-dependent localization of Pkc1p to sites of polarized growth. *Journal of cell science*. 113 (Pt 15):2685-2693.
- Antal, C.E., J.D. Violin, M.T. Kunkel, S. Skovso, and A.C. Newton. 2014. Intramolecular conformational changes optimize protein kinase C signaling. *Chemistry & biology*. 21:459-469.
- Antonsson, B., S. Montessuit, L. Friedli, M.A. Payton, and G. Paravicini. 1994. Protein kinase C in yeast. Characteristics of the *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 gene product. *The Journal of biological chemistry*. 269:16821-16828.
- Aoyama, K., H. Aiba, and T. Mizuno. 2001. Genetic analysis of the His-to-Asp phosphorelay implicated in mitotic cell cycle control: involvement of histidine-kinase genes of *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 65:2347-2352.
- Aoyama, K., Y. Mitsubayashi, H. Aiba, and T. Mizuno. 2000. Spy1, a histidine-containing phosphotransfer signaling protein, regulates the fission yeast cell cycle through the Mcs4 response regulator. *Journal of bacteriology*. 182:4868-4874.
- Arellano, M., A. Duran, and P. Perez. 1997. Localisation of the *Schizosaccharomyces pombe* rho1p GTPase and its involvement in the organisation of the actin cytoskeleton. *Journal of cell science*. 110 (Pt 20):2547-2555.
- Arellano, M., M.H. Valdivieso, T.M. Calonge, P.M. Coll, A. Duran, and P. Perez. 1999. *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, pck1p and pck2p, are targets of rho1p and rho2p and differentially regulate cell integrity. *Journal of cell science*. 112 (Pt 20):3569-3578.
- Aronova, S., K. Wedaman, S. Anderson, J. Yates, 3rd, and T. Powers. 2007. Probing the membrane environment of the TOR kinases reveals functional interactions between TORC1, actin, and membrane trafficking in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*. 18:2779-2794.

- Aronova, S., K. Wedaman, P.A. Aronov, K. Fontes, K. Ramos, B.D. Hammock, and T. Powers. 2008. Regulation of ceramide biosynthesis by TOR complex 2. *Cell metabolism*. 7:148-158.
- Aspuria, P.J., and F. Tamanoi. 2004. The Rheb family of GTP-binding proteins. *Cellular signalling*. 16:1105-1112.
- Aspuria, P.J., and F. Tamanoi. 2008. The Tsc/Rheb signaling pathway controls basic amino acid uptake via the Cat1 permease in fission yeast. *Molecular genetics and genomics : MGG*. 279:441-450.
- Audhya, A., and S.D. Emr. 2002. Stt4 PI 4-kinase localizes to the plasma membrane and functions in the Pkc1-mediated MAP kinase cascade. *Developmental cell*. 2:593-605.
- Audhya, A., R. Loewith, A.B. Parsons, L. Gao, M. Tabuchi, H. Zhou, C. Boone, M.N. Hall, and S.D. Emr. 2004a. Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P₂ effectors that regulate the actin cytoskeleton. *EMBO Journal*. 23:3747-3757.
- Audhya, A., R. Loewith, A.B. Parsons, L. Gao, M. Tabuchi, H. Zhou, C. Boone, M.N. Hall, and S.D. Emr. 2004b. Genome-wide lethality screen identifies new PI4,5P₂ effectors that regulate the actin cytoskeleton. *The EMBO Journal*. 23:3747-3757.
- Bahn, Y.S. 2008. Master and commander in fungal pathogens: the two-component system and the HOG signaling pathway. *Eukaryotic cell*. 7:2017-2036.
- Balendran, A., R.M. Biondi, P.C. Cheung, A. Casamayor, M. Deak, and D.R. Alessi. 2000. A 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) docking site is required for the phosphorylation of protein kinase Czeta (PKCzeta) and PKC-related kinase 2 by PDK1. *The Journal of biological chemistry*. 275:20806-20813.
- Balendran, A., A. Casamayor, M. Deak, A. Paterson, P. Gaffney, R. Currie, C.P. Downes, and D.R. Alessi. 1999. PDK1 acquires PDK2 activity in the presence of a synthetic peptide derived from the carboxyl terminus of PRK2. *Current biology : CB*. 9:393-404.
- Banerjee, P., M.F. Ahmad, J.R. Grove, C. Kozlosky, D.J. Price, and J. Avruch. 1990. Molecular structure of a major insulin/mitogen-activated 70-kDa S6 protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:8550-8554.
- Barba, G., T. Soto, M. Madrid, A. Nunez, J. Vicente, M. Gacto, and J. Cansado. 2008. Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cellular signalling*. 20:748-757.
- Bartlett, K., and K. Kim. 2014. Insight into Tor2, a budding yeast microdomain protein. *European journal of cell biology*. 93:87-97.
- Beeler, T., D. Bacikova, K. Gable, L. Hopkins, C. Johnson, H. Slife, and T. Dunn. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* TSC10/YBR265w gene encoding 3-ketosphinganine reductase is identified in a screen for temperature-sensitive suppressors of the Ca²⁺-sensitive csg2Delta mutant. *The Journal of biological chemistry*. 273:30688-30694.
- Bell, M., and D. Engelberg. 2003. Phosphorylation of Tyr-176 of the yeast MAPK Hog1/p38 is not vital for Hog1 biological activity. *The Journal of biological chemistry*. 278:14603-14606.
- Berchtold, D., and T.C. Walther. 2009. TORC2 plasma membrane localization is essential for cell viability and restricted to a distinct domain. *Molecular biology of the cell*. 20:1565-1575.
- Berridge, M.J., and R.F. Irvine. 1984. Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature*. 312:315-321.
- Bickle, M., P.A. Delley, A. Schmidt, and M.N. Hall. 1998. Cell wall integrity modulates RHO1 activity via the exchange factor ROM2. *EMBO J*. 17:2235-2245.
- Binda, M., M.P. Peli-Gulli, G. Bonfils, N. Panchaud, J. Urban, T.W. Sturgill, R. Loewith, and C. De Virgilio. 2009. The Vam6 GEF controls TORC1 by activating the EGO complex. *Molecular cell*. 35:563-573.

- Biondi, R.M., P.C. Cheung, A. Casamayor, M. Deak, R.A. Currie, and D.R. Alessi. 2000. Identification of a pocket in the PDK1 kinase domain that interacts with PIF and the C-terminal residues of PKA. *Embo j.* 19:979-988.
- Bonfils, G., M. Jaquenoud, S. Bontron, C. Ostrowicz, C. Ungermann, and C. De Virgilio. 2012. Leucyl-tRNA synthetase controls TORC1 via the EGO complex. *Molecular cell.* 46:105-110.
- Bonilla, M., and K.W. Cunningham. 2002. Calcium release and influx in yeast: TRPC and VGCC rule another kingdom. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment.* 2002:pe17.
- Bornancin, F., and P.J. Parker. 1996. Phosphorylation of threonine 638 critically controls the dephosphorylation and inactivation of protein kinase Calpha. *Current biology : CB.* 6:1114-1123.
- Borner, C., I. Filipuzzi, M. Wartmann, U. Eppenberger, and D. Fabbro. 1989. Biosynthesis and posttranslational modifications of protein kinase C in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry.* 264:13902-13909.
- Bosotti, R., A. Isacchi, and E.L. Sonnhammer. 2000. FAT: a novel domain in PIK-related kinases. *Trends Biochem Sci.* 25:225-227.
- Breslow, D.K., S.R. Collins, B. Bodenmiller, R. Aebersold, K. Simons, A. Shevchenko, C.S. Ejsing, and J.S. Weissman. 2010. Orm family proteins mediate sphingolipid homeostasis. *Nature.* 463:1048-1053.
- Broadus, M.R., and K.L. Gould. 2012. Multiple protein kinases influence the redistribution of fission yeast Clp1/Cdc14 phosphatase upon genotoxic stress. *Molecular biology of the cell.* 23:4118-4128.
- Browne, G.J., and C.G. Proud. 2004. A novel mTOR-regulated phosphorylation site in elongation factor 2 kinase modulates the activity of the kinase and its binding to calmodulin. *Molecular and cellular biology.* 24:2986-2997.
- Buck, V., J. Quinn, T. Soto Pino, H. Martin, J. Saldanha, K. Makino, B.A. Morgan, and J.B. Millar. 2001. Peroxide sensors for the fission yeast stress-activated mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular biology of the cell.* 12:407-419.
- Bultynck, G., V.L. Heath, A.P. Majeed, J.M. Galan, R. Haguenaer-Tsapis, and M.S. Cyert. 2006. Slm1 and Slm2 are novel substrates of the calcineurin phosphatase required for heat stress-induced endocytosis of the yeast uracil permease. *Molecular and cellular biology.* 26:4729-4745.
- Burns, D.J., and R.M. Bell. 1991. Protein kinase C contains two phorbol ester binding domains. *The Journal of biological chemistry.* 266:18330-18338.
- Cafferkey, R., M.M. McLaughlin, P.R. Young, R.K. Johnson, and G.P. Livi. 1994. Yeast TOR (DRR) proteins: amino-acid sequence alignment and identification of structural motifs. *Gene.* 141:133-136.
- Cai, S.L., A.R. Tee, J.D. Short, J.M. Bergeron, J. Kim, J. Shen, R. Guo, C.L. Johnson, K. Kiguchi, and C.L. Walker. 2006. Activity of TSC2 is inhibited by AKT-mediated phosphorylation and membrane partitioning. *The Journal of cell biology.* 173:279-289.
- Calonge, T.M., K. Nakano, M. Arellano, R. Arai, S. Katayama, T. Toda, I. Mabuchi, and P. Perez. 2000. Schizosaccharomyces pombe rho2p GTPase regulates cell wall alpha-glucan biosynthesis through the protein kinase pck2p. *Molecular biology of the cell.* 11:4393-4401.
- Calleja, V., D. Alcor, M. Laguerre, J. Park, B. Vojnovic, B.A. Hemmings, J. Downward, P.J. Parker, and B. Larijani. 2007. Intramolecular and intermolecular interactions of protein kinase B define its activation in vivo. *PLoS biology.* 5:e95.
- Cameron, A.J., C. Escribano, A.T. Saurin, B. Kostecky, and P.J. Parker. 2009. PKC maturation is promoted by nucleotide pocket occupation independently of intrinsic kinase activity. *Nature structural & molecular biology.* 16:624-630.

- Cameron, A.J., M.D. Linch, A.T. Saurin, C. Escribano, and P.J. Parker. 2011. mTORC2 targets AGC kinases through Sin1-dependent recruitment. *The Biochemical journal*. 439:287-297.
- Cameroni, E., N. Hulo, J. Roosen, J. Winderickx, and C.D. Virgilio. 2004. The Novel Yeast PAS Kinase Rim15 Orchestrates G0-Associated Antioxidant Defense Mechanisms. *Cell cycle*. 3:460-466.
- Cardenas, M.E., N.S. Cutler, M.C. Lorenz, C.J. Di Como, and J. Heitman. 1999. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes & development*. 13:3271-3279.
- Cenni, V., H. Doppler, E.D. Sonnenburg, N. Maraldi, A.C. Newton, and A. Toker. 2002. Regulation of novel protein kinase C epsilon by phosphorylation. *The Biochemical journal*. 363:537-545.
- Cohen, A., M. Kupiec, and R. Weisman. 2014. Glucose activates TORC2-Gad8 protein via positive regulation of the cAMP/cAMP-dependent protein kinase A (PKA) pathway and negative regulation of the Pmk1 protein-mitogen-activated protein kinase pathway. *The Journal of biological chemistry*. 289:21727-21737.
- Colon-Gonzalez, F., and M.G. Kazanietz. 2006. C1 domains exposed: from diacylglycerol binding to protein-protein interactions. *Biochimica et biophysica acta*. 1761:827-837.
- Collins, B.J., M. Deak, J.S. Arthur, L.J. Armit, and D.R. Alessi. 2003. In vivo role of the PIF-binding docking site of PDK1 defined by knock-in mutation. *Embo j*. 22:4202-4211.
- Cook, D.R., K.L. Rossman, and C.J. Der. 2014. Rho guanine nucleotide exchange factors: regulators of Rho GTPase activity in development and disease. *Oncogene*. 33:4021-4035.
- Corbalan-Garcia, S., and J.C. Gomez-Fernandez. 2006. Protein kinase C regulatory domains: the art of decoding many different signals in membranes. *Biochimica et biophysica acta*. 1761:633-654.
- Cottarel, G. 1997. Mcs4, a two-component system response regulator homologue, regulates the Schizosaccharomyces pombe cell cycle control. *Genetics*. 147:1043-1051.
- Coussens, L., P.J. Parker, L. Rhee, T.L. Yang-Feng, E. Chen, M.D. Waterfield, U. Francke, and A. Ullrich. 1986. Multiple, distinct forms of bovine and human protein kinase C suggest diversity in cellular signaling pathways. *Science (New York, N.Y.)*. 233:859-866.
- Crespo, J.L., S. Diaz-Troya, and F.J. Florencio. 2005. Inhibition of target of rapamycin signaling by rapamycin in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii. *Plant physiology*. 139:1736-1749.
- Cruz, S., S. Munoz, E. Manjon, P. Garcia, and Y. Sanchez. 2013. The fission yeast cell wall stress sensor-like proteins Mtl2 and Wsc1 act by turning on the GTPase Rho1p but act independently of the cell wall integrity pathway. *MicrobiologyOpen*. 2:778-794.
- Currie, R.A., K.S. Walker, A. Gray, M. Deak, A. Casamayor, C.P. Downes, P. Cohen, D.R. Alessi, and J. Lucocq. 1999. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *The Biochemical journal*. 337 (Pt 3):575-583.
- Cybulski, N., and M.N. Hall. 2009. TOR complex 2: a signaling pathway of its own. *Trends Biochem Sci*. 34:620-627.
- Czerwinski, R., A. Aulabaugh, R.M. Greco, S. Olland, K. Malakian, S. Wolfrom, L. Lin, R. Kriz, M. Stahl, Y. Huang, L. Liu, and D. Chaudhary. 2005. Characterization of protein kinase C theta activation loop autophosphorylation and the kinase domain catalytic mechanism. *Biochemistry*. 44:9563-9573.
- Chan, T.O., S.E. Rittenhouse, and P.N. Tsichlis. 1999. AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annual review of biochemistry*. 68:965-1014.
- Chauvin, C., V. Koka, A. Nouschi, V. Mieulet, C. Hoareau-Aveilla, A. Dreazen, N. Cagnard, W. Carpentier, T. Kiss, O. Meyuhas, and M. Pende. 2014. Ribosomal protein S6 kinase

- activity controls the ribosome biogenesis transcriptional program. *Oncogene*. 33:474-483.
- Chen, D., C. Gould, R. Garza, T. Gao, R.Y. Hampton, and A.C. Newton. 2007. Amplitude control of protein kinase C by RINCK, a novel E3 ubiquitin ligase. *The Journal of biological chemistry*. 282:33776-33787.
- Chen, E.J., and C.A. Kaiser. 2003. LST8 negatively regulates amino acid biosynthesis as a component of the TOR pathway. *The Journal of cell biology*. 161:333-347.
- Chen, R.E., and J. Thorner. 2007. Function and regulation in MAPK signaling pathways: lessons learned from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et biophysica acta*. 1773:1311-1340.
- Cho, W. 2001. Membrane targeting by C1 and C2 domains. *The Journal of biological chemistry*. 276:32407-32410.
- Dai, N., J. Christiansen, F.C. Nielsen, and J. Avruch. 2013. mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Genes & development*. 27:301-312.
- Dames, S.A., J.M. Mulet, K. Rathgeb-Szabo, M.N. Hall, and S. Grzesiek. 2005. The solution structure of the FATC domain of the protein kinase target of rapamycin suggests a role for redox-dependent structural and cellular stability. *The Journal of biological chemistry*. 280:20558-20564.
- Daquinag, A., M. Fadri, S.Y. Jung, J. Qin, and J. Kunz. 2007. The yeast PH domain proteins Slm1 and Slm2 are targets of sphingolipid signaling during the response to heat stress. *Molecular and cellular biology*. 27:633-650.
- Davis, R.J. 2000. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 103:239-252.
- Degols, G., and P. Russell. 1997. Discrete roles of the Spc1 kinase and the Atf1 transcription factor in the UV response of *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*. 17:3356-3363.
- Degols, G., K. Shiozaki, and P. Russell. 1996. Activation and regulation of the Spc1 stress-activated protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*. 16:2870-2877.
- deHart, A.K., J.D. Schnell, D.A. Allen, J.Y. Tsai, and L. Hicke. 2003. Receptor internalization in yeast requires the Tor2-Rho1 signaling pathway. *Molecular biology of the cell*. 14:4676-4684.
- DeHart, A.K.A., J.D. Schnell, D.A. Allen, and L. Hicke. 2002. The conserved Pkh-Ypk kinase cascade is required for endocytosis in yeast. *Journal of Cell Biology*. 156:241-248.
- Desrivieres, S., F.T. Cooke, P.J. Parker, and M.N. Hall. 1998. MSS4, a phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase required for organization of the actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*. 273:15787-15793.
- Di Como, C.J., and K.T. Arndt. 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes & development*. 10:1904-1916.
- Diaz-Cuervo, H., and A. Bueno. 2008. Cds1 controls the release of Cdc14-like phosphatase Fip1 from the nucleolus to drive full activation of the checkpoint response to replication stress in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 19:2488-2499.
- Diaz-Meco, M.T., and J. Moscat. 2001. MEK5, a new target of the atypical protein kinase C isoforms in mitogenic signaling. *Molecular and cellular biology*. 21:1218-1227.
- Du, W., G.M. Forte, D. Smith, and J. Petersen. 2016. Phosphorylation of the amino-terminus of the AGC kinase Gad8 prevents its interaction with TORC2. *Open Biology*. 6:150189.
- Dube, N., and M.L. Tremblay. 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. *Biochimica et biophysica acta*. 1754:108-117.
- Dubouloz, F., O. Deloche, V. Wanke, E. Cameroni, and C. De Virgilio. 2005. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Molecular cell*. 19:15-26.

- Duran, A., R. Amanchy, J.F. Linares, J. Joshi, S. Abu-Baker, A. Porollo, M. Hansen, J. Moscat, and M.T. Diaz-Meco. 2011. p62 is a key regulator of nutrient sensing in the mTORC1 pathway. *Molecular cell*. 44:134-146.
- Dutil, E.M., L.M. Keranen, A.A. DePaoli-Roach, and A.C. Newton. 1994. In vivo regulation of protein kinase C by trans-phosphorylation followed by autophosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 269:29359-29362.
- Dutil, E.M., and A.C. Newton. 2000. Dual role of pseudosubstrate in the coordinated regulation of protein kinase C by phosphorylation and diacylglycerol. *The Journal of biological chemistry*. 275:10697-10701.
- Duvel, K., A. Santhanam, S. Garrett, L. Schneper, and J.R. Broach. 2003. Multiple roles of Tap42 in mediating rapamycin-induced transcriptional changes in yeast. *Molecular cell*. 11:1467-1478.
- Echevarria, W., M.F. Leite, M.T. Guerra, W.R. Zipfel, and M.H. Nathanson. 2003. Regulation of calcium signals in the nucleus by a nucleoplasmic reticulum. *Nature cell biology*. 5:440-446.
- Edwards, A.S., and A.C. Newton. 1997. Phosphorylation at conserved carboxyl-terminal hydrophobic motif regulates the catalytic and regulatory domains of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 272:18382-18390.
- Efeyan, A., R. Zoncu, and D.M. Sabatini. 2012. Amino acids and mTORC1: from lysosomes to disease. *Trends in molecular medicine*. 18:524-533.
- Enslin, H., D.M. Branch, and R.J. Davis. 2000. Molecular determinants that mediate selective activation of p38 MAP kinase isoforms. *Embo j*. 19:1301-1311.
- Facchinetti, V., W. Ouyang, H. Wei, N. Soto, A. Lazorchak, C. Gould, C. Lowry, A.C. Newton, Y. Mao, R.Q. Miao, W.C. Sessa, J. Qin, P. Zhang, B. Su, and E. Jacinto. 2008. The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J*. 27:1932-1943.
- Fadri, M., A. Daquinag, S. Wang, T. Xue, and J. Kunz. 2005. The pleckstrin homology domain proteins Slm1 and Slm2 are required for actin cytoskeleton organization in yeast and bind phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate and TORC2. *Molecular biology of the cell*. 16:1883-1900.
- Farooq, A., and M.M. Zhou. 2004. Structure and regulation of MAPK phosphatases. *Cellular signalling*. 16:769-779.
- Ferguson, K.M., J.M. Kavran, V.G. Sankaran, E. Fournier, S.J. Isakoff, E.Y. Skolnik, and M.A. Lemmon. 2000. Structural basis for discrimination of 3-phosphoinositides by pleckstrin homology domains. *Molecular cell*. 6:373-384.
- Flynn, P., H. Mellor, A. Casamassima, and P.J. Parker. 2000. Rho GTPase control of protein kinase C-related protein kinase activation by 3-phosphoinositide-dependent protein kinase. *The Journal of biological chemistry*. 275:11064-11070.
- Freeley, M., D. Kelleher, and A. Long. 2011. Regulation of Protein Kinase C function by phosphorylation on conserved and non-conserved sites. *Cellular signalling*. 23:753-762.
- Friant, S., R. Lombardi, T. Schmelzle, M.N. Hall, and H. Riezman. 2001. Sphingoid base signaling via Pkh kinases is required for endocytosis in yeast. *EMBO J*. 20:6783-6792.
- Frias, M.A., C.C. Thoreen, J.D. Jaffe, W. Schroder, T. Sculley, S.A. Carr, and D.M. Sabatini. 2006. mSin1 is necessary for Akt/PKB phosphorylation, and its isoforms define three distinct mTORC2s. *Current biology : CB*. 16:1865-1870.
- Fruman, D.A., R.E. Meyers, and L.C. Cantley. 1998. Phosphoinositide kinases. *Annual review of biochemistry*. 67:481-507.
- Fujita, M., and M. Yamamoto. 1998. S. pombe sck2+, a second homologue of S. cerevisiae SCH9 in fission yeast, encodes a putative protein kinase closely related to PKA in function. *Current genetics*. 33:248-254.

- Gagliardi, P.A., L. di Blasio, and L. Primo. 2015. PDK1: A signaling hub for cell migration and tumor invasion. *Biochimica et biophysica acta*. 1856:178-188.
- Gaits, F., G. Degols, K. Shiozaki, and P. Russell. 1998. Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes & development*. 12:1464-1473.
- Gaits, F., and P. Russell. 1999. Active nucleocytoplasmic shuttling required for function and regulation of stress-activated kinase Spc1/Sty1 in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 10:1395-1407.
- Gaits, F., K. Shiozaki, and P. Russell. 1997. Protein phosphatase 2C acts independently of stress-activated kinase cascade to regulate the stress response in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*. 272:17873-17879.
- Gangloff, Y.G., M. Mueller, S.G. Dann, P. Svoboda, M. Sticker, J.F. Spetz, S.H. Um, E.J. Brown, S. Cereghini, G. Thomas, and S.C. Kozma. 2004. Disruption of the mouse mTOR gene leads to early postimplantation lethality and prohibits embryonic stem cell development. *Molecular and cellular biology*. 24:9508-9516.
- Gao, T., J. Brognard, and A.C. Newton. 2008. The phosphatase PHLPP controls the cellular levels of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 283:6300-6311.
- Gao, T., A. Toker, and A.C. Newton. 2001. The carboxyl terminus of protein kinase c provides a switch to regulate its interaction with the phosphoinositide-dependent kinase, PDK-1. *The Journal of biological chemistry*. 276:19588-19596.
- Garcia-Martinez, J.M., and D.R. Alessi. 2008. mTOR complex 2 (mTORC2) controls hydrophobic motif phosphorylation and activation of serum- and glucocorticoid-induced protein kinase 1 (SGK1). *The Biochemical journal*. 416:375-385.
- Garcia, P., I. Garcia, F. Marcos, G.R. de Garibay, and Y. Sanchez. 2009a. Fission yeast rgf2p is a rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of rgf1p. *Genetics*. 181:1321-1334.
- Garcia, P., V. Tajadura, I. Garcia, and Y. Sanchez. 2006a. Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 17:1620-1631.
- Garcia, P., V. Tajadura, I. Garcia, and Y. Sanchez. 2006b. Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast*. 23:1031-1043.
- Garcia, P., V. Tajadura, and Y. Sanchez. 2009b. The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 20:721-731.
- Genot, E.M., P.J. Parker, and D.A. Cantrell. 1995. Analysis of the role of protein kinase C-alpha, -epsilon, and -zeta in T cell activation. *The Journal of biological chemistry*. 270:9833-9839.
- George, V.T., G. Brooks, and T.C. Humphrey. 2007. Regulation of cell cycle and stress responses to hydrostatic pressure in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 18:4168-4179.
- Gould, C.M., N. Kannan, S.S. Taylor, and A.C. Newton. 2009. The chaperones Hsp90 and Cdc37 mediate the maturation and stabilization of protein kinase C through a conserved PXXP motif in the C-terminal tail. *The Journal of biological chemistry*. 284:4921-4935.
- Graef, I.A., F. Chen, and G.R. Crabtree. 2001. NFAT signaling in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*. 11:505-512.
- Graub, R., N. Hilti, C. Niederberger, and M.E. Schweingruber. 2003. Ksg1, a homologue of the phosphoinositide-dependent protein kinase 1, controls cell wall integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of basic microbiology*. 43:473-482.
- Griner, E.M., and M.G. Kazanietz. 2007. Protein kinase C and other diacylglycerol effectors in cancer. *Nature reviews. Cancer*. 7:281-294.
- Grodsky, N., Y. Li, D. Bouzida, R. Love, J. Jensen, B. Nodes, J. Nonomiya, and S. Grant. 2006. Structure of the catalytic domain of human protein kinase C beta II complexed with a bisindolylmaleimide inhibitor. *Biochemistry*. 45:13970-13981.

- Guertin, D.A., D.M. Stevens, C.C. Thoreen, A.A. Burds, N.Y. Kalaany, J. Moffat, M. Brown, K.J. Fitzgerald, and D.M. Sabatini. 2006. Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Developmental cell*. 11:859-871.
- Gusarova, G.A., L.A. Dada, A.M. Kelly, C. Brodie, L.A. Witters, N.S. Chandel, and J.I. Sznajder. 2009. Alpha1-AMP-activated protein kinase regulates hypoxia-induced Na,K-ATPase endocytosis via direct phosphorylation of protein kinase C zeta. *Molecular and cellular biology*. 29:3455-3464.
- Hagan, I.M., and J.S. Hyams. 1988. The use of cell division cycle mutants to investigate the control of microtubule distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science*. 89 (Pt 3):343-357.
- Halova, L., W. Du, S. Kirkham, D.L. Smith, and J. Petersen. 2013. Phosphorylation of the TOR ATP binding domain by AGC kinase constitutes a novel mode of TOR inhibition. *The Journal of cell biology*. 203:595-604.
- Hall, A. 2012. Rho family GTPases. *Biochemical Society transactions*. 40:1378-1382.
- Hall, M.N. 2008. mTOR-what does it do? *Transplantation proceedings*. 40:S5-8.
- Han, J.M., S.J. Jeong, M.C. Park, G. Kim, N.H. Kwon, H.K. Kim, S.H. Ha, S.H. Ryu, and S. Kim. 2012. Leucyl-tRNA synthetase is an intracellular leucine sensor for the mTORC1-signaling pathway. *Cell*. 149:410-424.
- Han, S., M.A. Lone, R. Schneider, and A. Chang. 2010. Orm1 and Orm2 are conserved endoplasmic reticulum membrane proteins regulating lipid homeostasis and protein quality control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 107:5851-5856.
- Hannan, K.M., Y. Brandenburger, A. Jenkins, K. Sharkey, A. Cavanaugh, L. Rothblum, T. Moss, G. Poortinga, G.A. McArthur, R.B. Pearson, and R.D. Hannan. 2003. mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and cellular biology*. 23:8862-8877.
- Hansra, G., F. Bornancin, R. Whelan, B.A. Hemmings, and P.J. Parker. 1996. 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced dephosphorylation of protein kinase Calpha correlates with the presence of a membrane-associated protein phosphatase 2A heterotrimer. *The Journal of biological chemistry*. 271:32785-32788.
- Hara, K., Y. Maruki, X. Long, K. Yoshino, N. Oshiro, S. Hidayat, C. Tokunaga, J. Avruch, and K. Yonezawa. 2002. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 110:177-189.
- Hartmuth, S., and J. Petersen. 2009. Fission yeast Tor1 functions as part of TORC1 to control mitotic entry through the stress MAPK pathway following nutrient stress. *Journal of cell science*. 122:1737-1746.
- Hatano, T., S. Morigasaki, H. Tatebe, K. Ikeda, and K. Shiozaki. 2015. Fission yeast Ryh1 GTPase activates TOR Complex 2 in response to glucose. *Cell cycle*. 14:848-856.
- Hauge, C., T.L. Antal, D. Hirschberg, U. Doehn, K. Thorup, L. Idrissova, K. Hansen, O.N. Jensen, T.J. Jorgensen, R.M. Biondi, and M. Frodin. 2007. Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *Embo j*. 26:2251-2261.
- Hay, N., and N. Sonenberg. 2004. Upstream and downstream of mTOR. *Genes & development*. 18:1926-1945.
- Hayashi, T., M. Hatanaka, K. Nagao, Y. Nakaseko, J. Kanoh, A. Kokubu, M. Ebe, and M. Yanagida. 2007. Rapamycin sensitivity of the *Schizosaccharomyces pombe* tor2 mutant and organization of two highly phosphorylated TOR complexes by specific and common subunits. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 12:1357-1370.

- Healy, A.M., S. Zolnierowicz, A.E. Stapleton, M. Goebel, A.A. DePaoli-Roach, and J.R. Pringle. 1991. CDC55, a *Saccharomyces cerevisiae* gene involved in cellular morphogenesis: identification, characterization, and homology to the B subunit of mammalian type 2A protein phosphatase. *Molecular and cellular biology*. 11:5767-5780.
- Heckman, D.S., D.M. Geiser, B.R. Eidell, R.L. Stauffer, N.L. Kardos, and S.B. Hedges. 2001. Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science (New York, N.Y.)*. 293:1129-1133.
- Heitman, J., N.R. Movva, and M.N. Hall. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science (New York, N.Y.)*. 253:905-909.
- Helliwell, S.B., A. Schmidt, Y. Ohya, and M.N. Hall. 1998. The Rho1 effector Pkc1, but not Bni1, mediates signalling from Tor2 to the actin cytoskeleton. *Current biology : CB*. 8:1211-1214.
- Hengst, L., T. Lehmeier, and D. Gallwitz. 1990. The *ryh1* gene in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* encoding a GTP-binding protein related to ras, rho and *ypt*: structure, expression and identification of its human homologue. *EMBO J*. 9:1949-1955.
- Hill, C.S., and R. Treisman. 1995. Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*. 80:199-211.
- Hinnebusch, A.G. 2005. Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annual review of microbiology*. 59:407-450.
- Hirata, D., K. Nakano, M. Fukui, H. Takenaka, T. Miyakawa, and I. Mabuchi. 1998. Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role of a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *Journal of cell science*. 111:149-159.
- Homma, K., S. Terui, M. Minemura, H. Qadota, Y. Anraku, Y. Kanaho, and Y. Ohya. 1998. Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase localized on the plasma membrane is essential for yeast cell morphogenesis. *The Journal of biological chemistry*. 273:15779-15786.
- Honma, Y., A. Kitamura, R. Shioda, H. Maruyama, K. Ozaki, Y. Oda, T. Mini, P. Jenö, Y. Maki, K. Yonezawa, E. Hurt, M. Ueno, M. Uritani, M.N. Hall, and T. Ushimaru. 2006. TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. *EMBO J*. 25:3832-3842.
- House, C., and B.E. Kemp. 1987. Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science (New York, N.Y.)*. 238:1726-1728.
- Huang, X., B.R. Withers, and R.C. Dickson. 2014. Sphingolipids and lifespan regulation. *Biochimica et biophysica acta*. 1841:657-664.
- Huber, A., B. Bodenmiller, A. Uotila, M. Stahl, S. Wanka, B. Gerrits, R. Aebersold, and R. Loewith. 2009. Characterization of the rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that Sch9 is a central coordinator of protein synthesis. *Genes & development*. 23:1929-1943.
- Hug, H., and T.F. Sarre. 1993. Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction? *The Biochemical journal*. 291 (Pt 2):329-343.
- Hurley, J.H., A.C. Newton, P.J. Parker, P.M. Blumberg, and Y. Nishizuka. 1997. Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein science : a publication of the Protein Society*. 6:477-480.
- Iadevaia, V., Z. Zhang, E. Jan, and C.G. Proud. 2012. mTOR signaling regulates the processing of pre-rRNA in human cells. *Nucleic acids research*. 40:2527-2539.
- Ikedo, K., S. Morigasaki, H. Tatebe, F. Tamanoi, and K. Shiozaki. 2008. Fission yeast TOR complex 2 activates the AGC-family Gad8 kinase essential for stress resistance and cell cycle control. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*. 7:358-364.
- Ikenoue, T., K. Inoki, Q. Yang, X. Zhou, and K.L. Guan. 2008. Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J*. 27:1919-1931.

- Inoki, K., H. Ouyang, Y. Li, and K.L. Guan. 2005. Signaling by target of rapamycin proteins in cell growth control. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR.* 69:79-100.
- Jacinto, E., V. Facchinetti, D. Liu, N. Soto, S. Wei, S.Y. Jung, Q. Huang, J. Qin, and B. Su. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell.* 127:125-137.
- Jacinto, E., B. Guo, K.T. Arndt, T. Schmelzle, and M.N. Hall. 2001. TIP41 interacts with TAP42 and negatively regulates the TOR signaling pathway. *Molecular cell.* 8:1017-1026.
- Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M.A. Ruegg, A. Hall, and M.N. Hall. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. *Nature cell biology.* 6:1122-1128.
- Jacinto, E., and A. Lorberg. 2008. TOR regulation of AGC kinases in yeast and mammals. *The Biochemical journal.* 410:19-37.
- Jaken, S. 1997. Protein Kinase C intracellular binding proteins *Springer-Verlag, Heidelberg:*179-188.
- Jaken, S. 2004. Protein kinase C regulation by protein interactions *Ed. Kluwer Academic/Plenum Publishers:*49-62.
- Jastrzebski, K., K.M. Hannan, E.B. Tchoubrieva, R.D. Hannan, and R.B. Pearson. 2007. Coordinate regulation of ribosome biogenesis and function by the ribosomal protein S6 kinase, a key mediator of mTOR function. *Growth factors (Chur, Switzerland).* 25:209-226.
- Jiang, Y., and J.R. Broach. 1999. Tor proteins and protein phosphatase 2A reciprocally regulate Tap42 in controlling cell growth in yeast. *EMBO J.* 18:2782-2792.
- Johnson, L.N., and R.J. Lewis. 2001. Structural basis for control by phosphorylation. *Chemical reviews.* 101:2209-2242.
- Jorgensen, P., I. Rupes, J.R. Sharom, L. Schneper, J.R. Broach, and M. Tyers. 2004. A dynamic transcriptional network communicates growth potential to ribosome synthesis and critical cell size. *Genes & development.* 18:2491-2505.
- Jung, U.S., and D.E. Levin. 1999. Genome-wide analysis of gene expression regulated by the yeast cell wall integrity signalling pathway. *Molecular microbiology.* 34:1049-1057.
- Kalender, A., A. Selvaraj, S.Y. Kim, P. Gulati, S. Brule, B. Viollet, B.E. Kemp, N. Bardeesy, P. Dennis, J.J. Schlager, A. Marette, S.C. Kozma, and G. Thomas. 2010. Metformin, independent of AMPK, inhibits mTORC1 in a rag GTPase-dependent manner. *Cell metabolism.* 11:390-401.
- Kamada, Y., Y. Fujioka, N.N. Suzuki, F. Inagaki, S. Wullschleger, R. Loewith, M.N. Hall, and Y. Ohsumi. 2005. Tor2 directly phosphorylates the AGC kinase Ypk2 to regulate actin polarization. *Molecular and cellular biology.* 25:7239-7248.
- Kanashiro, C.A., and R.A. Khalil. 1998. Signal transduction by protein kinase C in mammalian cells. *Clinical and experimental pharmacology & physiology.* 25:974-985.
- Kantidakis, T., B.A. Ramsbottom, J.L. Birch, S.N. Dowding, and R.J. White. 2010. mTOR associates with TFIIC, is found at tRNA and 5S rRNA genes, and targets their repressor Maf1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 107:11823-11828.
- Karin, M., and T. Hunter. 1995. Transcriptional control by protein phosphorylation: signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Current biology : CB.* 5:747-757.
- Kato, T., Jr., K. Okazaki, H. Murakami, S. Stettler, P.A. Fantes, and H. Okayama. 1996. Stress signal, mediated by a Hog1-like MAP kinase, controls sexual development in fission yeast. *FEBS letters.* 378:207-212.
- Kawai, M., A. Nakashima, M. Ueno, T. Ushimaru, K. Aiba, H. Doi, and M. Uritani. 2001. Fission yeast tor1 functions in response to various stresses including nitrogen starvation, high osmolarity, and high temperature. *Current genetics.* 39:166-174.

- Kazanietz, M.G. 2005. Targeting protein kinase C and "non-kinase" phorbol ester receptors: emerging concepts and therapeutic implications. *Biochimica et biophysica acta*. 1754:296-304.
- Keith, C.T., and S.L. Schreiber. 1995. PIK-related kinases: DNA repair, recombination, and cell cycle checkpoints. *Science (New York, N.Y.)*. 270:50-51.
- Kemp, B.E., and R.B. Pearson. 1990. Protein kinase recognition sequence motifs. *Trends Biochem Sci*. 15:342-346.
- Kemp, J.T., M.K. Balasubramanian, and K.L. Gould. 1997. A *wat1* mutant of fission yeast is defective in cell morphology. *Molecular & general genetics : MGG*. 254:127-138.
- Kiley, S.C., and P.J. Parker. 1995. Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *Journal of cell science*. 108 (Pt 3):1003-1016.
- Kim, D.H., D.D. Sarbassov, S.M. Ali, J.E. King, R.R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D.M. Sabatini. 2002. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 110:163-175.
- Kim, D.H., D.D. Sarbassov, S.M. Ali, R.R. Latek, K.V. Guntur, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D.M. Sabatini. 2003. GbetaL, a positive regulator of the rapamycin-sensitive pathway required for the nutrient-sensitive interaction between raptor and mTOR. *Molecular cell*. 11:895-904.
- Kim, E., P. Goraksha-Hicks, L. Li, T.P. Neufeld, and K.L. Guan. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nature cell biology*. 10:935-945.
- Knopf, J.L., M.H. Lee, L.A. Sultzman, R.W. Kriz, C.R. Loomis, R.M. Hewick, and R.M. Bell. 1986. Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell*. 46:491-502.
- Kogan, K., E.D. Spear, C.A. Kaiser, and D. Fass. 2010. Structural conservation of components in the amino acid sensing branch of the TOR pathway in yeast and mammals. *Journal of molecular biology*. 402:388-398.
- Kong, S.K., and P.B. Chock. 1992. Protein ubiquitination is regulated by phosphorylation. An in vitro study. *The Journal of biological chemistry*. 267:14189-14192.
- Kozma, S.C., S. Ferrari, P. Bassand, M. Siegmann, N. Totty, and G. Thomas. 1990. Cloning of the mitogen-activated S6 kinase from rat liver reveals an enzyme of the second messenger subfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 87:7365-7369.
- Krisak, L., R. Strich, R.S. Winters, J.P. Hall, M.J. Mallory, D. Kreitzer, R.S. Tuan, and E. Winter. 1994. SMK1, a developmentally regulated MAP kinase, is required for spore wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development*. 8:2151-2161.
- Kunz, J., U. Schneider, I. Howald, A. Schmidt, and M.N. Hall. 2000. HEAT repeats mediate plasma membrane localization of Tor2p in yeast. *The Journal of biological chemistry*. 275:37011-37020.
- Kuranda, K., V. Leberre, S. Sokol, G. Palamarczyk, and J. Francois. 2006. Investigating the caffeine effects in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* brings new insights into the connection between TOR, PKC and Ras/cAMP signalling pathways. *Molecular microbiology*. 61:1147-1166.
- Lawlor, M.A., A. Mora, P.R. Ashby, M.R. Williams, V. Murray-Tait, L. Malone, A.R. Prescott, J.M. Lucocq, and D.R. Alessi. 2002. Essential role of PDK1 in regulating cell size and development in mice. *Embo j*. 21:3728-3738.
- Lawrence, C.L., H. Maekawa, J.L. Worthington, W. Reiter, C.R. Wilkinson, and N. Jones. 2007. Regulation of *Schizosaccharomyces pombe* Atf1 protein levels by Sty1-mediated phosphorylation and heterodimerization with Pcr1. *The Journal of biological chemistry*. 282:5160-5170.
- Le Good, J.A., W.H. Ziegler, D.B. Parekh, D.R. Alessi, P. Cohen, and P.J. Parker. 1998. Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science (New York, N.Y.)*. 281:2042-2045.

- Lee-Fruman, K.K., C.J. Kuo, J. Lippincott, N. Terada, and J. Blenis. 1999. Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1. *Oncogene*. 18:5108-5114.
- Lee, H.W., L. Smith, G.R. Pettit, A. Vinitzky, and J.B. Smith. 1996. Ubiquitination of protein kinase C- α and degradation by the proteasome. *The Journal of biological chemistry*. 271:20973-20976.
- Lee, K., P. Gudapati, S. Dragovic, C. Spencer, S. Joyce, N. Killeen, M.A. Magnuson, and M. Boothby. 2010. Mammalian target of rapamycin protein complex 2 regulates differentiation of Th1 and Th2 cell subsets via distinct signaling pathways. *Immunity*. 32:743-753.
- Lempiainen, H., and D. Shore. 2009. Growth control and ribosome biogenesis. *Current opinion in cell biology*. 21:855-863.
- Leupold, U. 1949. Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei Schizosaccharomyces Pombe. Luno.
- Levin, D.E. 2005. Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*. 69:262-291.
- Levin, D.E. 2011. Regulation of cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: the cell wall integrity signaling pathway. *Genetics*. 189:1145-1175.
- Levin, D.E., and E. Bartlett-Heubusch. 1992. Mutants in the *S. cerevisiae* PKC1 gene display a cell cycle-specific osmotic stability defect. *The Journal of cell biology*. 116:1221-1229.
- Levin, D.E., B. Bowers, C.Y. Chen, Y. Kamada, and M. Watanabe. 1994. Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cellular & molecular biology research*. 40:229-239.
- Levin, D.E., F.O. Fields, R. Kunisawa, J.M. Bishop, and J. Thorner. 1990. A candidate protein kinase C gene, PKC1, is required for the *S. cerevisiae* cell cycle. *Cell*. 62:213-224.
- Li, W., J. Zhang, D.P. Bottaro, and J.H. Pierce. 1997. Identification of serine 643 of protein kinase C- δ as an important autophosphorylation site for its enzymatic activity. *The Journal of biological chemistry*. 272:24550-24555.
- Liu, J.P. 1996. Protein kinase C and its substrates. *Molecular and cellular endocrinology*. 116:1-29.
- Liu, K., X. Zhang, R.L. Lester, and R.C. Dickson. 2005. The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *The Journal of biological chemistry*. 280:22679-22687.
- Liu, W.S., and C.A. Heckman. 1998. The sevenfold way of PKC regulation. *Cellular signalling*. 10:529-542.
- Liu, Y., N.V. Belkina, C. Graham, and S. Shaw. 2006. Independence of protein kinase C- δ activity from activation loop phosphorylation: structural basis and altered functions in cells. *The Journal of biological chemistry*. 281:12102-12111.
- Liu, Z., T. Sekito, C.B. Epstein, and R.A. Butow. 2001. RTG-dependent mitochondria to nucleus signaling is negatively regulated by the seven WD-repeat protein Lst8p. *EMBO J*. 20:7209-7219.
- Loewith, R. 2010. TORC1 signaling in budding yeast *The Enzymes*. 27:147-175.
- Loewith, R., A. Hubberstey, and D. Young. 2000. Skh1, the MEK component of the mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *Journal of cell science*. 113 (Pt 1):153-160.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J.L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe, and M.N. Hall. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Molecular cell*. 10:457-468.
- Long, X., Y. Lin, S. Ortiz-Vega, K. Yonezawa, and J. Avruch. 2005. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current biology : CB*. 15:702-713.
- Lu, Z., D. Liu, A. Hornia, W. Devonish, M. Pagano, and D.A. Foster. 1998. Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Molecular and cellular biology*. 18:839-845.

- Luke, M.M., F. Della Seta, C.J. Di Como, H. Sugimoto, R. Kobayashi, and K.T. Arndt. 1996. The SAP, a new family of proteins, associate and function positively with the SIT4 phosphatase. *Molecular and cellular biology*. 16:2744-2755.
- Luo, G., A. Gruhler, Y. Liu, O.N. Jensen, and R.C. Dickson. 2008. The sphingolipid long-chain base-Pkh1/2-Ypk1/2 signaling pathway regulates eisosome assembly and turnover. *Journal of Biological Chemistry*. 283:10433-10444.
- Luo, X., N. Talarek, and C. De Virgilio. 2011. Initiation of the yeast G0 program requires Igo1 and Igo2, which antagonize activation of decapping of specific nutrient-regulated mRNAs. *RNA biology*. 8:14-17.
- Lv, T., Q. Wang, M. Cromie, H. Liu, S. Tang, Y. Song, and W. Gao. 2015. Twist1-mediated 4E-BP1 regulation through mTOR in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*. 6:33006-33018.
- Ma, X.M., and J. Blenis. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:307-318.
- Ma, Y., T. Kuno, A. Kita, Y. Asayama, and R. Sugiura. 2006. Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 17:5028-5037.
- Ma, Y., R. Sugiura, A. Koike, H. Ebina, S.O. Sio, and T. Kuno. 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.
- MacNeill, S.A., and P.A. Fantes. 1997. Genetic and physiological analysis of DNA replication in fission yeast. *Methods in enzymology*. 283:440-459.
- Mach, K.E., K.A. Furge, and C.F. Albright. 2000. Loss of Rhb1, a Rheb-related GTPase in fission yeast, causes growth arrest with a terminal phenotype similar to that caused by nitrogen starvation. *Genetics*. 155:611-622.
- Madrid, M., J. Fernandez-Zapata, L. Sanchez-Mir, T. Soto, A. Franco, J. Vicente-Soler, M. Gacto, and J. Cansado. 2013. Role of the fission yeast cell integrity MAPK pathway in response to glucose limitation. *BMC microbiology*. 13:34.
- Madrid, M., R. Jimenez, L. Sanchez-Mir, T. Soto, A. Franco, J. Vicente-Soler, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2015. Multiple layers of regulation influence cell integrity control by the PKC ortholog Pck2 in fission yeast. *Journal of cell science*. 128:266-280.
- Madrid, M., A. Nunez, T. Soto, J. Vicente-Soler, M. Gacto, and J. Cansado. 2007. Stress-activated protein kinase-mediated down-regulation of the cell integrity pathway mitogen-activated protein kinase Pmk1p by protein phosphatases. *Molecular biology of the cell*. 18:4405-4419.
- Madrid, M., T. Soto, H.K. Khong, A. Franco, J. Vicente, P. Perez, M. Gacto, and J. Cansado. 2006. Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*. 281:2033-2043.
- Maeda, T., Y. Watanabe, H. Kunitomo, and M. Yamamoto. 1994. Cloning of the pka1 gene encoding the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Journal of biological chemistry*. 269:9632-9637.
- Magnuson, B., B. Ekim, and D.C. Fingar. 2012. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *The Biochemical journal*. 441:1-21.
- Mahfouz, M.M., S. Kim, A.J. Delauney, and D.P. Verma. 2006. Arabidopsis TARGET OF RAPAMYCIN interacts with RAPTOR, which regulates the activity of S6 kinase in response to osmotic stress signals. *The Plant cell*. 18:477-490.
- Maines, M.D., T. Miralem, N. Lerner-Marmarosh, J. Shen, and P.E. Gibbs. 2007. Human biliverdin reductase, a previously unknown activator of protein kinase C betaII. *The Journal of biological chemistry*. 282:8110-8122.
- Majerus, P.W. 1992. Inositol phosphate biochemistry. *Annual review of biochemistry*. 61:225-250.

- Makowske, M., and O.M. Rosen. 1989. Complete activation of protein kinase C by an antipeptide antibody directed against the pseudosubstrate prototope. *The Journal of biological chemistry*. 264:16155-16159.
- Marshall, C.J. 1995. Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*. 80:179-185.
- Martin, D.E., and M.N. Hall. 2005. The expanding TOR signaling network. *Current opinion in cell biology*. 17:158-166.
- Matsumoto, S., A. Bandyopadhyay, D.J. Kwiatkowski, U. Maitra, and T. Matsumoto. 2002. Role of the Tsc1-Tsc2 complex in signaling and transport across the cell membrane in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics*. 161:1053-1063.
- Matsuo, T., Y. Kubo, Y. Watanabe, and M. Yamamoto. 2003a. Schizosaccharomyces pombe AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO Journal*. 22:3073-3083.
- Matsuo, T., Y. Kubo, Y. Watanabe, and M. Yamamoto. 2003b. Schizosaccharomyces pombe AGC family kinase Gad8p forms a conserved signaling module with TOR and PDK1-like kinases. *The EMBO journal*. 22:3073-3083.
- Matsuo, T., Y. Otsubo, J. Urano, F. Tamanoi, and M. Yamamoto. 2007. Loss of the TOR Kinase Tor2 Mimics Nitrogen Starvation and Activates the Sexual Development Pathway in Fission Yeast. *Molecular and cellular biology*. 27:3154-3164.
- Matsuyama, A., R. Arai, Y. Yashiroda, A. Shirai, A. Kamata, S. Sekido, Y. Kobayashi, A. Hashimoto, M. Hamamoto, Y. Hiraoka, S. Horinouchi, and M. Yoshida. 2006. ORFeome cloning and global analysis of protein localization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature biotechnology*. 24:841-847.
- Mayer, C., J. Zhao, X. Yuan, and I. Grummt. 2004. mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & development*. 18:423-434.
- McManus, E.J., B.J. Collins, P.R. Ashby, A.R. Prescott, V. Murray-Tait, L.J. Armit, J.S. Arthur, and D.R. Alessi. 2004. The in vivo role of PtdIns(3,4,5)P₃ binding to PDK1 PH domain defined by knockin mutation. *Embo j*. 23:2071-2082.
- McMullen, J.R., M.C. Sherwood, O. Tarnavski, L. Zhang, A.L. Dorfman, T. Shioi, and S. Izumo. 2004. Inhibition of mTOR signaling with rapamycin regresses established cardiac hypertrophy induced by pressure overload. *Circulation*. 109:3050-3055.
- Mellor, H., and P.J. Parker. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *The Biochemical journal*. 332 (Pt 2):281-292.
- Merrick, W.C. 2010. Eukaryotic protein synthesis: still a mystery. *The Journal of biological chemistry*. 285:21197-21201.
- Messerschmidt, A., S. Macieira, M. Velarde, M. Badeker, C. Benda, A. Jestel, H. Brandstetter, T. Neufeind, and M. Blaesche. 2005. Crystal structure of the catalytic domain of human atypical protein kinase C- ι reveals interaction mode of phosphorylation site in turn motif. *Journal of molecular biology*. 352:918-931.
- Meyuhas, O. 2000. Translational control of TOP mRNAs. *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor:671-693.
- Millar, J.B., V. Buck, and M.G. Wilkinson. 1995. Pyp1 and Pyp2 PTPases dephosphorylate an osmosensing MAP kinase controlling cell size at division in fission yeast. *Genes & development*. 9:2117-2130.
- Mitchison, J.M. 1970. Chapter 7 Physiological and Cytological Methods for *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods in Cell Biology*. 4:131-165.
- Mitra, P., Y. Zhang, L.E. Rameh, M.P. Ivshina, D. McCollum, J.J. Nunnari, G.M. Hendricks, M.L. Kerr, S.J. Field, L.C. Cantley, and A.H. Ross. 2004. A novel phosphatidylinositol(3,4,5)P₃ pathway in fission yeast. *The Journal of cell biology*. 166:205-211.

- Mochly-Rosen, D., and A.S. Gordon. 1998. Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 12:35-42.
- Mora, A., D. Komander, D.M. van Aalten, and D.R. Alessi. 2004. PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Seminars in cell & developmental biology*. 15:161-170.
- Morigasaki, S., and K. Shiozaki. 2013. Phosphorelay-dependent and -independent regulation of MAPKKK by the Mcs4 response regulator in fission yeast. *Communicative & integrative biology*. 6:e25020.
- Moscat, J., and M.T. Diaz-Meco. 2000. The atypical protein kinase Cs. Functional specificity mediated by specific protein adapters. *EMBO Rep*. 1:399-403.
- Moscat, J., P. Rennert, and M.T. Diaz-Meco. 2006. PKCzeta at the crossroad of NF-kappaB and Jak1/Stat6 signaling pathways. *Cell death and differentiation*. 13:702-711.
- Mukai, H. 2003. The structure and function of PKN, a protein kinase having a catalytic domain homologous to that of PKC. *Journal of biochemistry*. 133:17-27.
- Mulet, J.M., D.E. Martin, R. Loewith, and M.N. Hall. 2006. Mutual antagonism of target of rapamycin and calcineurin signaling. *Journal of Biological Chemistry*. 281:33000-33007.
- Murai, T., Y. Nakase, K. Fukuda, Y. Chikashige, C. Tsutsumi, Y. Hiraoka, and T. Matsumoto. 2009. Distinctive responses to nitrogen starvation in the dominant active mutants of the fission yeast Rheb GTPase. *Genetics*. 183:517-527.
- Murakami, M., T. Ichisaka, M. Maeda, N. Oshiro, K. Hara, F. Edenhofer, H. Kiyama, K. Yonezawa, and S. Yamanaka. 2004. mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells. *Molecular and cellular biology*. 24:6710-6718.
- Mutoh, T., K. Nakano, and I. Mabuchi. 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 to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 10:1189-1202.
- Nagiec, M.J., P.C. McCarter, J.B. Kelley, G. Dixit, T.C. Elston, and H.G. Dohlman. 2015. Signal inhibition by a dynamically regulated pool of monophosphorylated MAPK. *Molecular biology of the cell*. 26:3359-3371.
- Nakamichi, N., H. Yamada, K. Aoyama, R. Ohmiya, H. Aiba, and T. Mizuno. 2002. His-to-Asp phosphorelay circuitry for regulation of sexual development in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 66:2663-2672.
- Nakano, K., R. Arai, and I. Mabuchi. 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 to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 2:679-694.
- Nakase, Y., K. Fukuda, Y. Chikashige, C. Tsutsumi, D. Morita, S. Kawamoto, M. Ohnuki, Y. Hiraoka, and T. Matsumoto. 2006. A defect in protein farnesylation suppresses a loss of *Schizosaccharomyces pombe tsc2+*, a homolog of the human gene predisposing to tuberous sclerosis complex. *Genetics*. 173:569-578.
- Nakashima, A., Y. Otsubo, A. Yamashita, T. Sato, M. Yamamoto, and F. Tamanoi. 2012. Psk1, an AGC kinase family member in fission yeast, is directly phosphorylated and controlled by TORC1 and functions as S6 kinase. *Journal of cell science*. 125:5840-5849.
- Nakashima, A., T. Sato, and F. Tamanoi. 2010. Fission yeast TORC1 regulates phosphorylation of ribosomal S6 proteins in response to nutrients and its activity is inhibited by rapamycin. *Journal of cell science*. 123:777-786.
- Neer, E.J., C.J. Schmidt, R. Nambudripad, and T.F. Smith. 1994. The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*. 371:297-300.
- Newton, A.C. 2001. Protein kinase C: structural and spatial regulation by phosphorylation, cofactors, and macromolecular interactions. *Chemical reviews*. 101:2353-2364.
- Newton, A.C. 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *The Biochemical journal*. 370:361-371.

- Newton, A.C. 2004. Diacylglycerol's affair with protein kinase C turns 25. *Trends in pharmacological sciences*. 25:175-177.
- Newton, A.C. 2009. Lipid activation of protein kinases. *Journal of lipid research*. 50 Suppl:S266-271.
- Newton, A.C., C.E. Antal, and S.F. Steinberg. 2016. Protein kinase C mechanisms that contribute to cardiac remodelling. *Clinical science*. 130:1499-1510.
- Newton, A.C., and J. Brognard. 2017. Reversing the Paradigm: Protein Kinase C as a Tumor Suppressor. *Trends in pharmacological sciences*. 38:438-447.
- Nguyen, A.N., A.D. Ikner, M. Shiozaki, S.M. Warren, and K. Shiozaki. 2002. Cytoplasmic localization of Wis1 MAPKK by nuclear export signal is important for nuclear targeting of Spc1/Sty1 MAPK in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 13:2651-2663.
- Nguyen, A.N., and K. Shiozaki. 1999. Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. *Genes & development*. 13:1653-1663.
- Niederberger, C., and M.E. Schweingruber. 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. *Molecular & general genetics : MGG*. 261:177-183.
- Niles, B.J., H. Mogri, A. Hill, A. Vlahakis, and T. Powers. 2012. Plasma membrane recruitment and activation of the AGC kinase Ypk1 is mediated by target of rapamycin complex 2 (TORC2) and its effector proteins Slm1 and Slm2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 109:1536-1541.
- Niles, B.J., and T. Powers. 2012. Plasma membrane proteins Slm1 and Slm2 mediate activation of the AGC kinase Ypk1 by TORC2 and sphingolipids in *S. cerevisiae*. *Cell cycle*. 11:3745-3749.
- Nunez, A., A. Franco, M. Madrid, T. Soto, J. Vicente, M. Gacto, and J. Cansado. 2009. Role for RACK1 orthologue Cpc2 in the modulation of stress response in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 20:3996-4009.
- Oancea, E., and T. Meyer. 1998. Protein kinase C as a molecular machine for decoding calcium and diacylglycerol signals. *Cell*. 95:307-318.
- Ochotorena, I.L., D. Hirata, K. Kominami, J. Potashkin, F. Sahin, K. Wentz-Hunter, K.L. Gould, K. Sato, Y. Yoshida, L. Vardy, and T. Toda. 2001. Conserved Wat1/Pop3 WD-repeat protein of fission yeast secures genome stability through microtubule integrity and may be involved in mRNA maturation. *Journal of cell science*. 114:2911-2920.
- Odorizzi, G., M. Babst, and S.D. Emr. 2000. Phosphoinositide signaling and the regulation of membrane trafficking in yeast. *Trends Biochem Sci*. 25:229-235.
- Oh, W.J., C.C. Wu, S.J. Kim, V. Facchinetti, L.A. Julien, M. Finlan, P.P. Roux, B. Su, and E. Jacinto. 2010. mTORC2 can associate with ribosomes to promote cotranslational phosphorylation and stability of nascent Akt polypeptide. *EMBO J*. 29:3939-3951.
- Ohmiya, R., C. Kato, H. Yamada, H. Aiba, and T. Mizuno. 1999. A fission yeast gene (prr1(+)) that encodes a response regulator implicated in oxidative stress response. *Journal of biochemistry*. 125:1061-1066.
- Ohno, S., Y. Konno, Y. Akita, A. Yano, and K. Suzuki. 1990. A point mutation at the putative ATP-binding site of protein kinase C alpha abolishes the kinase activity and renders it down-regulation-insensitive. A molecular link between autophosphorylation and down-regulation. *The Journal of biological chemistry*. 265:6296-6300.
- Ono, Y., T. Fujii, K. Igarashi, T. Kuno, C. Tanaka, U. Kikkawa, and Y. Nishizuka. 1989a. Phorbol ester binding to protein kinase C requires a cysteine-rich zinc-finger-like sequence. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:4868-4871.

- Ono, Y., T. Fujii, K. Ogita, U. Kikkawa, K. Igarashi, and Y. Nishizuka. 1989b. Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86:3099-3103.
- Ono, Y., T. Kurokawa, K. Kawahara, O. Nishimura, R. Marumoto, K. Igarashi, Y. Sugino, U. Kikkawa, K. Ogita, and Y. Nishizuka. 1986. Cloning of rat brain protein kinase C complementary DNA. *FEBS letters*. 203:111-115.
- Orr, J.W., and A.C. Newton. 1994. Requirement for negative charge on "activation loop" of protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 269:27715-27718.
- Orr, N., E. Yavin, and D.S. Lester. 1992. Identification of two distinct populations of protein kinase C in rat brain membranes. *Journal of neurochemistry*. 58:461-470.
- Ozaki, K., K. Tanaka, H. Imamura, T. Hihara, T. Kameyama, H. Nonaka, H. Hirano, Y. Matsuura, and Y. Takai. 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., S.S. Ng, H. Ohkura, M. Geymonat, S.G. Sedgwick, and C.J. McInerney. 2008. Regulation of gene expression during M-G1-phase in fission yeast through Plo1p and forkhead transcription factors. *Journal of cell science*. 121:38-47.
- Paravicini, G., M. Cooper, L. Friedli, D.J. Smith, J.L. Carpentier, L.S. Klig, and M.A. Payton. 1992. The osmotic integrity of the yeast cell requires a functional PKC1 gene product. *Molecular and cellular biology*. 12:4896-4905.
- Parekh, D., W. Ziegler, K. Yonezawa, K. Hara, and P.J. Parker. 1999. Mammalian TOR controls one of two kinase pathways acting upon nPKCdelta and nPKCepsilon. *The Journal of biological chemistry*. 274:34758-34764.
- Pascual-Ahuir, A., and M. Proft. 2007. The Sch9 kinase is a chromatin-associated transcriptional activator of osmostress-responsive genes. *EMBO J*. 26:3098-3108.
- Patel, P.H., N. Thapar, L. Guo, M. Martinez, J. Maris, C.L. Gau, J.A. Lengyel, and F. Tamanoi. 2003. Drosophila Rheb GTPase is required for cell cycle progression and cell growth. *Journal of cell science*. 116:3601-3610.
- Paul, A., S. Wilson, C.M. Belham, C.J. Robinson, P.H. Scott, G.W. Gould, and R. Plevin. 1997. Stress-activated protein kinases: activation, regulation and function. *Cellular signalling*. 9:403-410.
- Pearce, L.R., G.R. Alton, D.T. Richter, J.C. Kath, L. Lingardo, J. Chapman, C. Hwang, and D.R. Alessi. 2010. Characterization of PF-4708671, a novel and highly specific inhibitor of p70 ribosomal S6 kinase (S6K1). *The Biochemical journal*. 431:245-255.
- Pearce, L.R., E.M. Sommer, K. Sakamoto, S. Wullschleger, and D.R. Alessi. 2011. Protor-1 is required for efficient mTORC2-mediated activation of SGK1 in the kidney. *The Biochemical journal*. 436:169-179.
- Pears, C.J., G. Kour, C. House, B.E. Kemp, and P.J. Parker. 1990. Mutagenesis of the pseudosubstrate site of protein kinase C leads to activation. *European journal of biochemistry*. 194:89-94.
- Perez, P., and J. Cansado. 2010. Cell integrity signaling and response to stress in fission yeast. *Current protein & peptide science*. 11:680-692.
- Petersen, J. 2009. TOR signalling regulates mitotic commitment through stress-activated MAPK and Polo kinase in response to nutrient stress. *Biochemical Society transactions*. 37:273-277.
- Petersen, J., and P. Nurse. 2007. TOR signalling regulates mitotic commitment through the stress MAP kinase pathway and the Polo and Cdc2 kinases. *Nature cell biology*. 9:1263-1272.
- Peterson, T.R., M. Laplante, C.C. Thoreen, Y. Sancak, S.A. Kang, W.M. Kuehl, N.S. Gray, and D.M. Sabatini. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells and required for their survival. *Cell*. 137:873-886.
- Ponting, C.P., T. Ito, J. Moscat, M.T. Diaz-Meco, F. Inagaki, and H. Sumimoto. 2002. OPR, PC and AID: all in the PB1 family. *Trends Biochem Sci*. 27:10.

- Powers, T., S. Aronova, and B. Niles. 2010. 10 - TORC2 and Sphingolipid Biosynthesis and Signaling: Lessons from Budding Yeast. *In* The Enzymes. Vol. Volume 27. Academic Press. 177-197.
- Pullen, N., P.B. Dennis, M. Andjelkovic, A. Dufner, S.C. Kozma, B.A. Hemmings, and G. Thomas. 1998. Phosphorylation and activation of p70s6k by PDK1. *Science (New York, N.Y.)*. 279:707-710.
- Quest, A.F., J. Bloomenthal, E.S. Bardes, and R.M. Bell. 1992. The regulatory domain of protein kinase C coordinates four atoms of zinc. *The Journal of biological chemistry*. 267:10193-10197.
- Quinn, J., V.J. Findlay, K. Dawson, J.B. Millar, N. Jones, B.A. Morgan, and W.M. Toone. 2002. Distinct regulatory proteins control the graded transcriptional response to increasing H₂O₂ levels in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular biology of the cell*. 13:805-816.
- Raben, D.M., M.B. Jarpe, and K.L. Leach. 1994. Nuclear lipid metabolism in NEST: Nuclear Envelope Signal Transduction. *The Journal of membrane biology*. 142:1-7.
- Rahman, K. 2007. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. *Clinical interventions in aging*. 2:219-236.
- Rajakyla, E.K., and M.K. Vartiainen. 2014. Rho, nuclear actin, and actin-binding proteins in the regulation of transcription and gene expression. *Small GTPases*. 5:e27539.
- Reinders, A., N. Burckert, T. Boller, A. Wiemken, and C. De Virgilio. 1998. *Saccharomyces cerevisiae* cAMP-dependent protein kinase controls entry into stationary phase through the Rim15p protein kinase. *Genes & development*. 12:2943-2955.
- Reinke, A., S. Anderson, J.M. McCaffery, J. Yates, 3rd, S. Aronova, S. Chu, S. Fairclough, C. Iverson, K.P. Wedaman, and T. Powers. 2004. TOR complex 1 includes a novel component, Tco89p (YPL180w), and cooperates with Ssd1p to maintain cellular integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry*. 279:14752-14762.
- Reiter, A., R. Steinbauer, A. Philippi, J. Gerber, H. Tschochner, P. Milkereit, and J. Griesenbeck. 2011. Reduction in ribosomal protein synthesis is sufficient to explain major effects on ribosome production after short-term TOR inactivation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 31:803-817.
- Reyland, M.E. 2009. Protein kinase C isoforms: Multi-functional regulators of cell life and death. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*. 14:2386-2399.
- Ridley, A.J. 2015. Rho GTPase signalling in cell migration. *Current opinion in cell biology*. 36:103-112.
- Robbins, D.J., E. Zhen, H. Owaki, C.A. Vanderbilt, D. Ebert, T.D. Geppert, and M.H. Cobb. 1993. Regulation and properties of extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 in vitro. *The Journal of biological chemistry*. 268:5097-5106.
- Roberg, K.J., S. Bickel, N. Rowley, and C.A. Kaiser. 1997. Control of amino acid permease sorting in the late secretory pathway of *Saccharomyces cerevisiae* by SEC13, LST4, LST7 and LST8. *Genetics*. 147:1569-1584.
- Roccio, M., J.L. Bos, and F.J. Zwartkruis. 2006. Regulation of the small GTPase Rheb by amino acids. *Oncogene*. 25:657-664.
- Rodriguez-Gabriel, M.A., and P. Russell. 2005. Distinct signaling pathways respond to arsenite and reactive oxygen species in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic cell*. 4:1396-1402.
- Roelants, F.M., D.K. Breslow, A. Muir, J.S. Weissman, and J. Thorner. 2011. Protein kinase Ypk1 phosphorylates regulatory proteins Orm1 and Orm2 to control sphingolipid homeostasis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 108:19222-19227.

- Roelants, F.M., P.D. Torrance, N. Bezman, and J. Thorner. 2002. Pkh1 and Pkh2 differentially phosphorylate and activate Ypk1 and Ykr2 and define protein kinase modules required for maintenance of cell wall integrity. *Molecular biology of the cell*. 13:3005-3028.
- Roelants, F.M., P.D. Torrance, and J. Thorner. 2004. Differential roles of PDK1- and PDK2-phosphorylation sites in the yeast AGC kinases Ypk1, Pkc1 and Sch9. *Microbiology*. 150:3289-3304.
- Roemer, T., G. Paravicini, M.A. Payton, and H. Bussey. 1994. Characterization of the yeast (1->6)-beta-glucan biosynthetic components, Kre6p and Skn1p, and genetic interactions between the PKC1 pathway and extracellular matrix assembly. *The Journal of cell biology*. 127:567-579.
- Ron, D., C.H. Chen, J. Caldwell, L. Jamieson, E. Orr, and D. Mochly-Rosen. 1994. Cloning of an intracellular receptor for protein kinase C: a homolog of the beta subunit of G proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91:839-843.
- Ron, D., and M.G. Kazanietz. 1999. New insights into the regulation of protein kinase C and novel phorbol ester receptors. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*. 13:1658-1676.
- Ron, D., J. Luo, and D. Mochly-Rosen. 1995. C2 region-derived peptides inhibit translocation and function of beta protein kinase C in vivo. *The Journal of biological chemistry*. 270:24180-24187.
- Rossman, K.L., C.J. Der, and J. Sondek. 2005. GEF means go: turning on RHO GTPases with guanine nucleotide-exchange factors. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:167-180.
- Roth, M.G. 2004. Phosphoinositides in Constitutive Membrane Traffic. *Physiological Reviews*. 84:699-730.
- Roux, A.E., P. Chartrand, G. Ferbeyre, and L.A. Rokeach. 2010. Fission yeast and other yeasts as emergent models to unravel cellular aging in eukaryotes. *The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences*. 65:1-8.
- Sabatini, D.M., H. Erdjument-Bromage, M. Lui, P. Tempst, and S.H. Snyder. 1994. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 78:35-43.
- Samejima, I., S. Mackie, and P.A. Fantes. 1997. Multiple modes of activation of the stress-responsive MAP kinase pathway in fission yeast. *Embo j*. 16:6162-6170.
- Sampaio-Marques, B., C. Felgueiras, A. Silva, F. Rodrigues, and P. Ludovico. 2011. Yeast chronological lifespan and proteotoxic stress: is autophagy good or bad? *Biochemical Society transactions*. 39:1466-1470.
- Sancak, Y., L. Bar-Peled, R. Zoncu, A.L. Markhard, S. Nada, and D.M. Sabatini. 2010. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell*. 141:290-303.
- Sancak, Y., T.R. Peterson, Y.D. Shaul, R.A. Lindquist, C.C. Thoreen, L. Bar-Peled, and D.M. Sabatini. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science (New York, N.Y.)*. 320:1496-1501.
- Sancak, Y., C.C. Thoreen, T.R. Peterson, R.A. Lindquist, S.A. Kang, E. Spooner, S.A. Carr, and D.M. Sabatini. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. *Molecular cell*. 25:903-915.
- Sanchez-Bautista, S., A. Kazaks, M. Beaulande, A. Torrecillas, S. Corbalan-Garcia, and J.C. Gomez-Fernandez. 2006. Structural study of the catalytic domain of PKCzeta using infrared spectroscopy and two-dimensional infrared correlation spectroscopy. *The FEBS journal*. 273:3273-3286.
- Sanchez-Mir, L., A. Franco, M. Madrid, J. Vicente-Soler, M.A. Villar-Tajadura, T. Soto, P. Perez, M. Gacto, and J. Cansado. 2012. Biological significance of nuclear localization of mitogen-activated protein kinase Pmk1 in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*. 287:26038-26051.

- Sanchez-Mir, L., A. Franco, R. Martin-Garcia, M. Madrid, J. Vicente-Soler, T. Soto, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2014a. Rho2 palmitoylation is required for plasma membrane localization and proper signaling to the fission yeast cell integrity mitogen-activated protein kinase pathway. *Molecular and cellular biology*. 34:2745-2759.
- Sanchez-Mir, L., T. Soto, A. Franco, M. Madrid, R.A. Viana, J. Vicente, M. Gacto, P. Perez, and J. Cansado. 2014b. Rho1 GTPase and PKC ortholog Pck1 are upstream activators of the cell integrity MAPK pathway in fission yeast. *PLoS one*. 9:e88020.
- Santhanam, A., A. Hartley, K. Duvel, J.R. Broach, and S. Garrett. 2004. PP2A phosphatase activity is required for stress and Tor kinase regulation of yeast stress response factor Msn2p. *Eukaryotic cell*. 3:1261-1271.
- Santos, J.L., and K. Shiozaki. 2001. Fungal histidine kinases. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment*. 2001:re1.
- Sarbassov, D.D., S.M. Ali, D.H. Kim, D.A. Guertin, R.R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst, and D.M. Sabatini. 2004. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Current biology : CB*. 14:1296-1302.
- Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science (New York, N.Y.)*. 307:1098-1101.
- Satoh, R., T. Morita, H. Takada, A. Kita, S. Ishiwata, A. Doi, K. Hagihara, A. Taga, Y. Matsumura, H. Tohda, and R. Sugiura. 2009. Role of the RNA-binding protein Nrd1 and Pmk1 mitogen-activated protein kinase in the regulation of myosin mRNA stability in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 20:2473-2485.
- Sayers, L.G., S. Katayama, K. Nakano, H. Mellor, I. Mabuchi, T. Toda, and P.J. Parker. 2000. Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*. 5:17-27.
- Schaeffer, H.J., and M.J. Weber. 1999. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology*. 19:2435-2444.
- Schmelzle, T., S.B. Helliwell, and M.N. Hall. 2002. Yeast protein kinases and the RHO1 exchange factor TUS1 are novel components of the cell integrity pathway in yeast. *Molecular and cellular biology*. 22:1329-1339.
- Schmidt, A., M. Bickle, T. Beck, and M.N. Hall. 1997. The yeast phosphatidylinositol kinase homolog TOR2 activates RHO1 and RHO2 via the exchange factor ROM2. *Cell*. 88:531-542.
- Schmidt, A., J. Kunz, and M.N. Hall. 1996. TOR2 is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93:13780-13785.
- Schonbrun, M., M. Kolesnikov, M. Kupiec, and R. Weisman. 2013. TORC2 is required to maintain genome stability during S phase in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*. 288:19649-19660.
- Schonbrun, M., D. Laor, L. Lopez-Maury, J. Bahler, M. Kupiec, and R. Weisman. 2009. TOR complex 2 controls gene silencing, telomere length maintenance, and survival under DNA-damaging conditions. *Molecular and cellular biology*. 29:4584-4594.
- Schroder, W.A., M. Buck, N. Cloonan, J.F. Hancock, A. Suhrbier, T. Sculley, and G. Bushell. 2007. Human Sin1 contains Ras-binding and pleckstrin homology domains and suppresses Ras signalling. *Cellular signalling*. 19:1279-1289.
- Sengar, A.S., N.A. Markley, N.J. Marini, and D. Young. 1997. Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Molecular and cellular biology*. 17:3508-3519.
- Shamji, A.F., F.G. Kuruville, and S.L. Schreiber. 2000. Partitioning the transcriptional program induced by rapamycin among the effectors of the Tor proteins. *Current biology : CB*. 10:1574-1581.

- Shibata, H., H. Mukai, Y. Inagaki, Y. Homma, K. Kimura, K. Kaibuchi, S. Narumiya, and Y. Ono. 1996. Characterization of the interaction between RhoA and the amino-terminal region of PKN. *FEBS letters*. 385:221-224.
- Shieh, J.C., M.G. Wilkinson, V. Buck, B.A. Morgan, K. Makino, and J.B. Millar. 1997. The Mcs4 response regulator coordinately controls the stress-activated Wak1-Wis1-Sty1 MAP kinase pathway and fission yeast cell cycle. *Genes & development*. 11:1008-1022.
- Shinozaki-Yabana, S., Y. Watanabe, and M. Yamamoto. 2000. Novel WD-repeat protein Mip1p facilitates function of the meiotic regulator Mei2p in fission yeast. *Molecular and cellular biology*. 20:1234-1242.
- Shiota, C., J.T. Woo, J. Lindner, K.D. Shelton, and M.A. Magnuson. 2006. Multiallelic disruption of the rictor gene in mice reveals that mTOR complex 2 is essential for fetal growth and viability. *Developmental cell*. 11:583-589.
- Shiozaki, K., and P. Russell. 1995a. Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature*. 378:739-743.
- Shiozaki, K., and P. Russell. 1995b. Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *Embo j.* 14:492-502.
- Shiozaki, K., and P. Russell. 1996. Conjugation, meiosis, and the osmotic stress response are regulated by Spc1 kinase through Atf1 transcription factor in fission yeast. *Genes & development*. 10:2276-2288.
- Shiozaki, K., M. Shiozaki, and P. Russell. 1998. Heat stress activates fission yeast Spc1/Styl MAPK by a MEKK-independent mechanism. *Molecular biology of the cell*. 9:1339-1349.
- Shor, B., J. Wu, Q. Shakey, L. Toral-Barza, C. Shi, M. Follettie, and K. Yu. 2010. Requirement of the mTOR kinase for the regulation of Maf1 phosphorylation and control of RNA polymerase III-dependent transcription in cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 285:15380-15392.
- Shull, A.Y., S.K. Noonepalle, F.T. Awan, J. Liu, L. Pei, R.J. Bollag, H. Salman, Z. Ding, and H. Shi. 2015. RPPA-based protein profiling reveals eIF4G overexpression and 4E-BP1 serine 65 phosphorylation as molecular events that correspond with a pro-survival phenotype in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 6:14632-14645.
- Sim, A.T., and J.D. Scott. 1999. Targeting of PKA, PKC and protein phosphatases to cellular microdomains. *Cell calcium*. 26:209-217.
- Simonsen, A., A.E. Wurmser, S.D. Emr, and H. Stenmark. 2001. The role of phosphoinositides in membrane transport. *Current opinion in cell biology*. 13:485-492.
- Sipiczki, M. 2000. Where does fission yeast sit on the tree of life? *Genome biology*. 1:Reviews1011.
- Smets, B., R. Ghillebert, P. De Snijder, M. Binda, E. Swinnen, C. De Virgilio, and J. Winderickx. 2010. Life in the midst of scarcity: adaptations to nutrient availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics*. 56:1-32.
- Smith, E.M., S.G. Finn, A.R. Tee, G.J. Browne, and C.G. Proud. 2005. The tuberous sclerosis protein TSC2 is not required for the regulation of the mammalian target of rapamycin by amino acids and certain cellular stresses. *The Journal of biological chemistry*. 280:18717-18727.
- Soderling, T.R. 1990. Protein kinases. Regulation by autoinhibitory domains. *The Journal of biological chemistry*. 265:1823-1826.
- Songyang, Z., K.P. Lu, Y.T. Kwon, L.H. Tsai, O. Filhol, C. Cochet, D.A. Brickey, T.R. Soderling, C. Bartleson, D.J. Graves, A.J. DeMaggio, M.F. Hoekstra, J. Blenis, T. Hunter, and L.C. Cantley. 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. *Molecular and cellular biology*. 16:6486-6493.

- Soto, T., F.F. Beltran, V. Paredes, M. Madrid, J.B. Millar, J. Vicente-Soler, J. Cansado, and M. Gacto. 2002. Cold induces stress-activated protein kinase-mediated response in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *European journal of biochemistry*. 269:5056-5065.
- Soto, T., A. Nunez, M. Madrid, J. Vicente, M. Gacto, and J. Cansado. 2007. Transduction of centrifugation-induced gravity forces through mitogen-activated protein kinase pathways in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Microbiology*. 153:1519-1529.
- Soulard, A., A. Cremonesi, S. Moes, F. Schutz, P. Jenö, and M.N. Hall. 2010. The rapamycin-sensitive phosphoproteome reveals that TOR controls protein kinase A toward some but not all substrates. *Molecular biology of the cell*. 21:3475-3486.
- Srivastava, J., K.J. Procyk, X. Iturrioz, and P.J. Parker. 2002. Phosphorylation is required for PMA- and cell-cycle-induced degradation of protein kinase Cdelta. *The Biochemical journal*. 368:349-355.
- Stahelin, R.V. 2014. Ready, set, go! How protein kinase C manages dynamic signaling. *Chemistry & biology*. 21:433-434.
- Stan, R., M.M. McLaughlin, R. Cafferkey, R.K. Johnson, M. Rosenberg, and G.P. Livi. 1994. Interaction between FKBP12-rapamycin and TOR involves a conserved serine residue. *The Journal of biological chemistry*. 269:32027-32030.
- Stebbins, E.G., and D. Mochly-Rosen. 2001. Binding specificity for RACK1 resides in the V5 region of beta II protein kinase C. *The Journal of biological chemistry*. 276:29644-29650.
- Steinberg, S.F. 2008. Structural basis of protein kinase C isoform function. *Physiol Rev*. 88:1341-1378.
- Sugiura, R., A. Kita, Y. Shimizu, H. Shuntoh, S.O. Sio, and T. Kuno. 2003. Feedback regulation of MAPK signalling by an RNA-binding protein. *Nature*. 424:961-965.
- Sugiura, R., T. Toda, S. Dhut, H. Shuntoh, and T. Kuno. 1999. The MAPK kinase Pek1 acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature*. 399:479-483.
- Sugiura, R., T. Toda, H. Shuntoh, M. Yanagida, and T. Kuno. 1998. pmp1+, a suppressor of calcineurin deficiency, encodes a novel MAP kinase phosphatase in fission yeast. *Embo j*. 17:140-148.
- Sun, Y., R. Taniguchi, D. Tanoue, T. Yamaji, H. Takematsu, K. Mori, T. Fujita, T. Kawasaki, and Y. Kozutsumi. 2000. Sli2 (Ypk1), a homologue of mammalian protein kinase SGK, is a downstream kinase in the sphingolipid-mediated signaling pathway of yeast. *Molecular and cellular biology*. 20:4411-4419.
- Sutter, B.M., X. Wu, S. Laxman, and B.P. Tu. 2013. Methionine inhibits autophagy and promotes growth by inducing the SAM-responsive methylation of PP2A. *Cell*. 154:403-415.
- Suzuki, A., K. Akimoto, and S. Ohno. 2003. Protein kinase C lambda/iota (PKClambda/iota): a PKC isotype essential for the development of multicellular organisms. *Journal of biochemistry*. 133:9-16.
- Tabancay, A.P., Jr., C.L. Gau, I.M. Machado, E.J. Uhlmann, D.H. Gutmann, L. Guo, and F. Tamanoi. 2003. Identification of dominant negative mutants of Rheb GTPase and their use to implicate the involvement of human Rheb in the activation of p70S6K. *The Journal of biological chemistry*. 278:39921-39930.
- Tabuchi, M., A. Audhya, A.B. Parsons, C. Boone, and S.D. Emr. 2006. The phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and TORC2 binding proteins Slm1 and Slm2 function in sphingolipid regulation. *Molecular and cellular biology*. 26:5861-5875.
- Takada, H., A. Nishida, M. Domae, A. Kita, Y. Yamano, A. Uchida, S. Ishiwata, Y. Fang, X. Zhou, T. Masuko, M. Kinoshita, K. Kakehi, and R. Sugiura. 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. *Molecular biology of the cell*. 21:674-685.
- Takada, H., M. Nishimura, Y. Asayama, Y. Mannse, S. Ishiwata, A. Kita, A. Doi, A. Nishida, N. Kai, S. Moriuchi, H. Tohda, Y. Giga-Hama, T. Kuno, and R. Sugiura. 2007. Atf1 is a target of the mitogen-activated protein kinase Pmk1 and regulates cell integrity in fission yeast. *Molecular biology of the cell*. 18:4794-4802.
- Takenawa, T., and T. Itoh. 2001. Phosphoinositides, key molecules for regulation of actin cytoskeletal organization and membrane traffic from the plasma membrane. *Biochimica et biophysica acta*. 1533:190-206.
- Talarek, N., E. Cameroni, M. Jaquenoud, X. Luo, S. Bontron, S. Lippman, G. Devgan, M. Snyder, J.R. Broach, and C. De Virgilio. 2010. Initiation of the TORC1-regulated G0 program requires Igo1/2, which license specific mRNAs to evade degradation via the 5'-3' mRNA decay pathway. *Molecular cell*. 38:345-355.
- Tang, H., E. Hornstein, M. Stolovich, G. Levy, M. Livingstone, D. Templeton, J. Avruch, and O. Meyuhas. 2001. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Molecular and cellular biology*. 21:8671-8683.
- Tang, Y., and M. McLeod. 2004. In vivo activation of protein kinase A in *Schizosaccharomyces pombe* requires threonine phosphorylation at its activation loop and is dependent on PDK1. *Genetics*. 168:1843-1853.
- Tatebe, H., S. Morigasaki, S. Murayama, C.T. Zeng, and K. Shiozaki. 2010. Rab-family GTPase regulates TOR complex 2 signaling in fission yeast. *Current biology : CB*. 20:1975-1982.
- Taylor, S.S., J.A. Buechler, and W. Yonemoto. 1990. cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes. *Annual review of biochemistry*. 59:971-1005.
- Taylor, S.S., and E. Radzio-Andzelm. 1994. Three protein kinase structures define a common motif. *Structure*. 2:345-355.
- Tee, A.R., J. Blenis, and C.G. Proud. 2005. Analysis of mTOR signaling by the small G-proteins, Rheb and RhebL1. *FEBS letters*. 579:4763-4768.
- Toda, T., S. Dhut, G. Superti-Furga, Y. Gotoh, E. Nishida, R. Sugiura, and T. Kuno. 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. *Molecular and cellular biology*. 16:6752-6764.
- Toda, T., M. Shimanuki, and M. Yanagida. 1993. Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *Embo j*. 12:1987-1995.
- Toker, A. 2008. mTOR and Akt signaling in cancer: SGK cycles in. *Molecular cell*. 31:6-8.
- Toker, A., and A.C. Newton. 2000. Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell*. 103:185-188.
- Treisman, R. 1996. Regulation of transcription by MAP kinase cascades. *Current opinion in cell biology*. 8:205-215.
- Urban, J., A. Soulard, A. Huber, S. Lippman, D. Mukhopadhyay, O. Deloche, V. Wanke, D. Anrather, G. Ammerer, H. Riezman, J.R. Broach, C. De Virgilio, M.N. Hall, and R. Loewith. 2007. Sch9 is a major target of TORC1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*. 26:663-674.
- Valbuena, N., A.E. Rozalén, and S. Moreno. 2012. Fission yeast TORC1 prevents eIF2 α phosphorylation in response to nitrogen and amino acids via Gcn2 kinase. *Journal of cell science*. 125:5955-5959.
- van Zyl, W., W. Huang, A.A. Sneddon, M. Stark, S. Camier, M. Werner, C. Marck, A. Sentenac, and J.R. Broach. 1992. Inactivation of the protein phosphatase 2A regulatory subunit A results in morphological and transcriptional defects in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*. 12:4946-4959.

- Vannini, A., R. Ringel, A.G. Kusser, O. Berninghausen, G.A. Kassavetis, and P. Cramer. 2010. Molecular basis of RNA polymerase III transcription repression by Maf1. *Cell*. 143:59-70.
- Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, E.V. Koonin, and R.J. Deshaies. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science (New York, N.Y.)*. 298:611-615.
- Verna, J., A. Lodder, K. Lee, A. Vagts, and R. Ballester. 1997. A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94:13804-13809.
- Viana, R.A., M. Pinar, T. Soto, P.M. Coll, J. Cansado, and P. Perez. 2013. Negative functional interaction between cell integrity MAPK pathway and Rho1 GTPase in fission yeast. *Genetics*. 195:421-432.
- Villar-Tajadura, M.A., P.M. Coll, M. Madrid, J. Cansado, B. Santos, and P. Perez. 2008a. Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Molecular microbiology*. 70:867-881.
- Villar-Tajadura, M.A., P.M. Coll, M. Madrid, J. Cansado, B. Santos, and P. Pérez. 2008b. Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Molecular microbiology*. 70:867-881.
- Waliullah, T.M., A.M.S.T. Yeasmin, A. Kaneko, N. Koike, M. Terasawa, T. Totsuka, and T. Ushimaru. 2017. Rim15 and Sch9 kinases are involved in induction of autophagic degradation of ribosomes in budding yeast. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 81:307-310.
- Wall, N.R., R.M. Mohammad, K.B. Reddy, and A.M. Al-Katib. 2000. Bryostatins induce ubiquitination and proteasome degradation of Bcl-2 in the human acute lymphoblastic leukemia cell line, Reh. *International journal of molecular medicine*. 5:165-171.
- Wang, X., A. Beugnet, M. Murakami, S. Yamanaka, and C.G. Proud. 2005. Distinct signaling events downstream of mTOR cooperate to mediate the effects of amino acids and insulin on initiation factor 4E-binding proteins. *Molecular and cellular biology*. 25:2558-2572.
- Wang, X., W. Li, M. Williams, N. Terada, D.R. Alessi, and C.G. Proud. 2001. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *Embo j*. 20:4370-4379.
- Wang, Y., Y. Wang, H. Zhang, Y. Gao, C. Huang, A. Zhou, Y. Zhou, and Y. Li. 2016. Sequential posttranslational modifications regulate PKC degradation. *Molecular biology of the cell*. 27:410-420.
- Wanke, V., E. Cameroni, A. Uotila, M. Piccolis, J. Urban, R. Loewith, and C. De Virgilio. 2008. Caffeine extends yeast lifespan by targeting TORC1. *Molecular microbiology*. 69:277-285.
- Warbrick, E., and P.A. Fantes. 1991. The wis1 protein kinase is a dosage-dependent regulator of mitosis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Embo j*. 10:4291-4299.
- Watanabe, M., C.Y. Chen, and D.E. Levin. 1994. *Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC. *The Journal of biological chemistry*. 269:16829-16836.
- Wedaman, K.P., A. Reinke, S. Anderson, J. Yates, 3rd, J.M. McCaffery, and T. Powers. 2003. Tor kinases are in distinct membrane-associated protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular biology of the cell*. 14:1204-1220.
- Weisman, R., and M. Choder. 2001. The Fission Yeast TOR Homolog, tor1+, Is Required for the Response to Starvation and Other Stresses via a Conserved Serine. *Journal of Biological Chemistry*. 276:7027-7032.
- Weisman, R., M. Choder, and Y. Koltin. 1997. Rapamycin specifically interferes with the developmental response of fission yeast to starvation. *Journal of bacteriology*. 179:6325-6334.

- Weisman, R., I. Roitburg, T. Nahari, and M. Kupiec. 2005. Regulation of leucine uptake by tor1+ in *Schizosaccharomyces pombe* is sensitive to rapamycin. *Genetics*. 169:539-550.
- Weston, L., A.S. Coutts, and N.B. La Thangue. 2012. Actin nucleators in the nucleus: an emerging theme. *Journal of cell science*. 125:3519-3527.
- Wick, M.J., F.J. Ramos, H. Chen, M.J. Quon, L.Q. Dong, and F. Liu. 2003. Mouse 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 undergoes dimerization and transphosphorylation in the activation loop. *The Journal of biological chemistry*. 278:42913-42919.
- Wilkinson, M.G., M. Samuels, T. Takeda, W.M. Toone, J.C. Shieh, T. Toda, J.B. Millar, and N. Jones. 1996. The Atf1 transcription factor is a target for the Sty1 stress-activated MAP kinase pathway in fission yeast. *Genes & development*. 10:2289-2301.
- Woo, S.Y., D.H. Kim, C.B. Jun, Y.M. Kim, E.V. Haar, S.I. Lee, J.W. Hegg, S. Bandhakavi, T.J. Griffin, and D.H. Kim. 2007. PRR5, a novel component of mTOR complex 2, regulates platelet-derived growth factor receptor beta expression and signaling. *The Journal of biological chemistry*. 282:25604-25612.
- Wood, V., and J. Bahler. 2002. Website review: how to get the best from fission yeast genome data. *Comparative and functional genomics*. 3:282-288.
- Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 124:471-484.
- Wullschleger, S., R. Loewith, W. Oppliger, and M.N. Hall. 2005. Molecular organization of target of rapamycin complex 2. *The Journal of biological chemistry*. 280:30697-30704.
- Xu, Z.B., D. Chaudhary, S. Olland, S. Wolfrom, R. Czerwinski, K. Malakian, L. Lin, M.L. Stahl, D. Joseph-McCarthy, C. Benander, L. Fitz, R. Greco, W.S. Somers, and L. Mosyak. 2004. Catalytic domain crystal structure of protein kinase C-theta (PKCtheta). *The Journal of biological chemistry*. 279:50401-50409.
- Yamamoto, M., Y. Imai, and Y. Watanabe. 1997. 12 Mating and Sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*.
- Yan, G., Y. Lai, and Y. Jiang. 2012. The TOR complex 1 is a direct target of Rho1 GTPase. *Molecular cell*. 45:743-753.
- Yan, G., X. Shen, and Y. Jiang. 2006. Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J*. 25:3546-3555.
- Yang, C., and M.G. Kazanietz. 2003. Divergence and complexities in DAG signaling: looking beyond PKC. *Trends in pharmacological sciences*. 24:602-608.
- Yang, J., P. Cron, V.M. Good, V. Thompson, B.A. Hemmings, and D. Barford. 2002a. Crystal structure of an activated Akt/Protein Kinase B ternary complex with GSK3-peptide and AMP-PNP. *Nature Structural Biology*. 9:940-944.
- Yang, J., P. Cron, V. Thompson, V.M. Good, D. Hess, B.A. Hemmings, and D. Barford. 2002b. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Molecular cell*. 9:1227-1240.
- Yang, W., A.P. Tabancay, Jr., J. Urano, and F. Tamanoi. 2001. Failure to farnesylate Rheb protein contributes to the enrichment of G0/G1 phase cells in the *Schizosaccharomyces pombe* farnesyltransferase mutant. *Molecular microbiology*. 41:1339-1347.
- Yin, H.L., and P.A. Janmey. 2003. Phosphoinositide regulation of the actin cytoskeleton. *Annual review of physiology*. 65:761-789.
- Yip, C.K., K. Murata, T. Walz, D.M. Sabatini, and S.A. Kang. 2010. Structure of the human mTOR complex I and its implications for rapamycin inhibition. *Molecular cell*. 38:768-774.
- Yoshida, K. 2007. PKCdelta signaling: mechanisms of DNA damage response and apoptosis. *Cellular signalling*. 19:892-901.
- Yoshinaga, C., H. Mukai, M. Toshimori, M. Miyamoto, and Y. Ono. 1999. Mutational analysis of the regulatory mechanism of PKN: the regulatory region of PKN contains an

- arachidonic acid-sensitive autoinhibitory domain. *Journal of biochemistry*. 126:475-484.
- Young, S., P.J. Parker, A. Ullrich, and S. Stabel. 1987. Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. *The Biochemical journal*. 244:775-779.
- Zaitsevskaya-Carter, T., and J.A. Cooper. 1997. Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S.pombe*. *Embo j*. 16:1318-1331.
- Zhang, T., M.P. Peli-Gulli, H. Yang, C. De Virgilio, and J. Ding. 2012. Ego3 functions as a homodimer to mediate the interaction between Gtr1-Gtr2 and Ego1 in the ego complex to activate TORC1. *Structure*. 20:2151-2160.
- Zhang, Y., R. Sugiura, Y. Lu, M. Asami, T. Maeda, T. Itoh, T. Takenawa, H. Shuntoh, and T. Kuno. 2000. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase Its3 and calcineurin Ppb1 coordinately regulate cytokinesis in fission yeast. *The Journal of biological chemistry*. 275:35600-35606.
- Zhao, Y., G. Boguslawski, R.S. Zitomer, and A.A. DePaoli-Roach. 1997. *Saccharomyces cerevisiae* homologs of mammalian B and B' subunits of protein phosphatase 2A direct the enzyme to distinct cellular functions. *The Journal of biological chemistry*. 272:8256-8262.
- Zheng, X.F., D. Florentino, J. Chen, G.R. Crabtree, and S.L. Schreiber. 1995. TOR kinase domains are required for two distinct functions, only one of which is inhibited by rapamycin. *Cell*. 82:121-130.
- Zhou, B., and Z.Y. Zhang. 2002. The activity of the extracellular signal-regulated kinase 2 is regulated by differential phosphorylation in the activation loop. *The Journal of biological chemistry*. 277:13889-13899.
- Zinzalla, V., D. Stracka, W. Oppliger, and M.N. Hall. 2011. Activation of mTORC2 by association with the ribosome. *Cell*. 144:757-768.
- Zou, J., L. Zhou, X.X. Du, Y. Ji, J. Xu, J. Tian, W. Jiang, Y. Zou, S. Yu, L. Gan, M. Luo, Q. Yang, Y. Cui, W. Yang, X. Xia, M. Chen, X. Zhao, Y. Shen, P.Y. Chen, P.F. Worley, and B. Xiao. 2011. Rheb1 is required for mTORC1 and myelination in postnatal brain development. *Developmental cell*. 20:97-108.

3. 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 las rutas de respuesta a estrés (SAPK) y de integridad celular (CIP) cuyos elementos centrales son la MAP quinasa Sty1 y Pmk1, respectivamente, y su actividad es fundamental para la regulación de la morfogénesis, el ciclo celular y la respuesta frente a situaciones de estrés.

Las proteínas quinasas C (PKCs) juegan un papel fundamental durante la regulación de numerosos procesos fisiológicos, ya que modulan múltiples vías de señalización celular en los organismos eucariotas. El estudio de la función de distintas isoformas de PKC es por ello enormemente relevante, ya que alteraciones en su actividad catalítica han sido implicadas en el desarrollo de algunas patologías en humanos como el cáncer o Alzheimer. *Schizosaccharomyces pombe* posee dos ortólogos de PKC no esenciales denominados Pck1 y Pck2. Ambas quinasas comparten una importante homología en sus secuencias de aminoácidos, siendo esta particularmente significativa a nivel del dominio catalítico situado en su extremo carboxilo terminal. De hecho, tanto el bucle de activación como los motivos de giro e hidrofóbico presentes en sus respectivos dominios de activación están altamente conservados en relación a las PKCs de células superiores. Previamente nuestro grupo de investigación había demostrado que el residuo conservado de treonina-842 presente en el bucle de activación (AL) de Pck2 es fosforilado *in vivo* por Ksg1, el ortólogo a PDK-1 en la levadura con fisión. De manera análoga, Pck1 posee un residuo de treonina equivalente en posición 823 del AL que podría ser también fosforilado por Ksg1. Además, tanto Pck1 como Pck2 poseen un dominio pseudosustrato autoinhibitorio conservado que hipotéticamente mantendría al enzima en una conformación inactiva al bloquear estéricamente su centro activo. Considerando su fuerte similitud estructural y el papel redundante como activadores de la ruta CIP, parecería lógico pensar por tanto que los mecanismos que regulan la activación catalítica, estabilidad y función de Pck1 y Pck2 son idénticos en ambas quinasas.

Las rutas TOR desempeñan un papel clave en el desarrollo y el envejecimiento y ha sido implicado en trastornos como el cáncer, las enfermedades cardiovasculares, la obesidad y la diabetes. Nuestro grupo de investigación ha propuesto un modelo en el que el complejo TORC2 regularía positivamente la traducción de Pck2 y la consiguiente activación de la ruta CIP en respuesta a distintos estímulos ambientales como el ayuno de glucosa o el daño en la pared celular. La Rab GTPasa Ryl1

es responsable en *S. pombe* de la activación del complejo TORC2 en respuesta al ayuno de glucosa, mientras que la AGC quinasa Gad8 actúa como principal efector aguas abajo del complejo. Sin embargo, se desconoce el posible papel de ambos elementos en la regulación de la actividad de la ruta en estas condiciones. Además, recientemente se ha descrito que Pmk1, la MAP quinasa de la ruta CIP, promueve la inhibición de la señalización dependiente de TORC2-Gad8 durante la respuesta a estrés, lo que sugiere la existencia de un mecanismo regulatorio de retroalimentación negativa entre ambas rutas de señalización que modula la respuesta celular frente al estrés de una manera coordinada.

Finalmente, una característica única de las MAP quinasas consiste en que su activación por la MAP quinasa quinasa implica la fosforilación dual en residuos de treonina y tirosina del bucle de activación T-X-Y. De hecho, multitud de estudios realizados con distintos organismos apoyan la idea de que la fosforilación dual de las MAP quinasas es un requisito indispensable para garantizar su actividad y funcionalidad biológica. Sin embargo, algunos trabajos han planteado la posibilidad de que las formas monofosforiladas en treonina o tirosina de las MAP quinasas también posean actividad biológica *in vivo*. Dicha posibilidad se vería apoyada porque, en primer lugar, la fosforilación dual de las MAPKs es un proceso secuencial, y, en segundo, por la presencia de fosfatasas que desfosforilan específicamente a las MAPKs en residuos de fosfo-treonina, fosfo-tirosina, o ambos. La existencia de fosfatasas fosfo-específicas sugeriría por tanto que las MAPK monofosforiladas son activas desde el punto de vista biológico. Si las formas monofosforiladas de MAPK retienen actividad en distinto grado, ello proporcionaría nivel extra de regulación de sus funciones biológicas, ya que la duración y la intensidad de su activación son críticas para inducir respuesta celulares específicas.

En base a los antecedentes descritos, en la presente Tesis Doctoral nos hemos planteado el abordaje de los siguientes objetivos:

1. Identificación de los mecanismos responsables de la maduración, activación catalítica y estabilización de los ortólogos de PKC Pck1 y Pck2.

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de este objetivo han sido publicados en el artículo: *Differential functional regulation of PKC orthologs in fission yeast. The Journal of Biological Chemistry* (2017) 292:11374-11387.

2. Caracterización de la interacción funcional entre las rutas TOR y de integridad celular.

Las evidencias obtenidas tras el desarrollo de este objetivo han sido publicadas en el artículo: *Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast. Scientific reports* (2016) 6:37515.

3. Determinación de la actividad biológica de las formas monofosforilables de las MAP quinasas Sty1 y Pmk1.

Los resultados obtenidos tras el desarrollo de este objetivo han sido publicados en el artículo: *Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast. Cellular signalling* (2015) 27:2534-2542.

4. PUBLICACIONES



Publicación 1:

Differential functional regulation of PKC orthologs in fission yeast

Marisa Madrid, Beatriz Vázquez-Marín, Teresa Soto, Alejandro Franco, Elisa Gómez-Gil, Jerónima Vicente-Soler, Mariano Gacto, Pilar Pérez, José Cansado.

ABSTRACT

The two PKC orthologs Pck1 and Pck2 in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* operate in a redundant fashion to control essential functions, including morphogenesis and cell wall biosynthesis, as well as the activity of the cell integrity pathway and its core element, the MAPK Pmk1. We show here that, despite the strong structural similarity and functional redundancy of these two enzymes, the mechanisms regulating their maturation, activation, and stabilization have a remarkably distinct biological impact on both kinases. We found that, in contrast to Pck2, putative *in vivo* phosphorylation of Pck1 within the conserved activation loop, turn, and hydrophobic motifs is essential for Pck1 stability and biological functions. Constitutive Pck activation promoted dephosphorylation and destabilization of Pck2, whereas it enhanced Pck1 levels to interfere with proper downstream signaling to the cell integrity pathway via Pck2. Importantly, although catalytic activity was essential for Pck1 function, Pck2 remained partially functional independent of its catalytic activity. Our findings suggest that early divergence from a common ancestor in fission yeast involved important changes in the mechanisms regulating catalytic activation and stability of PKC family members to allow for flexible and dynamic control of downstream functions, including MAPK signaling.

Mayo 2017

The Journal of Biological Chemistry,

doi: 10.1074/jbc.M117.786087

<http://www.jbc.org/content/292/27/11374.long>

Publicación 2:

Multiple crosstalk between TOR and the cell integrity MAPK signaling pathway in fission yeast.

Marisa Madrid, Beatriz Vázquez-Marín, Alejandro Franco, Teresa Soto, Jerónima Vicente-Soler, Mariano Gacto, José Cansado

ABSTRACT

In eukaryotic cells, the highly conserved Target of Rapamycin (TOR) and the Mitogen Activated Protein Kinase (MAPK) signaling pathways elicit adaptive responses to extra- and intracellular conditions by regulating essential cellular functions. However, the nature of the functional relationships between both pathways is not fully understood. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* the cell integrity MAPK pathway (CIP) regulates morphogenesis, cell wall structure and ionic homeostasis. We show that the Rab GTPase Ryh1, a TORC2 complex activator, cross-activates the CIP and its core member, the MAPK Pmk1, by two distinct mechanisms. The first one involves TORC2 and its downstream effector, Akt ortholog Gad8, which together with TORC1 target Psk1 increase protein levels of the PKC ortholog Pck2 during cell wall stress or glucose starvation. Also, Ryh1 activates Pmk1 in a TORC2-independent fashion by prompting plasma membrane trafficking and stabilization of upstream activators of the MAPK cascade, including PDK ortholog Ksg1 or Rho1 GEF Rgf1. Besides, stress-activated Pmk1 cross-inhibits Ryh1 signaling by decreasing the GTPase activation cycle, and this ensures cell growth during alterations in phosphoinositide metabolism. Our results reveal a highly intricate cross-regulatory relationship between both pathways that warrants adequate cell adaptation and survival in response to environmental changes.

Octubre 2016

Scientific Reports , doi: 10.1038/srep37515

<http://www.nature.com/articles/srep37515>

Publicación 3:

Distinct biological activity of threonine monophosphorylated MAPK isoforms during the stress response in fission yeast

Beatriz Vázquez-Marín, Teresa Soto, Javier Encinar del Dedo, Alejandro Franco, Jerónima Vicente-Soler, Elena Hidalgo, Mariano Gacto, José Cansado, Marisa Madrid

ABSTRACT

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) define a specific group of eukaryotic protein kinases which regulate a number of cellular functions by transducing extracellular signals to intracellular responses. Unlike other protein kinases, catalytic activation of MAPKs by MAPKKs depends on dual phosphorylation at two tyrosine and threonine residues within the conserved TXY motif, and this has been proposed to occur in an ordered fashion, where the initial phosphorylation on tyrosine is followed by phosphorylation at the threonine residue. However, monophosphorylated MAPKs also exist *in vivo*, and although threonine phosphorylated isoforms retain some catalytic activity, their functional significance remains to be further elucidated. In the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* MAPKs Sty1 and Pmk1 control multiple aspects of fission yeast life cycle, including morphogenesis, cell cycle, and cellular response to a variety of stressful situations. In this work we show that a trapping mechanism increases MAPKK binding and tyrosine phosphorylation of both Sty1 and Pmk1 when subsequent phosphorylation at threonine is hampered, indicating that a sequential and likely processive mechanism might be responsible for MAPK activation in this simple organism. Whereas threonine-monophosphorylated Sty1 showed a limited biological activity particularly at the transcriptional level, threonine-monophosphorylated Pmk1 was able to execute most of the biological functions of the dually phosphorylated kinase. Thus, threonine monophosphorylated MAPKs might display distinct functional relevance among eukaryotes.

Septiembre 2015

Cellular Signalling, doi: 10.1016/j.cellsig.2015.09.017

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089865681500279X?via%3Dihub>

5. CONCLUSIONES



CONCLUSIONES

5.1. 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. Identificación de los mecanismos responsables de la maduración, activación catalítica y estabilización de los ortólogos de PKC Pck1 y Pck2.

Conclusiones:

- A pesar de su fuerte similitud estructural y redundancia funcional, los mecanismos que regulan la maduración, activación y estabilización de Pck1 y Pck2 tienen un impacto sobre su función biológica notablemente distinto.
- El ortólogo de PDK-1, Ksg1, fosforila *in vivo* en el residuo de treonina-823 en el bucle de activación de Pck1, siendo dicha modificación necesaria para proporcionar a la quinasa una conformación estable y funcional.
- Al contrario de Pck2, las fosforilaciones de Pck1 en el bucle de activación y en los motivos de giro e hidrofóbico son esenciales para regular su estabilidad y funciones biológicas.
- La activación constitutiva promueve la desfosforilación y la desestabilización de Pck2, mientras que aumenta los niveles de Pck1, lo que provoca un fenómeno de interferencia en la señalización hacia la ruta de integridad celular dependiente de Pck2.
- Pck1 juega un papel relevante en *S. pombe* como efector de Rho1 durante el control del crecimiento celular y la activación de la ruta de integridad celular.
- Mientras que la actividad catalítica es esencial para la función biológica de Pck1, Pck2 es parcialmente funcional independientemente de esta.

Objetivo 2. Caracterización de la interacción funcional entre las rutas TOR y de integridad celular.

Conclusiones:

- Tor1 (TORC2) y su principal diana, Gad8, regulan positivamente los niveles de Pck2 y la activación de la ruta de integridad celular y la MAPK Pmk1 en respuesta al daño en la pared celular y el ayuno de glucosa.
- El complejo TORC1-Psk1 coopera con TORC2-Gad8 durante el control de la adaptación al estrés, la regulación de los niveles de Pck2, y la activación de la ruta de integridad celular.
- Tor1, Gad8 y Psk1 se asocian a los ribosomas *in vivo* durante la traducción, siendo dicho mecanismo independiente de la presencia de TORC2.

- La regulación por los complejos TORC1 y TORC2 de los niveles de Pck2 y la activación de Pmk1 en respuesta a estrés es independiente de la actividad de la proteína ribosomal Rps6.
- La Rab GTPasa Ryh1 regula positivamente la señalización de la ruta de integridad celular en respuesta a estrés por medio de dos mecanismos, uno dependiente del complejo TORC2, y otro independiente promoviendo la correcta localización en la membrana plasmática y/o el procesamiento de activadores específicos de la ruta CIP.
- Pmk1 regula negativamente la señalización dependiente del complejo TORC2 aguas arriba de Ryh1 durante la respuesta a estrés mediante un mecanismo independiente de Pck2 y Gad8.
- Its3, la fosfatidilinositol 4,5 bifosfato quinasa en *S. pombe*, participa en la señalización de TORC2 en respuesta a estrés e independientemente de su función como activador de la ruta CIP.

Objetivo 3. Determinación de la actividad biológica de las formas monofosforilables de las MAP quinasas Sty1 y Pmk1.

Conclusiones:

- La activación dual de las MAPKs Sty1 y Pmk1 en *S. pombe* es regulada mediante un mecanismo secuencial siguiendo un modelo procesivo.
- La isoforma de Pmk1 monofosforilada en treonina es funcional *in vivo*, regulando la homeostasis iónica, la separación celular, y la adaptación celular frente al estrés.
- La capacidad de la isoforma de Sty1 monofosforilada en treonina para promover la adaptación celular frente al estrés y durante el control de la progresión del ciclo celular es muy limitada. De hecho, es necesaria la presencia de una versión de la quinasa fosforilada dualmente para permitir la expresión de genes dependientes del factor de transcripción Atf1 en respuesta a estrés.
- La incapacidad de fosforilación por la MAPK quinasa de Sty1 y Pmk1 en el residuo de treonina de su bucle de activación provoca la unión constitutiva entre la MAPKK y la MAPK y la hiperfosforilación en el residuo de tirosina.
- La fosforilación en tirosina es un pre-requisito para una adecuada fosforilación de Sty1 y Pmk1 en el residuo de treonina tanto en condiciones basales como en respuesta a estrés.

5.2. Conclusiones generales

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

- La evolución temprana a partir de un antepasado común implicó cambios importantes en los mecanismos que regulan la activación catalítica y la estabilidad de los miembros de la familia PKC, lo que permitiría un control flexible y dinámico de sus funciones biológicas, incluyendo señalización por medio de las rutas de MAP quinasas.

- La interacción funcional entre las rutas de MAP quinasas de integridad celular y TOR permiten la supervivencia celular y adaptación frente a múltiples situaciones ambientales.
- Las formas monofosforiladas en treonina de las MAP quinasas Sty1 y Pmk1 son funcionales *in vivo*, aunque de forma parcial, siendo capaces de fosforilar a sus sustratos y promover una respuesta adaptativa moderada frente a estrés.

